

令和 4 年 6 月 22 日現在

機関番号：32647

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K18135

研究課題名(和文) VEGF-Rがもたらす大腸がんの多様性：血管新生阻害薬抵抗性メカニズムの解明

研究課題名(英文) The variety of colorectal cancer by VEGF-R: Elucidation of resistance mechanisms to anti-angiogenic therapies

研究代表者

富田 知里 (Tomida, Chisato)

東京家政大学・家政学部・期限付助教

研究者番号：60827385

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)：本研究は大腸がん細胞におけるVEGF受容体の役割を解明することを目的としている。大腸がん細胞が発現する複数種類のVEGF受容体のうち、どれを阻害した際に遊走能の亢進が生じるか検討を行った。成果としては、VEGF受容体の1に対する特異的阻害剤を大腸がん細胞に添加することにより、遊走能が亢進することを明らかにした。そのメカニズムとして、VEGF受容体1の阻害によりc-Metのリン酸化が亢進することを明らかにした。VEGF受容体1はVEGF阻害薬使用時における遊走能の獲得に重要な役割を有する可能性を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

VEGF(血管内皮増殖因子)やVEGF受容体を標的とした血管新生阻害治療は固形がんにおける化学療法において中心的な役割を果たしている。しかしながら、その効果は一時的であり、多臓器への転移など治療抵抗性を獲得することが臨床現場で問題となっている。本研究は、がん細胞に発現するVEGF受容体と血管新生阻害薬の関係に着目し、がんが治療抵抗性を獲得する仕組みを解明することを目的としている。得られた知見を応用し、転移を根本的に阻止できる新たな治療方法の開発を目指す。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to elucidate the role of VEGF receptor in colorectal cancer cells. I investigated which of the VEGF receptors expressed by colorectal cancer cells enhances migration ability. As a result, it was clarified that the migration ability is enhanced by adding a specific inhibitor for VEGF receptor 1 to colorectal cancer cells. Inhibition of VEGF receptor 1 increased levels of phosphor c-Met. It was suggested that inhibition of VEGF signal from VEGF receptor 1 may play an important role in the acquisition of migration ability under VEGF receptor inhibitor.

研究分野：分子生物学

キーワード：VEGF受容体

## 1. 研究開始当初の背景

がんの進展において血管新生は重要な役割を果たしており、血管新生阻害薬は固形がんにおける化学療法の中心的な役割を果たしている。しかし、血管新生阻害薬の効果は一時的であり「再血管新生・浸潤・転移」などの抵抗性を獲得することが臨床報告されている (Paez et al. *Cancer Cell*. (2009))。しかしながら、そのメカニズムは不明である。私はこれまで、VEGF (血管内皮増殖因子: Vascular endothelial growth factor) 受容体を阻害するマルチキナーゼ阻害剤がヒト大腸がん細胞に発現する VEGF 受容体に直接作用し、がん細胞内に入る VEGF シグナルが阻害されることが抵抗性の獲得に寄与しているのではないかと考え研究を行ってきた。実際に、Sunitinib を 100 日間連続投与した細胞は、VEGF システムに非依存的に受容体スイッチングを起こし NRP1/c-Met システムに依存して遊走能・浸潤能を獲得していることを見出している (Tomida et al. *Int J Oncol*. (2018))。

## 2. 研究の目的

本研究では、大腸がん細胞に発現する VEGF 受容体ファミリーが遊走能・浸潤能の獲得の際それぞれどのように関与しているのか明らかにし、大腸がん細胞における VEGF 受容体の本質的な存在意義を解明することを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) VEGF 受容体の個別阻害による遊走能の検討

使用する細胞における、VEGF 受容体の発現状況について確認するため、蛍光免疫染色を行う。蛍光免疫染色で発現が確認された受容体に対する阻害剤を 2 日間細胞に添加し、その遊走能をポイデンチャンバー法にて評価する。

### (2) 遊走能亢進メカニズムの検討

遊走能が亢進するメカニズムを明らかにするため、遊走能獲得に寄与する分子をウェスタンブロット法で評価する。

### (3) MACS (磁気細胞分離システム) を用いた検討

細胞膜表面上の受容体の有無で細胞を分離するプロトコルを確立し、分離した細胞を用いて遊走能を評価する。

### (4) 臨床検体における VEGF 受容体発現状況の検討

臨床検体 49 例 (高度異形腺腫 10 例、腺癌 39 例) の免疫染色を行い、VEGF 受容体 1 の発現を評価する。

## 4. 研究成果

### (1) VEGF 受容体の個別阻害による遊走能の検討

VEGF 受容体の蛍光免疫染色の結果、VEGF 受容体 1 と 3 が細胞膜表面上に存在することを見出した。VEGF 受容体 1 に対する特異的阻害剤を用いたところ遊走能が有意に亢進したが、受容体 3 に対する特異的阻害剤を用いたところ遊走能は亢進しなかった (図 1)。VEGF 受容体 1 を阻害した細胞では、EMT (上皮 - 間葉転換: Epithelial-Mesenchymal Transformation) 関連因子である E-cadherin の減少と Snail の増加が認められた。VEGF 受容体 1 を経由し細胞内に入る VEGF シグナルを阻害することは、VEGF 受容体阻害時の遊走能亢進において重要な役割を有する可能性が明らかになった。

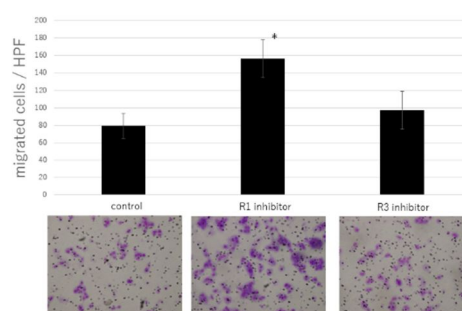


図 1 : 各 VEGF 受容体阻害時の遊走能

## (2)遊走能亢進メカニズムの検討

VEGF 受容体 1 に対する阻害剤を 2 日間添加した細胞において、c-Met のリン酸化が亢進することが明らかになった。c-Met は HGF (Hepatocyte growth factor) の受容体としても知られている。さらに、HGF シグナルの下流にあり、遊走能の獲得に寄与する因子のリン酸化も認められた。以上より、VEGF 受容体 1 が阻害下では HGF シグナルによって遊走能が亢進するという知見が得られた。

## (3)MACS (磁気細胞分離システム) を用いた検討

プロトコル確立後、分離した細胞の染色を行い VEGF 受容体 1 の有無で細胞が分離できていることを確認した。VEGF 受容体 1 の細胞膜表面への発現の有無で遊走能を比較したところ、VEGF 受容体 1 を発現していない細胞は発現している細胞に比べ遊走能が高くなる傾向にあることを見出した。細胞膜表面に VEGF 受容体 1 を発現し細胞内に VEGF シグナルを入れるシステムが損なわれることは、がん細胞の遊走能獲得につながる可能性が示唆された。

## (4)臨床検体における VEGF 受容体発現状況の検討

高度異形腺腫の症例では VEGF 受容体 1 は 1 例を除き観察されなかったが、腺癌 39 例では半数以上で発現が認められた。受容体の発現量及びがんの進行度に関連は認められなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nagano Hikaru, Tomida Chisato, Yamagishi Naoko, Teshima-Kondo Shigetada	4. 巻 20
2. 論文標題 VEGFR-1 Regulates EGF-R to Promote Proliferation in Colon Cancer Cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 5608 ~ 5608
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms20225608	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 富田知里、永野ひかる、山岸直子、近藤茂忠
2. 発表標題 VEGF受容体阻害剤による 大腸がん細胞の遊走能亢進メカニズムの解明
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 永野 ひかる, 松山 知菜未, 砂川 実乃莉, 富田 知里, 近藤 茂忠
2. 発表標題 VEGF経路とEGF経路のクロストーク 大腸がん細胞の悪性化進展機構への寄与
3. 学会等名 日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松山 知菜未, 永野 ひかる, 富田 知里, 砂川 実乃莉, 近藤 茂忠
2. 発表標題 フラボノイド類によるがん分子標的薬抵抗性の解除
3. 学会等名 日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	近藤 茂忠  (Kondo Shigetada)		
研究協力者	澤田 めぐみ  (Sawada Megumi)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------