

平成 28 年 6 月 29 日現在

機関番号：37104

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461018

研究課題名(和文) 肝細胞癌の腫瘍血管に特異的なマイクロRNAを標的とした血管新生抑制療法の開発

研究課題名(英文) Development of new antiangiogenic therapy specific for tumor tissue of hepatocellular carcinoma with microRNA

研究代表者

鳥村 拓司(Torimura, Takuji)

久留米大学・医学部・教授

研究者番号：60197986

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：腫瘍組織から分離した内皮細胞から、mRNA、microRNAを採取し、非癌部肝組織と比較した。血管新生に関与する12個のmRNAが腫瘍由来の内皮細胞で発現が亢進していた。さらに、microRNAではmiR-127-3p、miR-379-5p、miR-711が腫瘍由来の内皮細胞で発現が亢進し、70個が低下していた。最も発現が低下しているmiR30a-5pを腫瘍由来の内皮細胞に添加すると増殖が非癌部肝組織由来の内皮細胞の増殖能と同等まで抑制された。担癌マウスにmiR30a-5pを投与すると腫瘍の増殖を抑制した。腫瘍内の血管密度は対照群と比べて減少していたが、非癌部肝組織では変化がなかった。

研究成果の概要(英文)：We extracted mRNA and microRNA from endothelial cells in HCC tissues. The expression of twelve mRNAs related angiogenesis was upregulated. The expression of miR-127-3p, miR-379-5p and miR-711 was upregulated and 70 microRNAs were downregulated in HCC tissues. miR30a-5p which was the most downregulated was added to cultured endothelial cells from HCC tissues. The growth activity of endothelial cells from HCC tissues was suppressed by miR30a-5p addition. In vivo experiments, tumor growth of HCC was suppressed by miR30a-5p addition from mouse tail vein. Tumor angiogenesis was suppressed in HCC tissues by miR30a-5p addition. However, sinusoidal density was not reduced by miR30a-5p.

研究分野：医歯薬学

キーワード：肝細胞癌 内皮細胞 血管新生抑制療法 マイクロRNA 血管新生

## 1. 研究開始当初の背景

肝細胞癌は腫瘍血管が非常に発達した悪性腫瘍である。我々は、有効な治療法が存在しない進行肝細胞癌において血管新生抑制療法が有効な治療法と成り得ると考え、今日まで一貫して肝細胞癌に対する血管新生抑制療法に関しての検討を行ってきた。いずれの血管新生抑制剤も腫瘍容積の抑制、肝内転移の抑制、予後改善に寄与したことを明らかにしてきた。しかし、一方で全身投与による血管新生抑制療法では非癌部肝組織においても類洞内皮細胞の発達を抑制し、単位面積当たりの類洞の血管密度が低下するという問題点も明らかとなった。

2008年にSHARP試験で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証明された。しかし、重篤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ヶ月であるという問題点も浮き彫りとなった。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、副作用を軽減しさらに予後を延長するためには腫瘍局所でのみ強力に血管新生を抑制する治療法の開発が必要だと考えられる。

近年、マイクロRNAが細胞における様々なシグナルをposttranscriptionalのレベルで調節していることが明らかとなり、血管新生においても重要な調節因子として注目され、血管新生に関係するmicroRNAをコントロールすることが次世代の血管新生抑制療法として期待されている。しかし、血管内皮細胞で発現するmicroRNAのほとんどがHUVECを用いた検討で明らかにされたものであり、血管内皮細胞に発現する既知のmicroRNAを用いて血管新生を抑制しても腫瘍組織でのみ作用する血管新生抑制療法とは成り得ない。腫瘍血管は非腫瘍部の血管と同様の内皮細胞から形成され同一の構造であると考えられていたが、最近では腫瘍と非腫瘍部の血管

構造は異なり腫瘍部の内皮細胞は非腫瘍部の内皮細胞と異なった表現型を有し、抗癌剤や分子標的治療薬に対して非腫瘍部の内皮細胞より治療抵抗性であることが明らかにされつつある。腫瘍内の内皮細胞と非癌部の内皮細胞が異なるという特性を利用し、肝細胞癌組織内の血管内皮細胞に特異的に発現し血管新生を促進するmicroRNAを同定しこのmicroRNAの拮抗剤を血管新生抑制剤として用いることで肝細胞癌組織でだけ作用し非癌部の血管形成には影響せず副作用のない新しい血管新生抑制療法が開発可能と考える。

## 2. 研究の目的

マウス肝癌モデルの癌部と非癌部肝組織から別々に血管内皮細胞を分離する。次に、肝細胞癌と非癌部肝組織の血管内皮細胞からmRNAとmicroRNAを抽出しDNAアレイとmicroRNAアレイでマウスの肝細胞癌組織の血管内皮細胞に特異的に発現が亢進もしくは低下しているmicroRNAを同定し、発現が亢進したmicroRNAに対するanti-microRNAを作製する。作製したanti-microRNAや発現の低下したmicroRNAを培養した肝細胞癌と非癌部肝組織の血管内皮細胞に遺伝子導入し肝細胞癌組織から採取した血管内皮細胞のみに増殖抑制効果を示すanti-microRNAもしくはmicroRNAを選別する。次に、ヒト肝癌細胞株を接種したマウス肝癌モデルおよび肝硬変から肝発癌をきたすコリン欠乏アミノ酸食投与マウスに選別したanti-microRNAもしくはmicroRNAをリポソーム法で遺伝子導入し、腫瘍組織でのみの血管新生抑制効果、抗腫瘍効果、副作用を検討する。

## 3. 研究の方法

1) スードマウスの皮下にヒト肝癌細胞株を接種して作成した肝細胞癌組織と非癌部肝組織から内皮細胞をセルソーターにて

- 分離する。
- 2) 肝細胞癌組織と非癌部肝組織から分離・培養した血管内皮細胞から mRNA と microRNA を採取し、DNA アレイと microRNA アレイで癌部の血管内皮細胞増殖に特異的に関与する microRNA を同定する。
  - 3) コリン欠乏アミノ酸食を 48 週間投与しマウス肝硬変合併肝発癌モデルを作製する。
  - 4) マウス肝硬変合併肝発癌モデルの肝細胞癌組織と非癌部肝組織から血管内皮細胞を分離し、mRNA と microRNA を採取し、DNA アレイと microRNA アレイで癌部の血管内皮細胞の増殖に特異的に関与する microRNA を同定する。
  - 5) 同定したヒト肝細胞癌およびマウス肝癌モデルの各々の癌組織の血管内皮細胞の増殖に特異的に関与する microRNA を選定する。
  - 6) ノードマウスの皮下にヒト肝細胞株 (HuH-7, HAK-1B, KYN-2) を接種しマウス肝癌モデルを作製した後 anti-microRNA や microRNA をリポゾーム法で尾静脈から週 1 回投与する。継時的に腫瘍容積を測定し抗腫瘍効果を評価する。
  - 7) 同様のモデルにおいて 28 日目に腫瘍容積、肝内転移数、副作用 (体重減少、肝障害、骨髄抑制) を対照群と比較する。
  - 8) 腫瘍組織と非癌部肝組織の CD31 陽性脈管数を免疫組織化学にて比較する。
  - 9) コリン欠乏アミノ酸食を 48 週間投与し作製したマウス肝硬変合併肝発癌モデルに対し、anti-microRNA や microRNA をリポゾーム法で尾静脈から週 1 回投与する。28 日目に腫瘍容積、肝内転移数、副作用 (体重減少、肝障害、骨髄抑制) を対照群と比較する。
  - 10) 同モデルの腫瘍組織と非癌部肝組織における CD31 陽性脈管数を免疫組織化学

にて比較する。

#### 4. 研究成果

ヌードマウスの皮下にヒト肝細胞株を接種し作製したマウス肝癌モデルにおいて、腫瘍組織と非癌部肝組織からセルソーターにて内皮細胞を分離した。さらにヘキスト 33342 で染色しサイドポピュレーションから内皮幹/前駆細胞も採取できたが、採取できる量と回数がすくなかった。よって、成熟した血管内皮細胞と内皮幹/前駆細胞を分けて実験を行うことは中止し、同じ血管内皮細胞として取り扱うこととした。腫瘍組織由来の内皮細胞に特異的に発現している microRNA を同定し、このうちの 2 種類の microRNA に対し、anti-microRNA を作成し、腫瘍組織から分離した内皮細胞に添加したが、増殖抑制効果は認められなかった。この原因として、分離した内皮細胞に肝癌細胞が少量混入しており、肝癌細胞由来の microRNA を同定した可能性が考えられた。よって、つぎに GFP cDNA を遺伝子導入した肝癌細胞を作成し、その細胞をヌードマウスの皮下に接種し腫瘍モデルを作成した。このモデルを用いて腫瘍組織と非癌部肝組織から内皮細胞をセルソーターを用いて分離した。今回は、肝癌細胞の混入が少なく FACS での解析で血管内皮細胞と考えられる CD31 陽性細胞が KYN-2 肝癌細胞由来の腫瘍で 92.74%, HAK1-B 由来の組織で 94.29%, HuH-7 由来で 90.61%といずれも 90%を超え、purity は向上した。そこで、再度 mRNA と microRNA を抽出しなおした。ヒト肝細胞癌組織と非癌部肝組織からも同様にセルソーターを用いて血管内皮細胞を採取したがやはり、肝癌細胞の混入がみられたため、そこからの mRNA と microRNA の分離は断念した。マウス肝癌モデルの腫瘍組織と非癌部肝組織から分離した血管内皮細胞から抽出した mRNA と microRNA のうち血管新生に関与している mRNA, マイクロ RNA を選別し腫瘍組織で特異的に発現か変化している mRNA,

マイクロ RNA を選別した。その結果、血管新生に関与する 12 個の mRNA が腫瘍由来の血管内皮細胞で発現が亢進していた。さらに、3 個のマイクロ RNA (miR-127-3p, miR-379-5p, miR-711) が腫瘍由来の血管内皮細胞で非癌部肝組織由来の内皮細胞に比べて発現が亢進し (x1.65-1.91)、70 個が低下していた。腫瘍由来の血管内皮細胞で非癌部肝組織由来の内皮細胞に比べて 1/52.8 と最も発現が低下している miR30a-5p を非癌部肝組織から採取した培養内皮細胞と腫瘍から採取した培養内皮細胞に添加した。その結果、非癌部肝組織から採取した培養内皮細胞では細胞増殖は抑制されなかったが、腫瘍から採取した培養内皮細胞では miR30a-5p を添加した群で有意に内皮細胞の増殖が非癌部肝組織から採取した培養内皮細胞の増殖能と同等まで抑制された。次に、ヒト肝癌細胞をヌードマウスの肝臓に接種した担癌マウスの尾静脈から miR30a-5p をリポゾーム法で週 1 回とうよした。その結果、4 週間後の腫瘍容積は、無治療群が  $756 \pm 378 \text{ mm}^3$  であったのに対し、治療群では  $439 \pm 134 \text{ mm}^3$  と腫瘍の増殖を抑制した。組織を検討すると、腫瘍内の血管密度は対照群と比べて減少していたが、非癌部肝組織の類洞密度は対照群と変化がなかった。コリン欠乏アミノ酸食投与マウスに対し同様の検討を行ったが、腫瘍容積にばらつきが多く有意な抗腫瘍効果は得られなかった。本研究は、最終的に十分な効果が証明されていないため、今後も、この研究を継続しより効果的な抗腫瘍効果を得られるマイクロ RNA を検索していきたい。

#### 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 10 件)

- ① Nakano M, Tanaka M, Kuromatsu R, Nagamatsu H, Tajiri N, Satani M, Niizeki T, Aino H, Okamura S, Iwamoto H, Shimose S, Shirono T, Koga H, \_

Torimura T: Kurume Liver Cancer Study Group of Japan. Sorafenib for the treatment of advanced hepatocellular carcinoma with extrahepatic metastasis: a prospective multicenter cohort study. Cancer Medicine, 査読有、4: 1836-1843, 2015.  
DOI:10.1002/cam4.548

- ② Kawaguchi T, Hayakawa M, Koga H, Torimura T. Effects of fucoidan on proliferation, AMP-activated protein kinase, and downstream metabolism- and cell cycle-associated molecules in poorly differentiated human hepatoma HLF cells. International Journal of Oncology, 査読有、46: 2216-2222, 2015. DOI:10.3892/ijo.2015.2928.
- ③ Sumie S, Kawaguchi T, Kawaguchi A, Kuromatsu R, Nakano M, Satani M, Yamada S, Okamura S, Yonezawa Y, Kakuma T, Torimura T, Sata M. Effect of pioglitazone on outcome following curative treatment for hepatocellular carcinoma in patients with hepatitis C virus infection: A prospective study. Molecular and Clinical Oncology. 査読有、3: 115-120, 2015.
- ④ Nagamatsu H, Sumie S, Niizeki T, Tajiri N, Iwamoto H, Aino H, Nakano M, Shimose S, Satani M, Okamura S, Kuromatsu R, Matsugaki S, Kurogi J, Kajiwara M, Koga H, Torimura T. Hepatic arterial infusion chemoembolization therapy for advanced hepatocellular carcinoma: multicenter phase II study. Cancer Chemotherapy and Pharmacology. 査読有、77: 243-250, 2016.

- DOI:10.1007/s00280-015-2892-7.
- ⑤ Iwamoto H, Zhang Y, Seki T, Yang Y, Nakamura M, Wang J, Yang X, Torimura T, Cao Y. PlGF-induced VEGFR1-dependent vascular remodeling determines opposing antitumor effects and drug resistance to Dll4-Notch inhibitors. *Science Adv.* 査読有、1:e1400244, 2016. DOI:10.1126/sciadv.1400244.
- ⑥ Iwamoto H, Nakamura T, Koga H, Izaguirre-Carbonell J, Kamisuki S, Sugawara F, Abe M, Iwabata K, Ikezono Y, Sakaue T, Masuda A, Yano H, Ohta K, Nakano M, Shimose S, Shirono T, Torimura T. Inhibition of hypoxia-inducible factor via upregulation of von Hippel-Lindau protein induces "angiogenic switch off" in a hepatoma mouse model. *Mol Ther Oncolytics.* 査読有、2: 15020, 2015. DOI:10.1038/mt0.2015.20.
- ⑦ Sumie S, Nakashima O, Okuda K, Kuromatsu R, Kawaguchi A, Nakano M, Satani M, Yamada S, Okamura S, Hori M, Kakuma T, Torimura T, Sata M. The significance of classifying microvascular invasion in patients with hepatocellular carcinoma. *Ann Surg Oncol* 査読有、21: 1002-1009, 2014. DOI:10.1245/s10434-013-3376-9.
- ⑧ Torimura T, Iwamoto H, Nakamura T, Koga H, Ueno T, Kerbel RS, Sata M. Metronomic chemotherapy: possible clinical application in advanced hepatocellular carcinoma. *Transl Oncol.* 査読有、6: 511-519, 2013.
- ⑨ Hashimoto O, Nakamura A, Nakamura T, Iwamoto H, Hiroshi M, Inoue K, Torimura T, Ueno T, Sata M. Methylated-(3')-epigallocatechin gallate analog suppresses tumor growth in Huh7 hepatoma cells via inhibition of angiogenesis. *Nutr Cancer.* 査読有、66: 728-735, 2014. DOI:10.1080/01635581.2013.783601.
- ⑩ Nakano M, Kawaguchi T, Nakamoto S, Kawaguchi A, Kanda T, Imazeki F, Kuromatsu R, Sumie S, Satani M, Yamada S, Torimura T, Kakuma T, Yokosuka O, Sata M. Effect of occult hepatitis B virus infection on the early-onset of hepatocellular carcinoma in patients with hepatitis C virus infection. *Oncol Rep* 査読有、30: 2049--2055, 2013. DOI:10.3892/or.2013.2700.
- [学会発表] (計 5 件)
- ① 黒松亮子、住江修治、佐谷 学、中野聖士、岡村修祐、奥田康司、鳥村拓司. Child-Pugh A の小 肝癌における APRI を用いた肝線維化の層別化と治療方針. 第 101 回日本消化器病学会総会 2015/04/25 仙台国際センター (宮城県仙台市)
- ② 住江修治、黒松亮子、中野聖士、佐谷 学、岡村修祐、鳥村拓司. ラジオ波焼灼療法を施行した 20mm 以下の肝細胞癌の解析: 乏血性と多血性結節の比較検討. 第 51 回日本肝臓学会総会 2015/05/21 ホテル日航熊本 (熊本県熊本市)
- ③ 川口 巧、山田慎吾、福嶋伸良、住江修治、高田晃男、中野聖士、佐谷 学、黒松亮子、鳥村拓司. 非 B 非 C 肝がんのリスクプロファイル: データマイニング解析. 第 51 回日本肝臓学会総会 2015/05/22 ホテル日航熊本 (熊本県熊本市)
- ④ 中野聖士、田中正俊、黒松亮子、永松洋明、鳥村拓司. 進行肝細胞癌に対するソラフェニブ治療における新たな肝予備能

評価方法 (ALBI grade) の有用性. 23rd JDDW (第 57 回日本消化器病学会大会) 2015/10/08 グランドプリンスホテル新高輪 (東京都品川区)

- ⑤ 中野聖士、川口 巧、中本晋吾、川口 淳、神田達郎、今関文夫、黒松亮子、住江修治、佐谷 学、山田慎吾、鳥村拓司、角間辰之、横須賀収、佐田通夫. C型肝炎ウイルス関連肝細胞癌の早期発症における潜在性 B 型肝炎ウイルス感染の影響. 第 100 回日本消化器病学会総会 2014/04/23 東京国際フォーラム (東京都品川区)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年月日 :

国内外の別 :

[その他]

ホームページ等

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

鳥村 拓司 (TORIMURA, Takuji)

久留米大学・医学部・教授

研究者番号 : 60197986

(2) 研究分担者

( )

研究者番号 :

(3) 連携研究者

( )

研究者番号 :