

平成22年6月8日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2009

課題番号：20790948

研究課題名（和文） 血管新生阻害剤 TSU68 による肝転移抑制機序の解明と至適併用スケジュールの決定

研究課題名（英文） The mechanical analysis of angiogenic inhibitor TSU68 for the inhibition of liver metastasis and the decision of optimal administration schedule.

研究代表者 山本真義（YAMAMOTO MASAYOSHI）

浜松医科大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：70397420

研究成果の概要（和文）：本研究では血管新生阻害剤による肝転移制御機構の解明と、メカニズムに基づいた至適併用スケジュールの決定を目的とした。大腸癌肝転移モデルにおける転移形成前の肝臓で CXCL1 の発現が TSU68 によって抑制され、その制御には原発巣から分泌される IL12 p40 が関与していることが示唆された。すなわち血管新生阻害剤 TSU68 は転移形成前の転移先臓器の微小環境を変化させることで転移を強力に抑制していると考えられた。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study was to investigate the inhibitory effect of TSU68 on colon cancer liver metastasis, and to establish the optimal administration schedule with TSU68. In animal model of colon cancer liver metastasis, the expression of CXCL1 in premetastatic liver was significantly decreased by TSU68 treatment. In addition, the amount of interleukin-12 (IL-12) p40 in the portal vein was significantly decreased by TSU68 treatment. These results suggest that TSU68 may modulate the pre-metastatic niche in the target organ through suppression of the inflammatory response, which might be an alternative mechanism used by anti-angiogenic agents.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：腫瘍血管新生

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：血管新生阻害剤，分子標的治療，転移，Premetastatic niche

1. 研究開始当初の背景

血管新生は腫瘍の増殖や転移形成に不可欠であり、血管新生阻害による抗腫瘍効果、転移抑制効果については多くの evidence が示されている。2004 年、転移性大腸癌患者に対して標準化学療法と抗 VEGF 中和抗体の併用群の有意な生存期間の延長が初めて報告され、本邦においても既に臨床応用が始まっている。しかし現在もなお、その作用機序は明確ではない。特に転移に対する抑制メカニズムについては未だ不明な点が多く、その機序解明は抗血管新生療法の更なる応用、発展を考える上で必須であると考えられる。

また血管新生には EGF(epidermal growth factor), HGF(hepatocyte growth factor)など数多くの因子が各段階で複雑に関与しているため、単一、画一的な抗血管新生療法では治療抵抗性を獲得すると考えられる。この抗血管新生療法のピットフォールを克服するためには、さらなる標的分子を同定し効率的な併用療法スケジュールを探索することが極めて重要であると考えられる。

2. 研究の目的

(1) ヒト大腸癌同所移植肝転移ヌードマウスモデルを用いて、血管新生阻害剤 TSU68 投与による肝転移抑制効果の検討とそのメカニズムを解明する。

(2) TSU68 との併用療法に至適な薬剤の同定と、投与スケジュールを決定する。

3. 研究の方法

(1) TSU68 による肝転移抑制効果および原発巣における抗腫瘍効果の検討

ヒト大腸癌高肝転移株 TK4 をヌードマウス盲腸に同所移植し、TSU68 経口投与群 (400 mg/kg/day, n=19) およびコントロール群 (vehicle, n=19) を設定。5 週間連日投与後の肝転移抑制効果を肉眼的、組織学的に評価した。また原発巣における組織学的抗腫瘍効果の評価として、ヒトサイトケラチン 20 抗体、Ki67 抗体、CD34 抗体による免疫染色を行い、それぞれ腫瘍細胞密度、細胞増殖、微小血管密度の変化を検討した。

(2) 担癌、非担癌による肝臓内遺伝子発現変動と TSU68 投与による影響の解析

担癌群には TK4 を同所移植し、TSU68 投与群 (T-TSU 群; n=15) とコントロール群 (T-Co 群; n=15) を設定。非担癌群には sham 手術

を行い、TSU68 投与群 (NT-TSU 群; n=12) とコントロール群 (NT-Co 群; n=12) を設定した。薬剤投与後 7 日目 (肝転移形成前) における肝臓を採取し RNA を抽出。転移形成前の肝臓内での遺伝子発現変動をマイクロアレイ法にて解析した。

(3) 同様に薬剤投与後 7 日目における原発巣を採取し RNA を抽出。同時期における原発巣内遺伝子発現変動をマイクロアレイ法にて解析した。

4. 研究成果

(1) コントロール群ではマウス 1 匹あたり平均 1.28 個の肝転移が認められたのに対し TSU68 投与群では完全に抑制されていた ($p < 0.001$; 図 1)。

また原発巣における腫瘍細胞密度、細胞増殖、微小血管密度は TSU68 投与により有意に減少していた (それぞれ $p < 0.001$, $p = 0.032$, $p = 0.001$)。以上の結果から、TSU68 投与による著明な肝転移抑制効果および原発巣に対する抗腫瘍効果が確認された。

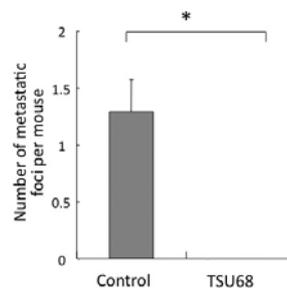


図1. TSU68による肝転移抑制効果

(2) マイクロアレイ解析により NT-Co 群と T-Co 群の肝臓内遺伝子発現を比較した結果、T-Co 群の肝臓で 1947 の遺伝子の発現上昇を認めた。さらにこれらの遺伝子中で TSU68 投与により有意な発現低下を認めた 44 の遺伝子を抽出し、その中で癌転移に深く関連していることが知られているケモカイン CXCL1 に着目した。CXCL1 の有意な発現変動は定量的 reverse transcriptional polymerase chain reaction (RT-PCR) 法および免疫染色によっても確認された (図 2)。

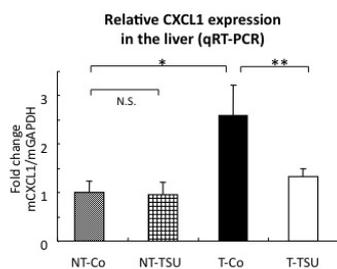


図2. 転移前肝臓におけるCXCL1の発現

CXCL1はその受容体であるCXCR2を発現する細胞のリクルートに関与することが知られている。そこでTK4細胞におけるCXCR2の発現をRT-PCR法にて確認したところ、皮下移植腫瘍と比較し同所移植腫瘍でCXCR2の有意な発現上昇を認めた(図3)。

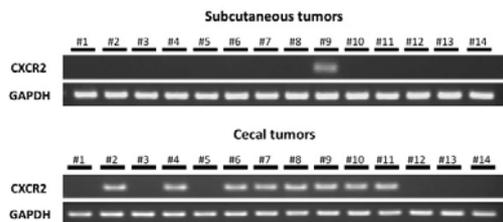


図3. 移植部位の違いによる腫瘍内CXCR2の発現

また担癌状態の肝臓内には好中球やマクロファージの集積が見られ、炎症が惹起されていることが示唆されたが、TSU68投与によりこれらの細胞の集積が有意に抑制されていた。大腸癌肝転移におけるCXCL1/CXCR2経路の重要性を確認するために抗CXCR2中和抗体による転移抑制効果を検討したところ、コントロールIgG投与群と比較して抗CXCR2中和抗体投与群で有意な転移抑制効果をも認めた(p=0.013; 図4)。

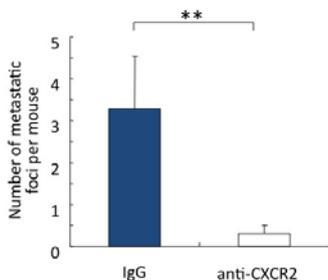


図4. 抗CXCR2抗体による転移抑制効果

次に我々は肝臓内の微小環境に影響を及ぼす因子として原発巣から門脈内へ流入する

サイトカインの関与を考えた。そこで門脈血を採取し計32種のサイトカインを定量した結果、インターロイキン12 p40サブユニット(IL-12 p40)がT-Co群で上昇しており、T-TSU群で抑制されていた(図5)。

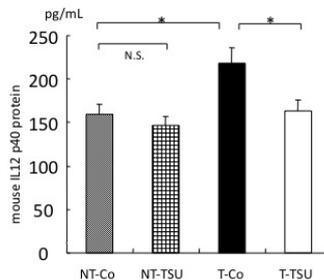


図5. 門脈内IL12 p40の定量

以上の結果から門脈血中のIL-12 p40が肝臓内CXCL1の発現変動に関与している可能性が示唆された。さらにIL-12 p40中和抗体投与による転移抑制効果を検討したところ、コントロールIgG投与群と比較しIL-12 p40中和抗体投与群において有意な肝転移抑制効果が確認された(p=0.017)。

(3) 同様に薬剤投与開始から7日目のPremetastatic phaseにおける原発巣のマイクロアレイ解析では、複数の遺伝子の発現変動が確認された。Lysyl oxidase(LOX)の発現がTSU68投与により有意に抑制されていることが確認され、転移抑制に関与している可能性が考えられた。マイクロアレイ解析では、併用療法の標的と成り得る候補の抽出には至らなかった。

[まとめ]

担癌状態では門脈血中IL-12 p40の上昇を介して肝臓内CXCL1の発現が転移形成前から上昇し炎症反応が惹起されることで転移の準備段階、すなわち「pre-metastatic niche」が形成されると考えられた。またTSU68投与により、肝臓内CXCL1の発現が抑制されCXCR2陽性細胞の肝臓内リクルートが阻害されることで肝転移が抑制されることが示唆された。

[結論]

本研究では血管新生阻害剤による新たな転移抑制機序として、転移先臓器の微小環境を変化させ癌細胞が転移臓器に生着しにくい環境を作り出しているというこれまでにない新たな概念を提唱することが出来た。また

pre-metastatic niche の制御により転移を強力に抑制できる可能性が示唆され、今後新たな転移制御戦略の標的となりうるものと考えられる。

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 1 件) Masayoshi Yamamoto, Hirotohi Kikuchi, Manabu Ohta, Toshiki Kawabata, Yoshihiro Hiramatsu, Kenji Kondo, Megumi Baba, Kinji Kamiya, Tatsuo Tanaka, Masatoshi Kitagawa, Hiroyuki Konno. TSU68 Prevents Liver Metastasis of Colon Cancer Xenografts by Modulating the Premetastatic Niche. Cancer Research; 査読あり. 2008;68: 9754-62.

[学会発表] (計 5 件)

① 山本真義. 大腸癌肝転移における CXCL1/CXCR2 の関与および血管新生阻害剤 TSU68 による肝転移制御メカニズムの解明. 2009年4月3日 第109回日本外科学会定期学術集会. 2009年4月2日 福岡国際会議場

② Masayoshi Yamamoto. TSU68 prevents liver metastasis of colon cancer xenografts by modulating the pre-metastatic niche. 100th American Association of Cancer Research. 2009年4月20日 Colorado Conventional Center.

③ 山本真義. TSU68 prevents liver metastasis of colon cancer xenografts by modulating the pre-metastatic niche. 第67回日本癌学会定期学術集会. 2008年10月28日 名古屋国際会議場

④ 山本真義. 血管新生阻害剤 TSU68 による肝転移抑制メカニズムの解析. 第108回日本外科学会定期学術集会. 2008年5月16日 長崎ブリックホール

⑤ Masayoshi Yamamoto. The role of angiogenic inhibitor TSU68 for the prevention of colon cancer liver metastasis. 99th American Association of Cancer Research. 2008年4月15日 San Diego Conventional Center.

6. 研究組織

(1) 研究代表者 山本 真義
(YAMAMOTO MASAYOSHI)
浜松医科大学・医学部附属病院・医員
研究者番号：70397420