

Title	腓島腫瘍とhypoxia inducible factor (HIF)腫瘍発生と血管新生阻害下における役割
Author(s)	竹田, 喬亮
Citation	大阪大学, 2011, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/58565">https://hdl.handle.net/11094/58565</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名	たけだ たかあき 竹田 喬亮
博士の専攻分野の名称	博士(薬学)
学位記番号	第 24527号
学位授与年月日	平成23年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 薬学研究科生命情報環境科学専攻
学位論文名	膵島腫瘍とhypoxia inducible factor (HIF)腫瘍発生と血管新生阻害下における役割
論文審査委員	(主査) 教授 西澤 恭子 (副査) 教授 八木 清仁 教授 那須 正夫 教授 土井 健史

## 論文内容の要旨

腫瘍はがん細胞だけでなく、様々な細胞が集合して腫瘍内部の環境を形成している。腫瘍の内部環境は特殊で、正常組織には存在しない環境であるため、腫瘍の内部環境を標的にした治療法を探索する研究は魅力的な分野である。腫瘍内部の特徴的な環境要素のひとつとして、血管から酸素や栄養を得ることが出来ない領域、すなわち低酸素領域が知られている。がん細胞は低酸素環境に適応するために、様々な分子応答をする。中でも重要な因子は転写因子Hypoxia inducible factor (HIF) である。がんの治療、特に低酸素領域を標的とした治療にHIF阻害は有望な候補として研究されている。しかし、HIFは多くの遺伝子発現を制御し、低酸素下以外でも増殖因子や活性酸素種 (ROS) の刺激によって通常酸素下でも活性化されることから、HIFを標的とした治療方法は予期せぬ結果を招く危険もある。そこで本研究では、正常膵島が腫瘍化し、腫瘍の発生過程が個体間で比較的均一である点で優れている Rip-Tag2 (RipTag)モデルマウスを用い、HIF阻害による様々な影響について解析した。

まず、HIFを阻害することで生じる影響について検証した。HIFの下流には多くの遺伝子が存在するため、HIFを阻害すると代謝経路など様々な細胞機能に影響が及ぶ可能性がある。酸素が豊富にある状態では細胞は酸化的リン酸化によりミトコンドリアで酸素を消費し、エネルギーを産生している。一方、酸素が乏しい低酸素下では、HIFはエネルギー産生の場をミトコンドリアから解糖系に移行させる。エネルギー産生の場を移行させることで、酸素欠乏によりミトコンドリアから発生するROSの発生を防いでいる。また、ROSはHIFを分解するために必要な酵素の機能を阻害するので、通常酸素下でもROSによってHIFは安定化する。したがって通常酸素下でもミトコンドリアから過剰なROSが産生される場合、HIFはROSの発生源であるミトコンドリアの活性を抑制することによってROSの発生を軽減している可能性がある。そこで、

自然発がんモデルマウスであるRipTagマウスを用いて腫瘍形成過程におけるROS及びHIFの役割を検証した。RipTagマウスに腓島特異的*Hif*ノックアウトマウス:RipCreHif-1 $\alpha^{flox/flox}$ を交配し、RipTagCreHif-1 $\alpha^{flox/flox}$  (TagHKO) マウスを作製し、腫瘍を解析した。TagHKOでは腫瘍形成が早期に開始していた。また、前がん病変であるTagHKOの腓島ではミトコンドリアの活性化とROS消去酵素の誘導が見られたこと、さらに腫瘍形成はNACの投与 (ROSの消去) により抑制されたことから、RipTag腫瘍の発生段階にROSが関与しており、HIFはROSの発生を抑制することにより、腫瘍抑制的に作用していることが示唆された。

次に血管新生阻害下におけるHIFの役割について検証した。血管新生は、腫瘍内部において血管の乏しい領域に新しく血管を誘導し、血管網を構築する現象であり、主にvascular endothelial growth factor (VEGF) によって促進される。現在用いられている血管新生阻害剤はこのVEGFの作用を阻害する薬剤である。血管新生の誘導が阻害されると、腫瘍内血管網が構築できず腫瘍は血管から酸素や栄養が得られなくなる。その結果、腫瘍の増大が抑制されたり、縮小効果が得られたりする。臨床試験では生存期間中央値や無増悪生存期間の延長が見られ、血管新生阻害剤は既にがんの治療に使用されている。しかし、まだ課題も残っている。その理由として、私たちや他の研究者は血管新生が阻害されるとがん細胞の浸潤能 (細胞間の接着を破壊し、その隙間に入り込む能力) が亢進することを示した。即ち、血管新生阻害剤を用いた治療は、むしろ腫瘍を悪性化するという側面があるということを示した。本研究では、血管新生阻害が浸潤能を誘導する原因として、腫瘍内の低酸素領域の関与に注目した。血管新生阻害の結果、低酸素領域が出現し、この低酸素領域でHIFが安定化し、結果として浸潤能が誘導されている可能性がある。そこで血管新生阻害下での浸潤能の誘導におけるHIFの役割を検証した。また、浸潤能の亢進にはE-cadherin (E-cad) などの接着因子の発現変化が深く関わっている。E-cadは、同一接着因子同士が相互作用して細胞を結合するカルシウム依存性の細胞接着因子であり、この接着因子に関しても検証した。血管新生に必要なvegfを欠損させたマウス:TagCreVegf $^{flox/flox}$  (TagVKO)を、さらにHKOを交配させたマウス:TagCreVegf $^{flox/flox}$ Hif $^{flox/flox}$  (TagDKO)を作製し、野生型 (wild) マウスの三者間で比較、解析した。まず、三者間の細胞増殖と細胞死に注目した。低酸素マーカーであるpimonidazole (pimo) で腫瘍の低酸素領域を描出した。pimo染色陽性部分で、TagVKOの細胞増殖の割合がwildやTagDKOに比べ抑制された。また、pimo染色陰性部分で、TagDKOの細胞死の割合がwildやTagVKOに比べ亢進した。細胞増殖、細胞死の結果から、HIFは低酸素マーカー染色陽性部分では細胞増殖を抑制する機能を、また低酸素マーカー染色陰性部分では細胞死を抑制する機能を有していると考えられる。次に浸潤能を解析した。TagVKOではwildと比べ浸潤能の誘導が見られ、このTagVKOにおける浸潤能の誘導はTagDKOでは抑制された。したがって、血管新生阻害によって誘導される浸潤能にHIFは必須であることが明らかとなった。また、TagVKO腫瘍においては、E-cadの発現が部分的に低下している腫瘍の割合がwild腫瘍に比べ上昇し、TagDKO腫瘍ではその割合がTagVKO腫瘍に比べ低下した。浸潤性を示すE-cadの発現が部分的に低下している腫瘍の割合に注目すると、TagVKO腫瘍ではwild腫瘍に比べ上昇し、TagDKO腫瘍ではTagVKO腫瘍に比べ低下した。浸潤能の誘導と接着因子の発現変化に相関関係

があったことから、HIFによる接着因子の発現変化が浸潤能の誘導に関与していることが示唆された。

以上、まとめるとHIFは腫瘍の発生段階ではがん化のタイミングを遅延し、腫瘍形成後の血管新生阻害下では浸潤能を誘導するということが明らかとなった。

#### 論文審査の結果の要旨

腫瘍はがん細胞だけではなく、様々な細胞が集合して腫瘍内部の環境を形成している。腫瘍内部の特微的な環境要素の一つとして、血管から酸素や栄養を得ることが出来ない低酸素領域が知られている。がん細胞は低酸素環境に適応するために、様々な分子応答をするが、中でも重要な因子は転写因子Hypoxia inducible factor (HIF) である。がんの治療、特に低酸素領域を標的とした治療にHIF阻害は有望な候補として研究されている。しかし、HIFは多くの遺伝子発現を制御し、低酸素下のみならず、増殖因子や活性酸素種 (ROS) の刺激により通常酸素下でも活性化されることから、HIFを標的とした治療手段は予期せぬ結果を招く恐れもある。

本研究は、正常腓島が腫瘍化し腫瘍の発生過程が個体間で比較的均一であるRip-Tag2 (RipTag) モデルマウスを用い、HIF阻害によって生じる様々な影響につき解析したものである。

本研究では、以下の成果が得られた。

1. RipTag腫瘍の発生段階にROSが関与しており、HIFはROSの発生を抑制することにより、腫瘍抑制的に作用していることが示唆される。
2. 血管新生が阻害されるとがん細胞の浸潤能 (細胞間の接着を破壊し、その隙間に入り込む能力) が亢進し、血管新生阻害剤を用いた治療はむしろ腫瘍を悪性化する側面を有するという報告があるが、この血管新生阻害により誘導される浸潤能亢進にHIFは必須である。浸潤能の誘導と接着因子の発現変化に相関関係があったことから、HIFによる接着因子の発現変化が浸潤能の誘導に関与していることが示唆される。

上記の成果から、HIFは腫瘍の発生段階ではがん化のタイミングを遅延し、腫瘍形成後の血管新生阻害下では浸潤能を誘導するということが明らかとなった。HIFをターゲットとした今後の癌治療・予防の試みにおいて、これらの知見は大いに役立つことが期待され、博士 (薬学) の学位授与に値するものと考えられる。