

肝細胞癌の新規血管新生因子 Angiopoietin-2の同定と そのシグナル抑制による tumor dormancy therapy の開発

九州大学大学院消化器・総合外科(第2外科)

田中 真二 杉町 圭史 山下 洋市
島田 光生 杉町 圭蔵

癌血管新生因子の抑制は tumor dormancy を誘導するが、その標的分子の同定が急務である。我々は肝癌組織から新しい血管新生遺伝子をクローニングし、そのシグナル制御による腫瘍抑制分子を開発したので報告する。Targeted differential display 法を用いて、高度の血管新生を示す肝癌の特異的遺伝子として新しい血管新生遺伝子 Angiopoietin-2をクローニングした。Angiopoietin-2遺伝子導入肝癌細胞は、マウス腹腔内接種により肝などに腫瘍形成し腹腔内出血死した。その機能抑制分子を癌細胞接種マウスへ in vivo electroporation 法により導入すると、著しい腫瘍抑制効果を認めた。我々が同定した Angiopoietin-2は肝癌の血管新生因子として重要であり、その抑制は tumor dormancy を誘導する画期的な分子標的となることが明らかとなった。

はじめに

癌の進展において dysplasia, carcinoma in situ という段階から、invasive carcinoma になる時にしばしば血管新生がおきることが観察されている。また、血管新生を抑えるとそれ以上の癌の進展は止まることも報告されている。癌進展におけるこの重要な変化を“angiogenic switch”と呼んでいる¹⁾。Angiogenic switch の制御は tumor dormancy を誘導する新しい癌治療法の1つとされており、その標的分子の同定は急務である。

肝細胞癌ではこの angiogenic switch という臨床病理学的現象が極めて特徴的に認められることが知られている。すなわち、肝細胞癌では高分化から中分化、低分化癌へと進展していくことが多いが、高分化肝細胞癌では血管新生はほとんど認められないのに対し、中分化～低分化肝細胞癌では多くが典型的な新生血管を伴っている。しかし、この angiogenic switch を規定する分子生物学的な機序についてほとんど分かっていない。そこで、我々は肝細胞癌の切除組織を用いて an-

giogenic switch の有無で発現差を認める遺伝子をクローニングし、その機能解析により臨床応用を目的とした腫瘍抑制分子を開発したので報告する。

対象と方法

1. 肝細胞癌の血管新生遺伝子の同定

肝細胞癌の術前血管造影にて hypovascular 群と hypervascular 群に分類し、それぞれの切除標本の非癌部、癌部から RNA を抽出し、cDNA 作製後、differential display 法および targeted differential display 法により、総括的に発現遺伝子を解析した²⁾。

2. 血管新生遺伝子導入肝癌細胞株の作製とその解析

肝細胞癌 hypervascular 群より同定した血管新生遺伝子の全長 cDNA を単離し、サイトメガロウイルス・プロモーターを用いた発現ベクターに挿入した。ヒト肝細胞癌株 HuH7に血管新生遺伝子発現ベクターを導入して高発現肝癌細胞株を作製した。

血管新生遺伝子導入肝癌細胞株の in vitro 細胞増殖速度、DNA 合成能、アポトーシス感受性を解析した。さらに、ヌードマウスに腹腔内接種し、in vivo での性質を解析した。

3. シグナル抑制分子の作製とその解析

肝細胞癌 hypervascular 群より同定した血管新生因子のレセプターの細胞外ドメインのみを発現するベク

* 第55回日消外会総会シンポ9・消化器癌における tumor dormancy therapy

<2000年12月19日受理> 別刷請求先: 田中 真二
〒812 8582 福岡市東区馬出3 1 1 九州大学大学院消化器・総合外科(第2外科)

ターを作製した。C3H マウス由来肝癌細胞 MSH134 を C3H マウスの背側皮下に接種し、直径5mm の皮下腫瘍形成させこの発現ベクターを癌細胞接種マウスへ in vivo electroporation 法により遺伝子導入した。その抗腫瘍効果および抗血管新生作用を解析した。

結 果

1. 肝細胞癌における血管新生遺伝子 Angiopoietin-2の同定とその発現解析

肝細胞癌の hypervascular 群, hypovascular 群切除標本の非癌部, 癌部から RNA を抽出し cDNA 作製後 differential display 法により 総括的に発現遺伝子を解析した。その結果 hypervascular 群の癌部でのみ強く発現する遺伝子を同定, クローニングしたところ, Angiopoietin homologue であることが判った³⁾。次に, Angiopoietin コンセンサス配列を用いて Angiopoietin-targeted differential display 法による解析を行うと, 肝組織では Angiopoietin-1, Angiopoietin-2 遺伝子の発現を検出し, Angiopoietin-1 遺伝子は肝細胞癌の癌部, 非癌部とも発現が認められるが, Angiopoietin-2 遺伝子は hypervascular 群の癌部でのみ強く発現することを明らかとなった。つまり, 肝細胞癌の angiogenic switch gene の 1 つは Angiopoietin-2 である可能性が示唆された。

Angiopoietin-2は Coiled-coil ドメイン, Fibrinogen 様ドメインから構成される分泌蛋白質で (Fig. 1A), 血

管内皮細胞に特異的なチロシンキナーゼ型レセプター Tie2のリガンドとして1997年に同定された分子である³⁾。肝細胞癌の組織標本における Angiopoietin-2, Tie2の蛋白発現の解析では, 高分化肝細胞癌には Angiopoietin-2, Tie2の発現は見られないが, 中分化~低分化肝細胞癌では, Angiopoietin-2が腫瘍辺縁の被膜に接した癌細胞と一部の肝細胞に強く発現していた。興味深いことに, Tie2もそれに呼応するように, 被膜内の新生血管を中心に発現が認められた。

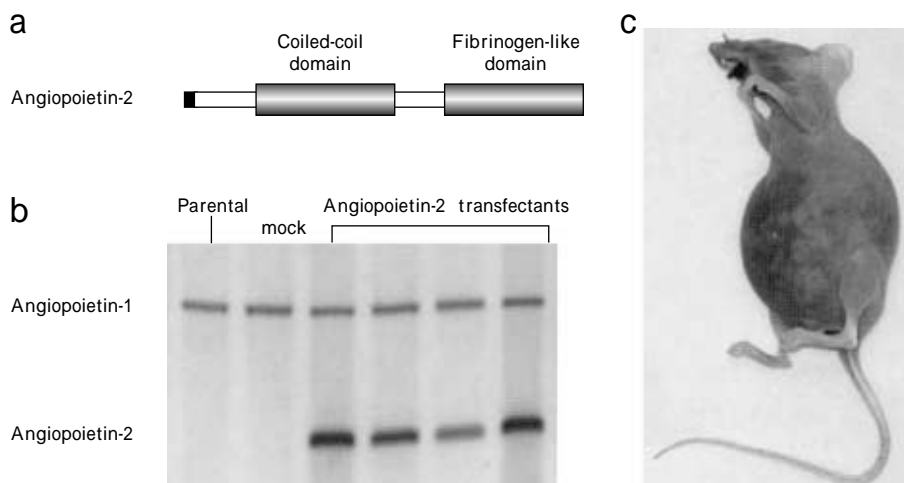
2. Angiopoietin-2遺伝子導入肝癌細胞株の作製とその解析

肝癌における Angiopoietin-2の機能を調べるために, Angiopoietin-2が発現していないヒト肝細胞癌株 HuH7に Angiopoietin-2発現ベクターを導入して Angiopoietin-2発現肝癌細胞株を作製した (Fig. 1B)。Angiopoietin-2発現肝癌細胞株の in vitro での増殖能を調べたが, 細胞増殖速度, DNA 合成能, アポトーシス感受性とも親株細胞, mock (空ベクター) 遺伝子導入細胞に比べて有意な差は認めなかった。

次に, Angiopoietin-2発現肝癌細胞株をヌードマウスに腹腔内接種したところ, 肝などに早期に hypervascular な腫瘍を形成し, 腹腔内出血によりすべて14日以内に出血死した (Fig. 1C)。肝に形成された腫瘍では, 腫瘍内には脆弱な血管が認められ, 腫瘍内出血が認められた。このような現象は, 親株細胞や mock 遺伝子導

Fig. 1 Angiopoietin-2 and its biologic significance.

a : Angiopoietin-2 structure. b : Ectopic expression of Angiopoietin-2 in hepatocellular carcinoma cells. c : Fatal intraperitoneal bleeding induced by Angiopoietin-2 transfected hepatocellular carcinoma cells.



入細胞では全く認められなかった⁴⁾。

3. Angiopoietin レセプターシグナル抑制分子の作製とその解析

Angiopoietin のレセプターである Tie2はチロシンキナーゼ酵素であり, Angiopoietin と結合する細胞外ドメイン, そして細胞膜貫通部位, キナーゼ活性を持つ細胞外ドメインから構成されている⁵⁾。すなわち, 細胞外ドメインで Angiopoietin の刺激を受け取り, 細胞内へそのシグナルを伝達する構造をもつ。そこで Tie2 cDNA の膜貫通部位直前にストップコドンを導入し, 分泌型ミュータント soluble Tie2 (sTie2) を発現するベクターを作製した。sTie2分子は Angiopoietin と結合することはできるが, 細胞内のキナーゼドメインを持たないためデコイとして機能し, さらに膜貫通部位を持たない分泌型蛋白なので Angiopoietin をトラップすると考えられる (Fig. 2A)。

この分泌型ミュータント sTie2の遺伝子を癌細胞接種マウスへ in vivo electroporation 法により遺伝子導入した。mock 遺伝子導入群では腫瘍増殖を認めるが, sTie2遺伝子導入群では, 腫瘍形成が見られるものの途中から腫瘍増殖が阻害された (Fig. 2B)。

mock 遺伝子導入群と, sTie2遺伝子導入群の腫瘍における腫瘍内血管を解析した。血管内皮細胞の特異抗原 CD31の発現を調べると mock 遺伝子導入群の腫瘍では強い発現を認めるが, sTie2遺伝子導入群ではほとんど認めず腫瘍内には壊死組織を認めた。sTie2は血管新生を抑制し, tumor dormancy を誘導することが明

らかとなった。

考 察

血管内皮細胞に発現する特異的レセプター・チロシンキナーゼとして, Flt-1, Flk-1, Tie1, Tie2が存在する。Flt-1, Flk-1のリガンドは, 血管内皮細胞の強力な増殖因子である vascular endothelial growth factor (VEGF) であることが知られている。一方, Tie2はそのノックアウトマウスの解析から血管構築の安定化に必要であることが示唆されていたが⁶⁾, Tie2のリガンドとして Angiopoietin-1, Angiopoietin-2が同定されると, 安定した血管構築はバランス機構によって成立していることが提唱された³⁾。

すなわち, Angiopoietin-1は Tie2と結合しそのチロシンキナーゼを活性化させ, 血管安定化シグナルを伝達するが, Angiopoietin-2は Tie2と結合するものの低濃度では活性化を誘導できないため, Angiopoietin-1に対するナチュラルアンタゴニストとして機能する。つまり Angiopoietin-1によって安定化している血管構築が, Angiopoietin-2の発現によって不安定となり局所的に血管構造を緩め, 血管再構築を誘導するイニシエーターとして作用すると考えられる。この際, VEGFなどの増殖因子が働かないと血管構築は緩んだままとなり, むしろ血管退縮が進むとされている。我々の作製した Angiopoietin-2遺伝子導入肝癌細胞株は in vivo で腫瘍形成を促進させるものの, すぐに出血死をもたらしたが (Fig. 1), これは Angiopoietin-2の無制御な発現による脆弱な血管形成によるものと考えられる⁴⁾。

Fig. 2 Soluble Tie2 ectodomain (sTie2) as an anti-tumor molecule.

a : Schematic structures of Tie2 and sTie2. b : In vivo gene transfer of sTie2 inhibited tumorigenesis of murine hepatoma cells.

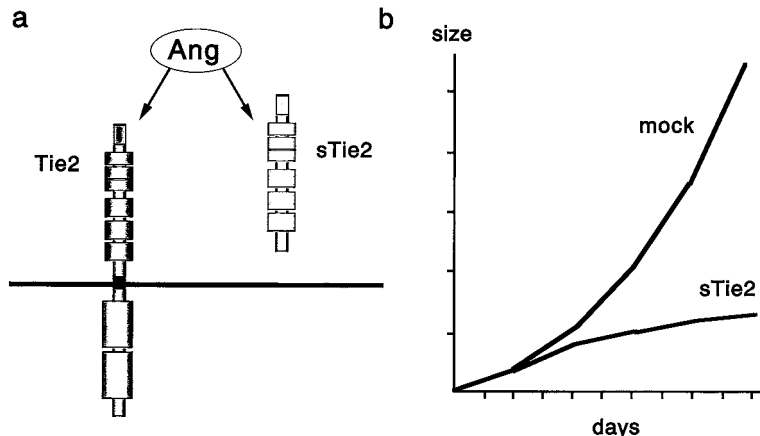
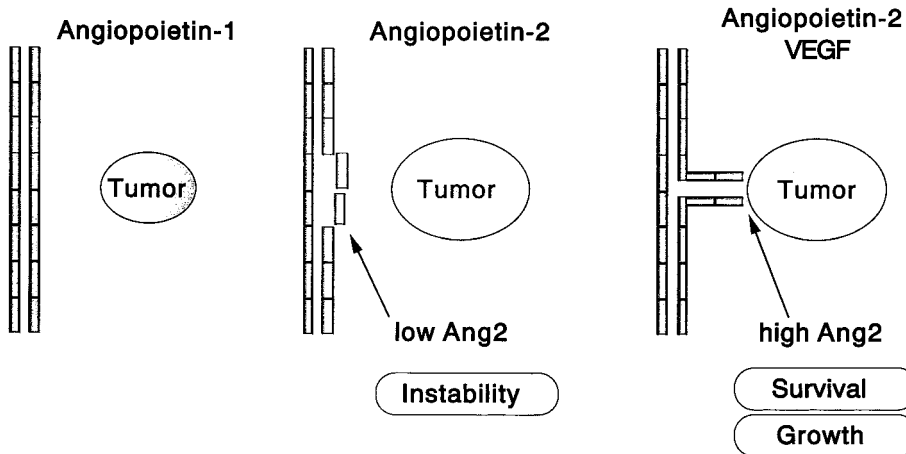


Fig. 3 Hypothesis of tumor angiogenesis mechanisms. Angiogenic switch is regulated by reversal expression from Angiopoietin-1(right)to Angiopoietin-2(middle). Low dose of Angiopoietin-2 functions as an angiogenic initiator (middle) and high dose of Angiopoietin-2 functions as an angiogenic promoter with additional growth factors (left)



また、肝細胞癌の死因の1つに腫瘍出血があげられるが、本研究はその機序にも関与する可能性があり現在その解析を進めている。

最近、Angiopoietin-2の機能に対し興味深い報告がなされた⁶⁾。Angiopoietin-2は低濃度では Tie2を活性化させないが、高濃度では Angiopoietin-1と同じように単独で Tie2を活性化することが出来るのである。癌血管新生の成立には、Angiopoietin-1/Angiopoietin-2のバランス機構に加え Angiopoietin-2による直接的なプロモーター作用も加わり、より複雑な制御が関与すると考えられる(Fig. 3)。我々は Tie2の細胞外ドメインのみで構成する分泌型ミュータント sTie2により、マウス肝癌に対し tumor dormancy を誘導することを証明した(Fig. 2)。分泌型ミュータント sTie2は Angiopoietin-1, Angiopoietin-2のいずれに対しても dominant negative として機能するため、Angiopoietin による血管新生制御機構すべてを阻害することで、強力な抗血管新生効果を発揮すると思われる。現在、Angiopoietin-2に対する選択的な dominant negative 分子を作製し、その機能解析を始めている。このように Angiopoietin/Tie2シグナル伝達の解析は、新しい癌血管新生メカニズムの解明するだけでなく、癌治療開発へ直接結び付く重要な研究である。

以上まとめると、我々は肝細胞癌の angiogenic

switch 遺伝子として Angiopoietin-2を同定し、その過剰発現により肝癌は新生血管を持つ腫瘍形成能を獲得することを明らかとした。さらに、Angiopoietin に対する分泌型デコイ分子はマウス肝癌細胞の血管新生を阻害し、腫瘍増殖を抑制することが示された。これは肝細胞癌の tumor dormancy を誘導する遺伝子治療の画期的な分子標的であり、今後その臨床への応用を目指したいと考えている。

文 献

- 1) Hanahan D, Folkman J : Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 86 : 353-364, 1996
- 2) Tanaka S, Akiyoshi T, Mori M et al : A novel frizzled gene identified in human esophageal carcinoma mediates APC/b-catenin signals. *Proc Natl Acad Sci USA* 95 : 10164-10169, 1998
- 3) Maisonpierre PC, Suri C, Jones PF et al : Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science* 277 : 55-60, 1997
- 4) Tanaka S, Mori M, Sakamoto Y et al : Biologic significance of angiopoietin-2 expression in human hepatocellular carcinoma. *J Clin Invest* 103 : 341-345, 1999
- 5) Sato TN, Tozawa Y, Deutsch U et al : Distinct roles of the receptor tyrosine kinases Tie-1 and

Tie-2 in blood vessel formation. Nature 376 : 70
74, 1995

6) Kim I, Kim JH, Moon SO et al : Angiopoietin-2 at
high concentration can enhance endothelial cell

survival through the phosphatidylinositol 3'-
kinase/Akt signal transduction pathway. Onco-
gene 19 : 4549-4552, 2000

Identification of Angiopoietin-2 as a Novel Angiogenic Switch Molecule of Hepatocellular
Carcinoma and Its Signal Inhibitor for Tumor Dormancy Therapy

Shinji Tanaka, Keishi Sugimachi, Yo-ichi Yamashita,
Mitsuo Shimada and Keizo Sugimachi

Department of Surgery and Science, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University

Since the regulation of angiogenic factors induces tumor dormancy, it is urgent to identify target molecules. We cloned an angiogenesis-related factor from human hepatocellular carcinoma, and synthesized the inhibitor of angiogenic signaling. Using targeted differential display, we identified an angiopoietin-2 gene as one of the specific molecules overexpressing in hypervascular hepatocellular carcinoma. Ectopic expression of angiopoietin-2 in nonexpressing hepatocellular carcinoma cells promotes the rapid development of human hepatomas and produces hemorrhage within tumors in nude mice. In vivo gene transfer of Tie2 ectodomain as an inhibitor of angiopoietin suppressed murine hepatocellular carcinoma tumor growth and neovascularization in inoculated mice. These results suggest a role for angiopoietin-2 in the neovascularization of hepatocellular carcinoma. The inhibition of angiopoietin/Tie2 signal transduction is a promising therapeutic application in tumor dormancy therapy.

Key words : Angiopoietin-2, Tie2, hepatocellular carcinoma

[Jpn J Gastroenterol Surg 34 : 415-419, 2001]

Reprint requests : Shinji Tanaka Department of Surgery and Science, Graduate School of Medical Sciences,
Kyushu University
3-1-1 Maidashi, Fukuoka, 812-8582 JAPAN
