

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年4月24日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590729

研究課題名（和文） 骨髄系血管・免疫前駆細胞を標的とした新規肝癌治療法の開発

研究課題名（英文） Development of novel therapy for hepatocellular carcinoma targeting of bone marrow-derived angiogenesis precursor

研究代表者

考藤 達哉（KANTO TATSUYA）

大阪大学・医学系研究科・寄附講座准教授

研究者番号：80372613

研究成果の概要（和文）：

肝癌の発癌、治療後の再発や転移には、腫瘍血管新生が関与している。TIE2陽性単球（TEM）は、血管新生因子 Angiopoietin の受容体（TIE2）を発現し、癌における血管新生への関与が報告されている。本研究では肝癌における TEM の臨床的意義と、肝癌による TEM への分化誘導機序を明らかにすることを目的とした。肝癌患者では末梢血、肝癌組織で TEM が増加しており、TEM 頻度は血管新生の指標と有意に正相関した。TEM は肝硬変と肝癌の判別能に優れており、肝癌治療後の再発に伴って増加し、診断・予後マーカーとして有用である。TEM への分化には肝癌由来の M-CSF、TNF- α 、IL-1 β が関与していた。TEM は肝癌における血管新生の制御を目指す治療標的となりうる。

研究成果の概要（英文）：

Angiogenesis is a critical step in the development of vascular-rich hepatocellular carcinoma (HCC). TIE-2, a receptor of angiopoietins, conveys pro-angiogenic signals. We thus aimed to clarify the roles of TIE2-expressing monocytes (TEMs) in the clinical management of HCC and to identify molecules involving in the differentiation of TEMs. In HCC patients, the frequency of TEMs in the periphery and in the liver was significantly higher than those in non-HCC groups. In patients who underwent local ablation of HCC, the frequency of TEMs changed in parallel with the recurrence of HCC. A significant positive correlation was observed between micro-vessel density in HCC tissues and the frequencies of TEMs, suggesting that TEMs are involved in angiogenesis in the liver. Receiver operating characteristic analyses revealed the superiority of TEM frequency to AFP, PIVKA-II and ANG-2 levels as a diagnostic for HCC. TEMs were generated from TIE2-negative monocytes in the presence of M-CSF, TNF- α and IL-1 β . In conclusion, the frequency of TEMs can be used as a diagnostic marker for HCC, potentially reflecting angiogenesis in the liver.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：肝癌、血管新生、TIE2

1. 研究開始当初の背景

C型肝硬変からの発癌、治療後の再発や転移には、腫瘍血管の新生や免疫抑制細胞の増加が関与している。肝癌患者の予後を改善するためには、肝癌の再発予防が重要である。TIE2陽性単球(TEM)は、血管新生因子Angiopoietinの受容体(TIE2)を発現し、癌における血管新生への関与が報告されている。

2. 研究の目的

本研究では肝癌による血管新生と免疫抑制に関与する骨髄系前駆細胞(特にTEM)に着目し、その血液中、組織中での動態と臨床病態との関連性、臨床への応用性を明らかにする。また、新生血管前駆細胞の血液から肝臓への遊走や血管内皮、免疫抑制細胞、TEMなどへの分化に関与する分子を同定し、それを標的とする肝癌に対する新規治療法の確立を目指す。

3. 研究の方法

(1) 肝癌患者の血液、癌組織での血管前駆細胞(TEM)の同定と頻度・機能解析
血管内皮前駆細胞(EPC)やTIE-2発現単球(TEM)、VEGFR2発現単球や骨髄系幼若細胞(CD34+)などがその候補となる。これらの細胞を表面抗原の発現プロファイルから同定し、血中、肝癌組織、非癌部組織での頻度と表現型を解析する。慢性肝疾患の各Stage(慢性肝炎、肝硬変、肝癌)での差異、癌の進展度や肝癌組織での血管新生因子(VEGF、ANGなど)の発現との関連性を検討することで、肝癌進展、再発における役割を解明する。

(2) 血管新生前駆細胞の分化誘導機構の解明と責任分子の同定
EPCやミエロイド系細胞を血液中、肝組織中から採取し、肝癌で発現するサイトカイン(TNF α 、TGF β 、IFN γ など)やケモカイン(M-CSF、CCL2、MIP1 α など)、血管新生因子(HGF、VEGF、ANGなど)で処理する。処理前後で遺伝子発現を網羅的に比較し、遊走先(肝癌部)での接着能や分化に関与する遺伝子を同定する。以上の検討から絞り込んだ分子とそのシグナル伝達経路

(Tie-2/PI3K/Aktなど)を特異抗体やsiRNAで阻害することで、前駆細胞の肝への遊走と分化を制御する方法を明らかにする。

4. 研究成果

(1) TEMはCD14⁺CD16⁺VEGFR2⁺Tie-2⁺の表現型であり、CD80、CD86、CCR4、CX3CR1などを高発現していた。高速ソーティングによって、肝癌患者末梢血、癌組織か

ら高純度TEMを採取可能であった。HCV陽性慢性肝疾患患者での末梢血TEM頻度は、肝癌患者で有意に他群より高値であり、肝硬変群とも差を認めた。またTEMは、末梢血に比較して肝癌組織で高頻度であり、肝癌組織へ集積すると考えられた。末梢TEM頻度は、慢性肝疾患と肝癌との判別にAFP値より感度、特異度とも優れており、ROC解析でも高いAUC値となった。RFAや肝切除による肝癌治療によって、TEM頻度は有意に減少した。以上の結果より、肝発癌に伴ってTEMが増加することが明らかになった。

(2) 免疫蛍光組織染色にてTEMは肝癌周辺部に同定され、血管壁細胞近傍に特に集積していた。また血管新生をCD34陽性細胞密度(MVD)で評価すると、末梢血TEM頻度、肝癌組織中TEM頻度は、MVDと有意に正相関を認めた。治療前のTEM頻度を中央値でカテゴリー化すると、肝癌患者のTEM高値群は低値群に比較して、治療後の無再発期間は有意に短かった。またTEM高値群は低値群に比べて、Child B群が多く、肝予備能が有意に低かった。以上の結果より、TEMは肝癌における血管新生に関与しており、TEMの解析は治療後再発、予後の予測マーカーとしても有用であることが示唆された。

(3) 健康成人の末梢血からTIE2陰性単球をSortingし、種々のサイトカイン、造血因子刺激を加えて、TIE2の誘導の有無を評価した。M-CSF存在下でTNF- α 、IL-1 β の刺激を加えると、TIE2が有意に発現した。またヒト肝癌切除標本でM-CSF陽性と陰性の群を比較すると、M-CSF陽性肝癌患者では、陰性患者に比較して、TEM頻度が高く、MVD高値であり、術後の再発率が高かった。以上より、M-CSFと炎症刺激によって、肝癌患者ではTEMが誘導され、血管新生の亢進を介して再発率に関与することが示唆された。

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)

[雑誌論文] (計12件)

1. Matsubara, T., Kanto, T., Kuroda, S., Yoshio, S., Higashitani, K., Kakita, N., Miyazaki, M., Sakakibara, M., Hiramatsu, N., Kasahara, A., Tomimaru, Y., Tomokuni, A., Nagano, H., Hayashi, N. and Takehara, T., TIE2-expressing monocytes as a diagnostic marker for hepatocellular carcinoma correlated with angiogenesis. *Hepatology* 2013. 57:1416-1425.

2. Harada, N., Hiramatsu, N., Oze, T., Yamada, R., Kurokawa, M., Miyazaki, M., Yakushijin, T., Miyagi, T., Tatsumi, T., Kiso, S., Kanto, T., Kasahara, A., Oshita, M., Mita, E., Hagiwara, H., Inui, Y., Katayama, K., Tamura, S., Yoshihara, H., Imai, Y., Inoue, A., Hayashi, N. and Takehara, T., Incidence of hepatocellular carcinoma in HCV-infected patients with normal alanine aminotransferase levels categorized by Japanese treatment guidelines. *J Gastroenterol* 2013. in press
3. Kanto, T., Inoue, M., Oze, T., Miyazaki, M., Sakakibara, M., Kakita, N., Matsubara, T., Higashitani, K., Hagiwara, H., Iio, S., Katayama, K., Mita, E., Kasahara, A., Hiramatsu, N., Takehara, T. and Hayashi, N., Dynamics of regulatory T cells and plasmacytoid dendritic cells as immune markers for virological response in pegylated interferon-alpha and ribavirin therapy for chronic hepatitis C patients. *J Gastroenterol* 2012. 47: 169-178.
4. Tsunematsu, H., Tatsumi, T., Kohga, K., Yamamoto, M., Aketa, H., Miyagi, T., Hosui, A., Hiramatsu, N., Kanto, T., Hayashi, N. and Takehara, T., Fibroblast growth factor-2 enhances NK sensitivity of hepatocellular carcinoma cells. *Int J Cancer*. 2012. 130: 356-364
5. Kakita, N., Kanto, T., Itose, I., Kuroda, S., Inoue, M., Matsubara, T., Higashitani, K., Miyazaki, M., Sakakibara, M., Hiramatsu, N., Takehara, T., Kasahara, A. and Hayashi, N., Comparative analyses of regulatory T cell subsets in patients with hepatocellular carcinoma: a crucial role of CD25(-) FOXP3(-) T cells. *Int J Cancer* 2012. 131: 2573-2583
6. Sakakibara, M., Kanto, T., Hayakawa, M., Kuroda, S., Miyatake, H., Itose, I., Miyazaki, M., Kakita, N., Higashitani, K., Matsubara, T., Hiramatsu, N., Kasahara, A., Takehara, T. and Hayashi, N., Comprehensive immunological analyses of colorectal cancer patients in the phase I/II study of quickly matured dendritic cell vaccine pulsed with carcinoembryonic antigen peptide. *Cancer Immunol Immunother* 2011. 60: 1565-1575
7. Shimizu, S., Takehara, T., Hikita, H., Kodama, T., Tsunematsu, H., Miyagi, T., Hosui, A., Ishida, H., Tatsumi, T., Kanto, T., Hiramatsu, N., Fujita, N., Yoshimori, T. and Hayashi, N., Inhibition of autophagy potentiates the antitumor effect of the multikinase inhibitor sorafenib in hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer* 2011. 131: 548-557.
8. Shigekawa, M., Takehara, T., Kodama, T., Hikita, H., Shimizu, S., Li, W., Miyagi, T., Hosui, A., Tatsumi, T., Ishida, H., Kanto, T., Hiramatsu, N. and Hayashi, N., Involvement of STAT3-regulated hepatic soluble factors in attenuation of stellate cell activity and liver fibrogenesis in mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2011. 406: 614-620.
9. Oze, T., Hiramatsu, N., Yakushijin, T., Mochizuki, K., Oshita, M., Hagiwara, H., Mita, E., Ito, T., Inui, Y., Fukui, H., Hijioka, T., Katayama, K., Tamura, S., Yoshihara, H., Inoue, A., Imai, Y., Hayashi, E., Kato, M., Hosui, A., Miyagi, T., Ishida, H., Yoshida, Y., Tatsumi, T., Kiso, S., Kanto, T., Kasahara, A., Takehara, T. and Hayashi, N., Efficacy of re-treatment with pegylated interferon plus ribavirin combination therapy for patients with chronic hepatitis C in Japan. *J Gastroenterol* 2011. 46: 1031-1037.
10. Tatsumi, T., Takehara, T., Miyagi, T., Sugiyama, T., Aketa, H., Sasakawa, A., Kanto, T., Hiramatsu, N. and Hayashi, N., alpha-Galactosylceramide activates antitumor immunity against liver tumor. *Hepatol Res* 2011. 41: 160-169.
11. Inoue, Y., Hiramatsu, N., Oze, T., Yakushijin, T., Mochizuki, K., Fukuda, K., Mita, E., Haruna, Y., Inoue, A., Imai, Y., Hosui, A., Miyagi, T., Yoshida, Y., Tatsumi, T., Kiso, S., Kanto, T., Kasahara, A., Takehara, T. and Hayashi, N., Amino acid substitution in the core protein has no impact on relapse in hepatitis C genotype 1 patients treated with peginterferon and ribavirin. *J Med Virol* 2011. 83: 419-427.
12. Miyagi, T., Takehara, T., Uemura, A., Nishio, K., Shimizu, S., Kodama, T., Hikita, H., Li, W., Sasakawa, A., Tatsumi, T., Ohkawa, K., Kanto, T., Hiramatsu, N. and Hayashi, N., Absence of invariant natural killer T cells deteriorates liver inflammation and fibrosis in mice fed high-fat diet. *J Gastroenterol* 2010. 45: 1247-1254.

[学会発表] (計6件)

1. Matsubara T, Kanto T, Kuroda S, Yoshio S, Higashitani K, Miyazaki M, Hiramatsu N, Kasahara A, Takehara T. TIE2-expressing monocytes are feasible angiogenesis-related cellular diagnostics for hepatocellular carcinoma: Involvement of inflammatory cytokines in the generation. The Liver Meeting AASLD 63rd Annual Meeting and Postgraduate Course, Boston, MA, USA,

- 2012, Nov 10.
2. Matsubara T, Kanto T, Kuroda S, Yoshio S, Higashitani K, Kakita N, Miyazaki M, Hiramatsu N, Kasahara A, Takehara T. Pro-angiogenic receptor TIE2-expressing monocytes/TEM as novel diagnostic biomarker for hepatocellular carcinoma The Liver Meeting AASLD 62nd Annual Meeting and Postgraduate Course, San Francisco CA, USA 2011, Nov 7.
 3. Kakita N, Kanto T, Miyazaki M, Yoshio S, Kuroda S, Matsubara T, Higashitani K, Sakakibara M, Hiramatsu N, Kasahara S, Takehara T, Hayashi N. Enhanced ability of IL28A and IL28B induction in plasmacytoid dendritic cells in chronic hepatitis C patients with major allele of IL28B single nucleotide polymorphism. The Liver Meeting AASLD 62nd Annual Meeting and Postgraduate Course, San Francisco CA, USA 2011, Nov 7.
 4. Oze T, Hiramatsu N, Yakushijin T, Doi Y, Ogawa H, Hagiwara H, Mita E, Kaneko A, Katayama K, Hijioka T, Tamura S, Yoshihara H, Inoue A, Imai Y, Hayashi E, Hosui A, Miyagi T, Yoshida Y, Tatsumi T, Kiso S, Kanto T, Kasahara A, Hayashi N, Takehara T. Viral suppression at week 4 exceeds the IL28B SNP for predicting SVR in pegylated interferon plus ribavirin combination therapy of genotype 1 infected patients with chronic hepatitis. The Liver Meeting AASLD 62nd Annual Meeting and Postgraduate Course, San Francisco CA, USA 2011, Nov 7
 5. Matsubara T, Kanto T, Higashitani K, Kakita N, Miyazaki M, Inoue M, Sakakibara M, Hiramatsu N, Takehara T, Kasahara A, Hayashi N. Pro-angiogenic receptor TIE2-expressing monocytes/ TEMs as novel diagnostic biomarker for hepatocellular carcinoma. The Liver Meeting AASLD 61st Annual Meeting and Postgraduate Course, Boston MA, USA, 2010, Oct 30.
 6. Kakita N, Kanto T, Matsubara T, Higashitani K, Miyazaki M, Sakakibara M, Hiramatsu N, Takehara T, Kasahara A, Hayashi N. Distinctive roles of IL-10-producing Type 1 regulatory T cells (Tr1) in the pathogenesis of hepatitis C virus-infected hepatocellular carcinoma. The Liver Meeting AASLD 61st Annual Meeting and Postgraduate Course, Boston MA, USA, 2010, Oct 30.

[その他]

ホームページ等

大阪大学大学院医学系研究科消化器内科学

ホームページ

<http://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/gh/index.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

考藤 達哉 (KANTO TATSUYA)

大阪大学・大学院医学系研究科・寄附講座
准教授

研究者番号：80372613

(2) 研究分担者

竹原 徹郎 (TAKEHARA TETSUO)

大阪大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：70335355

平松 直樹 (HIRAMATSU NAOKI)

大阪大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：30362700

(3) 連携研究者

なし