

令和元年5月30日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2014～2018

課題番号：26710005

研究課題名(和文)腫瘍微小環境における癌幹細胞維持ならびに悪性化機構の解明

研究課題名(英文)Understanding the mechanism of CSCs maintenance in tumor microenvironment

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・特任准教授

研究者番号：50567592

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,200,000円

研究成果の概要(和文)：癌の増殖と転移には腫瘍微小環境が重要な役割を果たす。これまで申請者は低酸素下の栄養飢餓で残存する癌細胞が癌の悪性化、及び、治療抵抗性を促進することを見出し報告してきた。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癌幹細胞の詳細な解析から解明し、低酸素・低栄養に抵抗性な癌幹細胞を標的とした新しい癌の制御法の開発につながる研究を目指して研究を行った。本研究から、低酸素・低栄養・低pHといったがん微小環境に起因する悪性化機構のいち部を解明し、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治療への応用のための基盤となる研究を実施した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の低酸素・低栄養の培養系を用いて樹立した細胞株を利用することにより、低酸素・低栄養の腫瘍微小環境における癌悪性化と治療抵抗性のメカニズムを解明し既存の抗癌剤や血管新生阻害剤と併用可能な新しい制癌法を開発することが可能になる。これら抵抗性の克服は、次世代の抗癌剤や血管新生阻害剤の開発にきわめて重要と考えられ、本研究は、

- (1) 大腸がん、乳がん、肝がんなどの血管新生阻害療法が承認されている癌治療についてさらに改良を加えること
- (2) Hypovascularな膵臓癌や、高転移性な脳腫瘍などの抗癌剤や血管新生阻害療法の効果が見られない難治癌

研究成果の概要(英文)：Tumor microenvironment plays an important role in cancer growth and metastasis. The applicant has so far found and reported that cancer cells remaining under nutrient deprivation under hypoxia promote malignant transformation and resistance to cancer treatments. This study elucidated the mechanism of malignant transformation of cancer induced by hypoxia and nutrient starvation from detailed analysis of cancer stem cells, and a novel cancer control method targeting cancer stem cells resistant to hypoxia and nutrient starvation. Research was aimed to development of novel anti-cancer strategy, we elucidated malignant transformation mechanisms caused by tumor microenvironments such as hypoxia, nutrient starvation and acidic pH, and a new target that can be expected to have a synergistic effect in combination with existing chemotherapy and angiogenesis inhibition therapy for molecular basis of and therapeutic application.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：がん微小環境 がん幹細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

癌の増殖と転移には腫瘍微小環境や血管新生が重要な役割を果たす。これまで申請者は、低酸素・低栄養という腫瘍微小環境が癌の悪性化と治療抵抗性に関与することを報告してきた。また、腫瘍微小環境と癌悪性化、治療抵抗性の研究は世界的に競争を増しているが、我々は癌の悪性化や治療抵抗性の原因の一部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、国際学会で優秀賞を受賞するなど本研究は世界的にみても先駆的である。本研究は低酸素・低栄養の腫瘍微小環境における癌幹細胞の維持機構を理解し、癌の悪性化・治療抵抗性の分子機構の解明とその克服を試みるもので普遍的で推進すべき重要な課題になると考えられる。これまでの研究で申請者は、腫瘍組織内で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、低酸素領域は同時に低栄養状態にあることを見出した。また、低酸素・低栄養は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、転移能を獲得し悪性度を増すことや宿主の免疫応答を制御することを明らかにしている。さらに、低酸素・低栄養特異的に発現亢進するエピゲノム修飾因子、転写因子及び代謝経路を見出し報告してきた。さらに申請者は、低酸素・低栄養で残存する乳癌 (MCF7) 細胞において癌幹細胞の細胞表面マーカー (CD44^{high}CD24^{low}) を高発現する細胞が顕著に増加することを見出している。

2. 研究の目的

本研究は、腫瘍微小環境における癌悪性化に重要なゲノム・エピゲノム変化と癌幹細胞の維持を解析することにより、腫瘍微小環境における癌悪性化および治療抵抗性の分子機構を理解することを目的とする。さらに、低酸素・低栄養に抵抗性をもつ癌幹細胞を標的とした新規制癌法の開発や、現存する化学療法や血管新生阻害療法との併用において相乗効果が期待できる標的分子の探索など治療への応用のための基盤となる研究を目指す。

3. 研究の方法

申請者は低酸素下の栄養飢餓という細胞にとって粗悪な腫瘍微小環境に長期間生存可能な癌細胞は癌の悪性化を促進するという研究成果を得ている。この成果をもとに研究期間内に以下の項目について詳細を明らかにする。

- 【1】 低酸素・低栄養で癌悪性化に寄与する癌幹細胞の解析
- 【2】 低酸素・低栄養の癌幹細胞における EIF2 シグナルの関与
- 【3】 低酸素・低栄養の癌幹細胞における RORX による転写制御の役割

これらを、ヒト・マウスの癌細胞株の遺伝子過剰発現、si/sh などの抑制系を用いた *in vitro* の実験系と、*in vivo* のマウス腫瘍移植実験系において抗腫瘍効果を検討を行った。

4. 研究成果

栄養飢餓で残存する癌細胞が腫瘍の悪性化及び治療抵抗性を促進することを見出し報告してきた。本研究は低酸素・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幹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治療への応用のための基盤となる研究を目的とした。

研究成果として、

(1) 腫瘍組織において癌細胞の少なくとも一部は低酸素・低栄養に陥り、これがヒトの癌においてどのように悪性化に寄与するかは知られていない。本研究では、低酸素・低栄養で癌細胞における癌幹細胞 (CD44^{high}CD24^{low}) が乳癌がん細胞株 (MCF7) において顕著に増加することを確認した。このことから、低酸素・低栄養のがん悪性化にも癌幹細胞の関与が示唆された。

(2) さらに本研究では、低酸素・低栄養下の癌細胞から癌幹細胞分画を FACS で分離し、癌幹細胞に寄与するシグナル系の検討をマイクロアレー等の網羅的な遺伝子発現解析から検討した結果、癌悪性化に寄与するシグナル系として E2F やストレス応答シグナルが亢進することを見出した。

(3) 低酸素・低栄養における癌幹細胞の RNA-Seq、ChIP-Seq、シングルセル RNA-Seq の統合解析を行い、RORX 転写因子を癌幹細胞の分子標的候補の 1 つとして同定した。

本研究により、低酸素・低栄養の悪性化には癌幹細胞の関与が示唆され、さらにストレス応答シグナル経路、RORX 転写因子が癌幹細胞の維持に重要な可能性が示された。

癌の増殖と転移には腫瘍微小環境が重要な役割を果たす。申請者は低酸素下の栄養飢餓で残存する癌細胞が腫瘍の悪性化及び治療抵抗性を促進することを見出し報告してきた。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癌幹細胞の詳細な解析から解明し、低酸素・低栄養に抵抗性な癌幹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治療への応用のための基盤となる研究を目的とする。

研究成果として、(1) 低酸素・低栄養で癌細胞における癌幹細胞 (CD44^{high}CD24^{low}) が顕著に増加する細胞における癌幹細胞を FACS 分離し、癌悪性化に寄与する RORX 転写因子を同定したことから、レトロウィルスベクター (pMX-RORX) を作成し、HeLa 細胞など幾つかのヒトがん細胞株で RORX の安定的な過剰発現株の樹立に成功した。

(2) RORX の安定過剰発現株を用いた細胞増殖アッセイを行ったところ RORX 過剰発現は癌細胞の in vitro の細胞増殖に対して大きな影響はなかったものの、in vivo の腫瘍形成能が顕著に増加した、このことから、低酸素・低栄養などの腫瘍微小環境における癌悪性化機構の一つにこの転写因子の関与が示唆されたため詳細な解析を現在行っている。

癌の増殖と転移には腫瘍微小環境が重要な役割を果たす。これまで申請者は低酸素下の栄養飢餓で残存する癌細胞が癌の悪性化、及び、治療抵抗性を促進することを見出し報告してきた。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癌幹細胞の詳細な解析から解明し、低酸素・低栄養に抵抗性な癌幹細胞を標的とした新しい癌の制御法の開発を目的とし、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治療への応用のための基盤となる研究を目指す。

(1) 癌代謝物の網羅的解析(メタボローム解析)から低酸素・低栄養の癌細胞で鍵となる代謝経路を同定しているが、低酸素や低 pH で鍵となる代謝経路とは異なることを見出した。また、癌の悪性化、及び、癌幹細胞維持に関与する可能性が示唆された新規の癌代謝物を複数同定したため、引き続き、これら癌代謝物が癌悪性化に関与するメカニズムを検討している。また、(2) 低酸素の結果起こると考えられている低 pH 腫瘍微小環境は癌の浸潤・転移など癌悪性化を促進することが知られているが、癌悪性化に寄与する転写因子や標的遺伝子群は未だ不明な点が多い、我々は新たに低 pH 微小環境を模倣する培養系を構築し、低 pH に誘導される遺伝子群が癌の悪性化や予後不良に関与することを見出し論文報告し、新たに低 pH 異存的に蓄積する代謝物や鍵となる代謝経路を見出した

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 8 件)

1. Kidoya H, Muramatsu F, Shimamura T, Jia W, Satoh T, Hayashi Y, Naito H, Kunisaki Y, Arai F, Seki M, Suzuki Y, **Osawa T**, Akira S., Takakura N. Regnase-1-mediated post-transcriptional regulation is essential for hematopoietic stem and progenitor cell homeostasis, *Nature Commun.*, 10:1072, 2019.
2. Yamamoto R, **Osawa T**, Sasaki Y, Yamamoto S, Anai M, Izumi K, Matsumura Y, Sakai J, Aburatani H, Mizokami A, Kodama T, Tanaka T. Overexpression of p54nrb/NONO induces differential EPHA6 splicing and contributes to castration-resistant prostate cancer growth. *Oncotarget*, 2018, 9(12), 10510-10524.
3. Kondo A & **Osawa T**. Establishment of an extracellular acidic pH culture system. *JoVE*, 2017, 129, e56660.
4. Kondo A, Nonaka A, Shimamura T, Yamamoto S, Yoshida T, Kodama T, Aburatani H and **Osawa T**. Long non-coding RNA JHDM1D-AS1 promotes tumor growth by regulating angiogenesis in response to nutrient starvation. *Molecular and Cellular Biology*, 2017, 37(18). pii: e00125-17.
5. Yamamoto S, Muramatsu M, Azuma E, Ikutani M, Nagai Y, Sagara H, Koo BN, Kita S, O'Donnell E, **Osawa T**, Takahashi H, Takano K, Dohmoto M, Sugimori M, Usui I, Watanabe Y, Hatakeyama N, Iwamoto T, Komuro I, Takatsu K, Tobe K, Niida S, Matsuda N, Shibuya M, Sasahara M. A subset of cerebrovascular pericytes originates from mature macrophages in the very early phase of vascular development in CNS. *Scientific Reports*. 7(1) :3855.
6. Kanki Y, Nakaki R, Shimamura T, Matsunaga T, Yamamizu K, Katayama S, Suehiro J, **Osawa T**, Aburatani H, Kodama T, Wada Y, Yamashita J and Minami T, Dynamically and epigenetically coordinated GATA/ETS/SOX transcription factor expression is indispensable for endothelial cell differentiation. *Nucleic Acids Research*, 2017, 45(8):4344-4358.
7. Kondo A, Yamamoto S, Nakaki R, Shimamura T, Hamakubo T, Sakai J, Kodama T, Yoshida T, Aburatani H* and **Osawa T***. Extracellular Acidic pH Activates the Sterol Regulatory Element-binding Protein 2 to Promote Tumor Progression. *Cell Reports*, 2017, Feb 28, (18), 2228-2242.
8. 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* 2014 Jul 17;33(29):3803-11. doi: 10.1038/onc.2013.358

[学会発表](計 51 件)

1. 大澤毅ら 低酸素・低栄養に抵抗性を持つ癌細胞を標的とした新規制癌法 東京大学生命科学シンポジウム 口頭発表 2011/6/4 東京
2. 大澤毅ら 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 がんとハイボキシア研究会 口頭発表 2011/11/27 東京
3. Osawa T., et al. Histone demethylases regulate tumor growth and enhances anti-angiogenic therapy The 1st Asia-Pacific Vascular Biology Meeting 招待講演

4. 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 口頭発表 2011/10/3-5 名古屋
5. 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 口頭発表 2011/12/13-16 横浜
6. 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 102nd Annual Meeting 2011/4/2-6 アメリカ
7. Osawa T., et al. Inhibition of histone demethylase JHDM2A suppresses tumor growth and enhances anti-angiogenic therapy The 9th Japan-Korea Joint Symposium on Vascular Biology
8. 大澤毅 低酸素・低栄養によって誘導されるヒストン脱メチル化酵素 JHDM2A を標的とした新規制癌法 がん若手研究者ワークショップ 口頭発表
9. Osawa T, Toyama K, Nakagawa S, Miura M, Suehiro J, Tanaka T, Aburatani H, Kodama T, and Minami T Paradoxically Impaired Development of Atherosclerosis in Hyperlipidemic Down 's syndrome candidate region-1-/- and Apolipoprotein E-/- Double-Knockout Mice The 17th International Vascular Biology Meeting 口頭発表 2012/6/2 ドイツ
10. 大澤毅, 土田里香, 村松昌, 王峰, 島村徹平, 宮野悟, 南敬, 児玉龍彦, 澁谷正史 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 口頭発表 2012/9/19 札幌
11. Osawa T, Nakagawa S, Toyono T, Toyama K, Miura M, Suehiro J, Tanaka T, Usui T, Amano S, Aburatani H, Kodama T, and Minami T Down 's syndrome candidate region-1 mediates corneal opacity via corneal angiogenesis The 10th Korea-Japan Joint Symposium on Vascular Biology 口頭発表 2012/12/5
12. Osawa T Inhibition of histone demethylase JHDM2A expressed under hypoxia and nutrient starvation suppresses tumor growth and enhances anti-angiogenic therapy Keystone Symposia 招待講演
13. 大澤毅ら 低酸素・低栄養の腫瘍微小環境と癌代謝 第1回がん代謝研究会 口頭発表 2013/10/30-11/1 鶴岡
14. 大澤毅ら 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 招待講演 2013/10/3-5 横浜
15. 大澤毅ら 低酸素・低栄養の腫瘍微小環境が脂質分解を促進し癌悪性に寄与する 第11回がんハイポキシア研究会 招待講演 2013/12/13-14 仙台
16. Osawa T Histone demethylases expressed under hypoxia and nutrient starvation regulate tumor growth by modulating tumor angiogenesis and metabolism European Cancer Congress 2013ポスター発表 2013/9/27-10/1 オランダ
17. Osawa et al Histone demethylases regulate tumor angiogenesis and metabolism 第18回国際血管生物学会 口頭発表 2014/4/14 京都
18. 大澤毅ら 腫瘍微小環境に起因するエピゲノム因子とncRNAの腫瘍増殖機構とsiRNAを用いた増殖抑制 第6回日本RNAi研究会 招待講演 2014/8/28 広島
19. 大澤毅 低酸素・低栄養の腫瘍微小環境におけるエネルギー代謝の解明 がん若手ワークショップ 口頭発表 2014/9/3
20. 大澤ら 低酸素・低栄養の腫瘍微小環境において癌細胞はエピゲノム制御を介して脂質代謝を誘導する 第73回日本癌学会 口頭発表 2014/9/25 横浜
21. 大澤ら 腫瘍微小環境における代謝とシステムバイオロジー 第87回日本生化学会 招待講演 2014/10/15 京都
22. 大澤ら 腫瘍微小環境におけるエピゲノム制御を介したオンコメタボライトの解析 第37回分子生物学会 口頭発表 2014/11/25 横浜
23. Osawa et al. Histone demethylases regulate tumor angiogenesis and metabolism 第18回国際血管生物学会 2014/4/14-17
24. Osawa T et al. Histone demethylases regulate tumor angiogenesis and metabolism Keystone Symposia
25. 大澤ら Cancer cells utilize lipid metabolism under hypoxic and nutrient starved tumor microenvironment 第1回血管生物医学若手研究会 招待講演 2015/2/6 東京
26. Osawa T et al. Cancer cells utilize lipid metabolism under hypoxic and nutrient starved tumor microenvironment 春季特別日本血管生物医学学会シンポジウム 招待講演 2015/5/13 大阪
27. 大澤ら オミクス統合解析から捉えた腫瘍微小環境とがん代謝 第3回がん代謝研究会 招待講演 2015/7/16 金沢
28. 大澤毅 オミクス統合解析から捉えた腫瘍微小環境とがん代謝 国立がんセンター東病院悪液質セミナー 招待講演 2015/8/5
29. 大澤ら メタボロミクスによる新しいオンコメタボライト EAP の発見 第27回高遠シンポジウム 口頭発表 2015/8/26 大津

30. Osawa T et al. Cancer cells utilize lipid metabolism under hypoxia and nutrient starvation 18th European Cancer Congress-40th ESMO 2015 2015/9/25 オーストリア
31. 大澤ら 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ライトの解析 第74回日本癌学会学術集会 口頭発表 2015/10/8 名古屋
32. Osawa T Tumor microenvironment and cancer metabolism 第46回高松宮妃癌研究基金国際シンポジウム 招待講演 2015/11/16
33. 大澤ら マルチオミクス統合解析から捉えた腫瘍微小環境 BMB2015 第38回日本分子生物学会年会、第88回日本生化学会大会 合同大会 招待講演 2015/12/1 神戸
34. 大澤ら Cancer cells utilize lipid metabolism under hypoxic and nutrient starved tumor microenvironment 第1回血管生物医学若手研究会 招待講演 2015/2/6-7
35. 大澤毅 メタボロミクスによる新規オンコメタボライト PEtn の発見 第一回生活習慣病とがんの代謝栄養メカニズム研究会 ポスター発表(最優秀ポスター賞受賞) 2016/2/27
36. 大澤ら 癌代謝物エタノールアミンリンは低栄養のがんの生存に寄与する 第2回血管生物医学若手研究会 招待講演 2016/3/4
37. 大澤毅 腫瘍微小環境から捉えたがん代謝 御茶ノ水がん学アカデミア第122回集会 招待講演 2016/3/23 東京
38. 大澤毅 腫瘍微小環境から捉えたがんの代謝戦略 第4回がん代謝研究会 招待講演 2016/7/7 鹿児島
39. 大澤毅 マルチオミクスが解き明かす腫瘍微小環境とがん代謝 第89回日本生化学会大会 招待講演 2016/9/25 仙台
40. 大澤毅ら Phosphoethanolamine Stimulates Cancer Cell Tolerance against Nutrient Starvation through Alteration of PE Biosynthesis 第75回日本癌学会 2016/10/6 横浜
41. 大澤毅 栄養飢餓におけるがんのトランスメタボロミクス 第39回日本分子生物学会 招待講演 2016/11/30 横浜
42. 大澤毅 がん微小環境と代謝エピゲノム制御の研究 第25回日本がん転移学会 招待講演 2016/7/21-22 米子
43. 大澤毅ら がん代謝と血管生物学の融合を目指して 第3回血管生物若手研究会 招待講演 2017/3/3 兵庫
44. 大澤毅 ニュートリオミクスから迫るがんの病態解明と治療戦略 ConBio2017 招待講演 2017/12/6-9 神戸
45. 大澤毅 腫瘍微小環境における細胞膜リン脂質代謝の役割 第5回がん代謝研究会 招待講演 2017/7/13-14 札幌
46. 大澤毅 Down-regulation of PE Synthesis promotes tumor progression under starvation 第76回日本癌学会学術総会 口頭発表 2017/9/28-30 横浜
47. Osawa T Comprehensive Nutriomics Approach Reveals Mechanism of Tumor Aggressiveness 16th Korea-Japan Joint Symposium on Vascular Biology 招待講演 2019/4/25-26 韓国
48. 大澤毅ら 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回日本癌学会学術大会 2018/9/27-29 大阪
49. Osawa T et al. Glutamine Deprivation Promotes Tumor Progression through Down-regulation of PCYT2 CSHL Meeting
50. 大澤毅 ニュートリオミクスでがん悪性化機構を解き明かす 第41回日本分子生物学会 招待講演 2018/11/28-30 横浜
51. Osawa T et al. Glutamine Deprivation Promotes Tumor Progression through Down-regulation of PCYT2 The 11th JCA-AACR Joint Conference 2019/2/8-12 アメリカ

〔図書〕(計 4件)

1. 大澤毅, 血管のバイオロジー オミクスが加速させる血管研究, *細胞*, 50(13), 562-565, 2018.
2. 近藤彩乃, 大澤毅, 酸性環境における腫瘍の悪性化機構, *生化学*, 90(4) 502-506, 2018.
3. 大澤毅, がん特異的な代謝 4. 酢酸代謝, *実験医学*, 35(10) 1614-1618, 2017
4. 大澤毅, 遺伝子制御の新たな主役 栄養シグナル 第1章 新たに見えてきた, 栄養・代謝物シグナルによる遺伝子制御メカニズム 1. 栄養・代謝物シグナルのメタボローム解析, *実験医学*, 34(15) 2417-2422, 2016.

〔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

<https://www.onc.rcast.u-tokyo.ac.jp>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

該当なし

(2)研究協力者

該当なし

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。