

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 25 年 5 月 28 日現在

機関番号：32610

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22590366

研究課題名（和文） VEGF-VEGFR シグナリングをターゲットにした肺癌・悪性中皮腫治療法の開発

研究課題名（英文） Therapeutic approach to lung cancer and malignant mesothelioma by inhibition of VEGF-VEGFR pathway

研究代表者

下山田 博明 (SHIMOYAMADA HIROAKI)

杏林大学・医学部・助教

研究者番号：60381472

研究成果の概要（和文）：肺癌では、VEGF-Aの発現機序にその転写因子であるEgr-1 (early growth response-1) が強く関与しており、また、Egr-1のcorepressorであるNAB2がEgr-1の発現制御に関係していることを明らかにした(Shimoyamada H. et al. Am J Pathol 2010, 177:70-83)。このことにより、NAB2を応用した、Egr-1やVEGF-Aの発現を抑制する肺癌治療法の可能性を見出した。

研究成果の概要（英文）：In summary, we have demonstrated that Early Growth Response Protein (Egr)-1 up-regulates the expression of VEGF-A in lung cancer cells by binding at specific sites in the VEGF-A promoter and that NAB2, a Egr-1 corepressor, probably form a negative feedback system for the Egr-1-VEGF-A expression. Egr-1 and NAB-2 may be useful as novel pharmaceutical targets in lung cancers.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：血管内皮増殖因子、Egr-1、肺癌

1. 研究開始当初の背景

肺癌は、悪性新生物のなかで日本人の死因の第一位であり、また胸膜に発生する悪性中皮腫も大きな社会的問題になってきており、それらの治療法の確立が急務の課題となっている。近年、癌の増大能力や血行性・リンパ行性転移能力にはVEGF-familyが深く関与していることが明らかになってきており、特に、血管内皮増殖因子 A (VEGF-A) の発現は肺

癌の予後予測因子となり、肺腺癌が非浸潤癌から浸潤癌となる段階でVEGF-AのmRNAの発現が亢進していることや、複数のヒト肺癌培養細胞株間でVEGF-Aの発現に有意差があることが示されている。現在、VEGF-Aと構造的に相同性を有する分子としてVEGF-CやVEGF-Dが同定され、特に癌におけるリンパ行性転移に関与する因子として注目されている。

申請者らは、これまで VEGF-A の発現と肺癌の進展メカニズムとの関連について研究を行ってきており、VEGF-A を高度に発現している肺癌は胸膜播種や血性胸水を起こしやすいことをマウスによる肺癌胸膜播種モデルで証明した。また、これまで VEGF-A 誘導因子としては低酸素下で発現が亢進する Hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α が注目されてきたが、肺では酸素濃度がもともと高いため HIF-1 α が発現しにくく、肺癌における VEGF-A の発現には違う発現機序があると考えた。

2. 研究の目的

肺癌においては、リンパ節転移、胸膜播種、遠隔転移がその治療を困難にしており、また悪性中皮腫においては悪性胸水と漿膜（胸膜や心嚢膜、腹膜）に沿った広範な進展が治療を困難にしている。本研究では、肺癌の悪性胸水や胸膜播種の形成に深く関与している VEGFs の発現機序を解明していき、次に、これまでに構築してきたマウスによる「肺癌胸膜播種モデル」に加え、「肺癌進展モデル」を作製し、血管内皮増殖因子群（Vascular Endothelial Growth Factors, VEGFs）が肺癌および悪性中皮腫の進展にどのように関与しているかを解明していき、そして、VEGFs の作用を拮抗する可溶性 VEGF receptor を用いた制癌療法の効果について、検討していくことを目的とする。

3. 研究の方法

(1) Egr-1 発現により誘導される下流分子の解明と VEGF-A の発現機序への関与
我々の研究室では肺癌培養細胞に k-ras mutation を導入することにより発現が変化する遺伝子を Gene Chip assay により網羅的に解析していた。その結果 Early Growth Response Protein (Egr)-1 と VEGF-A の発現が亢進していることが判明し、解析を進めた。

(2) Lewis LC 細胞を用いた「マウス肺癌進展モデル」の構築
C57/BL6 マウスに由来する肺癌細胞 (Lewis LC) を使用した「肺癌進展モデル」を作成する。具体的には各 mVEGFs を選択的に高発現させた Lewis を種々の細胞数に PBS で希釈した後、C57/BL6 マウスの尾静脈に接種し、胸水貯留の有無、体重減少、呼吸困難等の症状

に注意しながら一定期間飼育する。次に呼吸困難等の症状が現れたマウスを解剖し、胸水の性状、肺内腫瘍や胸膜播種形成の病理組織像と VEGFs 発現の関係等を検証する。また、上記の肺腫瘍、胸膜播種の一部を凍結サンプルとし、RNA を抽出し、mVEGFs、mVEGFRs の発現状態も合わせて検証する。

(3) mVEGFs 発現ベクターの構築と強制発現 Lewis LC 細胞株の作製

マウス肺組織より抽出した RNA より、mVEGF-A, -C, -D の全長 cDNA をクローニングし、発現ベクターに組み込んで mVEGFs 発現ベクターを構築する。これを Lewis LC 細胞に導入し、安定発現株を得る。

(4) VEGF 受容体の細胞外可溶性ドメイン領域 (sol-mVEGFRs, sol-hVEGFRs) 発現ベクターの作成

マウスおよびヒト肺組織より抽出した RNA より、m, hVEGFR-1, -2, -3 の全長 cDNA をクローニングし、細胞外可溶性ドメインのみをコードする cDNA に His タグ配列を付加したものを作製して発現ベクターに組み込み、宿主大腸菌株に transformation する。次に宿主大腸菌株を大量培養し、アフィニティーカラムで蛋白を回収、精製し、Anti-His 抗体や抗 VEGFRs 抗体を用いて、精製タンパク質を Western blotting により確認する。また、各 m, hVEGFR-1, -2, -3 の cDNA を組み込んだレトロウイルスベクターも作製する。

(5) Sol-VEGFRs の *in vitro* での効果検証

HUVEC やマウス血管内皮細胞、ならびに各肺癌培養細胞株に種々の条件で sol-hVEGFRs や sol-mVEGFRs を添加し、それぞれの培養細胞における増殖、生存促進抑制効果の有無について検証する。具体的には培養細胞の増殖能を MTT 法により、血管内皮の管腔形成能を ECMatrix-血管新生アッセイ kit 等により検討する。また、各 hVEGFs transfectants の培養液を使って内皮細胞を培養することにより増殖能や管腔形成能の変化を検討し、また sol-hVEGFRs や sol-mVEGFRs を添加することによる各 VEGFs 作用の抑制の有無について検討する。

(6) Lewis LC 細胞を用いた「肺癌進展モデル」における sol-mVEGFRs の治療効果の検証 上記肺癌進展モデルおよび胸膜播種モデル

において、肺内腫瘍が致死的になる前に(3)で作製した各 sol-mVEGFRs を発現するレトロウイルスベクターを一定量 C57/BL6 マウスに胸腔内、腹腔内、あるいは尾静脈内に接種する。この実験により、肺内腫瘍や胸膜播種に対する sol-mVEGFRs の治療効果を検証する。(1)と同様に詳細な病理組織学的検証や RNA レベルや蛋白レベルの mVEGFs と mVEGFRs の発現解析を行う。

4. 研究成果

(1) Egr-1 と VEGF-A の発現の関係について Egr-1 の強制発現による活性化される遺伝子を同定するため、肺癌培養細胞に tet-on system により Egr-1 の発現を調節できるレトロウイルスベクターを構築し、このベクターを用いて肺癌細胞に Egr-1 を発現させることに成功した。肺癌培養細胞に Egr-1 の発現誘導後 12 時間で RNA を抽出し、このサンプルを用いて発現亢進した遺伝子を Gene Chip 法により網羅的に解析した。その結果、Egr-1 の corepressor である NAB2 と VEGF-A の発現が亢進していることが明らかになった。

(2) VEGF-A のプロモーターアッセイ VEGF-A プロモーターの下流域には Egr-1 の結合可能領域である GC-rich の motif が多数存在していることが明らかになった。それぞれの結合可能部位について mutation を導入したプロモーター解析やクロマチン免疫沈降法、ならびにゲルシフトアッセイを行った結果、VEGF-A の発現に Egr-1 が直接関与していることが明らかになった。

(3) ヒト肺癌における Egr-1、NAB2、VEGF-A の発現

ヒト肺癌組織における Egr-1、NAB2、VEGF-A の発現を免疫染色により解析した。肺腺癌において Egr-1 の発現は分化度が低下するに従って亢進し、合わせて VEGF-A の発現も亢進することが明らかになり、また、分化度が低下するに従って NAB2 の発現が低下することが明らかになった。このことはすなわち、肺癌の凶暴性が増悪する「分化度低下」に Egr-1 → VEGF-A の発現亢進が関与し、それには Egr-1 の抑制因子である NAB2 の発現低下が関与している可能性を示している。

(4) マウス肺癌胸膜播種モデルを用いた肺癌胸膜播種と VEGFs の関係

本研究では C57/BL6 マウスに由来する肺癌細胞 (Lewis LC) に加えて同系マウスの肺腺癌細胞 CMT6461 を使用した「肺癌進展モデル」を作成した。CMT6461 は Lewis に比べて、遺伝子導入による各 mVEGFs の発現効率が高く、形態的にも腺癌に近く、病理組織学的に評価しやすい。選択的に mVEGFs を高発現させた一定量の CMT6461 を PBS で希釈した後、ヌードマウスの尾静脈に接種し、胸水貯留の有無、体重減少、呼吸困難等の症状に注意しながら一定期間飼育した後、安楽死させ解剖し、胸水の性状、肺内腫瘍や胸膜播種形成の病理組織像と VEGFs 発現の関係等を検証した。VEGF-C や VEGF-D を発現させた肺腫瘍では胸膜付近のリンパ管侵襲傾向が強くと、腺管傾向に乏しい低分化型腺癌の成分の混在が多い傾向にあることが明らかになり、これらの VEGFs は脈管侵襲や胸膜播種のみならず、肺癌の分化傾向に影響を及ぼす可能性が考えられる。

本研究により、Early Growth Response Protein (Egr)-1 が独立した VEGF-A 誘導因子であることが明らかになった。Egr-1 は種々の増殖因子やサイトカインにより誘導される転写因子であることから、この研究結果は、癌細胞が低酸素状態におかれなくともたやすく VEGF-A を発現できることを裏付けているものであり、VEGF-A が癌の進展において重要な役割を演じていることを示唆している。また、マウス肺癌胸膜播種モデルでは、VEGF 受容体の可溶性ドメインと NAB2 の抗腫瘍効果についても検証を進めている。VEGF 受容体の可溶性ドメインや NAB2 の肺癌での強制発現は、in vivo で抗 VEGFs 作用や VEGFs の発現抑制が期待され、腫瘍増殖抑制に繋がると考えられる。この研究を進めることにより新たな肺癌治療薬の開発に貢献できる。

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 9 件)

(1) Sakata R, Shimoyamada H, Yanagisawa M, Murakami T, Makiyama K, Nakaigawa N, Inayama Y, Ohashi K, Nagashima Y, Yao M, Kubota Y. Nonfunctioning juxtaglomerular cell tumor. Case Rep Pathol. 2013;973865

(2) Ishii J, Sato H, Sakaeda M,

- Shishido-Hara Y, Hiramatsu C, Kamma H, Shimoyamada H, Fujiwara M, Endo T, Aoki I, Yazawa T. POU domain transcription factor BRN2 is crucial for expression of ASCL1, ND1 and neuroendocrine marker molecules and cell growth in small cell lung cancer. Pathol Int. 2013;63(3):158-68.
- (3) Sakaeda M, Sato H, Ishii J, Miyata C, Kamma H, Shishido-Hara Y, Shimoyamada H, Fujiwara M, Endo T, Tanaka R, Kondo H, Goya T, Aoki I, Yazawa T. Neural lineage-specific homeoprotein BRN2 is directly involved in TTF1 expression in small-cell lung cancer. Lab Invest. 2013;93(4):408-21.
- (4) Yodonawa S, Ogawa I, Yoshida S, Ito H, Kato A, Kubokawa R, Tokoshima E, Shimoyamada H. Gastric metastasis from a primary renal leiomyosarcoma. Case Rep Gastroenterol. 2012;6(2):314-8.
- (5) Kashiwagi K, Ishii J, Sakaeda M, Arimasu Y, Shimoyamada H, Sato H, Miyata C, Kamma H, Aoki I, Yazawa T. Differences of molecular expression mechanisms among neural cell adhesion molecule 1, synaptophysin, and chromogranin A in lung cancer cells. Pathol Int. 2012 ;62(4):232-45.
- (6) Sato H, Sakaeda M, Ishii J, Kashiwagi K, Shimoyamada H, Okudela K, Tajiri M, Ohmori T, Ogura T, Woo T, Masuda M, Hirata K, Kitamura H, Yazawa T. Insulin-like growth factor binding protein-4 gene silencing in lung adenocarcinomas. Pathol Int. 2011; 61(1):19-27.
- (7) Okudela K, Woo T, Mitsui H, Yazawa T, Shimoyamada H, Tajiri M, Ogawa N, Masuda M, Kitamura H. Proposal of an improved histological sub-typing system for lung adenocarcinoma - significant prognostic values for stage I disease. Int J Clin Exp Pathol. 2010. 25;3(4):348-66.
- (8) Shimoyamada H, Yazawa T, Sato H, Okudela K, Ishii J, Sakaeda M, Kashiwagi K, Suzuki T, Mitsui H, Woo T, Tajiri M, Ohmori T, Ogura T, Masuda M, Oshiro H, Kitamura H. Early growth response-1 induces and enhances vascular endothelial growth factor-A expression in lung cancer cells. Am J Pathol. 2010 ;177(1):70-83.
- (9) Okudela K, Woo T, Mitsui H, Yazawa T, Shimoyamada H, Tajiri M, Ogawa N, Masuda M, Kitamura H. Morphometric profiling of lung cancers-its association with clinicopathologic, biologic, and molecular genetic features. Am J Surg Pathol. 2010;34(2):243-55.
- [学会発表] (計1件)
- (1) 下山田博明. 甲状腺癌においてTTF-1により発現変化する遺伝子の網羅的解析。第101回日本病理学会総会。2012年4月。東京
- [図書] (計1件)
- (1) 下山田博明. メジカルビュー社、臨床画像No.9、2012年、1024-1033
- [産業財産権]
- 出願状況 (計0件)
- 名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：
- 取得状況 (計0件)
- 名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：
- [その他]
ホームページ等

杏林大学医学部病理学教室
<http://www.kyorin-u.ac.jp/univ/faculty/medicine/education/labo/pathology/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

下山田 博明 (SHIMOYAMADA HIROAKI)
杏林大学・医学部・助教
研究者番号：60381472

(2) 研究分担者

矢澤 卓也 (YAZAWA TAKUYA)
杏林大学・医学部・准教授
研究者番号：50251054

奥寺 康司 (OKUDELA KOJI)
横浜市立大学・医学部・助教
研究者番号：10326027
(H23→H24：研究協力者)

(3) 連携研究者

なし

研究者番号：