

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390312

研究課題名(和文) 抗血管新生治療中における癌微小環境変化の解析

研究課題名(英文) Alterations of tumor microenvironment during antiangiogenic therapy in colorectal cancer

研究代表者

今野 弘之 (Konno, Hiroyuki)

浜松医科大学・医学部・教授

研究者番号：00138033

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,100,000円

研究成果の概要(和文)：血管新生促進因子VEGFに対する中和抗体ベバシズマブが大腸癌に使用されているが、同治療中における癌の悪性化や治療抵抗性、治療中断後における腫瘍の急速増大が報告されている。本研究では、主にヒト大腸癌固形腫瘍TK4を用いたヌードマウス同所移植モデルを用いて、抗VEGF抗体治療中における癌微小環境の変化が大腸癌の進展に与える影響を解析した。長期の抗VEGF抗体治療によって腫瘍内低酸素が惹起され、hypoxia inducible factor-1 (HIF-1)の標的遺伝子であるstanniocalcin 2 (STC2)の発現が上昇し、癌細胞の増殖能や遊走能が亢進することが示された。

研究成果の概要(英文)：Bevacizumab, a humanized monoclonal antibody against vascular endothelial growth factor (VEGF)-A has been used for colorectal cancer treatment. However, a number of preclinical reports indicate the development of resistance to anti-angiogenic therapy. In this study, we addressed the effects of anti-VEGF antibodies on the growth and malignant behavior of colorectal cancer cells using an orthotopic implantation model of TK-4, a solid tumor strain derived from a colon cancer patient, into nude mice. Intratumoral hypoxia induced by anti-VEGF antibody treatment resulted in induction of stanniocalcin 2 (STC2), a target gene of hypoxia inducible factor-1 (HIF-1), to enhance colon cancer cell growth and migration. Our data provide a potential molecular explanation for the limited clinical effectiveness of anti-VEGF antibodies and rebound phenomenon after withdrawal of bevacizumab.

研究分野：消化器外科学

キーワード：抗血管新生治療 大腸癌 腫瘍微小環境 低酸素 癌悪性化 治療抵抗性

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。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 vascular endothelial growth factor (VEGF) が最も良く知られている。

近年癌に対する抗血管新生療法の臨床応用が進み、大腸癌においては抗 VEGF 中和抗体のベバシズマブが保険適応であり、実臨床で用いられている。

しかし、血管新生は VEGF 以外にも複数の血管新生因子が複雑に関連しながら形成されており、VEGF のみをターゲットとした場合、他の血管新生因子からのシグナルにより escape 現象が起こることが考えられる。実際、動物実験などによって、既存の抗癌剤治療と同様に抗血管新生療法においても耐性メカニズムが存在することが次第に明らかにされてきている。さらにこの不完全な血管新生の阻害により癌微小環境の変化を生じ、これが癌の悪性化を惹起している可能性も指摘されている。

一方、ヒト組織幹細胞同様、腫瘍内で無限の自己複製能を有し増殖活性に富む細胞を生み出す、癌幹細胞の存在が知られている。癌幹細胞は正常組織幹細胞と同様に、組織中における特殊な微小環境 (ニッチ) 内で休眠状態として存在しており、増殖期の細胞を標的とする従来の抗癌剤は効きにくいとされる。そこで近年、この癌幹細胞を治療標的とした新規分子標的療法の開発が行われているが、臨床応用には至っていない。現在癌幹細胞の由来は正確には分かっていないが、癌幹細胞の維持に癌微小環境が重要であることは明白であり、癌微小環境を標的とした新規分子標的治療により、癌幹細胞の消退あるいは脆弱化が得られる可能性がある。

2. 研究の目的

抗血管新生 (抗 VEGF 中和抗体) 治療中における癌微小環境の変化が、どのように大腸癌の進展に関与しているかを解析することを目的とし、癌細胞自体ではなく癌微小環境をターゲットとした新規治療法の開発を最終目標とする。

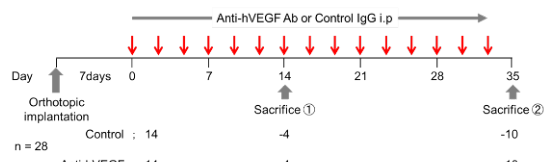
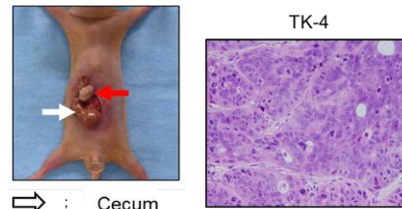
3. 研究の方法

ヒト大腸癌由来固形腫瘍 TK4 のマウス同所移植モデルによる *in vivo* 実験、大腸癌細胞株を用いた *in vitro* 実験、および臨床大腸癌検体の免疫組織化学染色を行い、抗 VEGF 抗体治療中における癌微小環境の変化に伴う、癌細胞の遺伝子発現変化や癌幹細胞の量的および質的变化等につき検討を行った。

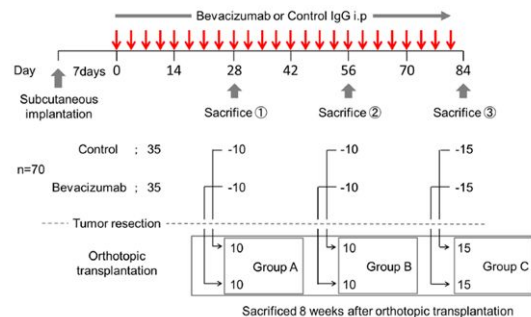
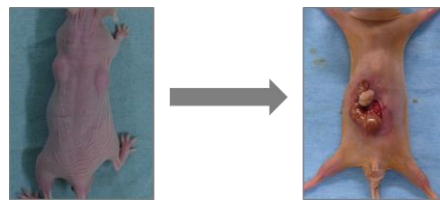
(1) 担癌マウス治療実験

TK4 をヌードマウスの盲腸壁に同所移植し、抗 VEGF 中和抗体による治療群と対照群に分け、治療開始後 14、35 日

に腫瘍を採取し、腫瘍量、微小血管密度、核分裂像、アポトーシス等を評価した。さらに両群間での腫瘍の遺伝子発現変化をマイクロアレイで解析した。



TK4 をマウスの皮下に移植し、抗体による治療群と対照群に分け、治療開始後 28、56、81 日目に腫瘍を採取して同サイズにトリミングし、異なる個体の盲腸壁に累代移植し、無治療で 56 日後に腫瘍量を評価した。



(2) 細胞実験

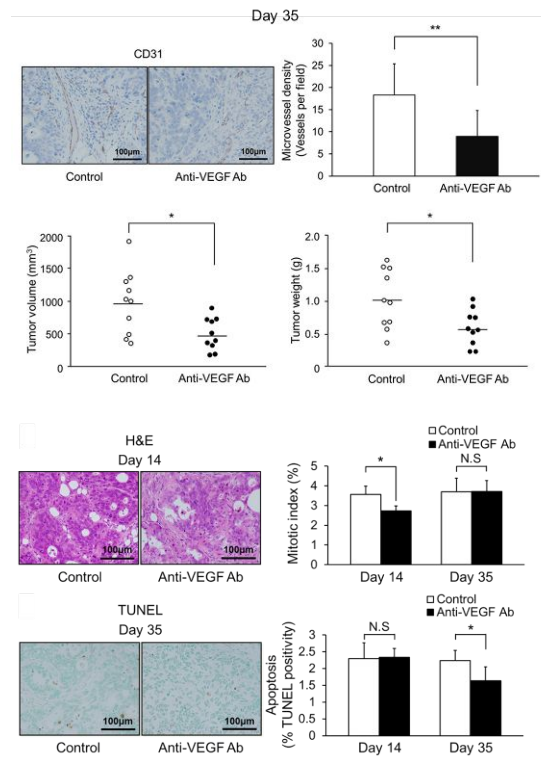
低酸素誘導因子の標的遺伝子である stanniocalcin 2 (STC2) の、大腸癌細胞における増殖、遊走への寄与を検討した。

(3) 臨床検体の検討

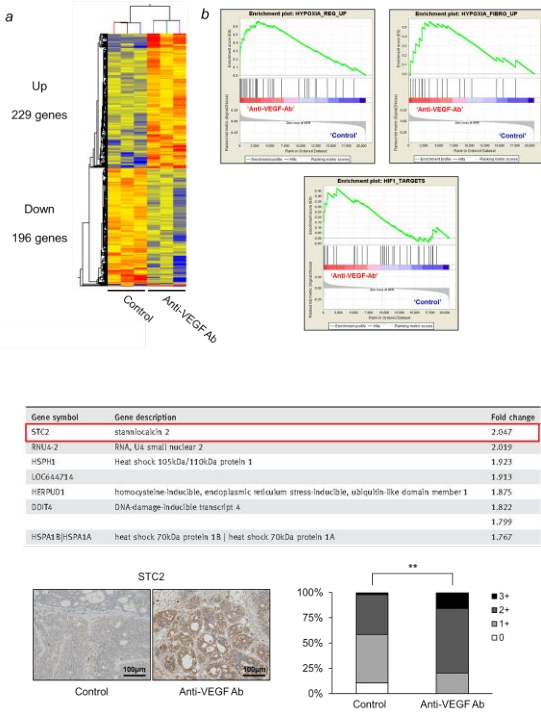
肝切除術前に化学療法が施行された、大腸癌肝転移症例における STC2 発現を免疫組織化学染色にて評価した。

4. 研究成果

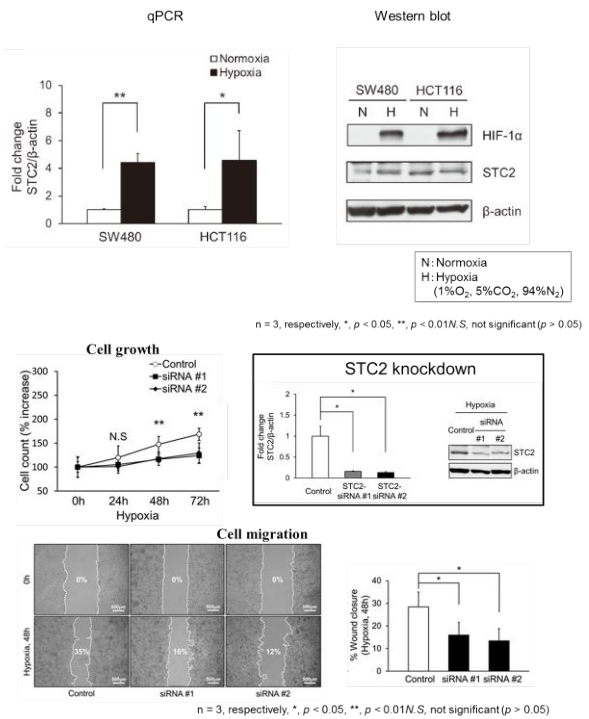
(1) TK4 をヌードマウスの盲腸壁に同所移植し、抗 VEGF 中和抗体治療を行ったところ、腫瘍量と微小血管密度は対照群に比べ治療群において有意に減少した。腫瘍の核分裂像は治療中期 (14 日) に治療群で減少したが、治療後期 (35 日) では両群に差を認めなかった。一方、アポトーシスは治療中期では差がなかったが、治療後期に治療群で減少した。



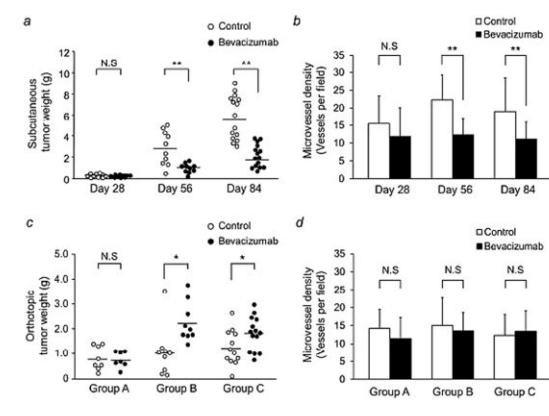
(2) 治療後期に腫瘍を採取し、遺伝子発現変化をマイクロアレイで解析した。Gene set enrichment analysis (GSEA)では、低酸素で誘導される遺伝子群が治療群において有意に発現上昇していた。治療群で最も発現が上昇した遺伝子として、hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) の標的遺伝子である stanniocalcin 2 (STC2) が抽出され、抗 VEGF 治療による大腸癌悪性度亢進への関与が示唆された。



(3) 大腸癌細胞株 HCT116, SW480 を用いて *in vitro* の検討を行ったところ、低酸素培養によって STC2 発現が上昇し、STC2 の knockdown によって低酸素下における SW480 細胞の増殖および遊走が抑制され、低酸素環境における STC2 の重要性が示された。

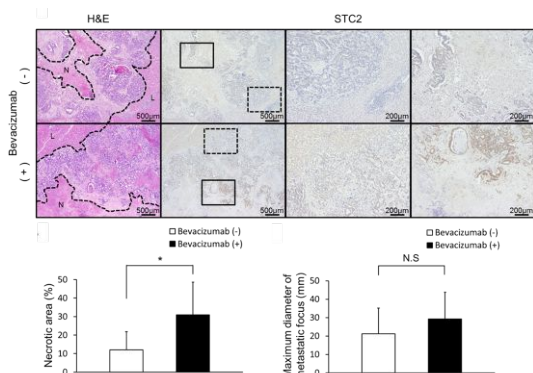


(4) 長期間に渡る抗 VEGF 抗体治療の影響を調べるため、TK4 をマウスの皮下に移植し、治療開始後 28、56、81 日目に腫瘍を採取し同大に整え、異なるマウスの盲腸壁に累代移植し、二次移植の 56 日後に腫瘍量を評価した。抗 VEGF 抗体治療を受けた皮下腫瘍は、累代移植後のマウス盲腸壁における発育 (腫瘍重量) が有意に亢進していた。長期間に渡る抗 VEGF 抗体治療による腫瘍増殖能の亢進が示唆された。

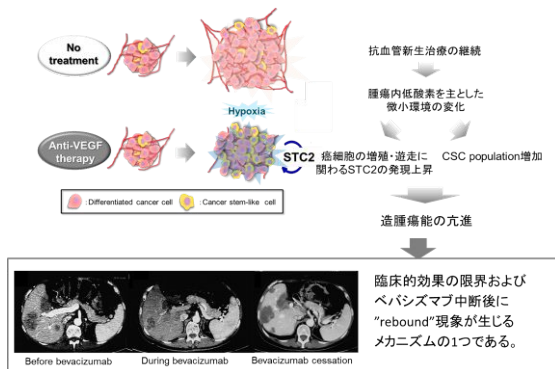


(5) 浜松医科大学第二外科において肝切除術前に化学療法が施行された、大腸癌肝転移 14 症例 (ベバシズマブ投与: 4 例、非投与: 10 例) における STC2 発現を評

価したところ、ベバシズマブ投与群で有意に腫瘍内の壊死領域が大きく、同部の周囲で STC2 発現が亢進していた。



以上の検討から、長期の抗 VEGF 抗体治療によって腫瘍内低酸素が惹起され、STC2 の発現が上昇し、癌細胞の増殖能や遊走能が亢進することが、大腸癌の悪性化や治療抵抗性、治療中断後における腫瘍の急速増大などの一因であ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 2 件)

1. Miyazaki S, Kikuchi H, Iino I, Uehara T, Setoguchi T, Fujita T, Hiramatsu Y, Ohta M, Kamiya K, Kitagawa K, Kitagawa M, Baba S, Konno H. Anti-VEGF antibody therapy induces tumor hypoxia and stanniocalcin 2 expression and potentiates growth of human colon cancer xenografts. International Journal of Cancer 査読有、135:295-307, 2014.
DOI: 10.1002/ijc.28686.
2. 菊池寛利, 今野弘之、消化器癌における血管新生の制御、最新医学、査読無、68(12):2653-8, 2013.
<http://www.saishin-igaku.co.jp/backnum/2013/m6812.html>

[学会発表](計 9 件)

1. 宮崎真一郎、長期抗 VEGF 抗体治療は大腸癌の腫瘍内低酸素および STC2 発現を引き起こし悪性形質を高める、第 73 回

日本癌学会学術総会、2014 年 9 月 25 日、パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

2. 宮崎真一郎、抗 VEGF 抗体治療による腫瘍内低酸素を介した大腸癌形質変化、第 69 回日本消化器外科学会総会、2014 年 7 月 17 日、ホテルハマツ (福島県郡山市)
3. 宮崎真一郎、抗 VEGF 抗体治療による腫瘍内低酸素および STC2 発現を介した大腸癌悪性形質獲得、第 23 回日本がん転移学会学術集会、2014 年 7 月 11 日、金沢市文化ホール (石川県金沢市)
4. 宮崎真一郎、長期抗 VEGF 抗体治療による腫瘍内低酸素を介したヒト大腸癌固形腫瘍の悪性形質獲得、第 114 回日本外科学会定期学術集会、2014 年 4 月 4 日、京都国際会議場 (京都府京都市)
5. 宮崎真一郎、抗 VEGF 抗体治療中におけるヒト大腸癌固形腫瘍形質変化の基礎的検討、第 72 回日本癌学会学術総会、2013 年 10 月 5 日、パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)
6. 宮崎真一郎、大腸癌の抗血管新生治療中における形質変化の解析、第 68 回日本消化器外科学会総会、2013 年 7 月 19 日、シーガイアコンベンションセンター (宮崎県宮崎市)
7. 菊池寛利、抗血管新生治療中における大腸癌微小環境変化の解析、第 22 回日本がん転移学会総会、2013 年 7 月 11 日、ホテルブエナビスタ (長野県松本市)
8. 宮崎真一郎、抗血管新生治療中における大腸癌悪性形質獲得の基礎的検討、第 113 回日本外科学会定期学術集会、2013 年 4 月 12 日、福岡国際会議場 (福岡県福岡市)
9. Shinichiro Miyazaki. Alteration of tumor microenvironment during antiangiogenic therapy in colorectal cancer xenograft. The 14th International Biennial Congress of the Metastasis Research Society. 2012 年 9 月 4 日、Brisbane, Australia

6. 研究組織

(1) 研究代表者

今野 弘之 (KONNO, Hiroyuki)
浜松医科大学・医学部・教授
研究者番号: 00138033

(2) 研究分担者

神谷 欣志 (KAMIYA, Kinji)
浜松医科大学・医学部附属病院・講師
研究者番号: 20324361
太田 学 (OHTA, Manabu)
浜松医科大学・医学部附属病院・講師
研究者番号: 40397394
菊池 寛利 (KIKUCHI, Hirotoshi)
浜松医科大学・医学部・助教
研究者番号: 70397389

宮崎 真一郎 (MIYAZAKI, Shinichiro)
浜松医科大学・医学部附属病院・医員
研究者番号：30571575

(3)連携研究者

馬場 聡 (BABA, Satoshi)
浜松医科大学・医学部附属病院・准教授
研究者番号：10242760