

学位論文題名

Hypoxia enhances the expression of autocrine motility factor and the motility of human pancreatic cancer cells

(ヒト膵癌細胞における低酸素による
autocrine motility factor 誘導と運動能の亢進)

学位論文内容の要旨

目的

転移は癌死の主要因であり、その原因究明は癌研究における重要な位置を占める。近年、ヒト癌において原発巣の酸素分圧が低い症例では転移率が高く予後不良であることが報告された。これは低酸素に晒されることで、転移関連分子を発現し高転移能を獲得した癌細胞のみが比較的酸素濃度の高い肝・肺などの臓器で増殖できる可能性を示唆するが、その機序は未だ明らかではない。そこで DNA マイクロアレイ法を用い、膵癌細胞株における正常酸素分圧と低酸素分圧における発現遺伝子の違いを検討したところ、解糖系・血管新生系を中心とした遺伝子が検出された。その中の一つである解糖系酵素 phosphoheptose isomerase (PHI) が、代表的な random motility 刺激因子である autocrine motility factor (AMF) と同一であることが最近明らかにされた。解糖系酵素は低酸素で誘導されるため、酸素分圧の低い腫瘍では AMF/PHI 誘導により運動能が亢進し転移の一因となっているのではないかと考えた。本研究の目的は、腫瘍細胞を適度な低酸素状態に暴露することにより AMF/PHI の発現が増強し、運動能が亢進するという仮説を証明することである。また、AMF/PHI の誘導に対する転写因子 hypoxia inducible factor-1 (HIF-1) の関与も検討した。

材料と方法

細胞株：ヒト膵癌細胞株 PCI-6・PCI-10・PCI-19・PCI-43・PCI-66・MiaPaCa・BxPC-3、ヒト大腸癌細胞株 KM-12C、ヒト卵巣癌細胞株 TTOV・TAOV、ヒト小細胞肺癌細胞株 PC-6、ヒト肝芽腫細胞株 Hep-G2 の 12 株を用いた。DNA マイクロアレイ法：PCI-10 をそれぞれ正常酸素下 (21% O₂)・低酸素下 (1% O₂) で 24 時間培養した後 mRNA を抽出し発現遺伝子の違いをスクリーニングした。HIF-1 α 導入株：PCI-10 に HIF-1 α の発現ベクターを導入し PCI-10/H2 と PCI-10/H3 の 2 株を作成した。また、PCI-10 に空ベクターを導入し PCI-10/V2 とした。Dominant-negative HIF-1 α 導入株：PCI-43 に dominant-negative HIF-1 α の発現ベクターを導入し PCI-43/dnH3、PCI-43/dnH7 と PCI-43/dnH10 の 3 株を作成した。また、空ベクター導入株を PCI-43/dnV3 とした。ノーザンブロット法：20mg の total RNA を電気泳動後ナイロン膜にトランスファーし HIF-1 α ・AMF/PHI・AMF/PHI 受容体 (AMFR) のプローブを用いハイブリダイズした。FACS 法：癌細胞をトリプシン処理し、ラット抗ヒト AMFR 抗体を用い AMFR 蛋白の発現を検出した。金コロイド法：金コロイドで coat したカバーガラス上へ培地と PCI-10 を撒布し、正常酸素下 (21% O₂)・低酸素下 (1% O₂) で 24 時間培養した後の random motility を定量した。

結果

ヒト膀胱癌細胞株 PCI-10 における正常酸素下と低酸素下での発現遺伝子の相違を DNA マイクロアレイ法で検討した。AMF/PHI は低酸素下で発現が亢進していた遺伝子の一つである。ノーザンブロット法で確認したところ、この低酸素下における発現亢進は他臓器癌を含め 12 株の全てでみられた。AMFR は全ての癌細胞株で発現していたが、低酸素による発現亢進はみられなかった。

ここで AMF/PHI の発現亢進が転写因子 HIF-1 を介するのではないかという仮説を立て検討した。HIF-1 は細胞が低酸素へ適応する時に中心的役割を果たすとされ、解糖系酵素・血管新生因子・血管拡張因子など様々な遺伝子の転写を促進するとされる。HIF-1 α 導入株では正常酸素下においても AMF/PHI mRNA の高発現が見られたが空ベクター導入株では発現に変化は無かった。Dominant negative HIF-1 α 導入株では低酸素下における AMF/PHI mRNA の発現亢進が抑制され、正常酸素下での発現レベルに留まった。

低酸素による AMF/PHI 発現亢進が癌細胞の運動能を実際に増強していることを確認するため random motility を金コロイド法で検討した。PCI-10 では正常酸素下と比較し低酸素下では 5.1 倍の random motility 亢進がみられた。この random motility 亢進が AMF/PHI の作用によることを確認するために AMF/PHI の特異的阻害剤 6PGA・E4P の 2 種を用い検討した。PCI-10 を低酸素下に置き 6PGA・E4P を加えたところ、両者とも濃度依存性に阻害作用を示し 1000 μ M では正常酸素下の random motility レベルまで抑制した。さらに、random motility 亢進が autocrine 様式により作用していることを示すために PCI-10 を低酸素下で培養したときの conditioned media を正常酸素下の PCI-10 に加えた。conditioned media の段階希釈を行うと濃度依存性に random motility の亢進がみられ、その亢進は 6PGA・E4P を各々 1000 μ M 加えることで完璧に抑制された。

HIF-1 α 導入株の PCI-10/H2 と PCI-10/H3 では、正常酸素下で空ベクター導入株に比較し各々 4.2 倍、3.9 倍の random motility 亢進がみられた。Dominant negative HIF-1 α 導入株では低酸素下における random motility 亢進が抑制された。

考察

酸素分圧の低い腫瘍では遠隔転移の頻度が高いとする報告は数多くある。しかし、低酸素が転移を促進する機序はほとんど解明されていない。本研究では、低酸素下の腫瘍細胞では AMF/PHI の発現が増強しており、これにより運動能が亢進することを明らかにした。また、HIF-1 α 導入株で AMF/PHI の誘導と random motility が亢進し、dominant negative HIF-1 α 導入株では両者が抑制されることより、AMF/PHI は HIF-1 を介した転写調節を受けていると考えられた。

結語

低酸素による AMF/PHI の発現増強は、原発巣によらず全ての癌細胞株でみられた。低酸素下における AMF/PHI 発現と random motility の亢進が dominant negative HIF-1 α 導入株では抑制されたことより、この HIF-1 経路の阻害が転移の予防に有用である可能性が示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 葛 卷 暹

副 査 教 授 守 内 哲 也

副 査 教 授 加 藤 紘 之

学 位 論 文 題 名

Hypoxia enhances the expression of autocrine motility factor and the motility of human pancreatic cancer cells

(ヒト膵癌細胞における低酸素による
autocrine motility factor 誘導と運動能の亢進)

近年、原発巣の酸素分圧が低い腫瘍では遠隔転移の頻度が高いと報告されているが、その機序は未だ明らかではない。本研究の目的は、ある程度の低酸素状態にある腫瘍がどのように高転移能を獲得するかを解明することである。

DNA マイクロアレイ法を用い、膵癌細胞株 PCI-10 における正常酸素分圧 (21% O₂) と低酸素分圧(1% O₂)における発現遺伝子の違いを検討したところ、解糖系・血管新生系を中心とした遺伝子群が検出された。その中の一つとして解糖系酵素 phosphohexose isomerase (PHI)活性を持ち、代表的な random motility 刺激因子 autocrine motility factor (AMF)をコードする遺伝子(AMF/PHI)が検出された。ノーザンブロット法で確認したところ、低酸素下における AMF/PHI mRNA の発現亢進は他臓器癌を含め 12 株の全てでみられた。AMF レセプターは全ての癌細胞株で発現していたが、低酸素による発現亢進はみられなかった。癌細胞株の運動能を金コロイド法で検討したところ、PCI-10 では正常酸素下と比較し低酸素下では 5.1 倍の random motility 亢進がみられた。次に、PCI-10 を低酸素下に置き AMF/PHI の特異的阻害剤 6PGA または E4P を加えたところ、両者とも濃度依存性に阻害作用を示し 1mM では正常酸素下の random motility レベルまで抑制した。よって、低酸素下における random motility 亢進が AMF/PHI の作用であることが確認された。さらに、random motility 亢進が autocrine 様式により作用していることを示すために PCI-10 を低酸素下で培養したときの conditioned media を正常酸素下の PCI-10 に加えた。conditioned media の段階希釈を行うと濃度依存性に random motility の亢進がみられ、その亢進は 6PGA・E4P を各々 1mM 加えることで完全に抑制された。

次に AMF/PHI の発現亢進が転写因子 hypoxia inducible factor-1 (HIF-1)を介するという仮説を立て検討した。HIF-1 は細胞が低酸素へ適応する時に中心的役割を果たすとされ、解糖系酵素・血管新生因子など様々な遺伝子の転写を促進するとされる。HIF-1 遺伝子導入株では正常酸素下においても AMF/PHI mRNA の高発現が見られたが、空ベクター導入株では発現に変化は無かった。Dominant negative HIF-1 遺伝子導入株

では低酸素下における AMF/PHI mRNA の発現亢進が抑制され、正常酸素下での発現レベルに留まった。金コロイド法により運動能を検討したところ、HIF-1 遺伝子 導入株の PCI-10/H2 と PCI-10/H3 では、正常酸素下で空ベクター導入株に比較し各々4.2倍、3.9倍の random motility 亢進がみられた。Dominant negative HIF-1 遺伝子導入株では低酸素下における random motility 亢進が抑制された。

口頭発表において、副査守内哲也教授より AMF の解糖系酵素と運動因子としての作用 domain が違うか、AMF のプロモーター領域に HIF-1 結合部位が存在するか、低酸素において他の運動因子が亢進したかに関して質問があった。つづいて、副査加藤紘之教授より本実験モデルと癌患者における転移機序の解離の有無、臨床応用に向けての具体的な構想についての質問があった。また、主査葛巻より正常細胞における動態、HIF-1 経路における HSP-90 遺伝子発現の検討の有無、血管新生阻害因子による治療が低酸素を惹起し転移を亢進させる可能性があるかについての質問があったが、申請者はおおむね妥当な回答をした。

本研究は、腫瘍細胞を適度な低酸素状態に暴露することにより AMF/PHI 遺伝子の発現と運動能が亢進することを証明し、さらに AMF/PHI 遺伝子は HIF-1 を介した転写調節を受けていることを示唆し、低酸素状態における転移亢進の機序の一つを解明したことで高く評価される。また、Dominant negative HIF-1 遺伝子導入株による random motility の抑制効果により、今後は HIF-1 経路の阻害が転移の阻止に有用であるかの検討が期待される。

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。