

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 18 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25670564

研究課題名(和文)肝細胞癌血管内皮の多様性と新規分子標的薬への応用

研究課題名(英文)The heterogeneity of tumor endothelial cells of hepatocellular carcinoma and the application to novel molecular targeted therapies

研究代表者

高橋 典彦 (TAKAHASHI, Norihiko)

北海道大学・大学病院・准教授

研究者番号：30399894

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：われわれはこれまで腫瘍血管に多様性があることを見出してきた。今回の研究目的は癌の悪性度の違いによる血管の多様性の有無とその機序を解明し、肝がんの血管を特異的に標的とする新しい分子標的薬の開発につなぐこととした。具体的には分化型の異なる癌における血管内皮の遺伝子発現を比較した。悪性度の高い低分化型のがんにおいて発現の高かった分子を同定し、それががん細胞の転移を促進していることを見出した。

研究成果の概要(英文)：We have reported that tumor endothelial cells are heterogeneous depending on tumor malignancy. In this study, we tried to evaluate the difference of tumor endothelial cells of hepatocellular carcinoma, in order to develop novel molecular for targeting liver cancer. We identified a marker that is highly expressed in poorly differentiated cancer compared to well-differentiated cancer and show that this molecule plays an important role for tumor cell metastasis. These results suggested that tumor endothelial cell may be involved in tumor metastasis in malignant hepatocellular carcinoma.

研究分野：消化器外科学

キーワード：腫瘍血管新生

1. 研究開始当初の背景

肝細胞癌は抗癌剤に対して抵抗性を示しやすいため抗腫瘍効果が期待しにくい。また患者の肝機能低下による薬剤に対する忍容性の観点から標準治療としての化学療法が確立していない状況にある。わが国では肝細胞癌の死亡率は現在第4位で、毎年3万5千人もの方が亡くなっている。

肝細胞癌の多くは高分化型肝細胞癌から一部が脱分化し、中分化、低分化となる多段階発癌によって生じると知られている。その中でも低分化型肝細胞癌は悪性度が高く、急速に増大し肝内転移を起こす。

一方、腫瘍血管密度は肝細胞癌の分化度と相関があり、高分化型に比べ中・低分化で有意に高く、腫瘍血管新生はがんの悪性化にも重要な役割を果たしているものと思われる。共同研究者の樋田らは、これまで腫瘍血管内皮を分離し、それまでの概念に反し、正常血管内皮と比較して growth factor や薬剤への感受性や遺伝子発現、増殖能、遊走能などが異なることを報告してきた(*Cancer Res.* 2004, 2005, 2006, *Cancer Sci* 2009)。さらに転移能が異なる腫瘍由来の血管内皮細胞の間には遺伝子発現や生存性などの差異があることを証明し、がんの悪性度が異なると、血管内皮の性質も異なる可能性があることを世界で初めて示した(Ohga, Hida et al *Am J Pathol* 2012 **ハイライトに選出**)。現在、申請者らは彼らと共同で肝細胞癌血管内皮細胞の分離とその生物学的解析を進めている。

近年、切除不能進行肝細胞癌の治療に対して分子標的薬であるソラフェニブが使用されているが、正常血管の生存にも重要な VEGF シグナルを抑えることから正常血管に対する傷害による副作用が報告されている。一方、上述のようにわれわれはこれまで腫瘍血管に多様性があることを見出してきた。今回の研究目的は肝細胞癌の悪性度の違いによる血管の多様性の有無とその機序を解明し、肝

がんの血管を特異的に標的とする新しい分子標的薬の開発につなぐこととした。

2. 研究の目的

分化型の異なる肝細胞癌における血管内皮の多様性と、肝細胞癌の悪性化への関与を解析し、新規分子標的薬への応用を目的とする

3. 研究の方法

(1) 血管内皮細胞の分離・培養

高分化型肝細胞株と低分化肝細胞株(HLE, HepG2)をヌードマウスに皮下移植する。また各肝細胞癌株に RFP 遺伝子および Luciferase 遺伝子導入を行い、in vivo imaging が可能な細胞株を樹立して同所移植を行う。それらのマウス皮下および同所移植腫瘍から血管内皮細胞を分離・培養し、血管内皮の特性解析を行う。コントロールとして正常マウスの肝臓由来血管内皮細胞を同様に分離・培養する。

(2) 高分化型肝細胞癌株由来血管内皮と低分化型肝細胞癌株由来血管内皮の生物学的機能解析

分離培養した血管内皮細胞を用いて、増殖能や運動能、血管新生能、薬剤抵抗性に関して in vitro で機能解析を行い、性質の違いを比較検討する。

(3) 低分化型肝細胞癌株由来血管内皮に特異的に発現する分子の同定

DNA マイクロアレイによる網羅的解析により、高分化型肝細胞癌由来血管内皮と比較し、低分化型肝細胞癌株由来血管内皮に有意に発現が高い分子を同定する。

(4) 低分化型肝細胞癌株由来血管内皮特異マーカーの阻害実験 (in vitro)

上記で同定された分子を siRNA もしくは阻害剤を用いて機能阻害し、増殖能や運動能、血管新生能、薬剤抵抗性に及ぼす影響を in vitro で解析する。

(5) 低分化型肝細胞癌株由来血管内皮特異マーカーの阻害実験 (in vivo)

上記で腫瘍血管における機能阻害が得られた特異マーカーについて、担癌マウスに阻害剤投与を行うことで、in vivo においても抗腫瘍効果、血管新生阻害効果、転移抑制効果などを評価する。

(6) 低酸素下状態における腫瘍血管内皮の解析

TAE 下での腫瘍血管内皮の遺伝子発現変化を解明するため、腫瘍血管内皮を低酸素化状態におき、遺伝子発現変化を解析する。

(7) 臨床検体におけるマーカーの発現と転移の検討：臨床検体において、上記で同定した低分化型肝細胞癌株由来血管内皮特異マーカーの発現とがんの悪性度、患者の予後との関連について病理学的な検索を行う。

4. 研究成果

平成26年度

高分化型のヒトがん細胞株と低分化型のヒトがん細胞株をヌードマウスに皮下移植し、それぞれの腫瘍塊から磁気ビーズ細胞分離法により腫瘍血管内皮細胞を分離し培養した。

それぞれの血管内皮細胞の性質について、PCR 法およびフローサイトメトリーにより血管内皮細胞マーカーの発現を確認し、管腔形成能アッセイにより管腔を形成することを確認した。

高分化型腫瘍由来血管内皮細胞と低分化型腫瘍由来血管内皮細胞の生物学的機能を比較検討した。細胞増殖能を MTS アッセイにより、運動能および VEGF に対する遊走能を Boyden chamber により解析した。低分化型腫瘍由来血管内皮細胞よりも高分化型腫瘍

由来血管内皮細胞において増殖能、運動能、遊走能が亢進していた。さらに、いくつかの特異遺伝子について発現量の違いが見られた。これらの結果から、がん細胞株の悪性度により腫瘍組織内の血管内皮細胞の性質が変化することが示唆された。

次に、マウス臓器内への同所移植を行い、その腫瘍の生着を in vivo imaging 装置を用いて経時的に確認することを目的として、高分化型がん細胞株と低分化型がん細胞株について、蛍光タンパク tdtomato および発光タンパク Luciferase を発現する細胞株を作製した。tdtomato-luciferase レンチウィルスベクターを遺伝子組み換えにより作製し、遺伝子導入を行い樹立した。Tdtomato 陽性細胞をフローサイトメトリーによりソーティングし、遺伝子導入された腫瘍細胞の純度を上げた。

平成27年度

昨年度より解析を進めてきた、腫瘍血管内皮細胞の Gene X の in vivo における機能評価を行った。担癌マウスに Gene X の阻害剤を投与し、経時的に抗腫瘍効果を観察したところ、Vehicle 群と比べて治療群で腫瘍増殖抑制効果が見られた。腫瘍血管への影響を解析するため、血管内皮マーカー CD31 に対する抗体を用いて、原発腫瘍を免疫組織学的に評価した。その結果、CD31 陽性血管が治療群において減少しており、血管新生阻害効果が認められた。さらに、in vivo イメージング装置 IVIS Spectrum を用いて、肺を含む遠隔臓器への転移を検討した。治療群において肺転移抑制効果が認められ、腫瘍血管内皮マーカー X の阻害が、血管新生阻害効果・抗腫瘍効果をもたらすことが示唆された。

がん組織内で血管にマーカー X が発現するメカニズムの解析を in vitro で行った。がん微小環境には、がん細胞由来の液性因子や VEGF が豊富にあり、また低酸素環境になっ

ていることが知られている。血管内皮細胞にがん細胞培養上清を処理したところ、マーカーXの発現亢進が認められた。また VEGF 処理によってもマーカー発現亢進が認められた。さらに血管内皮細胞を低酸素（1%酸素）環境下で培養したところ、マーカーXの発現が正常酸素（20%酸素）よりも亢進し、がん微小環境の様々な因子が血管内皮細胞のマーカーX発現亢進に関与していることが示唆された。

現在、臨床検体を用いてマーカーの発現とがんの悪性度など臨床病理学的因子との関連を検討している。

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）

〔雑誌論文〕（計 6 件）

1. Yamada K., Maishi N., Akiyama K., Alam Mohammad Towfik, Ohga N., Kawamoto T., Shindoh M. Takahashi N., Kamiyama T., Hida Y., Taketomi A. and *Hida K. : CXCL 12-CXCR7 axis is important for tumor endothelial cell angiogenic property, *Int J Cancer*, 137(12), 2825-2836, 2015 DOI: 10.1002/ijc.29655 査読あり
2. Akiyama K., Maishi N., Ohga N., Hida Y., Ohba Y., Alam Mohammad Towfik, Kawamoto T., Ohmura H., Yamada K., Torii C., Shindoh M. and *Hida K. : Inhibition of multidrug transporter in tumor endothelial cells enhances antiangiogenic effects of low-dose metronomic paclitaxel, *Am J Pathol*, 185(2), 572-580, 2015 doi:10.1016/j.ajpath.2014.10.017 査読あり
3. Ohmura-Kakutani H., Akiyama K., Maishi N., Ohga N., Hida Y., Kawamoto T., Iida J., Shindoh M., Tsuchiya K., Shinohara N., *Hida K. : Identification of Tumor Endothelial Cells with High Aldehyde Dehydrogenase Activity and a Highly Angiogenic Phenotype, *PLoS ONE*, 9(12):e113910doi: 10.1371/journal.pone.0113910, 2014 査読あり
4. Alam Mohammad Towfik , Nagao-Kitamoto H., Ohga N., Akiyama K., Maishi N., Kawamoto T., Shinohara N., Taketomi A., Shindoh M., Hida Y. and *Hida K. : Suprabasin as a novel tumor endothelial cell marker, *Cancer Sci*, 105(12), 1533-1540, 2014 doi: 10.1111/cas.12549 査読あり
5. Otsubo T., Hida Y., Ohga N., Sato H., Kai T., Matsuki Y., Takasu H., Akiyama K., Maishi N., Kawamoto T., Shinohara N., Nonomura K., *Hida K. : Identification of Novel Targets for Antiangiogenic Therapy by Comparing the Gene Expressions of Tumor and Normal Endothelial Cells, *Cancer Sci*, 105(5), 560-567, 2014 DOI: 10.1111/cas.12394 査読あり
6. Sakurai Y., Hatakeyama H., Sato Y., Hyodo M., Akita H., Ohga N., Hida K., Harashima H. : RNAi-mediated gene knockdown and anti-angiogenic therapy of RCCs using a cyclic RGD-modified liposomal-siRNA system, *J Control Release*, 173(10), 110-118, 2014 査読あり

〔学会発表〕（計 13 件）

1. 北條敬之, 間石奈湖, Mohammad T Alam, 秋山廣輔, 大賀則孝, 進藤正信, 樋田泰浩, 藤澤俊明, 樋田京子: ROS による biglycan 発現誘導を介した腫瘍血管内皮細胞の血管新生能亢進, 第 74 回日本癌学会学術総会, 2015.10.10 国際会議場 (名古屋市)
2. 間石奈湖, 大場雄介, 秋山廣輔, 大賀則孝, 浜田淳一, 北本(永尾)宗子, Mohammad Alam T., 進藤正信, 樋田泰浩, 樋田京子: 腫瘍血管内皮細胞は biglycan の分泌を介してがんの転移を促進する, 第74回日本癌学会学術総会, 2015.10.8 国際会議場 (名古屋市)
3. 間石奈湖, 大場雄介, 秋山廣輔, 大賀則孝, 浜田淳一, 北本宗子, Alam Mohammad Towfik, 進藤正信, 樋田泰浩, 樋田京子: 腫瘍血管内皮細胞は biglycan の分泌を介してがんの転移を促進する, 第26回日本臨床口腔病理学会総会・学術大会, 2015.7.31北海道大学学術交流会館 (札幌市)

4. Alam Mohammad Towfik , Nagao-Kitamoto H., Ohga N., Akiyama K., Maishi N., Shinohara N., Taketomi A. : Suprabasin as a novel tumor endothelial cell marker ,第26回日本臨床口腔病理学会総会・学術大会, 2015.7.31北海道大学学術交流会館(札幌市)
5. 北條敬之, 間石奈湖, 秋山廣輔, 大賀則孝, 進藤正信, 樋田泰浩, 藤澤俊明, 樋田京子: 活性酸素種によるBiglycan発現誘導を介した腫瘍血管内皮細胞の血管新生能亢進, 第26回日本臨床口腔病理学会総会・学術大会, 2015.7.31 北海道大学学術交流会館(札幌市)
6. 山田健司, 間石奈湖, 秋山廣輔, 大賀則孝, 川本泰輔, 進藤正信, 高橋典彦, 神山俊哉, 樋田泰浩, 武富紹信, 樋田京子: CXCR7を標的とした新規血管新生阻害療法の可能性, 第73回日本癌学会学術総会, 2014.9.25 (パシフィコ横浜(横浜市))
7. 大賀則孝, 近藤美也子, 秋山廣輔, 間石奈湖, 北川善政, 樋田泰浩, 進藤正信, 樋田京子: 腫瘍内低酸素環境と腫瘍血管内皮の異常性の関連, 第73回日本癌学会学術総会, 2014.9.25 パシフィコ横浜(横浜市)
8. Akiyama K., Ohga N., Hida Y., Maishi N., Alam Mohammad Towfik, Kawamoto T., Omura H., Yamada Y., Torii C., Shindoh M., Ohba Y., Hida K., P-gp inhibitor enhances antiangiogenic activity in metronomic chemotherapy, The 18th International Vascular Biology Meeting, 2014. 4.14-17, Miyakomesse Kyoto, Japan
9. Maishi N., Ohba Y., Ohga N., Akiyama K., Hamada J., Yamamoto Y., Kawamoto T., Shindoh M., Hida Y., Hida K.: Tumor endothelial cells promote metastasis, The 18th International Vascular Biology Meeting, 2014. 4.14-17, Miyakomesse ,Kyoto, Japan
10. Alam Mohammad Towfik, Nagao H., Ohga N., Akiyama K., Maishi N., Kawamoto T., Shinohara N., Taketomi A., Shindoh M., Hida Y., Hida K.: SBSN is a novel Tumor Endothelial Cell marker, The 18th International Vascular Biology Meeting, 2014. 4.14-17, Miyakomesse ,Kyoto, Japan
11. Yamada K., Maishi N. Ohga N., Akiyama K., Kawamoto T., Alam Mohammad Towfik, Shindoh M. Takahashi N., Kamiyama T., Hida Y., Taketomi A., Hida K. : CXCL12/CXCR7 axis is important for tumor endothelial cell angiogenic property, The 18th International Vascular Biology Meeting, 2014. 4.14-17, Miyakomesse ,Kyoto, Japan
12. Torii C., Ohga N., Akiyama K., Maishi N., Hojo T., Ohiro Y., Ono M., Totsuka Y., Kitagawa Y., Tei K., Hida Y., Shindoh M., Sato Y., Hida K.: Vasohibin-1 as a novel prognostic factor in oral squamous cell carcinoma, The 18th International Vascular Biology Meeting, 2014. 4.14-17, Miyakomesse , Kyoto, Japan
13. Hojo T., Maishi N., Akiyama K., Ohga N., Kondoh M., Shindoh M., Fujisawa T., Hida Y., Hida K. : Proangiogenic phenotype of Tumor Endothelial Cells induced by ROS accumulation, The 18th International Vascular Biology Meeting, 2014. 4.14-17, Miyakomesse, Kyoto, Japan

〔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
高橋 典彦 (TAKAHASHI, Norihiko)
北海道大学・北海道大学病院・准教授

研究者番号：30399894

(2)研究分担者

本間 重紀 (HONMA, Shigenori)
北海道大学・北海道大学病院・助教
研究者番号：30533674

下國 達志 (SHIMOKUNI, Tatsushi)
北海道大学・北海道大学病院・特任教授
研究者番号：30596458

大賀 則孝 (OHGA, Noritaka)
北海道大学・大学院歯学研究科・助教
研究者番号：40548202

崎浜 秀康 (SAKIHAMA, Hideyasu)
北海道大学・北海道大学病院・特任助教
研究者番号：50533676

武富 紹信 (TAKETOMI, Akinobu)
北海道大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：70363364

(3)連携研究者

なし