

## 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 25 年 6 月 15 日現在

|  |
|--|
| 機関番号： 32206  |
| 研究種目： 基盤研究（C）  |
| 研究期間： 2010 ～ 2012  |
| 課題番号： 22591478   |
| 研究課題名（和文） 大腸癌におけるベバシズマブの耐性機序の解明とその克服   |
| 研究課題名（英文） The mechanism and overcome of resistance to anti-VEGF antibody, bevacizumab in colon cancer. |
| 研究代表者<br>高橋 豊（TAKAHASHI YUTAKA）<br>国際医療福祉大学<br>研究者番号： 10179541   |

研究成果の概要（和文）：血管新生因子の一つである VEGF の中和抗体ベバシズマブの耐性機序の解明とその克服の可能性について検討した。ベバシズマブの長期投与により耐性となったと思われるヌードマウス移植大腸癌株および臨床症例において、網羅的遺伝子解析により耐性によって変化する遺伝子の有無を検討したが、残念ながら共通する遺伝子を指摘することは不可能であった。以上より、ベバシズマブは抗癌剤や他の分子標的治療薬に比べて規定の耐性が生じにくいものと推察された。

研究成果の概要（英文）： We studied the mechanism and overcome of resistance to anti-VEGF antibody, bevacizumab. We could not find any upregulated genes in transplanted tumors and clinical tumors which were resistant to bevacizumab while bevacizumab therapies by several microarray studies. These results suggest that the resistance to anti-VEGF would be rare rather than conventional cancer drugs and other molecular targeting drugs.

### 交付決定額

（金額単位：円）

|       | 直接経費      | 間接経費      | 合計        |
|-------|-----------|-----------|-----------|
| 22 年度 | 1,800,000 | 540,000   | 2,340,000 |
| 23 年度 | 1,200,000 | 360,000   | 1,560,000 |
| 24 年度 | 500,000   | 150,000   | 650,000   |
| 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：大腸癌外科学

#### 1. 研究開始当初の背景

我々は、大腸癌の血管新生が転移、予後に大きく関連するとともに、血管新生因子として

は Vascular endothelial growth factor (VEGF) が強く関与していることを初めて報告した (Takahashi Y, Kitadai Y et al,

Cancer Res, 55, 1995, Takahashi Y, Kitadai Y, et al, Arch Surg, 132, 1997)。その後、数多くの追試がなされ、特に大腸癌において VEGF の関与が強いことが確認され、2000 年から VEGF のヒト遺伝子組換えヒトモノクローナル抗体の一つである Bevacizumab と化学療法剤との併用治療により臨床試験が開始され、最終的には第 3 相試験において抗腫瘍効果と生存期間が化学療法単独に比し有意に改善したこと、2004 年 Bevacizumab は初の血管新生抑制剤として米 FDA において認可され、本邦においても、2007 年大腸癌において厚労省より認可された。

我々は、これまで VEGF 中和抗体の効果的な投与方法に関する研究を行い（平成 13 年度-14 年度、基盤研究 C、平成 15 年度-16 年度、基盤研究 C：いずれも研究代表者）、症例選択の重要性、投与期間、アポトーシスを目指した併用治療、併用する化学療法剤の投与方法などを報告してきた。また、我々が提唱した新たな癌治療戦略である Tumor dormancy therapy (Takahashi Y, et al, J Natl Cancer Inst, 87, 1995) を目指す場合、Bevacizumab と併用する抗癌剤治療は、遺伝子薬理学に基づいた individualized maximum repeatable dose (iMRD) 法が適していることを報告した（平成 17 年度-18 年度、基盤研究 C：研究代表者）。この iMRD 法は、胃癌において全国的な臨床試験が施行され、その方法論が確立されつつある (ESMO 2008)。

## 2. 研究の目的

そういった研究の中で、また臨床的にも現在 Bevacizumab 治療の最も大きな問題の一つは、Bevacizumab の耐性である。Bevacizumab の標的が癌細胞ではなく、ヒトの血管内皮細胞であることから、理論的に耐性が少ないと予想されていたが、実際は臨床的には 1、2 年

で効かなくなることも少なくないとされている。我々も、VEGF 抗体を長期投与したヌードマウス移植腫瘍において、当初増殖を抑制していたが、治療開始後 10 週を超えた後腫瘍が VEGF 抗体に抵抗性となり、再増殖を始める株を経験した。この耐性の理由としては、Bevacizumab 治療により、癌細胞から産生される VEGF に変異体が発現すること、あるいは VEGF に替わって basic fibroblast growth factor (bFGF) など別の血管新生因子が亢進することなどが報告されているが、いまだ明らかではない。血管新生抑制治療は、長期間腫瘍を tumor dormancy に置く事が重要であり、耐性の出現は致命的なものと考えられる。

## 3. 研究の方法

ヌードマウスに種々のヒトの癌細胞株（大腸癌、胃癌、肺癌）を皮下あるいは同所移植し、既報のごとく Bevacizumab 5mg/kg, 週 2 回投与で、12 週間治療を継続する。その中で、Bevacizumab の効果があり 12 週間効果が継続した A 群、途中効果が減弱した（耐性を示した）B 群、最初から効果がなかった C 群の 3 群に分類する。これらに対し、ヌードマウス移植前の細胞株、ヌードマウス移植後治療前、治療後 4 週毎の腫瘍を採取する。

また著者らが作成した、ヌードマウス皮下移植では VEGF の発現亢進が見られないが、同所移植で初めて VEGF が発現し、肝転移を合併する腫瘍株 (KKLS) においては、Bevacizumab 治療において、皮下移植腫瘍は血管新生抑制効果が見られないのに対し、同所移植腫瘍においては原発巣ばかりでなく、肝転移巣も抑制されることを報告している (Takahashi Y,

et al, J Exp Clini Res, 24, 2005)。そこで、この実験系において、無治療群において併発した肝転移と、Bevacizumab治療においても併発した腫瘍（Bevacizumabの抑制機構からエスケープした腫瘍と考えられる）を採取する。

細胞株、ヌードマウス皮下腫瘍、ヌードマウス同所移植腫瘍、大腸癌症例の各種の腫瘍に対し、タンパクコードRNAおよび非タンパクコードRNAの網羅的発現解析を行い、異常発現する機能性RNAを検出し、Bevacizumabの耐性発現と関連が深いものを同定する。また免疫染色等で、各種の腫瘍の血管新生の状況、VEGF、VEGFR-1、VEGFR-2、VEGFR-3、platelet derived growth factor (PDGF), platelet derived endothelial cell growth factor (PD-ECGF)などの種々の血管新生因子の発現を検索し、VEGFに替わる新たな血管新生因子の発現亢進の有無などを検索し、遺伝子解析の成績との照合を行う。

Bevacizumabの耐性発現に関連する遺伝子が同定された場合は、引き続き anti-sense や抗体を使用し、これらの遺伝子を抑制することにより、耐性の克服が可能かどうかを検討する。また Bevacizumab の投与により、腫瘍から発現する血管新生が VEGF から他の血管新生因子に変更することが判明した場合は、その血管新生を抑制することにより Bevacizumab の耐性が克服できる否かを検討する。

#### 4. 研究成果

いくつかの遺伝子の亢進、減弱が認められ

たものの、残念ながら治療前後で共通する遺伝子の変化を指摘することはできなかった。今回の研究の問題点として、臨床例の場合、腫瘍の切除が可能なのは、原発巣が切除されていないか、比較的採取が容易な浅い場所のリンパ節などに限定されるため症例の収集が困難であることと、Bevacizumab 治療は Oxaliplatin や CPT-11、5-FU などの併用が不可欠であるため、耐性になった時点を見分けることが困難であること、さらにこれら抗癌剤の耐性に関する遺伝子が含まれてしまうなどがあげられる。

#### 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2件）

Takahashi Y and Nishioka K. Therapeutic approaches targeting tumor vasculature in gastrointestinal cancers. Front Biosci, 2011, 3:541-548.

Komatsu Y, Takahashi Y, Kimura Y, Oda H, Tajima Y, Tamura S, Sakurai J, Wakasugi T, Tatebe S, Takahashi M, Sakata Y, Kitajima M, Sakamoto J, Saji S. Randomized phase II trial of first-line treatment with tailored irinotecan and S-1 therapy versus S-1 monotherapy for advanced or recurrent gastric carcinoma (JFMC31-0301). Anticancer Drugs. 2011 Jul;22(6):576-83.

〔学会発表〕（計0件）

〔図書〕（計0件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

○取得状況（計0件）

〔その他〕

ホームページ等：なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

高橋 豊 (TAKAHASHI YUTAKA)

国際医療福祉大学・

臨床医学研究センター・教授

研究者番号:10179541

### (2) 研究分担者

北台 靖彦 (Kitadai Yashuhiko)

広島大学・大学院医歯薬総合研究科・

准教授

研究者番号 : 10304437