

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 25 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19445

研究課題名(和文)悪性固形腫瘍内低酸素がん細胞に対する血中マーカーのゲノムワイドスクリーニング

研究課題名(英文)Genome-wide screening of blood markers for hypoxic cancer cells within malignant solid tumors

研究代表者

原田 浩(Harada, Hiroshi)

京都大学・生命科学研究科・教授

研究者番号：80362531

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：固形腫瘍内の酸素環境は不均一で、血管から70～100ミクロン離れた領域に、血管から十分な酸素が供給されない低酸素領域が存在する。同領域のがん細胞は放射線治療抵抗性を獲得しているため、がん患者に対する個別化医療を実現させるためには、患者ごとに異なる腫瘍低酸素領域の量を簡便かつ正確にモニターする手法の確立が急務である。

低酸素刺激を受けたがん細胞が発現・分泌する蛋白質を探索した結果、既に我々が見出していたSPINK1を含む4つのタンパク質が同定された。これら4遺伝子のいずれもが高発現している症例を選別することによって、高精度に腫瘍低酸素画分をモニターできる可能性を確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で見出した4遺伝子の発現・分泌レベルを基に、腫瘍低酸素を高精度に予測するシステムの確立できると期待される。そうしてできた手法をがん患者に適用することによって、癌患者に対する個別化医療が実現されることが期待される。

研究成果の概要(英文)：The oxygen environment in solid tumors is heterogeneous, with hypoxic regions that do not receive sufficient oxygen from blood vessels existing in areas 70 to 100 microns away from the vessels. Since cancer cells in this region have acquired resistance to radiotherapy, it is urgent to establish a simple and accurate method to monitor the amount of hypoxic regions in different tumors in different patients in order to realize personalized medicine for cancer patients.

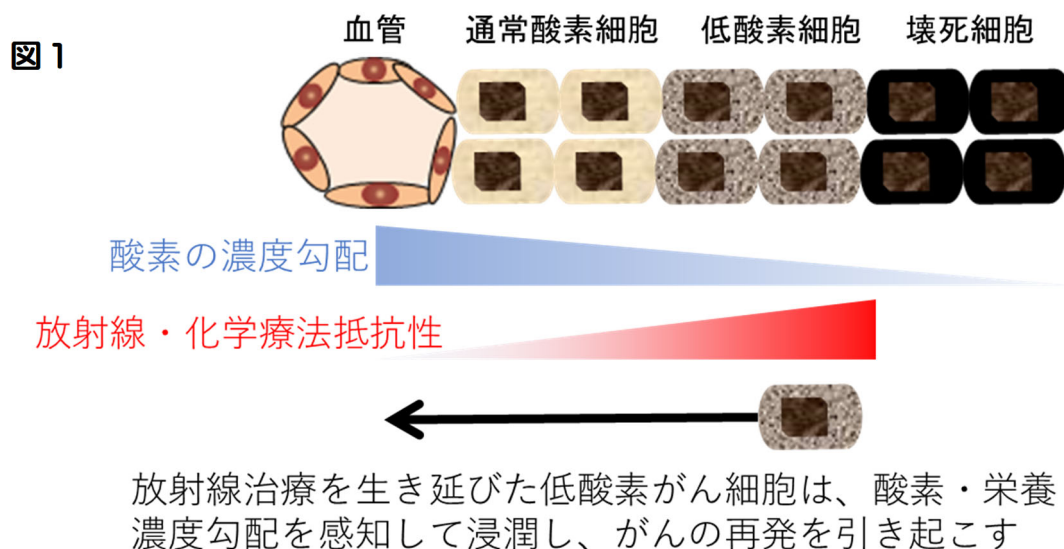
As a result of searching for proteins expressed and secreted by hypoxia-stimulated cancer cells, four proteins including SPINK1, which we had already discovered, were identified. By selecting cases in which all four genes are highly expressed, we confirmed the possibility of monitoring tumor hypoxic fractions with high accuracy.

研究分野：放射線腫瘍生物学

キーワード：がん 微小環境 低酸素 マーカー

## 1. 研究開始当初の背景

悪性腫瘍組織内部の微小環境は不均一で、腫瘍血管からの距離に応じて酸素・栄養素・増殖因子等の濃度勾配が存在する(図1)。こういった環境の多様性が、個々のがん細胞の放射線感受性・抵抗性の差異を生むことは、放射線腫瘍学の歴史の中で経験的に知られていた。このような状況下で我々は、遺伝子工学的手法を駆使して、「腫瘍内の低酸素がん細胞」を光タンパク質で標識する手法を独自に確立し、「当該細胞群が放射線治療を優位に生き残り、酸素・栄養環境の良い血管近傍に浸潤して、がんの再発と遠隔転移を引き起こす」という直接的なエビデンスを示し、がんの再発機構の解明に貢献してきた(Goto et al. *Nature Commun.* 2015; Harada et al. *Nature Communications.* 2012; Zhu et al. *Oncogene.* 2013 など; 図1)。この独自の知見、および腫瘍内低酸素分画の多い患者は生命予後が不良であるという臨床データに基づいて、今日、「がん患者の腫瘍内低酸素を簡便にモニターする手法が確立されれば、個別化医療の具現化に向けた道が拓ける」と期待されている。



担癌マウスを用いて実施した予備検討を通じて我々は、低酸素環境下で分泌量が増加する既知のタンパク質の血中濃度が、移植腫瘍内の低酸素領域の量と相関することを見出した。しかしながら、当該タンパク質の血中分泌量は極めて少なく、マーカーとしての有用性は低いことが問題であった。また、当該タンパク質は腫瘍組織以外の炎症部位からも分泌されることから、腫瘍低酸素の特異的のマーカーとしては不適である。

この問題を克服するために、予備検討レベルの小スケールでゲノムワイド解析を行ったところ、がん細胞が低酸素刺激依存的に100倍以上の誘導比を持って分泌するタンパク質が存在することが見出された。そこで、本研究を通じてゲノムレベルでの大規模スクリーニングを実施すれば、より良い低酸素血中マーカーが見つかること確信し、本研究を着想するに至った。

## 2. 研究の目的

上述の通り、個別化がん治療を具現化するために『腫瘍内の低酸素分画を簡便に定量する系』が希求されている。本研究で我々は、腫瘍内の低酸素がん細胞から分泌されるタンパク質を、血中マーカーとして活用する新たな手法を確立するため、

- ★ 低酸素環境にさらされたがん細胞が細胞外に分泌するタンパク質をゲノムワイドに探索する。
- ★ 同因子が低酸素刺激依存的に分泌される機序の解明を通じ、低酸素がん特異性を検証する。

以上、独自の探索研究で見出す因子を活用して、「新たなコンセプトに基づく“腫瘍低酸素モニター法”の確立」を目指す「挑戦的かつ波及効果の大きい萌芽研究」を展開した。

### 3. 研究の方法

これまでの予備的研究で我々は、*in vivo* の腫瘍組織内環境を *in vitro* で高度に模倣した培養条件を独自に作り出すことに成功している。この実験条件を活用し「腫瘍内低酸素環境を模倣した環境で、がん細胞が特異的に培地中へ分泌するタンパク質」を同定するため、がん細胞株を用いてゲノムワイドスクリーニングを実施した。ヒットした遺伝子産物の、低酸素刺激依存的な発現を定量的 PCR 法で検証した。また、細胞外への分泌を定量する目的で、ELISA アッセイを実施した。

### 4. 研究成果

腫瘍低酸素症を正確かつ簡便に予測する血漿マーカー候補タンパク質を特定するため、ヒト子宮頸がん由来細胞株 HeLa を、通常酸素条件下 (20%) または低酸素条件下 (<0.1% O<sub>2</sub>) で 24 時間培養し、その後に抽出した全 RNA サンプルを対象に DNA マイクロアレイ解析を行って、低酸素誘導性遺伝子をゲノムワイドにスクリーニングした。マイクロアレイのデータセットは、NCBI の Gene Expression Omnibus データベース (GEO GSE161393) に寄託した。

このマイクロアレイ解析の結果、ヒト子宮頸がん由来細胞株 HeLa 細胞において、<0.1% O<sub>2</sub>、24 時間という極めて重度の低酸素処理によって、34 遺伝子の mRNA レベルが 10 倍以上誘導されることがわかった (図 2)。配列解析の結果、34 個の遺伝子のうち 4 遺伝子が、それぞれの N 末端領域に、細胞外への分泌を煮ぬ分泌用シグナルペプチドを有していることが判明した。この解析結果から、低酸素依存的な発現により、当該 4 タンパク質が細胞から分泌されるのではないかと考えた。この 4 遺伝子の中に、我々が以前に実施した「低酸素がん細胞が分泌する蛋白質のスクリーニング実験で見出した SPINK1」が含まれていたことから、本研究で実施したゲノムワイドスクリーニングによって、目的とするタンパク質が同定される可能性が高いと判断した。SPINK1 を除く 3 つのタンパク質 A~C の発現が、低酸素刺激を受けたがん細胞によって、それぞれ約 30、29、21 倍誘導されることが明らかになった。また、これらタンパク質が実際に低酸素刺激を受けた細胞から、細胞外に分泌されることを確認した。また、SPINK1 を含む 4 タンパク質のいずれもが発現されている場合に、細胞が低酸素環境下にある可能性が高く、当該 4 タンパク質を低酸素マーカーとして活用できる可能性が示唆された。

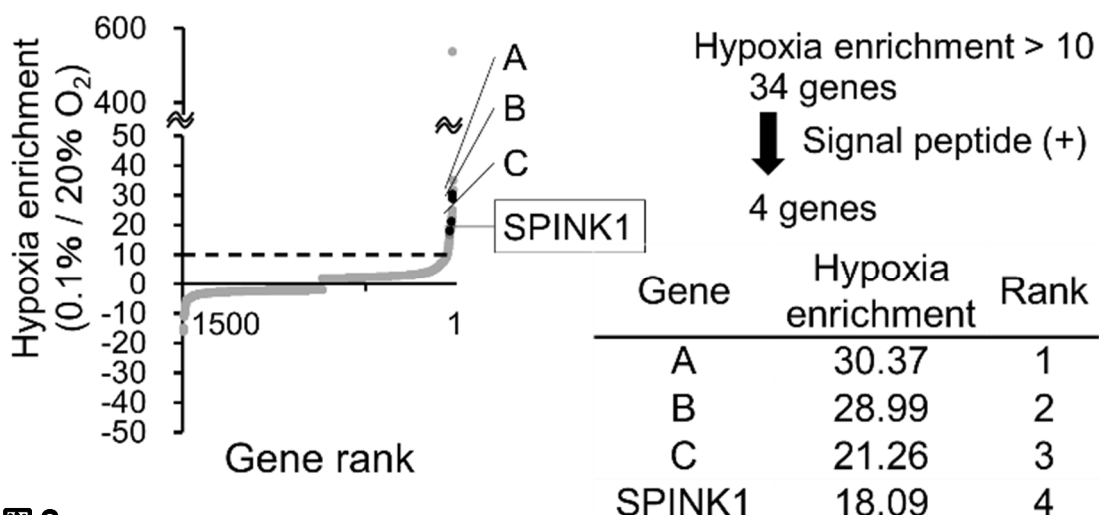


図 2

今後、担癌マウスを活用した *in vivo* 実験を通じて、「当該バイオマーカー候補遺伝子の血中濃度」が「移植腫瘍内の低酸素領域の量」と相関するか否かを検証することによって、当該タンパク質の有用性を検証することが必要である。また、がん患者を対象とした研究を開発することによって、当候補タンパク質の中から、腫瘍低酸素をモニターする血中バイオマーカーの王冠が絞り込まれることが期待される。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Suwa T, Kobayashi M, Nam JM, *Harada H.	4. 巻 53
2. 論文標題 Tumor microenvironment and radioresistance.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Exp Mol Med (NPG)	6. 最初と最後の頁 1029-1035
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s12276-021-00640-9.	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 Shirai Y, Chow CCT, Kambe G, Suwa T, Kobayashi M, Takahashi I, *Harada H, *Nam JM.	4. 巻 13
2. 論文標題 An overview of the recent development of anticancer agents targeting the HIF-1 transcription factor.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 2813
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers13112813	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 Suwa T, Kobayashi M, Shirai Y, Nam JM, Tabuchi Y, Takeda N, Akamatsu S, Ogawa O, Mizowaki T, Hammond EM, *Harada H.	4. 巻 6
2. 論文標題 SPINK1 as a plasma marker for tumor hypoxia and a therapeutic target for radiosensitization.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 JCI Insight	6. 最初と最後の頁 e148135
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1172/jci.insight.148135.	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 該当する
1. 著者名 Haitani T, Kobayashi M, Koyasu S, Akamatsu S, Suwa T, Onodera Y, Nam JM, Nguyen PTL, Menju T, Date H, Ogawa O, *Harada H.	4. 巻 528
2. 論文標題 Proteolysis of a histone acetyl reader, ATAD2, induces chemoresistance of cancer cells under severe hypoxia by inhibiting cell cycle progression in S phase.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Letter	6. 最初と最後の頁 76-84
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.canlet.2021.12.028	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 4件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 原田浩
2. 発表標題 酸素生物学と放射線腫瘍学の接点
3. 学会等名 日本量子医科学会第1回学術総会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 原田浩
2. 発表標題 高線量放射線照射後の腫瘍内酸素環境の変化に基づく分割照射法の再考
3. 学会等名 第34回日本放射線腫瘍学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 原田浩
2. 発表標題 HIFシグナルが加速する悪性固形腫瘍内の細胞社会ダイバーシティ
3. 学会等名 第94回日本生化学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 諏訪達也
2. 発表標題 泌タンパク質 SPINK1 を活用した腫瘍内低酸素のモニタリングと放射線増感
3. 学会等名 低酸素研究会2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 原田浩
2. 発表標題 低酸素バイオロジーの視点で見るハイパーサーミアによる放射線増感
3. 学会等名 第38回日本ハイパーサーミア学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 低酸素バイオマーカー及びその利用	発明者 諏訪達也、小林稔、 原田浩	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2021-108196	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

<p>京都大学大学院生命科学研究科がん細胞生物学分野ホームページ  <a href="http://www.rbc.kyoto-u.ac.jp/cancer_biology/index.html">http://www.rbc.kyoto-u.ac.jp/cancer_biology/index.html</a></p>
---

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
研究分担者	小林 稔  (KOBAYASHI Minoru)  (40644894)	京都大学・生命科学研究科・特定助教    (14301)	

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
---------	---------