

学位論文の要旨

学位の種類	博士	氏名	佐々木 高明
学位論文題目			
<p>Administration of VEGF Receptor Tyrosine Kinase Inhibitor Increased VEGF Production Causing Angiogenesis in Human Small-Cell Lung Cancer Xenografts: A Novel Mechanism of Drug Resistance</p> <p>(小細胞肺癌治療における血管内皮増殖因子受容体阻害薬による耐性機序の解明)</p>			
共著者名			
丹野幸恵、渋川紀代子、長内忍、川辺淳一、大崎能伸			
未公表			
<u>研究目的</u>			
<p>生体での血管新生は、おもに血管内皮成長因子（VEGF）によって調節されている。VEGFは生体の正常組織ばかりではなく、悪性腫瘍の増殖、腫瘍血管新生においても重要な役割を果たしている。VEGF受容体(VEGFR)を阻害することで腫瘍血管新生を標的としたいわゆる「血管新生阻害療法」が注目を浴びており、従来 of 進行癌に対する標準的治療と併用することで、腫瘍縮小効果や生存延長効果を示すと報告されている。しかし、この血管新生阻害療法に対して抵抗性を示す腫瘍があり、効果を予測する因子については明らかにされていない。</p> <p>本研究の目的は、血管新生阻害薬の1つである、VEGFR2受容体の特異的なチロシンリン酸化阻害薬、Vandetanibによるヒト小細胞肺癌に対する①抗腫瘍効果を検討し、②耐性機序を解明し、③これを克服する治療戦略を模索することである。</p>			

材 料 ・ 方 法

◆ 試薬

Vandetanib (Zactima™; ZD6474)はアストラゼネカ社から提供された。

本薬剤のIC₅₀値はVEGFR-2 40 nM, VEGFR-3 110 nM, 上皮成長因子 (EGF) 受容体(EGFR) 500 nM, VEGFR-1 1600 nMである。

◆ 細胞株と細胞培養

ヒト小細胞肺癌(hSCLC)細胞株は2種類 (SBC-1株とMS-1-L株)を使用した。いずれもヒューマンサイエンス研究資源バンク (大阪) より分与された。

細胞培養の培地は、RPMI-1640+10% FBSを使用、37℃、95% 空気/5% CO₂の条件でインキュベートし、培地交換は週2回、細胞は1:5の割合で希釈した。

◆ 無胸腺免疫不全マウス (ヌードマウス) の皮下移植片 (Xenograft) 作成と Vandetanib投与
5週齢メスの無胸腺BALB/c-nu/nu マウスにSBC-1株と MS-1-L株それぞれ5x10⁴個を背部へ皮下注射した。治療群(n=4-8)では移植7-14日目より50, 25, 12.5 mg/kg/日のVandetanibを3週間連日経口投与し、対照群(n=4-7)と比較した。以下、50 mg/kgを治療A群、25 mg/kgを治療B群、12.5 mg/kgをC群とする。腫瘍体積は (長さ x 幅 x 幅 x 0.5) の式で算出した。

◆ 腫瘍組織の病理学的検索

摘出した腫瘍標本は、H&E染色と抗CD31抗体による蛍光免疫染色を行った。腫瘍内の新生血管数を高倍率1視野中の血管数として計測し、5視野の平均値をMean Vascular Density (MVD)として表した。

◆ 逆転写 PCR 法

hSCLCからTotal RNAを抽出しone-step RT-PCR kitを用いVEGF, VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3, EGFR, β-actinにそれぞれ特異的なプライマーを用い、逆転写PCRを行った。このPCR産物を1.5%アガロースゲルで電気泳動しmRNA発現を確認した。

◆ hSCLC 株の VEGFR、EGFR 遺伝子変異の検索

ダイレクトシーケンス法で、VEGFR、EGFRのチロシンリン酸化部位の遺伝子変異の有無を確認した。VEGFR2はexon 24をEGFRはexon 18, 19, 21を検索した。DNAを抽出しBig-DyeでサイクルシーケンスしABI310 Genetic Analyzerで塩基配列を確認し、正常ヒト遺伝子配列のデータベース (EGFR; NM_005228, VEGFR2; NM_002253) と比較した。

◆ hSCLC の増殖因子産生能の評価

2.5 x 10⁶個の細胞を10cm dishに培養しVandetanib投与72時間後、培養上清を回収し、以下の方法で検討した。

● 抗体アレイ

Growth Factor Antibody Array I (Raybio社) を使い、血管新生因子41種類を同時に検出した。

● ELISA 法

VEGF₁₆₅の定量はQuantikine® VEGF, Human, ELISAキット (R&D System社)を使用し測定した。検出限界は0.64 pg/mlであった。

成 績

1. In vivo での Vandetanib による抗腫瘍効果

SBC-1株とMS-1-L株を用いて、ヌードマウス異種腫瘍移植モデルを作成し、対照群(n=4)と治療群(n=4-6)の移植した腫瘍体積を比較した。SBC-1株では、腫瘍体積 (mm³, mean±S.E.M)は対照群で382±101, 治療A群で15.6±31.3, 治療B群で282±380, 治療C群で312±159と、治療A-B群において腫瘍の増殖が抑制された(p<0.05)。一方、MS-1-L株では対照群で840±188, 治療A群で1054±318, 治療B群で700±186, 治療C群で300±133と、治療C群では、対照群に比較して有意に腫瘍縮小効果を認めたが(p<0.05)、治療A群では、腫瘍体積は増加した。

治療3週間後に移植片を摘出し病理学的に検討した。対照群と治療A群を比較すると、H&E染色標本では、SBC-1株では、いずれも中心壊死はわずかであったが、MS-1-L株では、治療A群で腫瘍の中心部に出血変性壊死を伴っていた。MVDは、SBC-1株では対照群で33.2±0.7、治療A群で3.8±0.7と減少(p<0.01 n=5)したが、MS-1-L株では血管新生減少の程度は有意ではなかった。

2. 2種類の hSCLC 株の相違点を検討

2.1. VEGF, VEGFR, EGFR の発現

SBC-1株とMS-1-L株においてmRNAの発現を検討した。VEGFRはVEGFR1, VEGFR2, VEGFR3についてそれぞれ検討した。この結果、SBC-1株では、VEGFR2は発現していたが、MS-1-L株ではmRNAの発現が確認できなかった。VEGF、VEGFR1、VEGFR3、EGFRは両者の培養株ともに発現がみられた。

2.2. VEGFR2、EGFR の遺伝子変異検索

SBC-1株とMS-1-L株のそれぞれについて、チロシンリン酸化阻害薬結合部位のDNA遺伝子変異を検索した。VEGFR2はexon 24をEGFRはexon 18, 19, 21を検索したが遺伝子変異は認められなかった。

3. hSCLC が産生する血管新生促進因子の検討

3.1. 抗体アレイによる血管新生促進因子の検討

Vandetanib (10μM) 投与下における、SBC-1株とMS-1-L株が産生する血管新生促進因子の相違性を抗体アレイを用いて検討した。その結果、SBC-1株に対するMS-1-L株の産生濃度比で表すと、MS-1-L株でPDGF-AAは9.3倍、VEGFは4.6倍、PIGFは4.4倍強く産生していた。

3.2. ELISA 法による VEGF 産生量の検討

SBC-1株とMS-1-L株において対照群とVandetanib投与群の培養上清中のVEGF濃度をELISA法を用いて測定した。SBC-1株では対照群、投与群(10μM)ではそれぞれ437±0.2対879±14.7(pg/ml Mean±S.E.M)と2倍程度の上昇であったが、MS-1-L株では986±6.6対3009±18.2と3.1倍の増加を示した。MS-1-L株のVandetanib投与によるVEGF上昇は0.1~1μMまでは認められなかったが、10~25μMでは約3倍に上昇した。

考 案

血管新生阻害薬は、腫瘍血管新生を抑制することで腫瘍増殖に必要な栄養や酸素の供給を断って抗腫瘍効果を示すため、がんの組織型に関わらず有効であるとされてきた。しかし、本研究においては、治療A群では、SBC-1株では移植腫瘍の増殖を抑制したが、MS-1-L株では効果を認めなかった。

血管新生阻害薬に対する耐性獲得の機序の1つに、薬剤が腫瘍内部の血管新生を抑制して、低酸素領域が増大し、腫瘍から産生される低酸素反応性の血管新生因子が増加するという報告がある⁽¹⁾。そのため本研究ではがん細胞自体の血管新生阻害薬に対する反応性に注目して検討を行った。

腫瘍の増殖因子阻害に対する耐性機序には、①標的となる受容体の遺伝子変異⁽²⁾、②抑制された増殖シグナル以外の増殖因子が代償的に増加すること⁽³⁾、などが知られている。これらの点について検討したところ使用した細胞株では①遺伝子変異はなく、②耐性株では薬剤投与で、VEGF, PDGF, PIGFなど血管新生促進因子など多くの増殖因子の産生が亢進していた。さらに、血管新生にもっとも重要な増殖因子とされるVEGFについて検討すると、VEGFR阻害薬の濃度の増加に伴いVEGF産生が亢進することを見出した。

そこで、この耐性株に対してin vivoでの耐性克服のために、VEGFR阻害薬を低用量（治療C群）で連日投与した。この結果、対照群や高用量(治療A-B群)に比較して、有意な腫瘍縮小効果を認めた。

結 論

VEGFR阻害薬による耐性の機序の1つは、薬剤負荷により血管新生を促進する増殖因子が代償的に増加することで、腫瘍血管の新生を維持している可能性が示された。また、VEGFR阻害薬の使用による増殖因子の増加は低用量の薬剤を持続的に用いることで回避できる可能性が示された。

引 用 文 献

1. Kesisis, G., Broxterman, H., Giaccone, G. Angiogenesis inhibitors. Drug selectivity and target specificity. *Curr Pharm Des*, 2007, 13: 2795-2809.
2. Paez, J. G., Janne, P. A., Lee, J. C., et al. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science*, 2004, 304: 1497-1500.
3. Casanovas, O., Hicklin, D. J., Bergers, G., et al. Drug resistance by evasion of antiangiogenic targeting of VEGF signaling in late-stage pancreatic islet tumors. *Cancer Cell*, 2005, 8: 299-309.

学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第 号		
学位の種類	博 士 (医学)	氏 名	佐々木 高明
審査委員長 小川 勝 洋 ㊟			
審査委員 牛 首 文 隆 ㊟			
審査委員 長谷部 直 幸 ㊟			
審査委員 大 崎 能 伸 ㊟			
学 位 論 文 題 目			
<p>Administration of VEGF Receptor Tyrosine Kinase Inhibitor Increased VEGF Production Causing Angiogenesis in Human Small-Cell Lung Cancer Xenografts: A Novel Mechanism of Drug Resistance (小細胞肺癌治療における血管内皮増殖因子受容体阻害薬による耐性機序の解明)</p>			
<p>生体内での血管新生を調節する血管新生因子 (VEGF) は正常組織ばかりではなく、悪性腫瘍の増殖や腫瘍血管新生にも関わっている。VEGF が VEGF レセプター (VEGFR) に結合するとレセプターに備っているチロシンキナーゼが活性化して細胞内に増殖シグナルが伝達される。近年、VEGFR を標的とした血管新生阻害剤が開発されており、その癌治療効果が期待されている。</p> <p>本学位論文提出者は、ヒト肺小細胞癌株を用いて VEGFR2 のリン酸化を特異的に阻害する vandetanib の効果及び耐性のメカニズムを検討した。VEGFR2 を発現する SBC-1 株ではヌードマウスに移植後、vandetanib 投与により腫瘍体積の減少と腫瘍内血管の減少が見られたが、VEGFR2 を発現していない MS-1-L 株では vandetanib 低用量では腫瘍体積が減少したものの、高用量ではむしろ増加し、また、腫瘍内血管の減少は見られなかった。培養条件下では、SBC-1、MS-1-L 株ともに vandetanib 処理により PDGF-AA, VEGF, PIGF などの増殖因子の発現量が亢進し、この反応は SBC-1 株に比較して MS-1-L 株で顕著であった。</p> <p>以上の結果より癌細胞は vandetanib 処理をすると、代償的に様々な増殖因子を産生して腫瘍血管の新生を維持している可能性が示唆された。また、vandetanib 低用量では抗腫瘍効果が見られ、増殖因子産生が低いことから投与方法を工夫することにより上記の耐性を回避できる可能性が示めされた。</p> <p>本研究は血管新生阻害剤に抵抗して癌細胞が増殖因子を過剰に産生するというユニークな抗癌耐性のメカニズムを明らかにしたものであり、今後癌の治療戦略を考える上で価値が高い発見である。本論文提出者は当該研究分野に関して広く深い知識有しており、諮問審査においても適切な回答が得られた。よって本審査委員会は本論文が学位論文としてふさわしいものと判定した。</p>			