

令和 5 年 5 月 24 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K15531

研究課題名（和文）腫瘍血管内皮細胞による、がん微小環境Feイオン調節機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanism of Fe ion regulation of cancer microenvironment by tumor vascular endothelial cells

研究代表者

村松 史隆（Muramatsu, FUnitaka）

大阪大学・微生物病研究所・助教

研究者番号：90803627

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は腫瘍血管内皮細胞がセルロプラスミンを産生し、がんの鉄イオン代謝調節を介して抗がん剤耐性を与える微小環境形成メカニズムの解明を目指したものである。血管内皮細胞特異的セルロプラスミンは腫瘍環境の鉄イオンの酸化還元反応を担い、がん細胞への鉄イオン取り込みを促進する。鉄イオンは、がん細胞核内で、DNA脱メチル化酵素の補因子として作用し、がん細胞のゲノムにエピジェネティックな変化および抗がん剤耐性遺伝子の誘導を引き起こすことが分かった。また、この微小環境形成メカニズムは予後不良な膠芽腫やメラノーマで作用しており、種々の悪性腫瘍治療開発に応用できる可能性を有することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

VEGFシグナルを標的とした抗腫瘍血管療法が有効ではない腫瘍は多く、新規治療法の開発が望まれている。本研究成果である血管内皮細胞による鉄代謝を介したがん微小環境制御機構は、これまでの考えられてきた血管内皮細胞が持つ病理学的な学術的意義を広める成果であると言える。またこのメカニズムは幅広い癌種で作用することが明らかとなった。内皮細胞による、鉄イオン代謝を介したがん細胞ゲノムのエピジェネティック制御は抗がん剤耐性化に重要であることから、既存のがん治療法への上乗せ期待できる多くのがん治療に適用しうる薬剤の開発につながると期待される。

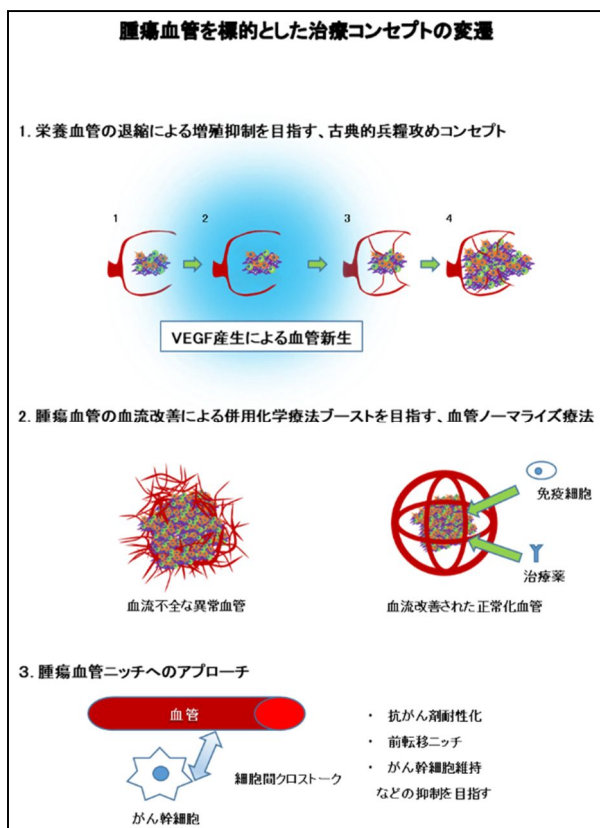
研究成果の概要（英文）：This study aimed to elucidate the microenvironmental mechanisms by which tumor vascular endothelial cells produce ceruloplasmin and confer anticancer drug resistance through modulation of iron ion metabolism in cancer. Vascular endothelial cell-specific ceruloplasmin is responsible for the redox reaction of iron ions in the tumor environment and promotes iron ion uptake into cancer cells. Iron ions act as a cofactor for DNA demethyltransferases in the nucleus of cancer cells, causing epigenetic changes in the genome of cancer cells and induction of anticancer drug-resistant genes. This microenvironment-forming mechanism was also found to act in glioblastoma and melanoma, which have poor prognosis, and has the potential to be applied to the development of treatment for various malignant tumors.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：がん微小環境 腫瘍血管 生体イメージング 鉄イオン セルロプラスミン 膠芽腫 血管内皮細胞

1. 研究開始当初の背景

腫瘍組織の隅々にまで張り巡らされた血管ネットワークは、酸素や栄養分を供給することで腫瘍の増大に働いている (Judah F. *N Engl J Med.* 1971)。腫瘍血管の形成は、主に血管新生(angiogenesis)と呼ばれる過程によって進められる。血管新生とは、既存の血管の一部から新たな血管の芽が生まれ、枝を伸ばすように分岐して血管網を形成する現象であり、血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) が中心的な役割を担う (Ferrara N. *Science.* 1989)。抗 VEGF 療法は腫瘍血管を減少させ「腫瘍組織を兵糧攻めにする」コンセプトに基づき開発されたが、患者の全生存期間は改善されないことも多い。その一方、近年の臨床適応が目覚ましく発展がみられる、抗 PD-1 抗体などのがん免疫療法では、腫瘍血管を介した T リンパ球の十分な癌への浸潤が必須であり、がん治療において腫瘍内に血管組織が豊富に存在することは必ずしも不利となるわけではない。そこで、VEGF シグナルを微調節し、腫瘍血管の透過性と血流をコントロールし、併用化学療法の効果を高める「腫瘍血管ノーマライゼーション療法」という治療コンセプトが考え出された (Jain RK. *Nat Med.* 2001)。しかしながら、併用化学療法の殺細胞性を高められるケースはごく限られており、無増悪生存期間の延長が得られる程度の結果となることも多い。



血管内皮細胞はがん微小環境(ニッチ)を構成する主要な細胞でもあり、上図のように一部のがん幹細胞に薬剤耐性能を与えたり、腫瘍内部の間質圧を調節したりして、抗がん剤の治療効果を減弱させている。近年では、種々の間質細胞とがん細胞間相互作用のメカニズムが多数報告されてきており、第3の治療コンセプトとして「がん微小環境を上手に制御する」ことががん治療に重要と考えられている。

我々の先行研究で、神経膠芽腫モデルマウスに DNA アルキル化剤と選択的 Fe²⁺イオンキレート剤を併用投与すると、抗 VEGF 療法併用療法よりも有意に治療効果が高まることが確認された。分子機構として(1)DNA アルキル化剤で処理されたがん細胞内には Fe²⁺イオンが蓄積し、薬剤耐性遺伝子 *Mgmt* の発現が誘導されること、(2)血管内皮細胞のフェロオキシダーゼであるセルロプラスミンが、がん組織中の Fe イオンを酸化-還元反応させることで、がん細胞での Fe イオン取り込みを促進させることが明らかとなってきた。この血管 鉄イオン代謝を軸としたがん微小環境形成メカニズムは、新規の抗腫瘍血管療法の治療ターゲットと幅広く応用可能かはよく分かっておらず、さらに詳細な分子機構の解明が必要となった。

2. 研究の目的

神経膠芽腫は「兵糧攻め」「腫瘍血管ノーマライゼーション」いずれの治療コンセプトに基づいても、抗 VEGF 療法の効果に乏しい悪性腫瘍である。我々の先行研究から示唆された、腫瘍血管内皮がセルロプラスミンを介して、Fe イオン代謝を調節し、がん幹細胞を支持する微小環境形成を促進する機構は、これまでの腫瘍血管の示す役割とはかけ離れており、抗 VEGF 療法に抵抗を示す悪性腫瘍の新規治療開発に役立つ可能性が高い。そこで、本研究は腫瘍血管内皮細胞が(1)血管ニッチ 鉄イオン代謝軸を制御する分子機構の解明、および(2)このがん微小調節機構の普遍性と治療応用性明らかとすることを目的に行った。

3. 研究の方法

血管内皮細胞特的なセルロプラスミンノックアウトマウスを作製し、血管-鉄イオンニッチが GL261 膠芽腫同所移植モデルおよび B16 悪性黒色腫皮下移植モデルにおけるテモゾロミド耐性化に果たす役割を検証した。膠芽腫モデルでは二光子励起蛍光顕微鏡生体イメージング解析を通して、1細胞レベルで、化学療法下の細胞の分布、分裂、細胞死と血管との相関パターンを解析した。ノックアウトマウスでの薬剤耐性化膠芽腫細胞の分布・増殖と血管ニッチの相関性の

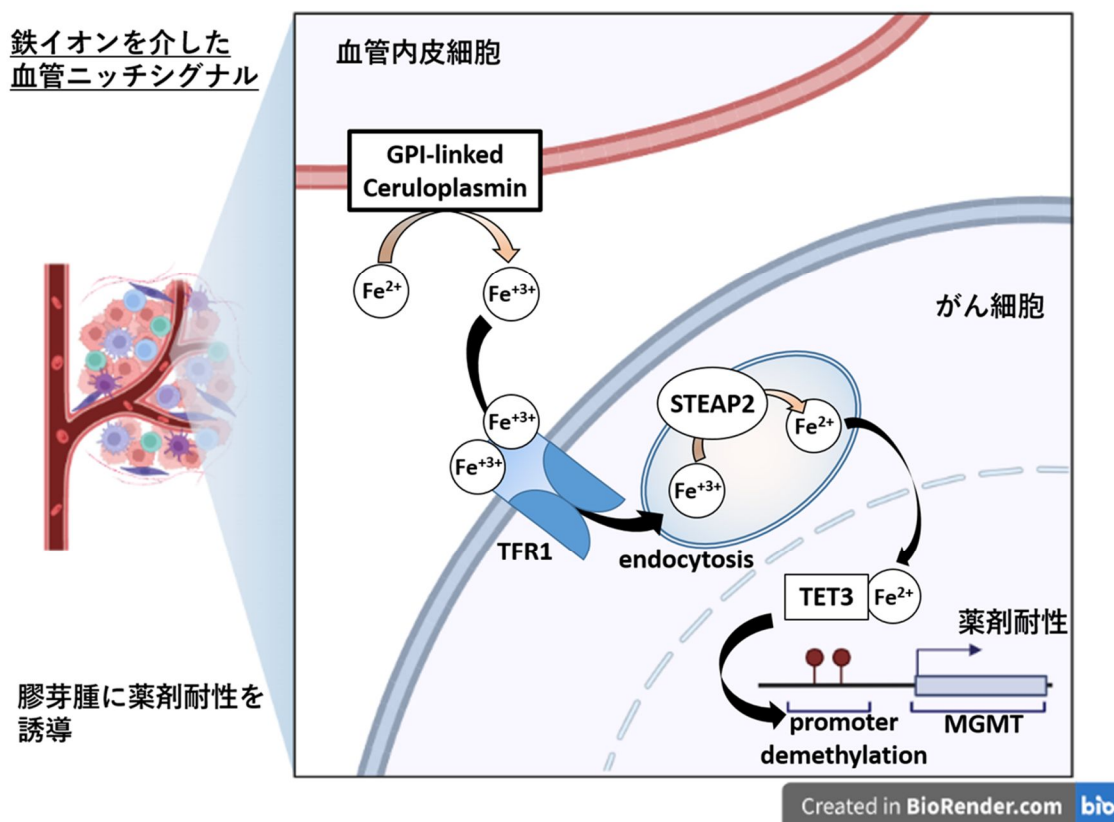
変化および、殺細胞性への向上効果を評価した。また血管 - 鉄イオン代謝軸を標的とした治療効果は、生存曲線解析で評価した。B16 悪性黒色腫薬剤抵抗性については、皮下移植モデルの増殖曲線解析を行った。鉄イオン代謝およびそのシグナル経路の解析は、bEnd3 培養血管内皮細胞とがん細胞の共培養系を構築し、関与する遺伝子のノックダウン試験や、エピゲノム解析を行った。

4. 研究成果

(1) 血管内皮細胞特異的セルロプラスミンノックアウトマウスに膠芽腫同所移植モデルを作製し、抗がん剤耐性化が誘導されるのか検証した。ノックアウトマウスでは血管内皮細胞による腫瘍内での鉄代謝が抑制され、鉄結合タンパク質フェリチンの腫瘍内への沈着が抑制された。この鉄イオンは Steap2 を介したエンドサイトーシスを経て、細胞核内へ運ばれており、DNA 脱メチル化酵素 Tet3 の補因子として作用していた。結果的に、がん細胞のゲノムにエピジェネティックな変化が引き起こされ、耐性遺伝子 Mgmt が誘導されること分かった。同モデルマウスで化学療法に対する生存曲線解析を行ったところ、ノックアウトマウスではより良好な生存期間の延長が見られた。

(2) 膠芽腫以外に乳癌、大腸がん、肺がん、悪性黒色腫モデルを作製し、同様のがん血管微小環境調節機構が作用するのか調べた。悪性黒色腫では膠芽腫と同じ鉄代謝経路を介した、ゲノムのエピゲノム調節が見られ、DNA アルキル化剤テモゾロミド耐性が誘導されることが明らかとなった。次に別種の DNA アルキル化剤としてダカルバジンなどへの耐性化メカニズムへの関与を検討したが、エピジェネティック制御を介しておらず、全く異なるシグナル経路が耐性化に関与している結果が得られた。悪性黒色腫では膠芽腫と同様のシグナル経路が誘導され、エピゲノム変化が生じることが分かった。さらに増殖曲線解析の結果からは、ノックアウトマウスではよりテモゾロミドの治療効果が高まることが明らかとなった。以上のことから、このがん微小環境制御機構はある程度の普遍的な性質を有する薬剤耐性誘導機構と言える(下図)。

本研究の成果は、膠芽腫や悪性黒色腫などの予後不良な悪性腫瘍の治療に繋がると期待される。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Jia Weizhen, Kong Lingyu, Kidoya Hiroyasu, Naito Hisamichi, Muramatsu Fumitaka, Hayashi Yumiko, Hsieh Han-Yun, Yamakawa Daishi, Hsu Daniel K., Liu Fu-Tong, Takakura Nobuyuki	4. 巻 12
2. 論文標題 Indispensable role of Galectin-3 in promoting quiescence of hematopoietic stem cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-021-22346-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Inukai Koichi, Kise Kazuyoshi, Hayashi Yumiko, Jia Weizhen, Muramatsu Fumitaka, Okamoto Naoki, Konishi Hiroataka, Akuta Keigo, Kidoya Hiroyasu, Takakura Nobuyuki	4. 巻 29
2. 論文標題 Cancer apelin receptor suppresses vascular mimicry in malignant melanoma	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Pathology and Oncology Research	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/pore.2023.1610867	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 村松 史隆
2. 発表標題 生体イメージングが解き明かす、セルロプラスミン - 鉄イオン代謝を介した血管性がん微小環境
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 村松 史隆
2. 発表標題 腫瘍血管内皮はセルロプラスミンを介して鉄イオンを制御し、膠芽腫に薬剤耐性を与えるニッチを形成する
3. 学会等名 第30回日本血管生物医学会学術集会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------