

平成21年 6月12日現在

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19591605  
 研究課題名（和文） 切除不能高度進行肝細胞癌に対する化学療法併用腫瘍新生血管抑制治療法開発の検討  
 研究課題名（英文） Anti-angiogenic gene therapy with chemotherapy for advanced Hepatocellular carcinoma  
 研究代表者  
 平野 公通（HIRANO TADAMICHI）  
 兵庫医科大学・医学部・講師  
 研究者番号90340968

研究成果の概要：強力に腫瘍新生血管を抑制する肝細胞増殖因子（HGF）アンタゴニストであるNK4遺伝子導入に加え腫瘍細胞のDNA合成および分裂を阻害する化学療法レジメを併用し、臨床に応用しうる高度進行肝癌に対する新しいstrategyを確立することを目的として研究を行なった。*in vitro*においてNK4は化学療法を併用しても肝癌増殖抑制に有意に働かなかった。マウスxenograft modelに対しアデノウイルスベクターAd.NK4を導入して*in vivo*での検討を行ったところ、有意にNK4+化学療法群で腫瘍増殖抑制効果を確認した。

## 交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：消化器外科学

キーワード：(1)HGF (2)NK4 (3)肝細胞癌 (4)新生血管抑制

## 1. 研究開始当初の背景

外科的治療を含む集学的治療の進歩により肝細胞癌に対する治療は近年著しく発展したが、門脈および肝静脈より下大静脈に浸潤し、腫瘍栓を伴う高度進行肝細胞癌症例はきわめて予後不良であり、無治療の場合、生存期間中央値は約3ヵ月とされている。多くの症例において、

手術不能であり、切除しえても、早期に遠隔・肝内転移をきたす。切除不能症例において門脈腫瘍栓を伴う症例に対しては肝動脈塞栓療法（TAE）は肝に梗塞をおこすため絶対禁忌であり、肝動脈よりの化学療法が唯一の治療法となるが、今まで報告されてきたフルオロウラシル（5FU）単

独あるいは5FUとシスプラチン(CDDP)を併用した low dose FP 療法では奏効率、生存率ともにきわめて低い。脈管浸襲症例は転移、進展がきわめて早く、今後このような進行肝癌の予後を改善するためには今までの腫瘍殺傷を期待した化学療法に加えて新しい戦略が必須と考えられる。われわれは肝細胞増殖因子(HGF)のアンタゴニストであるNK4を用いて肝癌に対する遺伝子治療研究を行ってきた(J Hepatol, 2006)。HGFの受容体であるc-Metは、多くの癌細胞で発現されており、HGFは癌-間質相互作用を介して癌の悪性化に働いているため、HGF-c-Met受容体系の阻害は、有効な制癌戦略になることが考えられる。HGFアンタゴニストNK4は、HGFの癌-間質相互作用を断ち、強力な腫瘍血管新生抑制および腫瘍の浸潤・転移を抑制する。現在までにマウス皮下腫瘍および肝腫瘍モデルにおいて著明な腫瘍新生血管抑制および浸潤・転移の抑制、それによる優れた増殖抑制効果を確認した。本治療法の特徴は、HGFの新生血管誘導をblockするだけでなく、強力な血管新生因子であるVEGFやbFGFの作用も阻害することにより、既存の血管新生抑制薬より強力に腫瘍新生血管を阻害する。加えてHGFにより誘導される腫瘍の浸潤・転移を阻害しえるため既に血管内に進展した腫瘍の増殖を阻止しえ、肝癌に対する新たな分子治療に発展する可能性を有すると考えられた。

## 2. 研究の目的

前回の研究では、腫瘍増殖を抑制し“tumor dormancy”の状態に誘導しえたが完全消失には至らなかった。そこで、これらの研究結果をふまえて、今回の研究目的は本治療法に腫瘍細胞のDNA合成および分裂を阻害する化学療法レジメを併用してより強力な、臨床に応用しうる、高度進行肝癌に対する新しいstrategyを確立することを目的とした。

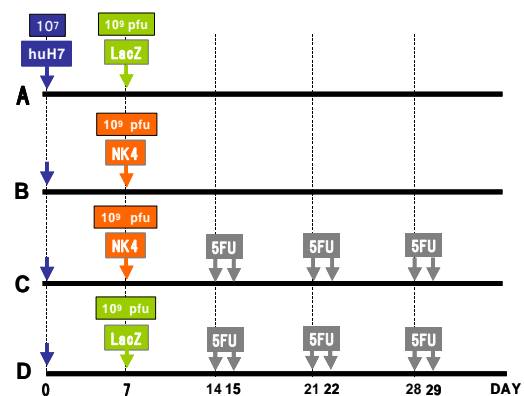
## 3. 研究の方法

### (1) in vitro における検討

in vitro におけるNK4と化学療法の効果を検討すべくヒト肝癌細胞 Huh7 を用いて以下の群に分けて検討した。1. Control 2. Ad.LacZ 3. Ad.Nk4 4. CDDP+5FU 5. Ad.LacZ + CDDP+5FU 6. .Ad.Nk4+ CDDP+5FU Huh7 を  $1 \times 10^5$  個/ml になるように調整 24well プレートで培養後に MOI30 でアデノウイルスベクターを感染、Alamar Blue 測定(24h , 72h , 7day)。

### (2) in vivo における検討

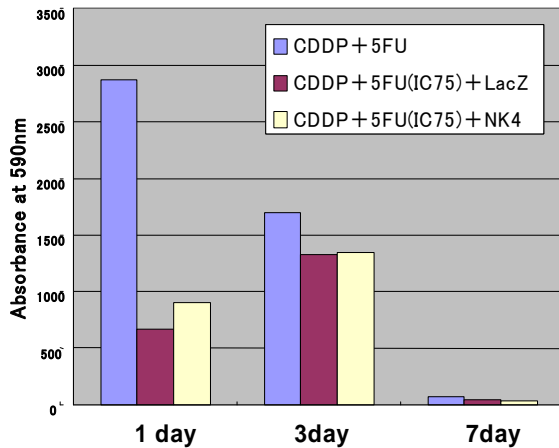
免疫不全マウスにヒト肝癌細胞を移植して作製した xenograft model を用いて in vivo での検討を行った。遺伝子導入ベクターとして、NK4を強力に発現するアデノウイルスベクターAd.NK4 およびコントロールベクターとして LacZ 発現ベクター Ad.LacZ を作製・精製し、ヌードマウス皮下にヒト肝癌細胞  $10^7$  個を移植して7日後腫瘍体積が約  $100\text{mm}^3$  になった時点でマウスを1. LacZ導入群、2. NK4導入群、3. NK4+化学療法群に分けて遺伝子導入および5FUの腹腔内投与を施行、週2回腫瘍体積を経時的に測定して28日目に全て犠死させて sampling 行なった。摘出した腫瘍は CD31 免疫染色を行い新生血管抑制効果を検討した。



#### 4. 研究成果

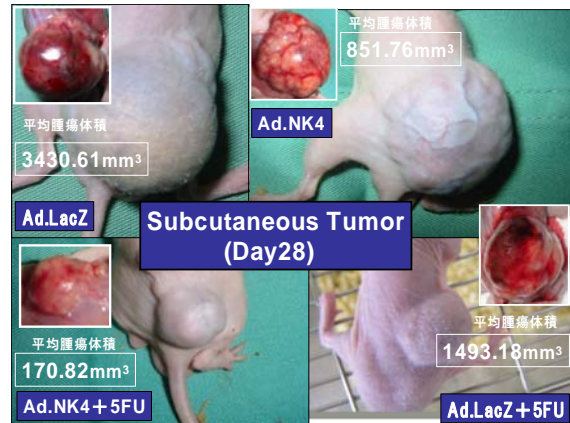
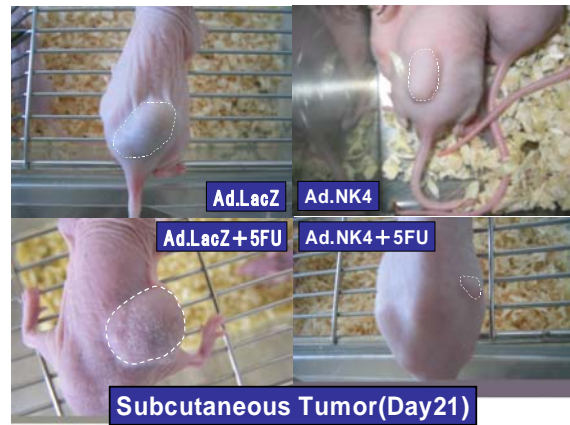
##### (1) in vitro における検討

*in vitro* においてNK4は化学療法を併用しても肝癌増殖抑制に有意に働かなかった( Ad.LacZ + CDDP+5FU vs..Ad.Nk4+ CDDP+5FU)。これは *in vitro* においては新生血管の寄与が認められないためであると判断した。

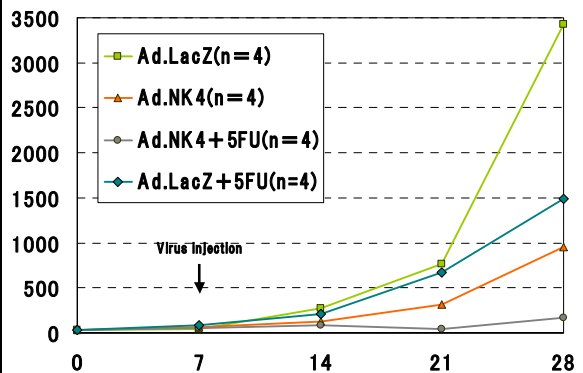


##### (2) in vivo における検討

ヌードマウス皮下にヒト肝癌細胞HuH710<sup>7</sup>個を移植して7日後腫瘍体積が約100mm<sup>3</sup>になった時点でマウスを1. LacZ導入群、2. NK4導入群、3. NK4+化学療法群に分けて遺伝子導入および5FUの腹腔内投与を施行、週2回腫瘍体積を経時的に測定して28日目に全て犠死させてsampling行なった。その結果、28日目における腫瘍体積(mm<sup>3</sup>)はLacZ導入群:3430.6、NK4導入群:851.8、NK4+化学療法群:170.8と有意にNK4+化学療法群で腫瘍増殖抑制効果を確認した。



各群における腫瘍体積の推移



現在採取した腫瘍をCD31免疫染色後3D構築  
行ない、さらに走査電顕にて腫瘍内新生血管分  
布を精査中であると共に、肝腫瘍モデルでも同  
様の結果が得られるか研究遂行中である。

5. 主な発表論文等  
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者に  
は下線)

[学会発表] (計 1 件)

①Jiro Fujimoto

Strategies of gene therapy for HCC  
アジア太平洋肝臓病学会 (APASL)  
2008 年 3 月 24 日 ソウル

6. 研究組織

(1)研究代表者

平野 公通 (HIRANO TADAMICHI)  
兵庫医科大学・医学部・講師  
研究者番号: 90340968

(2)研究分担者

藤元 治朗 (FUJIMOTO JIRO)  
兵庫医科大学・医学部・教授  
研究者番号: 90199373

飯室 勇二 (IIMURO YUJI)  
兵庫医科大学・医学部・准教授  
研究者番号: 30252108

岡田 敏弘 (OKADA TOSHIHIRO)  
兵庫医科大学・医学部・助教  
研究者番号: 70351799

(3)連携研究者