

令和 2 年 5 月 28 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09657

研究課題名(和文) 肺癌間質の新たな血管新生阻害薬耐性メカニズム - 薬剤耐性克服に向けた線維細胞研究 -

研究課題名(英文) The fibrocyte research for clarifying and overcoming the resistance against anti-angiogenesis therapy in lung cancer

研究代表者

後東 久嗣 (GOTO, Hisatsugu)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学域)・非常勤講師

研究者番号：00437641

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、血管新生阻害薬耐性バイオマーカーとしての線維細胞の可能性を探るとともに、線維細胞を標的とした新たな治療法を開発することを目的とした。

基礎的研究からは、線維細胞の産生するFGF2をVEGFに加えて阻害しても腫瘍は再度耐性化し、これにはPDGF等の他の血管新生因子の寄与が示唆された。また、線維細胞は血管新生阻害薬投与後速やかに(3日以内)腫瘍内から消失することが判明し、抗VEGF抗体の投与間隔を調節することで耐性化を最小限にとどめることができる可能性が示唆された。肺癌症例を用いた臨床的検討からは、62%の症例において抗VEGF抗体耐性後の胸水中線維細胞数の増加が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

血管新生阻害薬を用いた抗血管新生療法は、様々ながん種で効果を発揮する一方、他の分子標的治療薬と同様に耐性化現象が問題視されている。最近我々は血管新生阻害薬耐性に関わる重要な細胞として線維細胞(fibrocyte)を同定した。血管新生阻害薬投与後の腫瘍内線維細胞の動態を明らかにすることで、線維細胞の集積を最小限にしつつ、血管新生阻害効果を維持する投与レジメンを提案できる可能性がある。また、胸水中の線維細胞を解析することで、腫瘍組織を採取することなく最小限の侵襲で血管新生阻害薬耐性化をモニターできるため、今後の癌治療に貢献できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The objective of this project was to explore the possibility of fibrocytes as the cellular biomarker of the resistance against anti-angiogenic therapy.

The study using mouse models revealed that; 1) inhibiting FGF2 which was produced by fibrocytes in addition to VEGF induced secondary resistance, and other angiogenic molecules such as PDGF might contribute to such resistance. 2) in the time course experiment, the number of fibrocytes in the tumor was significantly decreased within 3 days after the cessation of anti-VEGF treatment, suggesting that the interval of treatment might be crucial to minimize the resistance. The clinical study in lung cancer patients showed that the number of fibrocytes in the pleural effusion was significantly increased in 62% of patients who acquired the resistance to the treatment with anti-VEGF antibody, suggesting that fibrocytes in the pleural effusion might be useful as cellular biomarker to predict the resistance against anti-angiogenic therapy.

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：血管新生阻害薬耐性 肺癌 悪性胸膜中皮腫

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) がんの増殖・進展に血管新生は必須である。血管新生は様々な因子で調節されているが、中でも血管内皮増殖因子 (VEGF) は血管新生促進因子として中心的な役割を担っており、既にそれを標的とした治療が臨床応用に至っている。しかし、血管新生阻害薬は良好な抗腫瘍効果が報告されている一方、他の分子標的治療薬と同様、耐性化現象が臨床現場で問題視されている。これは、抗 VEGF 抗体を始めとした血管新生抑制薬の耐性メカニズムが明らかになっておらず、耐性に関わるバイオマーカーが未だ同定されていないことが原因と考えられる。

(2) 我々は、これまでに重症免疫不全 (SCID) マウスの NK 細胞活性を除去することにより、臨床における転移様式を再現したヒト肺癌の多臓器転移モデルやヒト悪性胸膜中皮腫の同所移植モデルを確立し、同モデルを用いて宿主細胞を介した遠隔転移の分子メカニズムの解析や血管新生因子を標的とした新規治療法開発を行ってきた。これらのモデルを用いて我々がこれまでに、血管新生阻害薬耐性に関わる重要な細胞として線維細胞 (fibrocyte) を同定した。線維細胞は抗 VEGF 抗体治療によって惹起される腫瘍内低酸素により腫瘍内に集積し、線維芽細胞増殖因子 (FGF2) などの代替血管新生促進因子を産生することで治療耐性化の獲得を誘導することが判明している。

2. 研究の目的

これまでの研究結果を踏まえ、本研究では以下の 3 つを目的に検討を行った。

(1) 血管新生阻害薬 (抗 VEGF 抗体) 投与に伴う腫瘍内の線維細胞の詳細な動態をマウスモデルを用いて基礎的に解析する。

(2) これまでの検討で、VEGF に加え、線維細胞が産生する FGF2 を阻害することで血管新生阻害効果が増強することが確認されている。しかし、それでもいずれマウスは腫瘍死する。このことは、VEGF と FGF2 の両方を阻害する中で新たな耐性メカニズムが存在することを示唆する。そこで、その併用療法を耐性獲得まで継続することで、さらにその後起こる耐性メカニズムをマウスモデルを用いて明らかにする。

(3) これまで我々は、腫瘍組織内に集積した線維細胞を血管新生阻害薬耐性関連細胞として免疫染色法やフローサイトメトリー法を用いて同定してきた。しかし、実際は血管新生阻害薬投与中の患者では手術等で宿主細胞が解析できるサイズの組織が採取困難な場合が多い。よって今後、線維細胞を血管新生阻害薬耐性の細胞バイオマーカーとして実用化を目指していくに当たり、より低侵襲な手法でサンプルを採取し、解析を可能にすることは必須事項と考えた。このことを可能にする検体として、我々は末梢血に注目した。抗 VEGF 抗体投与患者において、投与前と耐性後の末梢血中線維細胞数を測定し、耐性バイオマーカーとしての線維細胞の可能性を臨床的に検討する。

3. 研究の方法

(1) SCID マウスにおける悪性胸膜中皮腫の胸腔内への同所移植モデルを用いて、抗 VEGF 抗体 (ベバシズマブ) による血管新生阻害効果および耐性化と線維細胞集積の詳細なタイムコースを検討する。具体的には、がん細胞をマウスに接種した 7 日後より 28 日後までベバシズマブ (10 μ g/mouse) を週 2 回腹腔内投与し、耐性化した腫瘍、すなわち線維細胞が多く集積した状態の腫瘍を作成する。以後、ベバシズマブ投与を中止し、1、3、5、7 日後に経時的に腫瘍を採取し、腫瘍内の線維細胞数を免疫組織学的に測定することで腫瘍から消失するタイムコースを検討した。

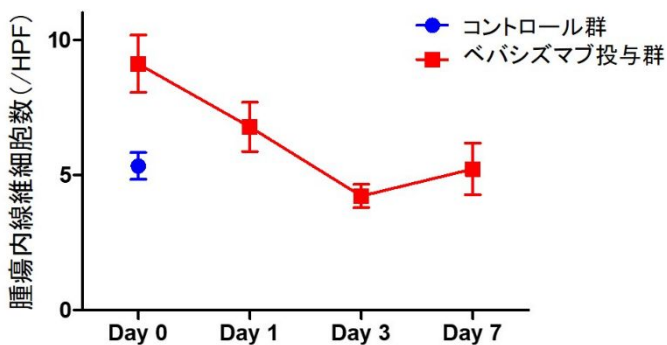
(2) 悪性胸膜中皮腫同所移植マウスモデルにて、抗 VEGF 抗体 (ベバシズマブ) および FGF 受容体阻害薬の併用治療に耐性となった腫瘍において、併用療法耐性に関与する因子を同定する。具体的には、がん細胞をマウスに接種した 7 日後より 28 日後までベバシズマブ (10 μ g/mouse) を週 2 回腹腔内投与し、FGF 受容体阻害薬 (BGJ-398) (200 μ g/mouse) を連日経口投与にて併用した。耐性化した腫瘍組織を採取し、PCR 法により耐性関連因子の同定を行った。

(3) 本研究開始時点で肺癌において承認されているベバシズマブもしくはラムシルマブ投与に至った肺癌症例において、薬剤投与前、奏効時期、耐性が確認された時期のそれぞれにおいて末梢血を採取し、血中の線維細胞数を比較検討した。具体的には、肺癌患者より同意を得て 30ml の末梢血を採取し、分離した単核球を 20% ウシ胎児血清を添加した培地を用いてフィブロネクチンコートディッシュ上で 2 週間培養し、付着細胞を線維細胞として採取後、単位血液当たりの線維細胞数を測定し、薬剤投与前、奏効時期、耐性が確認された時期のそれぞれにおける末梢血中線維細胞数を比較検討した (徳島大学病院医学系研究倫理審査委員会承認番号: 1586)。

4. 研究成果

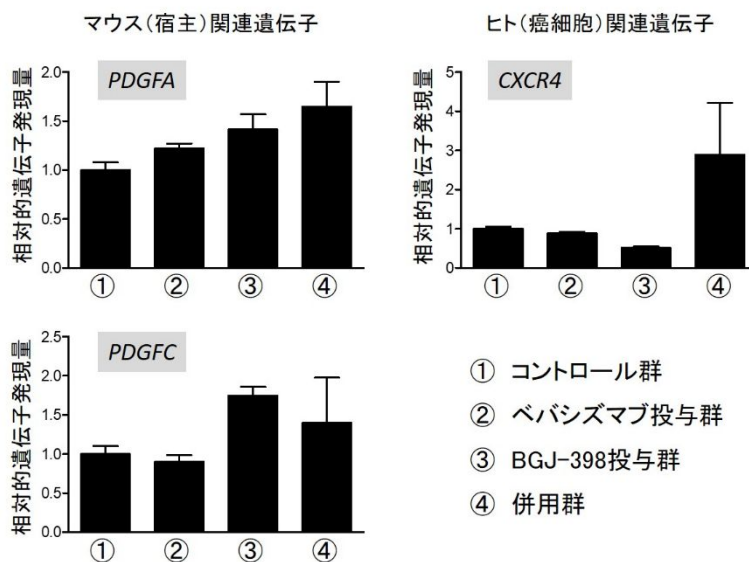
(1) SCID マウスにおける悪性胸膜中皮腫の胸腔内への同所移植モデルを用いて、担癌マウスを抗 VEGF 抗体(ベバシズマブ)で治療し、28 日後、耐性化した時点(Day 0)として治療を中止し、集積した線維細胞が腫瘍から消失していく詳細なタイムコースを検討したところ、ベバシズマブ投与中止後、線維細胞は 3 日で腫瘍内からほぼ消失する結果を得た(図 1)。これまでのヒト肺癌組織検体を用いた検討では、臨床的に効果ありと判断されている時期でも線維細胞は多く集積しており、臨床での効果判定と耐性メカニズムの発動にタイムラグがあることが示唆されている。今後、ベバシズマブ投与後にどのようなタイミングで線維細胞が集積するのかという疑問に応えるべく、新たなモデルで線維細胞の腫瘍内集積メカニズムを解析する必要があるが、血管新生阻害薬投与後の腫瘍内線維細胞の動態の詳細を明らかにすることで、「線維細胞の集積を最小限にしつつ、血管新生阻害効果を維持する投与間隔」を探索し、血管新生阻害薬の指摘レジメンを提案できる可能性があると考えられた。

図1. ベバシズマブ投与中止後、腫瘍内線維細胞の動態



(2) 悪性胸膜中皮腫同所移植マウスモデルにて、抗 VEGF 抗体(ベバシズマブ)および FGF 受容体阻害薬の併用治療に耐性となった腫瘍において、併用療法耐性に関する因子を同定するため、腫瘍を併用療法で治療後、耐性化した時点で腫瘍組織を採取し、PCR 法にて耐性関連候補因子の同定を行った。本モデルでは、ヒト腫瘍細胞を SCID マウスに移植しているため、それぞれの候補因子の種特異的配列(ヒトもしくはマウス)をあらかじめプライマーに設定することで、同定された因子が癌細胞由来なのかもしくは宿主細胞由来なのかを別個に検討することができた。結果、宿主由来因子として血小板由来増殖因子 A (PDGFA) が、また、癌細胞由来因子としてケモカイン受容体である CXCR4 が同定された(図 2)。CXCR4 は線維細胞の強い遊走因子であるため、併用療法獲得耐性にも線維細胞が関わっていることが示唆されたが、今後、免疫染色法等にて解析する予定である。

図2. 抗VEGF抗体およびFGF受容体阻害薬併用療法耐性関連遺伝子



(3) ベバシズマブもしくはラムシルマブ投与に至った肺癌症例において、薬剤投与前、奏効時期、耐性が確認された時期のそれぞれにおいて末梢血を採取し、血中の線維細胞数を比較検討した。現在 13 例のベバシズマブ耐性症例を解析が終了している。結果、8 例(62%)でベバシズマブ耐性後に末梢血中線維細胞数の増加が認められた(6 例は耐性に至っておらず治療継続中)。本研究においては、さらに症例を蓄積し、血管新生阻害薬に対する細胞バイオマーカーとしての可能性について検討を継続する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Atsuro Saijo, Hisatsugu Goto, Mayuri Nakano, Atsushi Mitsuhashi, Yoshinori Aono, Masaki Hanibuchi, Hirohisa Ogawa, Hisanori Uehara, Kazuya Kondo, Yasuhiko Nishioka	4. 巻 421
2. 論文標題 Bone marrow-derived fibrocytes promote stem cell-like properties of lung cancer cells.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cancer Letter	6. 最初と最後の頁 17-27
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.canlet.2018.02.016.	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hisatsugu Goto, Yasuhiko Nishioka	4. 巻 19
2. 論文標題 Fibrocytes: A Novel Stromal Cells to Regulate Resistance to Anti-Angiogenic Therapy and Cancer Progression	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci.	6. 最初と最後の頁 1-13
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms19010098	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 2件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 後東久嗣、三橋惇志、西條敦郎、西岡安彦
2. 発表標題 線維細胞（fibrocytes）を標的とした血管新生阻害薬耐性メカニズムの解明と治療への展開
3. 学会等名 第59回日本肺癌学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 H. Goto, A. Mitsuhashi, Y. Nishioka
2. 発表標題 Mechanism of acquired resistance to anti-angiogenic therapy mediated by fibrocytes
3. 学会等名 The 22nd Congress of Asian Pacific Society of Respiriology（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 H. Goto, A.Mitsuhashi, A. Saijo, H. Ogino, K. Otsuka, M. Tobiume, H. Yoneda, M. Hanibuchi, Y. Nishioka.
2. 発表標題 Fibrocytes as a Possible Cellular Biomarker for Anti-Angiogenic Therapy in Lung Cancer.
3. 学会等名 American Thoracic Society 2017 International Conference (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 後東久嗣, 三橋惇志, 西條敦郎, 埴淵昌毅, 西岡安彦
2. 発表標題 線維細胞(fibrocyte)を標的としたがん転移・進展メカニズムの解明と血管新生阻害薬耐性克服の試み
3. 学会等名 第26回日本がん転移学会学術集会・総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 三橋惇志、後東久嗣、荻野広和、大塚憲司、杉本正道、根東攝、西岡安彦
2. 発表標題 免疫チェックポイント阻害薬および血管新生阻害薬併用療法における腫瘍内fibrocyte-like cellの機能解析
3. 学会等名 第23回日本がん分子標的治療学会学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 後東久嗣、西岡安彦	4. 発行年 2019年
2. 出版社 南江堂	5. 総ページ数 526
3. 書名 呼吸器疾患 最新の治療2019-2020	

〔産業財産権〕

〔その他〕

徳島大学大学院医歯薬学研究部 呼吸器・膠原病内科学分野 業績一覧
<http://www.sannai.umin.jp>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	荻野 広和 (OGINO Hirokazu) (20745294)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学系)・助教 (16101)	