

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 21 日現在

機関番号：11201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K21205

研究課題名(和文) VEGF阻害剤投与中止後にみられるリバウンドのメカニズムの解明

研究課題名(英文) Mechanism of tumor rebound after discontinuation of anti-VEGF treatment

研究代表者

石黒 俊名(大沼俊名)(Ishiguro-Onuma, Toshina)

岩手大学・農学部・准教授

研究者番号：60452695

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：4T1細胞をBALB/cマウスに接種し、乳腺腫瘍モデルマウスとした。このマウスを4群(A群：ベースライン対照、B群：sunitinib 7日間投与群、C群：sunitinib 7日間投与+7日間休薬、D群：溶媒7日間投与+7日間休薬)に分けた。実験開始1日目にA群、7日目にB群、14日目にC群とD群を還流固定し組織学的に検証した。B群では腫瘍血管の有意な退縮が認められた。C群ではB群でみられた腫瘍血管の退縮はみとめられず、これは、腫瘍血管が休薬期間の7日の間に再成長したものと解釈された。B群とC群で腫瘍転移と浸潤の様子を組織学的に検討したところ、周辺組織への浸潤はC群で有意に増加していた。

研究成果の概要(英文)：Mouse mammary tumor cell line 4T1 cell were used. BALB/c mice were injected with 4T1 cells and divided into 4 groups (group A: base line control, group B: 7-days treatment with sunitinib (40 mg/kg, QD), group C: 7-days treatment with sunitinib plus 7-days withdraw, group D: 7-days treatment with vehicle plus 7-days withdraw). Mice were perfused at Day1 (group A), Day7 (group B), and Day14 (group C and D) and analysed by immunohistochemistry. In the group B, a significant decrease of blood vessel density was observed. In the group C, blood vessel density was comparable with group A, that means that decreased blood vessels rapidly recovered after sunitinib withdrawal. The tumor invasiveness to surrounding tissue was much greater in group C than in group B. However, incidence of distant metastasis was comparable between group B and C.

研究分野：血管生物学

キーワード：血管新生 分子標的薬

### 1. 研究開始当初の背景

固形腫瘍の成長は腫瘍内の血管新生に依存しているため、腫瘍血管新生を抑制すれば副作用無しに腫瘍を治療できる、あるいは腫瘍の進展を遅らせることができると考えられてきた。血管内皮細胞成長因子 (Vascular Endothelial Growth Factor: VEGF) やその受容体 (VEGF Receptor: VEGFR) を阻害する様々な薬剤が開発されている。具体的には、VEGF を中和するヒト型化抗 VEGF 抗体である Bevacizumab や VEGFR のチロシンキナーゼ活性を選択的に阻害する小分子である Sunitinib などが、非小細胞性肺ガンや腎細胞ガン等、様々なタイプのガンに対して臨床応用され始めている。この様に、腫瘍の特効薬として有望と考えられてきた VEGF 阻害剤だが、広く臨床の場で使用されるようになるにつれ、その治療効果は当初期待されていたような劇的なものではなく、限定的なものであることが明らかになってきた。また、知見の蓄積に伴い、VEGF 阻害剤の様々な問題点 (副作用) も浮かび上がってきた。1 つは VEGF 阻害剤の投与によって腫瘍細胞の浸潤性・転移性が増悪する場合があるという点 (Ebos JM et al. *Cancer Cell* 2009, Paez-Ribes M et al. *Cancer Cell* 2009), もう 1 つは VEGF 阻害剤の投与中止後に、腫瘍血管の再成長と腫瘍細胞の再増殖が急速に起こる (リバウンドと呼ばれる) という点である。一つ目の問題については、2009 年に報告されて以降、そのメカニズムは不明であったが、最近になって、血管新生阻害剤による血管密度の低下に伴う腫瘍組織の低酸素によって Hepatocyte growth factor receptor (HGFR/c-Met) が誘導されること、HGFR は EMT (Epithelial-Mesenchymal Transition) を引き起こすことで腫瘍の浸潤・転移を促進すること、VEGF と HGFR の同時阻害によって浸潤性・転移性の増悪を予防できることを、研究代表者が所属していたグループを含む複数の研究グループが相次いで報告した (Sennino B and Ishiguro-Oonuma T (研究代表者, equal contribution) et al. *Cancer Res* 2013, Cooke VG et al. *Cancer Cell* 2012, Sennino B et al. *Cancer Discovery* 2012)。しかしながら第二番目の問題であるリバウンドについては、そのメカニズムはいまだにほとんど明らかにされていない。

### 2. 研究の目的

リバウンドについては、その存在の有無を含めて多くの議論がなされており完全には実証されていないもの (Mancuso MR et al. *J Clin Invest* 2006, diTomaso E et al. *Cancer Res* 2011), 研究代表者はこれまでに、腫瘍モデルマウスを用いた系により、リバウンドを確認している。すなわち、VEGF 阻害剤 (sunitinib) により腫瘍血管密度は著しく低下するが、VEGF 阻害剤の投与中止後すみや

かにベースラインと同程度まで腫瘍血管密度が回復すること (図 1), また、投与中止後に遠隔転移が促進されること、の 2 点を確認した。実際の臨床現場で VEGF 阻害剤投与中止後にガンが急速に進行したという報告

(Desar IM et al. *Acta Oncologica* 2009, Wolter P et al. *Acta Oncologica* 2009) も散見され、そのメカニズムの解明は急務である。また、代表的な VEGF 阻害剤の 1 種である sunitinib の標準的投与プロトコルは、副作用のリスクを下げるために 4 週間投与 (ON) +2 週間休薬 (OFF) を数サイクル繰り返すというものになっており、このことから投与中止に対する腫瘍血管、腫瘍細胞の反応メカニズムを解明することは非常に重要である。本申請研究は VEGF 阻害剤中止後に起こるリバウンド (血管の再成長・腫瘍の悪化) を *in vivo* で経時的に解析し、そのメカニズムを解明することを目的とする。

### 3. 研究の方法

RIP-Tag2 マウスの繁殖に加えて、他種の腫瘍マウスモデルを作成するため、2 種類のマウス乳腺腫瘍細胞株 (4T1, BALB-MC)、3 種の肺癌細胞株 (3LL, EX3LL, INT3LL) を導入し、その VEGFA 発現量を real-time RT-PCR 法により測定した。これら計 5 種の腫瘍細胞株のうち、もっとも VEGFA 発現量が高かったのは 4T1 であり、以降の接種実験に使用することとした。4T1 細胞をメスの Balb/c マウスに  $10^6$  個接種し、腫瘍径が 5-10 mm になったのを確認できたものを乳腺腫瘍モデルマウスとして使用した。このマウスを 4 群 (A 群: ベースライン対照, B 群: sunitinib 7 日間投与, C 群: sunitinib 7 日間投与+7 日間休薬, D 群: 溶媒 7 日間投与+7 日間休薬) に分けた。1 日目に A 群を、7 日目に B 群、14 日目に C 群と D 群を環流固定し組織学的な検証に供した。sunitinib は 40 mg/kg の濃度で 1 日 1 回経口投与した。

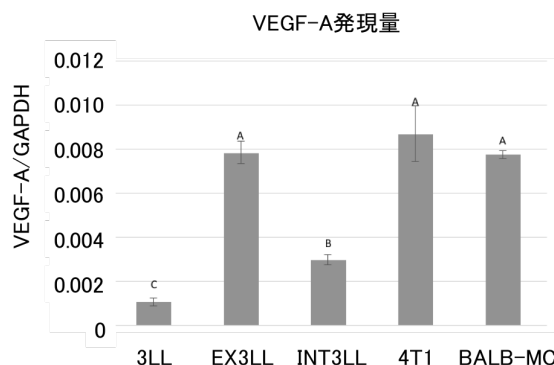


図 1. qRT-PCR による各細胞株における VEGF-A の発現量測定

### 4. 研究成果

B 群では有意な腫瘍血管の退縮が認められた。C 群では B 群で見られた腫瘍血管の退縮はみとめられず、すなわちこれは、腫瘍血管が休

薬期間の7日間の間に再成長したと解釈された。B群とC群で腫瘍転移と浸潤の様子を組織学的に検討したところ、周辺組織への浸潤はC群で有意に増加しているものの、遠隔転移の有意な変化はB群とC群の間では検出されなかった。実験に供した細胞が1種(4T1)のみであったため、他の株化細胞や腫瘍モデルでも同様の実験を行い、さらに検討をする必要がある。

#### 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10件)

① Ogura, S., Kurata, K., Hattori, Y., Takase, H., Ishiguro-Oonuma, T., Hwang, Y., Ahn, S., Park, I., Ikeda, W., Kusuhara, S., Fukushima, Y., Nara, H., Sakai, H., Fujiwara, T., Matsushita, J., Ema, M., Hirashima, M., Minami, T., Shibuya, M., Takakura, N., Kim, P., Miyata, T., Ogura, Y., Uemura, A.

Sustained inflammation after pericyte depletion induces irreversible blood-retina barrier breakdown. JCI Insight. 2, e90905, 2017

② Ishiguro-Oonuma, T., Suemoto, M., Okada, M., Yoshioka, K., Hara, Y., Hashizume, K., Kizaki, K.

Aberrant gene expression of heparanase in ventricular hypertrophy induced by monocrotaline in rats. J. Vet. Med. Sci. 78, 499-50, 2016

③ Koshi, K., Nakaya, Y., Kizaki, K., Ishiguro-Oonuma, T., Miyazawa, T., Spencer, TE., Hashizume, K.

Induction of ovine trophoblast cell fusion by fematrin-1 in vitro. Anim. Sci. J. 87, 419-22, 2016

④ Ochiai, K., Morimatsu, M., Kato, Y., Ishiguro-Oonuma, T., Udagawa, C., Rungsuriyawiboon, O., Azakami, D., Michishita, M., Ariyoshi, Y., Ueki, H., Nasu, Y., Kumon, H., Watanabe, M., and Omi, T.

Tumor suppressor REIC/DKK-3 and co-chaperone SGTA: Their interaction and roles in the androgen sensitivity. Oncotarget 19, 3283-3296, 2016.

⑤ Kato, Y., Ochiai, K., Michishita, M., Azakami, D., Nakahira, R., Morimatsu, M., Ishiguro-Oonuma, T., Yoshikawa, Y., Kobayashi, M., Bonkobara, M., Kobayashi, M., Takahashi, K., Watanabe, M., and Omi, T.

Molecular cloning of canine co-chaperone small glutamine-rich tetratricopeptide repeat-containing protein  $\alpha$  (SGTA) and investigation of its ability to suppress androgen receptor signalling in androgen-independent prostate cancer. Vet. J. 206, 143-148, 2015.

⑥ Ishiguro-Oonuma, T., Ochiai, K., Hashizume, K., Iwanaga, T., and Morimatsu, M.

Nfkbiz regulates the proliferation and differentiation of keratinocytes. Jpn. J. Vet. Res. 63, 107-114, 2015.

⑦ Kishimoto, A., Ishiguro-Oonuma, T., Takahashi, R., Maekawa, M., Toshimori, K., and Iwanaga, T.

Immunohistochemical localization of GLUT3, MCT1, and MCT2 in the testis of mice and rat: the use of different energy sources in spermatogenesis. Biomed. Res. 36, 225-234, 2015.

⑧ Yoshikawa, Y., Morimatsu, M., Ochiai, K., Ishiguro-Oonuma, T., Wada, S., Orino, K., and Watanabe, K.

Reduced canine BRCA2 expression levels in mammary gland tumors. BMC Vet. Res. 11, 159, 2015.

⑨ Ochiai, K., Ishiguro-Oonuma, T., Yoshikawa, Y., Udagawa, C., Kato, Y., Watanabe, M., Bonkobara, M., Morimatsu, M., Omi, T.

Polymorphisms of canine BRCA2 BRC repeats affecting interaction with RAD51. Biomed. Res. 36, 155-158, 2015

⑩ Ishiguro-Oonuma, T., Ochiai, K., Hashizume, K., Morimatsu, M.

The role of IFN- $\gamma$  in regulating Nfkbiz expression in epidermal keratinocytes. Biomed. Res. 36, 103-107, 2015

[学会発表] (計4件)

① 與座明祥, 石黒(大沼)俊名, 高橋透, 橋爪一善, 木崎景一郎  
ウシ栄養膜細胞系への効果的な遺伝子導入  
第89回日本生化学会 平成28年9月25-27日  
仙台市

③ 與座明祥, 石黒(大沼)俊名, 高橋透, 橋爪一善, 木崎景一郎  
ウシ栄養膜・胎膜に発現するmiRNAの探索  
第109回日本繁殖生物学会大会 平成28年9月11-15日  
相模原市

③ 石黒(大沼)俊名  
愛媛大学動物実験センター改修工事を経験

して

JCLAM Forum 第 159 回日本獣医学会学術集会  
平成 28 年 9 月 6-8 日 藤沢市

④ 佐藤良平, 石黒 (大沼) 俊名, 高橋透,  
橋爪一善, 木崎景一郎  
血管新生制御因子バソヒビンのウシ子宮・胎  
盤における発現動態  
第 159 回日本獣医学会学術集会 平成 28 年 9  
月 6-8 日 藤沢市

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

石黒 (大沼) 俊名 (Ishiguro-Oonuma  
Toshina)

岩手大学・農学部・准教授

研究者番号：60452695