

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 3 月 31 日現在

機関番号：34419

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23701089

研究課題名（和文） Vivo 耐性株による血管新生阻害薬耐性メカニズム

研究課題名（英文） VEGFR2 tyrosine kinase inhibitor (VEGFR2-TKI)-resistant cancer tissue from a cancer-bearing mouse model

研究代表者

木村英晴 (KIMURA HIDEHARU)

近畿大学・医学部・講師

研究者番号：40444202

研究成果の概要（和文）：マウス担癌モデルを用いた VEGFR2 チロシンキナーゼ阻害薬 (VEGFR2-TKI) 耐性がん組織の回収を行った。VEGFR2-TKI である Ki8751 (投与なし, 10 mg/kg/日, 20 mg/kg/日) を投与し、縮小後に再増大した時点で腫瘍組織を回収し、耐性後組織とした。また組織回収時には血漿も回収した。10mg/kg/日群では 6 匹中 3 匹から 8 週および 10 週投与後に耐性後組織を回収することができた (以下耐性群)。耐性群と投与なし群の腫瘍組織から RNA を抽出し、血管新生関連因子 (VEGFA, MET, HGF, IL-8, FGF7, KDR, EGF, FGF1, FGF2, KIT, VEGFB, VEGFC) の遺伝子発現を測定した。そのうち IL-8 で耐性後に遺伝子発現が増加し、VEGFR2, HGF では減少した。IL-8 の血漿中濃度を ELISA 法を用いて測定したところ、耐性群では 40.06 pg/mL で投与なし群では 26.90 pg/mL であり、耐性群で上昇していた。IL-8 は、VEGFR2-TKI 耐性メカニズムに関与することが予想される。

研究成果の概要（英文）：We collected VEGFR2 tyrosine kinase inhibitor (VEGFR2-TKI)-resistant cancer tissue from a cancer-bearing mouse model. We divided the mice into groups that were given the VEGFR2-TKI Ki8751 in a dose of 10 mg/kg/day and 20 mg/kg/day and an untreated control group, and after it had regressed, we collected tumor tissue from the Ki8751 groups and used it resistant tissue. Blood plasma was collected at the time the tissue was collected. It was possible to collect resistant tissue from 3 (resistant group) of the 6 mice in the 10 mg/kg/day group, at 8 weeks after the start of administration. We extracted RNA from the tumor tissue of the resistant group and the control group and measured gene expression of angiogenesis-related factors (*VEGFA*, *MET*, *HGF*, *IL-8*, *FGF7*, *KDR*, *EGF*, *FGF1*, *FGF2*, *KIT*, *VEGFB*, *VEGFC*). Expression of one of the genes, *IL-8*, had increased after resistance developed, and expression of two of the genes, *VEGFR2* and *HGF*, had decreased. Measurement of the plasma concentration of IL-8 by an ELISA yielded a concentration of 40.06 pg/mL in the resistant group and 26.90 pg/mL in the control group, and the concentration in the resistant group was elevated. IL-8 is suspected of being related to the mechanism of VEGFR2-TKI resistance.

交付決定額

(金額単位：円)

|       | 直接経費      | 間接経費       | 合計        |
|-------|-----------|------------|-----------|
| 交付決定額 | 3,400,000 | 1,0200,000 | 4,420,000 |

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・腫瘍診断学

キーワード：VEGFR 阻害剤、血管新生、IL-8

## 1. 研究開始当初の背景

血管新生阻害薬の耐性機序は不明な点が多く、血管内皮細胞の VEGF-VEGFR シグナル依存に対する **Escape** 現象が最も有力な機序として考えられている。血管新生阻害薬の耐性機序を解明するためには、その標的である「血管内皮細胞側」と「腫瘍細胞側」の両方向からのアプローチが重要であると考えられる。

これまでに我々は、正常細胞である「血管内皮細胞側」の耐性機序を解明するための研究を行ってきた。当該研究において、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、耐性血管内皮細胞においては、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。一方、血管新生阻害薬は、遺伝学的にバリエーションの少ない正常細胞由来の腫瘍血管内皮細胞を標的とするにも関わらず、各症例間における効果の差は極めて大きく、血管新生阻害薬の著効例であっても、ほとんど耐性が生じる。この点から、「腫瘍細胞側」の薬剤耐性因子に注目した。腫瘍細胞は遺伝学的にバリエーションが大きく、血管新生減少に伴う低酸素状態への対応などの反応を通して、あるいはケモカインなどの VEGFシグナルとは独立した血管新生因子の発現亢進などを通して、血管新生阻害薬耐性を生じていると考えた。以上からがん細胞株をマウスに移植し、血管新生阻害薬が奏効期から耐性期になった細胞をクローニングし、「**vivo耐性がん細胞株**」として血管新生阻害薬耐性メカニズムを明らかにすることを考案した。

## 2. 研究の目的

(1) 血管新生阻害薬耐性腫瘍細胞株を樹立する (**vivo耐性株**)。

(2) 血管新生阻害薬耐性腫瘍細胞株の耐性獲得機構の解析を行う。

解析結果より血管新生阻害薬耐性に関わるバイオマーカーを同定する。

## 3. 研究の方法

(1) マウス担癌モデルを用いた VEGFR2 チロシンキナーゼ阻害薬耐性腫瘍細胞の樹立

大腸癌細胞株である DLD-1 が移植された担癌マウスを 3 群 (投与なし群, 低用量群 10 mg/kg/日, 高用量群 20 mg/kg/日, それぞれ n=3) に分け、移植された腫瘍組織が 150 mm<sup>3</sup> となった時点から、低用量群もしくは高用量

群には VEGFR2 チロシンキナーゼ阻害薬 (VEGFR2-TKI) である Ki8751 を、投与なし群には生理食塩水を投与した。腫瘍組織が 900 mm<sup>3</sup> となった時点で腫瘍組織を回収した。いったん縮小しその後増大した腫瘍組織を耐性後組織とした。

回収した腫瘍組織から RNA を回収し、逆転写酵素を用いて cDNA を作成した。それらの cDNA 溶液を-20℃で保存した。また組織回収時に、血液を採取し遠心分離にて血漿を分離し-80℃で保存した。

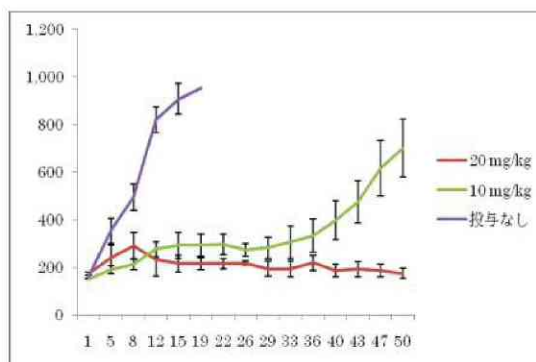
(2) VEGFR2 チロシンキナーゼ阻害薬耐性細胞組織と親株組織との差異の検討

血管新生関連因子の組織内遺伝子発現と血中タンパク濃度を測定した。VEGFR2-TKI 投与群のなか腫瘍組織が縮小後増大を示した群と投与なし群の腫瘍組織から得られた cDNA を用いて、血管新生関連因子 (VEGFA, MET, HGF, IL-8, FGF7, KDR, EGF, FGF1, FGF2, KIT, VEGFB, VEGFC) の遺伝子発現を定量的 PCR 法にて測定した。それらの結果から、耐性に関わることが予測される遺伝子を挙げ、それらに関連するタンパク質の血中濃度を、ELISA 法にて測定された。

## 4. 研究成果

(1) マウス担癌モデルを用いた VEGFR2 チロシンキナーゼ阻害薬耐性腫瘍細胞の樹立 (図 1)

図 1. VEGFR-TKI 投与中の腫瘍体積の推移



投与なし群においては day 12 (n=1) および day 15 (n=2) で腫瘍体積が 900mm<sup>3</sup> を超え、回収された。投与なし群から得られた組織は、親株組織として以降の研究に用いられた。また高用量群では day 8 あたりで一時増大したものの、その後縮小し経過中再増大することなく、腫瘍組織は回収されなかった。低用量群では day 12 あたりにかけて緩やかに増大し、その後安定し、day 33 あたりから再び増大した。day 50 (n=1) および day 54 (n=2)

で腫瘍体積が 900mm<sup>3</sup>を超え、回収された。低用量群から得られた組織は、VEGFR-TKI 耐性細胞組織として以降の研究に用いられた。

(2) VEGFR2 チロシンキナーゼ阻害剤耐性細胞組織と親株組織との差異の検討

耐性細胞組織および親株組織より mRNA が抽出され、以降の測定に十分な回収量を得ることができた (表 1)。

表 1. 抽出された mRNA 濃度

|    | mRNA 濃度 (ng/μl) |        |        |
|----|-----------------|--------|--------|
|    | 耐性細胞            | 689.9  | 482.8  |
| 親株 | 1199.0          | 1474.9 | 1699.6 |

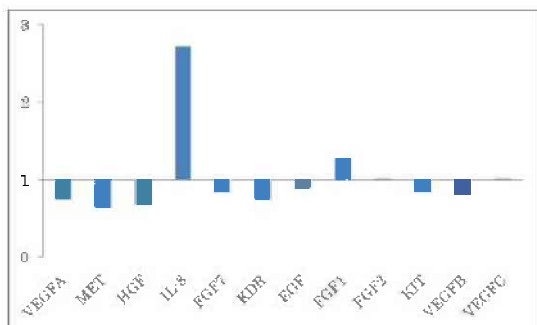
定量的 RT-PCR 法を用いて、血管新生関連因子 (VEGFA, MET, HGF, IL-8, FGF7, KDR, EGF, FGF1, FGF2, KIT, VEGFB, VEGFC) の遺伝子発現を測定した。遺伝子発現値は、GAPDH および測定因子の Ct 値から算出され、例えば VEGFA の発現値の場合には、

$$[Ct_{GAPD}] - [Ct_{VEGFA}] = \Delta Ct$$

$$[\text{expression value}] = 2^{-\Delta Ct}$$

と算出された。親株の発現値に対する耐性細胞の発現比 (耐性細胞発現値/親株発現値) を評価した (図 2)。耐性細胞株の IL-8 発現値は、親株と比較して約 2.7 倍に増加していた。他の因子は、親株と差はなかった。

図 2. 耐性細胞組織における血管新生関連因子の発現比



IL-8 の血漿中濃度を ELISA 法にて測定したところ、低用量群では 40.06 pg/mL で投与なし群では 26.90 pg/mL であり、低用量群すなわち耐性を示した群で上昇していた。

これらの結果から、IL-8 は VEGFR2-TKI 耐性メカニズムに関与することが予想される。我々は次段階として VEGFR2-TKI 耐性克服に向けた研究を計画している。

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 14 件) (すべて査読有り)

- ① Kato H, Arao T, Matsumoto K, Fujita Y, Kimura H, et al. Gene amplification of EGFR, HER2, FGFR2 and MET in esophageal squamous cell carcinoma. Int J Oncol. 2013 Apr;42(4):1151-8.
- ② Hayashi H, Okamoto I, Kimura H, et al. Clinical outcomes of thoracic radiotherapy for locally advanced NSCLC with EGFR mutations or EML4-ALK rearrangement. Anticancer Res 32: 4533-7, 2012.
- ③ Arao T, Ueshima K, Matsumoto K, Nagai T, Kimura H, et al. FGF3/FGF4 amplification and multiple lung metastases in responders to sorafenib in hepatocellular carcinoma. Hepatology. 2012 Aug 13. doi: 10.1002/hep.25956.
- ④ Fujita Y, Suda K, Kimura H, et al. Highly sensitive detection of EGFR T790M mutation using colony hybridization predicts favorable prognosis of patients with lung cancer harboring activating EGFR mutation. J Thorac Oncol 7: 1640-4, 2012.
- ⑤ Sakai K, Okamoto I, Takezawa K, Hirashima T, Kaneda H, Takeda M, Matsumoto K, Kimura H, et al. A novel mass spectrometry-based assay for diagnosis of EML4-ALK-positive non-small cell lung cancer. J Thorac Oncol 7: 913-8, 2012.
- ⑥ Matsuoka H, Arao T, Makimura C, Takeda M, Kiyota H, Tsurutani J, Fujita Y, Matsumoto K, Kimura H, et al. Expression changes in arrestin  $\beta$  1 and genetic variation in catechol-O-methyltransferase are biomarkers for the response to morphine treatment in cancer patients. Oncol Rep 27: 1393-9, 2012.
- ⑦ Aomatsu K, Arao T, Abe K, Kodama A, Sugioka K, Matsumoto K, Kudo K, Kimura H, et al. Slug is upregulated during wound healing and regulates cellular phenotypes in corneal epithelial cells. Invest Ophthalmol Vis Sci 53: 751-6, 2012.
- ⑧ Tanaka K, Arao T, Tamura D, Aomatsu K, Furuta K, Matsumoto K, Kaneda H, Kudo K, Fujita Y, Kimura H, et al. SRPX2 is a novel chondroitin sulfate proteoglycan that is overexpressed in gastrointestinal cancer. PLoS One. 7:e27922, 2012.

- ⑨ Sakamoto H, Kimura H, Sekijima M, et al. Plasma concentrations of angiogenesis-related molecules in patients with pancreatic cancer. Jpn J Clin Oncol. 2012; 42(2):105-12. 10.1093/jjco/hyr178
- ⑩ Sakai A, Kasahara K, Ohmori T, Kimura H, et al. MET increases the sensitivity of gefitinib-resistant cells to SN-38, an active metabolite of irinotecan, by up-regulating the topoisomerase I activity. J Thorac Oncol 7: 1337-44, 2012.
- ⑪ Furuta K, Arao T, Sakai K, Kimura H, et al. Integrated analysis of whole genome exon array and array-comparative genomic hybridization in gastric and colorectal cancer cells. Cancer Sci 103: 221-7, 2012.
- ⑫ Makimura C, Arao T, Matsuoka H, Takeda M, Kiyota H, Tsurutani J, Fujita Y, Matsumoto K, Kimura H, et al. Prospective study evaluating the plasma concentrations of twenty-six cytokines and response to morphine treatment in cancer patients. Anticancer Res 31: 4561-8, 2011
- ⑬ Nishio M, Yamanaka T, Matsumoto K, Kimura H, et al. Serum heparan sulfate concentration is correlated with the failure of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor treatment in patients with lung adenocarcinoma. J Thorac Oncol 6: 1889-94, 2011.
- ⑭ Nagai T, Arao T, Furuta K, Sakai K, Kudo K, Kaneda H, Tamura D, Aomatsu K, Kimura H, et al. Sorafenib inhibits the hepatocyte growth factor-mediated epithelial mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma. Mol Cancer Ther 10: 169-77, 2011.

[学会発表] (計4件)

- ① Takano T, Kimura H, Nishio K, et al. WJOG6110B (ELTOP): Randomized phase II trial comparing trastuzumab plus capecitabine (HX) and lapatinib plus capecitabine (LX) in HER2-positive metastatic breast cancer patients previously treated with trastuzumab and taxanes. American Society of Clinical Oncology Annual Meeting 2011. 2012. 6. 1-5
- ② Kimura H, Hatabe S, Arao T, et al. Characteristics of HS6ST2 expression

in colorectal cancer. American Association for Cancer Research 102nd Annual Meeting 2012. 2012. 3. 31-4. 4.

- ③ Kimura H, Arao T, Matsutomo K, et al. Impact of serum HGF on treatment response to EGFR tyrosine kinase inhibitors in patients with non-small-cell lung adenocarcinoma. The Joint International Meeting Sponsored by The Japanese Society for Interferon and Cytokine Research The Japanese Society for Macrophage Molecular and Cell Biology. 2011. 5. 25-27.
- ④ Kimura H, Sakamoto H, Nagai T, et al. Serum concentrations of angiogenesis-related molecules in patients with pancreatic cancer. American Association for Cancer Research 102nd Annual Meeting 2011. 2011. 4. 2-6.

[図書] (計1件)

- ① 木村英晴. 遺伝子変異検査. 「新臨床腫瘍学 (改訂第3版)」(日本臨床腫瘍学会編) p63-66、南江堂

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

木村 英晴 (KIMURA HIDEHARU)  
近畿大学・医学部・講師  
研究者番号：40444202

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：