

TSU68 prevents liver metastasis of colon cancer xenografts by modulating the premetastatic niche

メタデータ	言語: jpn 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2017-01-18 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 山本, 真義 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/788

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博第 526号	学位授与年月日	平成21年 3月18日
氏名	山本真義		
論文題目	TSU68 prevents liver metastasis of colon cancer xenografts by modulating the premetastatic niche (TSU68は転移前微小環境を変化させることにより大腸癌異種移植片の肝転移を抑制する)		

博士(医学) 山本真義

論文題目

TSU68 prevents liver metastasis of colon cancer xenografts by modulating the pre-metastatic niche

(TSU68 は転移前微小環境を変化させることにより大腸がん異種移植片の肝転移を抑制する)

論文内容の要旨

[はじめに]

腫瘍血管新生を標的とした癌治療は 1971 年に Folkman 博士によって最初に提唱されて以来 30 年以上にわたり世界中で研究が進められてきた。そして 2004 年には進行大腸癌患者に対して血管新生阻害剤と標準化学療法剤との併用による延命効果が示され、臨床応用が開始されるに至った。血管新生阻害治療は腫瘍血管の増殖抑制や退縮により腫瘍細胞に対する栄養や酸素の供給を阻害することによる「兵糧攻め」効果を狙ったものであるが、近年では血管新生阻害剤による腫瘍血管正常化や骨髄由来血管内皮前駆細胞の腫瘍内リクルートの抑制など新たな作用機序の存在が次々と明らかとなってきている。しかし血管新生阻害剤による転移抑制機序については未だ十分に解明されていない。

癌の「転移」は転移先臓器の特異的な微小環境と腫瘍細胞との相互作用が成立して初めて形成されるが、その分子機序は長らく未解明であった。近年、原発巣における癌の増殖に伴い、腫瘍細胞が転移先臓器へ生着するのに有利な微小環境、いわゆる「pre-metastatic niche」が形成されることが明らかとなった。そこで本研究では血管新生阻害剤 TSU68 (vascular endothelial growth factor receptor 2、platelet derived growth factor receptor β 、fibroblast growth factor receptor 1 に対するチロシンキナーゼ阻害剤) 投与による転移先臓器の微小環境の変化を解析し、転移抑制メカニズムの解明を試みた。

[材料ならびに方法]

1. TSU68 による肝転移抑制効果及び原発巣における抗腫瘍効果の検討

ヒト大腸癌高肝転移株 TK4 をヌードマウス盲腸に同所移植し、TSU68 経口投与群 (400 mg/kg/day, n=19) 及びコントロール群 (vehicle, n=19) を設定。5 週間連日投与後の肝転移抑制効果を肉眼的、組織学的に評価した。また原発巣における組織学的抗腫瘍効果の評価として、ヒトサイトケラチン 20 抗体、Ki67 抗体、CD34 抗体による免疫染色を行い、それぞれ腫瘍細胞密度、細胞増殖、微小血管密度の変化を検討した。

2. 担癌、非担癌による肝臓内遺伝子発現変動と TSU68 投与による影響の解析

担癌群には TK4 を同所移植し、TSU68 投与群 (T-TSU 群; n=15) とコントロール群 (T-Co 群; n=15) を設定。非担癌群には sham 手術を行い、TSU68 投与群 (NT-TSU 群; n=12) とコントロール群 (NT-Co 群; n=12) を設定した。薬剤投与後 7 日目 (肝転移形成前) における肝臓を採取し RNA を抽出。転移形成前の肝臓内での遺伝子発現変動をマイクロアレイ法にて解析した。

[結果]

1. コントロール群ではマウス 1 匹あたり平均 1.28 個の肝転移が認められたのに対し TSU68 投与群では完全に抑制されていた ($p < 0.001$)。また原発巣における腫瘍細胞密度、細胞増殖、微小血管密度は TSU68 投与により有意に減少していた (それぞれ $p < 0.001$, $p = 0.032$, $p = 0.001$)。以上の結果から、TSU68 投与による著明な肝転移抑制効果及び原発巣に対する抗腫瘍効果が確認された。

2. マイクロアレイ解析により NT-Co 群と T-Co 群の肝臓内遺伝子発現を比較した結果、T-Co 群の肝臓で 1947 の遺伝子の発現上昇を認めた。さらにこれらの遺伝子中で TSU68 投与により有意な発現低下を認めた 44 の遺伝子を抽出し、その中で癌転移に深く関連していることが知られているケモカイン CXCL1 に着目した。CXCL1 の有意な発現変動は定量的 reverse transcriptional polymerase chain reaction (RT-PCR)法及び免疫染色によっても確認された。CXCL1 はその受容体である CXCR2 を発現する細胞のリクルートに関与することが知られている。そこで TK4 細胞における CXCR2 の発現を RT-PCR 法にて確認したところ、皮下移植腫瘍と比較し同所移植腫瘍で CXCR2 の有意な発現上昇を認めた。また担癌状態の肝臓内には好中球やマクロファージの集積が見られ、炎症が惹起されていることが示唆されたが、TSU68 投与によりこれらの細胞の集積が有意に抑制されていた。大腸癌肝転移における CXCL1/CXCR2 経路の重要性を確認するために抗 CXCR2 中和抗体による転移抑制効果を検討したところ、コントロール IgG 投与群と比較して抗 CXCR2 中和抗体投与群で有意な転移抑制効果を認めた ($p=0.013$)。次に我々は肝臓内の微小環境に影響を及ぼす因子として原発巣から門脈内へ流入するサイトカインの関与を考えた。そこで門脈血を採取し計 32 種のサイトカインを定量した結果、インターロイキン 12 p40 サブユニット (IL-12 p40) が T-Co 群で上昇しており、T-TSU 群で抑制されていた。以上の結果から門脈血中の IL-12 p40 が肝臓内 CXCL1 の発現変動に関与している可能性が示唆された。さらに IL-12 p40 中和抗体投与による転移抑制効果を検討したところ、コントロール IgG 投与群と比較し IL-12 p40 中和抗体投与群において有意な肝転移抑制効果が確認された ($p=0.017$)。

[考察]

担癌状態では門脈血中 IL-12 p40 の上昇を介して肝臓内 CXCL1 の発現が転移形成前から上昇し炎症反応が惹起されることで転移の準備段階、すなわち「pre-metastatic niche」が形成されると考えられた。また TSU68 投与により、肝臓内 CXCL1 の発現が抑制され CXCR2 陽性細胞の肝臓内リクルートが阻害されることで肝転移が抑制されることが示唆された。

[結論]

本研究では血管新生阻害剤による新たな転移抑制機序として、転移先臓器の微小環境を変化させ癌細胞が転移臓器に生着しにくい環境を作り出しているという新たな概念を提唱した。また pre-metastatic niche の制御により転移を強力に抑制できる可能性が示唆され、今後新たな転移制御戦略の標的となりうるものとする。

論文審査の結果の要旨

[はじめに]

腫瘍血管新生を標的とした癌治療は 1971 年に Folkman 博士によって最初に提唱されて以来 30 年以上にわたり世界中で研究が進められてきた。血管新生阻害治療は腫瘍血管の増殖抑制や退縮により腫瘍細胞に対する栄養や酸素の供給を阻害することによる「兵糧攻め」効果を狙ったものであるが、近年では血管新生阻害剤による腫瘍血管正常化や骨髄由来血管内皮前駆細胞の腫瘍内リクルートの抑制など新たな作用機序の存在が次々と明らかとなってきた。しかし血管新生阻害剤による転移抑制機序については未だ十分に解明されていない。そこで申請者は血管新生阻害剤 TSU68 (vascular endothelial

growth factor receptor 2、platelet derived growth factor receptor β 、fibroblast growth factor receptor 1 に対するチロシンキナーゼ阻害剤) 投与による転移先臓器の微小環境の変化を解析し、転移抑制メカニズムの解明を試みた。

[材料ならびに方法]

ヒト大腸癌高肝転移株 TK4 をヌードマウス盲腸に同所移植し、TSU68 経口投与群(400 mg/kg/day, n=19) 及びコントロール群(vehicle, n=19)を設定。5 週間連日投与後の肝転移抑制効果を肉眼的、組織学的に評価した。また原発巣における組織学的抗腫瘍効果の評価として腫瘍細胞密度、細胞増殖、微小血管密度の変化を検討した。次に担癌、非担癌による肝臓内遺伝子発現変動と TSU68 投与による影響を解析するために以下の実験を行った。担癌群には TK4 を同所移植し、TSU68 投与群(T-TSU 群; n=15)とコントロール群(T-Co 群; n=15)を設定。非担癌群には sham 手術を行い、TSU68 投与群(NT-TSU 群; n=12)とコントロール群(NT-Co 群; n=12)を設定した。薬剤投与後 7 日目(肝転移形成前)における肝臓を採取し RNA を抽出。転移形成前の肝臓内での遺伝子発現変動をマイクロアレイ法にて解析した。

[結果]

コントロール群ではマウス 1 匹あたり平均 1.28 個の肝転移が認められたのに対し TSU68 投与群では完全に抑制されていた($p<0.001$)。また原発巣における腫瘍細胞密度、細胞増殖、微小血管密度は TSU68 投与により有意に減少していた(それぞれ $p<0.001$, $p=0.032$, $p=0.001$)。以上の結果から、TSU68 投与による著明な肝転移抑制効果及び原発巣に対する抗腫瘍効果が確認された。マイクロアレイ解析により NT-Co 群と T-Co 群の肝臓内遺伝子発現を比較した結果、T-Co 群の肝臓で 1947 の遺伝子の発現上昇を認めた。さらにこれらの遺伝子中で TSU68 投与により有意な発現低下を認めた 44 の遺伝子を抽出し、その中で癌転移に深く関連していることが知られているケモカイン CXCL1 に着目した。CXCL1 の有意な発現変動は定量的 reverse transcriptional polymerase chain reaction (RT-PCR)法及び免疫染色によっても確認された。CXCL1 はその受容体である CXCR2 を発現する細胞のリクルートに関与することが知られている。そこで TK4 細胞における CXCR2 の発現を RT-PCR 法にて確認したところ、皮下移植腫瘍と比較し同所移植腫瘍で CXCR2 の有意な発現上昇を認めた。また担癌状態の肝臓内には好中球やマクロファージの集積が見られ、炎症が惹起されていることが示唆されたが、TSU68 投与によりこれらの細胞の集積が有意に抑制されていた。大腸癌肝転移における CXCL1/CXCR2 経路の重要性を確認するために抗 CXCR2 中和抗体による転移抑制効果を検討したところ、コントロール IgG 投与群と比較して抗 CXCR2 中和抗体投与群で有意な転移抑制効果を確認した($p=0.013$)。次に申請者は肝臓内の微小環境に影響を及ぼす因子として原発巣から門脈内へ流入するサイトカインの関与を考えた。そこで門脈血を採取し計 32 種のサイトカインを定量した結果、インターロイキン 12 p40 サブユニット(IL-12 p40)が T-Co 群で上昇しており、T-TSU 群で抑制されていた。以上の結果から門脈血中の IL-12 p40 が肝臓内 CXCL1 の発現変動に関与している可能性が示唆された。さらに IL-12 p40 中和抗体投与による転移抑制効果を検討したところ、コントロール IgG 投与群と比較し IL-12 p40 中和抗体投与群において有意な肝転移抑制効果が確認された($p=0.017$)。

[考察]

これらの結果について申請者は以下のように考察した。担癌状態では門脈血中 IL-12 p40 の上昇を介して肝臓内 CXCL1 の発現が転移形成前から上昇し炎症反応が惹起されることで転移の準備段階、すな

われ「pre-metastatic niche」が形成されると考えられた。また TSU68 投与により、肝臓内 CXCL1 の発現が抑制され CXCR2 陽性細胞の肝臓内リクルートが阻害されることで肝転移が抑制されることが示唆された。

[結論]

血管新生阻害剤による新たな転移抑制機序として、転移先臓器の微小環境を変化させ癌細胞が転移臓器に生着しにくい環境を作り出しているという新たな概念を提唱した。また pre-metastatic niche の制御により転移を強力に抑制できる可能性が示唆され、今後新たな転移制御戦略の標的となりうるものと考えられた。

審査委員会は申請者の詳細な解析かつ明快な解釈を高く評価した。

審査委員会はこの論文について以下の質問を行った。

- 1) TSU68 開発の経緯、及び現在行われている治験の進展状況について
- 2) 癌種別による血管新生阻害剤の適応の相違について
- 3) TK4 モデル作成の経緯について
- 4) 肝転移の評価方法について
- 5) Pre-metastatic niche に注目した理由について
- 6) マイクロアレイ解析の統計学的評価法について
- 7) 正常状態での肝臓、肺における CXCL1 発現の相違について
- 8) 投与開始から 2 週以降の肝臓内 CXCL1 の発現について
- 9) 推定される IL-12 p40 の発現細胞について
- 10) 本研究結果から考えられる具体的な臨床応用への展開について

これらの質問に対し申請者の解答は適切であり、問題点も十分理解しており、博士(医学)の学位論文にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者

主査	瀬藤 光利	
副査	梶村 春彦	峯田 周幸