1版

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 ２９ 年 ６ 月 ６ 日現在

機関番号：８２６１０
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2014～2016
課題番号：２６４６１０２８

研究課題名（和文）肝浸潤ミエロイド細胞を標的とした血管新生抑制肝癌治療の開発

研究課題名（英文）Investigation of anti-angiogenesis therapy against hepatocellular carcinoma targeting liver-infiltrating myeloid cells.

研究代表者
考藤　達哉（Kanto, Tatsuya）

国立研究開発法人国立国際医療研究センター・その他部局等・研究センター長

研究者番号：８０３７２６１３

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,900,000円

研究成果の概要（和文）：肝癌では血管新生が重要な役割を果たしている。本研究では、肝癌の病態や治療における血管新生関連ミエロイド系細胞（Tie2陽性単球：TEM、マクロファージ）の機能を明らかにすることを目的とした。
非アルコール性脂肪性肝疾患患者において、肝線維化進行・肝発癌に伴いマクロファージは増加し、血清YKL-40（マクロファージ関連因子）は増加した。進行肝癌に対しソラフェニブ治療を行った患者では、治療開始１ヶ月でのTEM頻度変化は抗腫瘍効果、生命予後と関連した。肝癌の病態にミエロイド系細胞が関与しており、TEMはソラフェニブ治療効果を判別するバイオマーカーとしても有用である。

研究成果の概要（英文）：Hepatocellular carcinoma (HCC) is a vascular-rich tumor, the development of which is influenced by angiogenesis. The aim of this study is to clarify the mechanisms of the development of myeloid cells (Tie-2-expressing monocytes; TEM and macrophages) in patients with HCC and their impact on the pathogenesis and the response to anti-angiogenesis treatment (sorafenib) against HCC.
The frequency of CD68+ macrophages in the liver and serum YKL-40 (macrophage-derived factor) levels were increased in NAFLD patients with HCC. In patients who underwent sorafenib, the change of TEM frequency at 1 month after the start of therapy (⊿TEM) was well correlated with anti-tumor response and overall survival rate of the treated patients. Therefore, angiogenesis-related myeloid cells are involved in the progression of HCC and could be a therapeutic target. The ⊿TEM index could be a biomarker for predicting better treatment response and good prognosis in patients with advanced HCC under sorafenib.

研究分野：肝臓病学

キーワード：肝がん　血管新生　ミエロイド細胞

１．研究開始当初の背景

癌による死亡者数は年々増加しており、中でも肝癌などの消化器癌は有病者数も多く、治療成績の向上は国民的課題である。近年、肝癌に対する診断法、治療法は進歩しているが、原発巣治療後の肝内再発率は高く、局所療法を繰り返す症例が多い。他臓器転移例、再発例に対しては抗癌剤や分子標的治療薬などが適応となるが、患者の高齢化、合併症、薬剤耐性などのために十分な治療が困難である場合が多い。これらの症例においては再発・転移のコントロールが生命予後を規定しており、再発予防を視野に入れた新たな治療法の開発が急務である。

肝細胞癌は血流の豊富な腫瘍であり、その発生、進展、転移に血管新生が重要な役割を果たしている。肝細胞癌組織で血管内皮細胞増殖因子（VEGF）やアンギオポエチン（ANG）などの血管新生因子が発現すること、これらの因子の発現の程度と脈管侵襲、転移の程度や生命予後が相関することが報告されている。我々の検討によって、ANG-2の受容体であるTIE-2を発現する単球（TIE2-expressing monocytes, TEM）が肝癌患者の末梢血および肝臓組織中で増加しており、肝細胞癌組織における血管新生と正相関することが明らかになっている（Matsubara T, Kanto T et al. Hepatology 2013）。したがって、肝細胞癌における骨髄由来細胞による血管新生プロセスの解明やその制御方法の開発は、肝癌に対する新たな治療戦略となる可能性がある。

２．研究の目的

肝癌患者の生命予後の改善に繋がる肝発癌予防、再発抑止の新規治療法を開発することを目標とする。具体的には、肝臓における血管新生、免疫抑制に関与するミエロイド（単球、マクロファージ）系細胞を同定し、肝癌への浸潤、血管新生進展作用の分子機序を解明することを目的とする。また進行肝細胞癌に対する Sorafenib 治療において、ミエロイド系細胞の臨床的意義を明らかにすることを目的とする。

３．研究の方法

（１）肝がん発生・進展に関与するミエロイド系細胞の解析

血中には骨髄由来の血管内皮前駆細胞が少数ながら存在しており、血管内皮前駆細胞や 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。また肝臓内のマクロファージ（CD68+）も免疫調節や血管新生に関与すｒ．これらの細胞を表面抗原（CD14, CD16, CD45, CD34, CCR2, Tie-2, VEGFR など）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。TEM、TAM、マクロファージなどの細胞群、血清サイトカイン、ケモカインに関して、慢性肝疾患の各 Stage での差異、癌の進展度との関連性を検討することで、肝癌進展、再発との関連性を明らかにする。

（２）血管新生関連ミエロイド系細胞（TEM）誘導機序の解明

肝がんにおける血管新生と肝浸潤 TEM 頻度が相関することを明らかにしているが、TEM 誘導機序に関しては明らかではない。健康人、肝癌患者の末梢血、肝癌組織から単球を分離し、造血因子（GM-CSF、M-CSF、G-CSF）、血管新生因子（VEGF、ANG-1/ANG-2）などの添加による遺伝子発現変化を検討することで、Tie-2 発現機序を明らかにする。

（３）肝がん治療における TEM の臨床的意義の解明

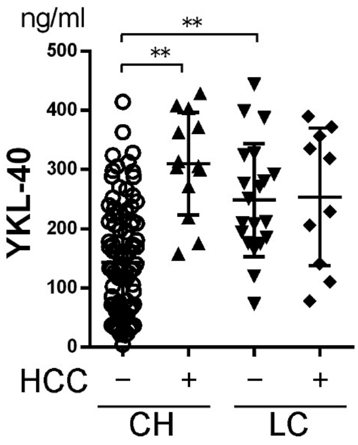
進行肝がんに対する治療としてソラフェニブ(Sorafenib)が用いられているが、ソラフェニブは血管新生抑制作用を持ち、TEM との関連性が示唆される。ソラフェニブによる進行肝がん治療前後で、上記ミエロイド系細胞の

頻度と機能を比較することで、治療効果や再発・予後への関与を明らかにする。ミエリ℃系細胞の肝がん治療におけるバイオマーカーとしての有用性を検証する。

４．研究成果

（１）非アルコール性脂肪性肝疾患（Non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD）患者 170 人を対象として、血液中のサイトカイン、ケモカインを網羅的に解析し、マクロファージ関連因子である YKL-40 が肝線維化、肝発癌と関連して増加していることを明らかにした（**図１**）。NAFLD では肝線維化進行に連れて CD68 陽性マクロファージが肝臓内で増加していた。YKL-40 産生細胞は CD68 陽性マクロファージであった。

図１．NAFLD 肝がんにおける血清 YKL-40

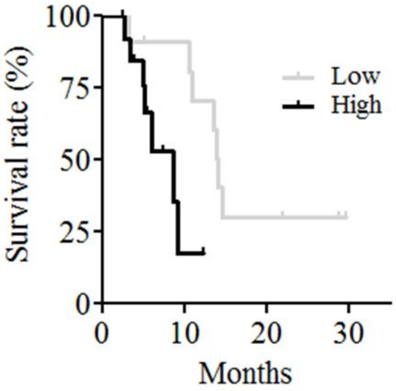


CH, 慢性肝炎; LC, 肝硬変; HCC, 肝がん

（２）肝がん由来の因子が TIE-2 を発現すると仮定し、肝がん患者血清中の造血因子、ケモカイン、サイトカインを Multiplex 法で網羅的に解析し、末梢血の TEM 頻度との関連性を検討した。肝がん患者では、M-CSF、HGF、IL-8、IP-10 が健康成人に比較して高値であった。肝がん患者を末梢血 TEM 頻度によって TEM 頻度高群（＞2.75%）、TEM 頻度低群（＜2.75%）に分けて各因子を比較すると、TEM 頻度高群では M-CSF、HGF、Osteopontin、Follistatin が高値であった。健康成人の末梢血単球にこれらの造血因子、サイトカインを添加すると、M-CSF によって Tie-2 発現が増強した。M-CSF が肝がんにおける TEM 誘導に関与する可能性が示唆された。

（３）進行肝がんに対する治療としてソラフェニブが用いられているが、ソラフェニブは血管新生抑制作用を持ち、TEM との関連性が示唆される。ソラフェニブ治療を行った肝がん患者の治療前、治療中の TEM 頻度、M-CSF などの因子と治療効果との関連性を検討すると、治療前と治療開始１ヶ月での TEM 頻度の変化が、生命予後と関連していた（**図２**）。TEM はソラフェニブの治療効果を反映するバイオマーカーとなる可能性が示唆された。

図２．ソラフェニブ治療における TEM 頻度変化値と生命予後



カットオフ値で Low 群と High 群を分けて解析（P=0.02）

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　４　件）

1. Shoji H, Yoshio S, Mano Y, Doi H, Sugiyama M, Osawa Y, Kimura K, Arai T, Itokawa N, Atsukawa M, Aoki Y, Fukai M, Taketomi A, Mizokami M, Kanto T. Pro-angiogenic TIE-2-expressing monocytes/TEMs as a biomarker of the effect of sorafenib in patients with

advanced hepatocellular carcinoma. ***Int J Cancer.*** 2017 May 27. doi: 10.1002/ijc.30804. (査読有)

2. Kumagai E, Mano Y, Yoshio S, Shoji H, Sugiyama M, Korenaga M, Ishida T, Arai T, Itokawa N, Atsukawa M, Hyogo H, Chayama K, Ohashi T, Ito K, Yoneda M, Kawaguchi T, Torimura T, Nozaki Y, Watanabe S, Mizokami M, Kanto T. Serum YKL-40 as a marker of liver fibrosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. ***Sci Rep.*** 2016 Oct 14;6:35282. doi: 10.1038/srep35282. (査読有)
3. Shoji H, Yoshio S, Mano Y, Kumagai E, Sugiyama M, Korenaga M, Arai T, Itokawa N, Atsukawa M, Aikata H, Hyogo H, Chayama K, Ohashi T, Ito K, Yoneda M, Nozaki Y, Kawaguchi T, Torimura T, Abe M, Hiasa Y, Kamiyama T, Fukai M, Taketomi A, Mizokami M, Kanto T. Interleukin-34 as a fibroblast-derived marker of liver fibrosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. ***Sci Rep***, 2016 Jul 1;6:28814. doi: 10.1038/srep28814. (査読有)
4. Aoki Y, Sugiyama M, Murata K, Yoshio S, Kurosaki M, Hashimoto S, Yatsuhashi H, Nomura H, Kang JH, Takeda T, Naito S, Kimura T, Yamagiwa Y, Korenaga M, Imamura M, Masaki N, Izumi N, Kage M, Mizokami M, Kanto T. Association of serum IFN-λ3 with inflammatory and fibrosis markers in patients with chronic hepatitis C virus infection. ***J Gastroenterol.*** 2015 Aug;50(8):894-902. (査読有)

〔学会発表〕（計　7　件）

1. Shoji H, Yoshio S, Mano Y, Kumagai E, Doi H, Sugiyama M, Osawa Y, Kimura K, Arai T, Itokawa N, Atsukawa M, Fukai M, Taketomi A, Mizokami M and **Kanto T.** Pro-angiogenic Tie2-expressing monocytes/TEMs as a biomarker of the response to sorafenib in patients with advanced hepatocellular carcinoma. Japan Society of Hepatology, Single Topic Conference, Hepatocellular carcinoa. September, 2016, Kanazawa, Japan.
2. Mano Y, Kumagai E, Yoshio S, Shoji H, Sugiyama M, Korenaga M, Arai T, Itokawa N, Atsukawa M, Hyogo H, Chayama K, Ohash Ti, Ito K, Yoneda M, Kawaguchi T, Torimura T, Nozaki Y, Mizokami M, and **Kanto T**. Serum YKL-40 as a marker of liver fibrosis and hepatocellular carcinoma in patients with non-alcoholic fatty liver disease. AASLD The Liver Meeting 2016. Boston, USA. 2016.11.11-15.
3. Shoji H, Yoshio S, Mano Y, Kumagai E, Doi H, Sugiyama M, Korenaga M, Arai T, Itokawa N, Atsukawa M, Aikata H, Hyogo H, Chayama K, Ohashi T, Ito K, Yoneda M, Nozaki Y, Kawaguchi T, Torimura T, Abe M, Hiasa Y, Fukai M, Kamiyama T, Taketomi A, Mizokami M and **Kanto T**. Interleukin-34 as a fibroblast-derived marker of liver fibrosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. The Liver Meeting 2016: The 67th Annual Meeting of AASLD. Boston, U.S.A, November, 2016.
4. **正司裕隆，由雄祥代，間野洋平，熊谷恵理奈，土肥弘義，杉山真也，是永匡紹，武冨紹信，溝上雅史，考藤達哉．非アルコール性脂肪性肝疾患における IL-34 新規マクロファージ関連肝線維化マー**

カー. 第 52 回日本肝臓学会総会. 千葉. 2016. 5. 19-20.

5. 正司裕隆, 溝上雅史, 考藤達哉. 非アルコール性脂肪性肝疾患におけるマクロファージ関連肝線維化マーカーIL-34 の検討. 第 24 回日本消化器関連学会週間 (JDDW2016) 神戸. 2016. 11. 3-6
6. Shoji H, Kanto T, Yoshio S, Mano Y, Sugiyama M, Aoki Y, Taketomi A, Mizokami M. Comprehensive analyses of serum biomarkers associating with the increase of pro-angiogenic Tie2-expressing monocytes in patients with hepatocellular carcinoma. Annual Meeting American Association for Cancer Research (AACR) 2015.4.19 Philadelphia, USA
7. 正司裕隆、考藤達哉、間野洋平、青木孝彦、由雄祥代、杉山真也、武冨紹信、溝上雅史 肝細胞癌における血管新生関連細胞（Tie2-expressing monocytes）誘導因子の探索 第 51 回日本肝臓学会総会 2015.5.21 熊本

○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
肝炎・免疫研究センター　肝疾患研究部
http://www.ncgmkohnodai.go.jp/kanen_meneki/

６．研究組織
(1)研究代表者
考藤　達哉（KANTO, Tatsuya）
国立国際医療研究センター・肝炎免疫研究センター・研究センター長
研究者番号：８０３７２６１３

(2)研究分担者
溝上　雅史（MIZOKAMI, Masashi）
国立国際医療研究センター・肝炎免疫研究センター・プロジェクト長
研究者番号：４０１６６０３８

是永　匡紹（KORENAGA, Masaaki）
国立国際医療研究センター・肝炎免疫研究センター・室長
研究者番号：７０４２０５３６