

膵癌における Hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α)

蛋白恒常的発現の意義

学位論文内容の要旨

【緒言】

膵癌（その90%は ductal adenocarcinoma）は代表的難治癌の一つであり、現在この癌に対する有効な治療はない。このような難治癌に対する新しい治療アプローチを確立するためには、膵癌の病因／病態に対するより詳細な分子生物学的理解が必要である。

腫瘍細胞が低酸素にさらされると、hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) および HIF-1 β subunit で構成される転写因子 HIF-1 が活性化されることによって、糖輸送蛋白、解糖系酵素、血管拡張因子などの遺伝子の転写が促進され、HIF-1 α は固形腫瘍の生体内増殖において重要な役割を果たしていると考えられている。膵癌特に ductal adenocarcinoma においては、hypovasculture であることが顕著な特徴とされている。それゆえに膵癌細胞は、他の血管新生が豊富な固形腫瘍と比較した時、絶えず厳しい低酸素や低栄養にさらされている。膵癌においては HIF-1 α 蛋白の発現、および血管新生関連遺伝子以外の HIF-1 によって誘導される遺伝子の発現が他の固形腫瘍細胞と異なって調節されている可能性が予想される。

本研究では最初に膵癌細胞株、他の固形腫瘍細胞株における正常酸素分圧下、低酸素分圧下での HIF-1 α mRNA、蛋白発現を検討した。つぎに低酸素および低栄養などストレス下での膵癌細胞株の増殖とアポトーシスを検討した。次に *in vitro*, *in vivo* での膵癌細胞株の増殖、アポトーシスに対する HIF-1 α 遺伝子導入の影響を検討した。

【方法と結果】

1. HIF-1 α mRNA、および蛋白の発現: HIF-1 α mRNA はすべての膵癌細胞株および他の固形癌細胞株において正常酸素分圧下で発現していた。HIF-1 α 蛋白は卵巣癌、肺癌、肝癌、および結腸癌細胞株は低酸素条件でのみ発現していたが、膵癌細胞株では20株中15株(75%)が正常酸素分圧下であっても高いレベルの HIF-1 α 蛋白を発現していた。次に HIF-1 α 蛋白の安定性を検討するために、cycloheximide を加えた条件下で、低酸素から正常酸素分圧へ培養条件を変えた後の HIF-1 α 蛋白発現を検討した。正常酸素分圧下で HIF-1 α 蛋白を発現する細胞では HIF-1 α 蛋白発現が60分以上持続したが、正常酸素分圧下で HIF-1 α 蛋白を発現しない細胞株では20分以下で消失した。

2. 膵癌細胞の apoptosis 抵抗性: 膵癌細胞株の低酸素および／または低 glucose 下での増殖および生存を trypan blue dye exclusion test にて検討した。正常酸素分圧下で HIF-1 α 蛋白を発現する細胞は、HIF-1 α 蛋白を発現しない膵癌細胞とは異なり低酸素下でも増殖した。低 glucose で72時間培養したところ PCI-10 は apoptosis を起したが、PCI-35 および PCI-43 の

細胞は apoptosis に抵抗性を示した. FACS 解析でも同様に, PCI-10 細胞は apoptosis を起したが PCI-35 と PCI-43 細胞は apoptosis に抵抗性を示した. これらの結果により, 低 glucose は低酸素に対しより cytotoxic であることを示した.

3. 低酸素, 低 glucose 下での HIF-1 α 蛋白, Glut1 および aldolase A mRNA の発現: HIF-1 α 蛋白は, PCI-10 細胞においては低酸素と低 glucose 曝露後 4 時間で出現し, 12 時間後には減少した. PCI-35 細胞では, 低酸素と低 glucose 曝露前からすでに HIF-1 α 蛋白を発現しており, 24 時間後まで蛋白レベルは増加し続けた. PCI-35 は PCI-10 に比較して Glut1, および aldolase A mRNA をより高いレベルで発現した. 低酸素および低 glucose 曝露後, Glut1 および aldolase A の mRNA の発現は PCI-35 においては次第に増加した.

4. HIF-1 α 導入株の apoptosis 抵抗性: HIF-1 α 導入株は HIF-1 α 蛋白を強発現した. PCI-10/H2 および PCI-10/H3 細胞は低酸素および低 glucose 下で増殖したが, PCI-10/V2 細胞は低酸素および低 glucose 下で apoptosis を起こした.

5. HIF-1 α 導入株の Glut1 および aldolase A mRNA の発現: vector 導入株では低酸素および低 glucose 曝露後 4 時間後に HIF-1 α 蛋白が出現したが, HIF-1 α 導入株では曝露前から HIF-1 α 蛋白をすでに発現していた. Glut1 および aldolase mRNA の発現は, PCI-10/H2 細胞では低酸素および低 glucose 曝露後に, 漸増した.

6. HIF-1 α 導入株の *In vivo* での増殖: PCI-10/H2 細胞ではヌードマウスに HIF-1 α 導入株を皮下移植すると腫瘍を認めたが, PCI-10/V2 および PCI-10 では腫瘍形成が少なかった.

【考案】

膵癌以外の癌細胞株は低酸素下でのみ HIF-1 α 蛋白を発現したが, 20 株中 15 株(75%)の膵癌細胞株が正常酸素分圧下でも HIF-1 α 蛋白を発現していた. HIF-1 α 蛋白は正常酸素分圧下で ubiquitin/proteasome システムを介して分解され, 正常酸素分圧下の細胞では検出されないと報告されており, 正常酸素分圧下でも HIF-1 α 蛋白を発現している膵癌細胞株においては分解機構の異常が存在する可能性がある. ubiquitin/proteasome システムの膵癌細胞株での欠陥を明らかにするためには HIF-1 α 遺伝子, p53 癌抑制遺伝子, heat shock protein 90 (HSP-90), von Hippel Lindau (VHL) 癌抑制遺伝子および PTEN 遺伝子など正常酸素分圧での HIF-1 α 蛋白分解に関係するすべての遺伝子を検索する必要がある.

膵癌は hypovascular であることが多く, 膵癌細胞は血管新生が豊富な他の固形癌細胞と比較すると, 厳しい低酸素および低栄養にさらされると思われる. 本研究にて低 glucose (血漿の約 1/10 glucose 濃度) は cytotoxic であるが, 低酸素 (動脈血の 1/10 以下の酸素分圧) は cytostatic であり, HIF-1 α の恒常的発現が膵癌細胞の低酸素および低 glucose での増殖および生存を増強することを示した. HIF-1 α 蛋白を恒常的に発現している膵癌細胞株においては, HIF-1 α 蛋白を発現していない膵癌細胞株と比較して, 低酸素に曝露された際の HIF-1 α 蛋白発現が高く, その下流において転写活性化される glucose transporter 遺伝子や解糖系酵素 aldolase A 遺伝子の発現も高かった. つまりこれらの結果は, HIF-1 α 蛋白を恒常的に発現している膵癌細胞株においては低酸素に適応するための道具である嫌気性代謝関連遺伝子を前もって準備状態にすることで低酸素に素早く対処できるが, 恒常的に発現していない細胞株においては嫌気性代謝関連遺伝子の転写が遅れるためにアポトーシスしてしまうことを示唆している. 低 glucose が低酸素に比較してより cytotoxic であったという結果は, 嫌気性代謝の癌増殖における重要性を示すと共に, 膵癌細胞が HIF-1 α 蛋白の恒常的発現を介して解糖系酵素を前もって準備することによって低酸素に適応しているとする本研究の結

論を支持するものと思われる。さらに HIF-1 α 蛋白の恒常的発現は膵癌細胞の *in vitro* 増殖と同様 *in vivo* 増殖においても有利であった。おそらく *In vivo* において膵癌細胞は低酸素や低 glucose にさらされても HIF-1 α 蛋白の恒常的に発現している細胞が、低酸素や低 glucose によって誘導される apoptosis により抵抗性であると思われる。

以上、HIF-1 α 蛋白恒常的発現が膵癌細胞の apoptosis 抵抗性など悪性度を現す因子と重要な関わりを有しており、HIF-1 α の機能を消失させることが膵癌患者の治療に有効である可能性を示唆する結果を得た。

【結語】

HIF-1 α 蛋白を恒常的に発現している膵癌細胞株は 20 株中 15 株(75%)に認められ、低酸素および低栄養によって誘導される増殖抑制や apoptosis に対して抵抗性を獲得していた。多くの膵癌細胞は HIF-1 α 蛋白を恒常的に発現することによって嫌気性代謝機構をあらかじめ用意することが可能となり、急性の低酸素および低栄養に適応できる事が示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 浅 香 正 博
副 査 教 授 加 藤 紘 之
副 査 教 授 細 川 眞 澄 男

学 位 論 文 題 名

膵癌における Hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α)

蛋白恒常的発現の意義

膵癌特に ductal adenocarcinoma においては、hypovasculature であることが顕著な特徴とされている。それゆえに膵癌細胞は、他の血管新生が豊富な固形腫瘍と比較した時、絶えず厳しい低酸素や低栄養にさらされている。膵癌においては HIF-1 α 蛋白の発現、および血管新生関連遺伝子以外の HIF-1 によって誘導される遺伝子の発現が他の固形腫瘍細胞と異なって調節されている可能性が予想される。申請者は膵癌細胞株、他の固形腫瘍細胞株における正常酸素分圧下、低酸素分圧下での HIF-1 α mRNA、蛋白発現を検討した。次に低酸素および低栄養などストレス下での膵癌細胞株の増殖とアポトーシスを検討した。更に *in vitro*、*in vivo* での膵癌細胞株の増殖、アポトーシスに対する HIF-1 α 遺伝子導入の影響を検討した。HIF-1 α mRNA はすべての膵癌細胞株および他の固形癌細胞株において正常酸素分圧下で発現していた。HIF-1 α 蛋白は卵巣癌、肺癌、肝癌および結腸癌細胞株は低酸素条件でのみ発現していたが、膵癌細胞株では 20 株中 15 株(75%)が正常酸素分圧下であっても高いレベルの HIF-1 α 蛋白を発現していた。次に HIF-1 α 蛋白の安定性を検討するために低酸素から正常酸素分圧へ培養条件を変えた後の HIF-1 α 蛋白発現を検討した。正常酸素分圧下で HIF-1 α 蛋白を発現する細胞では HIF-1 α 蛋白発現が 60 分まで持続したが、正常酸素分圧下で HIF-1 α 蛋白を発現しない細胞株では 20 分以内に消失した。膵癌細胞株の低酸素およびまたは低 glucose 下での増殖および生存を trypan blue dye exclusion test と FACS 解析にて検討した。正常酸素分圧下で HIF-1 α 蛋白を発現する細胞は、HIF-1 α 蛋白を発現しない膵癌細胞とは異なり低酸素下でも増殖した。低 glucose で 72 時間培養したところ HIF-1 α 蛋白を恒常的に発現しない膵癌細胞株は apoptosis を起したが、HIF-1 α 蛋白を恒常的に発現する細胞株は apoptosis に抵抗性を示した。HIF-1 α 蛋白を恒常的に発現する細胞株は低酸素と低 glucose 曝露前からすでに HIF-1 α 蛋白を発現しており、24 時間後まで蛋白レベルは増加し続けた。

また HIF-1 α 蛋白を恒常的に発現する細胞株は発現しない細胞株に比較して Glucose transporter の Glut1、および解糖系酵素の aldolase A mRNA をより高いレベルで発現した。HIF-1 α 導入株は HIF-1 α 蛋白を強発現した。HIF-1 α 導入株は低酸素および低 glucose 下で増殖したが、vector 導入株では低酸素および低 glucose 下で apoptosis を起こした。Glut1 および aldolase A mRNA の発現は HIF-1 α 導入株で低酸素および低 glucose 曝露後に、漸増した。ヌードマウスに HIF-1 α 導入株を皮下移植すると腫瘍を認めたが、vector 導入株では腫瘍形成が少なかった。膵癌は hypovascular であることが多く、膵癌細胞は血管新生が豊富な他の固形癌細胞と比較すると、厳しい低酸素および低栄養にさらされると思われる。HIF-1 α 蛋白を恒常的に発現する細胞株は発現しない細胞株に比較して Glut1、および aldolase A mRNA をより高いレベルで発現した事は、嫌気性代謝の癌増殖における重要性を示すと共に、膵癌細胞が HIF-1 α 蛋白の恒常的発現を介してその下流において転写活性化される glucose transporter 遺伝子や解糖系酵素を前もって準備することにより低酸素に適応していると考えられた。

公開発表に際し、副査の加藤教授より、膵癌が hypovasculature である事の妥当性につき申請者の意見が求められた。申請者は血管造影検査や造影 CT 等では膵癌は造影されにくく、血流が乏しいという見解を述べた。また固形癌一般では血管形成がもろく、不十分なため低酸素であるという報告を示した。次いでに副査である細川教授、主査の浅香教授もこの件に触れ論議されたが、膵癌が hypovasculature であるかどうかの結論には至らなかった。また加藤教授は、各 cell line の糖鎖抗原や解糖系の modify 等、おのおの特有の性質の違いによる HIF- α への影響を指摘した。さらに本研究の臨床応用に関して申請者の意見が求められた。申請者は HIF-1 α の活性を低下させることより腫瘍造成を抑制し、癌の治療に有効である可能性を述べた。続いて細川教授より HIF-1 α が分解されない理由を求められた。申請者は、Ubiquitin/proteasome 系による degradation の異常により HIF-1 α の分解が出来ないことによると思われ、これらは p53、VHL、PTEN などにより制御されていると報告されているのでこれらの異常の可能性があると示唆した。続いて会場の守内哲也教授から、ここでは示していない HIF-1 α の研究についての説明を求められた。申請者は低酸素による DNAmicroarray を用いた HIF-1 α の下流遺伝子の検討、癌の薬剤耐性と HIF-1 α の関係について研究を行ったと解答した。最後に浅香教授より膵癌の VEGF の発現と血管が乏しい理由についての質問があった。申請者は、VEGF は発現しているが何らかの血管新生抑制因子が働いている可能性を説明した。また浅香教授は解糖系酵素 aldolase A が膵癌では高率に発現していることを挙げ、膵癌での重要性とその HIF-1 α の関係が興味深いことを示唆した。更に HIF-1 α を用いた治療について将来的な展望を申請者に求めた。申請者は HIF-1 α の dominant negative を現在検討しており、将来は遺伝子治療への応用の可能性を述べた。

本研究は、HIF-1 α 蛋白を恒常的に発現している膵癌細胞株が75%に認められ、HIF-1 α の発現により低酸素および低栄養で誘導される増殖抑制や apoptosis に対して膵癌細胞が抵抗性を獲得することを発見した点で高く評価され、今後 HIF-1 α の機能を消失させることにより膵癌患者の治療効果の向上が期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や所得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。