

## 1 研究の背景と目的

原発性肝癌は本邦の癌死因第4位で、年間約3万人が死亡している。また、肝臓は各種悪性腫瘍の転移好発部位であり、悪性腫瘍による死亡例の20-50%は肝転移を有している。肝動脈塞栓術は切除不能肝細胞癌に対する標準的治療として位置づけられており、近年では転移性肝癌に対しても広く施行されている。しかし、肝動脈塞栓術後も高頻度で再発が認められ、再発した場合の予後は不良である。よって、肝動脈塞栓術の治療成績向上にむけて、国際的に活発な研究が進められている。

そこで我々は、肝動脈塞栓術後の再発を引き起こす要因として、リンパ管新生に着目した。近年、癌組織内にはリンパ管が存在し、リンパ管密度とリンパ節転移や患者予後に相関があることが明らかとなった。また、癌細胞から分泌される vascular endothelial growth factor (VEGF)-C/D や Podoplanin、lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor (Lyve)-1 といった因子により、リンパ管新生が誘導され、癌の再発やリンパ節転移を促進させることもわかってきた (図1)。肝動脈塞栓術は癌組織に低酸素ストレスを与えるため、これらがリンパ管新生に影響を与える可能性がある。しかし、現時点では肝動脈塞栓術がリンパ管新生を誘導する機序は未解明である。

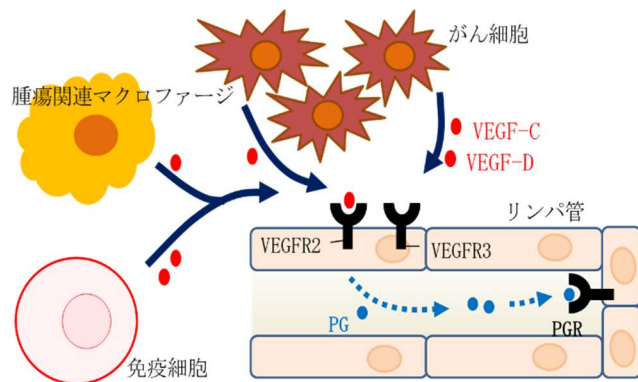


図1 がんリンパ管新生のメカニズム  
がん細胞や免疫細胞、腫瘍関連マクロファージから分泌される vascular endothelial growth factor (VEGF)-C、-Dは、リンパ管上皮に発現する受容体 (VEGFR2, VEGFR3) に結合し、prostaglandin (PG) 産生を誘導する。PGは、prostaglandin受容体 (PGR) と結合し、リンパ管新生が誘導される。

本研究の最終目的は、肝動脈塞栓術後の再発メカニズムを、リンパ管新生の観点から明らかにし、再発制御を目指した新しい治療戦略開発のための研究基盤を開発し、肝癌患者の治療成績向上に貢献することである。

## 2 研究方法・研究内容

本研究ではまず、培養細胞を用いて、肝動脈塞栓術を模した低酸素培養後に生じるリンパ管新生のメカニズムを検討した (研究項目①)。更に、ラット肝細胞癌モデルを用いて、肝動脈塞栓術後のリンパ管新生を *in vivo* で検証した (研究項目②)。具体的な研究方法は、次のとおりである。

### 研究項目①：培養細胞を用いた、肝動脈塞栓術後のリンパ管新生メカニズムの解明

肝動脈塞栓術を施行した組織は、低酸素状態となることが知られている。また、リンパ管新生を促進させる因子としては VEGF-C や VEGF-D が知られている。そこで我々は、ラット由来肝細胞癌株に対して肝動脈塞栓術を模した低酸素培養を行い、VEGF-C/D の発現変化をみた。ラット由来肝細胞癌株 (RH7777 :  $1 \times 10^6$ ) を培地とともに 10cm ディッシュに撒き、常酸素条件 (酸素濃度 21%) および低酸素条件 (酸素濃度 1%) の 2 条件で静置した。培養開始後 24 時間後に total RNA を抽出し、リアルタイム PCR 法で VEGF-C および VEGF-D の mRNA の変動を評価した。

### 研究項目②：ラット肝細胞癌モデルに対する肝動脈塞栓術後の、リンパ管新生についての検討

肝動脈塞栓術後のリンパ管新生には、がん細胞自体からの VEGF-C/D 分泌以外にも、腫瘍微小環境を構成する様々な因子の相互作用による結果の可能性も考えられる。そこで本研究では実際にラット肝細胞癌モデルに対してマイクロビーズを用いた肝動脈塞栓術または sham 治療 (肝動脈内に生理食塩水を注入するのみで、塞栓術は行っていない) を行い、リンパ管新生に関する因子の発現を調べた。8-10 週の SD ラットに対し、開腹下にラット肝細胞癌株を移植し、ラット肝細胞癌モデルを作成した。腫瘍径が 10mm 以上になったところで、肝動脈塞栓術 (n=6) または sham 治療 (n=6) を行った。治療はいずれも X 線透視下に行い、左内頸動脈を露出したのちに 1.6Fr マイクロカテーテルを肝動脈まで進め、治療を行った。治療後 14 日後に腫瘍塊を含む肝組織を摘出し、腫瘍

中心部 (T)、腫瘍辺縁部 (M)、および正常肝実質 (N) における VEGF-C/D の発現、更に、リンパ管上皮マーカーである Lyve-1 の発現を、リアルタイム PCR 法で比較検討した (図 2)。一部のサンプルでは、Lyve-1 の蛍光免疫染色も行った。

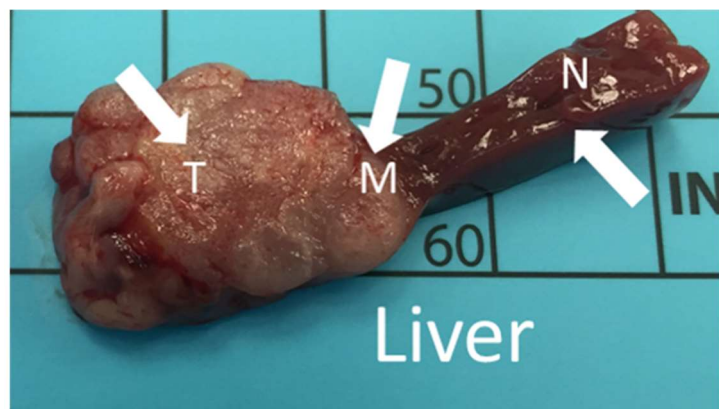


図 3 ラット肝細胞癌モデルに対する肝動脈塞栓術後のサンプルラット由来肝細胞癌株 (RH7777) を移植したラット肝細胞癌モデルを作成。動脈塞栓術または sham 治療を行い、14 日後に腫瘍を含む肝臓サンプルを摘出。腫瘍中心部 (T)、腫瘍辺縁部 (M)、および正常肝実質 (N) よりそれぞれ total RNA を抽出し、VEGF-C/D および Lyve-1 の mRNA 変化をリアルタイム PCR 法により評価した。

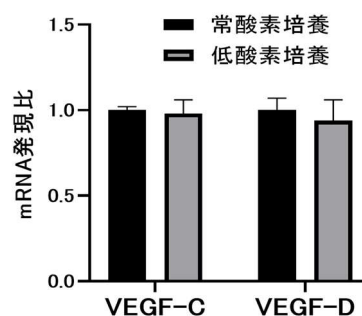


図 4 培養細胞を用いた VEGF-C/D の mRNA 発現変化ラット由来肝細胞癌株に対して常酸素 (酸素濃度 : 21%) および低酸素 (酸素濃度 : 21%) 濃度で 24 時間培養を行い、VEGF-C/D の mRNA 変化をリアルタイム PCR 法により検討。常酸素培養群および低酸素培養群間で、VEGF-C/D の mRNA 発現に有意差は認められなかった。

## 3 研究成果

### 研究項目①：培養細胞を用いた、肝動脈塞栓術後のリンパ管新生メカニズムの解明

リアルタイム PCR の結果、常酸素条件と低酸素条件の 2 条件間で、VEGF-C および VEGF-D の mRNA 発現変化は認められなかった (図 3)。

## 研究項目②：ラット肝細胞癌モデルに対する肝動脈塞栓術後の、リンパ管新生についての検討

肝動脈塞栓術後のサンプルでは、腫瘍中央、腫瘍辺縁とも、shma 治療群と比較して VEGF-C/D の有意な増加が認められた。VEGF-D については、正常肝実質においても、動脈塞栓術後に有意に増加していた (図 4)。

リンパ管上皮マーカーである Lyve-1 は、肝動脈塞栓術後、腫瘍中央部で有意な増加を示した (図 5)。肝動脈塞栓術後のサンプルの蛍光免疫染色では、腫瘍内に Lyve-1 の発現が認められた (図 6)。

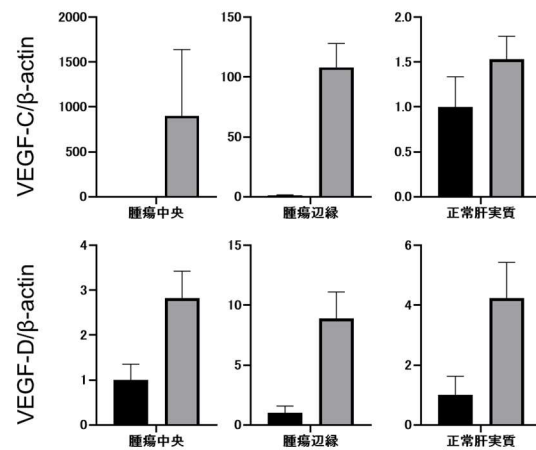


図4 肝動脈塞栓術後のVEGF-C/DのmRNA発現変化  
肝動脈塞栓術後のサンプルでは、腫瘍中央、腫瘍辺縁とも、VEGF-C/Dの有意な増加が認められた。VEGF-Dは、正常肝実質においても、動脈塞栓術後に有意に増加した。

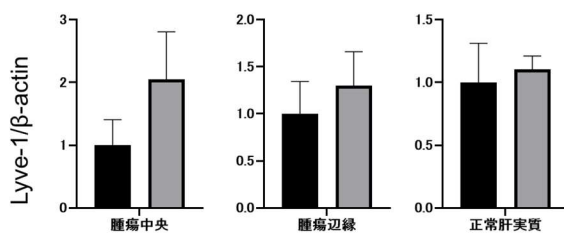


図5 肝動脈塞栓術後のLyve-1のmRNA発現変化  
肝動脈塞栓術後、特に腫瘍中央部においてLyve-1の有意な増加が認められた。

以上の結果より、動脈塞栓術は腫瘍部での VEGF-C/D の発現増加を誘導し、この結果、腫瘍内でリンパ管新生が生じている可能性が示唆された。リンパ管新生は、癌の再発やリンパ節転移を促進させることが知られており、本研究で実際に動脈塞栓術が癌のリンパ管新生を誘導しうることを示すことができたことは、意義深い。一方、In vitro の低酸素培養では、ラット肝細胞癌株における VEGF-C/D の発現増加は認められなかった。よって、肝動脈塞栓術後のリンパ管新生は、低酸素刺激による癌細胞からの VEGF-C/D 分泌とは別の経路が関与していることが示唆された。実際、肝臓を構成する正常の細胞 (肝細胞や Stellate 細胞) は癌細胞と様々な相互作用があることが知られており、動脈塞栓術後は、複数の因子が相互に作用してリンパ管新生を惹起している可能性が考えられる。例えば、肝動脈塞栓術後が Stellate 細胞において Sonic hedgehog ligand 等の発現を亢

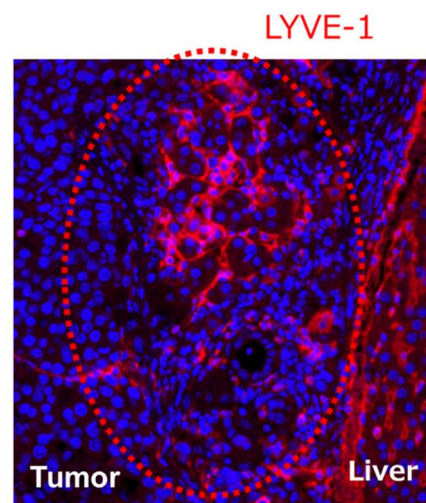


図6 肝動脈塞栓術後のLyve-1蛍光免疫染色  
肝動脈塞栓術後、腫瘍中央部においてLyve-1の発現が認められた。

進させ、paracrine signalingにより近傍の肝癌細胞よりリンパ管新生因子の発現を亢進させている可能性もある。今後は、肝細胞や Stellate 細胞と肝癌細胞の共培養下でも検討を行い、肝動脈塞栓術が癌リンパ管新生を促進させるメカニズムについて、更に詳細な検討を行う予定である。

#### 4 生活や産業への貢献および波及効果

本研究の結果、肝動脈塞栓術は腫瘍内において VEGD-C や VEGF-D の発現を増加させ、リンパ管新生を誘導しうることが示された。リンパ管新生は癌の再発やリンパ節転移を促進させ、癌患者の予後に影響を及ぼすことが知られている。よって、肝動脈塞栓術と VEGF-C/D の阻害抗体（例：VGX-100、VD1）や、VEGF-C/D のレセプターである VEGFR3 の阻害薬（例：Sorafenib、Pazopanib、Sunitinib、Axitinib）を併用することにより、肝動脈塞栓術の治療効果改善や肝癌患者の予後延長に寄与する可能性がある。本研究の結果は、更に効果の高い肝癌治療戦略を構築するうえで、重要な基盤となりうる。