

平成 21 年 4 月 23 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19590900
 研究課題名（和文） 胸膜中皮腫に著効を示す VEGF 受容体阻害薬の真の標的分子同定と治療への応用
 研究課題名（英文） Identification of real target of VEGF receptor inhibitor which shows dramatic cytotoxic effect against pleural mesothelioma
 研究代表者
 矢野 聖二（YANO SEIJI）
 金沢大学・がん研究所・教授
 研究者番号：30294672

研究成果の概要：

胸膜中皮腫細胞株 EHMES-10 においてチロシンキナーゼ活性を有した蛋白（RET）が活性型変異の結果恒常的にリン酸化されており、VEGF 受容体阻害薬である Vandetanib が RET リン酸化を阻害し殺細胞活性を示すこと、SCID マウスに EHMES-10 を移植する同所移植モデルにおいても胸腔内腫瘍および胸水形成を著明に抑制し生存期間を有意に延長することを明らかにし、胸膜中皮腫に対する有用な分子標的薬になりうる可能性を示した。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・呼吸器内科学

キーワード：胸膜中皮腫、血管新生、同所移植モデル、RET、チロシンキナーゼ阻害薬、VEGF、胸水、分子標的治療

1. 研究開始当初の背景

胸膜中皮腫は、壁側胸膜の中皮細胞から発生する悪性腫瘍で、胸腔内腫瘍や大量胸水を形成し呼吸不全をきたすことが特徴である。現在、外科的治療法、化学療法、放射線療法が単独あるいは併用で試みられているが、早期診断が困難であることから治癒的切除が

できる症例は少なく、しかも化学療法や放射線療法に対する感受性も低いことから、その予後は極めて不良である。胸膜中皮腫は年間死亡者数が 1000 人以下のまれな疾患であるが、1) 胸膜中皮腫患者の 80% にアスベスト吸入歴があること、2) 戦後わが国に大量のアスベストが 1990 年代までに輸入され多く

の用途に使用されてきたこと、3)アスベスト吸入後発症までの潜伏期が30年程度であり今後急激な患者数増加が予想されること、4)平成17年7月にアスベスト関連企業が中皮腫患者に見舞金支払いを決定したことなどから、胸膜中皮腫は現在わが国において非常に注目されるようになった。

予後不良な胸膜中皮腫に対する有効な治療法を確立するためにはその増殖・進展機構解明が必須であるが、そのような研究は皆無に等しい。その要因としては、悪性胸膜中皮腫の臨床的増殖・進展様式を反映した動物モデルの欠如があげられる。我々は、平成17年から科学研究助成金・基盤(C)「悪性胸膜中皮腫の癌抑制遺伝子およびVEGF阻害薬による分子生物学的制御法の開発」において、ヒト悪性胸膜中皮種細胞株をSCIDマウスに胸腔移植することで胸腔内腫瘍や大量胸水を形成する、胸膜中皮腫患者の腫瘍進展様式を反映した同所移植モデルを確立した。

さらに、胸膜中皮腫細胞の生存および増殖に必須の分子を同定するために、既存の各種チロシンキナーゼ阻害薬(EGF受容体阻害薬、PDGF受容体阻害薬、VEGF受容体阻害薬、Src阻害薬)の胸膜中皮腫細胞株EHMES-10の抗腫瘍効果を検討し、VEGF受容体およびEGF受容体(EGFR)に対するチロシンキナーゼ阻害薬であるVandetanibが非常に低濃度で劇的な殺細胞効果を示すことをみいだした。しかし、胸膜中皮腫細胞株は機能的VEGF受容体蛋白を発現しておらず、また抗VEGF抗体や抗VEGF受容体抗体が全く抗腫瘍効果を示さなかったことから、VandetanibはVEGF受容体とは全く別のシグナル伝達経路を阻害して殺細胞効果を示すと考え、本研究を着想するに至った。

2. 研究の目的

我々の研究の最終目的は、胸膜中皮腫の増殖・浸潤能や同所移植モデルにおける腫瘍進展の分子機構を明らかにし、それらに重要に関与する分子を選択的に阻害する有効で副作用の少ない分子標的治療薬を開発することである。本研究課題においては、VEGF受容体およびEGF受容体(EGFR)に対するチロシンキナーゼ阻害薬であるVandetanibが殺細胞効果を示すための真の標的分子を同定し、同所移植モデルにおける治療効果を明らかにすることを旨とした。

3. 研究の方法

ヒト胸膜中皮腫細胞株としてEHMES-10(愛媛大学 濱田泰伸博士より供与)を用いた。チロシンキナーゼ阻害薬としてEGF受容体阻害薬(Gefitinib)、VEGF受容体阻害薬(Vandetanib)、PDGF受容体阻害薬(Imatinib)を使用した。EHMES-10細胞に対するチロシンキナーゼ阻害薬の増殖抑制効果をMTT法にて検討した。

細胞内シグナル伝達の検討は、ヒト胸膜中皮腫細胞株にVEGF受容体阻害薬を処理し、数分後セルライゼートを回収し、EGF受容体、VEGF受容体などの蛋白発現やリン酸化状態、それらの下流に存在するERK、PI3Kなどの発現および活性化状態をWestern blotを用いて解析した。

同所移植モデルとしては、ヒト胸膜中皮腫細胞株EHMES-10(10⁶)をSCIDマウスの胸腔内に接種した。7日目には微小な胸腔内腫瘍が、28日目には明らかな胸腔内腫瘍と血性胸水が形成される。この同所移植モデルにおいて、腫瘍接種7日後よりVEGFR阻害薬を含む各種チロシンキナーゼ阻害薬を連日経口投与した。28日目にマウスを犠牲死させ、

胸腔内腫瘍および血性胸水形成を評価した。無治療、または各種チロシンキナーゼ阻害薬で治療された EHMES-10 移植 SCID マウスから胸腔内腫瘍を採取し、形態学的差異を検討するとともに、血管新生（血管密度）、増殖細胞、アポトーシス、各種増殖関連因子発現(EGF 受容体や VEGF、VEGF 受容体)を免疫染色で比較検討した。

4 . 研究成果

EHMES-10 においてチロシンキナーゼ活性を有した蛋白 (RET) が活性化型変異の結果恒常的にリン酸化されていた。RET に対する siRNA によりその増殖が抑制されたことより、活性化変異をおこした RET によるシグナル伝達経路が EHMES-10 細胞の生存に必須であることが明らかとなった。

Vandetanib は EHMES-10 細胞の増殖を著明に阻害した。また、Vandetanib 処理で RET のリン酸化が阻害されたことより、Vandetanib は EHMES-10 に対し RET の活性化を抑制することにより殺細胞活性を示すことが明らかとなった。

また、EHMES-10 を SCID マウスの胸腔内に移植する同所移植モデルを用い、Vandetanib 治療が用量依存的に EHMES-10 による胸腔内腫瘍形成および胸水形成を抑制し、生存期間を有意に延長することが明らかになった。さらには、Vandetanib 治療は VEGF に依存的な血管内皮細胞のアポトーシスを誘導し、腫瘍内血管新生も抑制していた。

以上より、VEGF 受容体阻害薬である Vandetanib は、RET が活性化している胸膜中皮腫に対して RET からのシグナル伝達阻害と VEGF 依存性血管新生の阻害の2つの機序で作用し、強力な新規分指標的治療薬とな

る可能性が示唆された。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計7件)

1. Yamada T, Muguruma H, Yano S, Ikuta K, Ogino H, Kakiuchi S, Hanibuchi M, Uehara H, Nishioka Y, Sone S. Intensification therapy of anti-parathyroid hormone-related protein antibody combined with zoledronic acid for bone metastasis of small cell lung cancer cells in severe combined immunodeficient mice. *Mol Cancer Ther*, 8:119-126, 2009. 査読有
2. Yamada T, Ohtsubo K, Mouri H, Yamashita K, Yasumoto K, Izumi K, Zen Y, Watanabe H, Yano S. Combined chemotherapy with carboplatin plus irinotecan showed favorable efficacy in a case with relapsed small cell carcinoma of the prostate complicated with meningeal carcinomatosis. *Int J Clin Oncol* (in press). 査読有
3. Otsuka S, Yano S, Hanibuchi M, Ikuta K, Ogino H, Yamada T, Kakiuchi S, Sone S. Novel osteoblastic bone metastasis model with osteolytic changes for lung cancer in natural killer-cell depleted SCID mice. *Oncol Res* (in press). 査読有
4. Ogino H, Yano S, Kakiuchi S, Yamada T, Ikuta K, Nakataki E, Goto H, Nishioka Y, Ryan A, Sone S. Novel dual targeting strategy with vandetanib induces tumor cell apoptosis and inhibits angiogenesis in malignant pleural mesothelioma cells expressing RET oncogenic rearrangement. *Cancer Letter*, 265:55-66, 2008. 査読有
5. Yano S, Wang W, Li Q, Matsumoto K, Sakurama H, Nakamura T, Ogino H, Kakiuchi S, Hanibuchi M, Nishioka Y,

Uehara H, Mitsudomi T, Yatabe Y, Nakamura T, Sone S, Hepatocyte growth factor induces gefitinib resistance of lung adenocarcinoma cells with EGF receptor mutations. *Cancer Res*, 68:9479-9487, 2008. 査読有

6. Ogino H, Yano S, Kakiuchi S, Muguruma H, Ikuta K, Uehara H, Tsuchida K, Sugino H, Sone S. Follistatin suppresses the production of experimental multiple-organ metastasis by small cell lung cancer cells in NK cell-depleted SCID mice. *Clin Cancer Res*, 14:660-667, 2008. 査読有
7. Yamada T, Yano S, Ogino H, Ikuta K, Kakiuchi S, Hanibuchi M, Taniguchi, Sekido Y, Sone S. Lysophosphatidic acid stimulated proliferation and motility of malignant pleural mesothelioma cells through LPA receptors, LPA₁ and LPA₂. *Cancer Sci*, 99: 1603-1610, 2008. 査読有

〔学会発表〕(計4件)

1. 第97回日本病理学会総会 矢野聖二. マウスモデルによる肺癌多臓器転移の分子機構解析. 2008.5.16, 金沢市.
2. 第48回日本呼吸器学会総会 矢野聖二. Respiratory year in review: 肺がんの分子標的治療. 2008.6.15, 神戸市.
3. 第23回日本肺癌学会ワークショップ 矢野聖二. EGFR-TKI 耐性. 2008.7.19, 名古屋市.
4. 第49回日本肺癌学会総会 矢野聖二, 山田忠明, 埴淵昌毅, 柿内聡司, 西岡安彦, 光富徹哉, 谷田部恭, 曾根三郎. 肝細胞増殖因子(HGF)は EGFR 活性型遺伝子変異を有する肺腺癌のゲフィチニブ耐性を誘導する. 2008.11.13, 北九州市.

〔その他〕

ホームページアドレス

<http://syuyounaika.w3.kanazawa-u.ac.jp/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

矢野 聖二 (YANO SEIJI)
金沢大学・がん研究所・教授
研究者番号：30294672

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし