

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590918

研究課題名(和文) 癌・間質相互作用を標的とした胃癌転移に対する新しい治療法の開発

研究課題名(英文) Combining molecular targeted drugs to inhibit both cancer cells and activated stromal cells in gastric cancer.

研究代表者

北台 靖彦 (Kitadai, Yasuhiko)

広島大学・医歯薬保健学研究院(医)・准教授

研究者番号：10304437

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：胃癌細胞はmTORシグナルが活性化しており、PDGF-Bを発現していた。また、動物実験においてPDGF-Bを高発現する胃癌細胞株をヌードマウスの胃壁に移植すると間質反応の強い腫瘍を形成した。この腫瘍モデルにPDGFR阻害剤を投与すると、腫瘍辺縁部において間質反応や腫瘍浸潤が抑制された。しかし、mTOR阻害剤投与では腫瘍が小さくなるものの間質の変化は認めなかった。腫瘍細胞に対し増殖抑制作用を有するmTOR阻害剤に間質を抑制するPDGFR阻害剤を併用することで、強い腫瘍増殖・リンパ節転移抑制効果が認められた。以上の結果より、癌細胞と腫瘍間質の両方をターゲットとして治療を行うことの有用性が示された。

研究成果の概要(英文)：Mammalian target of rapamycin (mTOR) is a serine/threonine kinase that increases the production of proteins that stimulate key cellular processes such as cell growth and proliferation, cell metabolism, and angiogenesis. In the present study, we examined the effects of PDGF-R tyrosine kinase inhibitor (nilotinib) and mTOR inhibitor (everolimus) on tumor stroma in an orthotopic nude mice model of human gastric cancer. Treatment with nilotinib did not suppress tumor growth but did significantly decrease stromal reactivity, lymphatic invasion, lymphatic vessel area, and pericyte coverage of tumor microvessels. In contrast, treatment with everolimus decreased tumor growth and microvessel density but not stromal reactivity. Nilotinib and everolimus in combination reduced both the growth rate and stromal reaction. Target molecule-based inhibition of cancer-stromal cell interaction appears promising as an effective anti-tumor therapy.

研究分野：医歯薬学

キーワード：癌間質相互作用 分子標的治療 胃癌

1. 研究開始当初の背景

腫瘍組織は癌細胞と間質から形成されている。腫瘍間質は線維芽細胞、筋線維芽細胞、内皮細胞、ペリサイト、炎症細胞など種々の非腫瘍性細胞とそれらを取り巻く細胞外物質 (Extracellular matrix; ECM) より構成される。近年、間質は癌細胞との相互作用の結果、癌の増殖・進展を促進することが明らかとなりつつあるが、従来の抗腫瘍薬は主に癌細胞に働き、間質に対する効果を期待し開発されたものは少ない。一方、これまで我々はヒト大腸癌組織ならびにヒト大腸癌移植モデルで platelet-derived growth factor receptor (PDGFR)リン酸化阻害剤が間質反応を抑制することを報告してきた。また、癌間質組織における癌関連線維芽細胞 (Carcinoma-Associated Fibroblast: CAF)、血管内皮細胞、ペリサイト、リンパ管内皮細胞、腫瘍関連マクロファージなど、非腫瘍細胞に注目し、転移機構の解析および血管新生抑制療法に関する研究を行ってきた (Kitadai Y, Cancer Microenviron. 2009)。なかでも CAF は種々の癌において増殖、転移に重要な働きをすると報告されているが、我々は、CAF が増殖因子レセプターのひとつである PDGFR を過剰発現することを見出し、分子標的薬である PDGFR チロシンキナーゼ阻害剤が間質反応を抑え、抗癌剤の抗腫瘍効果を増強させることにより転移を抑制することをすでに報告している (Kitadai Y et al, Am J Pathol, 2006, Sumida T, Kitadai Y et al, Int J Cancer 2011)。

一方、Rapamycin 誘導体の everolimus は経口 mTOR (mammalian target of rapamycin) 阻害剤として知られ、移植患者の免疫抑制剤として使用されてきた。2009 年には転移性腎細胞癌患者に対する分子標的治療薬として FDA に承認された。AKT/mTOR 系シグナルの活性化は種々の癌で報告されている。mTOR 阻害剤、everolimus は腫瘍細胞内のシグナル伝達を抑制し、癌細胞自身の増殖抑制、アポトーシスの促進を誘導する。さらには、hypoxia inducible factor (HIF)-1/vascular endothelial growth factor (VEGF)系の阻害による血管新生抑制作用も有する。すなわち、mTOR 阻害剤は癌細胞と血管内皮細胞を、PDGFR 阻害剤は CAF、ペリサイト、リンパ管内皮を標的として作用することが期待される。

2. 研究の目的

従来の抗癌剤のほとんどは主に癌細胞のみに殺細胞性効果を発揮し、腫瘍微小環境への影響を期待し開発されたものはない。また、腫瘍細胞は遺伝子不安定性のため、薬剤耐性を来しやすいことが知られている。本研究の目的は、作用機序の異なる分子標的薬を併用することにより、腫瘍細胞と数種類の活性化した間質構成細胞を同時に抑制し、癌の増殖・進展を阻止することにある。

3. 研究の方法

1) ヒト消化管癌組織における PDGF-B 発現と臨床病理学的事項との相関：ヒト胃癌の切除標本を用いて、alpha-smooth muscle actin (α SMA)や collagen type I の免疫染色を行い画像解析することで間質反応を定量化し、病期や予後、悪性度などの臨床病理学的事項との関連を解析する。

2) 消化管癌組織における mTOR 経路の活性化の有無：ヒト胃癌組織を用いた pS6R 免疫染色により S6 ribosomal protein のリン酸化を評価した。

3) ノードマウス同所移植モデルを用いた治療実験。PDGFR 阻害剤と mTOR 阻害剤 (それぞれの単剤あるいは両薬剤の併用) の治療効果を *in vitro* ならびに *in vivo* において下記 2 点を中心に検討する。

i) 腫瘍間質に及ぼす影響。

ii) 分子標的薬の併用による転移抑制効果。具体的には、同所移植モデルにより、腫瘍の増殖、転移阻害作用を評価する。また、形成された腫瘍における腫瘍細胞の増殖能、アポトーシス、間質反応、腫瘍微小血管、リンパ管の特徴を免疫組織学的に解析する。

4. 研究成果

(1) ヒト胃癌組織において PDGF-B は癌細胞で発現がみられ、未分化型や腫瘍間質の多い腫瘍で発現レベルが高かった (図 1 A)。また、PDGF-B を高発現する胃癌細胞株 (TMK-1 細胞) をノードマウスの胃壁に移植すると間質反応の強い腫瘍を形成した (図 2)。一方、PDGFR は間質の CAF、ペリサイト、リンパ管内皮細胞に発現していた。ヒト胃癌細胞では全症例 (29 例) で S 6 蛋白のリン酸化が認められ、mTOR 経路の活性化が確認された。(図 1 B)

図1 (A) ヒト胃癌組織では PDGF/R レベルが腫瘍間質量とよく相関していた。
(B) 胃癌細胞ではリン酸化 S6 リボソーム蛋白が陽性であった。

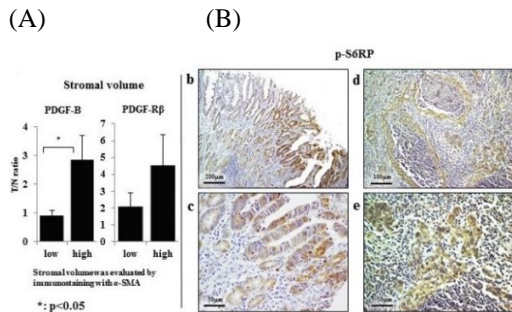
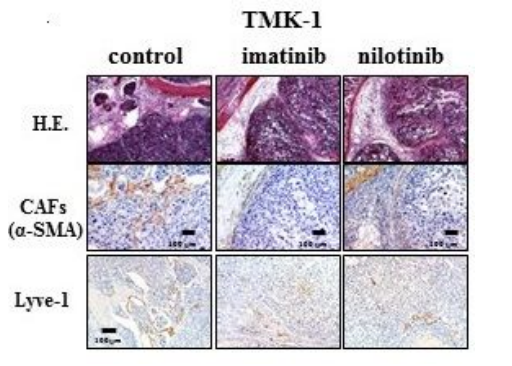
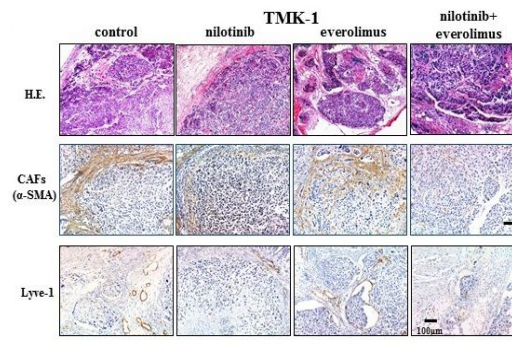


図2 TMK-1 腫瘍は間質反応の強い腫瘍を形成する。PDGFR リン酸化阻害薬は間質反応と腫瘍浸潤を抑制する。



(2) TMK-1 腫瘍に PDGFR リン酸化阻害剤(ニロチニブ、イマチニブ)を投与すると、腫瘍辺縁部において間質反応や腫瘍浸潤が抑制された(図2)。しかし、抗癌剤や mTOR 阻害剤(エベロリムス)投与では間質の変化は認めなかった(図3)。

図3 ニロチニブは腫瘍間質量やリンパ管密度を減少させる。エベロリムスは間質に影響を与えない。



(3) 腫瘍細胞や血管内皮細胞に対し抑制作用を有する薬剤(mTOR 阻害剤,エベロリムス)に PDGFR 阻害剤を併用することで、さらに強い腫瘍増殖・転移抑制効果が認められた。(Onoyama M, Kitadai Y, et, al, Neoplasia, 2014)

図4 ニロチニブとエベロリムスはそれぞれの標的蛋白のチロシンリン酸化を阻害していた。

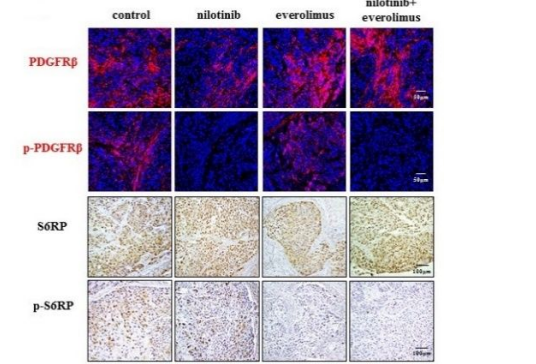


図5 エベロリムス投与により血管密度は減少し、ニロチニブはペリサイト数を減少させた。両薬剤の併用により著明に血管新生は抑制された。

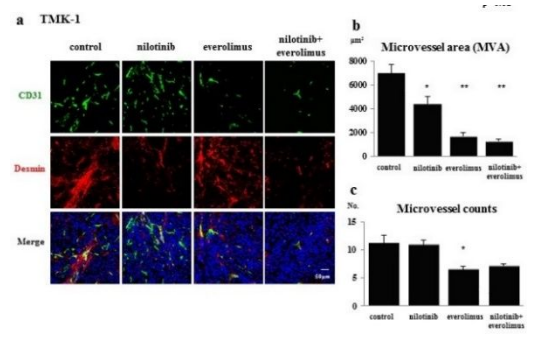
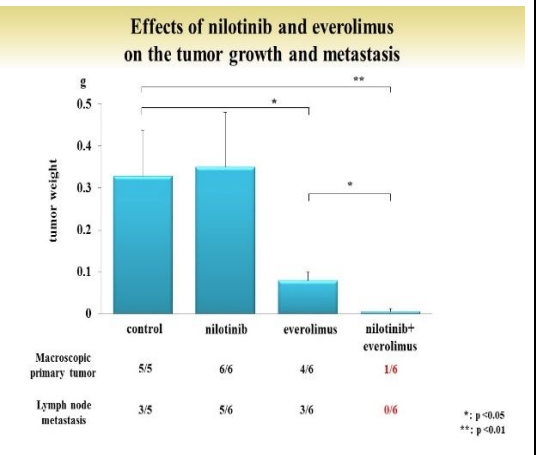


図6 薬剤の併用により、腫瘍増殖抑制とともにリンパ節転移も著明に抑制された。



(4) ノードマウス大腸癌同所移植モデルを用いた治療実験を行ったが、ほぼ同様の結果が得られ英文雑誌にて発表した(Yuge R, Kitadai Y, et, al, Am J Pathol, 2015.)。

考察

多くの臨床試験結果により、消化管癌の薬物療法の標準化はほぼ確立しつつある。しかし、胃癌においては明確な driver gene が報告されておらず、有望な分子標的薬はない。現在のところ、消化管癌の分野では細胞増殖因子レセプター(HER2, EGFR, c-Met, FGFR)や血管新生因子(VEGF)に対する抗体薬が開発

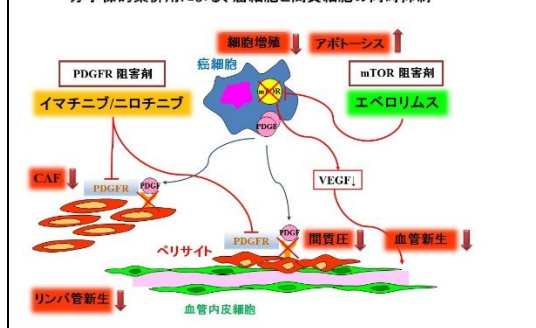
中であるが、胃癌に対して臨床の場で使用されている分子標的治療薬は HER2 陽性胃癌に対するトラスツズマブのみである。

腫瘍により活性化した間質を抑制しようとする治療は、まだ動物実験にて試みられている段階であり、臨床応用されているものはない。我々は以前より治療標的として PDGFR/レセプター系に注目してきた。PDGFR は血管平滑筋細胞、線維芽細胞、メザンジウム細胞などの間葉由来の細胞に発現していることが知られているが、胃癌や大腸癌組織において、腫瘍間質の CAF やペリサイトにおいて過剰発現していることを確認している。また、これらの細胞が発現している PDGFR はリン酸化されていた¹¹⁾。腫瘍細胞における PDGF-B の発現は認めるものの PDGF レセプターの発現はほとんど認めないことから、胃癌、大腸癌においては PDGF/レセプター系がパラクライン的に癌の増殖・進展に参与していると考えられる。

低分子化合物のイマチニブとニロチニブは、本来 Abl チロシンキナーゼの選択的阻害剤として開発された分子標的治療薬であるが、c-kit 蛋白や PDGFR のシグナル伝達も阻害する作用を有している。Bcr-Abl 癒合遺伝子を有する慢性骨髄性白血病や c-kit 遺伝子異常を持つ消化管間質腫瘍(GIST)に対しては、すでに臨床の場でその有用性が証明されている。これらの薬剤が PDGFR チロシンキナーゼを阻害することに着目し、ヌードマウスの胃癌、大腸癌同所移植モデルを用いて有効性を検討したところ、両者とも原発巣の浸潤先進部において著明な間質反応の抑制を認めた(図2)。単剤投与では腫瘍縮小効果はわずかであったが、これらの薬剤と抗癌剤との併用により腫瘍増殖のみならずリンパ節や腹膜への転移を抑制した。また最近では、標的細胞の異なる分子標的薬との併用実験も行われている。Rapamycin 誘導体のエベロリムスは経口投与可能な mTOR 阻害剤であるが、腫瘍細胞内の AKT/PI3K/mTOR 系シグナル伝達を抑制し、癌細胞自身の増殖抑制、アポトーシスの促進を誘導する。さらには、hypoxia inducible factor (HIF)-1 / VEGF 系の阻害による血管新生抑制作用も有する。我々は本研究にて、胃癌並びに大腸癌同所移植モデルを用いて、PDGFR 阻害剤(イマチニブ、ニロチニブ)と mTOR 阻害剤(エベロリムス)の単剤ならびに併用治療効果について検討した。両実験モデルにおいて mTOR 阻害剤単剤治療では腫瘍増殖の抑制と微小血管密度・面積の縮小がみられたが、間質反応やリンパ管には影響を与えなかった。しかし、PDGFR 阻害剤の併用により間質反応を抑制すると、著明な腫瘍縮小効果を示すのみならずリンパ節転移を完全に抑制した⁸⁾。これらのことから、癌組織構成細胞を広く同時に抑制する目的で標的の異なる分子標的薬を併用することは効果的な治療法となりうることを示された(図7)。

図7

分子標的薬併用による、癌細胞と間質細胞の同時抑制



5. 主な発表論文等

〔原著論文〕(計6件)

英文

1. Yuge R, **Kitadai Y**, Shinagawa K, Onoyama M, Tanaka S, Yasui W, Chayama K: mTOR and PDGF pathway blockade inhibits liver metastasis of colorectal cancer by modulating the tumor microenvironment. *Am. J. Pathol.* 2015 ; 185: 399-408.(査読有)
2. Onoyama M, **Kitadai Y**, Tanaka Y, Yuge R, Shinagawa K, Tanaka S, Yasui W, Chayama K: Combining molecular targeted drugs to inhibit both cancer cells and activated stromal cells in gastric cancer. *Neoplasia* 2013 ; 15: 1391-1399. (査読有)
3. Shinagawa, K., **Kitadai, Y.**, Tanaka, M., Sumida, T., Onoyama, M., Ohnishi, M., Ohara, E., Higashi, Y., Tanaka, S., Yasui, W., Chayama, K: Stroma-directed imatinib therapy impairs the tumor-promoting effect of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in an orthotopic transplantation model of colon cancer. *Int J Cancer* 2013; 132: 813-823. (査読有)

和文

1. 弓削 亮, **北台靖彦**: 癌間質におけるペリサイトの特徴と治療標的としての可能性 *実験医学* 2015; 33: 180-185. (査読無)
2. **北台靖彦**, 斧山美恵子, 弓削 亮, 品川 慶, 田中信治, 茶山一彰: 腫瘍間質を標的とした消化管癌治療の可能性 - 癌の生物学的悪性度と腫瘍微小環境 - *胃がん perspective State of the art.* 2014; 7: 114-124. (査読無)
3. 品川 慶, **北台靖彦**, 田中信治:

間葉系幹細胞はマウスの大腸腫瘍形成
脳能を促進する。
胃がん perspective, 2012; 5:122-124 (査読
無)。

〔学会発表〕(計9件)

国際学会

1. Yuge R, **Kitadai Y**, Onoyama M, Shinagawa K, Tanaka S, Yasui W, Chayama K.
Inhibition of collagen receptor discoidin domain receptor-1 (DDR1) reduces colon cancer cell migration and metastasis. AACR annual meeting 2015. 4.18. Philadelphia, PA, USA
2. Shinagawa, K., **Kitadai Y**, Onoyama M, Yuge R, Tanaka S, Yasui W, Chayama K.
Treatment with regorafenib inhibits the tumor-promoting effect of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in an orthotopic nude mice model of colon cancer
AACR annual meeting 2014. 4. 5. Philadelphia, PA, USA San Diego, CA, USA
3. Yuge R, **Kitadai Y**, Onoyama M, Shinagawa K, Tanaka S, Yasui W, Chayama K.
Combining molecular targeted drugs to inhibit both cancer cells and activated stromal cells in colon cancer.
AACR annual meeting 2014. 4. 5. Philadelphia, PA, USA San Diego, CA, USA
4. Shinagawa K, **Kitadai Y**, Onoyama M, Yuge R, Tanaka S, Yasui W, Chayama K.
Interaction between bone marrow-derived mesenchymal stem cells and tumor cells induces expression of fibronectin in human colon cancer cells.
AACR annual meeting 2014. 4. 5 San Diego, CA, USA.
5. Onoyama M, **Kitadai Y**, Yuge R, Shinagawa K, Tanaka S, Yasui W, Chayama K.
Combining molecular target drugs to inhibit cancer-stromal cell interaction in gastric cancer.
The 4th JCA-AACR Special Joint Conference 2013.12.16. Chiba, Japan.
6. **Kitadai Y**, Onoyama M, Yuge R, Shinagawa K, Tanaka S, Yasui W, Chayama K.
Combining molecular target drugs to inhibit cancer-stromal cell interaction in

gastrointestinal cancer.

AACR Special Conference of Tumor Invasion and Metastasis. 2013.1.20, San Diego, USA.

7. Onoyama M, **Kitadai Y**, Yuge R, Shinagawa K, Tanaka S, Yasui W, Chayama K.
Combining molecular target drugs to inhibit cancer-stromal cell interaction in gastric cancer.
AACR annual meeting. 2013. 4. 6, Washington DC, USA.

国内学会

1. 品川慶、**北台靖彦**：
骨髄由来間葉系幹細胞はヒト大腸癌においてメタロチオネインを誘導する。
第72回日本癌学会総会学術集会, 2013. 10.3 横浜, 日本。
2. **北台靖彦**：
胃癌間質をターゲットとした胃癌に対する分子標的治療。
第21回日本がん転移学会総会学術集会, 2012; 7.12 広島, 日本。

〔図書〕(計1件)

1. **Kitadai, Y.**, Shinagawa, K.:
Enhanced growth and metastasis of colon cancer: Role of mesenchymal stem cells.
Stem Cells and Cancer Stem Cells: Therapeutic Applications in Disease and Injury, Volume 4 (Hayat, M. A., ed), Springer, pp259-266, 2012.

6. 研究組織

(1)研究代表者

北台 靖彦 (KITADAI YASUHIKO)

広島大学・大学院医歯薬保健学総合研究院
准教授

研究者番号 10304437