

平成 22 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究（A）
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19209018
 研究課題名（和文） **血管新生阻害薬の耐性研究**
 研究課題名（英文） Mechanism of acquired drug resistance to VEGFR2 tyrosine kinase inhibitor in vascular endothelial cells
 研究代表者
 西尾 和人 （KAZUTO NISHIO）
 近畿大学・医学部・教授
 研究者番号：10208134

研究成果の概要（和文）：

VEGFR2 チロシンキナーゼ阻害薬耐性血管内皮細胞の樹立に国内外で初めて成功し、分子細胞学的な血管新生阻害薬の耐性メカニズムの一つを明らかにした。薬剤耐性において血管内皮細胞の VEGFR2 発現抑制、および VEGFR2 シグナル依存からのエスケープ現象が耐性メカニズムであることを同定した。また、CEP (CD133, CD117) が血管新生阻害薬の薬力学的バイオマーカーとなることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

- ① HUVEC clones resistant to VEGFR2-TKI Ki8751 exhibited the downregulation of VEGFR2, a decreased signal response to VEGF stimulation, and the loss of vascular endothelial markers. These results strongly suggest that an escape from VEGFR2 signaling-dependency is one of the mechanisms of resistance to VEGFR2-TKI in vascular endothelial cells.
- ② We identified VEGFR2+pTyr+ peripheral blood Leukocytes as a feasible and non-invasive pharmacodynamic biomarker in vivo. Our findings suggest the clinical utility of VEGFR2+pTyr+ PBLs as a VEGF signal-specific biomarker of VEGFR2 tyrosine kinase inhibitors for use in early clinical trials.
- ③ Phase I clinical and biomarker study demonstrated that BIBF 1120-treatment significantly increased percentage of CD133+CD117- cells ($p<0.001$) on Day 29 compared with pre-treatment, and conversely decreased that of CD133-CD117+ cells ($p<0.01$). Our biomarker data provide a novel insight into CD133 and CD117 positive cells as a potential pharmacodynamic biomarker for an anti-angiogenic inhibitor.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	14,500,000	4,350,000	18,850,000
2008年度	11,500,000	3,450,000	14,950,000
2009年度	11,000,000	3,300,000	14,300,000
年度			
年度			
総計	37,000,000	11,100,000	48,100,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・応用薬理学

キーワード：ファーマコゲノミクス、血管新生

1. 研究開始当初の背景

現在のがん治療において、VEGF 中和抗体、VEGFR2 チロシンキナーゼ阻害剤を代表とする血管新生阻害薬は標準的治療の一角を占め、次世代のがん薬物療法を支える分子標的薬となっている。理論的には正常細胞を標的とするため耐性が起こりにくいと考えられてきたが、実地臨床では通常の抗がん剤と同じような耐性の問題が明らかになってきた。これらの耐性メカニズムは明らかにされておらず、基礎血管研究のみならず臨床的にも非常に重要かつ急務の課題であると考えられている。

一方、血管新生阻害薬の効果をモニターするようなバイオマーカー研究は、臨床開発や安全性などの面で近年重視されているが、その臨床的有用性に比較し、血管新生阻害薬のバイオマーカー研究は大きく立ち遅れている。近年の基礎研究により骨髄由来血管内皮前駆細胞 (CEP) が血管新生に重要な働きを示す知見が報告されている。VEGFR2 を発現する CEP を血管新生阻害薬のバイオマーカーに利用する試みは行われていない。以上の知見を基に①血管新生阻害薬の耐性研究、②血管新生阻害薬バイオマーカー探索、③血管新生阻害薬バイオマーカー臨床研究の3項目を計画した。

2. 研究の目的

- ①血管新生阻害薬耐性血管内皮細胞株の樹立と耐性獲得機構の解析
- ②マウス薬剤血管新生阻害剤連続投与モデルにおけるバイオマーカーの探索
- ③血管新生阻害剤の第 I 相臨床試験における CEP バイオマーカーの意義を明らかにする。

3. 研究の方法

①ヒト血管内皮細胞 (HUVEC) に対して *TERT* 遺伝子を導入し不死化 HUVEC を樹立した。この細胞に対して MNNG を暴露後に VEGFR2 チロシンキナーゼ阻害剤である Ki8751 を 5 μ M で 4 日間暴露し、生存した HUVEC 細胞をクローン化して樹立した。得られた耐性クローン HUVEC と親株 HUVEC 間での細胞生物学的な差異を、ウエスタンブロット、realtime RT-PCR、マイクロアレイ (東レ, 3D-GeneTM Human Oligo Chip 25k)、細胞増殖試験などを用いて評価した。

②ヌードマウスに対して肝細胞癌 HepG2 を移植した担癌マウスに対して新規 VEGFR2 チロシンキナーゼ阻害剤である BIBF1120 を経口投与する (生食 or 50 or 100 mg/kg/day)。

14 日間連続投与後にマウス末梢血に対して、薬力学的効果に対するバイオマーカーを得るためにフローサイトメトリーを用いて VEGFR2⁺CD45^{dim} 末梢血白血球および VEGFR2⁺pTyr⁺末梢血白血球の分画を検討する。pTyr 抗体は、チロシンキナーゼのリン酸化を検出するもので、VEGFR2 と 2 重染色することで薬剤による直接的な効果である VEGFR2 リン酸化抑制を検出することを目的として、最適化を行う。

③新規 VEGFR2 チロシンキナーゼ阻害剤

BIBF1120 に対する第 I 相臨床試験において、治療前、治療後 (day1, day2, day8, day29) の 5 ポイントで採血を行い、薬剤による末梢血の CEP 変化を検討する。方法としては 4 色フローサイトメトリーを用いて末梢血 CD34+CD45dim 細胞に対して、CD133 および CD117/c-kit で展開して薬剤による変化を検出する。CEP 細胞の CD133 および CD117 の発現量と、薬剤 AUC 値、血中トラフ値、抗腫瘍効果などの臨床情報との相関解析を行う。

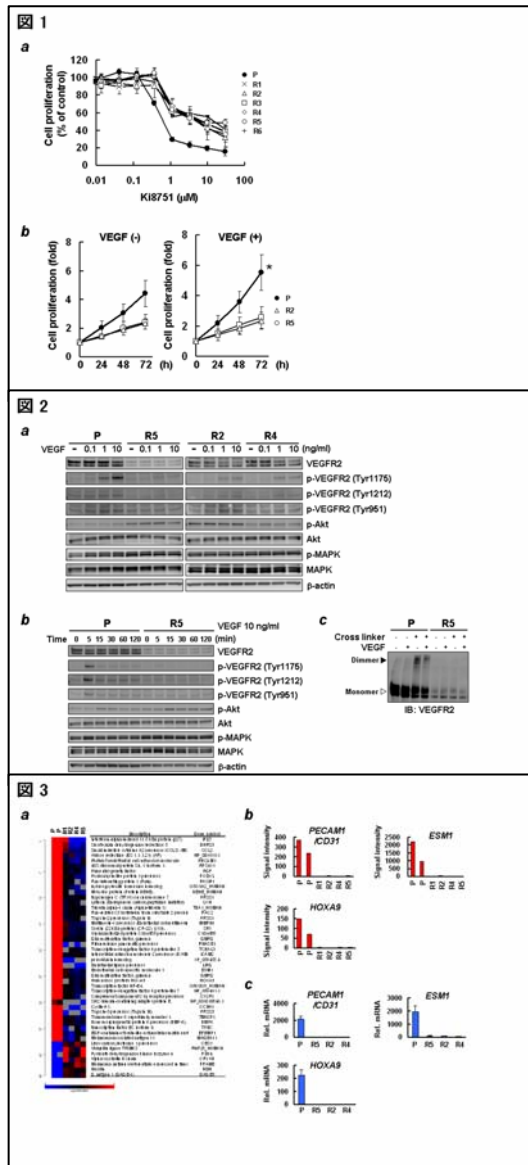
4. 研究成果

①血管新生阻害薬耐性血管内皮細胞株の樹立と耐性獲得機構の解析

血管新生阻害薬耐性 HUVEC として、10 倍薬剤耐性の 5 クローン (R1, R2, R4, R5, R6) を得た。これらの耐性クローンは、VEGF 刺激に対する細胞増殖亢進能がほぼ欠失していた (図 1)。次に耐性クローンの受容体発現の検討では、PDGFR-beta, KIT, EGFR, HER2, HER3 はほとんど変化しなかったのに対して、2 つの耐性クローン (R5, R6) では VEGFR2 の発現が著明に低下していた (図 2)。VEGFR2 発現低下クローン R5 では、VEGF 刺激に対する VEGFR2 リン酸化反応および VEGFR2 の 2 量体形成能が低下しており、VEGFR2 シグナルに対する反応が著明に低下していた (図 2)。さらに、VEGFR2 チロシンキナーゼ阻害薬による AKT のリン酸化阻害は約 10 倍低下していた。以上から、VEGFR2 チロシンキナーゼ阻害剤の耐性においては、一部の耐性クローンでは VEGFR2 発現自体の抑制が見られたこと、VEGFR2 発現が維持されている耐性クローンでも VEGFR2 シグナルの反応性が低下していることが耐性メカニズムの一つであることが判明した。マイクロアレイによる検討では、PECAM1/CD31, HOXA9, ESM1 を含むいくつかの血管新生特異的分子の遺伝子発現が、親株と比較してすべての耐性クローンにおいて

1/20 以下まで著明に低下していた (図3)。この結果は、耐性クローンは血管内皮としての特異的な機能を失っていることを強く示唆していた。

以上の結果から、VEGFR2 の発現抑制および VEGFR2 シグナルからのエスケープ現象が血管内皮細胞における VEGFR2 チロシンキナーゼ阻害薬の耐性メカニズムの一つであることが明らかになった (投稿中)。

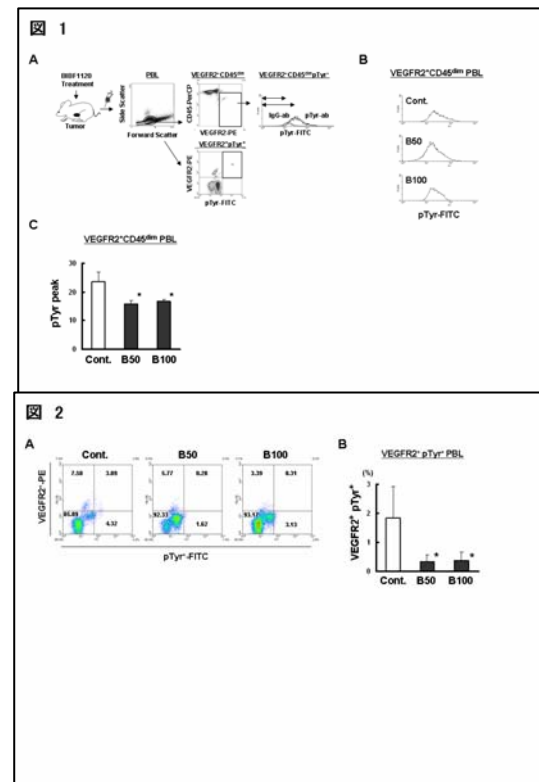


②マウス薬剤血管新生阻害剤連続投与モデルにおける薬剤バイオマーカーの探索

肝細胞癌HepG2 を移植した担癌マウスに対して新規VEGFR2 チロシンキナーゼ阻害剤であるBIBF1120 を経口投与し(各群8匹, 50 or 100 mg/kg/day)、腫瘍径を計測すると、BIBF1120 は有意に、腫瘍血管新生の抑制および抗腫瘍効果を示した。その14日間連続投

与後のマウス末梢血に対して、薬力学的効果に対するバイオマーカーを得るためにフローサイトメトリーを用いてVEGFR2⁺CD45^{dim} 末梢血白血球を検討した。VEGFR2⁺CD45^{dim}末梢血白血球にVEGF刺激を加え、pan-tyrosineリン酸化を検討すると、BIBF1120 投与マウス群では非投与マウス群と比較して有意に VEGFR2⁺CD45^{dim}末梢血白血球のリン酸化が抑制されていたが、その差は小さく、臨床応用は難しいと判断した (図1)。

次に、CD45 マーカーをはずしてVEGFR2⁺末梢血白血球のリン酸化変動をフローサイトメトリーを用いて検討すると、BIBF1120 投与マウス群では有意にVEGFR2⁺末梢血白血球のリン酸化が抑制されていた (図2)。この結果は、薬剤のダイレクトなVEGFR2 リン酸化抑制効果を代理組織の末梢血白血球で検出していることから、薬力学的な効果を反映するバイオマーカーとして有用であると結論した。特に薬力学的作用の証明(POC)や血管新生阻害効果のモニターが必要とされる臨床第I相試験において有用であると考えられる(国際特許出願、投稿中)。

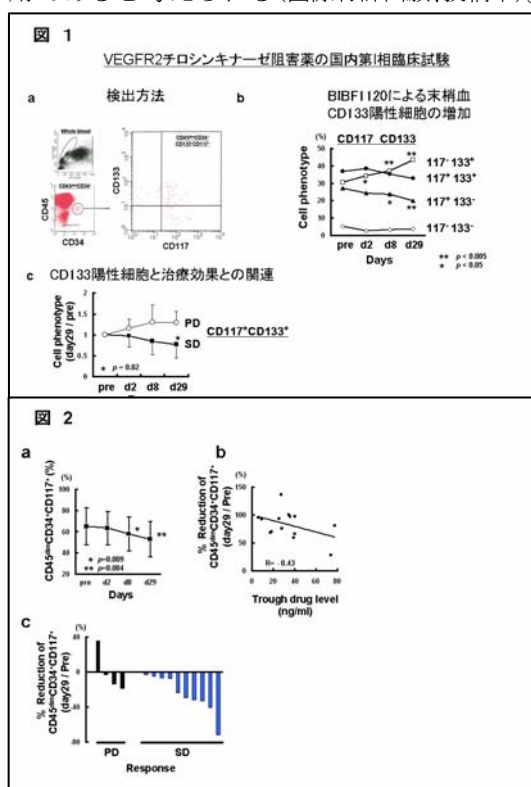


③血管新生阻害剤の第I相臨床試験におけるCEPバイオマーカーの意義

VEGFR2 チロシンキナーゼ阻害薬の国内第I相臨床試験の付随バイオマーカー研究において、CEP がバイオマーカーになり得るかどうかを検討した。薬剤投与前後の変動では、CD133 陽性 CEP が VEGFR2 チロシンキナーゼ阻

害薬治療により有意に増加し ($p < 0.001$)、CD117 も有意に減少することを明らかにした (図 1)。

次に、CD117 は VEGFR2 チロシンキナーゼ阻害薬の標的受容体の一つと考えられており、薬力学的効果との関連を検討した。CD117 陽性 CEP の薬剤投与後の減少率は、血中 AUC との相関は見られなかったが、血中トラフ値と有意に相関した (図 2)。また、臨床効果との関連を検討すると、症例が少ないので確定的ではないが、CD117 陽性細胞が投与後に減少しない症例は、薬剤の抗腫瘍効果も不良である傾向が確認された (図 2)。トラフ値など薬力学的効果を反映するバイオマーカーは現在までに報告されておらず、本研究で初めて特定した。以上の結果は、CD133 と CD117 に規定される CEP が血管新生阻害剤の臨床的な薬力学的バイオマーカーになりうることを初めて示したものであり、米国臨床腫瘍学会 (ASCO2009#3572) で報告した (投稿中)。本アプローチは、特に薬力学的効果の証明が必要とされる早期臨床試験においてきわめて有用であると考えられる (国際特許出願、投稿中)。



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 44 件)

すべて査読有

- 1) Kaneda H, Arao T, Tanaka K, Tamura D, Aomatsu K, Kudo K, Sakai K,

Velasco MA, Matsumoto K, Fujita Y, Yamada Y, Tsurutani J, Okamoto I, Nakagawa K, Nishio K. FOXQ1 is overexpressed in colorectal cancer and enhances tumorigenicity and tumor growth. *Cancer Res*, E-pub ahead or print, 2010.

- 2) Matsumoto K, Arao T, Tanaka K, Kaneda H, Kudo K, Fujita Y, Tamura D, Aomatsu K, Tamura T, Yamada Y, Saijo N, Nishio K. mTOR signal and hypoxia-inducible factor-1 alpha regulate CD133 expression in cancer cells. *Cancer Res*, 69(18): 7160-4, 2009.
- 3) Hosoi F, Izumi H, Kawahara A, Murakami Y, Kinoshita H, Kage M, Nishio K, Kohno K, Kuwano M, Ono M. N-myc downstream regulated gene 1/Cap43 suppresses tumor growth and angiogenesis of pancreatic cancer through attenuation of inhibitor of kB kinase β expression. *Cancer Res*, 69(129): 4983-91, 2009.
- 4) Matsumoto K, Shimizu C, Arao T, Andoh M, Katsumata N, Kohno T, Yonemori K, Koizumi F, Yokote H, Aogi K, Tamura K, Nishio K, Fujiwara Y. Identification of predictive biomarkers for response to Trastuzumab using plasma FUCA activity and N-Glycan identified by MALDI-TOF-MS. *J Proteome Res*, 8(2): 457-62, 2009.
- 5) Tanaka K, Arao T, Maegawa M, Matsumoto K, Kaneda H, Kudo K, Fujita Y, Yokote H, Yanagihara K, Yamada Y, Okamoto I, Nakagawa K, Nishio K. SRPX2 is overexpressed in gastric cancer and promotes cellular migration and adhesion. *Int J Cancer*, 124(5): 1072-80, 2009.
- 6) Honma K, Iwao-Koizumi K, Takeshita F, Yamamoto Y, Yoshida T, Nishio K, Nakagawa S, Kato K, Ochiya T. RPN2 gene confers docetaxel resistance in breast cancer. *Nature Med*, 14(9): 939-48, 2008.
- 7) Yamada Y, Arao T, Gotoba T, Taniguchi H, Oda I, Shirao K, Shimada Y, Hamaguchi T, Kato K, Hamano T, Koizumi F, Tamura T, Saito D, Shimoda T, Saka M, Fukagawa T, Katai H, Sasako M, Nishio K. Identification of prognostic biomarkers in gastric cancer using endoscopic biopsy samples. *Cancer Sci*, 99(11): 2193-9, 2008.
- 8) Fuukai J, Yokote H, Yamanaka R, Arao

- T, Nishio K, Itakura T. EphA4 promotes cell proliferation and migration through a novel EphA4-FGFR1 signaling pathway in the human glioma U251 cell line. Mol Cancer Ther, 7(9): 2768-78, 2008.
- 9) Fujii T, Kawahara A, Basaki Y, Hattori S, Nakashima K, Nakano K, Shirouzu K, Kohno K, Yanagawa T, Yamada H, Nishio K, Ono M, Kuwano M, Kage M. Expression of HER2 and estrogen receptor alpha depends upon nuclear localization of Y-box binding protein-1 in human breast cancers. Cancer Res, 68(5): 1504-12, 2008.
 - 10) Nakayama T, Hieshima K, Arao T, Jin Z, Nagakubo D, Shirakawa A-K, Yamada Y, Fujii M, Oiso N, Kawada A, Nishio K, Yoshie O. Abberant expression of Fra-2 promotes CCR4 expression and cell proliferation in adult T-cell leukemia. Oncogene, 27(33): 3221-32, 2008.
 - 11) Kimura H, Sakai K, Arao T, Shimoyama T, Tamura T, Nishio K. Antibody-dependent cellular cytotoxicity of cetuximab against tumor cells with wild-type of mutant epidermal growth factor receptor. Cancer Sci, 98(8): 1275-80, 2007.
 - 12) Takeda M, Arao T, Yokote H, Komatsu T, Yanagihara K, Sasaki H, Yamada Y, Tamra T, Fukuoka K, Kimura H, Saijo N, Nishio K. AZD2171 shows potent antitumor activity against gastric cancer over-expressing FGFR2/KGFR. Clin Cancer Res, 13(10): 3051-7, 2007.

他 32 件

[学会発表] (計 73 件)

- 1) Nishio K. Use of amplification of the 8q24 and 20q11-13 loci to predict progression-free survival of advanced epithelial ovarian cancer patients receiving standard therapy. American Society of Clinical Oncology 45th Annual Meeting 2009, Orlando, 5.29-6.2.2009.
- 2) Nishio K. Correlation of FcR IIa-H131R and IIIa-V158F polymorphisms and clinical outcome of trastuzumab in both neoadjuvant and metastatic setting in patients with HER-2 positive breast cancer. American Society of Clinical Oncology 45th Annual Meeting 2009, Orlando,

5.29-6.2.2009.

- 3) Nishio K. Phase I dose escalation study and biomarker analysis of E7080 in patients with advanced solid tumors. American Society of Clinical Oncology 45th Annual Meeting 2009, Orlando, 5.29-6.2.2009.
- 4) Nishio K. Identification of prognostic biomarkers for gastric cancer by gene expression analysis. American Society of Clinical Oncology 45th Annual Meeting 2009, Orlando, 5.29-6.2.2009.
- 5) Nishio K. A phase I and pharmacokinetic/pharmacodynamic study of vorinostat (suberoylanilide hydroxamic acid, SAHA) in Japanese patients with solid tumor. American Society of Clinical Oncology 45th Annual Meeting 2009, Orlando, 5.29-6.2.2009.
- 6) Nishio K. Phase I dose escalation study of E7080, a novel anti-angiogenic multikinase inhibitor, in Japanese patients with advanced solid tumors. American Society of Clinical Oncology 45th Annual Meeting 2009, Orlando, 5.29-6.2.2009.

他 67 件

[図書] (計 8 件)

- 1) 西尾和人、入門腫瘍内科学 新しい分子マーカー (遺伝子発現プロファイル・CTC)、篠原出版新社、2009.10.1. 共著・編集

他 7 件

[産業財産権]

○出願状況 (計 2 件)

- 1) 名称: ロタキサン化合物及び抗ガン剤
発明者: 西尾和人、他
権利者: 近畿大学、他
種類: 特許権
番号: PCT/JP2009/005503
出願年月日: 2009 年 10 月 21 日
国内外の別: 国外
- 2) 名称: 治療効果観察のためのバイオマーカー使用方法又はシステム
発明者: 西尾和人、他
権利者: 近畿大学、他
種類: 特許権
番号: EP 09154964.2
出願年月日: 2009 年 4 月 5 日
国内外の別: 国外

○取得状況 (計 7 件)

- 1) 名称：胃癌の判定方法
発明者：西尾和人、荒尾徳三、他
権利者：近畿大学、他
種類：特許権
番号：特許公開 2009-276153
取得年月日：2009年11月26日
国内外の別：国内
- 2) 名称：N 結合型糖鎖を利用した膵臓癌の
診断方法
発明者：西尾和人、荒尾徳三、他
権利者：近畿大学、他
種類：特許権
番号：特許公開 2009-270996
取得年月日：2009年11月19日
国内外の別：国内
- 3) 名称：5 員複素環化合物を有効成分とする
抗ガン剤および新規 5 員複素環化
合物
発明者：西尾和人、他
権利者：近畿大学、他
種類：特許権
番号：特許公開 2009-256274
取得年月日：2009年11月5日
国内外の別：国内
- 4) 名称：ErB 受容体薬に対する患者の応答
を予測またはモニタリングする
方法
発明者：西尾和人、他
権利者：アストラゼネカ、他
種類：特許権
番号：特許公表 2009-511008
取得年月日：2009年3月19日
国内外の別：国内
- 5) 名称：抗癌剤の有効性予測方法
発明者：西尾和人、他
権利者：近畿大学、他
種類：特許権
番号：特開 2009-244147
取得年月日：2009年10月22日
国内外の別：国内
- 6) 名称：抗癌剤の有効性予測方法
発明者：西尾和人、荒尾徳三、他
権利者：住友ベークライト、他
種類：特許権
番号：特開 2009-050189
取得年月日：2009年3月12日
国内外の別：国内
- 7) 名称：胃癌高発現遺伝子特定による胃癌
診断および創薬への利用

発明者：西尾和人、荒尾徳三、他
権利者：西尾和人、荒尾徳三、他
種類：特許権
番号：特開 2008-118915
取得年月日：2008年5月29日
国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西尾 和人 (NISHIO KAZUTO)
近畿大学・医学部・教授
研究者番号：10208134

(2) 研究分担者

荒尾 徳三 (ARAO TOKUZO)
近畿大学・医学部・講師
研究者番号：20441074