

平成 26 年 6 月 7 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791424

研究課題名(和文) 血清鉄調節を利用したがん微小環境制御による画期的な分子標的治療の効果増強法の開発

研究課題名(英文) Iron controlled cancer therapy

研究代表者

大原 利章 (Ohara, Toshiaki)

岡山大学・医学部・客員研究員

研究者番号：40623533

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：鉄は生体にとって必要不可欠な栄養素であり、それは癌にとっても同様である。癌と鉄については以前から研究が行われており、様々な鉄の化合物を動物モデルに投与すると腎癌、悪性中皮腫などの悪性腫瘍が誘発される事が知られている。しかし、逆に鉄を除去(除鉄)する事は動物レベルで腫瘍の増殖抑制が認められた報告はあるが、一般的な治療としては確立されていない。我々は除鉄を行うと癌細胞の増殖が抑制されるが、代償的に血管新生が生じる事を発見した。さらにこの癌の防御機構を逆手に取り、除鉄で誘導した上に血管新生阻害薬を投与すると高い抗腫瘍効果が認められる事を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Iron is an essential element for both normal and cancer cells in humans. Iron overload is known to induce some kinds of cancer, which suggests that prevention of iron overload may become a therapeutic strategy for cancer prevention. However, iron depletion mono-therapy by iron decreased treatment has not been thought to be superior to ordinary chemotherapy and is not part of the standard therapeutic strategy for the treatment of cancer. We revealed that iron depletion inhibited the cancer cell proliferation and reciprocally induced angiogenesis in vitro and in vivo. Treatment to deplete iron levels combined with anti-angiogenic therapy could induce a novel therapeutic effect in the treatment of cancer.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学 消化器外科学

キーワード：癌 血管新生 鉄 分子標的薬

## 1. 研究開始当初の背景

癌間質における血管新生をターゲットにした血管新生阻害薬は、2004年に Bevacizumab が米国で認可されてから結腸癌、直腸癌、非小細胞肺癌など幅広い癌種で投与されている。しかし、全ての投与症例に劇的に効果を認める事はなく、その効果を予測するバイオマーカーも存在しない。申請者らはまず、Beverizumab 投与症例の治療効果を認めた群と認めなかった群における Retrospective 解析を様々なファクターを用いて行い、その結果、治療前血清 Hb 値が低い群に、より Bevacizumab の治療効果が高い事を見出した。そして、この機序を低 Hb 値により引き起こされる腫瘍組織の Hypoxia による血管新生誘導とその血管新生誘導を血管新生阻害薬が阻害することによる抗腫瘍効果の結果と推測した。

一方、鉄は生体に必須な元素であり、それは癌細胞にとっても同様である。動物モデルでは以前から鉄化合物を過剰に投与すると発癌が認められる事が知られており、反対に鉄分を除去(除鉄)すると腫瘍の増殖抑制効果が得られることが報告されている。この事から担癌状態で除鉄を行うとある程度の増殖抑制効果に加えて Bevacizumab のの上乗せ効果が加わり、強い抗腫瘍効果が得られる可能性があると考えられた。

## 2. 研究の目的

癌に対して除鉄を行う事により腫瘍の増殖、周囲間質への与える影響を明らかにし、血清鉄調整を利用したがん微小環境制御による分子標的薬の効果増強法の開発を目的とする。具体的には *in vitro*, *in vivo* で除鉄状態を食餌(除鉄食)および鉄キレート剤(Deferasirox)でシミュレートし、除鉄状態で増殖、血管新生のシグナルへの影響を明らかにし、さらに Bevacizumab の抗腫瘍効果の上乗せ効果が認められるかの検討を行う。

## 3. 研究の方法

*in vitro* では除鉄状態を鉄キレート剤でシミュレートし、癌細胞株に対する抗腫瘍効果の検討と血管新生機構の解析を行った。具体的には鉄キレート剤である Deferasirox を癌細胞株に対して投与し、増殖抑制効果の評価と血管新生に関与する VEGF や HIF-1 等のシグナルの発現について明らかにした。解析対象とする細胞株は Bevacizumab が保険適応されている非小細胞肺癌の A549、H1299 とした。

*in vivo* では除鉄食餌を3週間投与すると Hb、フェリチン、血清鉄が低下し、マウス体内から鉄分の減少が確認でき、除鉄状態をシミュレートしたマウスモデルを作成した。こ

のマウスに皮下腫瘍(A549  $3 \times 10^6$ /mouse)を作成した。まず除鉄が及ぼす影響についてマウスの血液・臓器を採取して安全性・妥当性についての検討し、皮下腫瘍を回収し、HIF-1、VEGF等の血管新生関連マーカーや腫瘍内の酸素化を評価できる Pimonidazole を用いての評価を行った。シグナルについては通常食群および除鉄食群から3つずつ腫瘍をホモジナイズし、ウエスタンブロット法でシグナルを解析した。さらに Bevacizumab の抗腫瘍効果の上乗せが認められるかについて検討を行った。通常食群、除鉄食群、通常食 + Bevacizumab 投与群、除鉄食 + Bevacizumab 投与群の4群に分け、Bevacizumab は腹腔内投与で5 mg/kgの週2回投与で5週間の投与を行った。

## 4. 研究成果

*in vitro* では鉄キレート剤(Deferasirox)を投与すると A549, H1299 細胞に対して濃度依存的に増殖抑制効果が認められた。細胞内シグナルでは cyclin D1 の発現抑制が認められ、細胞周期を止める事で増殖抑制効果が認められていると考えられた。またウエスタンブロットでは除鉄によりトランスフェリンレセプター1(TFR-1)と HIF-1 の発現増強が認められた。さらに ELISA で培養液中の VEGF 濃度を測定すると鉄キレート剤の濃度依存的に培養液中の VEGF 濃度の上昇が認められた。

*in vivo* では除鉄マウスモデルを用いて皮下腫瘍(A549)を作成すると42日目に除鉄食群は有意に腫瘍の増殖抑制効果が認められた。腫瘍を回収し解析すると除鉄食群はプルシアンブルー染色(鉄染色)で鉄分が無くなり、ki-67を行いKi-67 indexを算出すると細胞増殖が抑制されている事が明らかになった。さらに除鉄食群の腫瘍は低酸素の検出系である Pimonidazole 染色を行うと低酸素化されている事が明らかになり、CD31染色で血管内皮を染色し、Microvessel density(MVD)を算出すると血管新生の増強が認められた。また腫瘍のシグナル解析では *in vitro* と同様にトランスフェリンレセプター1(TFR-1)と HIF-1 の発現増強が認められた。

このことから除鉄状態で血管新生阻害薬を併用すると強い抗腫瘍効果が得られると推察されたため、除鉄状態に血管新生阻害薬(Bevacizumab)を併用する実験を行った。Bevacizumab を併用すると除鉄食餌群では39日目に有意に抗腫瘍効果の増強が認められた。また実験期間中に死亡したマウスは認められなかった。除鉄状態に血管新生阻害薬を併用する治療法はがん微小環境制御による分子標的薬の新規効果増強法として有用と考えられた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Ohara T, Noma K, Urano S, Watanabe S, Nishitani S, Tomono Y, Kimura F, Kagawa S, Shirakawa Y, Fujiwara T.

A novel synergistic effect of iron depletion on antiangiogenic cancer therapy.

Int J Cancer. 2013; 132: 2705-2713

〔学会発表〕(計 11 件)

大原利章

除鉄を応用した新規がん治療法の開発 科学技術振興機構岡山大学新技術説明会 2013年12月17日 東京

浦野真一、大原利章、勝部亮一、渡邊伸一郎、野間和広、友野靖子、田澤 大、能祖一裕、白川靖博、貞森 裕、藤原俊義

鉄欠乏状態は肝細胞癌におけるソラフェニブの感受性を改善しうる 第 72 回日本癌学会学術総会 2013年10月24日 東京

浦野真一、大原利章、勝部亮一、友野靖子、木村文昭、野間和広、白川靖博、藤原俊義

肝臓癌における除鉄併用ソラフェニブ療法の可能性 第 37 回日本鉄バイオサイエンス学会学術集会 2013年9月8日 東京

大原利章、白川靖博、浦野真一、前田直見、勝部亮一、渡邊伸一郎、田辺俊介、野間和広、櫻間教文、藤原俊儀

除鉄効果を利用した新たな消化器癌治療 第 68 回日本消化器外科学会総会 2013年7月17日 宮崎

大原利章

除鉄効果を利用した新規癌治療法 第 12 回国際バイオテクノロジー展 2013年5月9日 東京

大原利章、白川 靖博、浦野 真一、前田 直見、渡邊 伸一郎、田辺 俊介、野間 和広、能祖 一裕、貞森 裕、八木 孝仁、藤原 俊義

血清鉄コントロールを用いた新たな肝細胞癌治療戦略 第 113 回日本外科学会定期学術集会 2013年4月11日 福岡

Shinichi Urano, Toshiaki Ohara, Shinichiro Watanabe, Kazuhiro Noma, Yasuko Tomono, Hiroshi Tazawa, Masafumi Kataoka, Nouse Kazuhiro, Yasuhiro Shirakawa, Toshiyoshi Fujiwara

Iron depletion by deferasirox have a synergistic effect on sorafenib in hepatocellular carcinoma

104th Annual Meeting American Association for Cancer Research 2013年4月10日 Washington, USA

浦野真一、大原利章、渡邊伸一郎、友野靖子、木村文昭、野間和広、白川靖博、藤原俊義  
食道癌における除鉄による浸潤・転移能抑制の可能性

文部科学省科学研究費補助金 がん研究分野の特性等を踏まえた支援活動 平成 24 年度「個体レベルでのがん研究支援活動」ワークショップ 2013年2月7日 滋賀

大原利章、野間和広、浦野真一、前田直見、渡邊伸一郎、田邊俊介、櫻間教文、友野靖子、白川靖博、藤原俊義

血管新生阻害作用を有する抗がん剤の抗腫瘍作用増強剤 岡山大学知恵の見本市 2012年11月2日 岡山

浦野真一、大原利章、前田直見、渡邊伸一郎、田辺俊介、野間和広、友野靖子、白川靖博、木村文昭、藤原俊義

食道癌における除鉄による遊走、浸潤能抑制作用の検討 第 36 回日本鉄バイオサイエンス学会学術集会 2012年9月2日 札幌

Toshiaki Ohara, Kazuhiro Noma, Seishi Nishitani, Shinichiro Watanabe, Yasuko Tomono, Yuuri Hashimoto, Hiroshi Tazawa, Toshiyoshi Fujiwara

Iron chelator contributes to anti-angiogenic therapy via selective induction of VEGF-A 103th Annual Meeting American Association for Cancer Research 2012年4月2日 Chicago, USA

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔ホームページ〕

<http://www.ges-okayama-u.com/index.html>

〔その他〕

本研究成果は以下の通り報道された。

・2012年11月21日 山陽新聞 朝刊 「分子標的薬と鉄分減併用で腫瘍増殖を大幅抑制」

6 . 研究組織

(1)研究代表者

大原 利章 (Toshiaki Ohara)  
岡山大学・医学部・客員研究員  
研究者番号：40623533

(2)研究分担者

(3)連携研究者