

平成 21 年 5 月 28 日現在

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2005～2008

課題番号：17209045

研究課題名（和文）腫瘍血管を標的とした新たなる大腸癌個別化集学的治療体系の確立

研究課題名（英文）Treatment strategy for colorectal cancer targeted to the tumor vessel

研究代表者

名川弘一（NAGAWA HIROKAZU）

東京大学・医学部附属病院・教授

研究者番号：80228064

研究成果の概要：

緑色野菜の成分 Surforaphane、抗腫瘍薬ゾレドロン酸、5-HT4 receptor（選択性セロトニン受容体）阻害薬が、血管新生抑制作用を持つことを発見し、大腸癌の発生、再発防止や再発症例の治療薬として臨床応用できる事を証明した。また、血管内皮前駆細胞(EPC)の機能調節を行うことも、血管新生制御を介した治療に発展する可能性も見出した。また、マウスモデルを用いて、樹状細胞に同種の血管内皮細胞（HSE）の膜抗原をパルスしたワクチンを作製、皮下投与により大腸癌（colon 26）の肺転移を強力に抑制することを証明した。この基礎的結果を受けて、多発性転移巣を有する大腸癌患者 14 名を対象に、HLA 型のマッチした臍帯由来血管内皮細胞(HUVEC)を培養、固定後皮下に免疫する方法で免疫治療を行いその臨床効果を検証した結果、3 例で進行スピードが明らかに抑制されたと考えられる症例（SD）を認めた。大腸癌の個別化集学的治療の一環として、腫瘍血管を標的とした治療法の有用性を示唆する結果が得られた。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2005 度	12,000,000	3,600,000	15,600,000
2006 度	11,100,000	3,330,000	14,430,000
2007 度	11,100,000	3,330,000	14,430,000
2008 度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
年度			
総計	37,800,000	11,340,000	49,140,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般

キーワード：大腸癌、腫瘍血管、血管内皮細胞、スルフォラファン、ゾレドロン酸、選択性セロトニン受容体阻害薬、血管内皮前駆細胞、HLA

1. 研究開始当初の背景

昨今の生活様式の欧米化に伴い、日本における大腸癌の罹患が増加している。当教室が担当している大腸肛門外科では年間約 120 例の大腸癌手術症例があるが、大腸癌に対する手術治療のみでは当然ながら限界があり、様々な治療を組み合わせ、根治治療の追求、再発予防に心掛けている。しかし、がんの本質である多様性の前には、総論的治療は無力であり、時として有害事象を与えるだけに終わる経験も多い。そこで、個々の患者に対する個々の治療の有効性を治療前に判定することが、実践上最も重要な問題となる。

“がん”は癌細胞のみによって構成されているわけではなく、宿主細胞と細胞外基質からなる豊富な間質を有する一つの器官である。したがって、“がん”の個性には、癌細胞以外の間質成分の性質も大きく寄与しており、間質を含めた器官としての“がん”の個性を把握しなければ、真の意味での個別化治療にはなりえない。そこで、本研究では、間質の構成成分のうち、現時点では最もアプローチしやすいと思われる血管内皮細胞に標的を絞る、分子生物学的検討を加え、腫瘍血管内皮細胞の多様性が、種々の治療に対する“がん”の個性を形作る上で如何なる意味を持っているか？という点を明らかにし、その事実を踏まえて、腫瘍血管を標的とした新世代のがん治療における個別化を模索することを目標とした。

大腸癌の治療において切除不能例や転移性癌など、治療困難な進行癌症例に対して化学療法、放射線療法が用いられているが、その治療効果はいまだに十分とはいえない。そこで、本研究では、癌細胞に栄養・酸素を供給するために必要不可欠な新生血管の内皮細胞を標的とする新たな癌治療法の開発を目指した。標的を癌細胞そのものから腫瘍血管内皮細胞に移行することにより、次の利点が考えられる。すなわち、内皮細胞は血管内腔に存在するため、免疫細胞・抗体などのデリバリーが容易であること、内皮細胞は癌細胞より細胞数が少なく、少ない抗体量や免疫細胞数で効果が着たいできること、内皮細胞は正常細胞であるため、遺伝子変異による治療耐性獲得は稀であることから、比較的長期に渡って使用できる、などである。特にワクチンとして、腫瘍新生血管内皮細胞と共通の抗原を発現する臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) に着目した。これらの結果のうちで、実際の臨床治療法に組み合わせることによりより効果的な治療法を模索する。

2. 研究の目的

(1)大腸癌に対する Bevasizumab(Avastin)に代表される血管新生阻害によるがん治療は、既に臨床的応用の時代を迎えているが、その調節機構はまだ未知な部分も多く、より強力で副作用の少ない血管新生阻害物質の発見や薬剤の開発も盛んに行われている。本研究では自然界にある物質や薬剤などを対象に血管新生阻害効果を基礎的に検討し、臨床応用の可能性を探る。

(2)近年、血管内皮細胞の免疫が、がんの新生血管を特異的に障害し、抗腫瘍効果を発揮する動物実験結果が報告された。詳細な機序は十分に解明されていないが、腫瘍血管内皮細胞に対する特異免疫が誘導された結果と考えられ、新しいがん免疫療法として期待されている。ヒト臍帯由来血管内皮細胞は、細胞表面抗原発現形態が腫瘍血管内皮細胞と酷似しているため、ヒトへの応用を考えた場合、同一の HLA を有する臍帯由来血管内皮細胞を用いた免疫治療が最も有効と考えられる。この免疫治療についての基礎的検討を加えるとともに、大腸癌多発性再発症例を対象として、本免疫治療を実践、実際の臨床的治療効果を検証することによって、最も有効な内皮細胞免疫法を模索する。

さらに、大腸癌多発性転移患者を対象として、HLA 型を特定し、これにマッチした臍帯由来血管内皮細胞(HUVEC)を用いた免疫治療についての基礎的検討を加えその分子機構を解明するとともに、実際の臨床的効果を検証する。

3. 研究の方法

(1)培養細胞を用いた検討

臍帯由来血管内皮細胞(HUVEC)を培養し、様々な物質を添加することにより、その増殖能、浸潤能、管腔形成能、アポトーシス、細胞周期などを In Vitro の測定系にて検討する。さらに、その分子メカニズムを探る目的にて、western blotting, 免疫染色などのタンパク解析、nothern blotting による RNA 解析を行う。

(2)血管内皮細胞を用いた基礎研究

マウスの皮下に FGF, VEGF を含んだゲルを移植、数日後にその中に誘導された新生血管を採取、培養系に移し自己血管内皮細胞を採取、この自己新生血管を免疫源とした腫瘍治療モデルを作成する。このモデルで得られた自己血管内皮細胞に炎症性サイトカイン、血管新生因子などのさまざまな物質を添加し、活性化させた後免疫し、もっとも顕著な治療効

果をもたらす免疫方法を模索する。また、マウスの骨髄から、血管芽細胞を分離、VEGFを用いて培養、これをマウスに免疫し、腫瘍効果を検討、臨床応用の可能性を探る。

(3) 臍帯由来血管内皮細胞(HUVEC)を用いた臨床研究

多発性転移を有する大腸癌患者のうちインフォームドコンセントが得られた患者を対象として、HLA型を特定し、これにマッチした臍帯由来血管内皮細胞(HUVEC)を培養し増殖させる。固定後、皮下に免疫し、その後の臨床的治療効果を、CTスキャン、エコー、MRIなどの画像診断による腫瘍サイズ、血中腫瘍マーカーの推移にて追求する。これと平行して、患者の血清中に存在する新生血管に反応する抗体価を、補体によるHUVEC障害活性、自己腫瘍の切除標本を用いた免疫染色にて、NK活性、CTL活性をそれぞれK562、免疫に用いたHUVECを標的とした細胞障害活性にて測定する。この結果から、患者のHLA型と実際の臨床効果をprospectiveに比較検討する。

4. 研究成果

(1) 緑色野菜の成分 Surforaphane が増殖を抑制し、マトリックス分解酵素の産生、コラーゲン内での管状構造構築能を強く抑制する、また血管内皮細胞の BAX タンパクを活性化することにより、内皮細胞のアポトーシスを誘導することを介して、血管新生を抑制することによって抗腫瘍効果を発揮する事が判明した。疫学にて証明されている緑色野菜の腫瘍抑制効果は、Surforaphane の血管新生抑制作用に起因することが推測されるとともに、薬剤への応用が期待される。

(2) 抗腫瘍薬ゾレドロン酸が血中の血管内皮前駆細胞の内皮細胞への分化を抑制する機能を有し、これがゾレドロン酸の抗腫瘍効果の一因となっている可能性があることを証明した。ゾレドロン酸は骨転移のみならず、血管への影響を介して全身転移に対しても有効性を発揮する事が示唆された。

(3) 腸管運動機能を調節する 5-HT4 receptor (選択性セロトニン受容体) 阻害薬が、血管新生抑制作用を持ち、化学療法の効果を強める働きがあることが判明した。5-HT4 受容体阻害薬は、嘔吐防止に広く臨床使用されている薬剤であるため、再発大腸癌に対する抗癌剤治療の前投与としての本薬剤の有用性が示唆された。

(4) 血管内皮前駆細胞(EPC)は骨髄で作られ、腫瘍血管新生に重要な役割を果たす。ヒト末

梢血より、この EPC を分離培養しその作用を In Vitro にて検討すると、CD86 などの接着分子の発現を亢進し、腫瘍抗原を提示することにより腫瘍免疫を誘導する機能をも有している事が判明した。これは、EPC が単に血管を増やし腫瘍の成長を促進するだけでなく、腫瘍組織内での免疫応答を介して、抗腫瘍効果を担っている可能性もあることを意味する。局所における EPC の機能制御が癌の進展に重要であることが示唆された。また、(1)で検討した Surforaphane は EPC に対しても強い刺激能力を持つことが判明した。

(5) 樹状細胞(DC)は非常に強力な抗原提示細胞(APC)であり、がん免疫の中心的な役割を果たしている。Balb/c マウスの splenocytes を GM-CSF で培養後、MACS にて $11c+$ の細胞を回収して DC を作成した。この DC に、ヒト臍帯由来血管内皮細胞(HUVEC)、マウス類洞内皮細胞(HSE)、マウス線維芽細胞(3T3)の膜抗原をパルスしたワクチンを作製し、皮下に3回投与後、大腸癌(colon 26)による皮下腫瘍モデル、尾静注による肺転移モデルにて、腫瘍増殖抑制効果を検討すると、両方にて、HUVEC-DC/HSE-DC の血管内皮細胞をパルスした2群が、他群に比べて40-50%と有意に強い腫瘍抑制作用を有していた。また、HUVEC-DC/HSE-DC の2群は、colon26ではなく、内皮細胞に対する特異的な細胞障害活性を有意に認めた。腫瘍血管内皮細胞をターゲットとした樹状細胞投与の in vivo での有用性が示唆された。

(6) 前述の結果をうけて、多発性転移を有する大腸癌患者のうちICが得られた患者14名を対象として、HLA型を特定し、これにマッチした臍帯由来血管内皮細胞(HUVEC)を培養、固定後、一回 5×10^5 個の HUVEC 患者の皮下に免疫し、その後の治療効果を臨床的に検討した。注射部位に遅発性細胞性過敏様の発赤が一例に見られた以外に有意な有害事象は認めなかった。RECIST に従った効果判定では CR, PR は認めなかったが、3例で進行スピードが抑制されたと考えられる症例(SD)を認めた。ちなみに、同様の検討を14例の脳腫瘍で行い、PR/CR/SD をあわせた有効率 64.3% (9例/14例) が得られた。また、これらの症例にて、治療後に ELISPOT 法と細胞障害試験にて HUVEC に対する特異性細胞免疫が誘導されている事が証明された。

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7件)

1. Sulforaphane stimulates activation of proapoptotic protein bax leading to apoptosis of endothelial progenitor cells. Nishikawa T. Tsuno NH. Tsuchiya T. Yoneyama S. Yamada J. Shuno Y. Okaji Y. Tanaka J. Kitayama J. Takahashi K. Nagawa H. Annals of Surgical Oncology. 16(2):534-43, 2009 (査読有)
2. Anti-angiogenic property of zoledronic acid by inhibition of endothelial progenitor cell differentiation. Yamada J. Tsuno NH. Kitayama J. Tsuchiya T. Yoneyama S. Asakage M. Okaji Y. Shuno Y. Nishikawa T. Tanaka J. Takahashi K. Nagawa H. Journal of Surgical Research. 151(1):115-20, 2009 (査読有)
3. Okaji Y, Tsuno NH. Tanaka M. Yoneyama S. Matsuhashi M. Kitayama J. Saito S. Nagura Y. Tsuchiya T. Yamada J. Tanaka J. Yoshikawa N. Nishikawa T. Shuno Y. Todo T. Saito N. Takahashi K. Nagawa H. Pilot study of anti-angiogenic vaccine using fixed whole endothelium in patients with progressive malignancy after failure of conventional therapy. Eur J Cancer. 44(3):383-90. 2008 (査読有)
4. Yoneyama S. Okaji Y. Tsuno NH. Kawai K. Yamashita H. Tsuchiya T. Yamada J. Sunami E. Osada T. Kitayama J. Takahashi K. Nagawa H. A study of dendritic and endothelial cell interactions in colon cancer in a cell line and small mammal model. Eur J Surg Oncol. 33(10):1191-8. 2007 (査読有)
5. Sulforaphane induces inhibition of human umbilical vein endothelial cells proliferation by apoptosis. Asakage M. Tsuno NH. Kitayama J. Tsuchiya T. Yoneyama S. Yamada J. Okaji Y. Kaisaki S. Osada T. Takahashi K. Nagawa H. Angiogenesis. 9(2):83-91, 2006 (査読有)
6. Early-outgrowth of endothelial progenitor cells can function as antigen-presenting cells. Asakage M. Tsuno NH. Kitayama J. Kawai K. Okaji Y. Yazawa K. Kaisaki S. Osada T. Watanabe T. Takahashi K. Nagawa H. Cancer Immunology, Immunotherapy. 55(6):708-16, 2006 (査読有)
7. 大梶祐頼, 津野寛和, 高橋孝喜, 名川弘一 先端のバイオ研究を知る! テクノ・トレンド 新たな癌治療法の開発 腫瘍血管内皮細胞・腫瘍内マクロファージの選択的分離につ

いて バイオテクノロジージャーナル 5(4) 457-459、2005 (査読無)

[学会発表](計5件)

1. 西川武司, 津野寛和, 須並英二, 北山丈二, 高橋孝喜, 名川弘一 選択的 5-HT₄ 受容体アゴニストによる抗血管新生作用 第 67 回日本癌学会総会、2008 年 10 月 29 日、名古屋
2. 西川武司, 津野寛和, 高橋孝喜, 北山丈二, 名川弘一 腫瘍血管の形成 スルフォラファンは前アポトーシスタンパク質 Bax を活性化し、内皮前駆細胞のアポトーシスを誘導する 第 66 回日本癌学会総会、2007 年 10 月 4 日 横浜
3. 山田純, 北山丈二, 津野寛和, 米山さとみ, 土屋剛史, 朝蔭正宏, 名川弘一 ゾレドロン酸による血管内皮前駆細胞を標的とした抗血管新生療法 第 65 回日本癌学会総会 2007 年 9 月 30 日 横浜
4. 朝蔭正宏, 津野寛和, 北山丈二, 川合一茂, 谷澤健太郎, 大梶祐頼, 土屋剛史, 米山さとみ, 山田純, 高橋孝喜, 名川弘一 スルフォラファンのアポトーシスによる内皮細胞増殖抑制 第 64 回日本癌学会総会 2006 年 9 月 29 日
5. 津野寛和, 大梶祐頼, 朝蔭正宏, 田中実, 米山さとみ, 土屋剛史, 山田純, 北山丈二, 藤堂具紀, 渡辺聡明, 名川弘一, 高橋孝喜 癌に対する血管新生標的治療の現状と将来内皮細胞ワクチンは腫瘍血管内皮細胞に対する免疫応答を誘導する 第 107 回日本外科学会 2006 年 3 月 31 日 東京

[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]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

名川 弘一 (NAGAWA HIROKAZU)
東京大学・医学部附属病院・教授
研究者番号：80228064

(2) 研究分担者

北山 丈二 (KITAYAMA JOJI)
東京大学・医学部附属病院・准教授
研究者番号：80228064

(3) 連携研究者

須並英二 (SUNAMI EIJI)
東京大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：70345205

武井 芳樹 (TAKEI YOSHIKI)
東京大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：60401098

高橋 孝喜 (TAKAHASHI KOKI)
東京大学・医学部附属病院・教授
研究者番号：50171484

津野 寛和 (TSUNO HIROKAZU)
東京大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：50282637