Anti-VEGF antibody therapy induces tumor hypoxia and stanniocalcin 2 expression and potentiates growth of human colon cancer xenografts

著者	宮? 真一郎
発行年	2014-03-17
URL	http://hdl.handle.net/10271/2726

doi: 10.1002/ijc.28686

博士(医学) 宮崎 真一郎

論文題目

Anti-VEGF antibody therapy induces tumor hypoxia and stanniocalcin 2 expression and potentiates growth of human colon cancer xenografts

(抗 VEGF 抗体治療はヒト大腸癌異種移植腫瘍の腫瘍内低酸素および stanniocalcin2 発現上昇を引き起こし腫瘍増大をもたらす)

論文の内容の要旨

[はじめに]

血管新生は大腸癌の進展に必要である。血管新生を標的とする治療は Folkman によって提案され、現在では血管内皮増殖因子(VEGF)に対する中和抗体である Bevacizumab が、大腸癌における従来の化学療法への上乗せ効果を認められ臨床使用されるに至っている。しかし他癌腫では、抗血管新生治療の抵抗性およびそのメカニズムが報告されている。大腸癌臨床においても Bevacizumab 投与の中断による腫瘍増大促進の報告があるが機序は不明である。今回、抗 VEGF 抗体の大腸癌の微小環境ならびに悪性度に与える影響につき基礎的検討を行った。

[材料ならびに方法]

動物実験：動物実験委員会の承認のもとヌードマウスの皮下、盲腸(同所)に移植したヒト大腸癌固形腫瘍 TK4 を用い治療実験を行った。プロトコール 1；同所担癌マウスを抗 VEGF 抗体治療群、対照群に分け治療開始後 14、35 日目に腫瘍を採取した。腫瘍サイズ、微小血管密度(MVD)、核分裂、アポトーシスを評価し、癌幹細胞の指標であるアルデヒド脱水素酵素 1(ALDH1)、低酸素の指標である低酸素誘導因子(HIF-1 α)の発現を免疫組織化学染色(IHC)で評価した。遺伝子発現変化をマイクロアレイ法で解析した。遺伝子解析で抽出された Stanniocalcin2(STC2)の発現を定量 PCR、IHC にて評価した。プロトコール 2；皮下担癌マウスを治療群、対照群に分け治療開始後 28、56、81 日目に腫瘍を採取し同じ大きさに整え、異なるマウスに累代移植し 56 日目に腫瘍を採取した。腫瘍サイズ、MVD、ALDH1 発現、STC2 発現、間質性を評価した。細胞実験：大腸癌細胞株 SW480、HCT116 で STC2 低酸素応答の検討および siRNA ノックダウン法を用いて低酸素、通常酸素下における機能解析(増殖能・遊走能)を行った。臨床検体：医の倫理委員会の承認のもと当科で切除前化学療法を施行した大腸癌肝転移 14 例(Bevacizumab 投与群；4 例、非投与群；10 例)の STC2 発現を IHC で評価した。

[結果]

動物実験：プロトコール 1；治療群で MVD は減少し腫瘍成長も阻害された。一方、14 日目の腫瘍の核分裂は治療群で低下したが 35 日目には差がなく、アポトーシスは 14 日目に差がなく 35 日目に治療群で低下していた。ALDH1 陽性細胞比率は 14 日目に差がなく、35 日目に治療群で増加していた。マイクロアレイ解析では、低酸素応答に関わる遺伝子群の発現が治療群で上昇しており、HIF-1 α の発現も治療群で上昇していた。治療により最も発

現上昇する遺伝子としてSTC2を抽出し、定量PCR、IHCで治療群での発現上昇を確認した。細胞実験：SW480、HCT116でSTC2遺伝子の低酸素誘導を認めた。STC2蛋白の発現上昇はSW480のみに認めた。HIF-1 α ノックダウンではSTC2の低酸素誘導は抑制されなかった。STC2をノックダウンしたSW480は低酸素下で増殖、遊走ともに阻害されたが、通常酸素下では増殖のみ阻害された。動物実験：プロトコル2；治療中は血管新生、腫瘍増大が抑制されたが、治療によりSTC2発現、ALDH1陽性細胞比率は上昇し、間質量も増加した。累代移植マウスではMVDに差を認めず腫瘍成長は前治療を受けた群でより増大した。臨床検体：STC2は腫瘍内壊死の周囲に強い発現を認めた。壊死領域はBevacizumab投与群で増加していた。

[考察]

今回、抗VEGF抗体治療による腫瘍形質変化を評価するうえで、間質が豊富であるなど元の腫瘍の組織像を維持し微小環境との相互作用を評価するうえで優れた患者由来腫瘍モデルであるTK-4を使用した。他癌腫で見られる抗血管新生治療の抵抗性のメカニズムには、①血管新生の保持、②腫瘍細胞の悪性化が関与すると考えられている。プロトコル1では血管新生は抑制される一方で、治療中期では抑制されていた増殖能が後期には回復し、アポトーシスは経時的に低下した。遺伝子解析の結果から、抗VEGF抗体治療中の大腸癌形質変化は低酸素による癌細胞の悪性形質獲得、つまり後者のメカニズムであることが示された。STC2は分泌型糖蛋白で、HIF-1および小胞体ストレス応答(UPR)の標的遺伝子であることがわかっている。また、大腸癌をはじめ種々の癌においてその発現と臨床病理学的因子との関連の報告はあるが、大腸癌における機能は不明であった。今回、大腸癌細胞を用いた解析により、大腸癌におけるSTC2の機能を初めて報告した。他癌腫の報告同様、大腸癌細胞株においてもSTC2は低酸素で発現誘導された。HIF-1 α ノックダウンはSTC2発現に影響しなかったが、これにはHIF-1非依存的な経路(UPR)による誘導の関与が考えられる。STC2をノックダウンした細胞は低酸素下で増殖、遊走が阻害される一方、通常酸素下では遊走阻害は認めず、低酸素下と通常酸素下の違いは更なる検討が必要である。抗VEGF抗体治療により低酸素が引き起こされ、大腸癌細胞の増殖、遊走に関わるSTC2の発現が上昇することを示したが、より長期の治療による悪性形質獲得の直接的な評価を行うためプロトコル2の治療実験を行った。同所移植腫瘍は長期維持できないため、治療を行った皮下腫瘍を同所に累代移植すると、興味深いことに、MVDに差はないが前治療を受けた腫瘍の増大は促進した。癌の進展には微小環境、間質との相互作用が重要である。今回、間質量および癌幹細胞比率が治療群で増加していた。間質の増大、さらには低酸素が影響し、腫瘍の癌幹細胞性形質変化をもたらすことが累代マウスでの腫瘍増大に関与した可能性がある。臨床検体ではSTC2発現は低酸素である壊死領域周囲に強く認められた。以上の結果より、抗VEGF抗体治療により低酸素を介してSTC2発現が上昇し、大腸癌の更なる悪性形質獲得が導かれることが示唆された。

[結論]

今回得られた知見は、大腸癌臨床におけるBevacizumab治療中断後の腫瘍増大促進のメカ

ニズムである可能性がある。今後更なる治療成績の向上には癌幹細胞を標的とした治療、
ならびに低酸素を回避するような適切な抗血管新生治療の構築が望まれる。