

## 学位論文題名

Dominant negative HIF-1  $\alpha$  は  
ヒト膵癌細胞株の造腫瘍性を低下させる

## 学位論文内容の要旨

## 【緒言】

膵癌の特徴の一つとして、血管造影などの検査上、腫瘍血管が少なく、むしろ栄養血管が蚕食されて閉塞している場合さえある事が知られている。したがって膵癌細胞は常に血流不足の状態に置かれていると考えられる。低酸素適応応答のマスター遺伝子産物である hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) は HIF-1 $\alpha$  と HIF-1 $\beta$  のヘテロダイマーからなり、低酸素下で HIF-1 $\alpha$  の分解が抑制されて常時つくられている HIF-1 $\beta$  と 2 量体を形成して核移行すると考えられている。核移行した HIF-1 は、glucose transporter や解糖系酵素、血管新生因子などの遺伝子発現を亢進させる。本研究では、dominant negative HIF-1 $\alpha$  (dnHIF-1 $\alpha$ ) 遺伝子を作製し、これを導入した膵癌細胞の増殖能を *in vitro* および *in vivo* で検討した。さらに、*in vivo* における腫瘍組織への glucose uptake を検討し、これに関与する遺伝子発現を検索することにより、膵癌細胞の増殖における HIF-1 $\alpha$  蛋白の役割を解析した。

## 【方法と結果】

1. Dominant negative HIF-1  $\alpha$  導入株の樹立：Dominant negative HIF-1 $\alpha$  (dnHIF-1  $\alpha$ ) 遺伝子は、Halterman M W らの報告に従い作製した。dnHIF-1  $\alpha$  の cDNA を発現ベクター pcDNA3.1 に組み込み、HIF-1  $\alpha$  を恒常的に発現している膵癌細胞株 PCI-43 に導入した。導入クローンのうち dnHIF-1 $\alpha$  発現の確認された 3 クローン dnH3、dnH7 および dnH10 を用いた。同様に空ベクター pcDNA3.1 を導入したクローン (V3) を導入対照クローンとして用いた。
2. dnHIF-1  $\alpha$  導入 PCI43 細胞の増殖能：各細胞株を、低酸素培養チャンバーを用いて 1 %  $O_2$  濃度、グルコース無添加培養液 DMEM に 10 % FBS を添加した培養液にて培養した。低酸素・低グルコースの条件では、3 株すべての dnHIF-1  $\alpha$  導入株の増殖が V3 細胞のそれに比較し、有意に抑制されていた。また、 $5 \times 10^6$  個の細胞を SCID マウスの背部皮下移植後の腫瘍形成を観察すると、親株 PCI43 および V3 は増殖し続けるのに対し、dnH3、dnH7 および dnH10 の増殖は移植後 8-11 日目より抑制され、dnH3、dnH7 は 21 日目までに完全退縮した。
3. dnHIF-1 $\alpha$  導入細胞における低酸素誘導遺伝子の発現低下：Northern blot により検討した glucose transporter-1 (Glut-1) と解糖系酵素 aldolase A の mRNA 発現は、正常酸素分圧下 (N) ではいずれの細胞においても同等あったが、低酸素分圧下 (H) では V3 のそれは N に比べ、約 2 倍に増強されたが、dnH3、dnH7 および dnH10 のそれらは全く増強されなかった。同様

に、RT-PCR で検索した血管新生因子' vascular endothelial growth factor (VEGF) 遺伝子の発現も dnH3, dnH7 および dnH10 おいては低酸素応答による増強が観察されなかった。

4. SCID マウス皮下増殖細胞の Glut-1 蛋白の発現：免疫組織化学染色により観察した SCID マウス増殖腫瘍組織における Glut-1 は、V3 では腫瘍細胞にも陽性であったが、dnH3, dnH7 および dnH10 の腫瘍細胞には陰性であった。これらの所見は、V3 細胞は *in vivo* では Glut-1 蛋白を強く発現するが、dnHIF-1 導入細胞においてはその発現が抑制されることを示している。また、宿主の間質細胞はいずれの腫瘍組織でも Glut-1 陽性であった。このことは観察した腫瘍組織がいずれも低酸素状態になっていることを示唆している。

5. 腫瘍組織における血管内皮細胞の検討：CD31 抗体陽性の血管内皮細胞の頻度は V3 の腫瘍組織に比べ dnH3 腫瘍細胞でも抑制されなかった。

6. SCID マウス皮下増殖腫瘍細胞のグルコース取り込み：アイソトープ標識 2-fluorodeoxyglucose (FDG) を用いて検討した腫瘍組織への glucose uptake は V3 に比べ dnHIF-1 $\alpha$  導入細胞では低下し、dnH3 群では有意差をもって低下した。一方、血液および筋肉、肝臓での FDG の取り込みは各群で有意の差はなかった。

7. dnHIF-1 $\alpha$  導入細胞の低酸素・低グルコース誘導アポトーシス：正常酸素分圧下および低酸素分圧下のみでは各細胞のアポトーシス百分率は 4-5%程度で全く差がなかった。一方、低酸素・低グルコースの条件では V3 のアポトーシスが 8.07%であったのに対し、dnHIF-1 $\alpha$  導入細胞 dnH3, dnH7 および dnH10 ではそれぞれ 24.65%, 26.21%, および 18.02%とアポトーシス百分率が上昇した。3 回の実験において、同様結果が得られ、dnHIF-1 $\alpha$  導入細胞の低酸素・低グルコースにより誘導されるアポトーシスの増強は有意であった。

#### 【考案】

本研究により、HIF-1 $\alpha$ を恒常的に発現している膀胱癌細胞株 PCI43 の SCID マウスにおける造腫瘍性が dnHIF-1 $\alpha$ 遺伝子導入によって抑制された。この造腫瘍性の低下には、HIF-1 によって発現が制御されている Glut-1、嫌気性解糖に関与する aldolase A などが関与していることが、*in vivo* でも Glut-1 の発現が抑制され、腫瘍組織へのグルコース取り込みが抑制されたことから明らかになった。また、*in vivo* の腫瘍組織環境に近づけた低酸素・低グルコースの培養条件下では dnHIF-1 $\alpha$ 導入株のアポトーシスが高頻度にみられたことは、HIF-1 $\alpha$  がこれらの低酸素・低グルコースによって誘導されるアポトーシスを抑制し、*in vivo* での腫瘍細胞の生存を助けていることを示唆した。一方、従来の報告では、HIF-1 の機能を阻害すると血管新生因子の産生が抑制され、血管新生が阻害されると考えられてきたが、HIF-1 の機能低下と血管新生阻害とが少なくとも膀胱癌においては相関しなかった。以上の結果は、HIF-1 の機能を阻害することが膀胱癌治療において有用な武器となることを示唆しており、今後の課題として dnHIF-1 $\alpha$ 導入による遺伝子治療の開発が期待される。

#### 【結語】

HIF-1 $\alpha$ 蛋白を発現している膀胱癌細胞株 PCI43 の造腫瘍性が、dominant negative HIF-1 $\alpha$  導入により抑制されることを示した。また、その機序として、この細胞において亢進している糖代謝の抑制によることを明らかにした。

## 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 玉 木 長 良  
副 査 教 授 加 藤 紘 之  
副 査 教 授 秋 田 弘 俊  
副 査 教 授 細 川 真 澄 男

学 位 論 文 題 名

Dominant negative HIF-1  $\alpha$  は

ヒト膵癌細胞株の造腫瘍性を低下させる

膵癌の特徴の一つとして、血管造影などの検査上、腫瘍血管が少なく、むしろ栄養血管が蚕食されて閉塞している場合さえある事が知られている。したがって、膵癌細胞は常に血流不足の状態に置かれていると考えられる。低酸素適応応答のマスター遺伝子産物であるhypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) はHIF-1 $\alpha$ とHIF-1 $\beta$ のヘテロダイマーからなり、低酸素下でHIF-1 $\alpha$ の分解が抑制されて常時つくられているHIF-1 $\beta$ と2量体を形成して核移行し、glucose transporterや解糖系酵素、血管新生因子などの遺伝子発現を亢進させると考えられている。申請者は、dominant negative HIF-1 $\alpha$ (dnHIF-1 $\alpha$ )遺伝子を作製し、これを導入した膵癌細胞の増殖能をin vitro およびin vivo で検討した。さらに、in vivoにおける腫瘍組織へのglucose uptakeを検討し、これに関与する遺伝子発現を検索することにより、膵癌細胞の増殖におけるHIF-1 $\alpha$ 蛋白の役割を解析した。

dnHIF-1 $\alpha$ 遺伝子をHalterman M Wらの報告に従い作製し、発現ベクターpcDNA3.1に組み込み、HIF-1 $\alpha$ を恒常的に発現して膵癌細胞株PCI-43に導入した。導入クローンのうちdnHIF-1 $\alpha$ 発現の確認された3クローンdnH3, dnH7およびdnH10および空ベクターpcDNA3.1を導入したクローン(V3)を導入対照クローンとして用いた。各細胞株を、低酸素培養チャンバーを用いて1%O<sub>2</sub>濃度、グルコース無添加培養液DMEMに10%FBSを添加した培養液にて培養し、低酸素・低グルコースの条件では、3株すべてのdnHIF-1 $\alpha$ 導入株の増殖がV3細胞のそれに比較し有意に抑制されることを観察した。また、5X10<sup>6</sup>個の細胞をSCIDマウスの背部皮下移植後の腫瘍形成を観察すると、親株PCI43およびV3は増殖し続けるのに対し、dnH3, dnH7およびdnH10の増殖は移植後8-11日目より抑制され、dnH3, dnH7は21日目までに完全退縮した。Northern blotにより検討したglucose transporter-1 (Glut-1)と解糖系酵素aldolase AのmRNA発現は、正常酸素分圧下(N)ではいずれの細胞においても同等あったが、低酸素分圧下(H)ではV3のそれはNに比べ約2倍に増強されたが、dnH3, dnH7およびdnH10のそれらは全く増強されなかった。同様に、RT-PCRで検索した血管新生因子vascular endothelial growth factor

(VEGF) 遺伝子の発現もdnH3、dnH7およびdnH10においては低酸素応答による増強が観察されなかった。SCIDマウス皮下増殖腫瘍組織のGlut-1蛋白を免疫組織化学染色により観察するとV3では腫瘍細胞にも陽性であったが、dnH3,dnH7およびdnH10の腫瘍細胞には陰性であった。一方、宿主の間質細胞はいずれの腫瘍組織でもGlut-1陽性であったから、観察した腫瘍組織がいずれも低酸素状態になっていることが示唆された。しかし、腫瘍組織におけるCD31抗体陽性の血管内皮細胞の頻度はV3に比べdnH3でも減少しなかった。また、アイソトープ標識2-fluorodeoxyglucose (FDG)を用いて検討した腫瘍移植10日目の担癌マウスのglucose uptakeは、血液および筋肉、肝臓では各群で有意の差はなかったが、腫瘍組織ではV3群に比べ、dnHIF-1 $\alpha$ 導入群で低下し、dnH3群では有意差をもって低下した。さらに、in vitroにおいて、低酸素・低グルコース誘導アポトーシス細胞の頻度観察した。その結果、正常酸素分圧下および低酸素分圧下のみでは各細胞のアポトーシス百分率は4-5%程度で全く差がなかったが、低酸素・低グルコース条件ではV3のアポトーシスが8.07%であったのに対し、dnHIF-1 $\alpha$ 導入細胞dnH3,dnH7およびdnH10ではそれぞれ24.65%,26.21%,および18.02%とアポトーシスの頻度が上昇した。3回の実験において同様結果が得られ、dnHIF-1 $\alpha$ 導入細胞の低酸素・低グルコースにより誘導されるアポトーシスの増強は有意であることを確認した。

以上の成績より、申請者は、in vivoの低酸素・低栄養状態にある膵癌細胞株PCI43細胞はHIF-1の転写活性を介し、Glut-1およびaldolase Aなどの遺伝子発現を促し、アポトーシスから逃れ増殖し続けるが、dnHIF-1 $\alpha$ 遺伝子導入によってHIF-1の転写活性が抑制されると、癌細胞へのグルコース取り込み効率が悪くなり、アポトーシスに陥り退縮すると推察した。また、膵癌細胞ではその産生するVEGFが血管新生にほとんど関与していないと考えた。

公開発表にあたり、副査加藤教授より、1)膵癌PCI43以外の細胞株dnHIF-1 $\alpha$ を導入、2) dnHIF-1 $\alpha$ 導入3 clonesでの発現効率の差についての考え、3) VEGFの結果が従来の報告と逆の結果になった理由、4) 血管の豊富な癌でのHIF-1 $\alpha$ の関与を考える上で、血管の豊富な大腸癌を使った経験などについて、副査秋田教授より、1) in vitroでのdnH3導入細胞の増殖が正常酸素分圧でも96時間で落ちていた理由、2) in vitroではVEGFがdnHIF-1 $\alpha$ 導入細胞で抑制されたのにin vivoでは腫瘍血管数が減少しなかったことの説明のために、In vivoではVEGFの免疫組織染色をしたか、3) in vivoでのアポトーシス検討、4) dnHIF-1 $\alpha$ を用いた遺伝子治療と化学療法との併用について、副査細川教授より、1) dnHIF-1 $\alpha$ 遺伝子治療の適応癌のHIF-1 $\alpha$ 発現からみた性格、2)膵癌では腫瘍血管新生にVEGFがあまり関与していない可能性について、主査玉木教授より、1) アポトーシスが低酸素だけでは誘導されないことから低グルコースが重要ではないか、2) 全てのdnHIF-1 $\alpha$ 導入細胞ではGlut-1の発現が抑制された結果とFDG uptake抑制がdnH3のみで有意であった結果との解離の解釈についてなどの多くの質問が出された。申請者はこれらの質問に対して、自らの実験経験および、これまでの学習して知識を駆使して、適格に回答した。

本研究は、dnHIF-1 $\alpha$ 遺伝子を用いて、低酸素条件下でその発現が増強されるHIF-1 $\alpha$ が、癌細胞のin vivo増殖性を、また、in vitroにおいては低酸素・低グルコースの条件下での増殖性を助長していることを、HIF-1によって発現が制御されているGlut-1、

aldolase A、VEGFなどの遺伝子発現の検索も含めて、明らかにした点で高く評価される。本研究の成果は、今後、dnHIF-1 $\alpha$ 遺伝子を用いた癌の遺伝子治療に応用されることが期待される。

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取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。