

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年9月28日現在

機関番号：83901

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590457

研究課題名（和文）HERおよびVEGF familyを標的とする消化器癌に対する分子標的治療の研究

研究課題名（英文）New molecular therapy against gastroenterological malignancies targeting members of HER and VEGF family.

## 研究代表者

中西 速夫（NAKANISHI HAYAO）

愛知県がんセンター（研究所）・腫瘍病理学部・室長

研究者番号：20207830

## 研究成果の概要（和文）：

1) 低分化型大腸癌細胞株の Gefitinib 感受性における HER3 の役割について検討し、HER3 が大腸がん細胞の細胞分化や分子標的薬(gefitinib)感受性に重要な役割を果たしている可能性を示唆した。2) HER2 遺伝子増幅胃癌細胞株の一部の細胞において VEGF-A 高発現、Bevacizumab および HER2 標的薬との併用療法に対する高感受性を明らかにした。3) HNSCC 細胞株において Gefitinib 抵抗性を示す EMT 亜株を分離し、その耐性機構を明らかにした。

## 研究成果の概要（英文）：

In this study, we newly demonstrated following three findings. 1) HER3 is involved in the gefitinib-sensitivity of poorly-differentiated colonic cancer cell line (COLM-5). 2) VEGF-A is overexpressed in some HER2 gene-amplified gastric cancer cell lines and can be effectively targeted by bevacizumab alone and in combination with HER2 antagonists. 3) Subline showing EMT derived from parental HNSCC show gefitinib-resistance due to down regulation of EGFR and compensatory activation of alternative signaling pathway.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
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：基礎医学，実験病理学

キーワード：腫瘍

## 1. 研究開始当初の背景

代表的な受容体型チロシンキナーゼである HER Family (EGFR, HER2, HER3, HER4) は上皮性腫瘍において最も有力な分子標的であり、現在、EGFR, HER2 を標的とする分子標的治療は肺癌、乳がんなどでその有効性が臨床的に確認され、従来の化学療法と並ぶ確固た

る地位を築いている。これに対し消化器癌に対する分子標的治療は本邦においては Cetuximab (抗ヒト EGFR キメラ抗体) が大腸がんに対して承認され、また昨年度より胃がんにおいてもようやく Trastuzumab (ヒト化抗 HER2 抗体) が保険適応になったものの、肺癌、乳がん等にくらべ比べ立ち遅れており、

またその分子機序にも依然として不明の点が多いのが現状である。一方、VEGFは原発腫瘍ならびに転移形成発育における腫瘍血管新生において中心的役割を果たす増殖因子であり、それらに対する抗体療法は大腸癌においてすでに臨床応用され、その化学療法併用による有効性が報告されているが、Bevacizumab (ヒト化抗 VEGF 抗体)の胃癌に対する生存延長効果は臨床試験により効果ありとするものもあるが、他の臨床試験では否定的な結果が報告されており、必ずしも評価は定まっておらず、臨床応用には至っていない。

消化器癌においてこのように分子標的治療が立ち遅れている一つの理由として HER Familyや VEGF Family に対するキナーゼ阻害剤や抗体薬に対して高感受性を示すヒト胃癌、大腸がん細胞株の数が限られており、in vitro における分子レベルの作用機構の解析などの前臨床的研究が困難であることが挙げられる。申請者らはこれまでに上記分子標的薬に対して高い感受性(抵抗性)を有する新しい頭頸部扁平上皮がん(UMSCC81-Fb)、日本人由来 HER2 高発現胃癌細胞株 (GLM-1, -2, -4)、大腸がん細胞株 (COLM-1~8)を独自に多数株樹立し、日本人消化器がんに対する分子標的治療の基礎的解析を進めてきた。

## 2. 研究の目的

本研究ではこれらの感受性細胞株を用いて抗腫瘍効果、転移抑制効果ならびにその分子機序や感受性予測因子の探索などの前臨床的研究を進め、消化器癌の個々の腫瘍の特性に応じた最適のテーラーメイド医療を構築することを目的とする。本研究では期間内に以下の3点を重点的に解明する。

1 申請者らが独自に樹立した大腸癌肝転移巣由来の Gefitinib (EGFR チロシンキナーゼ阻害剤) および Cetuximab 高感受性を有する細胞株 (COLM-5)を用いて、その感受性の分子機構および上記細胞から作成した耐性細胞を用いて耐性機構を明らかにし、それを克服できる新たな治療法を開発する。

2 申請者らが独自に樹立した胃癌肝転移巣由来の Gefitinib および Trastuzumab (抗 HER2 ヒト化抗体)感受性胃癌細胞株 (GLM-1, 2, 4) の感受性機構として血管新生抑制が関与するか否かを明らかにし、これら細胞の Bevacizumab 感受性との関連を検討、その分子機構や両者のクロストークを明らかにする。

3 胃癌・大腸がんなどの腺癌に対する上記分子標的治療の分子基盤をより深く理解するために EGFR を高発現する頻度

の高い舌がんなどの口腔扁平上皮癌についても Gefitinib および Cetuximab 感受性の分子機構を解析し、EGFR 高発現胃癌・大腸がん細胞との差異を明らかにする。

## 3. 研究の方法

### 1 転移性低分化型大腸癌細胞株の

Gefitinib および Cetuximab 高感受性機構の解析

肝転移巣から独自に樹立した EGFR 高発現大腸がん細胞株 (COLM-5) は Gefitinib および Cetuximab に高感受性 (supersensitive) であり、腹膜、肺およびリンパ節などへの転移も顕著に抑制される事をこれまでに明らかにしている。上記分子標的薬のアポトーシス、細胞周期ならびに EGFR 下流のシグナル伝達経路として重要な Erk1/2、PI3K/Akt 経路等に及ぼす影響を FACS, ウェスタンブロット, 免疫沈降などにより in vitro および in vivo の両面から解析し、抗腫瘍効果の作用機序を解明する。興味有ることに COLM-5 細胞は他の分化型腺癌細胞株 (COLM-1-4) に比べて HER3 の発現が著しく低く、Akt のリン酸化も低レベルであることを予備的検討により見出している。PI3K/Akt 経路の恒常的活性化は薬剤耐性の原因の一つであることはよく知られていることから、Loss of HER3 を介した PI3K/Akt の不活性化が感受性に関与している可能性があり、この点を HER3 のトランスフェクションにより耐性が獲得されるか否かを調べることにより明らかにする。

以上のシグナル伝達阻害と免疫学的機序の両面からの解析により悪性度の高いサブセットである低分化型大腸癌細胞に対する HER targeting 療法の作用機序を明らかにする。

### 2 Trastuzumab 感受性を有する胃癌細胞株を用いた VEGF 標的療法感受性とその分子機序の解析

HER2 高発現胃癌細胞株のいくつかの株は VEGF-A 産生能が高く、また in vivo において腫瘍血管が豊富な腫瘍組織を形成していることから、Bevacizumab 高感受性が予想されるのでこの点を検証する。また Gefitinib の抗腫瘍活性の機序として血管新生抑制効果が報告されている。Gefitinib が血管内皮細胞の EGFR を介して直接に

内皮細胞の遊走 Akt シグナルを遮断すると考えられ、Gefitinib の HER2 高発現胃癌細胞株に対する抗腫瘍作用には血管新生抑制が関与する可能性もある。これらの点を in vitro 及び in vivo の実験から検証する。

3 口腔扁平上皮癌における Gefitinib 感受性ならびに抵抗性の分子機構の解析  
申請者らは EGFR を発現する頻度の高い舌がんなどの口腔扁平上皮癌細胞株として既存の HSC-2, -3, UMSCC81B 細胞株を用い、これらが Gefitinib および Cetuximab に対して高感受性を示すこと、そしてこの感受性が主として CDK inhibitor である P27, P21 誘導による細胞周期停止 (G0/G1) によることを予備的検討で明らかにしている。一方、申請者らは上記 UMSCC81B 細胞株を Gefitinib 添加培地中で培養し、抵抗性株を作成し、その中から、EMT 形質を示す亜株 81-Fb 株を分離している。本研究ではこの Gefitinib 抵抗性株の Gefitinib 耐性機序について in vitro, in vivo の両面から機構について解析する。

#### 4. 研究成果

##### 1 高転移性低分化型大腸癌細胞株の Gefitinib 感受性における HER3 の役割解析

Gefitinib, に対し高感受性を示す低分化型大腸癌細胞株 (COLM-5) における HER3 低発現の意義について検討した。HDAC 阻害剤により HER3 発現亢進と同時に E-cadherin 発現などの上皮分化誘導が見られること、またトランスフェクションによる HER3 強制発現によっても分化が誘導され、同時に Gefitinib 感受性が低下することを明らかにし、HER3 が大腸がん細胞の分化や分子標的薬感受性に重要な役割を果たしている可能性を示唆した。

##### 2 HER2 遺伝子増幅胃癌細胞株を用いた VEGF 標的療法併用の抗腫瘍効果とその分子機序の解析

HER2 陽性胃癌細胞株 (GLM-1, 4) を含む胃癌細胞株の VEGF, HER2 発現を検討したところ、HER2 陽性胃癌株は組織学的に血管の豊富な乳頭がんであり、また VEGF-A (VEGF-C ではなく) mRNA を高発現していることを見いだした。さらに動物実験により HER2 陽性胃癌細胞株と HER2 陰性胃癌細胞株の皮下腫瘍モデルで Bevacizumab 感受性を検討したところ HER2 陽性胃癌細胞

株の方が Bevacizumab 感受性が高く、また Trastuzumab, Lapatinib との併用効果も認められた。以上の知見から HER2 陽性胃癌に対する血管新生阻害剤と HER2 Antagonist 併用療法は HER2 陽性胃癌に対する新たな治療法となる可能性を示唆した。

##### 3 頭頸部扁平上皮癌 (HNSCC) における Gefitinib 感受性ならびに抵抗性機構の解析

EGFR 高発現口腔扁平上皮癌細胞株において Gefitinib 抵抗性株が EMT 形質を示すことを明らかにし、その機構を解析した。その結果、EGFR の down regulation によって代償性に活性化された PI3K/Akt/GSK3b/snail 経路が EMT 形質発現に関与していること、また EGFR の強制発現により Gefitinib 感受性が亢進することから、EGFR の down regulation が Gefitinib 抵抗性に関与していることを明らかにした。

HNSCC にはしばしば肉腫様成分を伴う低分化型扁平上皮癌が混在し、肉腫様成分は浸潤性が強く、治療抵抗性で予後不良であることが知られている。本研究により、肉腫化 (EMT 化) の発生機構の一端が明らかになったことから、今後、代償性に活性化されるシグナル経路を明らかにすることにより新たな治療法の探索が可能になるものと思われる。

#### 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 12 件)

- ① Murakami H, Nakanishi H (Corresponding author), Tanaka H, Ito S, Misawa K, Ito Y, Ikehara Y, Kondo E, Kodera Y. Establishment and characterization of novel gastric signet-ring cell and non signet-ring cell, poorly-differentiated adenocarcinoma cell lines with low and high malignant potential. Gastric Cancer, 査読有, 2012, in press, DOI:10.1007/s10120-012-0149-2
- ② Fujii M, Toyoda T, Nakanishi H, Yatabe Y, Sato A, Matsudaira Y, Ito H, Murakami H, Kondo Y, Kondo E, Hida T, Tsujimura T, Osada H, Sekido

- Y.; TGF- $\beta$  synergizes with defects in the Hippo pathway to stimulate human malignant mesothelioma growth. *J Exp Med*, 査読有, VOL. 209 (3), 2012, 479-494, DOI:10.1084/jem.20111653
- ③ Akita K, Yoshida S, Ikehara Y, Shirakawa S, Toda M, Inoue M, Kitawaki J, Nakanishi H, Narimatsu H, Nakada H. Different levels of Sialyl-Tn A antigen expressed on MUC16 in Endometriosis and Ovarian Cancer Patients. *Int J Gynecol Oncol*, 査読有, VOL. 22(4), 2011, 531-538, DOI:10.1097/IJG.0b013e3182473292
- ④ Maseki S, Ijichi K, Tanaka H, Fujii M, Hasegawa Y, Ogawa T, Murakami S, Kondo E, Nakanishi H (Corresponding author). Acquisition of EMT phenotype in the gefitinib-resistant cells of a head and neck squamous cell carcinoma cell line through Akt/GSK3 $\beta$ /snail signaling pathway. *Br J Cancer*, 査読有, VOL. 106(6), 2012, 1196-1204, DOI:10.1038/bjc.2012.24
- ⑤ Ozaki H, Matsuzaki H, Ando H, Kajihara H, Nakanishi H, Ikehara Y, Narimatsu H.; Enhancement of metastatic ability by ectopic expression of ST6GalNAcI on a gastric cancer cell line in a mouse model. *Clin Exp Metastasis*, 査読有, VOL. 29(3), 2012, 229-238, DOI:10.1007/s10585-011-9445-1
- ⑥ Kamiyama S, Ichimiya T, Ikehara Y, Takase T, Fujimoto I, Suda T, Nakamori S, Nakamura M, Nakayama F, Irimura T, Nakanishi H, Watanabe M, Narimatsu H, Nishihara S. Expression and the role of 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate transporters in human colorectal carcinoma. *Glycobiology*, 査読有, VOL. 21(2), 2011, 235-246, DOI:10.1093/glycob/cwq154
- ⑦ Fukagawa T, Sasako M, Ito S, Nakanishi H, Iinuma H, Natsugoe S, Katai H, Shimoda T. The prognostic significance of isolated tumor cells in the lymph nodes of gastric cancer patients. *Gastric Cancer*, 査読有, VOL. 13(3), 2010, 191-196, DOI: 10.1007/s10120-010-0556-1
- ⑧ Ito S, Kodera Y, Mochizuki Y, Kojima T, Nakanishi H, Yamamura Y. Phase II Clinical Trial of Postoperative S-1 Monotherapy for Gastric Cancer Patients with Free Intraoperative Cancer Cells Detected by Real-Time RT-PCR. *World Journal of Surgery*, 査読有, VOL. 34(9), 2010, 2083-2089, DOI:10.1007/s00268-010-0573-6
- ⑨ Matsui M, Shimizu Y, Ikehara Y, Kondo E, Kodera Y, Nakanishi H (Corresponding author). Targeted delivery of oligomannose-coated liposome to the omental micrometastasis by peritoneal macrophages from patients with gastric cancer. *Cancer Science*, 査読有, VOL. 101 (7) 2010, 1670-1677, DOI: 10.1111/j.1349-7006.2010.01587.x
- ⑩ Ito Y, Nakanishi H, Kodera Y, Hir

ai T, Nakao A and Kato T. Characterization of a novel lymph node metastasis model from human colonic cancer and its preclinical use for comparison of anti-metastatic efficacy between oral S-1 and UFT/LV. *Cancer Science*, 査読有, VOL. 101(8), 2010, 1853-1860, DOI: [10.1111/j.1349-7006.2010.01607.x](https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2010.01607.x)

- ⑪ Kodera Y, Nakanishi H, Ito S, Misawa K, Ito Y, Nakayama G, Koike M, Fujiwara M, Yamamura Y, Nakao A. Expression of L1 cell adhesion molecule is a significant prognostic factor in pT3-stage gastric cancer. *Anti Cancer Res*, 査読有, VOL. 29(10), 2009, 4033-4039, <http://ar.iiarjournals.org/content/29/10/4033.abstract>
- ⑫ Iwatsuki M, Fukagawa T, Mimori K, Nakanishi H, Ito S, Ishii H, Yokobori T, Sasako M, Baba H, Mori M. Bone Marrow and Peripheral Blood Expression of ID1 in Human Gastric Carcinoma Patients Is a Bona Fide Indicator of Lymph Node and Peritoneal Metastasis. *Br J Cancer*, 査読有, VOL. 100, 2009, 1937-1942, DOI: [10.1038/sj.bjc.660508](https://doi.org/10.1038/sj.bjc.660508)

[学会発表] (計 12 件)

- ① 中西速夫、HER2 陽性胃癌細胞の Trastuzumab 耐性株における p95HER2 および MUC4 の発現、第 84 回 日本胃癌学会総会、2012. 2. 9、大阪国際会議場 (大阪)
- ② 中西速夫、Molecular optical imaging of peritoneal metastasis of gastric cancer using near-infrared (NIR)-labeled antibody、第 70 回日本癌学会

学術総会、2011. 10. 4、名古屋国際会議場 (名古屋)

- ③ 中西速夫、蛍光標識抗体を用いた胃癌腹膜転移の光イメージング、第 100 回日本病理学会総会、2011. 04. 30、パシフィコ横浜 (横浜)
- ④ Nakanishi H, Molecular aspect of peritoneal metastasis; A new diagnostic and therapeutic strategy in gastric cancer. 第 9 回国際胃癌学会 (IGCC2011), 2011. 4. 22, Coex Convention Center (ソウル)
- ⑤ 中西速夫、Molecular targeting and imaging of gastric cancer metastasis, BIT's 3rd International Congress of Antibodies-2011 (ICA-2011), 2011. 3. 24, 中国国立会議場 (北京)
- ⑥ 中西速夫、HER2 過剰発現胃癌細胞に対するの分子標的治療の検討、第 83 回日本胃癌学会総会、2011. 3. 5、青森屋 (青森)
- ⑦ 中西速夫、HER2 遺伝子増幅胃癌に対する Trastuzumab と Lapatinib の抗腫瘍効果の差異とその分子機構の解析、第 69 回日本癌学会学術総会、2010. 9. 23、大阪国際会議場 (大阪)
- ⑧ 中西速夫、がん幹細胞様形質を示す口腔扁平上皮癌細胞株の Gefitinib 感受性とその機構、第 19 回日本がん転移学会、2010. 6. 16、金沢市文化ホール (金沢)
- ⑨ 中西速夫、がん幹細胞様形質を示す大腸がん低分化型腺癌細胞株の gefitinib 高感受性、第 99 回日本病理学会総会、2010. 4. 28、京王プラザホテル (東京)
- ⑩ 中西速夫、HER3 の著明な発現低下を認める低分化型大腸癌細胞株の Gefitinib 感受性機構の解析、第 18 回日本が

ん転移学会学術集会・総会、2009. 7. 23、  
旭川グランドホテル (旭川)

- ⑪ 中西 速夫、HER3 低発現低分化型大腸癌細胞の Gefitinib, Cetuximab 感受性機構の解析、第 98 回日本病理学会総会、2009. 5. 2、京都国際会館 (京都)
- ⑫ Nakanishi H、High gefitinib sensitivity of EGFR overexpressing, HER3-deficient and metastatic poorly-differentiated new human colonic cancer cell line、AACR 100th Annual Meeting、2009. 4. 19、コロラドコンベンションセンター (米国、デンバー)

[図書] (計 2 件)

- ① Nakanishi H, Ito S, Matsui M, Murakami H, Kodera Y. “In Vivo Imaging” Methods and Protocols, Hoffman, R. M. (ed.), Non invasive and real-time fluorescence imaging of peritoneal metastasis in nude mice. Humana Press, Totowa, NJ, 2011, in press.
- ② 中西速夫 病理診断医になじみのある疾患関連分子 “VEGF (vascular endothelial growth factor) family 解説編・診断編” 病理診断に役立つ分子生物学、病理と臨床 臨時増刊号 Vol.29、461-466、2011

## 6. 研究組織

- (1) 研究代表者: 中西速夫 (NAKANISHI HAYAO)  
愛知県がんセンター (研究所) 腫瘍病理学部・室長

研究者番号 : 20207830