

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 6 月 11 日現在

機関番号：37104

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22590752

研究課題名（和文）iPS 細胞を用いた肝細胞癌に対する血管新生抑制遺伝子治療
のベクター細胞作製の試み研究課題名（英文）Development of iPS cells-derived vector cells for antiangiogenic gene
therapy for hepatocellular carcinoma.

研究代表者

鳥村 拓司 (TORIMURA TAKUJI)

久留米大学・先端癌治療研究センター・教授

研究者番号：60197986

研究成果の概要（和文）：本研究は iPS 細胞から肝細胞癌組織へ高率に遊走するベクター細胞を作成し、この細胞に血管新生抑制因子を遺伝子導入し担癌マウスに投与することで抗腫瘍効果を得ることを目的としたものである。当初、マウス iPS 細胞から平滑筋細胞を作製しベクター細胞にする予定であったが細胞の増殖能と腫瘍への遊走能が予想に反して低かったためヒト iPS 細胞から間葉系幹細胞を作成し、さらに遊走能を高めるため CXCR4 cDNA を遺伝子導入し、かつ、担癌マウスに投与した細胞が腫瘍部で様々な増殖因子を産生して腫瘍の増大を促進しないように HIF1- α の siRNA を遺伝子導入しベクター細胞を完成させた。この細胞に血管新生抑制因子である可溶性 VEGF レセプター-1, 2 をアデノウイルスを用いて ex vivo で遺伝子導入後担癌マウスの尾静脈から 1×10^6 個を週 1 回 4 週間にわたり投与した。その結果、対照群に比べて腫瘍の増大が抑制された。投与したベクター細胞は主に腫瘍内の間質に存在し、その一部は血管内皮細胞や平滑筋細胞にも分化していたが非主要部へのベクター細胞の浸潤は乏しかった。さらに腫瘍内血管密度は減少していた。ベクター細胞を投与する事での骨髄系および肝機能への影響はみられなかった。

研究成果の概要（英文）：In the present study, we investigated the anti-tumor effects of anti-angiogenic gene therapy with iPS cell-derived vector cells transfected soluble VEGF receptor-1 and 2 cDNAs. At first, we tried to develop the vector cells from mouse iPS cells. However, mouse iPS cell-derived smooth cells showed less proliferative activity and less homing to tumor tissues than we had expected. So, we changed to construct mesenchymal stem cells from human iPS cells. After constructing mesenchymal stem cells, we transferred CXCR4 cDNA to mesenchymal stem cells to up-regulate the ability of homing to tumor tissues. As vector cells might produce several kinds of growth factors through the activation of HIF signaling under hypoxic condition in tumor tissues, we reduced the expression of HIF1- α with siRNA technique. Then, we transferred soluble VEGF receptor-1 and 2 cDNAs with adenovirus vector and injected the vector cells (1×10^6 /week for 4 weeks) to tumor-bearing mice of hepatoma cells through the tail vein. After 4 weeks of initial treatment, tumor growth was suppressed comparing with non-treated control mice. Injected vector cells mainly located in the stroma of tumor tissues. Some of vector cells differentiated to endothelial cells and smooth muscle cells in tumor tissues. The microvascular density in tumor tissues was decreased comparing with control group. The homing of vector cells to non-cancerous tissues was rarely detected. Severe adverse events such as bone marrow suppression or abnormality of liver function test were not observed.

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	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
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：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：血管新生抑制遺伝子療法、肝細胞癌、iPS細胞、間葉系幹細胞

1. 研究開始当初の背景

従来、腫瘍血管は既存の血管の内皮細胞が分裂して新たに血管が伸長すると考えられていたが、新たに骨髄から腫瘍組織へ選択的に遊走し血管を構築する血管内皮前駆細胞の存在が明らかとなった。さらに最近では、骨髄中に腫瘍組織へ選択的に遊走し血管周囲の平滑筋細胞や線維芽細胞に分化する間葉系幹細胞の存在も証明され、様々な細胞が腫瘍組織への特異的遊走能を有していることが明らかとなった。

1971年にFolkmanによって提唱された血管新生抑制療法は近年悪性腫瘍に対する新しい概念の治療法として注目されている。我々は、今日までにラット肝発癌モデルに対し血管新生抑制剤であるTNP-470の全身投与、マウス肝癌モデルにおいて血管新生抑制物質であるKringlet-5のcDNAを用いた遺伝子治療、さらにVEGF receptor2とEGF receptorの阻害薬であるVandetanibいずれもが腫瘍容積の抑制、肝内転移の抑制、予後が改善したことを明らかにしてきた。また、平成19年度から21年度にかけての科学研究費補助金による研究で骨髄細胞から血管内皮前駆細胞と血管平滑筋前駆細胞を作製し血管新生抑制因子として可溶性VEGF receptor 2を遺伝子導入後、マウス肝癌モデルに投与したところ両細胞とも腫瘍組織へ遊走し軽度ではあるが抗腫瘍効果を認めたことを証明した。

肝細胞癌は悪性腫瘍のなかでも腫瘍血管の形成が特に盛んであり、肝細胞癌の増殖進展過程において血管形成は不可欠である。腫瘍血管の形成に関与する様々な増殖因子のうち、我々を含めて多くの研究から肝細胞癌の血管形成には腫瘍組織から分泌されるVascular endothelial growth factor (VEGF) が重要な働きをしていることが明らかとなっ

た。2008年にSHARP試験においてヒト肝細胞癌においてVEGFを介した血管形成をSorafenibが抑制し抗腫瘍効果を得ることが明らかとなった。しかし、ヒト肝細胞癌はほとんどが肝硬変症を合併しているためか臨床様々な副作用が出現し継続使用が困難になる場合が多いこと、予後の延長がわずかに3カ月であることから肝細胞癌における血管新生抑制療法は副作用を軽減し、さらに予後を延長することが今後の大きな課題である。そのためには、腫瘍局所でのみ強力に血管新生を抑制する必要がある。

2006年に山中らによって報告されたiPS細胞はあらゆる細胞への分化が可能な細胞として細胞療法などの分野で注目されている。iPS細胞から腫瘍組織へ選択的に遊走する細胞を作製することが出来れば血管新生抑制遺伝子療法の理想的なベクター細胞として用いることができ、腫瘍局所でのみ強力に血管新生を抑制可能なため副作用を軽減できる。さらに、iPS細胞は一度作製すれば必要な時に何度でも培養可能であり、長期間の遺伝子治療に適していると考えられる。

2. 研究の目的

ヒト肝細胞癌に対するSorafenibを用いた血管新生抑制療法は一定の効果は認められるものの対照群に比べてわずか3ヶ月の予後延長効果にとどまりさらに、副作用が多いことが実臨床の場で大きな問題となっている。本研究は、これら臨床の場で主に問題になっていることを解決し、Sorafenibによる治療に比べより強力に腫瘍局所において作用する副作用の少ない血管新生抑制遺伝子療法

の近い将来におけるヒト肝細胞癌に対する臨床応用を目指した研究である。

遺伝子のベクターとして選択的に腫瘍細胞への遊走能を有する細胞を iPS 細胞から作製し、強力な血管新生抑制物質である可溶性 VEGF receptor 1+ VEGF receptor 2 の遺伝子を ex vivo で導入しマウス肝癌モデルに対し投与することで腫瘍局所でのみ強力な血管新生抑制作用を発揮し副作用なく抗腫瘍効果が得られることを証明する。

3. 研究の方法

*in vitro*での検討

(1) ヒト iPS 細胞から間葉系幹細胞 (MSC) の作成: Lian らの方法に準じて iPS 細胞をグラチンコートディッシュでノックアウト

DMEM+10% serum replacement

medium+bFGF+PDGF AB+EGF で培養し、7 日後にマグネットビーズ法により CD105⁺CD24⁻の細胞を採取する。次に、採取された細胞が MSC であることを確認するために CD44, CD29, CD49e, CD166, CD34, CD31 に発現を FACS で解析する。

(2) MSC に対し CXCR4 遺伝子の導入: ソウル国立大学の Shin 教授より供与されたマウス CXCR4 cDNA を MSCV ベクターに組み込んだのち Retropack PT67 細胞に遺伝子導入した後、培養液中に分泌された CXCR4 cDNA を組み込んだレトロウイルスを回収する。このウイルスを MSC に遺伝子導入し安定株を確立する。さらに、Boyden chamber を用いて SDF-1 に対する遊走能が CXCR4 cDNA を遺伝子導入していない細胞に比べ亢進することを証明する。

(3) HIF1-alpha に対する siRNA の遺伝子導入: ベクター細胞が腫瘍組織へ遊走したときに腫瘍内の低酸素状態のために HIF1-alpha が増加して VEGF, PDGF, bFGF, TGF-alpha などの増殖因子が増加して腫瘍の増殖を促進することを抑制するためにレンチウイルスを用いて(2)で作成した細胞に対し

HIF1-alpha に対する siRNA を遺伝子導入し安定株を作成する。作成した安定株で

HIF1-alpha の mRNA が低下していることを Real-time PCR にて確認し、低酸素培養下で VEGF, SDF-1, TGF-alpha, bFGF などの産生が低下していることを確認する。

(4) 可溶性 VEGF レセプター1,2 の cDNA を組み込んだアデノウイルスベクターの作製: スタンフォード大学の Kuo 教授から供与された可溶性 VEGF レセプター1,2 の cDNA を細胞に感染すると蛍光色素を発するアデノウイルスベクターである pLP-Adeno-X-CNV ベクターへの組み込み。

*in vivo*での検討

(5) ベクター細胞の腫瘍組織への遊走能の評価: MSC と MSC にマウス CXCR4 cDNA を遺伝子導入した細胞に蛍光色素を標識した後、担癌マウス (Hepa1-6, KYN-2 細胞皮下接種モデル)の尾静脈から投与し腫瘍部への選択的な遊走能を比較する。

(6) マウス肝癌モデルにおける抗腫瘍効果の評価: ノドマウスの皮下に肝細胞癌細胞株を接種し作製したマウスの尾静脈から MSC にマウス CXCR4 cDNA と HIF1-alpha に対する siRNA を遺伝子導入したベクター細胞に対し、可溶性 VEGF レセプター1,2 の cDNA を組み込んだ pLP-Adeno-X-CNV アデノウイルスベクターを感染させ、細胞が赤色を呈する感染細胞のみをマグネットビーズ法で採取し、 1×10^6 個を週 1 回 4 週間にわたり投与する。この間継時的に腫瘍容積を計測する。

(7) マウス肝癌モデルにおけるベクター細胞の局在と血管新生抑制効果の検証: 投与したベクター細胞が選択的に腫瘍組織へ遊走しどのような細胞に分化しているかを免疫組織化学にて検証する。さらに、63 倍で観察し 1 視野あたりの CD31 陽性血管数を対照群と比較する。

(8) 副作用の検証：血管新生抑制剤の全身投与で認められる骨髄抑制、肝機能異常、手足皮膚反応などの副作用の有無を検証する。

4. 研究成果

(1) ヒト iPS 細胞から間葉系幹細胞 (MSC) の作成：平成 22 年度、23 年度はマウス iPS 細胞から α SMA 陽性平滑筋細胞を作製し CXCR4 遺伝子をレトロウイルスを用いて導入した。しかし、この細胞は Boyden chamber による SDF-1 に対する細胞遊走能を CXCR4 遺伝子を導入していない α SMA 陽性細胞と比較したがわずかに遊走能が亢進しているのみであった。パイロット的にこの細胞に可溶性 VEGF レセプター 1,2 の cDNA を組み込んだ pLP-Adeno-X-CNV アデノウイルスベクターを感染させ、抗腫瘍効果を検証した。その結果、抗腫瘍効果は認められたもののこの細胞は継代を重ねることで細胞の増殖力も低下し治療に用いるには不相当と判断し、2012 年度はヒト iPS 細胞から CD105⁺CD24⁻の細胞を作製した。さらに、この細胞は CD44(+), CD29(+), CD49e(+), CD166(+), CD34(-), CD31(-)で間葉系幹細胞の表現型と一致していた。さらに、この細胞は増殖能も良好に保たれておりベクター細胞を作成するのに適していると思われた。

(2) MSC に対しマウス CXCR4 遺伝子の導入：レトロウイルスベクターを用いて CXCR4 cDNA を遺伝子導入し G418 にて感染細胞のみを採取し安定発現株を作製した。この細胞にマウス CXCR4 cDNA が発現していることを RT-PCR にて確認した。さらに、Boyden chamber を用いて SDF-1 に対する遊走能を MSC と比較したところ CXCR4 cDNA を遺伝子導入した細胞が輸送能が亢進していた。

(3) HIF1-alpha に対する siRNA の遺伝子導入：レンチウイルスを用いて HIF1-alpha に対する siRNA を遺伝子導入し安定発現株を作

製し MSC に CXCR4 cDNA と HIF1-alpha に対する siRNA を遺伝子導入したベクター細胞を作製した。HIF1-alpha 発現の抑制効果は Real-time PCR にて確認した。さらに、低酸素培養下で VEGF, SDF-1, TGF-alpha, bFGF の発現低下も Real-time PCR にて確認した。この結果、*in vivo* において投与したベクター細胞が腫瘍組織内の低酸素状態で VEGF, SDF-1, TGF-alpha, bFGF の産生が亢進して腫瘍の増大を促進する危険性は回避できると考えられた。

(4) 可溶性 VEGF レセプター 1,2 の cDNA を組み込んだアデノウイルスベクターの作製：幹細胞へのアデノウイルスを用いた遺伝子導入の効率は高くない。よって、ベクター細胞の治療効果を上げるためには遺伝子導入できたベクター細胞のみを担癌マウスに投与する必要がある。今回は、遺伝子導入ができた細胞に蛍光色素を発現させることができる pLP-Adeno-X-CNV ベクターに可溶性 VEGF レセプター 1,2 の cDNA を組み込んだ。

(5) ベクター細胞の腫瘍組織への遊走能の評価：蛍光色素で染色した CXCR4 cDNA を遺伝子導入した細胞と元々の MSC を各々 1×10^6 個ずつ担癌マウス (Hepa1-6, KYN-2 細胞皮下接種モデル) の尾静脈から投与し腫瘍組織への遊走能を比較した結果、CXCR4 を遺伝子導入したベクター細胞の方が腫瘍組織への遊走能が優れていた。

(6) マウス肝癌モデルにおける抗腫瘍効果の評価：ヌードマウスの皮下に肝細胞癌株 (Hepa1-6, KYN-2) を 5×10^6 個接種し腫瘍容積が 50-100 mm³ に達した担癌マウスモデルに対しベクター細胞に可溶性 VEGF レセプター 1,2 の cDNA を組み込んだ pLP-Adeno-X-CNV ベクターが感染した治療用細胞 1×10^6 個を尾静脈から週 1 回の割合で 4 回投与した。この間継時的に腫瘍容積を計測した。その結果、治療

群の腫瘍容積は対照群に比べ腫瘍の増大が抑制された。

(7) マウス肝癌モデルにおけるベクター細胞の局在と血管新生抑制効果の検証：投与されたベクター細胞は腫瘍組織に選択的に遊走し主に腫瘍内の間質に存在していた。さらに、一部の細胞は CD31 陽性の血管内皮細胞および α SMA 陽性平滑筋細胞に分化していた。1 視野あたりの腫瘍血管密度は治療群で低下していた。

(8) 副作用の検証：マウスを sacrifice する時点で採血しヘモグロビン、血小板、ALT を測定した。対照群と治療群間にいずれの値も有意な差はなかった。また、臨床上血管新生抑制療法に用いられるソラフェニブでよく認められる手足皮膚反応はみられなかった。

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 22 件)

- (1) Inoue K, Torimura T, Nakamura T, Iwamoto H, Masuda H, Abe M, Hashimoto O, Koga H, Ueno T, Yano H, Sata M. Vandetanib, an inhibitor of VEGF receptor-2 and EGF receptor, suppresses tumor development and improves prognosis of liver cancer in mice. Clin Cancer Res. 査読：あり 18: 2012, 3924-3933. DOI:10.1158/1078-0432.CCR-11-2041
- (2) Niizeki T, Sumie S, Torimura T, Kurogi J, Kuromatsu R, Iwamoto H, Aino H, Nakano M, Kawaguchi A, Kakuma T, Sata M. Serum vascular endothelial growth factor as a predictor of response and survival in patients with advanced hepatocellular carcinoma undergoing hepatic arterial infusion chemotherapy. J Gastroenterol. 査読：あり 47: 2012, 686-695. DOI: 10.1007/s00535-012-0555-6.
- (3) Abe M, Koga H, Yoshida T, Masuda H, Iwamoto H, Sakata M, Hanada S, Nakamura T, Taniguchi E, Kawaguchi T, Yano H, Torimura T, Ueno T, Sata M. Hepatitis C virus core protein upregulates the expression of vascular endothelial growth factor via the nuclear

factor- κ B/hypoxia-inducible factor-1 α axis under hypoxic conditions. Hep Res. 査読：あり 42: 2012, 591-600.

- (4) Torimura T, Ueno T, Taniguchi E, Masuda H, Iwamoto H, Nakamura T, Inoue K, Hashimoto O, Abe M, Koga H, Barresi V, Nakashima E, Yano H, Sata M. Interaction of endothelial progenitor cells expressing cytosine deaminase in tumor tissues and 5-fluorocytosine administration suppresses growth of 5-fluorouracil-sensitive liver cancer in mice. Cancer Sci. 査読：あり 103:2012, 542-548. DOI:10.1111/j.1349-7006.2011.02182.x.
 - (5) Iwamoto H, Torimura T, Nakamura T, Hashimoto O, Inoue K, Kurogi J, Niizeki T, Kuwahara R, Abe M, Koga H, Yano H, Kerbel RS, Ueno T, Sata M. Metronomic S-1 chemotherapy and vandetanib: an efficacious and nontoxic treatment for hepatocellular carcinoma. Neoplasia. 査読：あり 13: 2011, 187-197. URL: www.neoplasia.com
 - (6) Sumie S, Kawaguchi T, Kuromatsu R, Takata A, Nakano M, Satani M, Yamada S, Niizeki T, Torimura T, Sata M. Total and high molecular weight adiponectin and hepatocellular carcinoma with HCV infection. PLoS One. 査読：あり 6: 2011, e26840. DOI: 10.1371
 - (7) Nakano M, Ando E, Kuromatsu R, Torimura T, Sumie S, Takata A, Fukushima N, Kurogi J, Niizeki T, Iwamoto H, Tanaka M, Sata M. Recent progress in the management of hepatocellular carcinoma detected during a surveillance program in Japan. Hepatol Res. 査読：あり 40: 2010, 989-996. DOI: 10.1111/j.1872-034X
 - (8) Takata A, Kuromatsu R, Ando E, Iwamoto H, Fukushima N, Sumie S, Torimura T, Sata M. HCC develops even in the early stage of chronic liver disease in elderly patients with HCV infection. Int J Mol Med. 査読：あり 26:2010, 249-256. URL: WWW.spandidos-publications.com
 - (9) Nagamatsu H, Hiraki M, Mizukami N, Yoshida H, Iwamoto H, Sumie S, Torimura T, Sata M. Aliment Pharmacol Ther. 査読：あり 32: 2010, 543-550. DOI: 10.1111/j.1365-2036.2010.04379.x
- [学会発表] (計 161 件)

- (1) Koga Hironori, Torimura Takuji, T-cell factor-4 isoforms regulate resistance involving upregulation of Bmi-1 in hepatocellular carcinoma cells. 第71回日本癌学会学術総会, 2012年9月19-21日、札幌市
- (2) 安倍満彦、鳥村拓司、C型肝炎ウイルス core 蛋白は低酸素環境下においてNF- κ B/HIF-1 α 軸を介してVEGFの発現を上昇させる。第48回日本肝臓学会総会、2012年6月7-8日、金沢市
- (3) 鳥村拓司、肝細胞癌に対する血管新生抑制療法の試み。第67回久留米医学会総会(招待講演)、2012年4月23日、久留米市
- (4) 鳥村拓司、マウス肝癌モデルにおけるAfliberceptの血清形成抑制機序に関する検討。第47回日本肝臓学会総会。2011年6月2-3日、東京都
- (5) 岩本英希、鳥村拓司、肝細胞癌を用いた作用機序の異なる血管新生阻害療法の比較:メトロノミックケモラピーとVEGFR-2リン酸化阻害剤の比較。第47回日本肝臓学会総会。2011年6月2-3日、東京都
- (6) 新関 敬、鳥村拓司、進行肝細胞癌に対する肝動注化学療法(Low-dose FP)の治療効果及び予後予測における血清VEGFの重要性と今後の展望。第47回日本肝臓学会総会。2011年6月2-3日、東京都
- (7) Torimura Takuji, Antiangiogenic mechanisms of aflibercept in mouse hepatoma model. 102nd Annual Meeting of the American Association for Cancer Research, 2011年4月2-6日、オーランド、アメリカ。
- (8) 鳥村拓司、マウス肝癌におけるAfliberceptの血管形成抑制機序に関する検討。第24回肝類洞壁細胞研究会, 2010年11月27-28日、福島市
- (9) 永松洋明、鳥村拓司、Stage IV-A 肝細胞癌症例に対する長期予後を目標とした集学的治療。第96回日本消化器病学会総会。2010年5月27-28日、山形市
- (10) Iwamoto H, Torimura T. Low dose metronomic chemotherapy of S-1 and Vandetanib produces nontoxically good therapeutic results for hepatocellular carcinoma (HCC). 101st Annual Meeting of the American Association for Cancer Research. 2010年4月17-21日、ワシントン、アメリカ。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鳥村 拓司 (TORIMURA TAKUJI)

久留米大学・先端癌治療研究センター・教授
研究者番号：60197986

(2) 研究分担者

中村 徹 (NAKAMURA TORU)

久留米大学・医学部・助教

研究者番号：30341332

谷口 栄太郎 (TANIGUCHI EITARO)

久留米大学・医学部・助教

研究者番号：50341318

(3) 連携研究者

上野隆登 (UENO TAKATO)

久留米大学・先端癌治療研究センター・教授

研究者番号：70176618