

令和元年6月6日現在

機関番号：14301

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2014～2018

課題番号：26111005

研究課題名（和文）腫瘍内低酸素応答を利用した癌悪性化制御法の開発

研究課題名（英文）Development of cancer therapy based on the hypoxia response of cancer cells

研究代表者

井上 正宏（INOUE, Masahiro）

京都大学・大学院 医学研究科・特定教授

研究者番号：10342990

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 66,100,000円

研究成果の概要（和文）：我々の開発した初代三次元培養法（CTOS法）は患者がんの特性を試験管内でよく再現する。このCTOS法を用いて、活性型遺伝子変異をもつ肺癌細胞が、低酸素により積極的に休眠状態になる分子メカニズムを解明した。また、同じ腫瘍内に異なる組織型を持つ混合腫瘍では、異なる組織型の起源が同一の細胞であること、酸素が分化の決定因子であることを明らかにした。大腸粘膜細胞は生理的に低酸素状態にあるが、大腸腫瘍の形成に低酸素誘導因子が必須であることを、大腸がんマウスモデルを用いて証明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究班では本領域研究が提唱した「生体内の構成細胞が、必要とする最適な酸素濃度領域を能動的に構築する」酸素リモデリングの概念を、がん細胞の休眠や分化状態の変化で実証した。つまり、がんは発がん経路でがん化するが、がん細胞は劣悪な環境下では、その発がん経路を自ら抑制することで、休眠状態になり生存する。現状のがん治療が活動状態のがん細胞のみを標的にしていることから、今後根治を目指したがん治療を開発するうえで極めて重要な発見である。また、酸素分圧の違いによってがんの組織型（分化状態）が変化することを実証したが、これも治療法の選択において重要な知見である。

研究成果の概要（英文）：We have developed a primary three dimensional culture method for cancer. Using the method, we revealed the molecular mechanism of cancer cell dormancy, under which cancer cells suppress the oncogenic pathway and their activity in hypoxia. The dormant cells are resistant to the molecular targeting drugs. In addition, we revealed that cells of common origin exist in a mixed tumor, in which distinct pathological types co-exist in a tumor, and the differentiation is dominated by oxygen levels. We also revealed that the mucosal cells in the colon reside in hypoxic microenvironment and the hypoxia inducible factor is critical for the development of colon tumor using mouse model of colon cancer.

研究分野：腫瘍生化学

キーワード：低酸素 代謝リモデリング 癌 休眠 初代培養 細胞分化

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

1. 研究開始当初の背景

癌は増殖性疾患であるために、増殖能にのみ焦点が当てられがちであるが、実際の腫瘍内には細胞周期や代謝の不活発な細胞が存在し、治療抵抗性や再発の温床となる可能性がある。癌組織内で酸素供給が不足する中で、癌細胞が酸素を消費することにより癌組織は低酸素状態になるが、まず、いわゆる急性期低酸素応答をすることで、ミトコンドリアでの酸素消費を抑制し、解糖系にシフトすることによって活動を維持しようとする。一方、低酸素状態が遷延する場合には、酸素消費を落として危機的な酸素欠乏を回避する(dormancy)と同時に、幹細胞性の獲得や分化誘導など質的な変化が惹起される。従来の癌細胞株が一般に低酸素で dormancy 状態になることができないことから、新しい実験モデルが求められていた。我々は癌細胞初代培養法 Cancer Tissue-Originated Spheroid 法 (CTOS 法) を開発し、癌臨床検体から高効率に高純度の癌細胞を初代培養することを可能にしていた(Kondo 2011 PNAS)。また、従来の癌細胞株と対照的に、CTOS が低酸素で容易に dormancy 状態になること、dormancy の細胞が化学療法耐性であることを既に明らかにしていた(Endo 2014 PLoS One)。本研究班では本領域研究が提唱した「生体内の構成細胞が、必要とする最適な酸素濃度領域を能動的に構築する」酸素リモデリングの概念を、dormancy を軸に癌に外挿することを目的として研究を行った。

2. 研究の目的

癌組織の内部環境は低酸素であり、低酸素は癌の転移などの悪性化や治療抵抗性と密接に関連している。癌細胞は、供給の不足下で酸素消費をすることで低酸素になると、酸素消費を落として危機的な酸素欠乏を回避すると同時に、幹細胞性の獲得や分化誘導など質的な変化が惹起される。このような酸素リモデリングによって確立する動的平衡の実態を明らかにすることを目的とした。低酸素状態の癌細胞の特徴を、CTOS を用いて生化学的、分子生物学的に明らかにするとともに、遺伝子発現プロファイルを網羅的に解析し、dormancy マーカーの探索およびそれを利用して dormancy マーカー遺伝子のプロモーターで細胞標識し dormancy 細胞の運命を追跡することを計画した。マーカー遺伝子のプロモーター下にジフテリア毒素受容体を発現するトランスジェニックマウスを作出し、腫瘍マウス等との交配により dormancy 細胞を選択的にアブレーションする dormancy toxin の化合物スクリーニングとその標的分子の探索を目指したが、研究を実施する過程で、後述するように dormancy の特性上 dormancy 特異的転写マーカーの探索は困難なことが判明したため、dormancy 標識遺伝子改変マウスの作製は断念した。マウスモデルの研究は、腸管腫瘍の形成における低酸素関連因子の役割を明らかとすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 低酸素による EGFR 遺伝子変異肺癌初代培養細胞の休眠状態の誘導

肺癌由来 CTOS を StemPro hESC 中で培養し、20%O₂ または 1%O₂ における CTOS の増殖を比較した。ウエスタンブロット法を用いて低酸素下におけるシグナルの変化を検討した。免疫沈降法および proximity ligation assay 法により、ERBB family RTK の会合、局在を検討した。MIG6 の発現を shRNA 法で抑制した。

(2) 子宮頸部小細胞癌・腺癌混合腫瘍における低酸素による分化方向性の決定

子宮頸部小細胞癌・腺癌混合腫瘍およびそれに由来する CTOS の小細胞癌マーカーCHGA と腺癌マーカーKRT19 および KRT7 を免疫染色した。単細胞網羅的遺伝子発現解析を行い、クラスタリングによるグループ化を行った。EGFP 発現ベクターを低効率で導入し、単細胞追跡を行った。CTOS を低酸素下で培養し、小細胞癌マーカーCD99 を flow cytometry で検出した。HIF-1 およ

び Notch の NICD をウエスタンブロット法で検出した。様々な子宮頸部小細胞癌 CTOS ラインで、低酸素培養における様々な小細胞癌マーカーと腺癌マーカーの変化を検討した。

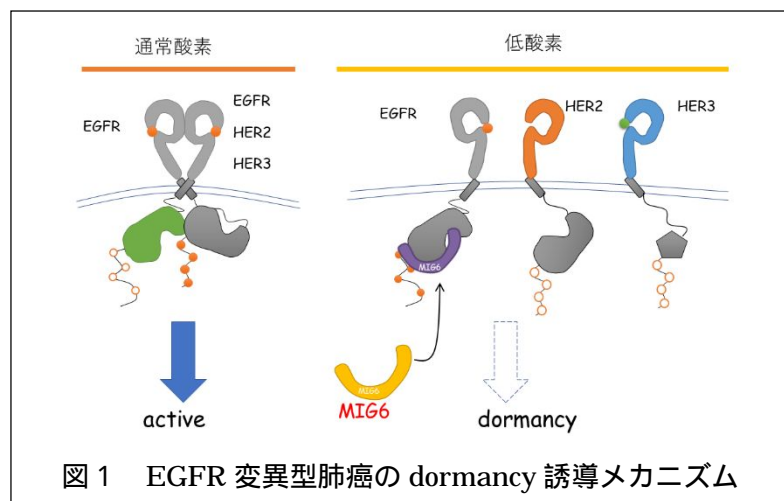
(3) 腸管腫瘍形成における低酸素関連因子の役割

腸管腫瘍形成において低酸素関連因子である HIF-1 および HIF-2 が果たす役割を検討するため、Apc 716 マウスと腸上皮特異的な HIF-1 および HIF-2 欠失誘導型変異マウスとの複合ノックアウトマウスを作出し、腫瘍形成に及ぼす影響を解析した。また、Apc 716 マウスの腸管腫瘍形成には Myd88 が重要な役割を果たすことを示す予備的データを得ていたため、MyD88 の下流で HIF-1 、HIF-2 が作用する可能性について、Apc 716 マウスと腸上皮特異的な MyD88 欠失誘導型変異マウスとの複合ノックアウトマウス、および腸管腫瘍細胞由来オルガノイドを用いて検討した。

4. 研究成果

(1) 低酸素による EGFR 遺伝子変異肺癌初代培養細胞の休眠状態の誘導

EGFR 活性型変異を有する肺癌由来 CTOS は、低酸素下で可逆的な休眠状態に陥った。この休眠状態下の CTOS は、EGFR TKI 耐性を示した。低酸素下で dormancy 状態にある肺癌 CTOS は、EGFR の恒常的な活性化にも関わらず、HER2、HER3 のリン酸化が低下した。免疫沈降法および Proximity ligation assay により、EGFR と HER3 の会合は低酸素下で低下することが明らかとなった。EGFR の内因性阻害物質 MIG6 (ERRF11) の発現は低酸素で継続的に上昇した。MIG6 の発現を抑制すると dormancy 状態にならないことから、EGFR 活性型変異を有する肺癌細胞は、MIG6 の誘導により積極的に EGFR シグナルを抑制することで dormancy に陥ることを示した (Endo 2017 Oncogene) (図 1)。癌のドライバー変異はがん細胞にとって必須のシグナルを活性化するため、分子標的治療の対象になっているが、がん細胞は環境によって積極的にドライバーシグナルを抑制することで dormancy 状態になることが実証された。これは典型的な「酸素リモデリング」の一例である。



活動状態と dormancy 状態の遺伝子発現を網羅的に比較解析し dormancy マーカーの探索を試みたが、遺伝子発現については、蛋白レベルとの不一致が顕著であった。これは dormancy 状態におけるタンパク合成の低下や分解の亢進によるものと考えられる (Endo 2017 Oncogene)。MIG6 のように低酸素状態下でも mRNA が polysome 分画に存在する蛋白もあることから、低酸素下 polysome 分画の mRNA を網羅的に解析することが、dormancy マーカーの探索に有用である可能性が示唆された。酸素リモデリングの総説 (Mori 2016 Pflugers Arch)、および本研究を含む癌 dormancy 研究の総説 (Endo 2019 Cancer Sci) を発表した。

CTOS を用いたハイスループット化合物スクリーニング系を開発した (Kondo 2019 Cancer Science)。dormancy CTOS を対象として dormancy 細胞を障害する薬剤のスクリーニングを行い、共通の標的をもつ複数の分子標的薬を同定した。興味深いことに、この経路の活性化は dormancy で低下するが、残存する低レベルの活性が dormancy に必須である (論文投稿準備中)。

(2) 子宮頸部小細胞癌・腺癌混合腫瘍における低酸素による分化方向性の決定

CTOS 法の利点の一つは、患者がんの分化形質を培養条件下でも保持することである。子宮頸部小細胞神経内分泌癌は臨床的にしばしば腺癌との混合癌を形成するが、一つの CTOS ラインは患者腫瘍と同様に混合腫瘍の表現型を示した。患者腫瘍やマウス移植腫瘍、CTOS を、小細胞癌、腺癌それぞれのマーカーで染色すると、明確に一方のマーカーが検出される部位と両者が発現する部位、全く発現していない部位が混在することが分かった。単細胞遺伝子発現解析の結果、明確に二つの組織型の特徴を示すクラスターに加え、小細胞癌の傾向は示すが特徴的でないクラスターの存在が示された。EGFP 導入による単細胞追跡により両成分がクローナルな起源をもつことを証明した。単細胞解析の結果、HIF 下流の遺伝子が鮮明に活性化しているクラスターが存在したことから、低酸素が分化方向を規定する因子であるとの仮説を立てた。実際に低酸素培養すると小細胞がんマーカーの発現が減弱し (図 2) それらは HIF-1 と Notch シグナル依存的であった。

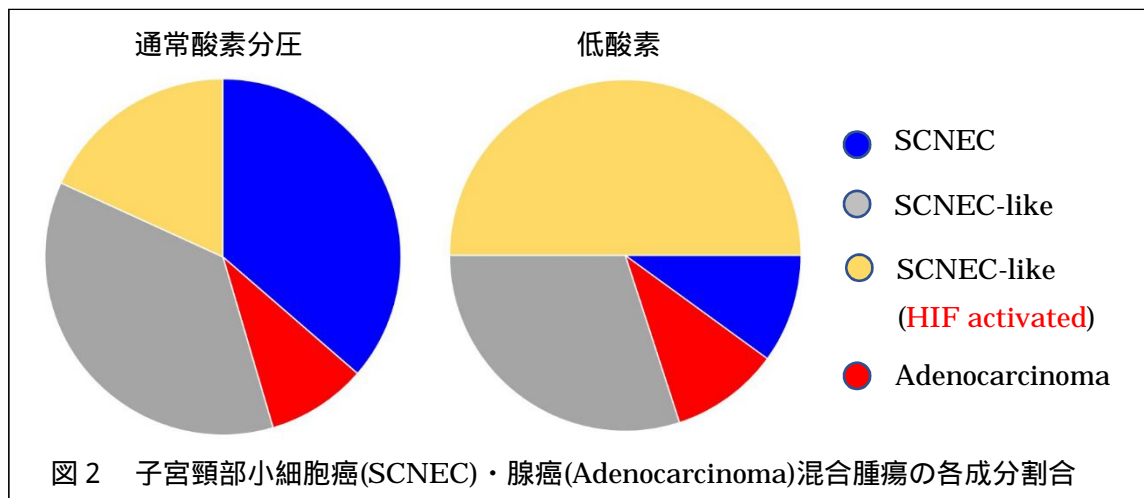


図 2 子宮頸部小細胞癌(SCNEC)・腺癌(Adenocarcinoma)混合腫瘍の各成分割合

他の小細胞癌 CTOS ラインでも、低酸素下で、小細胞がんマーカーが減弱した (PNAS, submitted)。これまでに混合腫瘍のクローナリティーを直接証明した研究はない。さらに低酸素が分化傾向を制御していることを示した。これも酸素リモデリングの一例と言える。肺癌では腺癌が治療中に小細胞がんに変換することは臨床的に報告されており、今後の治療法の開発に重要な知見となる。

(3) 腸管腫瘍形成における低酸素関連因子の役割

大腸がんマウスモデルである Apc 716 マウスの腸管腫瘍では、HIF-1、HIF-2 およびこれらの標的遺伝子の発現は細胞増殖が盛んな部分で亢進しており、高度な低酸素領域とは合致しなかった。腸管上皮細胞特異的に HIF-1、HIF-2 をそれぞれ欠失させたところ、いずれも腫瘍サイズ、数ともに顕著に減少した。腸管腫瘍内では低酸素非依存的に HIF-1、HIF-2 が発現誘導され、それらが腫瘍細胞の増殖に寄与することを示した。正常大腸上皮では、腸内細菌叢により作り出された生理的低酸素環境により HIF が発現誘導されることから、腸管における低酸素および低酸素疑似環境の重要性が明らかになった。(論文投稿準備中)。

Apc 716 マウスの腸管上皮細胞特異的に MyD88 を欠失させたところ、HIF-1 および標的遺伝子の発現低下を伴って腫瘍数が顕著に減少した。腸管腫瘍細胞由来オルガノイドで MyD88 を

欠失させるとアポトーシスが引き起こされ、ヒト大腸がん細胞株 HCT116 においても MyD88 のノックダウンは同様の作用を示したことから、Wnt 経路活性化と MyD88 の欠失が合成致死に働くことを明らかにした。また、HIF-1 が MyD88 の下流に位置づけられたことから、大腸がんにおいて MyD88/NF B/HIF-1 経路が治療標的となる可能性が示された。(論文投稿準備中)

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 43 件)

- 1) Endo H, Inoue M. Dormancy in cancer. *Cancer Science*. 2019. 110(2);474-480. 査読有 doi:10.1111/cas.13917
- 2) Kondo J, Ekawa T, Endo H, Yamazaki K, Tanaka N, Kukita Y, Okuyama H, Okami J, Imamura F, Ohue M, Kato K, Nomura T, Kohara A, Mori S, Dan S, Inoue M. High-Throughput Screening in Colorectal Cancer Tissue-Originated Spheroids. *Cancer science*. 2018. 110(1);345-355. 査読有 doi:10.1111/cas.13843
- 3) Sakuma K, Sasaki E, Kimura K, Komori K, Shimizu Y, Yatabe Y, Aoki M. HNRNPLL stabilizes mRNAs for DNA replication proteins and promotes cell cycle progression in colorectal cancer cells. *Cancer Science*. 2018. 109(8);2458-2468. 査読有 doi:10.1111/cas.13660
- 4) Sakuma K, Sasaki E, Kimura K, Komori K, Shimizu Y, Yatabe Y, Aoki M. HNRNPLL, a newly identified colorectal cancer metastasis suppressor, modulates alternative splicing of CD44 during epithelial-mesenchymal transition. *Gut*. 2018. 67(6);1103-1111. 査読有 doi:10.1136/gutjnl-2016-31292
- 5) 井上正宏. 低酸素応答としてのがん細胞の cellular dormancy. *臨床免疫・アレルギー科*. 70(3);295-300. 2018. 査読無
- 6) Goodwin J, Neugent ML, Lee SY, Choe JH, Choi H, Jenkins DMR, Ruthenborg RJ, Robinson MW, Jeong JY, Wake M, Abe H, Takeda N, Endo H, Inoue M, Xuan Z, Yoo H, Chen M, Ahn JM, Minna JD, Helke KL, Singh PK, Shackelford DB, Kim JW. The distinct metabolic phenotype of lung squamous cell carcinoma defines selective vulnerability to glycolytic inhibition. *Nature communications*. 2017. 8;15503. 査読有 doi:10.1038/ncomms15503
- 7) Endo H, Okami J, Okuyama H, Nishizawa Y, Imamura F, Inoue M. The induction of MIG6 under hypoxic conditions is critical for dormancy in primary cultured lung cancer cells with activating EGFR mutations. *Oncogene*. 2017. 36(20);2824-2834. 査読有 doi:10.1038/onc.2016.431
- 8) Fujishita T, Kojima Y, Kajino-Sakamoto R, Taketo MM, Aoki M. Tumor microenvironment confers mTOR inhibitor resistance in invasive intestinal adenocarcinoma. *Oncogene*. 2017. 36(46);6480-6489. doi:10.1038/onc.2017.242. 査読有
- 9) Satoh K, Yachida S, Sugimoto M, Oshima M, Nakagawa T, Akamoto S, Tabata S, Saitoh K, Kato K, Sato S, Igarashi K, Aizawa Y, Kajino-Sakamoto R, Kojima Y, Fujishita T, Enomoto A, Hirayama A, Ishikawa T, Taketo MM, Kushida Y, Haba R, Okano K, Tomita M, Suzuki Y, Fukuda S, Aoki M, Soga T. Global metabolic reprogramming of colorectal cancer occurs at adenoma stage and is induced by MYC. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017. 114(37):E7697-E7706. 査読有 doi:10.1073/pnas.1710366114.
- 10) 近藤純平, 井上正宏. がんオルガノイド×Drug Screening CTOS法を利用したオルガノイド作成とドラッグスクリーニング. *実験医学* 35(16); 2714-2719. 2017. 査読無
- 11) Kiyohara Y, Yoshino K, Kubota S, Okuyama H, Endo H, Ueda Y, Kimura T, Kimura T, Kamiura S, Inoue M. Drug screening and grouping by sensitivity with a panel of primary cultured cancer spheroids derived from endometrial cancer. *Cancer science*. 2016. 107(4);452-460. 査読有 doi:10.1111/cas.12898
- 12) 井上正宏, 遠藤洋子. がん細胞の低酸素応答と休眠. *ファルマシア*. 53(7); 215-9, 2017. 査読無
- 13) 井上正宏. 抗がん剤開発を目指したがん細胞三次元初代培養法の確立. *バイオサイエンスとインダストリー (B&I)*. 75(1);22-6, 2017. 査読無
- 14) 井上正宏. 活性酸素と転移. *医学のあゆみ*. 257(12); 1251-4, 2016. 査読無
- 15) 井上正宏. 最小単位としてのがん細胞集団. *生体の科学*. 67(2); 142-5, 2016. 査読無
- 16) Mori Y, Takahashi N, Polat OK, Kurokawa T, Takeda N, Inoue M. Redox-sensitive transient receptor potential channels in oxygen sensing and adaptation. *Pflugers Archiv : European journal of physiology*. 2016. 468(1);85-97. 査読有 doi:10.1007/s00424-015-1716-2
- 17) Furukawa T, Yuan Q, Jin ZH, Aung W, Yoshii Y, Hasegawa S, Endo H, Inoue M, Zhang MR, Fujibayashi Y, Saga T. A limited overlap between intratumoral distribution

of 1-(5-fluoro-5-deoxy-β-D-arabinofuranosyl)-2-nitroimidazole and copper-diacetyl-bis[N(4)-methylthiosemicarbazone]. *Oncology reports*. 2015. 34(3); 1379-1387. 査読有 doi:10.3892/or.2015.4079

- 18) Kurokawa H, Ito H, Inoue M, Tabata K, Sato Y, Yamagata K, Kizaka-Kondoh S, Kadonosono T, Yano S, Inoue M, Kamachi T. High resolution imaging of intracellular oxygen concentration by phosphorescence lifetime. *Scientific reports*. 2015. 5; 10657. 査読有 doi:10.1038/srep10657

〔学会発表〕(計 152 件)

- 1) 井上正宏. 低酸素・低栄養下におけるがん細胞の適応と制御法の開発. 日本薬学会 第 139 年会. 2019
- 2) 井上正宏. 生物の生存戦略としての活動抑制・休眠. 第 41 回日本分子生物学会年会. 2018
- 3) 久保田哲, 田中稔恵, 岩本一成, 中嶋 綾, 遠藤洋子, 近藤純平, 吉野 潔, 上浦祥司, 木村 正, 岡田眞里子, 橋本真一, 井上正宏. 子宮頸部小細胞癌・腺癌混合腫瘍の分化と低酸素の役割. (新学術領域研究) 酸素生物学・ダイニングコード合同若手会議. 2018
- 4) 梶野リ工, 藤下晃章, 武藤誠, 青木正博. Apc 変異マウスの腸管腫瘍形成において腸上皮細胞の MyD88 が果たす役割の解明. 第 77 回日本癌学会学術総会. 2018
- 5) 青木正博. 腸管腫瘍形成における MyD88 と HIFs の役割. 第 16 回がんとハイポキシア研究会. 2018
- 6) 梶野リ工, 藤下晃章, 武藤誠, 青木正博. Apc+/− 716 マウスの腸管腫瘍形成において腸上皮細胞の MyD88 が果たす役割の解析. 第 76 回日本癌学会学術総会. 2017
- 7) Inoue M. Tumor Dormancy under hypoxic conditions. The 42nd Annual Meeting of Korean Cancer Association with International Cancer Conference. 2016
- 8) Kubota S, Nakajima A, Kiyohara Y, Endo H, Okuyama H, Yoshino K, Kimura T, Inoue M. Dynamic change of differentiation in spheroids derived from mixed small cell carcinoma/adenocarcinoma of the uterine cervix. American Association for Cancer Research(AACR) Annual Meeting 2016. 2016
- 9) 梶野リ工, 青木正博. 大腸がんマウスモデルとオルガノイド培養を用いた腫瘍形成における低酸素シグナルの役割の解明. 第 14 回がんとハイポキシア研究会. 2016
- 10) 井上正宏. がん細胞の休眠メカニズム. BMB2015 第 38 回日本分子生物学会年会・第 88 日本生化学会大会 合同大会. 2015
- 11) 遠藤洋子, 奥山裕照, 岡見次郎, 今村文生, 井上正宏. MIG6 は EGFR 活性変異型肺がん初代培養細胞の低酸素による休眠状態の誘導に寄与する. 第 74 回日本癌学会学術総会. 2015
- 12) Endo H, Inoue M. Dormant status of primary-cultured lung cancer cells in hypoxia. Keystone symposia/Hypoxia: From Basic Mechanisms to Therapeutics. 2015

〔図書〕(計 1 件)

浦野泰照, 塚田秀夫, 佐治英郎, 岡沢秀彦, 小野正博, 荒野泰, 青木伊知男, 近藤輝幸, 西山伸宏, 立花克郎, 小林久隆, 吉原利忠, 小川美香子, 國土典宏, 今村健志, 松田道行, 井上正宏, 他. 化学同人. *がんの分子イメージング*. 2015. 269(234-240)

〔その他〕

ホームページ等

<https://cbrrd.med.kyoto-u.ac.jp/>

https://www.pref.aichi.jp/cancer-center/ri/01bumon/07bunshi_byotai/index.html

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：青木 正博

ローマ字氏名：AOKI, masahiro

所属研究機関名：愛知県がんセンター(研究所)

部局名：がん病態生理学分野

職名：分野長

研究者番号(8桁)：60362464

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。