

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 9 月 11 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461938

研究課題名(和文) 抗血管新生療法における新規biomarker検索と分子基盤の解明

研究課題名(英文) Novel biomarker for tumor anti-angiogenic therapy based on molecular biology

研究代表者

藤井 孝明 (Fujii, Takaaki)

群馬大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：40507331

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：乳癌細胞株MCF-7に対するRapamycinの抗腫瘍効果について、VEGFの発現制御に着目して検討した。MCF-7の増殖活性はRapamycin投与、またVEGFの中和抗体投与にて抑制された。MCF-7のVEGF発現はRapamycin投与により抑制され、Rapamycinの抗腫瘍効果はVEGFの投与により阻害される傾向を認めた。以上より、RapamycinはMCF-7のVEGF発現抑制による直接的な作用を介し、抗腫瘍効果に関与している可能性が示唆された。腫瘍進展、リンパ節転移のメカニズムにおけるリンパ節外浸潤、リンパ管浸潤の意義、乳癌センチネルリンパ節生検について報告している。

研究成果の概要(英文)：We hypothesized that the mTOR inhibitor-induced anticancer effect is affected by expression of a key angiogenic factor, vascular endothelial growth factor (VEGF). The key observations made in this study can be summarized as follows: 1) administration of rapamycin dose-dependently reduced cell viability of MCF-7, but did not reduce cell viability of HT-29; 2) rapamycin reduced VEGF expression in the culture medium of MCF-7, while rapamycin did not contribute VEGF expression to the culture medium of HT-29; 3) VEGF stimulated cell viability and VEGF inhibition reduced cell viability of MCF-7; and 4) rapamycin dose-dependently restored the cell viability of MCF-7 reduced by rapamycin. These results demonstrate the critical role of VEGF in the action of rapamycin as an anticancer agent on MCF-7. We also revealed that lymph node metastasis and ECI suggest poor prognosis and, especially ECI represent lymphatic aggressive disease and also biological aggressiveness in cases with breast cancer.

研究分野：腫瘍外科学

キーワード：腫瘍血管新生 リンパ節転移 VEGF リンパ節外浸潤

1. 研究開始当初の背景

腫瘍の増殖には血管新生が必須である。腫瘍血管新生の抑制は抗腫瘍効果をもたらす治療法になり得るという概念が Folkman により提唱されて以後、血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) をはじめとする種々の血管新生因子が同定され、機能解析が行われてきている。VEGF は腫瘍血管新生を誘導する中心的な分子であり、VEGF の中和抗体であるベバシズマブ (Bv) は化学療法との併用で、種々の転移、切除不能癌に対しすでに臨床応用されている。しかし、抗 VEGF 療法は癌種により抗腫瘍効果が異なる。この理由として、VEGF だけではなく、癌種により血管新生関連因子の発現、制御機構が異なることが予想される。また Bv は治療効果予測因子が定まらず、どの患者群において予後を改善するかは未だ不明である。これまでに VEGF 遺伝子多型 (SNPs) や血漿中の VEGF-A 値、VEGFR2 発現等が検討されてきたが、明確な効果予測因子としては同定されていない。今後、抗 VEGF 療法の効果予測因子 '新規 biomarker' が必要であるとともに、さらには VEGF の阻害に加え、種々の血管新生関連因子の阻害を踏まえた新しい治療薬開発が必要であると考えられる。

2. 研究の目的

腫瘍の増殖には血管新生が必須である。血管新生因子 VEGF の阻害は癌腫により効果が異なり、治療効果予測因子が定まらず。本研究は、抗 VEGF 療法の新規 biomarker を検索し、さらに血管新生に必須である画期的な分子標的を見出すことを目的とする。

3. 研究の方法

本研究では、抗血管新生療法の新規 biomarker の検索と、FGF-2 と FGF-1 による血管新生過程、メカニズムの相違を検討することにより、血管新生過程とその病態に關与する分子基盤を明らかにする。

PDGF-AA, TGF- β は Bevacizumab 療法、抗 mTOR 療法の biomarker となりうるか？ 各種腫瘍細胞株、正常内皮細胞、正常間葉系細胞での TGF- β 、VEGF、HGF、PDGF-AA 発現プロファイルを、タンパク発現は ELISA 法、mRNA 発現は RT-PCR にて検討する。TGF- β 刺激により PDGF-AA/p70S6K システムが抑制されることを正常間葉系細胞において再現性を確認し、各種腫瘍細胞株でも TGF- β による PDGF-AA/p70S6K システム抑制機構が存在するか検討し、TGF- β 、PDGF-AA 発現

による抗血管新生療法の抗腫瘍効果の違いを確認する。

FGF-2 と FGF-1 による血管新生機構の相違を検討：血管新生過程に必須の新規分子基盤解明

1) マウス重症虚血下肢モデルにおける FGF-1、FGF-2 遺伝子導入の効果

マウス重症虚血下肢モデルを用いた FGF-2 遺伝子導入による血管新生のメカニズムについて報告している。FGF-1、FGF-2 の高発現状態を惹起し、血流回復効果の相違を確認する。下肢虚血を誘導すると下肢に壊死、脱落が認められる autoamputation モデル (Balb/c ノードマウス) を用い、FGF-1 また FGF-2 による下肢の救肢効果を比較、検討する。次に、下肢虚血を誘導しても下肢に壊死、脱落がみとめられない limb salvage model (C57 BL/6 マウス) を用い、血流回復効果の変化をレーザー Doppler にて測定する。さらに、血流回復の効果の違いの原因を調べるため、血管新生の状況を形態的、免疫組織学的に検討する。特に血管内皮細胞と周皮細胞との関連を検討し、新生血管の質的意義を検討する。

FGF-2 依存性の機能的血管新生には、血管新生初期には PDGF-AA を介した VEGF や HGF による開始シグナルが、血流回復がみられる後期には VEGF-C を介した PDGF-BB の発現による血管成熟シグナルが關与しているが、FGF-1 による血管新生でも同様のメカニズムが關与しているか、FGF-1 高発現状態での各種血管新生因子の発現を limb salvage model を用いて、経時的に検討する (ELISA、リアルタイム PCR)。

2) マイクロアレイによる網羅的解析

FGF-1、FGF-2 の下流で誘導されてくる遺伝子群について limb salvage model を用い、マイクロアレイを用いた網羅的検索を行う。すでに、FGF-1 をマウス下肢虚血モデルに遺伝子導入すると、FGF-2 を導入した際と同レベルの VEGF、HGF の誘導が認められるが、FGF-1 には全く治療効果がみとめられないという予備的なデータを得ているため、両群間で発現が異なる遺伝子群が検出できれば、これらは機能的、病的血管新生の分子機構に大きく關与している遺伝子群であることが推測される。

4. 研究成果

Rapamycin は p70S6K を活性化する mTOR 経路の阻害剤であり、腎細胞癌、乳癌など種々の癌で臨床応用されているが、一方で、Rapamycin は血管新生抑制作用を有することが報告されている。まず、乳

癌細胞株 MCF-7 に対する Rapamycin の抗腫瘍効果について、VEGF の発現制御に着目して検討を行った。MCF-7 の増殖活性は Rapamycin 投与、また VEGF の中和抗体投与にて抑制された。また、MCF-7 の VEGF 発現は Rapamycin 投与により著明に抑制され、Rapamycin の抗腫瘍効果は VEGF の投与により阻害される傾向を認めた。一方、Rapamycin による VEGF 発現抑制効果が認められなかった大腸癌細胞株 HT29 では、Rapamycin による抗腫瘍効果は認められなかった。以上より、Rapamycin は MCF-7 の VEGF 発現抑制による直接的な作用を介し、抗腫瘍効果に關与している可能性が示唆された。ここまでの結果を論文にて発表している (Fujii T, et al. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 2016)。VEGF の発現を強力に制御する PDGF-AA/p70S6K は Bv 療法の効果予測因子となる可能性があり、さらに TGF- β は PDGF-AA/VEGF 経路を制御しており、PDGF-AA、TGF- β が Bv 療法の新規 biomarker となり得るか検討中である。また腫瘍進展、リンパ節転移のメカニズムにおけるリンパ節外浸潤、リンパ管浸潤の意義、乳癌センチネルリンパ節生検施行例で、cT1 かつ ly 陰性症例では腋窩郭清を省略できる可能性についても検討し報告している。

FGF-2 は生理的血管新生に必要な血管新生因子群の発現をバランスよく亢進することができる因子である。FGF-1 と FGF-2 は同じサブファミリーに属し、両者とも FGFR-1 を受容体としている。FGF-2 と同様に FGF-1 にも血管新生作用が報告されており、FGF-1 は FGF-2 を導入した際と同レベルの VEGF、HGF の誘導が認められるが、我々の検討では FGF-2 と異なり、FGF-1 では血流を伴う血管新生は確認できていない (未発表データ)。FGF-1 は虚血心筋への治療的血管新生に用いた最初の因子であり、血管の分岐を誘導し、血管機能を維持するという報告もあるが、血管腫様の毛細血管増生を惹起する病的血管新生を誘発する。これらの所見より VEGF、HGF などは機能的血管新生の必要因子であるが、これらだけでは血管新生に十分ではなく、他の因子、分子基盤の関与が必要であることが示唆される。

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 28 件)

1. Fujii T, Sutoh T, Kigure W, Morita H, Katoh T, Yajima R, Tsutsumi S, Asao T, Kuwano H: Clinicopathological features of second primary colorectal cancer

incidentally identified by 18F-FDG-PET.

Hepatogastroenterology 62(139): 599-601, 2016. (査読あり)

2. Fujii T, Yajima R, Tsuboi M, Higuchi T, Obayashi S, Tokiniwa H, Nagaoka R, Takata D, Horiguchi J, Kuwano H: Clinicopathological features of cases with primary breast cancer not identified by 18F-FDG-PET. *Anticancer Res.* 36(6): 3019-3022, 2016. (査読あり)
3. Fujii T, Yajima R, Kurozumi S, Higuchi T, Obayashi S, Tokiniwa H, Nagaoka R, Takata D, Horiguchi J, Kuwano H: Clinical significance of 18F-FDG-PET in invasive lobular carcinoma. *Anticancer Res.* 36(10):5481-5485, 2016. (査読あり)
4. Fujii T, Yajima R, Tatsuki H, Kuwano H: Implication of F18-fluorodeoxyglucose uptake of affected axillary lymph nodes in cases with differentiated thyroid cancer. *Mol Clin Oncol* 5(3): 247-251, 2016. (査読あり)
5. Fujii T, Yajima R, Kuwano H: Implications of long-term indwelling of tissue expander in breast reconstruction: risk of expander rupturing. *Anticancer Res.* 36(8): 4337-4340, 2016. (査読あり)
6. Fujii T, Yajima R, Tatsuki H, Oosone K, Kuwano H: Implication of F18-fluorodeoxyglucose uptake of affected axillary lymph nodes in cases with breast cancer. *Anticancer Res* 36(1): 393-397, 2016. (査読あり)
7. Fujii T, Yajima R, Tatsuki H, Kuwano H: Prediction of extracapsular invasion at metastatic sentinel nodes and non-sentinel lymph nodal metastases by FDG-PET in cases with breast cancer. *Anticancer Res.* 36(4): 1785-1789, 2016
8. Fujii T, Yajima R, Tatsuki H, Oosone K, Kuwano H: Anticancer effect of rapamycin on MCF-7 via downregulation of VEGF expression.

- In Vitro Cell Dev Biol Anim 52(1): 45-48, 2016. (査読あり)
9. Fujii T, Yajima R, Tatsuki H, Kuwano H: Cystic parathyroid adenoma with MIBI scan-negative PHPT: Usefulness of Gamma camera. Int J Case Rep Imag 7(5): 318-322, 2016. (査読あり)
 10. Fujii T, Morita H, Sutoh T, Yajima R, Tsutsumi S, Kuwano H: Novel method of surgical incision management in patients undergoing colorectal surgery. Int Surg 101(1-2); 14-19, 2016. (査読あり)
 11. Fujii T, Yajima R, Tatsuki H, Morita H, Suto T, Tsutsumi S, Kuwano H: Immediate tissue-expander breast reconstruction using a skin flap with thick subcutaneous tissue: A preliminary study on selective patients. Am Surg. 81(11): 363-565, 2015. (査読あり)
 12. Fujii T, Yajima R, Morita H, Suto T, Tatsuki H, Tsutsumi S, Kuwano H: Implication of duration of clinical presentation on tumor progression and short-term recurrence in patients with early breast cancer. Mol Clin Oncol. 3(4): 785-788, 2015. (査読あり)
 13. Fujii T, Yajima R, Tatsuki H, Suto T, Morita H, Tsutsumi S, Kuwano H: Significance of lymphatic invasion combined with size of primary tumor for predicting sentinel lymph node metastasis in patients with breast cancer. Anticancer Res. 35(6): 3581-3584, 2015. (査読あり)
 14. Fujii T, Yajima R, Morita H, Hirakata T, Miyamoto T, Fujisawa T, Tsutsumi S, Yanagita Y, Iijima M, Kuwano H: Impact of vascular invasion of a primary tumor as a strong risk factor for disease recurrence in patients with node-positive breast cancer. Am Surg. 81(5): 523-526, 2015. (査読あり)
 15. Fujii T, Sutoh T, Kigure W, Morita H, Katoh T, Yajima R, Tsutsumi S, Asao T, Kuwano H: C-reactive protein level as a possible predictor for early postoperative ileus following elective surgery for colorectal cancer. Hepatogastroenterology. 62(138): 283-285, 2015. (査読あり)
 16. Fujii T, Morita H, Sutoh T, Yajima R, Tsutsumi S, Asao T, Kuwano H: Outlet obstruction of temporary loop diverting ileostomy. Hepatogastroenterology 62(139): 602-605, 2015. (査読あり)
 17. Fujii T, Morita H, Sutoh T, Yajima R, Tsutsumi S, Kuwano H: Anti-inflammatory effect of the *Kampo* Japanese traditional medicine *daikenchuto* after colorectal resection. Int Surg 100(11-12); 1360-1363, 2015. (査読あり)
 18. Fujii T, Yajima R, Morita H, Yamaguchi S, Tsutsumi S, Asao T, Kuwano H: Intracystic papillary carcinoma of the breast with invasion accompanying lymph node metastasis. International Journal of Case Reports and Images. 6(1): 25-28, 2015. (査読あり)
 19. Fujii T, Morita H, Sutoh T, Yajima R, Yamaguchi S, Tsutsumi S, Asao T, Kuwano H. Benefit of oral feeding as early as one day after elective surgery for colorectal cancer: oral feeding on first versus second postoperative day. Int Surg. 2014 May-Jun;99(3):211-5. (査読あり)
 20. Fujii T, Yajima R, Morita H, Tsutsumi S, Asao T, Kuwano H. A rare case of anterior chest wall schwannoma masquerading as a breast tumor. Int Surg. 2014;99(3):196-9. (査読あり)
 21. Fujii T, Yajima R, Morita H, Yamaguchi S, Tsutsumi S, Asao T, Kuwano H. Adenoma of the nipple projecting out of the nipple: curative resection without excision of the nipple. World J Surg Oncol. 2014 Apr 10;12:91. (査読あり)

22. Fujii T, Yajima R, Hirakata T, Miyamoto T, Fujisawa T, Tsutsumi S, Yanagita Y, Iijima M, Kuwano H. Impact of the prognostic value of vascular invasion, but not lymphatic invasion, of the primary tumor in patients with breast cancer. *Anticancer Res.* 2014 Mar;34(3):1255-9. (査読あり)
23. Fujii T, Morita H, Yamaguchi S, Tsutsumi S, Asao T, Kuwano H. A rare case of granular cell tumor of the anal region: diagnostic difficulty to masses in the anal area. *Int Surg.* 2014 Jan-Feb;99(1):45-7. (査読あり)
24. Fujii T, Yajima R, Yamaguchi S, Yanagita Y, Fujisawa T, Hirakata T, Tsutsumi S, Asao T, Iijima M, Kuwano H. Extracapsular invasion of sentinel lymph nodes is not associated with disease recurrence in breast cancer. *Int Surg.* 2014 Jul-Aug;99(4):305-8. (査読あり)
25. Fujii T, Yajima R, Takada T, Sutoh T, Morita H, Yamaguchi S, Tsutsumi S, Kuwano H. Serum albumin and prealbumin do not predict recurrence in patients with breast cancer. *Anticancer Res.* 2014 Jul;34(7):3775-9. (査読あり)
26. Fujii T, Sutoh T, Morita H, Yajima R, Yamaguchi S, Tsutsumi S, Asao T, Kuwano H: Vascular invasion, but not lymphatic invasion, of the primary tumor is a strong prognostic factor in patients with colorectal cancer. *Anticancer Res.* 2014 Jun;34(6):3147-51. (査読あり)
27. Fujii T, Yajima R, Morita H, Yamaguchi S, Tsutsumi S, Asao T, Kuwano H. FDG-PET/CT of schwannomas arising in the brachial plexus mimicking lymph node metastasis: report of two cases. *World J Surg Oncol.* 2014 Oct 12;12:309. (査読あり)
28. Fujii T, Morita H, Sutoh T, Takada T, Tsutsumi S, Kuwano H. Arteriovenous malformation detected by small bowel endoscopy. *Case Rep Gastroenterol.* 2014 Oct 17;8(2):324-8. (査読あり)
- 〔学会発表〕(計 23 件)
1. 藤井孝明: FDG-PET 偽陰性例の検討: FDG 非集積乳癌の臨床病理学的特徴. 第 53 回日本癌治療学会学術集会 2016.10.21
 2. 藤井孝明: 乳癌腋窩リンパ節転移例における腋窩 FDG 集積の意義. 第 24 回日本乳癌学会学術総会 2016.6.16-18
 3. 藤井孝明: 乳癌センチネルリンパ節生検における FDG-PET によるリンパ節転移、節外浸潤評価. 第 116 回日本外科学会定期学術集会 2016.4.14-16
 4. 藤井孝明: 乳癌の脈管浸潤評価における Iy 因子, v 因子個別評価の意義. 第 22 回日本乳癌疾患研究会 2016.2.26-27
 5. 藤井孝明: 症状出現から乳癌治療開始までの期間が乳癌進展, 予後に及ぼす影響. 第 77 回日本臨床外科学会総会 2015.11.26-28
 6. 藤井孝明: FDG-PET による乳癌腋窩リンパ節転移, センチネルリンパ節転移評価. 第 78 回日本臨床外科学会総会 2016.11.24
 7. 藤井孝明: 非腫瘍形成性の術前 DCIS 診断例における FDG-PET による浸潤評価の可能性. 第 53 回日本癌治療学会学術集会 2015.10.29-31
 8. 藤井孝明: 術前 CT による 3 次元画像処理装置を用いた乳房容量測定を試み. 第 3 回日本乳房オンコプラスティックサージャリー学会総会 2015.9.3-4
 9. 藤井孝明: 直腸腫瘍に対する経肛門的局所切除の適応と有用性. 第 71 回日本消化器外科学会総会 2016.7.14-16
 10. 藤井孝明: FDG-PET により検出された褐色脂肪組織と乳癌の臨床病理学的因子との関連. 第 24 回日本乳癌学会学術総会 2015.7.3-5
 11. 藤井孝明: エベロリムス投与による ALP 値の変動. 第 27 回日本内分泌外科学会総会 2015.5.28-29

12. 藤井孝明:大腸癌のリンパ節転移予測:ly 因子の重要性. 第 82 回大腸癌研究会 2015.1.23
13. 藤井孝明:副甲状腺嚢胞を伴う腺腫により副甲状腺機能亢進症を呈した一例:MIBI シンチグラフィ陰性例に対する小型ガンマカメラの有用性. 第 47 回日本甲状腺外科学会学術集会 2014.10.30-31
14. 藤井孝明:大腸癌の脈管浸潤の評価による転移再発予測:vascular invasion の重要性
15. 第 69 回大腸肛門病学会学術集会 2014.11.7-11.8
16. 藤井孝明:人工物を用いた乳房一次再建:下垂乳房に対する再建の工夫. 第 68 回手術手技研究会 2014.5.16-17
17. 藤井孝明:脈管浸潤の評価による乳癌の転移再発予測:vascular invasion の重要性. 第 22 回日本乳癌学会学術総会 2014.7.10-12
18. 藤井孝明:上縦隔リンパ節腫大にて発見された甲状腺癌の 2 例:FDG-PET の有効性. 第 26 回日本内分泌外科学会総会 2014.5.22-23
19. 藤井孝明:副甲状腺嚢胞を伴う腺腫により副甲状腺機能亢進症を呈した一例:MIBI シンチグラフィ陰性例に対する小型ガンマカメラの有用性. 第 69 回手術手技研究会 2014.5.16-17
20. 藤井孝明:乳癌センチネルリンパ節転移における節外浸潤の腋窩リンパ節転移予測の可能性. 第 114 回日本外科学会定期学術集会 2014.4.2-4
21. 藤井孝明:大腸癌の再発予測因子としての血清アルブミン、プレアルブミン値の意義. 第 10 回日本消化管学会学術集会 2014.2.14-15
22. 藤井孝明:リンパ節転移陽性乳癌におけるvascular invasion の重要性. 第 52 回日本癌治療学会学術集会 2014.8.28-30
23. 藤井孝明:人工物を用いた乳房一次再建:下垂乳房に対する再建の工夫. 第 76 回日本臨床外科学会総会 2014.11.20-22

24. 藤井孝明:大腸癌内視鏡治療後追加切除施行例の検討:当科における治療成績

25. 第 69 回日本消化器外科学会総会 2013.7.16-18

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤井 孝明(Takaaki Fujii)

群馬大学 医学部附属病院 助教

研究者番号: 40507331

(2) 研究分担者

堤 荘一(Soichi Tsutsumi)

群馬大学 医学部附属病院 講師

研究者番号: 30323356

茂木 晃(Akira Mogi)

群馬大学 大学院医学系研究科 准教授

研究者番号: 10323362