

平成 30 年 6 月 8 日現在

機関番号：24403

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04931

研究課題名(和文)血管新生阻害治療の盲点：大腸癌細胞の新たな環境適応機構とその制御法の開発

研究課題名(英文)Elucidation of a novel evasive adaptation mechanism against antiangiogenic treatment in colorectal cancer cells

研究代表者

近藤 茂忠(Kondo, Shigetada)

大阪府立大学・総合リハビリテーション学研究科・教授

研究者番号：40304513

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,900,000円

研究成果の概要(和文)：VEGFを分子標的とした血管新生阻害薬は、治癒切除不能な大腸がんの中心的な化学療法となっている。ところが、大半の患者でVEGF阻害薬に対する獲得耐性が生じ、さらに悪性進展してしまうことが臨床的に問題となっている。本研究では、VEGF/VEGFR分子標的薬を感知する分子基盤と、これら分子標的薬により活性化されるがん細胞の適応プログラムを解明した。さらに、VEGF/VEGFRの破綻をがん細胞に感知させない方法を見出した。

研究成果の概要(英文)：VEGF- and its receptor (VEGF-R)-targeted anti-angiogenic therapies are important treatments for colorectal cancer. However, there is increasing evidence that VEGF/VEGF-R inhibitors promote the adaptive and evasive resistance of tumor cells to the therapies. How the cancer cells become resistant remains unclear. We elucidated that VEGF/VEGF-R blockers directly act on tumor cells independently of anti-angiogenic effects, resulting in induction of receptor switching to activate the evasive adaptation. We further found several agents that effectively blocked the evasive mechanism.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：VEGF VEGF受容体 悪性進展 VEGF分子標的薬 浸潤

1. 研究開始当初の背景

VEGF/VEGF 受容体を分子標的とした血管新生阻害薬は、治癒切除不能な固形がんの中心的な化学療法となっている。ところが、大半の患者で VEGF 分子標的阻害薬に対する獲得耐性が生じてしまうことが臨床的に問題となっている。さらに、マウス腫瘍モデルでは、VEGF 阻害治療によってがん細胞の悪性化(浸潤・転移)も促進されてしまうことが分かってきた。これらのメカニズムについて、血管新生が阻害された「後」の低酸素応答はよく解析されているが、血管新生が阻害される「前」のがん細胞の反応やその仕組みは全く解っていない。これまで、大腸がんを含む多くの固形がん細胞(患者検体、細胞株)は VEGF 受容体を発現し、生存シグナルに関与していることが報告されているものの、その本質的役割は全く解っていない。従って、VEGF/VEGF-R 阻害薬が腫瘍細胞に直接与える影響も解っていないのが現状である。

2. 研究の目的

本研究では、大腸がん細胞が持つ VEGF/VEGFR システムの本質的役割を解明し、VEGF/VEGFR 分子標的阻害薬によって悪性進展する分子機構を明らかにする。さらに、悪性進展を抑制できる方法を開発する。

3. 研究の方法

(1) がん細胞の VEGFR 分子標的薬感知機構の検討

3種類の担がんマウスモデル(1. 血管新生とがん細胞の VEGF モニターシステムの両方を阻害するモデル(レゴラフェニブ投与)、2. 血管新生のみを阻害しがん細胞の VEGF モニターシステムは阻害しないモデル(マウス特異的 VEGF 中和抗体投与)、3. がん細胞の VEGF モニターシステムのみを阻害して、血管新生は阻害しないモデル(ヒト特異的 VEGF-R1 中和抗体投与))を作製し、免疫組織化学染色法(CD31 染色、TUNEL 染色、pan-keratin 染色)で評価した。

(2) VEGF 以外の血管新生因子受容体を阻害した時の腫瘍細胞浸潤能の検討

担がんマウスに各種血管新生阻害剤(FGF-R(SSR128129E)、c-Met(INCB28060)、PDGF-R(CP673451)、Tie-2(2-MCA)、TGFb-R(GW788388))を投与し、免疫組織化学染色法(TUNEL 染色、pan-keratin 染色)で評価した。

(3) がん細胞の VEGF システム破綻を感知する分子基盤の検討

NRP1 と相互作用することが報告されている増殖因子受容体(FGF-R、TGFb-R、PDGF-R)をそれぞれ単独阻害、あるいはNRP1阻害と併用して、適応プログラムが抑制されるかを、アポトーシスと浸潤能を指標に評価した。

(4) ノンコーディング RNA を介した適応メカニズムの解明

RNA プルダウン実験で、VEGF-ncRNA と VEGF-R1-ncRNA を bait として、ビオチン・ストレプトアビジンシステムで共沈してきた mRNA を RNA-Seq 解析し、標的 mRNA を RNA-Seq 解析で同定する。

4. 研究成果

(1) がん細胞の VEGFR 分子標的薬感知機構の検討

In vivo 環境下におけるがん細胞の VEGFR 分子標的薬感知機構を検討するために、がん細胞移植モデルを構築し、以下の3条件 (1. 血管新生とがん細胞の VEGF モニターシステムの両方を阻害するモデル, 2. 血管新生のみを阻害しがん細胞の VEGF モニターシステムは阻害しないモデル, 3. がん細胞の VEGF モニターシステムのみを阻害して、血管新生は阻害しないモデル) を検討した。結果は当初予想通り、モデル1と3では、細胞死抵抗性と浸潤能の亢進が起こった。一方、モデル2では、細胞死は顕著に増加し、浸潤能の亢進は認められなかった。

(2) VEGF 以外の血管新生因子受容体を阻害した時の腫瘍細胞浸潤能の検討

VEGF 以外の血管新生因子受容体を阻害した時の腫瘍細胞浸潤能の活性化について解析した結果、がん細胞に発現する FGF-R、PDGF-R、TGFb-R、cMet、Tie-2 を阻害しても腫瘍細胞浸潤能の活性化は誘導されないことを見出した。

(3) がん細胞の VEGF システム破綻を感知する分子基盤の検討

これまでの検討で、感知システムとしては、VEGF 受容体と相互作用できる「受容体」分子 (NRP-1, NRP-2, integrin family) が候補として考えられ、阻害剤を用いて検討した結果、NRP-1 が責任分子であることを見出している。NRP1 は VEGF と結合できるが、キナーゼドメインを持たないため、単体ではシグナルを伝達できない。よって、VEGF 受容体キナーゼ阻害薬の標的から漏れている。このことから、阻害薬によって VEGF 受容体が抑制された結果、NRP1 受容体が活性化されて、適応反応の一部を惹起していると考えられた (レセプター・スイッチング)。本研究では、NRP1 と相互作用することが報告されている種々の増殖因子受容体 (FGF-R, TGFb-R, PDGF-R, cMet, EGF-R) をそれぞれ単独阻害、あるいは NRP1 阻害と併用して、適応プログラムが抑制されるかを、アポトーシスと浸潤能を指標に評価した。その結果、3種類の増殖因子受容体 (TGFb-R, cMet, EGF-R) が感知を担っていることを同定した。さらに、これら受容体の細胞内シグナル伝達経路を解析し、cAbl と p130Cas が中核分子であることを明らかにした。また、この成果に基づき、感知受容体群を阻害できる化合物を探索し、2つの有効な低分子化合物を見出した。

(4) ノンコーディング RNA を介した適応メカニズムの検討

VEGF/VEGF-R 分子標的阻害薬によって誘導されるノンコーディング RNA (VEGF-ncRNA, VEGF-R1-ncRNA) の標的 mRNA として2つの腫瘍抑制遺伝子を同定した。VEGF-ncRNA, VEGF-R1-ncRNA によってこれら腫瘍抑制遺伝子の発現が抑制されることを見出した。さらに、種々のフラボノイド類がこれら2つのノンコーディング RNA の転写を抑制できることを見出した。

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14件)

1. Tomida C, Yamagishi N, Nagano H, Uchida T, Ohno A, Hirasaka K, Nikawa T, and Teshima-Kondo S. (corresponding author) VEGF pathway-targeting drugs induce evasive adaptation by activation of neuropilin-1/cMet in colon cancer cells. *Int. J. Oncol.* 52(4): 1350-1362. doi: 10.3892/ijo.2018.4291. (査読有)
2. Uchida T, Sakashita Y, Kitahata K, Yamashita Y, Tomida C, Kimori Y, Komatsu A, Hirasaka K, Ohno A, Nakao R, Higashitani A, Higashibata A, Ishioka N, Shimazu T, Kobayashi T, Okumura Y, Choi I, Oarada M, Mills EM, Teshima-Kondo S., Takeda S, Tanaka E, Tanaka K, Sokabe M, Nikawa T. Reactive oxygen species up-regulate

- expression of muscle atrophy-associated ubiquitin ligase Cbl-b in rat L6 skeletal muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2018 Mar 7. doi: 10.1152/ajpcell.00184.2017. (査読有)
3. Tomida C, Nagano H, Yamagishi N, Uchida T, Ohno A, Hirasaka K, Nikawa T, and Teshima-Kondo S. (corresponding author) Regorafenib induces adaptive resistance of colorectal cancer cells via inhibition of vascular endothelial growth factor receptor. *J. Med. Invest.* 64: 262-265 (2017). doi: 10.2152/jmi.64.262. (査読有)
 4. Tomida C, Yamagishi N, Nagano H, Uchida T, Ohno A, Hirasaka K, Nikawa T, and Teshima-Kondo S. (corresponding author) Antiangiogenic agent sunitinib induces epithelial to mesenchymal transition and accelerates motility of colorectal cancer cells. *J. Med. Invest.* 64: 250-254 (2017). doi: 10.2152/jmi.64.250. (査読有)
 5. Abe T, Hirasaka K, Kohno S, Tomida C, Haruna M, Uchida T, Ohno A, Oarada M, Teshima-Kondo S, Okumura Y, Choi I, Aoyama T, Terao J, Nikawa T. Capric Acid Up-Regulates UCP3 Expression without PDK4 Induction in Mouse C2C12 Myotubes. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 62: 32-39 (2016). doi: 10.3177/jnsv.62.32. (査読有)
 6. Hirasaka K, Mills EM, Haruna M, Bando A, Ikeda C, Abe T, Kohno S, Nowinski SM, Lago CU, Akagi KI, Tochio H, Ohno A, Teshima-Kondo S, Okumura Y, Nikawa T. UCP3 is associated with Hax-1 in mitochondria in the presence of calcium ion. *Biochem Biophys Res Commun.* 472: 108-113 (2016). doi: 10.1016/j.bbrc.2016.02.075. (査読有)
 7. Ohno A, Ochi A, Maita N, Ueji T, Bando A, Nakao R, Hirasaka K, Abe T, Teshima-Kondo S, Nemoto H, Okumura Y, Higashibata A, Yano S, Tochio H, Nikawa T. Structural analysis of the TKB domain of ubiquitin ligase Cbl-b complexed with its small inhibitory peptide, Cblin. *Arch Biochem Biophys.* 594:1-7 (2016). doi: 10.1016/j.abb.2016.02.014. (査読有)
 8. Tomida C, Yamagishi N, Aibara K, Yano C, Uchida T, Abe T, Ohno A, Hirasaka K, Nikawa T, and Teshima-Kondo S. (corresponding author) The malignant progression effects of regorafenib in human colon cancer cells. *J. Med. Invest.* 62 (3-4): 195-198 (2015). doi: 10.2152/jmi.62.195. (査読有)
 9. Hashimoto R, Sakai A, Murayama M, Ochi A, Abe T, Hirasaka K, Ohno A, Teshima-Kondo S, Yanagawa H, Yasui N, Inatsugi M, Doi D, Takeda K, Mukai R, Terao J, and Nikawa T. Effects of dietary soy protein on skeletal muscle volume and strength in human with various physical activities. *J. Med. Invest.* 62 (3-4): 177-183 (2015). (査読有)
 10. Shiota C, Abe T, Kawai N, Ohno A, Teshima-Kondo S, Mori H, Terao J, Tanaka E, Nikawa T. Flavones Inhibit LPS-Induced Atrogin-1/MAFbx Expression in Mouse C2C12 Skeletal Myotubes. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 61: 188-194 (2015). (査読有)
 11. Tomida C, Yamagishi N, Aibara K, Yano C, Uchida T, Abe T, Ohno A, Hirasaka K, Nikawa T, and Teshima-Kondo S. (corresponding author) Chronic exposure of VEGF inhibitors promotes the malignant phenotype of colorectal cancer cells. *J. Med. Invest.* 62: 75-79 (2015). doi: 10.2152/jmi.62.75. (査読有)
 12. Ochi A, Abe T, Nakao R, Yamamoto Y, Kitahata K, Takagi M, Hirasaka K, Ohno A, Teshima-Kondo S, Taesik G, Choi I, Kawamura T, Nemoto H, Mukai R, Terao J, Nikawa T. N-Myristoylated ubiquitin ligase Cbl-b inhibitor prevents on glucocorticoid-induced atrophy in mouse skeletal muscle. *Arch Biochem Biophys.* 570: 23-31 (2015). (査読有)
 13. Nagano H, Yamagishi N, Tomida C, Yano C, Aibara K, Kohno S, Abe T, Ohno A, Hirasaka K, Okumura Y, Mills EM, Nikawa T, and Teshima-Kondo S. (corresponding author) A novel myogenic function residing in the 5' non-coding region of *Insulin receptor substrate-1 (Irs-1)* transcript. *BMC Cell Biol.* 16:8 (2015). doi: 10.1186/s12860-015-0054-8. (査読有)
 14. Kawai N, Hirasaka K, Maeda T, Haruna M, Shiota C, Ochi A, Abe T, Kohno S, Ohno A, Teshima-Kondo S, Mori H, Tanaka E, and Nikawa T. Prevention of skeletal muscle atrophy in vitro using anti-ubiquitination oligopeptide carried by atelocollagen *Biochim Biophys Acta - Molecular Cell Research*, 1853(5):873-880 (2015). (査読有)

[学会発表] (計 23 件)

(1) 二宮みゆき、木森有希、高木麻理奈、井田くるみ、岸本ひかる、高津絵梨香、石田祐子、加藤健、越智ありさ、内田貴之、真板綾子、安倍知紀、近藤茂忠、中尾玲子、平坂勝也、二川健 坐骨神経切除による筋萎縮におけるホエイペプチドと大豆タンパク質の阻害効果 第71回日本栄養・食糧学会大会 2017. 5. 19-21. 沖縄コンベンションセンター (沖縄県宜野湾市)

(2) 真板綾子、真板宣夫、奥村裕司、永野ひかる、有田恭平、平坂勝也、安倍知紀、近藤茂忠、二川健 高病原性インフルエンザ感染に関わる宿主酵素 MSPL と阻害ペプチドとの複合体構造 第71回日本栄養・食糧学会大会 2017. 5. 19-21. 沖縄コンベンションセンター (沖縄県宜野湾市)

(3) 木森有希、二宮みゆき、相原知佳、坂下禎宏、内田貴之、安倍知紀、中尾玲子、真板綾子、近藤茂忠、二川健 Mfn2 ノックダウンの筋肉における影響の検討 第71回日本栄養・食糧学会大会 2017. 5. 19-21. 沖縄コンベンションセンター (沖縄県宜野湾市)

(4) Ohno Ayako, Saki Tsugita, Katsuya Hirasaka, Marie Haruna, Chika Ikeda,

Ken-ich Akagi, Hidehito Tochio, Shigetada Teshima-Kondo, Yuushi Okumura, Takeshi Nikawa. Calcium-Dependent Interactive between UCP3 and Hax-1. The 27th International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems. 2016. 8. 21-26. 国立京都国際会館 (京都府京都市)

(5) 矢野千晶、富田知里、山岸直子、相原可奈、安倍知紀、真板綾子、二川健、近藤茂忠 アピゲニンによる大腸癌細胞悪性化の抑制とその分子機構の解明 第70回日本栄養・食糧学会大会 2016. 5. 13-15. 武庫川女子大学中央キャンパス (兵庫県西宮市)

(6) 次田早希、真板綾子、赤木謙一、平坂勝也、奥村裕司、近藤茂忠、Floriane Rudwill、安倍知紀、朽尾豪人、二川健 UCP3 と HAX-1 の相互作用様式の解明 第16回日本蛋白質科学会年会 2016. 6. 7-9. 福岡国際会議場 (福岡県福岡市)

(7) 真板綾子、真板宣夫、奥村裕司、永野ひかる、次田早希、有田恭平、坂東亜紀、田畑考統、平坂勝也、安倍知紀、近藤茂忠、二川健 高病原性インフルエンザウイルス感染に関わる宿主酵素 MSPL とペプチド性阻害剤の複合体結晶構造 第16回日本蛋白質科学会年会 2016. 6. 7-9. 福岡国際会議場 (福岡県福岡市)

(8) 富田知里、近藤茂忠 Elucidation of molecular mechanism by which VEGF-R inhibitors promote malignant phenotype of colon cancer cells. 第75回日本癌学会学術総会 2016. 10. 6-8. パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

(9) Saki Tsugita, Katsuya Hirasaka, Marie Haruna, Edward M. Mills, Aki Bando, Tomoki Abe, Cory U. Lago, Sara M. Nowinski, Ken-ichi Akagi, Hidehito Tochio, Ayako Ohno, Shigetada-Teshima-Kondo, Yuushi Okumura, Takeshi Nikawa. Elucidation of the interaction between UCP3 and Hax-1. 11th Asian Microgravity Symposium. 2016. 10. 25-29. 北海道大学学術交流会館 (北海道札幌市)

(10) 矢野千晶、富田知里、山岸直子、相原可奈、安倍知紀、真板綾子、二川健、近藤茂忠、アピゲニンによる大腸癌細胞悪性化の抑制とその分子機構の解明 第39回日本分子生物学会年会 2016. 11. 30-12. 2. パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

(11) 富田知里、山岸直子、相原可奈、矢野千晶、安倍知紀、真板綾子、二川健、近藤茂忠 VEGF 受容体阻害剤による大腸がん細胞悪性化の分子機構の解明 第39回日本分子生物学会年会 2016. 11. 30-12. 2. パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

(12) 相原可奈、富田知里、山岸直子、矢野千晶、安倍知紀、真板綾子、二川健、近藤茂忠、血管新生阻害薬によるがん細胞の悪性化機構の解明 第39回日本分子生物学会年会 2016. 11. 30-12. 2. パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

(13) 矢野千晶、富田知里、山岸直子、相原可奈、安倍知紀、真板(大野)綾子、二川健、近藤茂忠 アピゲニンによる大腸癌細胞悪性化の抑制とその分子機構の解明 第38回日本分子生物学会年会 2015. 12. 1-4. 神戸ポートアイランド (兵庫県神戸市)

(14) 相原可奈、富田知里、山岸直子、矢野千晶、安倍知紀、真板(大野)綾子、二川健、近藤茂忠 血管新生阻害薬によるがん細胞の悪性化機構の解明 第38回日本分子生物学会年会 2015. 12. 1-4. 神戸ポートアイランド (兵庫県神戸市)

(15) 富田知里、山岸直子、相原可奈、矢野千晶、安倍知紀、真板綾子、二川健、近藤茂忠 VEGF 阻害薬による大腸がん細胞の悪性化とその分子機構の解明 第38回日本分子生物学会年会 2015. 12. 1-4. 神戸ポートアイランド (兵庫県神戸市)

(16) 富田知里、近藤茂忠 Elucidation of molecular mechanism by which VEGF inhibitors promote malignant phenotype of colon cancer cells. 第74回日本癌学会学術総会 2015. 10. 8-10. 名古屋国際会議場 (愛知県名古屋市)

(17) Shigetada Teshima-Kondo, Yano Chiaki, Yamagishi Naoko, Tomida Chisato, Aibara Kana, Abe Tomoki, Ohno Ayako, Nikawa Takeshi. Chemopreventive effects of polyphenols on malignant phenotypes induced by chronic inhibition on VEGF in colorectal cancer cells. 12th Asian Congress of Nutrition. 2015. 5. 14-18. パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

(18) Marina Takagi, Arisa Ochi, Kanako Kitahata, Hikaru Kishimoto, Reiko Nakao, Ayako Maita, Shigetada Kondo, Tomoki Abe, Hisao Nemoto, Takeshi Nikawa. N-Myristoylated ubiquitin ligase Cbl-b inhibitor prevents on glucocorticoid-induced atrophy in mouse skeletal muscle. 12th Asian Congress of Nutrition. 2015. 5. 14-18. パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

(19) Tomoki Abe, Katsuya Hirasaka, Takayuki Uchida, Marina Takagi, Ayako Ohno, Shigetada Kondo, Takeshi Nikawa. Cbl-b is a Critical Regulator of macrophage Activation With Obesity-Induced insulin Resistance in Mice. 12th Asian Congress of Nutrition. 2015. 5. 14-18. パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

(20) Takayuki Uchida, Takeshi Nikawa, Tomoki Abe, Shohei Kohno, Katsuya Hirasaka, Ayako Ohno, Shigetada Kondo, Yuushi Okumura, Edward M. Mills. Ubiquitin ligase Cbl-b is a negative regulator for insulin-like growth factor 1 signaling during

muscle atrophy caused by unloading. 12th Asian Congress of Nutrition. 2015. 5. 14-18. パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

- (2 1) Takayuki Uchida, Takeshi Nikawa, Tomoki Abe, Shohei Kohno, Ayako Maita, Shigetada Kondo, Katsuya Hirasaka, Yuushi Okumura, Mills M Edward. Ubiquitin ligase Cbl-b is a negative regulator for insulin-like growth factor 1 signaling during muscle atrophy caused by unloading. 30th International Symposium on Space Technology and Science. 2015. 7. 4-10. 神戸コンベンションセンター (兵庫県神戸市)
- (2 2) Marina Takagi, Arisa Ochi, Kanako Kitahata, Hikaru Kishimoto, Reiko Nakao, Tomoki Abe, Ayako Maita, Shigetada Kondo, Kazuhito Akama, Takeshi Nikawa. A novel functional rice against skeletal muscle atrophy caused by unloading. 44th European Muscle Conference. 2015. 9. 21-25. ワルシャワ大学 (ポーランドワルシャワ)
- (2 3) Tomoki Abe, Katsuya Hirasaka, Marina Takagi, Hikaru Kishimoto, Ayako Maita, Shigetada Kondo, Takeshi Nikawa. Capric acid up-regulates UCP3 expression without PDK4 induction in mouse C2C12 myotubes. 44th European Muscle Conference. 2015. 9. 21-25. ワルシャワ大学 (ポーランドワルシャワ)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 1 件)

名称：p 5 3 の発現促進方法およびそれに用いる p 5 3 発現促進剤

発明者：近藤茂忠、六反一仁

権利者：国立大学法人徳島大学

種類：中国特許

番号：ZL200880106106.2

取得年月日：平成 26 年 5 月 14 日

国内外の別：国外

[その他]

ホームページ等

該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

近藤 茂忠 (KONDO, Shigetada)

大阪府立大学大学院・総合リハビリテーション学研究科・教授

研究者番号：40304513

(2) 研究分担者

二川 健 (NIKAWA, Takeshi)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部・教授

研究者番号：20263824

増田 清士 (MASUDA, Kiyoshi)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部・准教授

研究者番号：00457318

(3) 連携研究者

該当なし

(4) 研究協力者

富田 知里 (TOMIDA, Chisato)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部・栄養生命科学教育部・博士後期課程

矢野 千晶 (YANO, Chiaki)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部・栄養生命科学教育部・博士前期課程

相原 可奈 (AIBARA, Kana)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部・栄養生命科学教育部・博士前期課程