

令和元年6月8日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2018

課題番号：26461568

研究課題名(和文) 腫瘍の悪性化に関する血管新生シグナルの作用機構の解明と新規治療法の開発

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism of BMP4 signaling involved in malignant transformation and development of the new treatment of neuroblastoma

研究代表者

土田 里香 (TSUCHIDA, Rika)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・非常勤講師

研究者番号：60571388

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：神経の発生に関するBMP4は、固形腫瘍(子宮頸がん、好転移性肺がん、メラノーマ)の血管新生を阻害し、既存の正常な血管に傷害を与えることなく腫瘍抑制効果をもたらす。神経芽細胞腫についてはBMP4の投与により腫瘍細胞そのものの増殖抑制が認められ、動物実験では顕著な腫瘍抑制効果が確認された。RNAシーケンス解析により、神経芽細胞腫でしばしば増幅が認められるMYCN遺伝子発現がBMP4によって抑制され、MYCN蛋白の発現低下も認められた。更にMYCN遺伝子と連動してがん幹細胞の制御に関わる遺伝子発現が腫瘍抑制に関与することが分かった。BMP4は神経芽細胞腫の新規治療薬となることが期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

小児固形腫瘍として頻度の高い神経芽細胞腫の予後は極端に分かれており、自然に退縮する腫瘍がある一方で、非常に悪性度を増し難治性腫瘍となる場合がある。本研究ではヒトの神経発生とその分化に必須であるBMP4が、神経芽細胞腫の著明な腫瘍抑制効果をもたらす、その作用機序としてMYCN遺伝子発現低下とがん幹細胞に関わる遺伝子の制御に関与することを見いだした。神経芽細胞腫は元来がん幹細胞様の性質を持つため、BMP4シグナル経路がその予後の良悪を決定づけるON/OFF効果を担っている可能性がある。BMP4の投与は既存の血管を傷害しないため、副作用を避け、神経芽細胞腫の完全治癒を目指せる治療薬として期待できる。

研究成果の概要(英文)：BMP4 is expected to be a novel treatment for neuroblastoma.

BMP4, which is involved in neural development, inhibits angiogenesis in solid tumors (cervical cancer, metastatic lung cancer, melanoma) and provides tumor suppression without damaging existing normal blood vessels. With especially respect to neuroblastoma cells, administration of BMP4 inhibited the growth of the cells themselves, and animal experiments showed a remarkable tumor suppressor effect. By RNA sequence analysis, BMP4 suppressed the expression of MYCN gene, which is often recognized in neuroblastoma, and confirmed the decrease in expression of MYCN protein. Furthermore, it was also found that the genes related to cancer stem cells regulate neuroblastoma suppression associating with the MYCN gene expression.

研究分野：がん微小環境を標的とした腫瘍抑制/小児がん

キーワード：神経芽細胞腫 BMP4 がん微小環境 腫瘍血管新生 固形腫瘍 がん幹細胞 小児がん Angiogenesis

1. 研究開始当初の背景

「がんは血液が供給されなければ直径 3cm 以上大きくはならない。がんが血管を新生する仕組みを阻害すれば、がん細胞を完全に消滅させることは出来なくても、がんと共に生きていくことは可能かもしれない」この理論は、1970 年代初頭、ハーバード大学のfolkman 教授によって提唱された。2002 年 6 月、私はカナダ・トロント大学でがん細胞の血管新生シグナルの解析をテーマに研究に取り組み、その年の冬、幸運にもfolkman 教授の講義を直接受けた。留学以前の数年間、私は小児科医師として、がんを闘う子ども達と向き合ってきた。2019 年の現在と比較すると小児がんの全体の死亡率は下がっているが、1990 年代はまだ完治の難しい病気だった。強力な化学療法後に寛解状態となり、安堵している中で、不幸にもがんが再発した時、そのがんは増殖能がさらに亢進しており、治療に抵抗性を示すなど、明らかに初発の病態より悪性度を増していることが多いことは、私の大きな疑問だった。初発時と同じ遺伝子異常をもったがん細胞の再発ならば、理論的には再発した時も同じ治療が効果をもたらしてよいはずである。しかし、再発時のがん細胞は明らかに初発とは性格の違う難治性のがんに変貌している。

この現象を紐解くためには、がん細胞そのものの遺伝子異常を基礎とした研究だけではなく、血管新生や免疫応答を含む、がんを取り巻く微小環境にも目を向け、がんも周囲の環境からさまざまな情報を受け、それに影響されて変貌する悪性の新生物であるとの視点から研究を行う必要があると強く考えた。本研究課題に至った学術的背景を下記の(1)から(3)に述べる。

(1) 小児腫瘍性疾患の遺伝的背景要因としての ATM 遺伝子異常の関与

1990 年、Li-Fraumeni 症候群という家族性のがんが発症する疾患(主に骨軟部肉腫、乳がん、脳腫瘍)では、がん抑制遺伝子である p53 に変異があることが原因であると報告され、p53 遺伝子のいわば“傷”が遺伝によって子どもにも引き継がれることでがんが発症することが初めて示された。私は小児科医師である立場から、まず“がんになりやすい体質”の子どもに p53 を上流で制御する ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated) 遺伝子の変異を探索し、小児のホジキンリンパ腫や乳児白血病の発症に、ATM 遺伝子変異が関係していることを見出し報告した( ) ( 基盤研究(B)、DNA 切断・修復機能異常による疾患の病態解明 2001 年度～2002 年度、研究代表者：水谷修紀)。さらに私はこれらの ATM 遺伝子の変異を、酵母の栄養要求性を利用した安価で簡便な大規模スクリーニング法を開発し報告した( ) ( 萌芽的研究、毛細血管拡張性運動失調症の酵母による大規模スクリーニング法の開発とその応用、2001 年度、研究代表者：水谷修紀)。

(2) 血管新生シグナル VEGF/Flt1 ががん幹細胞を活性化させ、腫瘍の悪性化(抗がん剤耐性・高転移性)に関与する

2002 年 7 月から、上述した Li-Fraumeni 症候群の原因が p53 遺伝子の変異であると報告した David Malkin 教授の研究室(カナダ・トロント小児病院)にポスドク研究員として留学し、抗がん剤耐性のメカニズムに取り組んだ。そこで私は、固形腫瘍(主に骨肉腫、神経芽細胞腫、横紋筋肉腫)の細胞の中に潜む極少数のがん細胞(Side-Population Cells: SP 細胞; がん幹細胞の性質を持つ細胞集団)の細胞膜上で、血管新生の中心的なシグナル伝達経路である VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) シグナル経路が機能し、その自己分泌刺激(がん細胞が分泌する VEGF でがん細胞が持つ VEGF 受容体 Flt1 が自ら刺激を受ける)が化学療法後の抗がん剤耐性、再発、転移に関わることをマウスモデルにおいて証明した( )。

また VEGF/Flt1 (VEGF-R1) シグナル経路はがんの血管新生に関わるのみならず、Stemness Switch (がんをがん幹細胞様に変化させる起点)として重要な働きをしていることを示し、同時に、SP 細胞の VEGF/Flt1 シグナル経路を阻害した上で抗がん剤を投与すると、がんの進展を完全に抑え込める可能性を示した( ) (2002 年～2006 年まで、カナダ・トロント小児病院 RESTRACOMP (RESEARCH TRAINING COMPETITION) および Terry Fox がん研究財団のより受けた特別奨励費により遂行した)。

(3) がん微小環境における BMP4/TSP1 回路は腫瘍血管新生の阻害と固形腫瘍の増殖抑制に関与する

2007 年に帰国し、同年 11 月から血管新生シグナルの受容体・Flt1 (VEGF-R1) の発見者である澁谷正史教授の研究グループに所属し、血管新生が腫瘍増大および悪性化を抑制するメカニズムについての研究を行い、がんの微小環境を標的とした新しいシグナル経路を見出した( )。血管新生因子の一つである BMP4 (Bone Morphogenetic Protein 4) が TSP-1 (Thrombospondin-1) の腫瘍細胞からの分泌を促し、腫瘍血管内皮細胞の増殖を抑え腫瘍の縮小効果をもたらすことを、マウスを使った動物実験で証明し報告した( )。更に BMP4 の血管新生抑制効果は、BMP4 投与量を 3 倍量に増やしても、既存の血管を傷害することなく、がん微小環境で起こる de novo の血管新生にのみ抑制効果をもたらすことも明らかにした( )。BMP4 は既存のたんぱく製剤であり、腹腔内投与により腫瘍抑制効果が認められることから、具体的で迅速な臨床応用が期待された(特別研究員奨励金 RPD, 2010 年度～2012 年度、研究代表者：土里里香)。

以上(1)(2)(3)の研究成果により、骨形成因子として知られていた BMP4 が、がんの血管新生に関与すること、BMP4 の投与により固形腫瘍の腫瘍抑制を来すこと、さらにそれは TSP1 という血管新生阻害因子が血管内皮細胞の増殖を抑制することによってもたらされることを明らかにした。

その過程で、神経芽細胞腫に関しては BMP4 が直接腫瘍細胞に強い増殖抑制効果を示すこと見いだした。BMP4 による神経芽細胞腫の増殖抑制効果は非常に劇的であったため、新しい神経芽細胞腫の新規治療法になることを期待し、本研究を開始することとなった。

参考文献：(本研究課題に関与した論文)

Takagi M\*, **Tsuchida R\***, et al. (\* Both authors contributed equally) Identification and characterization of polymorphic variations of the ataxia telangiectasia mutated (ATM) gene in childhood Hodgkin disease. *Blood*. Jan 1;103(1):283-90. 2004

Oguchi K, Takagi M, **Tsuchida R**, et al. Missense mutation and defective function of ATM in a childhood acute leukemia patient with MLL gene rearrangement. *Blood*. May 1;101(9):3622-7. 2003

**Tsuchida R**, et al. Detection of ATM Gene Mutation in Human Glioma Cell Line M059J by a Rapid Frame-Shift/ Stop Codon Assay in Yeast *Radiat. Res.* 158, 195-201, July 2002

**Tsuchida R**, et al. VEGF / Flt1 signaling regulates tumorigenicity following exposure to cytotoxic chemotherapy in osteosarcoma, *Oncogene* 26;27(28): 3923-34. 2008

Osawa T, **Tsuchida R**, et. al., Increased expression of histone demethylase JHDM1D under nutrient starvation suppresses tumor growth via down-regulating angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Dec 20;108(51):20725-9

**Tsuchida R\*\***, et.al., BMP4/Thrombospondin-1 loop paracrinically inhibits tumor angiogenesis and suppresses the growth of solid tumors. *Oncogene* 2013 Sept 9. (\*\*Corresponding author)

## 2. 研究の目的

がん血管新生シグナル経路の一つである BMP4/TSP1 経路を制御することで、神経芽細胞腫を標的とした腫瘍抑制効果を示す新規治療法の開発を研究の目的とした。

小児に発症する主な固形腫瘍である神経芽細胞腫の治療は、成長期にある子どもの治療であることを考慮すると、極力、正常細胞や正常臓器に傷害を与えず、腫瘍とその周囲組織(がん微小環境)のみを標的とした治療であることが期待される。人生 100 年時代と言われる今日にあって、このような生活の質(QOL; Quality of life)を考慮したがん治療法は、延いては、どの年代においても期待されるべき治療法である。

## 3. 研究の方法

ヒトの固形がん細胞株を用いて、*in vitro*で BMP4 の腫瘍抑制効果を検討する。BMP4 によって直接腫瘍細胞の増殖抑制効果がなかった場合は、マウスに腫瘍細胞を移植し、腫瘍が増大する際に周囲の組織から引き込もうとする腫瘍の血管新生を阻害できるかどうかに着目し、病理組織学的手法を用いて血管新生阻害の効果を検討する。また同時に、BMP4 による抗腫瘍効果のメカニズムを分子レベルで解明するために、BMP4 の刺激によって変動する RNA シークエンス解析等を行い、腫瘍細胞内でどのようなシグナル経路が活性化、又は不活性化されているのかを確認する。候補に挙がった遺伝子については、蛋白発現の確認、BMP4 投与による候補分子の機能解析を検証し、最終的に腫瘍細胞を移植したマウスによって、BMP4 投与による副作用がないかを確認しつつ、抗腫瘍効果の確実性を検証する。

## 4. 研究成果

### (1) TGF ファミリーの一つである BMP4 シグナル経路はがんの血管新生を制御している

がんの微小環境で起こる血管新生は、VEGF シグナル経路が主に関与している。がんが生き残るため、又は転移するために必要な血管を新生するため、腫瘍細胞は自ら VEGF を大量に放出している。その VEGF に対する阻害剤(総称名: アバスタチン、一般名: ベバシズマブ)は臨床応用されて久しいが、一定の効果を示す反面、薬剤耐性の問題も提起されており、今回の研究成果の一つは、腫瘍増殖抑制に関与する新しい血管新生シグナル経路が見いだされたことである。

BMP4 は元来、生物発生の極初期に関与する重要な分子として知られ、ヒトでは神経堤の正常な形成に不可欠な分子である。しかしながら、私どもの研究室では、ラットの発生の過程で、目のレンズに残る血管を完全に退縮させる因子が BMP4 であるとの実験結果を得ていたことから、BMP4 ががんの血管新生抑制にも効果を発揮するのではないかと考えた。

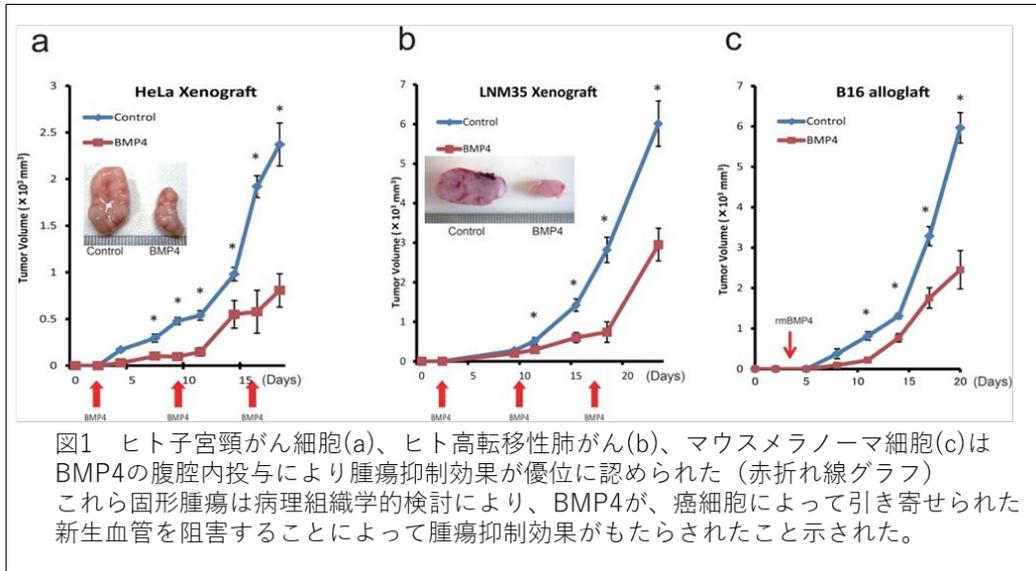
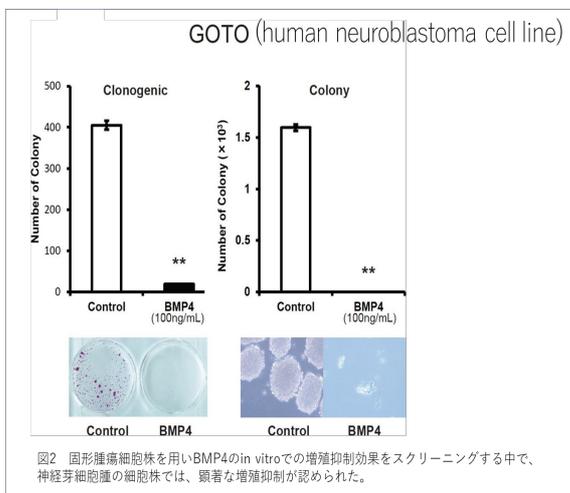


図1では、マウスの皮下に移植した際、腫瘍を形成する能力をもつ固形腫瘍細胞株を用いて、BMP4の抗腫瘍効果を検討し、抑制効果があることが確かめられた。これらは腫瘍の病理組織学的検討により、移植した腫瘍の周囲の血管新生が、BMP4により有意に抑制されていることが分かった。

## (2) BMP4 シグナル経路は神経芽細胞腫そのものの増殖を阻害する

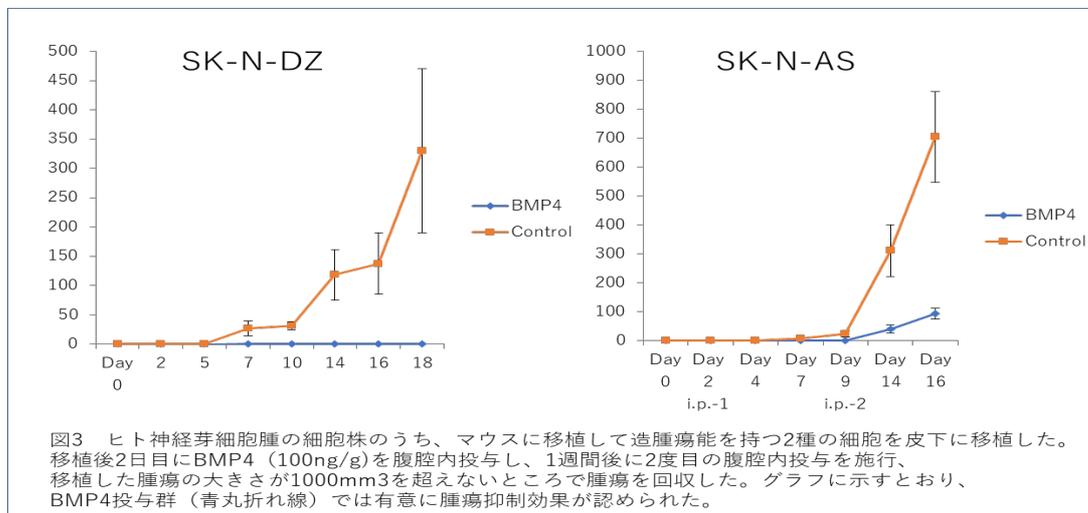


がんのがんの微小環境の相互関係を取り持つ血管新生に着目し研究を進めている中で、BMP4は神経芽細胞腫に関しては、血管新生阻害を介さず、腫瘍細胞レベルにおいて顕著な増殖抑制を示すことが *in vitro* の実験で判明した(図2)。

さらに、マウスに造腫瘍能のある神経芽細胞株を移植し、BMP4を投与したところ、有意な腫瘍抑制効果が認められた(図3)。これは、図1に示した固形腫瘍の腫瘍抑制よりも顕著な効果であり、BMP4を作用させた群では、腫瘍そのものが退縮し、検体を取り出しての病理組織学的検討はもとより、RNA等遺伝子の採取も出来ない程であった。移植腫瘍の完全な消退は臨床的には極めて理想的な表現型といえるが、安全に臨床応用するためには

BMP4がなぜ腫瘍を退縮させることが出来たのか、その作用機序を詳細に解明することが必要である。

一方でこの実験結果は、BMP4による作用が腫瘍細胞内で完結し、周囲の微小環境に影響をもちたらず以前に腫瘍の増殖を抑制するためとも考えられたため、入手できる限りのヒト神経芽細胞の細胞株を集め、*in vitro*でBMP4を作用させ、増殖抑制効果を確認し、腫瘍細胞内ではどのような遺伝子が発現または抑制されているのかについてRNA遺伝子の網羅的な解析を行った。



### (3) BMP4 は MYCN 遺伝子の発現を抑制して神経芽細胞腫の増殖を抑制する

BMP4 を作用させた神経芽細胞腫の細胞株を用いて RNA シークエンス解析を行い、その結果、増殖が抑制された細胞株において、神経芽細胞腫でしばしば増幅が認められる MYCN 遺伝子の発現抑制が確認され、蛋白の発現低下も確認することができた。MYCN 遺伝子上流にある制御遺伝子も見つかり、それらはがん幹細胞の進展に関わる遺伝子であることも分かった。本研究の成果は、今後も、国内外の学会で報告する予定であり、論文作成も同時に進行させている。

BMP4 は既に蛋白製剤として製品化されており、マウス実験では腹腔内投与で腫瘍抑制効果が確認されている。BMP4 による抗腫瘍効果のメカニズムが更に解明され、迅速に臨床応用されることを期待している。進展の早い難治性の神経芽細胞腫に対する安全性と有効性が確立された新規治療法を見つけるべく今後も努力を続けたい。

## 5 . 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計 3 件)

Takagi M, Yoshida M, Nemoto Y, Tamaichi H, Tsuchida R, Seki M, Uryu K, Nishii R, Miyamoto S, Saito M, Hanada R, Kaneko H, Miyano S, Kataoka K, Yoshida K, Ohira M, Hayashi Y, Nakagawara A, Ogawa S, Mizutani S, Takita J.

Loss of DNA Damage Response in Neuroblastoma and Utility of a PARP Inhibitor

J Natl Cancer Inst. 査読有り 109 ( 11 ) 1-12 2017

DOI: 10.1093/jnci/djx062.

Sora Sandhya, Rika Tsuchida, Sukanya Gayan, Rashmi Bhuyan, Joyeeta Talukdar, Bidisha Pal, Seema Bhuyan, Jugal Ch Das, Amal Ch Katak, Debabrata Baishya, and Bikul Das

Undenatured whey protein isolate exhibit chemopreventive activity against HPV-16 induced carcinogenesis of CD271+ oral mucosa stem cells

American Association for Cancer Research 査読有り 76 ( 14 ) 4324

DOI: 10.1158/1538-7445.AM2016-4324 Published July 2016

Tsuchida R, Osawa T, et. al.

BMP4/Thrombospondin-1 loop paracrinically inhibits tumor angiogenesis and suppresses the growth of solid tumors.

Oncogene 査読有り 33 3803-11 2014

DOI: 10.1038/onc.2013.358.

### 〔学会発表〕(計 10 件)

Satoshi Miyamoto, Rika Tsuchida

Anti-tumor effect of BMP4 on human neuroblastoma cell lines

12th International BMP Conference ( Tokyo, Bunkyo-ku ) ( 国際学会 ) 2018 年

大澤毅、島村徹平、近藤彩乃、土田里香、宮野悟、油谷浩幸、澁谷正史、児玉龍彦

発表標題 アミノ酸飢餓における代謝変動ががんの悪性化に寄与する

第 77 回日本がん学会学術大会 (大阪府大阪市) 2018 年

大澤毅、土田里香、他

栄養飢餓における細胞膜リン脂質合成低下ががんの悪性化に寄与する

第 76 回 日本がん学会学術総会 2017

Sora Sandhya, Rika Tsuchida, Sukanya Gayan, Rashmi Bhuyan, Joyeeta Talukdar, Bidisha Pal, Seema Bhuyan, Jugal Ch Das, Amal Ch Katak, Debabrata Baishya, Bikul Das

Undenatured whey protein isolate exhibit chemopreventive activity against HPV-16 induced carcinogenesis of CD271+ oral mucosa stem cells.

AACR 107th Annual Meeting ( 国際学会 ) New Orleans, LA ( U.S.A. ) 2016 年

PE 生合成系の調節を介しエタノールアミンリン酸はがん細胞の飢餓耐性に寄与する

大澤毅、土田里香、他

第 75 回日本がん学会学術総会 パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市) 2016 年

低酸素低栄養で脂肪酸代謝を介して蓄積するオンコメタボロイドの解析  
大澤毅、土田里香、他  
第74回日本がん学会学術総会 名古屋国際会議場（愛知県・名古屋市）2015年

Tumor Microenvironment and Cancer Metabolism  
大澤毅、土田里香、他  
第46回高松宮妃がん研究基金国際シンポジウム（国際学会）  
パレスホテル東京（東京都・千代田区）

神経芽細胞種における ATM の機能喪失  
根本佳乃、土田里香、他  
第73回日本がん学会学術総会 パシフィコ横浜（神奈川県・横浜市）2014年

低酸素低栄養の腫瘍微小環境においてがん細胞はエピゲノム制御を介し脂質代謝を誘導する  
大澤毅、土田里香、他  
第73回日本がん学会学術総会 パシフィコ横浜（神奈川県・横浜市）2014年

神経芽細胞種における ATM の機能喪失  
根本佳乃、土田里香、他  
第56回日本小児血液・がん学会学術集会  
岡山コンベンションセンター・岡山シティーミュージアム（岡山県・岡山市）2014年

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計0件)  
取得状況(計0件)

〔その他〕  
ホームページ等

骨形成因子 4(BMP4) はがんの微小環境を制御することでがんの増殖を抑制する  
[http://www.jobu.ac.jp/laboratory/laboratory\\_news\\_20131011.html](http://www.jobu.ac.jp/laboratory/laboratory_news_20131011.html)  
がん細胞のもつ低酸素・低栄養ストレス抵抗性は新規がん剤開発の標的となり得る  
[http://www.jobu.ac.jp/laboratory/laboratory\\_news\\_20131011.html](http://www.jobu.ac.jp/laboratory/laboratory_news_20131011.html)  
がん微小環境における BMP4/TSP1 回路は腫瘍血管新生の阻害と固形腫瘍の増殖抑制に関与する  
<http://www.lsbm.org/news/2013/0910.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：大澤 毅  
ローマ字氏名：(OSAWA, tsuyoshi)  
研究協力者氏名：澁谷 正史  
ローマ字氏名：(SUBUYA, masabumi)  
研究協力者氏名：高木 正稔  
ローマ字氏名：(TAKAGI, masatoshi)  
研究協力者氏名：水谷 修紀  
ローマ字氏名：(MIZUTANI, shuki)  
研究協力者氏名：氏家 優子  
ローマ字氏名：(UJIE, yuko)  
研究協力者氏名：宮本 智史  
ローマ字氏名：(MIYAMOTO, satoshi)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。