

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 19 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591772

研究課題名（和文） 腫瘍血管新生と低酸素環境を軸としたテーラーメイド癌治療法の創出

研究課題名（英文） Tailor-made therapy for cancer based on tumor angiogenesis and hypoxia

研究代表者

森 章 (MORI AKIRA)

京都大学・医学研究科・非常勤講師

研究者番号：60324646

研究成果の概要（和文）：

抗血管新生療法の限界を打破するため、血管新生に依存しない低酸素環境における腫瘍の増殖機構を解析し、それに基づく治療標的分子の探索を行った。極めて予後不良である膵癌における KLF5 のシグナル伝達経路を *in vitro* で解析した。KRAS 変異の有無にかかわらず各種膵癌細胞株で KLF5 は高発現であり、P38 経路に依存していた。また、KLF5 の上流には、低酸素により誘導される HIF-1 α が存在し、下流には、PDGF-A、Survivin が存在し、膵癌の増殖、転移に関与することを突き止め、治療標的分子として KLF5 が有力候補となり、臨床標本での解析を行っている。

研究成果の概要（英文）：

Krüppel-like factor 5 (KLF5) is a transcription factor involved in cell transformation, proliferation, and carcinogenesis that can be up-regulated by RAS mutations. However, controversy persists as to whether it functions as a tumor suppressor or as an oncogene. The overexpression of KLF5 in human pancreatic cancer cells is not mediated by KRAS/Raf/MAPK/Erk signaling, but involves the IL-1beta/IL-1R system, p38, and the transcription factor HIF-1alpha. KLF5 is a promising candidate of target molecule in pancreatic cancer therapy. We are now investigating the clinical significance of KLF5 in pancreatic cancer patients.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
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：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：腫瘍血管新生、低酸素、分子標的治療、膵癌、肝細胞癌、肝移植

1. 研究開始当初の背景

抗腫瘍血管新生療法の旗手として VEGF (vascular endothelial growth factor) 中和抗体 (Bevacizumab) が登場し、従来の化学療法との併用により切除不能の転移を有する結腸直腸癌患者における奏率が 35% から 45% へ飛躍的に向上した。抗腫瘍血管新生療法は、様々な癌腫での効果が期待され副作用が少なく耐性が現れにくいとの謳い文句で臨床応用が開始され急速に普及した。しかし、癌腫間、個体間でその効果や耐性獲得に大きな差があることが判明している。

我々は、著明に血管新生を誘導し、腫瘍増殖が旺盛な VEGF 遺伝子導入高発現細胞株を樹立し、腫瘍血管新生を解析し報告した。他家は、ある種のメラノーマ細胞はそれ自体が内皮細胞様に形質転換すること (mimicry)、骨髄由来の内皮前駆細胞 (endothelial progenitor cell) が腫瘍血管を構成することを報告している。我々は、周皮細胞の被覆率が血管の成熟度を反映し、幼弱な腫瘍血管を有する患者で血行性転移が多く、予後不良であることを見だし、また VEGF による腫瘍血管新生の超微細構造を解析し、内皮細胞の sprout の増加とともに周皮細胞の減少を見いだしている。しかし、依然、腫瘍血管構成細胞の経時的形態変化と発現分子の相互関係は不明な点が多い。

我々は、内皮細胞を標的とした治療法として、VEGF 受容体の可溶型をコードする Flt-1 細胞外ドメインを用いた遺伝子治療法を考案し、胃癌皮下腫瘍モデル及び腹膜播種モデルにおいて優れた治療効果を報告した。また、血管新生阻害因子アンジオスタチンを生成する MME を用いて皮下腫瘍モデルに対して増殖抑制効果を報告した。血管の成熟度に関与する分子として RECK や PDGFR、FAK、PI3K などが報告されており、内皮細胞と周皮細胞や腫瘍細胞との相互関係から腫瘍血管の多様性に対応した治療法の開発を目指す。

一方、抗腫瘍血管新生療法の限界を打破するため、血管新生に依存せず低酸素状態で増殖可能な腫瘍におけるエネルギー獲得機構の解析を行い、それに基づく分子標的治療法の開発は他に類を見ない。

切除不能進行癌に対する分子標的治療は国内でも臨床応用が開始されているが、原発巣切除後の微小転移に対する分子標的治療は未だ行われておらず、腹膜播種、創部局所再発、肝転移、リンパ節転移、肝移植後再発という難治性の癌病態それぞれに対して至適分子、投与方法や併用化学療法を検討し、テーラーメイド治療を確立する必要があると考える。特に、肝硬変に発生した肝細胞癌に対する肝移植術は、肝硬変とともに癌の根治

をめざした治療法であるが、肝細胞癌が再発すると免疫抑制剤の影響もあり予後は極めて不良である。生体ドナーの危険性や脳死ドナー不足の観点からも、肝移植を受けたレシピエントの長期予後を改善せねばならない。

2. 研究の目的

腫瘍血管新生の構築過程における分子生物学的多様性を解明し、それに応じた新たな分子標的治療を開発するとともに、担癌個体の病態に応じた至適投与方法や化学療法との併用を考案することにより、癌の生物学的特性と患者の病態の両者に適合したテーラーメイドの治療戦略を創出することをめざす。

(1) まず、腫瘍血管新生と低酸素環境における pivotal molecule として KLF5 に着目した。KLF5 は、心血管リモデリング、血管新生に重要な働きを担っており、また、大腸癌では KRAS 変異に伴い Raf/MEK/Erk 経路を介して癌の増殖、転移に関与していることが報告されている。今回、KRAS 変異が約 80% である膵癌における KLF5 のシグナル伝達経路を解析し、新たな分子標的治療の可能性を探求する。

(2) さらに、膵癌患者における KLF5 および HIF-1 α の臨床的意義を検討する。

(3) 肝移植後肝細胞癌再発を抑制するための至適標的分子および投与方法をラット肝移植モデルで検討する。

3. 研究の方法

(1) 膵癌細胞株を用いた *in vitro* 実験 ① 各種膵癌細胞株における KLF5 発現を Western blot で評価した。② IL-1 β 刺激時の KLF5 発現誘導を RT-PCR および Western blot で評価した。③ 低酸素刺激時の KLF5 と HIF-1 α 発現を Western blot で評価した。④ 細胞密度、足場依存度に伴う KLF5 発現を RT-PCR で評価した。⑤ KLF5 の標的遺伝子の検索を KLF5 siRNA を用いて行った。

(2) 膵癌における HIF-1 α と KLF5 の臨床的意義を明らかにすべく、R0 手術を受けた 53 例の膵癌患者の切除標本を用いて免疫染色を行い、臨床病理学的因子、予後との関連を検討した。

(3) ① ラット肝移植モデルを安定して作成する。② グラフト肝灌流時に *ex vivo* で物質を投与し、移植後の効果を評価する。③ ラット肝細胞癌株を用いて、肝移植後肝癌再発モデルを作成する。④ 肝移植後肝癌再発モデルに対して、ある物質の抑制効果を検討す

る。

4. 研究成果

(1) ① 膵癌細胞株では KRAS 変異の有無に関わらず、KLF5 発現は亢進していた。MEK/Erk 経路や SAPK/JNK 経路ではなく、P38 経路に依存していた。② IL-1 β 刺激により P38 を介して KLF5 発現は誘導された。③ 低酸素刺激で HIF-1 α とともに KLF5 発現が誘導され、HIF-1 α siRNA により KLF5 発現が抑制され、免疫共沈降により両蛋白が結合した。④ 高細胞密度、足場非依存的増殖において KLF5 発現が亢進した。⑤ KLF5 siRNA により、PDGF-A および Survivin の発現が抑制された。

(2) 患者生存期間は、癌細胞における HIF-1 α 高発現症例および KLF5 高発現症例で有意に長く、両者の発現分布が一致している症例で長い傾向であった。

(3) ① ラット肝移植モデルが安定して作成できるようになった。②③④ グラフト肝灌流時の物質の投与量、投与経路、肝移植後肝癌再発モデルは試行中である。

以上から、in vitro において、膵癌細胞株では Kras 変異の有無に関わらず KLF5 発現は亢進しており、そのシグナル伝達経路は P38 と HIF-1 α に依存していた。KLF5 は足場非依存的増殖において発現が亢進し、標的遺伝子として PDGF-A と Survivin が確認され、癌の増殖転移に関与していることを見いだした。KLF5 は血管新生と低酸素環境の両者に作用する pivotal molecule であり、膵癌に対する治療標的分子として有望と考えられた。一方、今回の膵癌患者の臨床切除標本を用いた免疫染色の結果からは、KLF5 と HIF-1 α の高発現がともに生存期間に対して有利に関与すると考えられ、その解釈が難しい。肝移植後肝癌再発抑制実験は継続中である。

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 1 件)

- ① Mori A, Moser C, Lang SA, et al. Up-regulation of Krüppel-like factor 5 in pancreatic cancer is promoted by interleukin-1beta signaling and hypoxia-inducible factor-1alpha. Mol Cancer Res. 査読有 .7: 1390-1398. 2009. 10.1158/1541-7786.MCR-08-0525 著者 9 名 1 番目.

[学会発表] (計 2 件)

- ① 森章, Oliver Stoeltzing, 土井隆一郎, 上本伸二, 膵癌における KLF5 のシグナル伝達経路と治療標的としての可能性. 第 68 回 日本癌学会学術総会 2009.10.2 横浜
- ② 森章, Oliver Stoeltzing, 土井隆一郎, 上本伸二, 膵癌における KLF5 のシグナル伝達経路と治療標的としての可能性. 第 18 回 日本癌転移学会学術集会・総会 2009.7.23 旭川

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森 章 (MORI AKIRA)

京都大学・医学研究科・非常勤講師

研究者番号：60324646

(2) 研究分担者

秦 浩一郎 (HATA KOICHIRO)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：90523118