

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5月30日現在

機関番号：13802

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22791270

研究課題名（和文）

消化器癌における抗血管新生療法に対する耐性機構の解明

研究課題名（英文）

Mechanisms of resistance to antiangiogenic therapy in gastrointestinal cancers.

研究代表者

菊池 寛利 (KIKUCHI HIROTOSHI)

浜松医科大学・医学部・特任助教

研究者番号：70397389

研究成果の概要（和文）：

ヒト大腸癌固形腫瘍 TK4 を同所（盲腸壁）へ移植し、抗 vascular endothelial growth factor (VEGF) 中和抗体治療を行ったところ、腫瘍血管密度が低下し移植腫瘍が縮小したが、完全には増殖阻害されなかった。そこで同治療中の移植腫瘍（ヒト組織）における遺伝子発現変動をマイクロアレイ (human chip) にて解析した。抗 VEGF 抗体治療により移植腫瘍で発現が亢進した 97 遺伝子のうち、最も発現変化が大きかった stanniocalcin 2 (STC2) に注目。STC2 は hypoxia inducible factor -1 (HIF-1) の標的遺伝子であり、低酸素環境で発現が亢進することが知られている。また、STC2 は癌の浸潤転移に関与するとされる上皮間葉移行 (epithelial mesenchymal transition: EMT) を誘導することが最近報告されている。さらに、Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) による発現解析では、EMT 誘導や癌幹細胞維持に関与する transforming growth factor ベータ (TGF β) 経路の活性化が抗 VEGF 抗体治療によって惹起されていることが確認された。これらのことから、抗 VEGF 抗体治療中の腫瘍における低酸素環境が、EMT や癌幹細胞の誘導を介して浸潤転移能を亢進させている可能性が示唆される。そこで、抗血管新生治療により生じる低酸素環境の評価を、HIF-1, HIF-2 の免疫組織化学染色により行ったところ、抗 VEGF 抗体治療群において有意に HIF-1 α タンパクの核内移行が確認された。次に大腸癌幹細胞マーカーとして CD133, CD44, ALDH1 の免疫組織化学染色による評価を行ったところ、抗 VEGF 抗体治療群で ALDH1 陽性細胞の増加がみられた。

研究成果の概要（英文）：

We transplanted solid tumors derived from human colon carcinoma into the cecum wall of nude mice and treated them with anti-VEGF antibody or normal control IgG. Despite decreased microvessel density in the tumors with anti-VEGF treatment, tumor growth was incompletely impaired. Microarray analysis revealed 97 genes that were predominantly expressed in tumors treated with anti-VEGF antibody compared with untreated tumors. Among them, we further focused on stanniocalcin 2 (STC2) which has been reported to be regulated by hypoxia inducible factor -1 (HIF-1) under hypoxic condition and to induce epithelial mesenchymal transition. Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) showed the activation of transforming growth factor β (TGF β) pathway in tumors treated with anti-VEGF antibody. These findings suggest that hypoxic conditions due to VEGF inhibition may induce EMT and stemness of transplanted tumors, resulting in enhanced invasive and metastatic potential. Immunohistochemistry of HIF-1 α and HIF-2 α revealed that HIF-1 α protein was more likely to locate in the nucleus of tumors treated with anti-VEGF antibody compared with untreated tumors. Immunohistochemistry of colon cancer stem cell markers, CD133, CD44 and ALDH1 revealed that expression levels of ALDH1 were higher in tumors treated with anti-VEGF antibody than those in tumors treated with control IgG.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野： 医歯薬学

科研費の分科・細目： 外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード： 消化器癌、抗血管新生、耐性機構

1. 研究開始当初の背景

癌はある一定以上の大きさ (1-2 mm³) になるために栄養成分および酸素を供給するための血管新生を必要とし自らこれを誘導する。この腫瘍血管新生は、癌の転移過程においても重要な役目を担っている。血管新生は血管新生促進因子および抑制因子のバランスによって規定され、促進因子として VEGF が最も良く知られている。最近癌に対する抗血管新生療法の開発が進み、大腸癌における臨床試験において抗 VEGF 抗体である Bevacizumab (Avastin®) が生命予後向上に寄与するとの結果を得て成功を収め、既に本邦でも保険適応となり臨床で用いられている。しかし既存の抗癌剤治療同様、抗血管新生療法においても耐性メカニズムの存在が次第に明らかとなるなど、同分野における研究課題は山積している。

2. 研究の目的

研究代表者はこれまでに、KRAS 変異型大腸癌細胞株移植モデルにて抗 VEGF 抗体と抗 IL-8 抗体治療を同時に行った。その際、腫瘍増殖は完全には抑制されず、血管新生も有意には抑制されていなかった。次に、両抗体治療中における遺伝子発現の変化をマイクロアレイにて解析したところ、抗体治療群で有意に発現上昇または低下している遺伝子群が得られた。本研究は、抗 VEGF 抗体治療中における、これら遺伝子発現変化を解析し、抗血管新生治療に対する耐性機構の解明を目的とする。

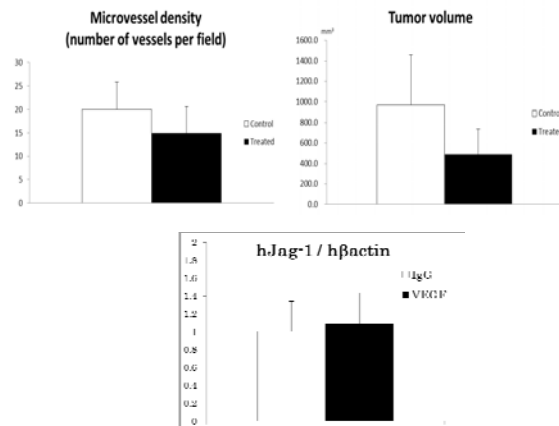
3. 研究の方法

先述したマイクロアレイ解析にて、抗血管新生治療による有意な発現亢進が確認された JAG1 に注目した。JAG1 は Notch signaling に関与し、Notch receptor の ligand である DLL4 に拮抗的に作用する。DLL4-Notch signaling は血管の成熟において重要な役割

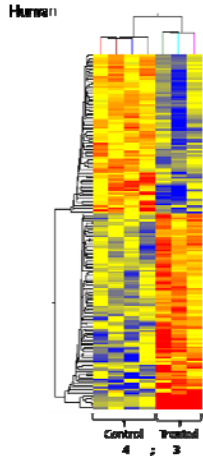
を果たしており、DLL4 と JAG1 は血管新生において反対の作用を持つ。これらのことから「抗血管新生療法中に JAG1 の発現が亢進することにより未熟な腫瘍血管の増殖が維持され、抗体治療の効果が抑制される」といった仮説を立て、同遺伝子発現の変化を、浜松医科大学外科学第二講座にてマウスの皮下で継代維持している KRAS 変異ヒト大腸癌固形腫瘍 TK4 の同所 (盲腸壁) 移植モデルにて検討した。

4. 研究成果

ヒト大腸癌固形腫瘍 TK4 をヌードマウスの同所 (盲腸壁) へ移植し、抗 VEGF 中和抗体治療を行い、腫瘍細胞および腫瘍周囲間質における Jag1 の発現を qRT-PCR にて調べた。興味深いことに抗 VEGF 治療によって血管密度および腫瘍増殖の抑制がみられたにも関わらず、Jag1 発現はほとんど変化していなかった。これは DLD1 細胞株の皮下移植モデルで得られた結果と異なる。細胞株と異なり、TK4 が分化型腺癌の組織像を保った固形腫瘍であることや、特殊な環境である皮下ではなくより臨床癌に近い同所 (盲腸壁) で発育したこと等が影響している可能性が考えられる。



そこで、TK4 の同所移植モデルにおいて、抗 VEGF 抗体治療群とコントロール群の腫瘍における遺伝子発現をマイクロアレイにて解析した。中和抗体治療 6 週間後に腫瘍を採取し RNA を抽出。腫瘍組織における遺伝子変化を Affimetrix の Human Gene 1.0 ST を用いて解析した。抗 VEGF 抗体治療により移植腫瘍で発現が亢進した 97 遺伝子のうち、最も発現変化が大きかった stanniocalcin 2 (STC2) に注目した。STC2 は hypoxia inducible factor -1 (HIF-1) の標的遺伝子であり (*Exp Cell Res.* 314(8): 1823-30, 2008)、低酸素環境で発現が亢進することが知られている。また、STC2 は癌の浸潤転移に関与するとされる上皮間葉移行(epithelial mesenchymal transition: EMT)を誘導することが最近報告されている (*Exp Cell Res.* 316(20):3425-34, 2010)。STC2 の他、抗 VEGF 抗体治療により発現が亢進した遺伝子として、複数の heat shock protein (HSP) が同定された、このうちの数種類は幹細胞の維持に関与していることが報告されている (*Bioessays.* 31(4):370-7, 2009)。さらに、Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) による発現解析では、EMT 誘導や癌幹細胞維持に関与する TGF β 経路の活性化が抗 VEGF 抗体治療によって惹起されていることが確認された。これらのことから、抗 VEGF 抗体治療中の腫瘍における低酸素環境が、EMT や癌幹細胞の誘導を介して浸潤転移能を亢進させている可能性が示唆される。そこで、抗血管新生治療により生じる低酸素環境の評価を、HIF-1, HIF-2 の免疫組織化学染色により行ったところ、抗 VEGF 抗体治療群において有意に HIF-1 α タンパクの核内移行が確認された。次に大腸癌幹細胞マーカーとして CD133, CD44, ALDH1 の免疫組織化学染色による評価を行ったところ、抗 VEGF 抗体治療群で ALDH1 陽性細胞の増加がみられた。この他、抗 VEGF 抗体治療により EMT が惹起されているか検討すべく、TK4 同所移植腫瘍における EMT マーカー (E-cadherin, N-cadherin, vimentin) の免疫組織化学染色を行ったが、TK4 腫瘍の染色性の問題から十分な評価に至っていない。また、HSP の発現変化を qPCR 等にて評価したが、抗血管新生治療に伴う有意な変化は確認できなかった。現在、大腸癌細胞株を用いた *in vitro* 実験にて、低酸素環境下における STC2 の機能を解析中である。また今後、TK4



同所移植モデルを用いた *in vivo* 実験にて、抗血管新生治療による大腸癌転移能の変化を解析する予定である。

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 7 件)

1. Duerr EM, Mizukami Y, Moriichi K, Gala M, Jo WS, Kikuchi H, Xavier RJ, Chung DC: Oncogenic KRAS regulates BMP4 expression in colon cancer cell lines. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 302: G1223-30, 2012
2. Kawabata T*, Kikuchi H* (*contributed equally), Okazaki S, Yamamoto M, Hiramatsu Y, Yang J, Baba M, Ohta M, Kamiya K, Tanaka T, Konno H: Near-infrared multichannel Raman spectroscopy with a 1064 nm excitation wavelength for ex vivo diagnosis of gastric cancer. *J Surg Res* 169: 137-43, 2011.
3. Kikuchi H, Setoguchi T, Miyazaki S, Yamamoto M, Ohta M, Kamiya K, Sakaguchi T, Konno H: Surgical intervention for imatinib and sunitinib-resistant gastrointestinal stromal tumors. *Int J Clin Oncol* 16: 741-5, 2011.
4. Setoguchi T, Kikuchi H, Yamamoto M, Baba M, Ohta M, Kamiya K, Tanaka T, Baba S, Goto-Inoue N, Setou M, Sasaki T, Mori H, Sugimura H, Konno H: Microarray analysis identifies versican and CD9 as potent prognostic markers in gastric gastrointestinal stromal tumors. *Cancer Sci* 102: 883-9, 2011.
5. Zeng M, Kikuchi H, Pino MS, Chung DC: Hypoxia activates the K-ras proto-oncogene to stimulate angiogenesis and inhibit apoptosis in colon cancer cells. *PLoS One* 5: e10966, 2010.
6. Pino MS, Kikuchi H, Zeng M, Herraiz MT, Sperduti I, Berger D, Park DY, Iafrate AJ, Zukerberg LR, Chung DC: Epithelial to mesenchymal transition is impaired in colon cancer cells with microsatellite instability. *Gastroenterology* 138: 1406-17, 2010.
7. 菊池寛利、今野弘之: 遺伝子型による大腸癌浸潤転移機構の相違と治療の個別化. *消化器内科* 53: 632-8, 2011.

[学会発表] (計 21 件)

1. 菊池寛利、瀬戸口智彦、宮崎真一郎、飯野一郎太、藤田剛、高橋善明、平松良浩、馬場恵、太田学、神谷欣志、坂口孝宣、中村利夫、今野弘之. GIST 治療個別化へ向けたバイオマーカーの探索. 第 112 回日本外科学会定期学術集会 2012 年 4 月 千葉県幕張市
2. Kikuchi H, Uehara T, Setoguchi T, Yamamoto M, Ohta M, Kamiya K, Baba B, Setou M, Sugimura H, Konno H. Overexpression of LPCAT1 and concomitant lipid alterations in gastric cancer. American Association for Cancer Research 103rd Annual Meeting 2012 年 4 月 Chicago IL, USA
3. 菊池寛利、瀬戸口智彦、宮崎真一郎、飯野一郎太、平松良浩、馬場恵、太田学、神谷欣志、田中達郎、今野弘之. 分子標的治療後に切除した GIST の病理組織学的遺伝子学的検討. 第 84 回日本胃癌学会総会 2012 年 2 月 大阪府大阪市
4. 菊池寛利、平松良浩、太田学、神谷欣志、坂口孝宣、中村利夫、今野弘之. 大腸癌における microsatellite instability と浸潤・転移機構. 第 22 回日本消化器癌発生学会総会 2011 年 11 月 佐賀県佐賀市
5. 菊池寛利、坂口孝宣、今野弘之. 分子標的時代における GIST 肝転移に対する治療戦略 JDDW2011 2011 年 10 月 兵庫県神戸市
6. Kikuchi H, Setoguchi T, Hiramatsu Y, Baba M, Ohta M, Kamiya K, Sakaguchi T, Konno H. Surgical intervention for metastatic liver GIST in the era of TKIs. International Surgical Week 2011 2011 年 8 月 神奈川県横浜市
7. 菊池寛利、平松良浩、太田学、神谷欣志、坂口孝宣、中村利夫、今野弘之. 大腸癌における microsatellite instability と浸潤転移機構. 第 66 回日本消化器外科学会総会 2011 年 7 月 愛知県名古屋市
8. 菊池寛利、平松良浩、太田学、神谷欣志、今野弘之. 大腸癌における KRAS を介した VEGF の低酸素誘導機構. 第 20 回日本がん転移学会学術集会・総会 2011 年 6 月 静岡県浜松市
9. 菊池寛利、太田学、神谷欣志、Daniel C. Chung、今野弘之. 大腸癌における KRAS を介した VEGF の低酸素誘導機構. 第 111 回日本外科学会定期学術集会 2011 年 5 月 誌上開催 (東日本大震災のため)
10. Kikuchi H, Kawabata T, Okazaki S, Hiramatsu Y, Baba M, Ohta M, Kamiya K, Tanaka T, Konno H. Near-infrared multichannel Raman spectroscopy with a 1064-nm excitation wavelength for ex vivo diagnosis of gastric cancer. American Association for Cancer Research 102nd Annual Meeting 2011 年 4 月 Orlando FL, USA
11. 菊池寛利、川端俊貴、宮崎真一郎、飯野一郎太、瀬戸口智彦、平松良浩、太田学、神谷欣志、馬場恵、田中達郎、今野弘之. 切除胃におけるラマン分光法を用いた胃癌診断. 第 83 回日本胃癌学会総会 2011 年 3 月 青森県三沢市
12. 菊池寛利、平松良弘、太田学、神谷欣志、今野弘之. 大腸癌における KRAS、BRAF 遺伝子変異と HIF を介した増殖制御機構. 第 21 回日本消化器癌発生学会総会 2010 年 11 月 長野県北佐久郡軽井沢町
13. 菊池寛利、太田学、神谷欣志、坂口孝宣、中村利夫、今野弘之. 遺伝子型による大腸癌増殖転移機構の相違と治療の個別化 JDDW2010 2010 年 10 月 神奈川県横浜市
14. Kikuchi H, Konno H, Chung DC. Oncogenic KRAS and BRAF differentially regulate colon tumor progression through the unique induction of HIF-1 and -2. 第 69 回日本癌学会学術総会 2010 年 9 月 大阪府大阪市
15. Kikuchi H, Setoguchi T, Hiramatsu Y, Ohta M, Kamiya K, Sakaguchi T, Konno H. Postoperative management after hepatectomy for metastatic liver GISTs based on genetic analysis. 9th International Conference of The Asian Clinical Oncology Society 2010 年 8 月 岐阜県岐阜市
16. 菊池寛利、山本真義、平松良弘、太田学、神谷欣志、坂口孝宣、中村利夫、今野弘之. 大腸癌における遺伝子変異に基づいた分子標的治療および転移抑制新規標的分子の開発. 第 65 回日本消化器外科学会総会 2010 年 7 月 山口県下関市
17. Kikuchi H, Setoguchi T, Yamamoto M, Kamiya K, Ohta M, Konno H. Effect of loss of heterozygosity of the c-kit gene on liver metastases from gastrointestinal stromal tumors. The 17th Czech-Japan Surgical Symposium 2010 年 6 月 石川県金沢市
18. 菊池寛利、瀬戸口智彦、山本真義、太田学、神谷欣志、今野弘之. 消化管間質腫瘍における転移予測因子の探索. 第 19 回日本がん転移学会学術集会・総会 2010 年 6 月 石川県金沢市
19. 菊池寛利、瀬戸口智彦、今野弘之. 遺伝

子解析に基づいた GIST 肝転移に対する
治療戦略. 第 96 回日本消化器病学会
総会 2010 年 4 月 新潟県新潟市

20. Kikuchi H, Pino MS, Zeng M, Shirasawa S, Konno H, Chung DC. Translational Regulation of Hypoxia-Inducible Factor-1 α and 2 α by Mutant Oncogenes in Colon Cancer. American Association for Cancer Research 101st Annual Meeting 2010 年 4 月 Washington DC, USA
21. 菊池寛利、太田学、神谷欣志、Daniel C. Chung、今野弘之. 大腸癌における KRAS, BRAF 遺伝子変異と HIF を介した増殖制御機構. 第 110 回日本外科学会定期学術集会 2010 年 4 月 愛知県名古屋市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

菊池 寛利 (KIUCHI HIROTOSHI)
浜松医科大学・医学部・特任助教
研究者番号：70397389

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：