

平成 22 年 6 月 9 日現在

研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19591556
 研究課題名(和文) VEGF 受容体および PDGF 受容体をターゲットとした大腸癌の分子標的治療
 研究課題名(英文) Molecular targeting therapy of VEGF and PDGF receptor for colon cancer
 研究代表者
 山田 靖哉 (YAMADA NOBUYA)
 大阪市立大学・大学院医学研究科・講師
 研究者番号：00305640

研究成果の概要(和文)：Ki23057 は新しく開発された VEGF 受容体リン酸化阻害剤である。Ki23057 は大腸癌細胞株に対しては増殖抑制効果を示さなかったが、血管内皮細胞に対しては有意に細胞増殖を抑制した。また、Ki23057 は血管内皮細胞の管腔形成能および血管内皮細胞の VEGF 受容体のリン酸化を有意に抑制した。Ki23057 は大腸癌細胞の腫瘍増殖抑制と肝転移を有意に抑制した。以上より、Ki23057 は大腸癌に対する新たな血管新生阻害剤として臨床応用の可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Ki23057 is a new small-synthetic tyrosine kinase inhibitor that blocks autophosphorylation of the VEGF receptor2 (VEGFR2). Ki23057 inhibited VEGF-induced proliferation of human umbilical vein endothelial cells (HUVECs), whereas no inhibitory effect of Ki23057 on the proliferation of colon cancer cells was observed by means of the cell count assay. Ki23057 inhibited tube formation of HUVECs and tyrosine phosphorylation of VEGFR2 in HUVECs. Ki23057 exhibited a significant inhibitory effect on the growth of the xenografted tumors and the spreading of cancer cells to liver. Ki23057 may be a promising new antiangiogenic agent for colon cancer.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
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

キーワード：小腸大腸肛門外科学

1. 研究開始当初の背景
 大腸癌に対する治療は外科的手術が第一選択である。肝転移症例においても切除

可能な症例に対しては積極的に肝切除が行われており、良好な成績が報告されている。しかし、切除できない症例も多く、

化学療法や放射線療法が行われている。新規抗癌剤及び投与法の開発に伴い、大腸癌の治療成績は向上してきているが、まだ十分に満足できる成績とは言い難い。近年、大腸癌の増殖、転移の研究が積極的に行われ、その機序が明らかになりつつある。腫瘍は1mm³以上の大きさになるには酸素や栄養を供給するために血管新生が必要である。大腸癌においても癌の増殖、転移に血管新生が必要不可欠である。重要な血管新生促進因子の1つであるVEGF(Vascular Endothelial Growth Factor)は大腸癌を含む多くの癌細胞から産生される。VEGFレセプターの1つであるVEGFR2は血管内皮細胞に存在し、増殖、遊走、管腔形成と関連している。大腸癌においては癌組織中における微小血管の密度、VEGFの過剰発現が癌の再発、転移や予後と相関していることが示されており、VEGF発現が独立した予後因子であることが報告されている。このように大腸癌の増殖、転移において血管新生は重要な因子であり、血管新生阻害剤は大腸癌の新しい治療薬として注目されている。これまでに多くの血管新生阻害剤が開発されてきており、実際に臨床応用されている薬剤もある。bevacizumabはVEGFに対するモノクローナル抗体であり、大腸癌治療にCPT、5-FU、LVの3剤抗がん剤にbevacizumabを併用することによる生存期間の延長が報告されている。一方、PDGF(Platelet-Driven Growth Factor)は大腸癌細胞に高発現しており、大腸癌の増殖、浸潤、転移に重要な働きをしていることが報告されている。

新しく開発されたKi23057は低分子化合物でチロシンキナーゼレセプターを阻害する。Ki23057はVEGFR、PDGFR、KGF、c-kitのリン酸化を阻害する作用を持っている。これまで我々はスキルス胃癌の増殖に癌細胞と線維芽細胞の相互作用が重要であり胃線維芽細胞の産生するKGF(Keratinocyte Growth Factor)が深く関与し、さらにそのリガンドであるチロシンキナーゼ型の増殖因子レセプターKGF receptor(KGFR)が胃癌細胞に発現していることが重要であることを明らかにした(Nakazawa K, Yashiro M, et al. Cancer Res.;63: 8848-52, 2003)。また、Ki23057はKGF阻害剤としてスキルス胃癌の分子標的薬として有効であることも報告してきた(Nakamura K, Yashiro M, et al. Gastroenterology in press)。今回、

我々は、Ki23057のVEGFRおよびPDGFRリン酸化阻害作用に注目し大腸癌に対する新しい分子標的薬としての可能性について検討を行う。

2. 研究の目的

(1) これまでにいくつかのVEGFRリン酸化阻害剤が開発され、実験的検討および臨床試験が行われてきた。しかし、phase IIIの臨床試験で生存期間の延長させた報告はまだない。この理由の一つとしてチロシンキナーゼ阻害剤の半減期が短いことがあげられる。今回新しく開発されたKi23057は経口投与可能であり、これまでのリン酸化阻害剤に比べて半減期が長く理想的な血管新生阻害剤と考えられる。また、血管新生阻害のみならずPDGFRのリン酸化を阻害することにより大腸癌の増殖を直接抑制する可能性が考えられる。そこで、VEGFRおよびPDGFR両方にリン酸化阻害作用を有するKi23057の大腸癌細胞および血管内皮細胞に対する作用をin vitroで検討するとともに、in vivoにおける大腸癌細胞の増殖、転移に対する効果を検討する。

(2) 実際の臨床応用に向けて、Ki23057の単独療法ではなく抗癌剤やCOX-2 inhibitorとの併用療法が有効であると考えられた。Ki23057は経口薬であり、併用する薬剤も経口薬が望ましいと考え、フッ化ピリミジン系抗癌剤であるS-1とCOX-2 inhibitorであるetodolacを用いて、それぞれ単独および併用による、大腸癌細胞の増殖、浸潤および転移に与える影響を検討する。

(3) VEGFRは血管内皮細胞だけでなく、癌細胞にも発現しており、その増殖能や浸潤能に関与すると報告されている。そこで、膵癌細胞におけるVEGFRの発現と抗VEGF抗体およびVEGFR阻害剤が膵癌細胞の増殖能および浸潤能におよぼす影響を検討する。

3. 研究の方法

(1) 当科で樹立した大腸癌細胞株LM-H3およびHT-29、LoVo、LS174Tを用いて大腸癌細胞の増殖、浸潤にあたるKi23057の影響をin vitroで検討する。また、HUVECs(Human Umbilical Vein Endothelial Cells)を用いて血管内皮細胞の増殖、管腔形成にあたる影響をin vitroで検討する。また、ヌードマウスを用いて大腸癌の増殖、肝転移におよぼすKi23057の影響を検討する。また、血管

新生抑制効果を検討するため、anti-mouse CD31 抗体を用いて腫瘍微小血管を染色し検討する。

(2) フッ化ピリミジン系経口抗癌剤である S-1 および COX-2 inhibitor である etodolac を用いてそれぞれ単独および併用による、大腸癌の増殖、浸潤あたえる影響を in vitro で検討し、肝転移抑制効果についてヌードマウス肝転移モデルを用いて検討する。

(3) 膵癌細胞株 (MIAPaCa-2, OCUP-AT, Panc-1) における VEGFR の発現と抗 VEGF 抗体および VEGFR 阻害剤が膵癌細胞の増殖能および浸潤能におよぼす影響を検討する。

4. 研究成果

(1) Ki23057 はいずれの大腸癌細胞株にも増殖抑制を示さなかったが、血管内皮細胞の増殖を濃度依存的に抑制した。Ki23057 は血管内皮細胞のアポトーシスを誘導した。血管内皮細胞の管腔形成は Ki23057 の添加によって有意に抑制された。血管内皮細胞の VEGFR2 リン酸化は Ki23057 によって濃度依存的に抑制された。Ki23057 はヌードマウス皮下腫瘍の腫瘍増殖抑制を示し、有意に血管新生の抑制を認めた。また、ヌードマウス肝転移モデルでは Ki23057 は肝転移を有意に抑制した。以上より、Ki23057 は大腸癌の増殖及び肝転移に対して有用な血管新生阻害剤である可能性が示唆された。

(2) S-1 は大腸癌細胞の増殖を抑制したが、浸潤能には影響を与えなかった。一方 etodolac は大腸癌細胞の増殖を抑制しなかったが、浸潤能を抑制した。また、ヌードマウス肝転移モデルを用いた肝転移抑制効果の検討では、S-1 あるいは etodolac 単独投与において抑制効果を認めたが、併用することによりさらなる抑制効果を認めた。

(3) MIAPaCa-2 および OCUP-AT は VEGFR-2 を高発現していた。いずれの細胞株においても、VEGF-A の投与により増殖能に変化は認めなかった。しかし、VEGF-A の投与により、VEGFR-2 を高発現している MIAPaCa-2、OCUP-AT において浸潤能の亢進を認めた。一方、VEGFR-2 の発現が低い Panc-1 では VEGF-A による浸潤促進効果は認めなかった。MIAPaCa-2 および OCUP-AT は VEGF-A の添加に

より、VEGFR-2 シグナルがリン酸化され浸潤能が亢進された。ベマシツマブおよびスニチニブは浸潤能を抑制した。また、VEGFR-2 siRNA により浸潤能が抑制された。VEGF-A/VEGFR-2 シグナルは、膵癌細胞の浸潤能に関与しており、VEGF/VEGFR 阻害剤が膵癌治療に有用である可能性が示唆された。

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 2 件)

- ① Tachimori A, Yamada N: Combination therapy of S-1 with selective cyclooxygenase-2 inhibitor for liver metastasis of colorectal carcinoma. *Anticancer Research* 28, 査読有, 2008, 629-638
- ② Sakurai K, Yamada N, Yashiro M: A novel angiogenesis inhibitor, Ki23057, is useful for preventing the progression of colon cancer and the spreading of cancer cells to the liver. *European Journal of Cancer* 43, 査読有, 2007, 2612-2620

[学会発表] (計 5 件)

- ① 土井洋輔、山田靖哉、VEGF/VEGFR シグナル阻害剤が膵癌細胞の浸潤能におよぼす効果、第 43 回制癌剤適応研究会、平成 22 年 3 月 12 日、仙台市情報・産業プラザ
- ② Doi Y, Yamada N, Expression of Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2 in human pancreatic cancers、第 68 回癌学会総会、平成 21 年 10 月 3 日、横浜・パシフィコ横浜
- ③ 天野良亮、山田靖哉、胆道癌における KGF/Ksam-II をターゲットにした分子標的治療の可能性の検討、第 62 回日本消化器外科学会定期学術総会、平成 19 年 7 月 19 日東京
- ④ Yamada N, Yashiro M, The effect of a novel molecular targeting compound as K-samII/KGFR phosphorylation inhibitor, Ki23057, on biliary tract cancer, *AACR*, 2007. 4. 18, Los Angeles (USA)
- ⑤ Sakurai K, Yamada N, The Effect of a Novel Angiogenesis Inhibitor, Ki23057, on Preventing Progression and Liver Metastasis of Colon Cancer, *AACR*, 2007. 4. 16, Los Angeles (USA)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山田 靖哉 (YAMADA NOBUYA)
大阪市立大学・大学院医学研究科・講師
研究者番号：00305640

(2) 研究分担者

八代 正和 (YASHIRO MASAKAZU)
大阪市立大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号：60305638

(3) 連携研究者 なし