

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390315

研究課題名(和文) 癌と生体環境のミクロコスモスとマクロコスモス

研究課題名(英文) macro-cosmos in interaction between cancer and host microenvironments.

研究代表者

山本 浩文 (Yamamoto, Hirofumi)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：30322184

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,200,000円

研究成果の概要(和文)：癌の進行は癌細胞の性質のみならず、癌を有する生体反応も含めて考える必要がある。また癌の制御には微小な段階から成熟して多発の病巣をつくるまでの段階があり、それぞれの病態を把握することは癌の再発を予防したり、進行癌となった場合の治療法を創出する上で重要である。本研究では、微小癌の臨床的意義、癌の浸潤・転移で重要なEMT(上皮間葉転換)に際して鍵となる分子の働き、生体環境としての低酸素の癌の悪性化に果たす役割、新規核酸医薬による治療抵抗性癌の治療法の開発 などについて一定の成果を導出できた。

研究成果の概要(英文)：Cancer progression should be understood with respect to cancer features as well as the biological response of the patient's body. To conquer cancers we need to understand tumor behaviors from early cancers to advanced ones. In this project we successfully clarified clinical significance of very early tumor cells, role of a key molecule involved in EMT, role of a hypoxic condition surrounding tumor cells in tumor progression, and we developed a novel nucleic acid medicine against therapy-resistant cancers.

研究分野：消化器外科

キーワード：hypoxia microRNA micrometastasis C4.4A invasion disease recurrence

1. 研究開始当初の背景

1990年以降の僅か20年程の間に、大腸癌は遺伝子、或いはエピジェネティックな異常から発生する病気であることが明らかとなり、microRNA (miR) が癌の進展を含めた様々な生命現象を調節する因子として重要であることが分かってきた。2000年以降は癌を周囲の微小環境も含めたひとつのorganとして捉える概念が普及し、癌治療も腫瘍細胞のみならず腫瘍血管などの癌周囲の環境因子を標的とした戦略が臨床効果をあげている。更に近年、骨髄間質の転移巣への遊走が転移を形成する準備状態を作る役割を担っていることが分かってきた。これらのことは、癌抑制の鍵は癌細胞に留まらず、その微小環境や担癌状態の生体反応にも展開する可能性を示唆する。

2. 研究の目的

癌と生体のクロストークの結果として生じる癌環境には、癌細胞を取り巻く微小環境(ミクロコスモス)と原発巣、骨髄反応、転移巣を含めた巨視的生体環境(マクロコスモス)の2側面がある。私達はこれまでに癌細胞の細胞周期やWnt signal系の異常の観点からいくつかの核酸医薬を開発してきた。また2000年以降いち早く癌の微小環境の解明に取り組んできた。本申請課題では、癌細胞と微小環境についての包括的研究を更に進め、加えて癌発生による骨髄の生体変化がmicroRNAの分泌を通じて転移形成を促進する機序を明らかとし、ミクロ・マクロ視点両面から癌の攻略法を探索し、臨床応用に発展させることを目的とする。

3. 研究の方法

培養細胞、動物、生体材料を用いて倫理委員会に承認された複数のテーマについて、各々必要な実験技術を採用し、個別に結果を出し特許申請と論文の公表を行う。

4. 研究成果

(1) 担癌状態での生体反応としての骨髄の役割に注目した。骨髄中の大腸癌細胞でmiR340を分泌する症例では肝転移を起こしやすいことを論文化した。国内特許出願した。

(2) 微小転移研究: 大腸癌微小リンパ節転移に関する多施設前向き臨床研究の結果を解析した結果、微小転移の量に応じてStage II大腸癌の再発率が増加することが分かった。これをもとにRT-PCR法よりも短時間で簡単に結果の出るCK19mRNAを指標としたOSNA法への展開を考慮し前向きにCEAとCK19でStage II大腸癌のリンパ節中の微小転移検査を開始した。130例の解析では両者の相関が強いことが分かってきた。またOSNA法を用いた大腸癌微小転移に関する症例ベースの臨床試験の結果、Stage II大腸癌のupstageは17%に達した。これについて論文

投稿中である。

(3) 転移遺伝子C4.4A蛋白に対して4種類の抗体を作成しGPIアンカー型の抗体が有用であることを論文化した。食道癌のC4.4A発現について膜型が予後不良と関連することを報告した。そのメカニズムとしてはTNC (Tenascin-C)との連携が重要であることを論文化した。消化器癌発生学会主導の独立した検証試験(n=230)を実施した結果、Stage III大腸癌の再発予測因子として有用であることが確認された。大腸癌の再発補助診断薬としてC4.4A抗体を利用することはよい戦略と考えられた。安定した良質のモノクローナル抗体を作成するためにオールジャパン体制で診断用モノクローナル抗体を作成するprojectを厚生労働省の3か年計画で開始した。その基礎となる大腸癌の再発と結びつくメカニズムについてEMTを中心とした細胞浸潤の視点から解析し、論文作成中である。

(4) 低酸素誘導遺伝子JMJD1AがヒストンH3リジン9基の脱メチル化を通じてEMT誘導因子を発現させることを明らかとし論文作成中である。肝転移巣の低酸素領域を調べ新たな低酸素誘導遺伝子SCGB2A1やEphrin-A1を同定し抗がん剤や放射線治療に抵抗性を示したり大腸癌の予後因子となることを論文報告した。

(5) 炭酸アパタイト法を改良したsuper apatite法によって、ヌードマウスに移植した大腸癌腫瘍をsurvivin siRNAの尾静脈投与により縮小させることに成功した。本法によると従来の生体用DDSであるリポゾームやアテロコラーゲンと比べて格段にマウス腫瘍への核酸の取り込みが向上し、その進歩性により国内特許を取得し、論文化した。また同システムはliving imagingにも応用可能であることが明らかとなり、国内特許を出願した。炭酸アパタイトのin vivo核酸デリバリーの優れた性能については革新的な生体用の遺伝子導入法としてマスメディアに広く取り上げられた。またブドウ糖を炭酸アパタイトにつめて過剰量のブドウ糖を癌細胞に送り込むことによって活性酸素の産生を通じて抗腫瘍効果をもたらすことがわかり論文報告した。

(6) ヌードマウスに腫瘍を形成させる際に、Ang2が腫瘍血管の内腔形成に重要であること、VEGFとAng2の両方の阻害による抗血管療法の有効性について論文化した。

(7) KRAS 変異型の大腸がんに関与する microRNA4689 を同定、国内/外国特許出願し、論文文化した。

(8) アポトーシスを強力に誘発する治療的 microRNA MIRTX を開発、国内特許出願した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 13 件)

1. Miyazaki S, Yamamoto H, Miyoshi N, Wu X, Ogawa H, Uemura M, Nishimura J, Hata T, Takemasa I, Mizushima T, Konno M, Doki Y, Mori M, Ishii H. A Cancer Reprogramming Method Using MicroRNAs as a Novel Therapeutic Approach against Colon Cancer : Research for Reprogramming of Cancer Cells by MicroRNAs. *Ann Surg Oncol*, Nov 11. 2014 [Epub ahead of print] 査読有り
2. Inoue A, Yamamoto H, Uemura M, Nishimura J, Hata T, Takemasa I, Ikenaga M, Ikeda M, Murata K, Mizushima T, Doki Y, Mori M. MicroRNA-29b is a Novel Prognostic Marker in Colorectal Cancer. *Ann Surg Oncol*. Dec 4. 2014 [Epub ahead of print] 査読有り
3. Yamamoto H, Wu X, Nakanishi H, Yamamoto Y, Uemura M, Hata T, Nishimura J, Takemasa I, Mizushima T, Sasaki J, Imazato S, Matsuura N, Doki Y, Mori M. A glucose carbonate apatite complex exhibits in vitro and in vivo anti-tumour effects. *Sci Rep*. 5, 7742, 2015. DOI 10.1038/srep07742. 査読有り
4. Hiraki M, Nishimura J, Takahashi H, Wu X, Takahashi Y, Miyo M, Nishida N, Uemura M, Hata T, Takemasa I, Mizushima T, Soh JW, Doki Y, Mori M, Yamamoto H. Concurrent Targeting of KRAS and AKT by MiR-4689 Is a Novel Treatment Against Mutant KRAS Colorectal Cancer. *Mol Ther Nucleic Acids*, 4, e231, 2015. DOI 10.1038/mtna.2015.5. 査読有り
5. Wu X, Yamamoto H, Nakanishi H, Yamamoto Y, Inoue A, Tei M, Hirose H, Uemura M, Nishimura J, Hata T, Takemasa I, Mizushima T, Hossain S, Akaike T, Matsuura N, Doki Y, Mori M. Innovative Delivery of siRNA to Solid Tumors by Super Carbonate Apatite. *PLoS One*. 10(3):e0116022, 2015. DOI 10.1371/journal.pone.0116022. eCollection 2015. 査読有り
6. Munakata K, Uemura M, Takemasa I, Ozaki M, Konno M, Nishimura J, Hata T, Mizushima T, Haraguchi N, Noura S, Ikenaga M, Okamura S, Fukunaga M, Murata K, Yamamoto H, Doki Y, Mori M. SCGB2A1 is a novel prognostic marker for colorectal cancer associated with chemoresistance and radioresistance. *Int J Oncol*. 2014 May;44(5):1521-8. doi: 10.3892/ijo.2014.2316. 査読有り
7. Takeyama H, Yamamoto H, Yamashita S, Wu X, Takahashi H, Nishimura J, Haraguchi N, Miyake Y, Suzuki R, Murata K, Ohue M, Kato T, Takemasa I, Mizushima T, Ishii H, Mimori K, Doki Y, Mori M. Decreased miR-340 expression in bone marrow is associated with liver metastasis of colorectal cancer. *Mol Cancer Ther*. 13(4):976-85, 2014. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-13-0571. 査読有り
8. Suzuki R, Yamamoto H, Ngan CY, Ohtsuka M, Kitani K, Uemura M, Nishimura J, Takemasa I, Mizushima T, Sekimoto M, Minamoto T, Doki Y, Mori M. Inhibition of angiopoietin 2 attenuates lumen formation of tumour-associated vessels in vivo. *Int J Oncol*. 43(5):1447-55, 2013. doi: 10.3892/ijo.2013.2076. 査読有り
9. Ohtsuka M, Yamamoto H, Oshiro R, Takahashi H, Masuzawa T, Uemura M, Haraguchi N, Nishimura J, Hata T, Yamasaki M, Takemasa I, Miyata H, Mizushima T, Takiguchi S, Doki Y, Mori M. Concurrent expression of C4.4A and Tenascin-C in tumor cells relates to poor prognosis of esophageal squamous cell carcinoma. *Int J Oncol*. 43(2):439-46, 2013. doi: 10.3892/ijo.2013.1956. 査読有り
10. Hossain S, Yamamoto H, Chowdhury EH, Wu X, Hirose H, Haque A, Doki Y, Mori M, Akaike T. Fabrication and intracellular delivery of doxorubicin/carbonate apatite nanocomposites: effect on growth retardation of established colon tumor. *PLoS One*. 16;8(4):e60428, 2013. doi: 10.1371/journal.pone.0060428. Print 2013. 査読有り
11. Yamamoto H, Oshiro R, Ohtsuka M, Uemura M, Haraguchi N, Nishimura J, Takemasa I, Mizushima T, Doki Y, Mori M. Distinct expression of C4.4A in colorectal cancer detected by different antibodies. *Int J Oncol*. 42(1):197-201, 2013. doi: 10.3892/ijo.2012.1714. 査読有り
12. Yamamoto H, Tei M, Uemura M, Takemasa I, Uemura Y, Murata K, Fukunaga M, Ohue M, Ohnishi T, Ikeda K, Kato T, Okamura S, Ikenaga M, Haraguchi N, Nishimura J,

- Mizushima T, Mimori K, Doki Y, Mori M. Ephrin-A1 mRNA is associated with poor prognosis of colorectal cancer. Int J Oncol. 42(2):549-55, 2013. doi: 10.3892/ijo.2012.1750. 査読有り
13. Ohtsuka M, Yamamoto H, Masuzawa T, Takahashi H, Uemura M, Haraguchi N, Nishimura J, Hata T, Yamasaki M, Miyata H, Takemasa I, Mizushima T, Takiguchi S, Doki Y, Mori M. C4.4A Expression Is Associated with a Poor Prognosis of Esophageal Squamous Cell Carcinoma. Ann Surg Oncol. 20(8):2699-705, 2013. doi: 10.1245/s10434-013-2900-2. 査読有り

〔学会発表〕(計12件)

発表者：大塚正久、山本浩文、森正樹
題名：転移遺伝子 C4.4A の細胞外基質構成因子への影響
学会名：第112回日本外科学会定期学術集会
発表年月日：2012/4/14
発表場所：千葉 幕張メッセ

発表者：大塚正久、山本浩文、森正樹
題名：転移遺伝子 C4.4A の細胞外基質構成因子への影響
学会名：第22回日本サイトメトリー学会 学術集会
発表年月日：2012/6/30
発表場所：千里ライフサイエンスセンター

発表者：大塚正久、山本浩文、森正樹
題名：大腸癌における先進部 C4.4A 発現と EMT との関連
学会名：第16回日本がん分子標的治療学会
発表年月日：2012/6/28
発表場所：小倉 西日本総合展示場

発表者：大塚正久、山本浩文、森正樹
題名：食道癌における C4.4A 発現の意義
学会名：第71回日本癌学会学術総会
発表年月日：2012/9/21
発表場所：札幌 ロイトン札幌

発表者：M Ohtsuka, H Yamamoto, M Mori
題名：C4.4A is a candidate prognostic marker of esophageal cancer by association with Tenascin-C
学会名：Ninth AACR-Japanese Cancer Association Joint conference
発表年月日：2012/2/23
発表場所：Hawaii, Maui, Hyatt Regency mau

発表者：山本浩文 他
題名：リンパ節中の微小転移量は Stage II 大腸癌の再発率を規定する
学会名：第68回日本消化器外科学会 シンポジウム1

発表年月日：2013.7.18
発表場所：宮崎

発表者：大塚正久 他
題名：食道癌における C4.4A 発現と予後についての検討
学会名：第1143回日本外科学会
発表年月日：2013.4.13
発表場所：福岡

発表者：大塚正久 他
題名：大腸癌における C4.4A 発現と EMT との関連性について
学会名：第68回日本消化器外科学会
発表年月日：2013.7.19
発表場所：宮崎

発表者：山本浩文 他
題名：リンパ節中の微小転移量は Stage II 大腸癌の再発率を規定する
学会名：第68回日本消化器外科学会 シンポジウム1
発表年月日：2013.7.18
発表場所：宮崎

発表者：呉 しん 他
題名：10 ナノスケール超微細粒子の全身投与はマウス固形腫瘍への核酸デリバリー効果を示した
学会名：第51回日本癌治療学会
発表年月日：2013.10.26
発表場所：京都

発表者：山本浩文、森正樹
題名：シンポジウム3 「大腸癌治療におけるバイオマーカー」microRNA による大腸癌の診断と治療への取組み
学会名：第69回日本大腸肛門病学会学術集会
発表年月日：2014年11月7日
発表場所：横浜

発表者：Hirofumi Yamamoto, Xin Wu, Susumu Miyazaki, Mamoru Uemura, Taishi Hata, Junichi Nishimura, Ichiro Takemasa, Tsunekazu Mizushima, Yuichiro Doki, Masaki Mori
題名：Super carbonate apatite as simplified systemic nanoparticle carrier.
学会名：AACR annual meeting
発表年月日：2014/5-9
発表場所：San Diego

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計5件)

名称：抗癌剤の抗腫瘍効果の増強剤
発明者：山本浩文
権利者：国立大学法人大阪大学、山本浩文 他

種類：特願
番号：2014-041768
出願年月日：2014年3月4日
国内外の別：国内・国外

名称：大腸癌の治療剤
発明者：山本浩文
権利者：国立大学法人大阪大学、山本浩文 他
種類：特願
番号：2014-031060
出願年月日：2014年2月20日
国内外の別：国内

名称：抗腫瘍作用を有する新規 microRNA
発明者：山本浩文
権利者：国立大学法人大阪大学、山本浩文 他
種類：特願
番号：2014-41769
出願年月日：2014年3月4日
国内外の別：国内・国外

名称：Pharmaceutical composition for targeting cancer using carbonate apatite nanoparticle
発明者：Yamamoto H et al.
権利者：Yamamoto H et al.
種類：特願
番号：14/010878
出願年月日：2013.8.27
国内外の別：外国

名称：miR-340 を用いた大腸癌の治療剤
発明者：山本浩文 他
権利者：国立大学法人大阪大学、山本浩文 他
種類：特願
番号：2013-229482
出願年月日：2013.11.5
国内外の別：国内

取得状況（計1件）

名称：スーパーアパタイト超微細ナノ粒子
発明者：山本浩文 他
権利者：山本浩文 他
種類：特許
番号：第5436650号
出願年月日：2012.11.28
取得年月日：2013.12.20
国内外の別：国内

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本 浩文 (Yamamoto Hirofumi)
大阪大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：30322184

(2) 研究分担者

森 正樹 (Mori Masaki)
大阪大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：70190999

(3) 連携研究者

()

研究者番号：