

学位論文の要旨

学位の種類	博士	名前	田中 宏樹
学位論文題目			
Hypoxia-independent overexpression of Hypoxia-inducible factor 1α as an early change in mouse hepatocarcinogenesis			
(マウス肝発癌過程の初期変化としての低酸素非依存的な HIF-1 α の発現亢進)			
共著者名			
山本雅大、橋本典和、宮腰昌明、玉川 進、吉江真澄、徳差良彦、横山和典、柳沼裕二、小川勝洋			
Cancer research 66(23); 11263-70, 2006			
研究目的			
<p>生体内で癌細胞が誕生する過程は多段階的であり、細胞増殖や細胞生存に関連する遺伝子の異常が蓄積することによる。マウス実験肝発癌過程では、初期に前癌病変である Foci が生じ、それらが次に Adenoma に進展し、さらに Adenoma を母地にして肝癌が発生する。これらの細胞では発生の初期から正常肝細胞とは異なる特異な遺伝子発現を示しており、それらには増殖サイクル制御因子、増殖因子およびそのレセプターなど様々な癌関連遺伝子が含まれるが、なぜそのような遺伝子発現異常が起こるのかは分かっていない。</p> <p>Hypoxia inducible factor-1 (HIF-1)は低酸素環境下で活性化する核内転写因子で、細胞の生存、増殖、血管新生、糖代謝等に関わる様々の遺伝子の転写を活性化する。HIF-1 はαとβの二つのサブユニットからなり、HIF-1βは恒常的に核内に発現しているのに対し、HIF-1αは常圧酸素下では産生される一方で直ちに分解されるが、低酸素下では HIF-1α分解系が抑制されるために HIF-1αが蓄積し、核内に移行して HIF-1βと結合して転写因子として働く。癌組織内ではしばしば低酸素環境になるために、HIF-1αの発現が亢進して癌細胞の生存、増殖を有利にする遺伝子群が発現すると考えられてきたが、近年 HIF-1αの発現亢進は常圧酸素環境下でも起こり、それは主に増殖因子による PI3K/Akt シグナル伝達経路の活性化に依存していることが報告されている。本研究では、マウス肝発癌過程における HIF-1αの発現、HIF-1α活性化のメカニズム、さらに HIF-1 により転写活性化を受ける遺伝子群について解析</p>			

し、肝発癌過程における HIF-1 α 活性化の意義を検討した。

材料・方法

1) 材料

生後 2 週齢の B6C3F1 マウスにジエチルニトロサミンを一回腹腔投与することによって肝発癌を誘導し、さまざまな時点で肝腫瘍を摘出して材料とした。また、ヒト前癌肝病変については肝針生検材料を使用した。細胞株についてはマウス肝腫瘍より樹立した HCC3 細胞を用い、10% 牛胎児血清、EGF、Insulin、Dexamethasone、Transferrin、抗生剤を含む Williams' E 培地で培養した。さらに、シグナル伝達経路を抑制するために PI3 Kinase 抑制剤 LY294002、EGF レセプター抑制剤 AG1478、IGF-2 レセプター抑制剤 AG1024などを添加した条件で培養し、その影響を検討した。

2) 組織酸素濃度測定

上記の発癌処理マウスをジエチルエーテル麻酔下で開腹し、酸素針電極を直接病変組織に刺入して組織酸素分圧を測定した。また、低酸素マーカーである Pimonidazole をマウスに投与し、免疫組織化学的に低酸素状態を検出した。

3) 免疫組織化学/免疫細胞蛍光染色

抗 HIF-1 α 抗体、抗リン酸化 Akt 抗体を一次抗体として免疫組織化学染色および免疫細胞蛍光染色を行った。

4) ウェスタンブロット法

肝腫瘍及び肝癌細胞から抽出した蛋白を 10% SDS-ポリアクリルアミドゲルにて電気泳動したのち、ニトロセルロース膜にブロットし、抗 HIF-1 α 抗体、抗 VEGF 抗体、抗 IGF-2 抗体、抗 c-met 抗体、抗 Glut-1 抗体、抗 α -tubulin 抗体、抗 Akt 抗体、抗リン酸化 Akt 抗体を一次抗体としてそれぞれの発現を解析した。

5) RT-PCR

培養細胞から RNA を抽出して oligo dT プライマーを用いて逆転写反応を行い、HIF-1 α 、IGF-2、TGF- α 、 β -actin に対する特異的プライマーを用いて RT-PCR を行った。また、SYBR green 法によるリアルタイム RT-PCR を行い、mRNA 発現量を定量した。

6) HIF-1 α ノックダウン

マウス HIF-1 α mRNA に対する siRNA ベクターをマウス肝癌細胞に導入し、ハイグロマイシン処理により導入細胞を選択して HIF-1 α ノックダウンクローンを得た。また、陰性対照として Green fluorescence protein (GFP)に対する siRNA ベクターを導入したクローンを作製した。

7) 細胞増殖活性

培養細胞の増殖は、 2×10^5 個の細胞を 35 mm dish に播種し、2-6 日後にヘモサイトメーターを用い

て細胞数を測定した。移植腫瘍については、 1×10^6 個の細胞を B6C3F1 マウスの背部皮下に移植し、腫瘍径を 14 日間ノギスにより測定し、体積=(単径)² x 長系/2 により腫瘍体積を求めた。

8) 統計学的解析

統計学的解析は Student の *t* 検定を行い、 $P < 0.05$ を有意とした。

結果

1) 肝前癌病変組織での HIF-1 α ならびに HIF-1 標的遺伝子の発現

ウェスタンブロット法による解析では、正常肝組織に比較してマウス Adenoma で HIF-1 α ならびにその標的遺伝子である VEGF、Glut-1、IGF-2、c-met の発現が亢進していた。免疫組織化学染色においても、Adenoma、Hepatocellular carcinoma (HCC)組織で HIF-1 α の発現亢進が認められ、また、マウス初期病変である Foci 及びヒト初期病変である変異肝細胞巣でも HIF-1 α の高発現が確認された。

2) 肝前癌病変組織の酸素分圧

HIF-1 α の発現が低酸素によるものであるか否かを明らかにするために肝病変の組織酸素分圧を酸素針電極により測定した結果、Adenoma、HCC 組織ともに正常肝組織と同等の酸素分圧で低酸素状態は見られなかった。さらに低酸素細胞に取り込まれると蛋白と結合する Pimonidazole を発癌剤処理マウスに投与して Pimonidazole 免疫組織化学により検討した結果、低酸素状態は進行した HCC 組織のごく一部のみでしか検出されなかった。これらのことから、肝病変での HIF-1 α の発現亢進は低酸素に依存するものではないことが明らかになった。

3) PI3K/Akt シグナル伝達経路

次に、HIF-1 α の発現が PI3K/Akt シグナル伝達経路に依存している可能性を検討するために肝病変でのリン酸化 Akt の発現を免疫組織化学染色とウェスタンブロット法により解析した。その結果、いずれの肝病変でも正常肝組織と比較して強い Akt のリン酸化が確認された。さらに、肝癌細胞を無血清で 24 時間培養した後、IGF-2 および EGF で処理したところ、Akt のリン酸化とともに HIF-1 α の発現亢進が認められ、また、この反応は PI3K 抑制剤により抑制された。

4) HIF-1 α ノックダウンの影響

HIF-1 α ノックダウン細胞では親株、あるいは対照ベクター導入細胞株に比較して HIF-1 転写標的遺伝子である VEGF、Glut-1、IGF-2、c-met の発現が低下しており、増殖能も低下していた。また、興味深いことに、HIF-1 α の発現を上流で調節する Akt のリン酸化が低下していた。さらに、ノックダウン細胞をマウス皮下に移植したところ、腫瘍中心部が強く壊死に陥り、腫瘍形成能がほぼ完全に失われた。

5) 増殖因子による HIF-1 α の発現調節

HIF-1 の標的遺伝子には IGF-2 や TGF- α などの増殖因子が含まれるが、これらの増殖因子はマウス

肝発癌過程で活性化することが知られている。したがって、HIF-1 の活性化によりこれらの増殖因子が産生されてオートクラインに働き、それぞれのレセプターを介して PI3K/Akt 経路を活性化することにより HIF-1 α の発現を促進している可能性が考えられる。これらのことを証明するために、肝癌細胞を IGF-2、EGF で処理したところ、濃度依存的に Akt の活性化と HIF-1 α の発現が亢進し、さらに増殖因子に対する中和抗体や IGF-2、EGF レセプター阻害剤を加えることによりこれらの反応が抑制された。

考察

本研究において我々は、1) HIF-1 α と HIF-1 転写標的遺伝子の発現が肝発癌過程の初期から亢進していること、2) HIF-1 α の発現は低酸素によるものではなく、PI3K/Akt シグナル伝達の活性化に依存すること、3) PI3K/Akt シグナル伝達の活性化および HIF-1 α 発現亢進は、HIF-1 転写標的遺伝子である IGF-2、TGF- α などの増殖因子の発現に依存していること、4) HIF-1 α の発現を抑制すると肝癌細胞の増殖能、造腫瘍性が著しく低下することを明らかにした。一般的に、癌の組織環境は低酸素になるために HIF-1 が活性化して細胞増殖、血管新生、糖代謝などに関わる様々な遺伝子の発現が亢進して癌細胞の進展に関わると考えられてきたが、本研究では肝発癌過程のきわめて初期から低酸素非依存的に PI3K/Akt 経路の影響下で HIF-1 α の発現が亢進していることが明らかになった。さらに HIF-1 α の発現により IGF-2、TGF- α などの増殖因子の発現化亢進し、それらが PI3K/Akt 経路の活性化して HIF-1 α の発現を促進するというユニークなオートクライン機構が明らかになった。このオートクライン機構のどのステップが肝発癌におけるイニシャルのイベントであるかについては更なる検討が必要であるが、これらの結果はこれまでに不明な点が多かった肝発癌の分子メカニズムに HIF-1 が深く関わっていることを示すものであり、また肝病変における特異な遺伝子発現のメカニズムの一端を明らかにした。以上より、HIF-1 α 、PI3K/Akt 経路によるオートクライン機構は肝癌治療の有効な標的となることが期待される。

結語

HIF-1 は肝発癌の初期段階から PI3K/Akt 経路の影響下で活性化しており、増殖因子を含むさまざまな遺伝子の転写を活性化することにより肝発癌の進展に重要な働きをしている。

引用文献

Semenza GL. Targeting HIF-1 for cancer therapy. Nat Rev Cancer 2003;3:721-32.

参考文献

1) Honmo S, Ozaki A, Yamamoto M, Hashimoto N, Miyakoshi M, Tanaka H, Yoshie M, Tamakawa S, Tokusashi

- Y, Yaginuma Y, Kasai S, Ogawa K. Low p38 MAPK and JNK activation in cultured hepatocytes of DRH rats; a strain highly resistant to hepatocarcinogenesis. *Mol Carcinog.* 2007 Sep;46(9):758-65.
- 2) Imai K, Yamamoto M, Tanaka H, Hashimoto N, Miyakoshi M, Honmou S, Yoshie M, Tamakawa S, Yaginuma Y, Kasai S, Ogawa K. Low selection of preneoplastic hepatocytes after treatment with the 2-acetylaminofluorene diet-partial hepatectomy regimen in the liver of hepatocarcinogenesis-resistant DRH strain rats. *Oncol Rep.* 2007 Jan;17(1):55-60.
- 3) Tanaka H, Shirkoohi R, Nakagawa K, Qiao H, Fujita H, Okada F, Hamada J, Kuzumaki S, Takimoto M, Kuzumaki N. siRNA gelsolin knockdown induces epithelial-mesenchymal transition with a cadherin switch in human mammary epithelial cells. *Int J Cancer.* 2006 Apr 1;118(7):1680-91.
- 4) Okada F, Kobayashi M, Tanaka H, Kobayashi T, Tazawa H, Iuchi Y, Onuma K, Hosokawa M, Dinauer MC, Hunt NH. The role of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase-derived reactive oxygen species in the acquisition of metastatic ability of tumor cells. *Am J Pathol.* 2006 Jul;169(1):294-302.
- 5) Qiao H, Koya RC, Nakagawa K, Tanaka H, Fujita H, Takimoto M, Kuzumaki N. Inhibition of Alzheimer's amyloid-beta peptide-induced reduction of mitochondrial membrane potential and neurotoxicity by gelsolin. *Neurobiol Aging.* 2005 Jun;26(6):849-55.

学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第 号		
学位の種類	博士 (医学)	氏 名	田 中 宏 樹
<p>審査委員長 高 井 章 ㊟</p> <p>審査委員 高 後 裕 ㊟</p> <p>審査委員 小 川 勝 洋 ㊟</p>			
<p>学 位 論 文 題 目</p> <p style="font-size: 1.2em; margin: 10px 0;">Hypoxia-independent overexpression of hypoxia-inducible factor 1α as an early change in mouse hepatocarcinogenesis</p> <p style="font-size: 0.9em; margin: 10px 0;">「マウス肝発癌過程の初期変化としての低酸素非依存的な HIF-1αの発現亢進」</p>			
<p>生体内での発癌過程は、初期に前癌細胞が出現し、それらに多段階的に癌関連遺伝子変異が蓄積することにより進展すると考えられている。前癌細胞では初期段階から細胞増殖や細胞生存にかかわる遺伝子の発現亢進が見られるが、なぜそのような異常が起こるのかは分かっていない。Hypoxia inducible factor-1 (HIF-1)は低酸素環境下で活性化する核内転写因子で、細胞の生存、増殖、血管新生、糖代謝等に関わる様々な遺伝子の転写を活性化する。HIF-1はαとβのサブユニットからなり、βサブユニットは恒常的に核内に発現しているのに対し、αサブユニットは常圧酸素下では産生される一方で直ちに分解される。しかし、低酸素下ではαサブユニットはその分解系が抑制されるために蓄積して核内に移行し、αサブユニットとβサブユニットとが結合して転写因子として働く。癌組織内ではしばしば低酸素環境になるために、HIF-1が活性化して癌細胞の生存、増殖を有利にする遺伝子群を活性化すると考えられてきたが、近年HIF-1は低酸素とは関係なしに増殖因子シグナル経路に依存して活性化することが報告されている。しかし、HIF-1の活性化が発癌過程のどの段階で起こるのかについては不明である。</p> <p style="text-align: right; margin-top: 10px;">(次ページに続く)</p>			

本学位論文提出者は、マウス肝発癌過程においてHIF-1 α とその転写標的遺伝子が初期段階から高発現していることを見出した。さらに、肝腫瘍性病変について組織内酸素分圧を測定したところ、正常肝組織のそれと変わらなかったことからHIF-1 α の発現亢進は低酸素によらないことが明らかになった。一方、肝腫瘍では活性型Aktが検出され、また肝癌細胞株についてPI3 kinase-Akt経路を抑制するとHIF-1 α の発現低下が見られたことから、HIF-1 α の活性化はPI3k/Akt経路に依存していることが明らかになった。

また、肝癌細胞株においてsiRNAによりHIF-1 α の発現を抑制したところ、標的遺伝子の発現が低下し、マウス皮下に移植すると、腫瘍細胞はネクロシスを起こして消失した。さらに、HIF-1 α ノックダウン肝癌細胞では、HIF-1の転写標的であるTGF- α 、IGF-2のような増殖因子の発現が低下しており、さらにHIF-1 α 発現を上流で促進する活性化型Aktも低下していた。一方、肝癌細胞株をEGFまたはIGF-2で処理したところ、濃度依存的にPI3K-Akt経路が活性化し、それに比例してHIF-1 α およびHIF-1標的遺伝子の発現が亢進した。

これらの結果は、HIF-1 α はその転写標的であるTGF- α 、IGF-2などの増殖因子とPI3k/Akt経路を介してオートクラインループを形成していることを示唆する。すなわち、肝発癌過程において初期からHIF-1がさまざまな遺伝子を活性化することによりその進展に関わっていることを示すものであり、HIF-1は肝発癌の予防及び肝癌治療の重要な分子標的となるものと期待される。

本論文申請者は当該研究領域に関して広く深い知識を有しており、試問審査においても適切な回答が得られた。よって本審査委員会は本論文が学位論文にふさわしいものと判定した。