

学位論文の要旨

学位の種類	博士	氏名	吉川 大太郎
学位論文題目			
<p>Vandetanib (ZD6474), an inhibitor of VEGFR and EGFR signaling, as a novel molecular targeted therapy against cholangiocarcinoma (胆道癌に対する新規分子標的治療としての VEGFR・EGFR 阻害剤 vandetanib(ZD6474)の検討)</p>			
共著者名			
<p>Hidenori Ojima(尾島英知), Akiko Kokubu(国分明子), Takahiro Ochiya(落谷孝広), Shinichi Kasai(葛西眞一), Setsuo Hirohashi(廣橋説雄), Tatsuhiro Shibata(柴田龍弘)</p>			
<p>British Journal of Cancer 100(8): 1257-1266, 2009</p>			
研究目的			
<p>胆道癌は難治癌のひとつであり、外科的切除以外に有効な治療法は確立されていない。我々は、vascular endothelial growth factor (VEGF)や epidermal growth factor receptor (EGFR) の発現が比較的高頻度に見られ、胆道癌の進展に関わっている事を報告している(Br J Cancer 98(2):418-425, 2008)。そこで、VEGFR・EGFR の阻害剤が胆道癌に対する新規の治療となりうるかどうかを検討する。</p>			
材料・方法			
<p>VEGFR-2とEGFR のチロシンキナーゼ阻害剤である vandetanib (ZD6474, ZACTIMATM)の効果を検討した。4種類の胆道癌細胞株(TK4, OZ, TGBC24TKB, HuCCT1)を用いた。各細胞株における VEGF・EGFR・VEGFR-2 などの発現や遺伝子異常を明らかにし、vandetanib の効果を検討した。In vitro に於いては、各細胞株に対する vandetanib の抗細胞増殖効果について、MTS アッセイとウエスタンブロット法を用いて検討した。</p> <p>In vivo では、vandetanib の抗腫瘍効果と転移抑制効果について、in vivo imaging system (IVIS)を用いて検討した。抗腫瘍効果の検討は TK4 と OZ の2種類の細胞株のマウス皮下移植モデルを用いて行った。vandetanib の投与量により4群(50mg/kg b.w., 25mg/kg b.w., 12.5mg/kg b.w., コントロール)に分け、投与は一日一回経口投与で最低4週間行い、IVISによる経過観察を行った。経過観察終了後腫瘍を摘出し、半分は組織学的検討(HE 染色、CD34(微小血管マーカー)と Ki67</p>			

(腫瘍増殖マーカー)の免疫染色、および TUNEL 法(アポトーシスマーカー))を行い、腫瘍壊死率、microvessels density (MVD)、proliferation index (PI)、apoptotic index (AI)を算出した。残り半分からタンパクを抽出し、薬剤投与の有無による EGFR・pEGFR・VEGFR-2 の発現の違いを、ウエスタンブロット法を用いて検討した。転移抑制効果の検討は、TKKK 細胞株のマウス尾静脈注入転移モデルを用いた。vandetanib 25mg/kg b.w. 群とコントロールの二群とし、投与は週5日間一日一回経口投与とし、3ヶ月間の IVIS による経過観察を行った。IVIS で転移が検出されるまでの時間 (time to metastasis)を評価した。経過観察終了後、転移の有無を組織学的に確認した。

国立がんセンター中央病院で切除された 90 例の胆道癌症例に対して EGFR の免疫染色を施行し、陽性例 19 例と陰性例 15 例に対して FISH 法を用いて EGFR 遺伝子増幅を検討した。

成績

4 種類の胆道癌細胞株は、いずれも EGFR・VEGF を発現していたが、VEGFR-2 は発現していなかった。このことから、vandetanib の腫瘍細胞に対する直接効果は EGFR 阻害によると考えられた。また、TKKK は EGFR 遺伝子増幅を、OZ・HuCCT1 は KRAS 遺伝子変異を有していた。In vitro では、TKKK は vandetanib に対して高感受性を示し、OZ・HuCCT1 は治療抵抗性を示した。各細胞株に対して vandetanib を投与した際に、EGFR 及び EGFR 下流分子のリン酸化の程度が変化するかどうかをウエスタンブロット法で検討したところ、すべての細胞株で vandetanib の投与により EGFR のリン酸化が抑制されるのにかかわらず、OZ・HuCCT1 においては下流分子である MAPK のリン酸化が抑制されなかった。このことから KRAS 遺伝子変異による RAS/RAF/MAPK 経路の活性化が、治療抵抗性の原因であると考えられた。

高感受性株である TKKK と抵抗性株である OZ を用いた、in vivo における vandetanib の抗腫瘍効果の検討では、vandetanib は TKKK xenograft に対しては低容量投与 (12.5~50mg/kg b.w.、 $P<0.05$) から有意な治療効果を示したが、OZ xenograft に対しては高用量投与 (50mg/kg b.w.、 $P<0.05$) にて有意な治療効果を示した。いずれの xenograft においても、治療効果を示した群では組織学的に壊死性変化を来しており、MVD と PI は有意に減少し AI は有意に増加していた ($P<0.05$)。また、治療効果を示した群では EGFR・pEGFR・VEGFR-2 の発現は減少していた。細胞株自体は VEGFR-2 を発現していないため、VEGFR-2 の減少は腫瘍間質における発現の減少であると考えられた。転移抑制効果の検討では、vandetanib は time to

metastasis を有意に延長した ($P=0.006$)。

胆道癌臨床献体 90 例中 19 例 (21%) に免疫染色で EGFR 発現を認めた。これら 19 例の陽性例と 15 例の陰性例に対して FISH 法を施行したところ、EGFR 発現 19 例中 8 例に EGFR 遺伝子増幅を認めた。

考 案

EGFR および KRAS 遺伝子異常は胆道癌に対する EGFR を標的とした治療における感受性予測マーカーとなりうると考えられた。EGFR 遺伝子増幅など、EGFR 経路が腫瘍増殖に重要となっている腫瘍に対して vandetanib 等の EGFR 阻害剤が著明な腫瘍増殖抑制効果を示すと考えられた。vandetanib は、VEGFR-2 阻害を介して腫瘍間質の血管新生を阻害することにより、間接的な抗腫瘍効果も発揮していると考えられた。vandetanib は転移抑制効果をもつ可能性が考えられた。

結 論

VEGFR および EGFR 経路は、胆道癌治療における有用な治療標的となる可能性が示唆された。また術後アジュバント療法としての可能性も示唆された。更に言えば、KRAS 遺伝子変異のないことと、EGFR 遺伝子増幅のあることが、胆道癌に対する EGFR 阻害治療における感受性予測マーカーとなる可能性も示唆された。胆道癌に対する治療の選択肢は限られているのが現状であり、臨床におけるさらなる検討が切望される。

引用文献

Yoshikawa D, Ojima H, Iwasaki M, Hiraoka N, Kosuge T, Kasai S, Hirohashi S, Shibata T : Clinicopathological and prognostic significance of EGFR, VEGF, and HER2 expression in cholangiocarcinoma. Br J Cancer 98(2) : 418-425, 2008




Wedge SR, Ogilvie DJ, Dukes M, Kendrew J, Chester R, Jackson JA, Boffey SJ, Valentine PJ, Curwen JO, Musgrove HL, Graham GA, Hughes GD, Thomas AP, Stokes ES, Curry B, Richmond GH, Wadsworth PF, Bigley AL, Hennequin LF : ZD6474 inhibits vascular endothelial growth factor signaling, angiogenesis, and tumor growth following oral administration. Cancer Res 62(16) : 4645-4655, 2002

参考文献

Yoshikawa D, Ojima H, Iwasaki M, Hiraoka N, Kosuge T, Kasai S, Hirohashi S, Shibata T : Clinicopathological and prognostic significance of EGFR, VEGF, and HER2 expression in cholangiocarcinoma. Br J Cancer 98(2) : 418-425, 2008

唐崎秀則、渡辺一教、吉川大太郎、鈴木茂貴、石崎 彰、稲垣光裕、紀野修一、河野 透、葛西眞一：胆管内腫瘍栓を形成した左肝管付属腺原発肝門部胆管癌の1例. 日本消化器外科学会雑誌 40(2) : 180-185, 2007

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	吉川 大太郎
<p>審査委員長 <u>渡部 剛</u> </p> <p>審査委員 <u>飯村 一</u> </p> <p>審査委員 <u>河野 透</u> </p> <p>審査委員 _____ 印</p>			
<p>学 位 論 文 題 目</p> <p>Vandetanib (ZD6474), an inhibitor of VEGFR and EGFR signaling, as a novel molecular-targeted therapy against cholangiocarcinoma. (胆道癌に対する新規分子標的治療としての VEGFR・EGFR 阻害剤 vandetanib (ZD6474) の検討)</p> <p>本論文提出者は、胆道癌の新たな治療法の確立をめざして、チロシンキナーゼ阻害剤である Vandetanib の胆道癌に対する効果を、細胞レベルと個体レベルの両方で検討した。 その結果、(1)胆道癌由来腫瘍細胞株で EGFR は発現しているが、VEGFR-2 は発現していないこと、(2)EGFR 遺伝子の増幅があり、かつ、EGFR シグナル伝達経路の下流の分子に変異がない TKKK 細胞では培地への Vandetanib 添加で有意な増殖抑制効果が認められるが、EGFR が発現しているそのシグナル伝達経路の下流で KRAS 変異がある OZ 細胞と HuCCT1 細胞では、同剤の効果は低いこと、(3) 腫瘍細胞を皮下移植したマウス担癌モデルでは、同剤に抵抗性の OZ 細胞で形成された腫瘍でも、感受性の高い TKKK 細胞による腫瘍に対してよりは効果は低いものの、ある程度の腫瘍増殖抑制効果があること、そして、(4) TKKK 細胞を尾静脈から注入し同剤による転移巣形成に対する抑制効果を検討したところ、同剤経口投与で有意な転移抑制効果があることが明らかにされた。</p> <p>本研究は、Vandetanib 投与により EGFR と VEGFR の両者のシグナル伝達を阻害することで相乗的に胆道癌の細胞増殖・進展を抑制できることを細胞および個体レベルで初めて明らかにしたもので、これまで著効を示す化学療法剤が無かった胆道癌に対する効果的な治療法の確立につながる重要な成果であると思われる。</p> <p>本研究で用いられた方法の妥当性は、適切な対照実験によって検証されており、論文の記述および図版の質・構成も得られた知見を説明するのに十分なものである。また、本論文の内容および関連領域に関して、論文提出者に試問を行ったところ、適切な応答が得られ十分な学力を有することが示された。</p> <p>以上の結果に基づき、審査委員会は本論文を学位論文として適切なものであると判定した。</p>			