

平成 21 年 5 月 11 日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19790256
 研究課題名（和文） 胃癌における VEGF, PDGF, TGF- β シグナル経路の病理学的検討
 研究課題名（英文） Research of VEGF, PDGF and TGF-beta in gastric cancers

研究代表者
 鈴木 潮人（SUZUKI SHIOTO）
 金沢大学・医学系・講師
 研究者番号：40334859

研究成果の概要：胃癌 107 例中，PDGF, VEGF 蛋白の過剰発現は，53%，41%の症例にみられ，両者が同一症例で発現する傾向があった。また，87%の症例で中等度以上の血管密度がみられ，PDGF の過剰発現と統計学的に有意な相関があったが，VEGF の過剰発現と相関はなかった。胃癌においては，VEGF よりも PDGF の分泌が血管密度を上昇させることが示唆され，さらに両者が共同して血管新生を誘導している可能性も示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,800,000	0	1,800,000
2008 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	420,000	3,620,000

研究分野：人体病理

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

キーワード：PDGF, VEGF, 血管新生, 胃癌

1. 研究開始当初の背景

HER-2 を標的とした薬剤 Herceptin の適応には免疫染色および fluorescence in situ hybridization (FISH) 法による検索が用いられていることを踏まえ，我々は，これらの手法を用いて，乳癌（Pathol Int. 2002; 52(7):451-7），大腸癌（Mod Pathol. 2004; 17(8):895-904），非小細胞肺癌（Cancer.

2005; 103(6):1265-73）（Mod Pathol. 2006;19(7):986-98），胃癌（Clin Gastroenterol Hepatol. 2003; 1(6):438-45），食道癌（Int J Cancer. 2006; 118(5):1173-80），胆道癌（J Pathol. 2005; 206(3): 356-65），骨軟部腫瘍（Mod Pathol. 2004; 17(12):1497-505）を対象として EGFR (epidermal growth factor receptor), HER2

及びそのシグナル伝達の下流因子に関する研究を行い、チロシンキナーゼ阻害剤を用いた治療を行う際に必要なデータを蓄積してきた。しかし、細胞増殖に重要な EGFR family に加え、vascular endothelial growth factor (VEGF), platelet derived growth factor (PDGF), TGF-beta 経路を標的とした治療薬を併用した効率的な治療法を確立するためには、腫瘍新生血管に関する研究を行うことが必須である。これに対し、申請者は、2005 年から、スウェーデンの Ludwig Institute for Cancer Research において Carl-Henrik Heldin 博士の指導の下、癌治療対象のモデルとしてノックインマウス (J Biol Chem. 2004;279(41):42516-27) を用いて、PDGFR の機能及び in vivo における癌細胞周囲の微小環境について明らかにするべく基礎的な研究を行った。抗血管内皮細胞抗体、抗平滑筋抗体を用いた 2 重免疫染色により、移植腫瘍内における新生血管の密度、一個当たりの血管の平均面積、傍細胞の血管被覆密度など、新生血管の状態について調べ、PDGF シグナルが新生血管に与える影響について検討したところ、PDGFR-beta 活性の高い間質を背景とすると、PDGF 刺激の少ない環境でも、新生血管への傍細胞の接着が多いこと、さらに腫瘍の初期増殖速度が亢進していることがわかった。これらの実験動物や細胞株を用いた基礎実験における結果を踏まえて実験を進展させ、抗腫瘍血管療法確立に役立てるために、人体の胃癌切除材料を対象として本研究を行う着想に至った。

2. 研究の目的

近年、腫瘍新生血管が腫瘍の増殖・転移過程において重要であることが注目されており、血管新生を制御する重要な因子として、VEGF, PDGF が挙げられる。本邦で罹患率の高

い胃癌においても発現されていることが報告されており (World J Gastroenterol. 2006; 12 (21): 3297-3305), これらを標的とした治療の効果が期待できる。抗腫瘍血管療法確立のためには、外科材料標本を用いた研究によるデータの蓄積、必要である。しかし、複数のリガンドと受容体チロシンキナーゼの発現・活性化状態、さらに、その分布について解析した報告は無かった。本研究では、人体の胃癌切除材料における新生血管の密度、PDGF, VEGF 経路が血管新生に与える影響について明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

金沢大学医学部附属病院で 2003 年から 2007 年に切除された 107 例 (男 70, 女 37; 平均 65.3 歳, 26-85 歳) の胃癌切除材料のホルマリン固定・パラフィン包埋組織と凍結材料 28 検体を対象として用いた。

(1) 免疫染色による蛋白の過剰発現及び活性化状態の検索

① VEGF, PDGF, TGF-beta 蛋白過剰発現の検索

金沢大学医学部・外科で切除された胃癌のホルマリン固定・パラフィン包埋組織で VEGF, PDGF, TGF-beta に対する抗体を用いた免疫組織化学を行い、蛋白の過剰発現およびその局在を検索した。

② VEGF, PDGF 過剰発現の評価

癌細胞における VEGF, PDGF の染色強度を 4 段階 [0(none), 1+(weak), 2+(moderate), 3+(strong)], 陽性細胞が癌病巣に占める面積の割合を 5 段階 [0(0%), 1(1%-25%), 2(26-50%), 3(51-75%), 4(76%-100%)] にスコア化し (Ann Surg Oncol. 14(10):2738-47), 両者の和が 4 以上の症例を過剰発現ありと判定した。

③ VEGFR, PDGFR 蛋白のリン酸化状態の検索

胃癌のホルマリン固定・パラフィン包埋組織で抗 pVEGFR 抗体, 抗 pPDGFR 抗体を用いた免疫染色を行い, VEGFR, PDGFR 蛋白のリン酸化状態について調べ, その局在についても検索した.

④ 腫瘍新生血管の状態の検索

胃癌のホルマリン固定・パラフィン包埋組織で抗血管内皮細胞抗体 (抗 CD34 抗体), を用いた免疫染色を行い, 腫瘍新生血管の密度を調べた. 血管密度 (microvessel density: MVD) の評価に関しては, 過去の報告 (Br J Cancer. 2000;82(2):339-47) に従い, 最も CD34 陽性像が多い 3 箇所 hot spot を調べ, 新生血管の密度を軽度 (grade1), 中等度 (grade2), 高度 (grade3) の 3 段階に分類した. (2) Western blot analysis による VEGF, PDGF, TGF-beta シグナル伝達経路における蛋白の過剰発現及び活性化状態の検索

金沢大学医学部・外科で切除された胃癌凍結標本を lysis buffer (0.5% Nonidet P-40, 0.05% SDS, 50 mM Tris-HCl [pH 7.6], 0.2 M NaCl, 5 mM EDTA, 50 mM NaF, proteinase inhibitors and sodium orthovanadate) に溶解させる. このサンプルを 10%SDS-PAGE ゲルで電気泳動し, ニトロセルロースメンブレンに転写したのち, 1 次抗体を反応させた. 対応する 2 次抗体を反応させたのち, image-analyzer を用いて, 内部コントロールである beta-actin と比較して PDGF, VEGF 蛋白発現量を数値化した. 次に非癌部 N に対する癌部 T の数値の比を protein index として計算し, この値が 1.5 以上のとき, 蛋白の過剰発現ありと判定した. また, 1 次抗体がリン酸化受容体の場合, protein index が 1.0 以上のときに活性化ありと判定した.

上記 (1), (2) の免疫染色および western blot 法で用いた 1 次抗体 (希釈倍率) は以下の通りである.

免疫染色

PDGF (PGF007, monoclonal, Mochida) (1:1000)

VEGF (polyclonal, Lab Vision) (1:100)

CD34 (monoclonal, Dako) (diluted)

PDGFR-β (rabbit monoclonal, Cell Signaling Technology) (1:50)

p-PDGFR (phospho Y751, polyclonal, Abcam) (1:50)

western blot 法

PDGF (PDGF-BB, monoclonal, Abcam) (1:200)

PDGFR-β (rabbit monoclonal, Cell Signaling Technology) (1:2000)

p-PDGFR (Tyr751, rabbit monoclonal, Cell Signaling Technology) (1:2000)

4. 研究成果

107 症例のうち, 胃癌の組織型は intestinal-type が 58 例, diffuse-type が 49 例であった. 103 例で固有筋層以深への癌の浸潤がみられた (T1 4, T2 56, T3 39, T4 8). 74 例においてリンパ節転移が認められた (N0 33, N1/2 74).

(1) 免疫染色

① PDGF 発現は癌細胞, 炎症細胞, 周囲間質細胞においてび慢性あるいは部分的に細胞質内および核周囲にみられた. 107 例において蛋白発現がみられたが, その染色強度は 45 例において軽度, 44 例は中等度, 18 例は高度であった. また, 陽性像が病変に占める割合は 26 例 (24%) が grade1, 52 例 (49%) が grade2, 25 例 (23%) が grade3, 4 例 (4%) が grade4 であった. 両者のスコアの和を求めたところ, 14 例 (13%) は value grade2, 36 例 (34%) は grade3, 29 例 (27%) が grade4, 14 例 (13%) が grade5, 12 例 (11%) が grade6, 2 例 (2%) が grade7 であり, 4 以上で過剰発現ありと判定されたのは 57 例 (53%) であった.

② VEGF 発現は癌細胞の細胞質内にみられた。VEGF 発現は 107 例中, 105 例にみられた。染色強度は 64 (60%) 例が grade1, 29 例 (27%) が grade2, 12 例 (11%) が grade3 であった。また, 陽性像が病変に占める割合は 44 (41%) 例は grade1, 37 例 (35%) は grade2, 21 例 (20%) は grade3, 3 (3%) 例が grade4 であった。31 例 (29%) は VEGF value grade2, 30 例 (28%) は grade3, 27 例 (25%) は grade4, 11 (10%) 例が grade5, 6 (6%) 例が grade6 であり, 過剰発現ありと判定されたのは 44 例 (41%) であった。

③ p-PDGFR は 44% で陽性, 51% で陰性, 4% の症例で判定不能であった。しかし, 陽性像が確認された症例においても, 弱陽性の症例が多く, 必ずしも明瞭にリン酸化を確認出来なかった。p-VEGFR に関しても陽性像は不明瞭であり, リン酸化の確認は難しかった。

④ PDGF, VEGF の相関について
蛋白の過剰発現は, 53%, 41% の症例にみられ, 両者が同一症例で発現する傾向があった: PDGF 染色強度が軽度の 45 例中, 1 例は VEGF 陰性, 33 例が VEGF 染色強度が軽度, 10 例が中等度, 1 例が高度であった。PDGF が中等度陽性の 44 例中, 1 例が VEGF 陰性, 29 例が軽度陽性, 11 例が中等度陽性, 3 例が高度陽性であった。PDGF 高度陽性の 18 症例のうち, 2 例が VEGF 軽度陽性, 8 例が中等度陽性, 8 例が高度陽性であった。

⑤ 血管新生について
CD34 陽性像は全 107 例でみられ, 14 (13%) 例が軽度, 52 (49%) 例が中等度 grade2, 41 例 (38%) に高度の血管密度がみられた。

⑥ 新生血管と VEGF, PDGF の相関について
87% の症例で中等度以上の血管密度がみられ, 血管密度の上昇と, PDGF の過剰発現に統計学的に有意な相関があった。特に, PDGF 陽性像が癌病巣に占める面積の割合が, 血管密度上

昇と相関があった。一方, VEGF の過剰発現と血管密度の上昇に相関はなかった。

(2) Western blot 法の結果

上記の如く, PDGF 過剰発現と血管密度の上昇に相関がみられることが分かった。しかし, PDGFR のリン酸化は免疫染色では必ずしも明確に確認できなかった。そこで, PDGF 過剰発現と PDGFR 蛋白リン酸化について western blot 法を用いて検索した。

① 凍結組織の得られた 28 例中 21 例の腫瘍部で, (正常部に比し 1.5 倍以上の) PDGF 過剰発現が確認された。

② 28 例中 7 例において PDGFR 蛋白のリン酸化が確認された。

上記①, ②で得られた結果を比較すると, 両者に相関はみられず, PDGF の過剰発現により必ずしも PDGFR のリン酸化が生じているわけではなかった。さらに, PDGFR 蛋白リン酸化の有無と血管密度上昇との相関はなかった。

<結論>

87% の症例で中等度以上の血管密度がみられ, 血管密度の上昇と, PDGF の過剰発現に統計学的に有意な相関があった。特に, PDGF 陽性像が癌病巣に占める面積の割合が, 血管密度上昇と相関があった。一方, VEGF の過剰発現と血管密度の上昇に相関はなかった。胃癌においては, VEGF よりもむしろ PDGF の分泌が血管密度を上昇させることが示唆され, さらに両者が同時に分泌され, 共同して血管新生を誘導している可能性も示唆された。

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 4 件)

① Dobashi Y, Suzuki S, Matsubara H,

Kimura M, Endo S, Ooi A.
Critical and diverse involvement of Akt/mammalian target of rapamycin signaling in human lung carcinomas.

Cancer. 2009;115(1):107-18. 査読あり

② Ooi A, Suzuki S, Nakazawa K, Itakura J, Imoto I, Nakamura H, Dobashi Y.
Gene amplification of Myc and its coamplification with ERBB2 and EGFR in gallbladder adenocarcinoma.

Anticancer Res. 2009;29(1):19-26. 査読あり

③ Suzuki S, Heldin CH, Heuchel RL.
Platelet-derived growth factor receptor-beta, carrying the activating mutation D849N, accelerates the establishment of B16 melanoma.

BMC Cancer. 2007;7(1):224. 査読あり

④ Dobashi Y, Suzuki S, Sugawara H, Ooi A.

Involvement of epidermal growth factor receptor and downstream molecules in bone and soft tissue tumors.

Hum Pathol. 2007;38(6):914-25. 査読あり

[学会発表] (計6件)

① 鈴木潮人, 土橋洋

Effects of an activating mutation (D849N) in PDGFR-beta on angiogenesis of B16 malignant melanoma (活性変異型 PDGFR-β (D849N)の血管新生増強効果)

第67回日本癌学会総会(名古屋)(2008年10月29日)

② 大井章史, 鈴木潮人, 井本逸勢, 土橋洋
Gene amplification of Myc and its coamplification with ERBB2 and EGFR in gallbladder adenocarcinoma (胆嚢癌にお

けるMyc遺伝子増幅,特にERBB2及びEGFR遺伝子との同時増幅について)

第67回日本癌学会総会(名古屋)(2008年10月28日)

③ 鈴木潮人, 土橋洋, 大井章史
PDGFR-βの活性型変異D849NはB16メラノーマの増殖を促進する

第97回日本病理学会総会(金沢)2008年5月16日

④ 土橋洋, 鈴木潮人, 大井章史
ヒト肺癌におけるEGFR遺伝子異常,下流因子の活性化とその分子病理学的意義

第97回日本病理学会総会(金沢)2008年5月16日

⑤ 鈴木潮人, 土橋洋, 大井章史
Diversity of epidermal growth factor receptor-mediated activation of downstream molecules in human lung carcinomas

第66回日本癌学会総会(横浜)2007年10月5日

⑥ 土橋洋, 鈴木潮人, 大井章史
Involvement of epidermal growth factor receptor and downstream molecules in bone and soft tissue tumors

第66回日本癌学会総会(横浜)2007年10月5日

6. 研究組織

(1)研究代表者:

鈴木潮人 (SUZUKI SHIOTO)

金沢大学・医学系・講師

研究者番号: 40334859

(2)研究分担者: なし

(3)連携研究者: なし