

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23701047

研究課題名(和文)低酸素・低栄養に抵抗性な癌細胞を標的とした新規制癌法

研究課題名(英文)Targeting cancer cells resistant to hypoxia and nutrient starvation to improve anti-cancer therapy

研究代表者

大澤 毅(Osawa, Tsuyoshi)

東京大学・先端科学技術研究センター・特任助教

研究者番号：50567592

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,900,000円、(間接経費) 570,000円

研究成果の概要(和文)：癌の進展には腫瘍微小環境が重要な役割を果たす。我々は、低酸素・低栄養という腫瘍微小環境が(1)腫瘍細胞の増殖、転移能を促進すること(2)免疫系を制御すること(3)ヒストン脱メチル化酵素(JMJD1A, JHDM1D)が腫瘍増殖や血管新生を制御すること(4)JMJD1A阻害が血管新生阻害剤と相乗効果を示すことを報告してきた。このことから低酸素・低栄養に抵抗性な癌細胞を標的とすることが新規制癌法の開発に繋がること示唆された。

研究成果の概要(英文)：Tumor microenvironment is critical determinant for tumor progression and metastasis. We reported that (1) hypoxia and nutrient starvation induced tumor aggressiveness, (2) and stimulated pro-cancer immunity, (3) histone demethylase JMJD1A and JHDM1D regulated tumorigenicity and tumor angiogenesis, and (4) inhibition of JMJD1A showed synergetic effect with antiangiogenesis. Thus, targeting cancer cells resistant to hypoxia and nutrient starvation can be an effective cancer treatment.

研究分野：総合生物

科研費の分科・細目：腫瘍学・腫瘍生物学

キーワード：癌 組織・細胞 ストレス エピジェネティクス ヒストン

## 1. 研究開始当初の背景

腫瘍血管新生は癌の増殖と転移に重要な役割を果たすことから、腫瘍血管新生阻害療法の治療効果が期待された。しかし、現時点において血管新生阻害剤は、一部の進行癌で延命効果は見られるものの根本的な治療効果に至っていない。さらなる血管を標的とした治療法が世界的に開発されていることから、血管新生阻害療法に対する抵抗性・再発の分子機構の解明とその克服は普遍的で推進すべき重要な課題である。

血管新生阻害療法とその抵抗性の研究は世界的に競争を増しているが、我々は血管新生阻害に対する抵抗性や悪性化の原因の一要因が低酸素下の栄養飢餓という腫瘍微小環境に起因することを見出し報告してきた。腫瘍細胞の増殖を標的とした従来の抗癌剤に加え、宿主側を標的とした制癌法との併用が効果的な癌治療法であることから、癌細胞の血管新生阻害療法に対する抵抗性の問題の重要性を認識し本研究の着想に至った。

我々は、腫瘍組織において低酸素領域とその栄養状態を同時に可視化する新しい方法を開発し、低酸素領域に存在する癌細胞は同時に栄養飢餓状態にあることを見出している。また、血管新生阻害等により誘導される低酸素・低栄養が、腫瘍の退縮を促進する一方、残存した癌細胞の少なくとも一部は、転移能を獲得するなど癌の悪性に寄与することを報告してきた。

## 2. 研究の目的

血管新生阻害療法は進行性の癌において治療効果が認められている。一方で、我々は血管新生阻害による長期間の低酸素下の栄養飢餓状態で残存する癌細胞が腫瘍の悪性化を促進することを報告してきた (Osawa *et al. Cancer Sci.* 2009 など)。

本研究はこの低酸素・低栄養によって誘導される癌の悪性化のメカニズムを解明し、低酸素・低栄養に抵抗性な癌細胞を標的とした

新しい癌の制御法を開発し、現存する化学療法や血管新生阻害療法との併用で相乗効果が期待できる新しい標的分子の探索と将来的な治療への応用のための基盤となる研究を目的とする。

## 3. 研究の方法

低酸素下の栄養飢餓状態に対する癌細胞の抵抗性と腫瘍の悪性化のメカニズムを解明する為に、以下の研究を行った。

(1) 低酸素・低栄養に抵抗性を持つ癌細胞は癌細胞自身が転移能の獲得や悪性化を促進することを報告してきたが、腫瘍微小環境や宿主における役割は不明な点が多い。

我々が樹立した低酸素・低栄養に抵抗性を持つ癌細胞株を用いて、低酸素・低栄養に曝された癌がどの経路を介して悪性化を促進するかの検討を行った。例として Akt-PI3K-mTOR 経路、VEGF 系を介したマクロファージ系細胞の導引、炎症性サイトカイン IL2,IL4,IL6,IFN $\gamma$  による宿主免疫惹起の関与を解析した。

(2) 低酸素・低栄養に抵抗性を持つ癌細胞において、マイクロアレイ解析を用いて低酸素・低栄養に抵抗性な癌細胞に特異的な分子標的を同定し、この標的分子を si/shRNA 等により特異的に制御し *in vivo* における抗腫瘍効果と現存する化学療法や血管新生阻害療法との併用に相乗効果が期待できるかを検討した。

## 4. 研究成果

我々は、血管新生阻害の結果として一部の癌細胞は低酸素や低栄養状態に陥り、これに抵抗性な癌細胞が悪性化に寄与するという仮説をもとに本研究を行い以下のような研究成果を得た。

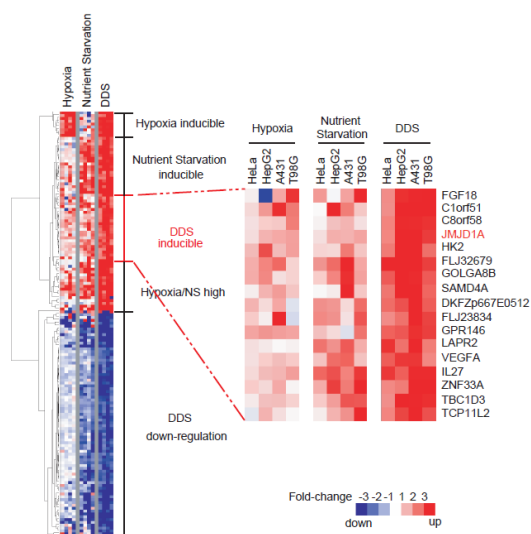
(1) 低酸素・低栄養に抵抗性を持つ癌細胞は癌細胞自身の転移能の獲得や悪性化の促進に Akt-PI3K-mTOR 経路が活性化されること、また、VEGF 非依存的な経路 (FGF、

HGF) を介した血管新生が促進されることが示された (Osawa *et al. Cancer Res.*2013)。

また、我々が樹立した低酸素・低栄養に抵抗性を持つ癌細胞は炎症性サイトカイン IL2,IL4,IL6,IFN $\gamma$  の発現を誘導することにより宿主免疫応答を惹起してマウスの二次性白血病の一因となる可能性を示した (Osawa *et al. BCJ.* 2013, 下図)。

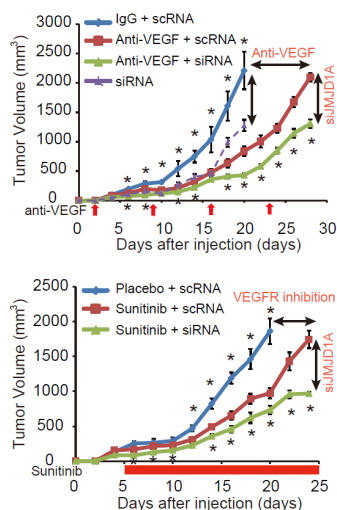


(2) 我々は、低酸素、低栄養を模した培養癌細胞のマイクロアレー解析からヒストン脱メチル化酵素 JMJD1A 及び JHDM1D の遺伝子発現が亢進していることを見出した (下図)。



また、我々は、JMJD1A と JHDM1D の役割を培養細胞とマウスを用いて解析し、マウス腫瘍移植実験系において腫瘍増殖や腫瘍血管新生を制御することを見いだした (Osawa *et al. PNAS* 2011, Osawa *et al. Cancer Res.* 2013)。

さらに、JMJD1A の阻害は VEGF 中和抗体や VEGF 受容体阻害剤など血管新生阻害剤との併用に相乗効果を示した (下図)。



本研究により、ヒストン脱メチル化酵素が低酸素・低栄養下で腫瘍増殖や腫瘍血管新生を制御し、癌の進展や悪性を抑制することが明らかとなった。これらの知見は、近年着目されているヒストン修飾、エピゲノム修飾因子が腫瘍増殖に関わることを示しており、エピゲノム創薬が癌の悪性化や血管新生阻害における治療抵抗性に対する新しい標的の一つとして、新しいメカニズムに基づく新規創薬に繋がる可能性を示すものである。

## 5. 主な発表論文等 〔雑誌論文〕 (計 9 件)

- Méndez-Barbero N, Esteban V, Villahoz S, Escolano A, Urso K, Alfranca A, Rodríguez C, Sánchez SA, **Osawa T**, Andrés V, Martínez-González J, Minami T, Redondo JM, Campanero MR. A major role for RCAN1 in atherosclerosis progression. *EMBO Mol Med.* 2013 Dec;5(12):1901-17. doi: 10.1002/emmm.201302842. 査読有
- Minami T, Jiang S, Schadler K, Suehiro JI, **Osawa T**, Oike Y, Miura M, Naito M, Kodama T, Ryeom S. The Calcineurin-NFAT-Angiopoietin-2 Signaling Axis in Lung Endothelium Is Critical for the Establishment of Lung Metastases. *Cell Reports* 2013, Aug 14. pii:S2211-1247(13)00383-5. doi: 10.1016/j.celrep.2013.07.021. 査読有

3. Tsuchida R, **Osawa T (Equally First)**, Wang F, Nishii R, Tsuchida S, Muramatsu M, Das B, Takahashi T, Yuasa Y, Inoue T, Wada Y, Minami T, and Shibuya M: BMP4/Thrombospondin-1 loop paracrinically inhibits tumor angiogenesis and suppresses the growth of solid tumors. *Oncogene* 2013, Sep 9. doi: 10.1038/onc.2013.358. 査読有
  4. **Osawa T (Co-correspondence)** and Shibuya M: Targeting cancer cells resistant to hypoxia and nutrient starvation to improve anti-angiogenic therapy. *Cell Cycle* 2013, Aug 15;12(16):2519-20. 査読有
  5. **Osawa T (Co-correspondence)**, Tsuchida R, Muramatsu M, Shimamura T, Wang F, Suehiro J, Kanki Y, Wada Y, Yuasa Y, Aburatani H, Miyano S, Minami T, Kodama T, and Shibuya M: Inhibition of histone demethylase JMJD1A improves anti-angiogenic therapy and reduces tumor associated macrophages. *Cancer Research* 2013, May 15;73(10):3019-3028. 査読有
  6. Yae T, Tsuchihashi K, Ishimoto T, Motohara T, Yoshikawa M, Yoshida GJ, Wada T, Masuko T, Mogushi K, Tanaka H, **Osawa T**, Kanki Y, Minami T, Aburatani H, Ohmura M, Kubo A, Suematsu M, Takahashi K, Saya H and Nagano O: Alternative splicing of CD44 mRNA by ESRP1 enhances lung colonization of metastatic cancer cell. *Nature Commun* 2012, Jun 6;3:883. doi: 10.1038/ncomms1892. 査読有
  7. **Osawa T**, Muramatsu M, Tsuchida R, Wang F, Kodama T, Minami T and Shibuya M: Increased expression of histone demethylase JHDM1D under nutrient starvation suppresses tumor growth via downregulating angiogenesis, *PNAS*, 2011, Dec 20;108(51):20725-9. 査読有
  8. Wang F, **Osawa T**, Tsuchida R, Yuasa Y, and Shibuya M: Down-regulation of receptor activated C-kinase 1 (RACK1) suppresses tumor growth by inhibiting tumor cell proliferation and tumor-associated angiogenesis, *Cancer Science*. 2011, Nov;102(11):2007-13. 査読有
  9. **Osawa T**, Davies D, and Hartley JA: Mechanism of cell death resulting from DNA interstrand cross-linking in mammalian cells, *Cell Death and Disease*, 2011, Aug 4; 2, e187; doi; 10.1038/cddis.2011.70. 査読有
- [学会発表] (計 13 件)
1. Osawa T, Histone Demethylases regulate tumor angiogenesis and metabolism, Keystone Symposia on Metabolism and Angiogenesis, 16-21 March 2014, Whistler, Canada.
  2. 大澤毅、低酸素・低栄養が癌悪性を誘導する分子機構とその治療への応用、第72回日本癌学会学術総会、3-5, October, 2013, 横浜、神奈川県.
  3. 大澤毅、低酸素・低栄養に誘導されるヒストン脱メチル化酵素が腫瘍血管新生と癌代謝を制御する. 第72回日本癌学会学術総会、3-5, October, 2013, 横浜、神奈川県.
  4. Osawa T, Histone demethylases expressed under hypoxia and nutrient starvation regulate tumor growth by modulating tumor angiogenesis and metabolism, Poster Presentation, European Cancer Congress 2013, Sep 27-Oct 1, 2013 Amsterdam, Netherlands.
  5. Osawa T, Down's syndrome candidate region-1 mediates corneal opacity via corneal angiogenesis. Oral presentation, The 10<sup>th</sup> Korea-Japan Joint Symposium on Vascular Viology, December 5-7, 2012, Tokushima.

6. 大澤毅、低酸素・低栄養に誘導されるヒストン修飾酵素が血管新生を介して癌の増殖を制御する。第71回日本癌学会学術総会、19-21, September, 2012, 札幌、北海道.
7. Osawa T, Paradoxically Impaired Development of Atherosclerosis in Hyperlipidemic Down's syndrome candidate region-1<sup>-/-</sup> and Apolipoprotein E<sup>-/-</sup> Double-Knockout Mice, The International Vascular Biology Meeting, June 2-5, 2012, Wiesbaden, Germany.
8. Osawa T, Inhibition of histone demethylase JHDM2A expressed under hypoxia and nutrient starvation suppresses tumor growth and enhances anti-angiogenic therapy, Keystone Symposia on Angiogenesis, Snowbird Utah, 16-21 Jan 2012.
9. 大澤毅、低酸素・低栄養で誘導されるヒストン脱メチル化酵素 JHDM2A は血管新生を介して癌の進展に寄与する。第34回日本分子生物学会年会、13-16 Dec 2011、横浜、神奈川県.
10. Osawa T, Histone demethylases regulate tumor growth and enhances anti-angiogenic therapy. The 1<sup>st</sup> Asia-Pacific Vascular Biology Meeting, 8-10 Dec 2011, Tokyo.
11. 大澤毅、低酸素・低栄養下で生存する癌細胞を標的とした新規制癌法。第70回日本癌学会学術総会、3-5, October, 2011、名古屋、愛知県.
12. Osawa T, Inhibition of histone demethylase JHDM2A suppresses tumor growth and enhances anti-angiogenic therapy. The 9<sup>th</sup> Japan-Korea Joint Symposium on Vascular Biology, 24-27 August, 2011, Busan, Korea.
13. Osawa T, Targeting cancer cells resistant to hypoxia and nutrient starvation double-deprivation stress as a novel cancer therapy. The American Association for

Cancer Research 102st Annual Meeting, 2-6 April, 2011, Orlando, USA.

[図書] (計0件)

[産業財産権]  
○取得状況 (計1件)

名称：抗腫瘍剤  
発明者：澁谷正史、土田里香、大澤毅  
権利者：東京医科歯科大学  
種類：PCT  
番号：JP2010/004778  
取得年月日：平成22年7月  
国内外の別：国際

[その他]  
ホームページ等

<http://ganshien.umin.jp/public/research/spotlight/oosawa/index.html>

<http://www.lsbm.org/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

大澤毅 (OSAWA, Tsuyoshi)  
東京大学・先端科学技術研究センター・  
システム生物医学・特任助教  
研究者番号：50567592