

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 11 日現在

機関番号：14401
 研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2009～2011
 課題番号：21390360
 研究課題名（和文） 臨床応用へ向けた癌細胞と微小環境の役割解明に関する包括的研究
 研究課題名（英文） Integrated research for respective role of cancer and microenvironment towards clinical application
 研究代表者
 山本 浩文（YAMAMOTO HIROFUMI）
 大阪大学・医学系研究科・講師
 研究者番号：30322184

研究成果の概要（和文）：①OSNA法を用いた大腸癌リンパ節転移診断について2010年に論文化し、厚生労働省から販売承認を得た。②浸潤癌細胞のみに反応するC4.4A抗体を作成し国内特許を申請。国際特許の出願も受理された。またC4.4AはEMT誘導を促進することが分かり論文化した。③低酸素誘導遺伝子JMJD1AがヒEMT誘導因子を発現させることを明らかとした。④siRNA内包炭酸アパタイトにより腫瘍を縮小させることを動物モデルで示した。⑤VEGFとAng2の両方の阻害による抗血管療法の有効性を動物モデルで示した。

研究成果の概要（英文）：①We reported OSNA-based diagnosis of lymph node metastasis of colorectal cancer in 2010, and Ministry of Health, Labour and Welfare permitted its usage in diagnosis. ②We produced the C4.4A specific antibody that recognizes only invasive cancer cells. We also found that C4.4A promotes EMT. ③We found that hypoxia-induced gene JMJD1A promotes EMT in colon cancer. ④ We found that carbonate apatite containing specific siRNA showed a tumor shrinkage when it is injected into the tail vein of nude mice. ⑤ We found inhibition of both VEGF and Ang2 led to a tumor shrinkage in nude mice.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
2010年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
2011年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
年度			
年度			
総計	13,100,000	3,930,000	17,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学

キーワード：癌、微小環境、浸潤、転移

1. 研究開始当初の背景

癌の攻略には癌細胞とその微小環境を含めた両面からのアプローチが必要である。私たちはこれまでに癌細胞の性質については主として細胞周期関連分子と

β -catenin に代表される Wnt signal 系の異常について研究を進めてきた。それらの研究成果を臨床応用するために、炭酸アパタイトナノ粒子法の臨床開発が研究目的

のひとつである。癌の微小環境の研究としては、①癌と間質の interface における癌細胞の間質浸潤の分子機構について、②血管内浸潤のメカニズム解析、③腫瘍血管の分化阻害、④低酸素下での癌細胞応答と癌の悪性転化について、⑤微小リンパ節転移の再発マーカーとしての意義、⑥活性化線維芽細胞 myofibroblast の癌進展への寄与、など、多角的に研究を進めてきた。本申請課題では、癌細胞と微小環境の役割解明に関する包括的研究を掘り下げ、あるいは発展させ、研究期間3年間で癌の診断・治療において臨床応用が可能なレベルにまで到達させることを目標とする。

2. 研究の目的

癌細胞と微小環境の役割解明に関する包括的研究を遂行し、癌の診断・治療に役立てることを目的とする。

そのためには癌細胞に対しては抗がん剤や核酸の導入を可能ならしめる炭酸アパタイト法の改良が必要であり、微小環境としては癌周囲の血管、リンパ管・リンパ節、低酸素環境、癌先進部についての新しい知見を追求する。

3. 研究の方法

大腸癌細胞、切除組織、動物腫瘍モデルを用いて各実験を進める。

- (1) リンパ節転移診断：OSNA法により多施設で診断精度を検定する。
- (2) C4.4A抗体を用いて大腸癌の予後予測、budding、EMTとの関連をみる。
- (3) ヒストン脱メチル化酵素 JMJD1A と大腸癌の進展・予後との関連、大腸癌細胞のEMT化を進めるかどうかを調べる。

(4) 炭酸アパタイト法を動物モデルで全身に投与することで抗がん剤や siRNA などの核酸を内包したナノ粒子を用いてマウスの皮下移植腫瘍を治療する。

(5) VEGF 抗体の腹腔内投与に加えて Ang2 阻害 peptide を投与し、抗腫瘍効果の上乗せ可能か検討する。

4. 研究成果

(1) リンパ節転移診断

① OSNA法による大腸癌リンパ節転移の検出精度は 2mm 間隔のHE染色と同等ということが多施設共同の臨床性能試験により示した。この結果をもって、OSNA法による大腸癌リンパ節転移診断の妥当性について厚生労働省より承認を受けた。

② 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癌の再発率が增加するという明らかな相関関係を認めた

(2) C4.4A抗体を用いた大腸癌の予後予測

① 新規に作成した C4.4A 抗体は大腸癌の 25% の先進部の浸潤細胞に反応し血行性転移と相関しリンパ節転移とは関連しない独立予後因子となった。この抗体は、浸潤癌細胞の細胞膜にのみ反応し、診断的価値を有するので国内特許を申請し、国際特許(PCT)の出願も受理された。

② C4.4A 発現は大腸癌の budding と関連し、細胞浸潤能を高め EMT (epithelial mesenchymal transition 上皮間葉転換) を促進した。

③ コラーゲンゲル内での浸潤モデルを作成、C4.4AsiRNA 処理によってコラーゲンの融解が完全に抑止された。

(3) ヒストン脱メチル化酵素 JMJD1A と大腸癌

①大腸癌肝転移巣の中心傍域は血流が乏しくそこで up-regulate される遺伝子を in vivo 低酸素誘導遺伝子候補として microarray で同定した。2 万余の検索遺伝子の中で VEGF は TOP3 に位置しており、TOP10 に位置した JMJD1A は epigenetic に各種遺伝子の転写を制御するヒストン脱メチル化酵素であった。興味深いことに JMJD1A は大腸癌 300 例以上、また胃癌、肝臓癌の解析でも非常に強い予後因子となった。

②大腸癌細胞株に JMJD1A 遺伝子を adenovirus system により導入した。大腸癌細胞株を用いた in vitro 実験では増殖能・浸潤能の亢進を認めた。ヌードマウスの皮下に作成した腫瘍を antisense 型 JMJD1A の adenovirus 液を局所投与し治療効果を認めた。

③JMJD1A は低酸素培養下でヒストン H3K9 のメチル化を阻害することでクロマチン構造の open 化を維持し、大腸癌細胞の EMT を促進させることが明らかとした。

④大腸癌のみならず JMJD1A は肝臓癌の新規予後マーカー、EMT 促進因子であることも分かった。

(4) 炭酸アパタイト法 carbonate apatite による in vivo 遺伝子導入

炭酸アパタイトナノ粒子テクノロジーの臨床開発を進めている。本法は東京工業大学赤池敏宏教授によって開発された(2006 Gene 5;376(1):87-94)。電荷がマイナスチャージの DNA, mRNA, siRNA などとカルシウム、炭酸イオンが 100-200nm のナノ粒子を形成し血中で安定したイオン状態となり、癌細胞内に入るとエンドソーム内の pH の低下から粒子が一気に burst する仕組みを備えている。また毒性はほとんどなく HeLa や NIH3T3 を用い

た遺伝子導入試験では従来の liposome 法の 10-40 倍以上の導入効率が示されている。

①薬物のデリバリーとしてはアドリアマイシンが最も効率的に炭酸アパタイトへ封入できた。In vitro で癌細胞への取り込みを追跡すると、炭酸アパタイトに封入することで、アドリアマイシン単独よりも短時間で細胞内に侵入することが分かった。細胞殺傷効果もアパタイトに封入したほうが有意に高かった。しかし、電子顕微鏡で粒子サイズを測定すると 60-80nm の粒子が数個集まり 200nm-1000nm 以上に凝集しサイズが増大した。このためマウスの尾静脈から注射することができなかった。そこで多くの試行錯誤の結果、凝集を防ぎ 10-30nm のナノサイズの均一な粒子を調整する方法を開発した (Super Apatite 法)。これによってアパタイトに封入した通常の 10 分の 1 量のアドリアマイシンをマウスの尾静脈より投与することによって、皮下に移植した大腸癌細胞 HCT116 の有意な抗腫瘍効果を認めた。

②炭酸アパタイトに FITC 標識した siRNA を封入し細胞内への取り込みを追跡した。リポフェクション法よりも早くに細胞内に入り、survivin などの蛋白発現を速いタイミングでノックアウトすることができた。ヌードマウスの尾静脈に投与すると肝臓や腎臓などへの取り込みは FITC 標識 siRNA 単体の方が多く、皮下腫瘍への取り込みは炭酸アパタイトに封入した FITC 標識 siRNA が多くみられた。

③炭酸アパタイト法を更に進化させた super apatite 法によって動物への全身投与が可能となり核酸医薬による in vivo 治療が飛躍的な向上を遂げた。

(5) 血管新生分子阻害の異なるメカニズムによる抗腫瘍効果の検討

①In vivo 3次元培養でHUVECを用いてAng2リコンビナント蛋白、Ang2阻害剤(中和抗体)の(VEGF存在下、非存在下で)血管内腔形成に与える影響を検討した結果、in vitro環境では血管内腔形成への影響は少ないことがわかった。

②HUVECからの蛋白抽出物を用いてCDC42, Rac, V-cadherin蛋白発現レベルはVEGFによって増強したがAng2リコンビナント蛋白の添加によっては影響を受けなかった。

③動物皮下腫瘍においては、Ang2阻害剤(中和抗体)は著しく血管内腔形成を阻害した。一方、VEGF阻害によって血管内皮細胞の増殖が抑えられ、それぞれ異なるメカニズムによって抗腫瘍効果が得られることが分かった。併用によりAng2阻害抗体はVEGF中和抗体による治療効果を増強した。

(総括)

臨床レベル、臨床応用直前まで到達したもの

- ・OSNA法によるリンパ節転移診断
- ・大腸癌の再発診断に適した抗体の作成

画期的な発展に繋がる可能性の高い成果

- ・Super apatite法による全身的in vivo遺伝子デリバリー

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7件)

1. Noda T, Yamamoto H et al. PLOD2 induced under hypoxia is a novel prognostic factor for hepatocellular carcinoma after curative resection. 査読有.Liver Int. 32, 110-8, 2012.

2. Oshiro, Yamamoto H et al. C4.4A is associated with tumor budding and EMT of colorectal cancer. Cancer Science, 査読有.in press, 2012.
3. Yamada D, Kobayashi S, Yamamoto H, et al. Role of the Hypoxia-Related Gene, JMJD1A, in Hepatocellular Carcinoma: Clinical Impact on Recurrence after Hepatic Resection. 査読有.Ann Surg Oncol. 2011 May 24. [Epub ahead of print]
4. Yamamoto H et al. OSNA-based Novel Molecular Testing for Lymph Node Metastases in Colorectal Cancer Patients: Results from a Multicenter Clinical Performance Study in Japan. 査読有.Annals of Surgical Oncology 18(7):1891-8, 2011.
5. Uemura M, Yamamoto H et al. Hypoxia-inducible adrenomedullin in colorectal cancer. 査読有.Anticancer Res 31(2), 507-14, 2011
6. Konishi K, Yamamoto H et al. Expression of C4.4A at the invasive front is a novel prognostic marker for disease recurrence of colorectal cancer. 査読有. Cancer Science 101, 2269-77, 2010.
7. Uemura M, Yamamoto H et al. Jumonji domain containing 1A is a novel prognostic marker for colorectal cancer: *in vivo* identification from hypoxic tumor cells Clin Cancer Res. 査読有.16; 4636-46, 2010.

[学会発表] (計2件)

1. Hirofumi Yamamoto. Clinical application of molecular biological testing for detecting lymph node metastasis of colorectal cancer. 8th International Symposium on Minimal Residual Cancer. Evening Seminar, 2011.9.21, Osaka
2. 山本浩文 大腸癌リンパ節転移検査における分子生物学的検査法の臨床への応用 第100回日本病理学会総会ランチョンセミナー(招待講演) 2011. 4. 30、横浜

〔産業財産権〕

○出願状況（計2件）

1. 名称：癌予後判定可能な抗体、および癌予後判定方法
発明者：山本浩文
権利者：大阪大学
種類：特願
番号：2010-136621
出願年月日：平成22年6月15日
国内外の別：国内

2. 名称：癌予後判定可能な抗体、および癌予後判定方法
発明者：山本浩文
権利者：大阪大学
種類：PCT
名称：JP2011/063746
出願年月日：2011年6月15日
国内外の別：外国

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本 浩文 (YAMAMOTO HIROFUMI)
大阪大学・医学系研究科・講師
研究者番号：30322184

(2) 研究分担者

森 正樹 (MORI MASAKI)
大阪大学・医学系研究科・教授
研究者番号：70190999

赤池 敏宏 (AKAIKE TOSHIHIRO)
東京工業大学・生命理工学部・教授
研究者番号：30101207