

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 3 日現在

機関番号：23903
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2011～2012
課題番号：23791556
研究課題名（和文） Bevacizumab 耐性大腸癌に対する Itraconazole 併用療法の有用性
研究課題名（英文） Synergic anticancer effect of Itraconazole combination therapy on Bevacizumab-resistant cancer cell
研究代表者 原 賢康（ HARA MASAYASU ） 名古屋市立大学・大学院医学研究科・助教 研究者番号：80528860

研究成果の概要（和文）：抗真菌薬 Itraconazole に抗血管新生作用があることを明らかとした。この作用は抗 VEGF 抗体 Bevacizumab とは異なる作用機序であることを解明。それは他の血管新生因子となるサイトカインを抑制するものではなく、直接血管内皮細胞の増殖を抑えるものであった。またこの作用は近年腎癌などに使われている mTOR 阻害剤と同じ作用であること、さらに mTOR 阻害剤と比べ副作用が少ないこと、Beverizumab と併用することによって Bevacizumab 抵抗性の癌細胞に対しても血管新生を抑制、抗腫瘍効果を表すことを明らかとした。

研究成果の概要（英文）：We clarified antiangiogenetic effect of Itraconazole, one of the antifungus drugs. This effect is based on the mechanism which is quite different from that of Bevacizumab. We also clarified it is based on direct anti-proliferation effect on endothelial cells not based on other angiogenetic cytokines. Our results showed that this Itraconazole's effect is same as mTOR inhibitor, less toxicity than mTOR inhibitor and synergic effect with Bevacizumab on Bevacizumab resistant cancer cell.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,200,000	960,000	4,160,000

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

キーワード：抗血管新生、VEGF、Beverizumab 耐性

1. 研究開始当初の背景

大腸癌の進展における血管新生の役割は近年多くが解明され、癌増殖において非常に重要な意義を占めることが明らかとなった。この血管新生を阻害することが大腸癌治療に導入されるようになり、抗 VEGF 抗体 Bevacizumab (以下 Bv: 商品名 Avastin) は現在大腸癌治療の Key drug となっている。この Bv 投与によってほとんどの症例において腫瘍の縮小作用がみられる。しかしながら Bv

の継続使用に伴いその抗腫瘍効果には限りが出てくることもほとんどの症例で見られる。これらには血管新生において VEGF 以外のサイトカインにも血管新生作用を有しているものがありこれらの副経路が VEGF をブロックすることで発達化することが考えられる。これらの Bv 抵抗性が大腸癌治療の支障となっている。

2. 研究の目的

抗真菌薬 Itraconazole は血痰を伴う肺真菌症患者に投与時血痰を減少させる作用があるとのことから抗血管新生作用がある可能性が以前より指摘されていた。その作用機序には VEGF が介していない可能性があり、他の血管新生作用を有するサイトカインの関与が考えられる。この抗血管新生作用を解明することで Bv 抵抗性の機序を打破する一助となりえないかを検討する。

3. 研究の方法

(1) Itraconazole の腫瘍細胞、CAF、血管内皮細胞における増殖抑制効果を検討するために 96well plate に均等に播いたうえで特定の濃度に調整した Itraconazole ($0, 10^{-7}, 10^{-6}, 10^{-5}, 10^{-4}M$) を投与、WTT assay にて細胞数を測定し増殖抑制を評価する。

(2) CAF の確立

ヒト手術検体で大腸癌周辺の繊維芽細胞をシャーレ内にて培養、vimentin, α SMA 染色を用いて CAF であることを確認する。

(3) Multicytokine assay

CAF からの血管新生にかかわるサイトカインの分泌量の変化を評価するために Proteome Profiler Array (R&D) を用いて Itraconazole 投与或いは非投与の CAF からのサイトカイン分泌量を ELISA にて比較した。

これによって VEGF, VEGF-c, Vasohibin, PIGF, PDGFuPA, MCP, IL-1 β 等の分泌が比較できる。

(4) *in vivo* assay

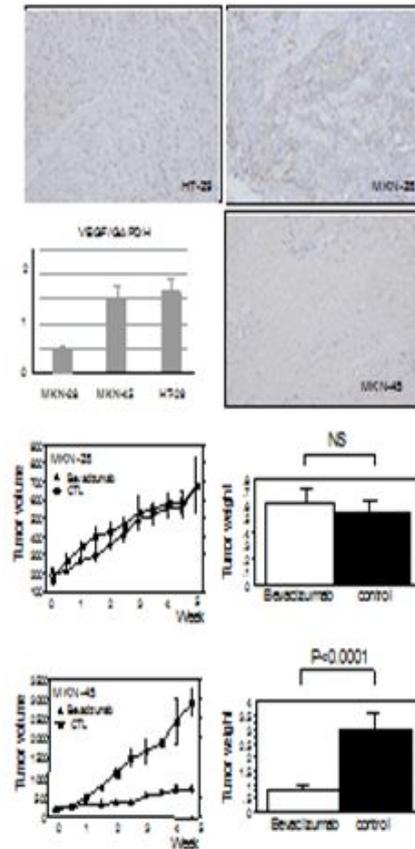
ヌードマウス鼠径部皮下に細胞を移植、8mm 径に成長した段階で Bv、Itraconazole、Bv+Itraconazole を腹腔内へ投与し腫瘍増大を測定、抗腫瘍効果を比較検討する。さらに摘出腫瘍を顕微鏡 100 倍率にて観察、血管密度の多い部位での血管密度を測定し Bv、Itraconazole、さらには併用療法での血管新生抑制を計測する。

またこれら治療法の副作用の評価としてそれぞれの群のマウスの体重を測定、比較する。

4. 研究成果

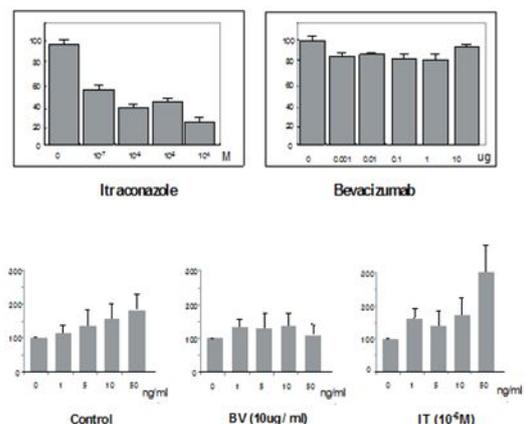
種々の癌細胞 (MKN-28, MKN-45 : いずれも胃癌, HT-29 : 大腸癌) の VEGF 発現量を免疫染色、RT-PCR を用いて評価、その結果低 VEGF 発現株 (MKN-28) , 中等度 VEGF 発現株 (MKN-45) 、高 VEGF 発現株 (HT-29) と分類した。これらにおいてヌードマウス移植腫瘍に Bv を投与、その抗腫瘍効果を確認したところ MKN-28 ではまったく抗腫瘍効果が得られないこと、MKN-45 では Bv の効果が見られることが明らかとなった。

(別図 1)

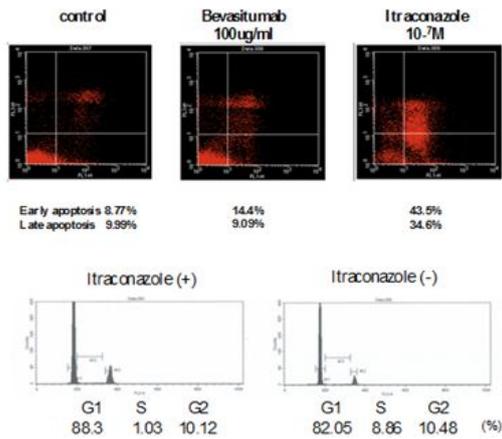


また手術時摘出した大腸組織から腫瘍周辺に存在する fibroblast を分離培養することに成功、vimentin 染色からこれらが Cancer Associated Fibroblast (CAF) であることを確認した。

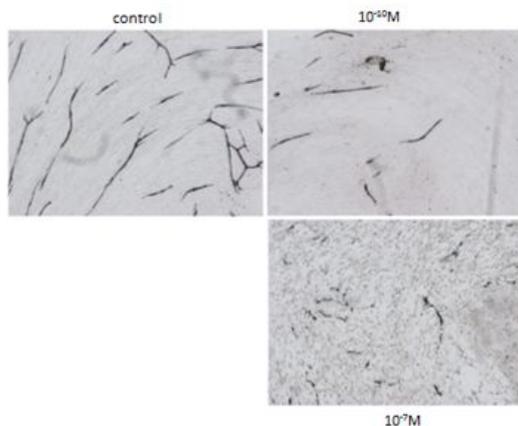
次に Itraconazole の血管内皮細胞、癌細胞 CAF の増殖への影響を見るために WTT assay を施行、Itraconazole が癌細胞増殖にはまったく影響せず、血管内皮細胞 ($10^{-7}M$)、CAF ($10^{-6}M$) の増殖を抑えることを明らかとした。(別図 2)



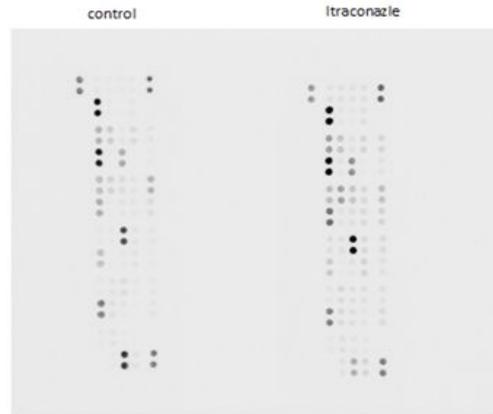
Itraconazole の血管内皮細胞における増殖抑制が起こる機序を見るため FACS で Annexin assay にて apoptosis の関与を、cycle test にて細胞周期の変化を確認したところ、Itraconazole による血管内皮細胞の増殖抑制は Apoptosis によるものであると判明した。これに対して Bv 投与した血管内皮細胞においては apoptosis も細胞周期の変化も見られず Itraconazole の血管新生抑制作用が Bv の欠陥新生抑制作用と異なることが明らかとなった。(別図 3)



次に血管新生 kit を用いて血管新生を確認したが低濃度 Itraconazole (10⁻¹⁰M) によって血管内皮細胞の分枝、管腔形成が抑えられることが明らかとなったほか、高濃度 Itraconazole (10⁻⁷M) では血管内皮細胞自体の増殖、fibroblast の増殖が抑えられ Itraconazole は血管新生に必要な増殖、管腔形成をいずれも抑えることがわかった。(別図 4)



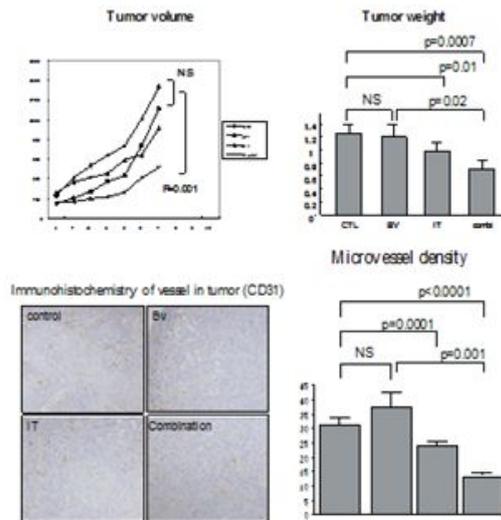
Itraconazole の CAF から放出される種々のサイトカイン分泌量への影響を検討するため Proteome Profiler Array (R&D) を用いて Itraconazole 投与或いは非投与の CAF からのサイトカイン分泌量を ELISA にて比較した。これによって VEGF, VEGF-c, Vasohibin, PIGF, PDGFuPA, MCP, IL-1 β 等の分泌が比較できるのだが最終的に Itraconazole によって CAF からのサイトカイン分泌は変化しないということが明らかとなった。(別図 5)



Itraconazole の、血管内皮細胞への影響を再度確認するために増殖に必要な signal を western blot にて確認した。その結果 Rab11 の減衰が認められた。

先に明らかにしていた中等度 Bv 抵抗性株である HT-29 と Bv 高度抵抗性株である MKN-28 に対して Bv 単独投与、Itraconazole 単独投与、Bv, Itraconazole 併用投与による抗腫瘍効果を、ヌードマウス移植癌細胞を用いて検討した。その結果、Itraconazole 単剤での抗腫瘍効果は乏しいが、Bv と併用することによって抗腫瘍効果を増強することが明らかとなり、これらは Bv 単剤、Itraconazole 単剤では効果の得られなかった MKN-28 でも Itraconazole 併用によって抗腫瘍効果が増強した。

さらに摘出腫瘍における血管密度を調べたところ Bv, Itraconazole 併用によって優位に血管密度が減少したことから Itraconazole は Bv とは異なる作用機序で血管増殖を抑制することで抗腫瘍効果をきたしたと結論付けた。こちらのいずれの群においてもマウスの著明な体重減少は認めず下痢等 Itraconazole による重度の副作用は認めなかった。(別図 6)



以上より、Itraconazole に認める血管新生阻害作用は VEGF を介する従来のものとは異なること、しかしながら他のサイトカインの関与するものではなく、直接血管内皮細胞の増殖を阻害するものであることが明らかとなった。

この作用は単独では抗腫瘍効果は乏しいものの、Bv と併用することで Bv 抵抗性の腫瘍に対しても抗血管新生阻害作用を現すことができることが明らかとなった。臨床にて Bv 長期投与後にみられる、Bv 耐性獲得後の治療法としての Itraconazole 併用療法が有用となる可能性が示唆された。

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 8 件)

- ①Takayama S, Hara M, Sato M, Takeyama H. Hybrid natural orifice transluminal endoscopic surgery for ileocecal resection. *World J Gastrointest Surg*, 4, 41-44, 2012
doi: 10.4240/wjgs.v4.i2.41
- ②Hara M, Sato M, Takayama S, Imafuji H, Ogawa R, Takeyama H. Laparoscopic intersphincteric resection with a SILS port for very low rectal cancer: a case report. *Surg Laparosc Endosc Percutan Tech*, 22, e138-141, 2012
doi: 10.1097/SLE.0b013e318248b446
- ③Hara M, Takayama S, Arakawa A, Sato M, Nagasaki T, Takeyama H. Transvaginal resection of a rectal gastrointestinal stromal tumor. *Surg Today*, 42, 909-912, 2012
doi: 10.1007/s00595-012-0215-8

④Takahashi H, Hara M, Takayama S, Matsuo Y, Sato M, Kimura M, Takeyama H. Simple laparoscopic technique of transverse loop colostomy prolapse. *Surg Laparosc Endosc Percutan Tech*, 22, e263-264, 2012
doi: 10.1097/SLE.0b013e31825cb90b

⑤Hara M, Takayama S, Imafuji H, Sato M, Funahashi H, Takeyama H. Single-port retrieval of peritoneal foreign body using SILS port: report of a case. *Surg Laparosc Endosc Percutan Tech*, 21, e126-129, 2011
doi: 10.1097/SLE.0b013e31820df9d0

⑥Hara M, Sato M, Takahashi H, Takayama S, Takeyama H. Accuracy of monitoring serum carcinoembryonic antigen levels in postoperative stage III colorectal cancer patients is limited to only the first postoperative year. *Surg Today*, 1357-1362, 2011
doi: 10.1007/s00595-010-4519-2

⑦Hara M, Takayama S, Sato M, Imafuji H, Takahashi H, Takeyama H. Laparoscopic anterior resection for colorectal cancer without minilaparotomy using transanal bowel reversing retrieval. *Surg Laparosc Endosc Percutan Tech*, 21, 234-237, 2011
doi: 10.1097/SLE.0b013e3182297667

⑧Takayama S, Hara M, Sato M, Takeyama H. Initial experience of single-incision laparoscopic right colectomy with minimum umbilical access. *Surg Laparosc Endosc Percutan Tech*, 21, 462-463, 2011
doi: 10.1097/SLE.0b013e31823b652c

[学会発表] (計 7 件)

- ①高山 悟, 当院における早期大腸癌の治療戦略, 第 67 回日本大腸肛門病学会学術集会, 2012 年 11 月 16 日, 福岡国際会議場 (福岡県)
- ②長崎高也, 抗インターロイキン-6 レセプター抗体の抗腫瘍作用 直接作用と癌間質相互作用について—続報—, 第 71 回日本癌学会学術総会, 2012 年 9 月 19 日, ロイトン札幌 (北海道)
- ③高山 悟, 当院における集学的術後感染症対策, 第 67 回日本消化器外科学会総会, 2012 年 7 月 19 日, 富山国際会議場 (富山県)
- ④佐藤幹則, 進行・再発大腸癌に対するベバシマブ併用症例の検討, 第 67 回日本消化器外科学会総会, 2012 年 7 月 18 日, 富山国際会議場 (富山県)
- ⑤長崎高也, 抗インターロイキン 6 受容体抗体の大腸癌細胞に対する抗腫瘍効果, 第 112 回日本外科学会定期学術集会, 2012 年 4 月 14 日, 幕張メッセ (千葉県)

- ⑥佐藤幹則，効率的かつ安全ながん化学療法レジメンシステムの構築と運用，第 112 回日本外科学会定期学術集会，2012 年 4 月 12 日，幕張メッセ（千葉県）
- ⑦長崎高也，抗血管新生作用、抗腫瘍増生作用両面を介した抗インターロイキン-6 レセプター抗体の抗腫瘍作用，第 70 回日本癌学会学術総会，2011 年 10 月 3 日，名古屋国際会議場（愛知県）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

原 賢康（ HARA MASAYASU ）
名古屋市立大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号：80528860