

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19591863

研究課題名(和文) 低酸素環境による治療抵抗性を克服するための新たな治療標的遺伝子の同定

研究課題名(英文) Selection of new target genes to overcome the therapeutic resistance according to hypoxic condition,

研究代表者

近藤 慶一(KONDO KEIICHI)

横浜市立大学・市民総合医療センター・准教授

研究者番号：80363836

研究成果の概要：

1. 腎癌及び膀胱癌細胞株において Hypoxia Inducible Factor (HIF) 1 α & 2 α それぞれを強制発現または発現抑制させたクローンを作製しました。
2. HIF α を強制発現させると、低酸素環境下でも増殖が抑制されにくい傾向が認められました。
3. それぞれの癌細胞株に対して、酸素濃度依存性に感受性に差が報告されている薬剤（インターフェロン、テラルビシン、マイトマイシン）を作用させてみたところ、HIF α を強制発現させた細胞群に抵抗性が増加する傾向が見られました。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成19年度	2,700,000	810,000	3,510,000
平成20年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・泌尿器科学

キーワード：腫瘍学

1. 研究開始当初の背景

当研究者は日常の医療活動において腎細胞癌を中心とした泌尿器癌の診断と治療を専門としています。腎細胞癌については当時点

では手術以外には確立された治療法はなく、手術不可能な病変を持つ方々の治療で難渋した経験から、腎細胞癌の発生過程の究明とそれに基づく治療法の開発が必須であると

確信しました。

まず腎細胞癌において生じている遺伝子の異常について臨床検体を用いて解析を行いました(Kondo K, et al Int J Cancer, 2001 Jan 15;91(2):219-24.)。様々な遺伝子の解析を行った結果、遺伝性ではないごくありふれた腎細胞癌、その中で大部分を占める淡明細胞型腎癌の発生には von Hippel-Lindau(VHL)腫瘍抑制遺伝子の異常が決定的な役割を果たしていることを明らかにしました (Kondo K, et al Genes Chromosomes Cancer. 2002 May;34(1):58-68. Yao M, Kondo K et al J Natl Cancer Inst. 2002 Oct 16;94(20):1569-75.)。

次に淡明細胞型腎癌の発癌過程の研究を行うにあたっては、VHL 遺伝子産物である pVHL の機能を明らかにし、この蛋白が関与する Pathway を解析することが最も有望であろうと考えました。

様々な機能に関する仮説が提唱される中で、pVHL が低酸素誘導因子 (Hypoxia Inducible factor; HIF) の α サブユニット (HIF α) を分解に導いていることが当研究者の所属研究室を含むいくつかの研究室から報告されました (Ivan M, Kondo K, et al Science. 2001 Apr 20;292(5516):464-8.)。HIF α は細胞が低酸素環境にさらされた際に発現が誘導される転写因子です。HIF は細胞を過酷な環境に適応させるために様々な成長因子や、解糖系酵素群およびエリスロポエチンなどの発現を誘導します。当研究者はこの pVHL-HIF α pathway が淡明細胞型腎癌の発育進展に必須の経路であるとの仮説を立て、腎細胞癌株を用いた実験によりこの仮説を証明しました。(Kondo K, et al Cancer Cell. 2002 Apr;1(3):237-46. Kondo K, et al PLoS Biol. 2003 Dec;1(3))

この研究の過程で解明された事項の一つ

に、pVHL は HIF α のサブタイプ(1 α 、2 α 及び 3 α)の違いを問わず分解誘導するのに対し、実際に淡明細胞型腎癌の増殖進展に影響を及ぼしうるのはそのうちの HIF2 α のみであるという事実が有りました。

このように腫瘍の増殖進展に大きな影響を及ぼす HIF α ですが、ではそのものが腫瘍治療の標的となりうるものでしょうか? 確かに HIF α は腎癌のみならず多くの泌尿器科悪性腫瘍において発現の亢進が見られるとともに、その発現が治療抵抗性と相関し、予後とは逆相関することが報告されています。しかし、腫瘍細胞を用いた検討からは HIF α が増殖促進や治療抵抗性の獲得に働くという報告が数多く見られる一方で、ノックアウトマウスを用いた実験からは反対に腫瘍抑制に働いているとも報告されています。この相反する結果については、HIF α は多岐にわたる遺伝子群の発現をコントロールしているため、腫瘍に対する影響が一定になりにくいということがその一因ではないかと考えられます。これでは HIF α そのものは治療の標的としては不適當と言えます。

当研究者は、様々な泌尿器癌の治療のためには更に選択性の高い標的がそれぞれの発生源地ごとに必要であると考えました。そこでその標的を選択する際の指標として、HIF α のサブタイプを様々な腫瘍細胞株で強制的に発現させたり反対に発現を抑制したりすることで誘導されてくる遺伝子群のスペクトラムの変化を解析しています。そしてサブタイプにより誘導に相違が見られた遺伝子が腫瘍の増殖や治療抵抗性にどのように影響しているのかという検討を進めてきました。

2. 研究の目的

低酸素状態で誘導される転写因子 HIF α は悪性腫瘍の発生進展に重大な影響を及ぼしています。当研究者はこれまでに、この HIF α のサブタイプの違いが腎細胞癌の増殖進展に決定的な差をもたらすことを明らかにしてきました。この研究を押し進めてサブタイプの違いがいかなる遺伝子発現の差を生み出すのかを解析します。そしてどのような変化が泌尿器癌の進展や治療抵抗性に決定的な影響を及ぼしうるのかを検討し、より選択性の高い治療法の開発を目指します。

3. 研究の方法

第1段階ではレトロウイルスを用いて、腎癌株や膀胱癌株、前立腺癌株で HIF1 α と 2 α それぞれの発現調節株を樹立します。第2段階では樹立した細胞株を様々な抗がん剤や放射線で処理し、これらの治療に対する感受性の相違を検討します。

1. HIF α のサブタイプを強制発現/発現抑制させた泌尿器科癌細胞株の樹立：当研究者はレトロウイルスを用いた HIF α のサブタイプに対する強制発現/発現抑制の実験系を確立しております(Kondo K, et al Cancer Cell. 2002 Apr;1(3):237-46. Kondo K, et al PLoS Biol. 2003 Dec;1(3)). このシステムを用いて、腎細胞癌株及び膀胱癌細胞株、前立腺癌細胞株においてそれぞれの HIF α の発現量を変化させた細胞株を樹立します。

2. 各種抗腫瘍治療に対する感受性の測定：樹立した HIF α の発現調整株を用いて、インターフェロンや各種抗がん剤などの実際の治療手段に対する感受性の相違を比較します。具体的には、96穴のマイクロプレート上で各種の細胞株を継代し、インターフェロンや各種抗がん剤の添加を行います。発色により生存細胞数を検出するMTTアッセイや希釈培養によるコロニー形成アッセイを

行い、各治療の効果にどのような差が見られるかを測定します。

4. 研究成果

1. 腎癌細胞株 ACHN 及び UMRC3 において Hypoxia Inducible Factor (HIF) 1 α & 2 α それぞれを強制発現させたクローンと発現抑制させたクローンをレトロウイルスベクターを用いて作製し、低酸素環境下での細胞の増殖の違いを検討しました。HIF α のいずれかを強制発現させると、低酸素環境下でも正常酸素環境下と比較しても増殖が抑制されにくくなりました。

またインターフェロンの感受性に関わる遺伝子の中には低酸素環境でその発現が影響を受けるものがあります。そこで、これら作製した細胞株を用いてインターフェロンによる直接の増殖抑制能を比較してみましたが、HIF1 α と 2 α を強制発現や発現抑制させても、インターフェロンに対する感受性や抵抗性を増強する効果は認められませんでした。

2. また膀胱癌細胞株 T24 を用いて同様に Hypoxia Inducible Factor (HIF) 1 α & 2 α それぞれを強制発現させたクローンと発現抑制させたクローンを作製し、膀胱内注入療法に実際に使用されている THP-ADM や Mitomycin C に対する感受性を比較してみました。その結果、やはりいずれかの HIF α を強制発現させると薬剤抵抗性が増す傾向は見られたものの優位な差にはなりませんでした。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

1. Expression of Aquaporin 1 in Primary Renal Tumors: A Prognostic Indicator for Clear-Cell Renal Cell Carcinoma.

Huang Y, Murakami T, Sano F, Kondo K, Nakaigawa N, Kishida T, Kubota Y, Nagashima Y, Yao M.

Eur Urol. 2008 Oct 14.

2. A three-gene expression signature model to predict clinical outcome of clear cell renal carcinoma.

Yao M, Huang Y, Shioi K, Hattori K, Murakami T, Sano F, Baba M, Kondo K, Nakaigawa N, Kishida T, Nagashima Y, Yamada-Okabe H, Kubota Y.

Int J Cancer. 2008 Sep 1;123(5):1126-32.

3. Identification and characterization of Birt-Hogg-Dubé associated renal carcinoma.

Murakami T, Sano F, Huang Y, Komiya A, Baba M, Osada Y, Nagashima Y, Kondo K, Nakaigawa N, Miura T, Kubota Y, Yao M, Kishida T.

J Pathol. 2007 Apr;211(5):524-31.

[学会発表] (計 件)

1. Kondo K: Effect of binding proteins to Hypoxia-Inducible Factor 1 α & 2 α on growth of renal cell carcinoma. 第 67 回日本癌学会総会, 名古屋, 2008

2. Kondo K: Role of hypoxia-inducible factor-alpha in chemo sensitivity of bladder cancer. 第 66 回日本癌学会総会,

横浜, 2007

3. 近藤 K: 膀胱癌の抗癌剤感受性における Hypoxia-Inducible Factor(HIF) の関与. 第 45 回日本癌治療学会総会, 京都, 2007,

6. 研究組織

(1) 研究代表者

近藤 慶一 (KONDO KEIICHI)

横浜市立大学・市民総合医療センター・准教授

研究者番号: 80363836

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし