

令和 3 年 6 月 22 日現在

機関番号：14301

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化(B)）

研究期間：2018～2020

課題番号：18KK0241

研究課題名（和文）がん細胞の放射線抵抗性と浸潤を制御する新規遺伝子の作用機序と機能の解析

研究課題名（英文）Mechanism of Action and Function of a novel HIF-1 activator in p53-deficient cancers

研究代表者

原田 浩 (Harada, Hiroshi)

京都大学・生命科学研究科・教授

研究者番号：80362531

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,800,000円

研究成果の概要（和文）：低酸素誘導性因子HIF-1は、がん細胞の治療抵抗性と悪性形質を誘導する機能を持つ。申請者は海外研究協力者との予備研究を通じて、HIF-1を活性化する新規遺伝子を同定し、がん抑制遺伝子p53の機能不全を引き金に、HIF-1を活性化する活性を持ち、がん細胞の悪性形質（特に浸潤能）を誘導する可能性を見出した。また臨床検体を対象にした研究で、HPF4の腫瘍内発現量と患者の生命予後不良が関連することを見出している。このような背景の下、当該新規遺伝子の作用機序の解明、治療標的とする妥当性の検証、及びその活性を阻害する手法の確立を目指し、培養細胞・ショウジョウバエ・マウス・ヒト臨床検体を用いた研究を展開した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって、p53変異型がん細胞が腫瘍組織内の低酸素環境下で悪性形質と治療抵抗性を獲得するメカニズムに迫ること、および当該メカニズムを効率よく抑制するストラテジーを見出すことが出来た。これまで、発がん過程の中でp53に変異が入ることを引き金に腫瘍の悪性度が劇的に増加する機序は不明であったが、本研究によりその一端が解明された学術的意義は大きい。また、ここで得られた知見を基に、p53変異型腫瘍に対する新たな治療法の確立に繋がることが期待されることから、その波及効果も大きい。

研究成果の概要（英文）：Hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) has the function of inducing resistance of cancer cells to conventional therapies, such as chemotherapy and radiotherapy, and malignant phenotypes of cancer cells. Through the collaborative studies between the applicant and overseas researchers, we preliminarily identified a novel gene that activates HIF-1 only in the case of dysfunction of the tumor suppressor gene, p53. In addition, we have found a possibility that the novel gene induces invasiveness of p53-deficient cancer cells. Based on these preliminary findings, we performed extensive research with the aim of elucidating the mechanism of action of the novel gene, validating the usefulness of the novel factor as a therapeutic target, and establishing a rational method for inhibiting the activity of the novel gene.

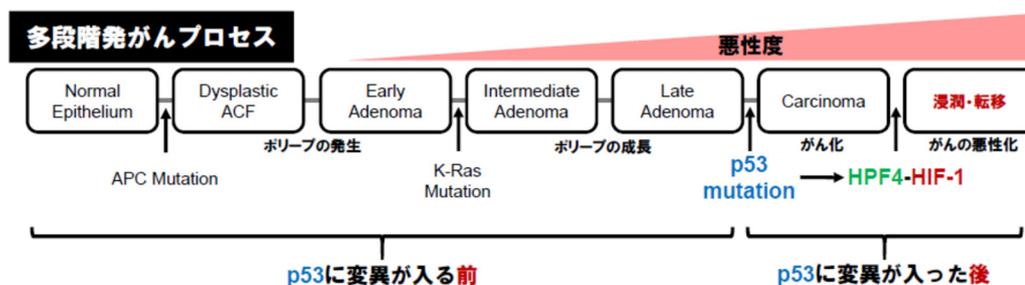
研究分野：がん細胞生物学、低酸素バイオロジー

キーワード：がん 低酸素 浸潤・転移関連遺伝子 治療抵抗性 がん抑制遺伝子 HIF-1 p53

1. 研究開始当初の背景

がんの初期発生において、がん遺伝子やがん抑制遺伝子に段階的に変異が蓄積することが知られている。例えば APC 変異によって良性ポリープが生じ、K-ras 遺伝子の活性化型変異が加わることで腫瘍が成長、さらにがん抑制遺伝子 p53 に機能欠失型変異が生じることで浸潤能の高い悪性がんが生じる(図1)。この様な多段階発がんモデル(Koorstra et al. *Pancreatology*. 2008)が提唱されて久しいが、がん抑制遺伝子 p53 の機能が低下した後に、がんの悪性形質(特に浸潤能)が劇的に誘導されるメカニズムは解明されていない。

図1



がんに対する放射線治療法は、著しく高精度化している。しかしそれでもなお、がんはしばしば再発し、患者の生命を脅かしている。放射線治療後のがんの再発を引き起こす原因として、がん特有の遺伝子変異によって細胞の放射線抵抗性が惹起されていることが挙げられる。例えば、がん抑制遺伝子 p53 に機能喪失型変異が生じた場合、もしくは低酸素誘導性転写因子 HIF-1 が活性化した場合に、がん細胞が放射線抵抗性を獲得することが知られている。しかし、p53 と HIF-1 の間を介在する因子は同定されておらず、またそれ故に両者の間に存在する分子メカニズム的、及び機能的相互作用の実態は全く解明されていなかった。

我々は、腫瘍組織内の低酸素がん細胞を対象に細胞系譜実験を展開し、放射線治療後のがんの再発源が、原発腫瘍内の低酸素領域に存在すること、また同細胞群が再発の過程で HIF-1 依存的に腫瘍血管方向へ浸潤することを報告した (Harada et al. *Nature Commun*. 2012)。しかしながら、低酸素がん細胞の浸潤能を誘導する因子の同定は不十分で、未知の遺伝子ネットワークを解明する必要があった。

本研究に着手するまでに実施した予備的研究を通じて我々は、『HIF-1 を活性化する新規遺伝子 HPF4』の同定に成功し、これが HIF-1 と p53 を繋ぐ介在分子(メディエーター)であることを発見している。具体的には、『p53 によるがん抑制機構の破綻を引き金に、HPF4 が HIF-1 を活性化できるようになり、がん細胞の放射線抵抗性と浸潤能が高まる可能性』を見出していた。この予備的知見は、HPF4 の作用機序と機能を解明することにより、上述の問いに対する回答を得られる可能性を示していた。しかしながら本研究開始時点ではまだ、HPF4・HIF-1・p53 を繋ぐ機能的相互作用の実態は解明できていなかった。また、培養細胞レベル、動物実験レベル、臨床レベルの研究が不十分で、当該遺伝子の機能解析、および当該遺伝子の治療標的としての妥当性の検証が必要であった。

本研究を展開するにあたり、p53 遺伝子や HIF-1 の機能サブユニット HIF-1 α のホモログ *sima* などをサイレンシングした個体が既に準備されているショウジョウバエの利用により、効率良く個体レベルのがん研究を展開できると考え、英国 MRC London Institute of Medical Sciences との国際共同研究を展開した。

2. 研究の目的

- 申請者が独自に同定した新規遺伝子 HPF4 に着目し、その作用機序を解明することを通じて、これまで謎であった“p53 と HIF-1 を繋ぐ分子基盤”を解明する。
- HPF4・HIF-1・p53 を繋ぐ機能的相互作用の実態を解明する。そして、p53 の不活性化と HIF-1 の活性化を引き金とする“がんの悪性進展(特に浸潤能の亢進)”の本質を明らかにする。
- HPF4 治療標的とする妥当性を検証する。

3. 研究の方法

HPF4 の構造遺伝子を系統的に欠失させた変異体を作成し、HIF-1 の活性化に必須の領域の同定、および HIF-1 を活性化するメカニズムの解明を試みた。またボイデンチャンバーを活用して HPF4 ががん細胞の浸潤能に及ぼす影響を *in vitro* で解析した。p53 変異型がん細胞や HIF-1 knock down 細胞を活用することによって、同時に p53 status と HIF-1 依存性を検証した。p53、HIF-1、HPF4 を遺伝子工学的に調節した細胞株を免疫不全マウスに移植することで、HPF4 が腫瘍増殖に及ぼす影響を解析した。

4. 研究の成果

- HPF4 が p53 と HIF-1 を繋ぐ分子基盤の解明：

HPF4 が p53 変異型がん細胞において HIF-1 を活性化する機序を明らかにした。具体的には、HPF4 の機能ドメインを系統的に欠失させた変異体の解析で、① N 末端の α ヘリックス、② BTB-POZ ドメイン、③ Zinc Finger domain 2 (ZF2)、④ ZF3 が、HIF-1 の活性化に必須であることを見出した。また、HPF4 が N 末端の α ヘリックスと BTB-POZ ドメインを介してホモ二量体を形成すること、また当該二量体形成が、HIF-1 α タンパク質の transactivation 活性の亢進に必須であることを明らかにした。以上の結果をもって、「p53 変異型がんにおいて HPF4 のホモ二量体形成を阻害する」という新たな治療コンセプトを提唱することができた。

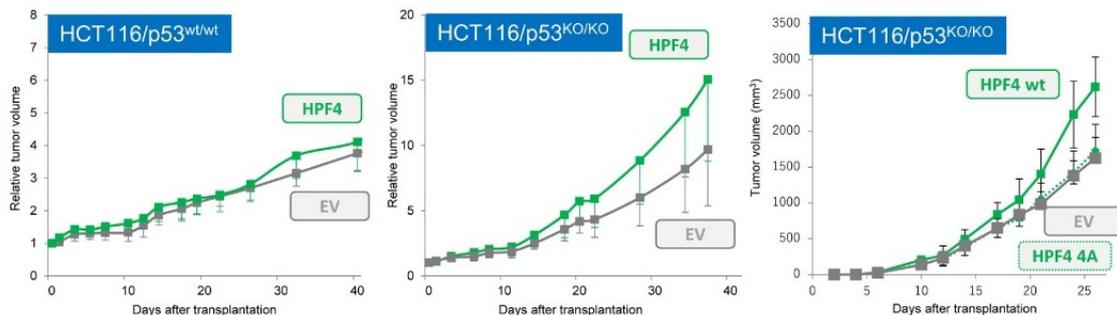
- HPF4・HIF-1・p53 を繋ぐ機能的相互作用の解明 (*in vitro*)

トランスウェル浸潤アッセイによって、HPF4 が p53 変異型がん細胞の転移・浸潤能を HIF-1 依存的に高めることを見出した。また、内在性の HPF4 発現レベルが高い p53 変異型細胞で、HPF4 の発現をノックダウンした場合に、浸潤能が低下することが確認できた。さらに、細胞増殖アッセイによって、HPF4 ががん細胞の増殖を亢進する作用も確認された。以上の結果から、HPF4-HIF-1 経路を阻害することによって、がんの浸潤能を抑制できることを確認し、HPF4 の治療標的としての妥当性が確認された。

- HPF4・HIF-1・p53 を繋ぐ機能的相互作用の解明 (*in vivo*)

HPF4-HIF-1 経路を遺伝子工学的に活性化した腫瘍モデルマウスを確立した。具体的には、HPF4 過剰発現ベクターを、ヒト大腸がん由来細胞株 HCT116 細胞とそれをもとに樹立した p53 ノックアウト細胞 (HCT116 p53^{KO/KO}) のゲノムに安定導入し、これを免疫不全マウスに移植して担癌マウスを作成した。そして、HPF4-HIF-1 経路の活性化によって、p53 変異型腫瘍の増殖が亢進することを明らかにした。N 末端の α ヘリックス内に点変異を導入することでホモ二量体形成能を失った HPF4 (HPF4 4A) は、腫瘍増殖亢進能を持たなかったことから、当該領域を標的とする妥当性が確認された。

図2



P53野生型腫瘍でHPF4を過剰発現しても、腫瘍増殖に変化はなかったが(左)、p53変異型腫瘍においては増殖能が高まった(中)。HPF4 N末端領域のLILL(8-11 a.a.)をAAAAに置換した変異体(ホモ二量体形成能を持たない変異体)を過剰発現した場合には、p53変異型腫瘍の増殖能が高まらなかった(右)。以上の結果からHPF4による腫瘍増殖の亢進に、HPF4のホモ二量体形成が必要であることが確認された。

- HPF4 の腫瘍内発現量とがん患者の生命予後不良との相関解析

ヒト肺がんの臨床検体を対象に、抗 HPF4 抗体を用いて免疫組織化学染色を実施し、染色強度をダブルブラインド法で定量した。その結果、HPF4 の腫瘍内発現量がん患者の生命予後と相関することを確認することができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Roudkenar MH, Fukumoto M, Roushandeh AM, Kuwahra Y, Uroshihara Y, Harada H, Fukumoto M	4. 巻 72
2. 論文標題 Disturbance in the regulation of miR 17-92 cluster on HIF-1- expression contributes to clinically relevant radioresistant cells: an in vitro study	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cytotechnology	6. 最初と最後の頁 141-153
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Li Xuebing, Hattori Akira, Takahashi Senye, Goto Yoko, Harada Hiroshi, Kakeya Hideaki	4. 巻 111
2. 論文標題 Ubiquitin carboxyl terminal hydrolase L1 promotes hypoxia inducible factor 1 dependent tumor cell malignancy in spheroid models	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 239 ~ 252
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.14236	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Koyasu S, Shimizu Y, Morinibu A, Saga T, Nakamoto Y, Togashi K, Harada H	4. 巻 145
2. 論文標題 Increased 14C-acetate accumulation in IDH-mutated human glioblastoma: implications for detecting IDH-mutated glioblastoma with 11C-acetate PET imaging	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Neurooncol	6. 最初と最後の頁 441-447
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nagao Ayako, Kobayashi Minoru, Koyasu Sho, Chow Christalle C. T., Harada Hiroshi	4. 巻 20
2. 論文標題 HIF-1-Dependent Reprogramming of Glucose Metabolic Pathway of Cancer Cells and Its Therapeutic Significance	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 238 ~ 238
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms20020238	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Koyasu Sho, Kobayashi Minoru, Goto Yoko, Hiraoka Masahiro, Harada Hiroshi	4. 巻 109
2. 論文標題 Regulatory mechanisms of hypoxia-inducible factor 1 activity: Two decades of knowledge	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 560 ~ 571
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.13483	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Katagiri Tomohiro, Kobayashi Minoru, Yoshimura Michio, Morinibu Akiyo, Itasaka Satoshi, Hiraoka Masahiro, Harada Hiroshi	4. 巻 9
2. 論文標題 HIF-1 maintains a functional relationship between pancreatic cancer cells and stromal fibroblasts by upregulating expression and secretion of Sonic hedgehog	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 10525 ~ 10535
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18632/oncotarget.24156	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Suwa T, Kobayashi M, Nam JM, Harada H	4. 巻
2. 論文標題 Tumor microenvironment and radioresistance	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Experimental & Molecular Medicine	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Shirai Y, Chow CCT, Kambe G, Suwa T, Kobayashi M, Takahashi I, Harada H, Nam JM.	4. 巻
2. 論文標題 An Overview of the Recent Development of Anticancer Agents Targeting the HIF-1 Transcription Factor	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計16件（うち招待講演 16件 / うち国際学会 7件）

1. 発表者名 原田浩
2. 発表標題 低酸素と放射線の関わり.
3. 学会等名 第10回日本放射線腫瘍学会（JASTRO）放射線生物学セミナー（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 原田浩
2. 発表標題 放射線腫瘍学における低酸素バイオロジー.
3. 学会等名 第49回. 京都放射線腫瘍研究会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Harada H
2. 発表標題 A link between activation of HIF-1 and defect in p53 in malignant progression of cancers.
3. 学会等名 International Seminar on Stress Medicine and Precision Healthcare; from Hypoxia and DNA Damage Response to Therapeutic Intervention. National Taiwan University（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 原田浩
2. 発表標題 新規HIF-1活性化因子の発現スクリーニングで明らかになったHIF-1活性制御機構.
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Harada H
2. 発表標題 Radioresistance of hypoxic tumor cells; Lessons from hypoxia and HIF-1 biology.
3. 学会等名 The 3rd isRTB (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 原田浩
2. 発表標題 低酸素・腫瘍生物学研究で迫る癌治療増感.
3. 学会等名 日本放射線腫瘍学会第32回学術大会. 名古屋 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 原田浩
2. 発表標題 放射線治療効果の増強につなげる腫瘍生物学・低酸素生物学研究.
3. 学会等名 第57回日本癌治療学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Harada H
2. 発表標題 Tumor hypoxia; its influences on malignant progression and therapy resistance of cancer cells.
3. 学会等名 Special Seminar in Kobe University Graduate School of Medicine (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Harada H
2. 発表標題 A link between HIF-1 and defect in p53 under hypoxic stress.Core Sumposium 1: Microenvironmental Stress,
3. 学会等名 The 78th Annual Meeting of Japanese Cancer Association (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 原田浩
2. 発表標題 低酸素がん細胞の治療抵抗性と再発を担う能動的休眠制御.
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Harada H
2. 発表標題 Radioresistance of hypoxic tumor cells; Lessons from hypoxia& HIF-1 biology and beyond.
3. 学会等名 The 16th International Congress of RadiationResearch 2019 (ICRR2019) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Harada H
2. 発表標題 Functions of HIF-1 in tumor hypoxia and beyond.
3. 学会等名 Bio-Group Symposium 2018. Taipei. (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 原田浩
2. 発表標題 酸素/HIF-1バイオロジーを基軸とする放射線腫瘍生物学研究
3. 学会等名 第61回日本放射線影響学会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 原田浩
2. 発表標題 腫瘍低酸素に係る基礎研究と臨床応用
3. 学会等名 第31回日本放射線腫瘍学会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Harada H
2. 発表標題 HIF-1 and Tumor Progression.
3. 学会等名 The 24th Conference of International Union of Biochemistry and Molecular Biology. Seoul.（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 原田浩
2. 発表標題 HIF-1 in tumor hypoxia and beyond.
3. 学会等名 第24回国際癌治療増感研究会学術大会.（招待講演）
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

京都大学大学院 生命科学研究科 がん細胞生物学（原田研究室）ホームページ
http://www.rbc.kyoto-u.ac.jp/cancer_biology/
京都大学大学院 生命科学研究科 がん細胞生物学分野ホームページ
http://www.rbc.kyoto-u.ac.jp/cancer_biology/index.html

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	小林 稔 (Kobayashi Minoru) (40644894)	京都大学・生命科学研究科・特定研究員 (14301)	
研究分担者	子安 翔 (Koyasu Sho) (80781913)	京都大学・生命科学研究科・招へい研究員 (14301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------