

平成 30 年 5 月 30 日現在

機関番号：32660

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14619

研究課題名(和文)アルクチゲニンによる組織レベルのシンセティックリーサリティ - の確立

研究課題名(英文) Synthetic lethality induced by arctigenin through engineering tumor tissue microenvironment

研究代表者

江角 浩安 (Esumi, Hiroyasu)

東京理科大学・研究推進機構生命医科学研究所・教授

研究者番号：70160364

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：アルクチゲニンが腫瘍血管網を正常化し、腫瘍組織内低酸素を改善することを見つけた。この効果を用いて、腫瘍のX線や抗がん剤治療を増強できるのではないかと考えた。色々なモデル、で作用の異なる7種の抗がん剤やX線治療が顕著に改善した。そのメカニズムを解析すると、アルクチゲニンにより腫瘍血管が正常化し薬剤ががん組織に届きやすく、かつがん細胞の薬剤やX線への感受性が高くなっていることが分かった。ヒトへの応用を計画している。

研究成果の概要(英文)：An active principle in fruit of Actinum Lappa, a traditional medicine was found to normalize tumor vasculature, leading to significant improvement of tumor hypoxia. By utilizing this activity of arctigenin, we intended to develop a combination therapy of tumor with both X-ray and chemotherapeutics. Taking several xenograft models and X-ray and anticancer drugs, we could clearly show tissue level synthetic lethality (synergistic antitumor effect by modulating tissue structure). Previously, we have shown the bioavailability and clinical safety of Arctigenin in a phase I trial in patients with pancreatic cancer, we plan to conduct clinical trial of arctigenin to enhance X-ray and chemotherapy of cancer.

研究分野：がん治療、がん微小環境工学、化学療法、放射線療法

キーワード：低酸素 微小環境 vascular normalization synthetic lethality 微小環境変化による増感

1. 研究開始当初の背景

腫瘍血管は、腫瘍の内在的なプログラム(ゲノム・エピゲノム異常)による血管構築のベクトルと、無秩序な増殖、生体の免疫反応などとの相互作用、結果として来される特殊な微小環境への腫瘍細胞や間質細胞の反応に基づく VEGF などの血管新生因子の誘導など複雑な反応の総合的な結果として存在する。しかしこれは、腫瘍と非腫瘍、免疫反応、遺伝子異常に基づくブレーキのかからない増殖と細胞死の力オスの中で極めて流動的である事が推測される。実験的にも腫瘍組織内の血流は極めて多様性に富み、その多様性は空間的だけでなく時間的にも変動に富むものである。VEGF に対する抗体ベバシツマブは当初 VEGF を中和する事により腫瘍血管の新生を止める事により腫瘍組織を兵糧攻めする治療と考えられた。しかし、単剤での効果はマウス腫瘍やゼノグラフトモデルでは顕著でもヒト腫瘍では見るべきものは無かった。ところが、まずは大腸がんの化学療法で顕著な併用効果が見られその後他の腫瘍でも併用効果が確認された。その血管新生阻害の活性から化学療法と併用すればむしろ血流が低下し抗癌剤の送達が阻害されることが想定されもしたが結果は全く逆であった。R. Jain 博士が早くから提案した Vascular normalization の仮説が合致し、ベバシツマブにより結果的には腫瘍血管がより灌流の良い状態に変化し抗癌剤の送達が改善する事が今や広く受け入れられている。

2. 研究の目的

血管新生阻害薬が当初推定されていた腫瘍血管の増殖・維持を阻害し腫瘍への栄養と酸素の供給を遮断する、つまり糧秣を立つ治療ではなく、全く逆さまの結果をもたらすものである事が明らかにされた。この現象は広く Normalization として受け入れられるようになった。我々は、腫瘍組織の極度の血流不足に基づく低酸素は、同時に栄養供給の深刻な不足を伴うものであり、酸素だけが不足する低酸素応答とは全く別のものである事を明らかにしてきた。更にこの腫瘍微小環境の特殊性に着目し、この環境で特異的に細胞毒性を示すものを抗腫瘍薬 (Antiausterity agent) として開発をしてきた。このうちのひとつアルクチゲニンが顕著な腫瘍血管の Normalization あるいは再構築と呼ぶべき効果があることを見出した。このメカニズムを解明し、組織レベルの synthetic lethality と呼ぶべき治療戦略のコンセプトを確立することを目的とする。

3. 研究の方法

ヒト膵がん細胞株だけでなく多くのゼノグラフトモデルでアルクチゲニンによる血管正常化が起こるか否かを検討、アルクチゲニンに依る組織の血液灌流の改善を MRI による Perfusion 測定、超音波によるドップ

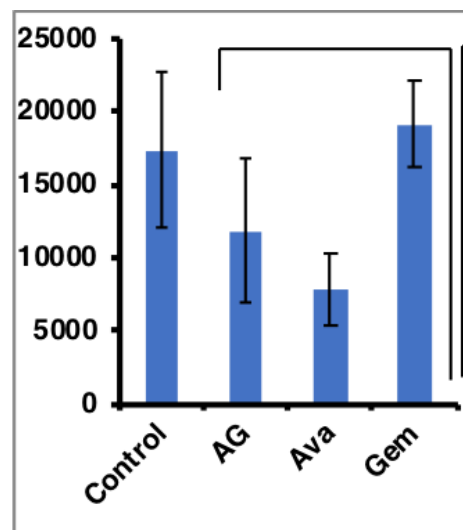
ラーおよび血流描出、光イメージングによる低酸素イメージングなど多角的な手法で定量的に解析する、アルクチゲニンによる血管網再構築も分子メカニズムを解明するためにアルクチゲニンの血管新生因子発現に対する影響を in vitro および in vivo で検討する、アルクチゲニンの血管内皮増殖への直接効果を in vitro および in vivo (コルネア、腹膜など) で検討する、組織レベルの synthetic lethality 療法を確立するためゲノム、エピゲノム、メタボローム情報の判明している膵がん細胞株と 26 の肺腺がん細胞株を含めて各種の薬剤との組み合わせで synergistic 効果の出る組み合わせと条件を明らかにする。

4. 研究成果

(1) 現在までの進捗状況

アルクチゲニンによる腫瘍微小環境の低酸素の改善 (減少)

微小環境の改善効果をヒト代腸がん細胞株 LS174T, ヒト膵がん細胞株 Miapaca2, Suit2 の3種のゼノグラフトを用いて再確認できた。各の細胞に低酸素応答性のルシフェラーゼ遺伝子 (5 x HRE-Luc) を安定導入した後、ヌードマウスに移植したゼノグラフトを作製した。10-14 日後に長径約 5mm の皮下腫瘍が出来たことを確認し適切に群分けをした後経口投与で1日 250-1250 µg のアルクチゲニン懸濁液の投与か、アルクチゲニンを 10% 含有する牛蒡子エキスを 0.1-0.5% 含有した固形飼料により飼育するのこの方法でアルクチゲニンを継続投与した。投与開始後経時的にルシフェラーゼの発現量と腫瘍体積の測定をした。ルシフェラーゼはルシフェリンを腹腔投与 10 分後に IVIS imaging system で定量した。Miapaca2 を用い、2 週間の投与後の結果をしたに示す。



Control、無処置群
AG、アルクチゲニン投与群
Ava、アバスチン投与群
Gem、ゲムシタピン投与群

図からも明らかのように、アルクチゲニン投与により、アバスチンと同様に腫瘍体積当たりの低酸素領域の減少が見られた。

組織の低酸素の軽減はピモナゾールを用いた検討でも再現され、確かに組織の低酸素は軽減していることが確認された。

さらに、ゼノグラフトモデルを用いたアルクチゲニン投与のメタボロームに対する影響の解析をした。アルクチゲニンは、ミトコンドリア複合体 I の阻害をするために、in vitro cell culture で培地に添加すると顕著に乳酸の培地中への蓄積が観察される。このことはヒトの臨床試験でも確認され、アルクチゲニンが作用すれば直接的には好氣的代謝から嫌氣的代謝へと移行する (Fujioka et al. Plos One 2018)。ところが、約 2 週間アルクチゲニン投与をしたヌードマウスから腫瘍組織を取り出し、アルクチゲニン投与をしなかった腫瘍とを、大きさを概ね合わせた腫瘍のメタボローム解析をした。その結果、そのごく一部を次に示すが、図 2A に示す如くアルクチゲニン投与 (赤) で乳酸は対照群 (青) および、ゲムシタピン投与群 (緑) に比較して顕著に低下していた。また、TCA サイクルの代謝産物のうちコハク酸、フマル酸が減少していた。一般にこれらの産物は低酸素で上昇する。以上のことから、腫瘍微少環境の改善で、アルクチゲニン投与により代謝は好氣的に変化していることが分かった。

図 2A

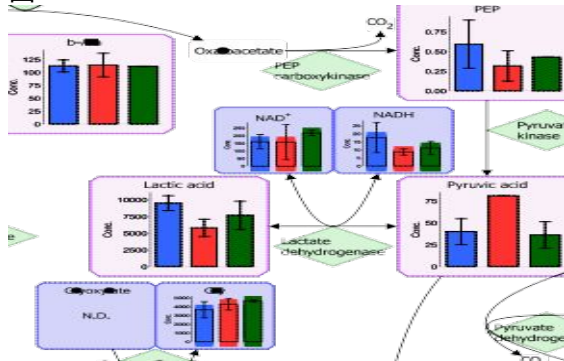
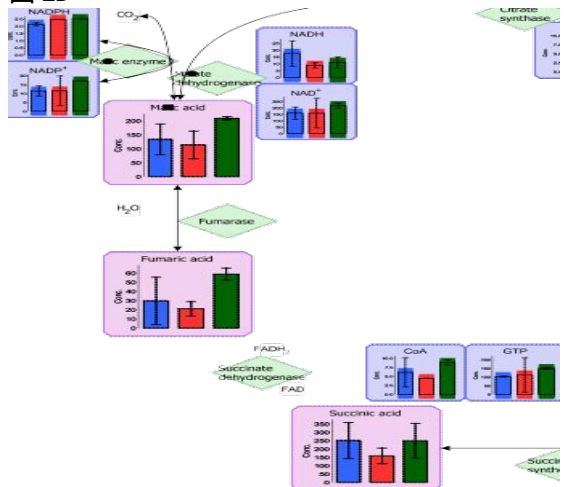


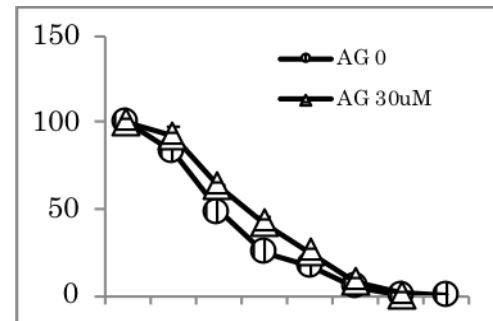
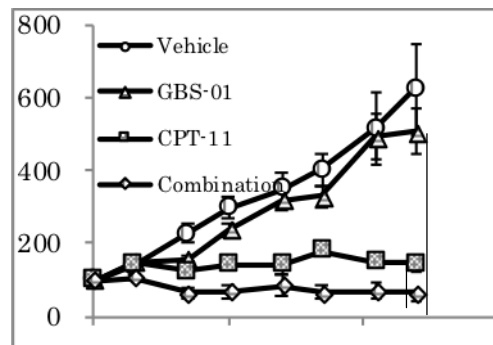
図 2B



アルクチゲニン投与による腫瘍血管網の Normalization のメカニズム

昨年度の研究でも腫瘍細胞での遺伝子発現は Tie2, Angiopoietin, ANGPTL4 遺伝子発現が顕著に増加していることが分かったが、同様に HEVEC を用いた検討でも、多くの血管新生抑制系の遺伝子発現の変化が見られた。総じて言えば、血管新生促進よりも血管新生良く整形の動きが大きいことが分かった。しかしこれらは in vitro での、各の細胞単独での結果であり生体内でいかにして normalization が起こっているのかを明らかにするために、ヒトのがん細胞をヌードマウスに移植するゼノグラフトでの発現解析を、ヒト型の遺伝子発現解析とマウス型の発現解析をすることで解析を試みている。

アルクチゲニンと併用により顕著な腫瘍縮小が各種の化学療法薬で観察された。これらの薬剤は、CPT-11 に加え、carboplatin, oxaliplatin, doxorubicin, bortezomib, everolimus, および gemcitabine である。これらの薬剤は、その作用機序は多様であり、このことからアルクチゲニンによる抗腫瘍効果の増強が腫瘍細胞に対する作用の増強と考えるよりは、動物個体か其れとの相互作用 (微少環境) を通じたものであることが強く示唆された。協調効果が最も顕著な CPT-11 を例として、in vitro および、薬学的な解析を行った。



上の図は、ゼノグラフトを用いた CPT-11 とアルクチゲニン 10% 含有牛蒡子エキス投与および併用の抗腫瘍効果を検討したものである。図からもはっきりと併用による増強効果が明らかである。

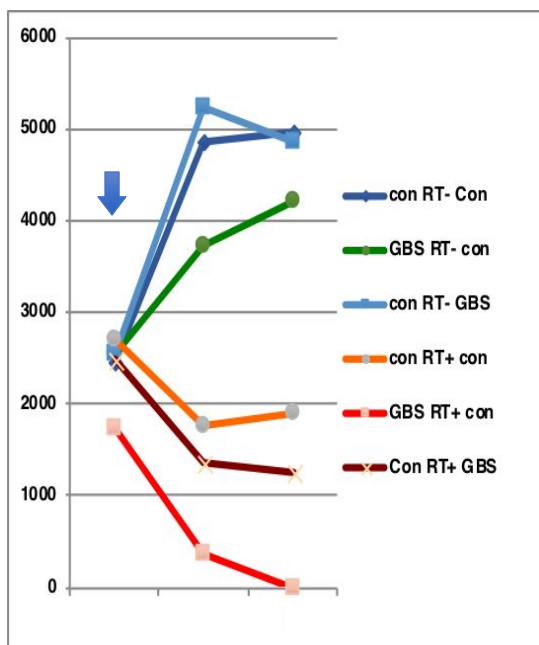
一方、下の図は、*in vitro* でアルクチゲニンと CPT-11 の併用効果を検討した結果である。少なくともはっきりとした k 併用効果を見ることは出来なかった。

同様の検討を、さらに 6 種類の抗がん剤で確認をし、同様の結果が得られた。また、異なるゼノグラフトを用いた検討でも再現することが出来た (Murata et al. submitted)。

CPT-11 では、薬剤の血中濃度、腫瘍組織内濃度を検討し、アルクチゲニン投与により薬剤の送達も改善していることを見いだした。アルクチゲニンが腫瘍血管網を再構築し血流の改善、血管網の正常化を起こしているために送達の向上が見られたと考えられる。

アルクチゲニンによる X 線治療効果の増強

組織の低酸素は放射線治療効果を左右する最も大きな宿主側の要因の一つである。Miapaca 2 のゼノグラフトを用い、腫瘍が直径 5 mm 程度になったときグループ分けをし、10 日間各通常の固形飼料、0.5% GBS-01 含有固形飼料で飼育した後、1.6 Gy の放射線照射ありなしの群を作った。照射後さらに通常の固形飼料と GBS-01 含有飼料を与えたものを比較した。



図から明らかなように、放射線治療群は顕著な腫瘍縮小効果を認めたが、あらかじめ GBS-01 飼料を与えた群は明らかに顕著な腫瘍縮小効果を認め、この増強効果は照射後に GBS-01 含有飼料投与群と比較し顕著に大きかった。これらのことは、アルクチゲニンが約一週間から 10 日で vascular normalization を引き起こし組織点酸素の軽減をすることと良く合致する。放射線を照射する直前に動物各個体の組織低酸素を 5xHRE-Luc を用い計測をしてある。そこで、各個体の X 線照射による腫瘍縮小効果と低酸

素の程度が相関するか否かを解析した。その結果、腫瘍の縮小率と低酸素は有意な逆相関を示した。現在、2.0 Gy, 12 Gy の条件でも詳細な解析を行っている。

アルクチゲニンによる放射線増感効果は腫瘍組織特異的

アルクチゲニンによる放射線増感が vascular normalization によるものであるか否かを実験的に確かめるために、腫瘍を移植していない部分の皮膚に対する毒性の増強があるか否か、そのとき末梢白血球数に対する影響を検討した。皮膚に対する明確な障害が出る量までの検討は十分には行っていないが、初歩的検討では増強効果は認められなかった。また、大腿部、下肢への照射の範囲では明確な骨髄抑制の増強は認められなかった。しかし、この問題はきわめて重要であり、臨床導入以前に詳細に検討を追加する必要がある。

(2) 今後の推進方法

Vascular normalization のメカニズムに関しては、当初想定していた antiangiogenicity の活性、つまり血液灌流の少ない組織領域への選択的毒性によりこれらが脱落するために、相対的に血液灌流の良い部分が残るというメカニズムに加えて、アルクチゲニンが遺伝子発現変化を通じて antiangiogenesis の活性を持っている可能性が明らかになった。しかしながら、現時点では組織レベルで十分に解明されたわけではなく、現在行っているマウス型とヒト型の遺伝子発現解析による腫瘍細胞側と宿主側の各の因子の役割の解析だけでなく、遺伝子改変マウスを用いた解析が必要である。現在臨床で用いられている antiangiogenesis agents は副作用という意味では多くの問題を抱えている。ベバシツマブは明確な、高血圧、血栓形成などの重篤な副作用を高い頻度で招来する。アルクチゲニンには、これまでの臨床試験や、伝統薬としての使用経験からこれらの重篤な副作用の報告はなくその意味でも臨床導入には大きな意義がある。

また、アルクチゲニンの vascular normalization のメカニズムを詳細に明らかにすることで新たな治療標的が見いだされる可能性もある。おのおのの遺伝子のノックダウンやノックアウトマウスを含めて解析しメカニズムを明らかにする必要がある。

X 線治療での増強効果は、すぐにも臨床導入できるものであり、臨床プロトコルにつながる検討を行う必要がある。

まだ解析を始めたところではないが、がん治療での免疫療法の役割は増加している。免疫療法への低酸素領域現象の効果を検討し実用化に結びつける意義は大きい。

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)

- Port JLF, Esumi H, et al. Colorectal Tumors Require NUA1 for Protection from Oxidative Stress. *Cancer Discovery*. 査読有 8, 2018, 632-647. doi:10.1158/2159-8290.CD-17-0533.
- Makinoshima H, Esumi H, et al. Metabolic Determinants of Sensitivity to Phosphatidylinositol 3-Kinase Pathway Inhibitor in Small-Cell Lung Carcinoma. *Cancer Res*. 査読有 78, 2018, 2179-2190. doi:10.1158/0008-5472.CAN-17-2109.
- Obata Y, Esumi H, et al. Oncogenic Kit signalling on the Golgi is suppressed by blocking secretory trafficking with M-COPA in gastrointestinal stromal tumours. *Cancer Lett*. 査読有 415, 2018, 1-10. doi:10.1016/j.canlet.2017.11.032.
- Shinozaki E, Esumi H, et al. Clinical significance of BRAF non-V600E mutations on the therapeutic effects of anti-EGFR monoclonal antibody treatment in patients with pretreated metastatic colorectal cancer: the Biomarker Research for anti-EGFR monoclonal Antibodies by Comprehensive Cancer genomics (BREAC) study. *Br J Cancer*. 査読有 117, 2017, 1450-1458. doi:10.1038/bjc.2017.308.
- Tabata S, Esumi H, et al. Thymidine Catabolism as a Metabolic Strategy for Cancer Survival. *Cell Rep*. 査読有 19, 2017, 1313-1321. doi:10.1016/j.celrep.2017.04.061.
- Awale S, Esumi H, et al. Highly oxygenated antiausterity agents from the leaves of *Uvaria* *dac*. *Bioorg Med Chem Lett*. 査読有 27, 2017, 1967-1971. doi:10.1016/j.bmcl.2017.03.021.
- Obata Y, Esumi H, et al. Oncogenic signaling by Kit tyrosine kinase occurs selectively on the Golgi apparatus in gastrointestinal stromal tumors. *Oncogene*. 査読有 36, 2017, 3661-3672. doi:10.1038/ncr.2016.519.
- Nguyen NT, Esumi H, et al. Constituents of the Rhizomes of *Boesenbergia pandurata* and Their Antiausterity Activities against the PANC-1 Human Pancreatic Cancer Line. *J Nat Prod*. 査読有 80, 2017, 141-148. doi:10.1021/acs.jnatprod.6b00784.

Yagishita A, Esumi H, et al. Development of Highly Selective Fluorescent Probe Enabling Flow-Cytometric Isolation of ALDH3A1-Positive Viable Cells. *Bioconjug Chem*. 査読有 28, 2017, 302-306. doi:10.1021/acs.bioconjchem.6b00618.

Ikeda M, Esumi H, et al. Phase I trial of GBS-01 for advanced pancreatic cancer refractory to gemcitabine. *Cancer Sci*. 査読有 107, 2016, 1818-1824. doi:10.1111/cas.13086.

Nguyen HX, Esumi H, et al. Chemical Constituents of *Mangifera indica* and Their Antiausterity Activity against the PANC-1 Human Pancreatic Cancer Cell Line. *J Nat Prod*. 査読有 79, 2016, 2053-2059. doi:10.1021/acs.jnatprod.6b00381.

Mimaki S, Esumi H, et al. Hypermutation and unique mutational signatures of occupational cholangiocarcinoma in printing workers exposed to haloalkanes. *Carcinogenesis*. 査読有 37, 2016, 817-826. doi:10.1093/carcin/bgw066.

Okada T, Esumi H, et al. Synthesis of new tricyclic thiolactams as potent antitumor agent for pancreatic cancer. *Bioorg Med Chem Lett*. 査読有 26, 2016, 2577-2579. doi:10.1016/j.bmcl.2016.04.035.

[学会発表](計11件)

藤岡 ルミ、江角 浩安 他 . アルクチゲニンの抱合、脱抱合とその安全性と有効性の関係の解明 . 2017 年度生命科学系学会合同年次大会 .

Rumi Fujioka, Hiroyasu Esumi, et al. Conjugation and de-conjugation of arctigenin in mice relating to its safety and effectiveness. 第76回日本癌学会学術総会 . 2017 年 .

江角 浩安 . がん代謝を切り口としたがん治療戦略の現状と課題 . 第17回日本抗加齢医学会総会 . 2017 年 .

堀川 啓太、江角 浩安 他 . 消化管間質細胞腫における Kit チロシンキナーゼのシグナリングは細胞膜ではなくゴルジ体で起こる . 第39回日本分子生物学会大会 . 2016 年 .

Yuuki Obata, Hiroyasu Esumi, et al. GIST and mast cell tumor require the PI3K-Akt pathway on intracellular compartments for their proliferation ~Oncogenic Kit signaling occurs selectively on the Golgi and endo/lysosomes~ . 第39回日本分子生物学会大会 . 2016 年 .

Sachiyo Mimaki, Hiroyasu Esumi, et al.
Comparison of the mutation profiles of the multicentric tumors in an occupational cholangiocarcinoma case. 第 75 回日本癌学会学術総会 . 2016 年.
藤岡 ルミ、江角 浩安 他 . マウスにおけるアルケチゲニンの吸収・グルクロン酸包合と乳酸産生 . 第 4 回がん代謝研究会 . 2016 年.
山口 雅之、江角 浩安 他 . 抗がん剤開発における小動物 MR イメージング . 第 4 回がん代謝研究会 . 2016 年.
田畑 祥、江角 浩安 他 . Thymidine 異代謝による新規エネルギー産生機構 . 第 4 回がん代謝研究会 . 2016 年.
Takanori Kawashima, Hiroyasu Esumi, et al. Arctigenin, an antiausterity antitumor agent, increases intra-tumor blood circulation through vascular remodeling in vivo. 第 11 回日本分子イメージング学会 . 2016 年.
Kenta Murata, Hiroyasu Esumi, et al. Histological and anatomical analysis of vascular normalization in tumor by arctigenin treatment. 第 11 回日本分子イメージング学会 . 2016 年.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称：血管壁強化剤、血管壁を強化する方法および血管網形成抑制剤
(BLOOD-VESSEL-WALL STRENGTHENING DRUG, METHOD FOR STRENGTHENING BLOOD VESSEL WALL, AND VASOGLIANGION-FORMATION SUPPRESSING DRUG)
発明者：江角 浩安、土原 一哉、藤井 博史、山口 雅之、川島 孝則、村田 健太、与茂田 敏、千葉殖幹
権利者：クラシエ製薬、国立がん研究センター、東京理科大学
種類：特許
番号：PCT/JP2016/079830
出願年月日：2016 年 10 月 6 日
国内外の別：国外

取得状況 (計 1 件)

名称：抗癌剤、放射線増感剤および食品組成物
発明者：江角 浩安、土原 一哉、川島 孝則
権利者：クラシエ製薬、国立がん研究センター、東京理科大学
種類：特許
番号：特許第 6 1 9 7 0 7 7 号
取得年月日：2017 年 8 月 25 日
国内外の別：国内

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

江角 浩安 (Esumi Hiroyasu)
東京理科大学・研究推進機構生命医科学
研究所・教授
研究者番号：70160364