

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461191

研究課題名(和文) 肺癌・中皮腫の微小環境に着目したベバシズマブの耐性関連バイオマーカーの探索

研究課題名(英文) Investigation in the microenvironment of lung cancer and malignant pleural mesothelioma for the development of biomarker for the resistance to bevacizumab

研究代表者

後東 久嗣 (GOTO, Hisatsugu)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学系)・講師

研究者番号：00437641

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、がん治療における血管新生阻害薬(ベバシズマブ)の耐性メカニズムを解明することを目的とした。マウスモデルを用いた検討で、ベバシズマブ獲得耐性には宿主側の線維芽細胞増殖因子(FGF2)が重要な役割を果たしており、その産生細胞として線維細胞を同定した。ヒト臨床検体を用いた検討でもベバシズマブ投与後に手術した群では、手術単独群や術前化学療法のみ群に比べ有意に腫瘍組織内の線維細胞数が増加していた。

以上より、線維細胞は血管新生阻害薬耐性克服のための新たな治療標的となり得る可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to clarify the mechanism of resistance to anti-angiogenic therapy in cancer. Bevacizumab exerts anti-angiogenic effects in cancer patients by inhibiting vascular endothelial growth factor (VEGF). However, its use is still limited due to the development of resistance to the treatment. In this study, using mouse model of malignant pleural mesothelioma, we found that fibroblast growth factor (FGF) 2 played important role in the resistance to bevacizumab. We identified fibrocytes as the producer of FGF2 in the tumor tissue. In clinical specimens of lung cancer, the number of fibrocyte was significantly increased in bevacizumab-treated tumors, and is correlated with the number of treatment cycles, as well as CD31-positive vessels. Our results identify fibrocytes as a promising cell biomarker and a potential therapeutic target to overcome resistance to anti-VEGF therapy.

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：肺癌 悪性胸膜中皮腫 血管新生阻害薬 薬剤耐性

### 1. 研究開始当初の背景

(1) がんの増殖・進展に血管新生は必須である。血管新生は様々な因子で調節されているが、中でも血管内皮増殖因子 (VEGF) は血管新生促進因子として中心的な役割を担っており、既にそれを標的とした治療が臨床応用に至っている。日本では、ヒト化抗 VEGF モノクローナル抗体であるベバシズマブが肺癌や大腸癌で承認されている。しかし一方米国では、臨床試験でその不十分な効果から乳癌に対する承認が取り消された。これはベバシズマブに対する耐性メカニズム等のバイオマーカーが未だ同定されていないことが原因と考えられる。よってその耐性メカニズムを解明し、克服していくことは、がん治療成績向上のために急務であると考えられる。

(2) 我々はこれまでに、ヒト悪性胸膜中皮腫 (MPM) 細胞株を SCID マウスの胸腔内に接種する同所移植モデルを作成し (Cancer Sci. 2006) (図 1)、VEGF を標的とした治療が MPM に有効であることを報告してきた (Clin Cancer Res. 2007, 2009)。しかし、やはりその効果は限定的で、マウスの生存延長が得られてもいずれマウスは死亡することが判明している。これらの基礎的研究からも VEGF を標的とした抗血管新生治療に耐性メカニズムが存在することが示唆されている。

(3) 今回我々は、上記マウスモデルを用いることでベバシズマブの耐性メカニズムの検討が可能であると考え実験を開始し、腫瘍細胞ではなく、微小環境 (宿主細胞) 側の fibroblast growth factor 2 (FGF2) が治療群の腫瘍組織で有意に増加していることを見出した。

### 2. 研究の目的

これまでの結果を踏まえ、ベバシズマブ獲得耐性における FGF2 の重要性の検証およびその産生細胞を同定し、血管新生阻害薬 (ベバシズマブ) 耐性メカニズムを解明することを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) ベバシズマブ獲得耐性腫瘍において、宿主側 FGF2 の増加が認められた結果を受けて、FGF2 がその腫瘍において血管新生促進因子として機能しているか否かについて、その受容体阻害剤を用いて検討した。具体的には、上記マウスモデルにて、市販されている FGFR 阻害剤 (BGJ-398) をベバシズマブ耐性が始まる時期 (腫瘍接種から約 21 日後) から併用を開始し、腫瘍内血管密度やマウス生存に与える影響を検討した。

(2) 本研究で用いるマウスは免疫不全 (SCID) マウスであるため、腫瘍組織内の

FGF2 産生宿主細胞としては、マクロファージ、線維芽細胞、好中球、血管周皮細胞 (pericytes) などが候補として挙げられ、これらの表面マーカー (CD68, FSP-1, Gr-1, CXCR4, CD45, NG2 など) と FGF2 を蛍光二重染色することで、FGF2 産生細胞を同定した。また、その数を耐性化群とコントロール群で比較し、FGF2 産生細胞のベバシズマブ獲得耐性に対する重要性を検証した。

(3) 宿主側の FGF2 産生増加には、がん細胞が関与している可能性が考えられた。すなわち、がん細胞側が何らかの因子を放出して FGF2 を産生する宿主細胞の集積、FGF2 産生等を促している可能性が考えられたため、ベバシズマブ耐性となった腫瘍において、ヒト (がん細胞側) の遺伝子変化をマイクロアレイ法にて網羅的に解析することで、その因子の同定を行った。

(4) ベバシズマブは肺腺癌の治療において実臨床で多く用いられるが、未だその治療効果、耐性化を予測するマーカーは同定されていない。そのため、マウスモデルで同定した FGF2 ならびにその産生細胞のベバシズマブ耐性予測因子としての有用性を、ヒト肺腺癌臨床検体を用いて検証した。具体的には、ベバシズマブを含む化学療法を行った後に手術を施行した肺腺癌症例のパラフィン包埋腫瘍組織切片を集積し、マウスモデルにおいて同定した FGF2 産生細胞を免疫染色で同定した。同時に、手術単独、もしくはベバシズマブを含まない化学療法後に手術を施行した症例の検体もコントロール群として集積し、免疫組織学的に比較検討を行った。

### 4. 研究成果

(1) 代替血管新生促進因子としての FGF2 の重要性を確認するため、FGFR 阻害剤 (BGJ-398) をベバシズマブに併用し、腫瘍内血管密度やマウス生存に与える影響を検討したところ、それぞれの単剤治療群と比較して併用群では有意な生存の延長や腫瘍血管数の抑制を認めた (図 1)。この結果から、FGF2 が代替血管新生因子として VEGF 阻害薬耐性に関わっていることが考えられた。

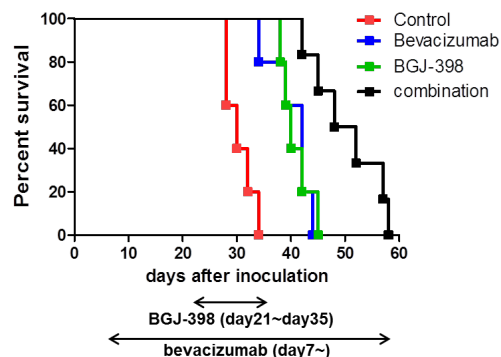


図1. 悪性胸膜中皮腫 (Y-MESO-14) 細胞を用いた同所移植マウスモデルにおいて、ベバシズマブにFGFR阻害薬 (BGJ-398) を併用したところ、有意にマウスの生存を延長した。

(2) 宿主側 FGF2 の産生細胞を同定するため、種々の細胞マーカーを用いた免疫組織染色を施行したところ、FGF2 は collagen type 1 と CXCR4 に共染色された。興味深いことに、ベバシズマブ耐性腫瘍内では collagen type 1 と CXCR4 を同時に発現する細胞が有意に増加しており、FGF2 はこれらの細胞から産生されていた。Collagen type 1 と CXCR4 を共発現する特徴を有する細胞として、これらは線維細胞 (fibrocyte) であると考えられ (図 2) GFP 陽性細胞を骨髄移植したキメラマウスやフローサイトメトリー法を用いた検討も追加し、本細胞が同定された。

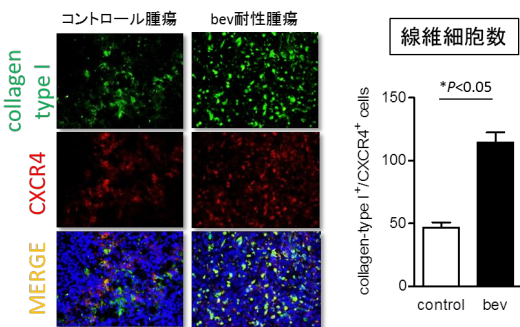


図2. ヒト悪性胸膜中皮腫同所移植モデルにおけるベバシズマブ耐性腫瘍内の線維細胞数  
ヒト悪性胸膜中皮腫細胞株をSCIDマウスの胸腔内に同所移植後、7日目よりベバシズマブを継続的に投与し、耐性化後に腫瘍を回収後、fibrocyteをcollagen type 1<sup>+</sup>/CXCR4<sup>+</sup>細胞として同定した。耐性化腫瘍内でfibrocyte数の増加が認められた。bev: ベバシズマブ

(3) ベバシズマブなどの血管新生阻害薬を投与することで、腫瘍内が低酸素状態に陥ることが報告されている。このような条件下では、がん細胞は様々な因子を産生することで新たな血管を誘導しようとするのが考えられるが、本検討では、ベバシズマブ投与後マウス腫瘍組織における低酸素環境を確認し、さらにその条件下でのがん細胞での遺伝子変化を網羅的に解析したところ、低酸素条件下で CXCL12 の発現亢進が認められた (図 3)。

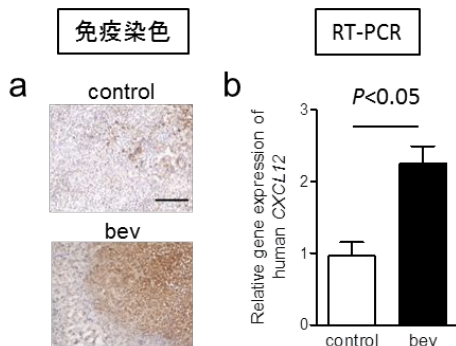


図3. (a) 悪性胸膜中皮腫マウスモデル (Y-MESO-14) において、ベバシズマブ投与により低酸素 (茶色) が誘導された。(b) このような条件下ではがん細胞由来の CXCL12 の遺伝子発現が増強されていた。

線維細胞が発現する CXCR4 は CXCL12 の結合分子である。低酸素によってがん細胞で誘導される CXCL12 が線維細胞の遊走能に与える影響を *in vitro* において double chamber assay を用いて検討したところ、低酸素環境下では線維細胞の遊走は増強され、その効果は CXCR4 antagonist である AMD3100 で抑制された (図 4)。以上から、がん細胞が低酸素環境で CXCL12 を放出し、CXCL12/CXCR4 axis を介して線維細胞を腫瘍内に誘導することが明らかとなった。

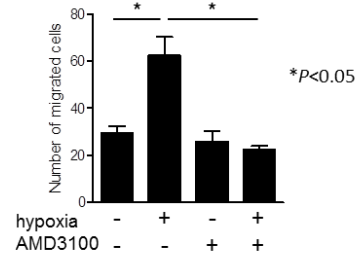


図4. 下層にがん細胞 (Y-MESO-14)、上層に線維細胞を置いた double chamber assayにて、下方に遊走する線維細胞数を検討した。低酸素環境下では線維細胞の遊走能は増強し、その効果は CXCR4 antagonist である AMD3100 にて抑制された。

(4) これまで、血管新生阻害薬耐性に関する報告はいくつかあるが、いずれもマウスレベルの報告であり、ヒトでの報告はなされていなかった。今後のバイオマーカー開発のためには、マウスモデルのみならずヒトでの解析が重要と考え、今回同定した線維細胞と血管新生阻害薬治療の関連について、ヒト肺癌切除組織を用いた検討を行った。ヒト肺癌組織中における線維細胞の存在およびベバシズマブ投与との関連性を調べるため、切除標本をベバシズマブを含む化学療法後に手術した群、ベバシズマブを含まない化学療法後に手術した群、手術単独群、に分け、各群における組織中の線維細胞数を免疫組織学的に検討した。結果、上記群、群に比較し、群において有意に腫瘍組織内の線維細胞数の増加が認められた (図 5)。さらに興味深いことに、群において、術前ベバシズマブ投与とサイクル数と腫瘍内線維細胞数には正の相関が認められた。

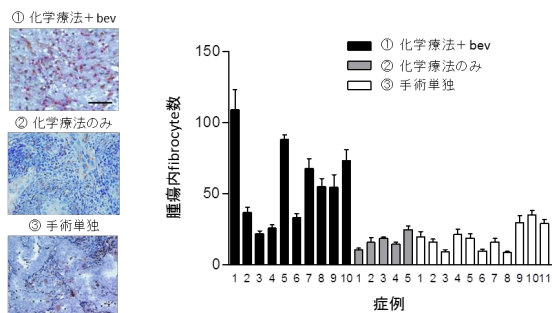


図5. ヒト肺癌切除組織内における線維細胞 (fibrocyte) 数  
ヒト肺癌切除症例を①ベバシズマブを含む化学療法後に手術した群、②ベバシズマブを含まない化学療法後に手術した群、③手術単独群、に分け、切除組織内の fibrocyte を CD45<sup>+</sup> (赤) / FSP-1<sup>+</sup> (茶) 細胞として同定した。  
①群において、有意に腫瘍内 fibrocyte の増加が認められた。bev: ベバシズマブ

これらの結果から、線維細胞がペバシズマブ耐性化のバイオマーカーや治療標的となり得る可能性が示唆された。前述したようにこれまでの血管新生阻害薬耐性メカニズムに関する報告はマウスレベルのみの報告であった。本研究成果は、マウスモデルのみならずヒト臨床検体においても線維細胞の重要性を証明した点が評価され、Nature Communications 誌に掲載された。

#### 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 1 件)

Mitsuhashi A, Goto H, Saijo A, Trung VT, Aono Y, Ogino H, Kuramoto T, Tabata S, Uehara H, Izumi K, Yoshida M, Kobayashi H, Takahashi H, Gotoh M, Kakiuchi S, Hanibuchi M, Yano S, Yokomise H, Sakiyama S, Nishioka Y. Fibrocyte-like cell mediate acquired resistance to anti-angiogenic therapy with bevacizumab. Nat Commun 6: 8792. doi: 10.1038/ncomms9792, 2015 (査読有り)

[学会発表](計 8 件)

Goto H. Fibrocytes mediate acquired resistance to anti-angiogenic therapy with bevacizumab in thoracic tumors. ATS 2016 International Conference. 2016年5月15日. San Francisco (USA).

Goto H. The role of fibrocytes in the resistance to anti-angiogenic therapy in malignant pleural mesothelioma and lung cancer. International Conference of Cancer Immunotherapy and Macrophages 2015. 2015年7月9日. 東京大学伊藤国際学術センター(東京都文京区).

Goto H. The Role of Fibrocytes in the Acquired Resistance to Anti-Angiogenic Therapy with Bevacizumab in Malignant Pleural Mesothelioma. ATS 2015 International Conference. 2015年5月17日. Denver (USA).

Goto H. Fibrocytes mediate acquired resistance to anti-angiogenic therapy with bevacizumab. 第 55 回日本呼吸器学会学術講演会. 2015年4月18日. 東京国際フォーラム(東京都千代田区).

後東久嗣. ペバシズマブに対する獲得耐性メカニズムとしての線維細胞(fibrocytes)の役割. 第 73 回日本癌学会学術総会. 2014年9月27日. パシフィコ横浜(神奈川県横浜市).

後東久嗣. ペバシズマブに対する獲得耐性メカニズムとしての線維細胞(fibrocytes)の役割. 第 18 回日本がん分子標的治療学会学術集会(シンポジウム). 2014年6月27日.

仙台市情報・産業プラザ(宮城県仙台市).

Goto H. The role of fibrocytes in the resistance to anti-angiogenic therapy in malignant pleural mesothelioma and lung cancer. ATS 2014 International Conference (Mini-symposium). 2014年5月21日. San Diego (USA).

後東久嗣. 呼吸器疾患における慢性炎症と fibrocyte. 第 54 回日本呼吸器学会学術講演会(シンポジウム). 2014年4月27日. 大阪国際会議場(大阪府大阪市).

[図書](計 5 件)

後東久嗣, 西岡安彦. 最新医学社. 最新医学 2017年. 132-137 ページ(総ページ数 168 ページ).

後東久嗣, 三橋惇志, 西岡安彦. 先端医学社. 分子呼吸器病. 2017年. 4-7 ページ(総ページ数 119 ページ).

後東久嗣, 三橋敦志, 西岡安彦. 先端医学社. 分子呼吸器病. 2016年. 111-114 ページ(総ページ数 137 ページ).

後東久嗣, 青野純典, 三橋惇志, 西岡安彦. 医学書院. 呼吸と循環. 2016年. 149-155 ページ(総ページ数 1242 ページ).

後東久嗣, 西岡安彦. 医歯薬出版株式会社. 医学のあゆみ. 2015年. 814-818 ページ(総ページ数 1260 ページ).

[その他]

ホームページ等  
www.sannai.umin.jp

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

後東 久嗣 (GOTO, Hisatsugu)  
徳島大学・大学院医歯薬学研究部・講師  
研究者番号: 00437641

##### (2) 研究分担者

埴淵 昌毅 (HANIBUCHI, Masaki)  
徳島大学・大学院医歯薬学研究部・准教授  
研究者番号: 80335794

柿内 聡司 (KAKIUCHI, Soji)  
徳島大学・大学院医歯薬学研究部・非常勤講師  
研究者番号: 50380100