

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 29 日現在

機関番号：20101

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K17439

研究課題名(和文)低酸素誘導因子(HIF)-1の新規経路に着目した進行胃癌治療戦略の開発

研究課題名(英文)Developing a novel therapeutic strategy for advanced gastric cancer using the new genetic pathway of HIF-1 alpha.

研究代表者

大須賀 崇裕(Osuga, Takahiro)

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号：40619714

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文):本研究において、低酸素状態での胃癌細胞の培養に成功し、低酸素状態では正常酸素状態に比べ腫瘍細胞数の減少を認めた。胃癌では低酸素におけるRELの役割については、その阻害のみで腫瘍の低酸素への耐性を阻害することはできなかった。これは、RELを阻害することにより、他の遺伝子経路が活性化し、低酸素への耐性を得ている可能性があり、以前の大腸癌を対象とした研究とは異なっており重要な知見であると考えられた。また、組織学的、臨床的検討から、喫煙者に生じる胃癌の特徴が明らかになった。喫煙とHIF-1の関係性についてもやや傾向はみられており、今後前向きな組織解析および患者背景統計解析を予定している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヘリコバクターピロリ除菌時代における胃癌の原因として喫煙が注目されている。肺癌においてタバコ抽出物の暴露によるHIF-1の活性化が示されている。そこで本研究では、喫煙者の胃癌の特徴をHIF-1を通して検討し、HIF-1の下流遺伝子で、大腸癌で発癌と関係する可能性があるRELを標的とした胃癌治療が可能か検討した。その結果、RELの阻害剤のみでは腫瘍細胞の低酸素での耐性を解除することができず、大腸癌と異なった遺伝子機構の存在が示唆された。組織学的な検討では、喫煙者ではややHIF-1活性化が多い傾向であり、これらの知見は今後のHIF-1を標的とした胃癌治療の開発で役立つと考えられた。

研究成果の概要(英文): In this study, we succeeded in culturing gastric cancer cells in a low oxygen state, and found that the number of tumor cells decreased in the low oxygen state compared to the normal oxygen state. Regarding the role of REL in hypoxia in gastric cancer, its inhibition alone could not inhibit the tumor's resistance to hypoxia. This may be due to the activation of other gene pathways by inhibiting REL, resulting in resistance to hypoxia. It was considered to be an important finding because it differs from previous studies on colorectal cancer. In addition, histological and clinical studies have revealed the characteristics of gastric cancer that occurs in smokers. Since there is a slight tendency in the relationship between smoking and HIF-1, we plan to conduct positive histological analysis and patient background statistical analysis in the future.

研究分野：悪性腫瘍

キーワード：胃癌 HIF-1

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ヘリコバクターピロリ (HP) 除菌療法の浸透や、がん検診、内視鏡治療の普及により胃がんの年齢調整死亡率は低下傾向にある。しかし、未だに本邦での胃がんによる死亡者数は男性 2 位、女性 4 位と多い。特に遠隔転移例の 5 年生存率は 20%未満であり、切除不能症例については非常に予後が悪いままである。フッ化ピリミジン、白金製剤に加えて、HER2 抗体や PD-1 抗体の登場により、以前に比べて有意な生存期間の延長は得られているものの、その効果は極めて限局的であるといえる。したがって、作用機序の異なる新しい治療戦略の開発が急務である。また、HP 除菌後胃がんの増加も予想される。喫煙は、現在明らかとなっている HP 除菌後胃がんの危険因子であるが、喫煙による組織低酸素状態に介入する治療法はこれまでにない。低酸素誘導因子 (HIF) は、腫瘍細胞が低酸素環境に適応するために発現する遺伝子である。数百以上の下流遺伝子を制御し、がんの増殖、転移、アポトーシス抵抗性等を促進し、がんの生存や治療抵抗性、患者の予後の悪化をもたらす。固形腫瘍は周辺組織が低酸素環境となるため、胃がんでも HIF の重要性を示唆する報告があるが、現在、その標的薬剤の臨床への応用は十分なされているとは言えない。それは、HIF-1 $\alpha$  が多数の下流遺伝子を制御し、低酸素環境に対して複雑な調整機構を有しているためである。有効な治療薬の開発は HIF-1 の下流遺伝子の中でがんの進行に深く関与している経路を特定することで可能となる。申請者はこれまで大腸がんにおいて、HIF-1 の標的遺伝子 ANKRD37 が NF- $\kappa$ B サブユニットのひとつである REL を発現し、この経路が発がんやがんの増大に関わり、またその遮断薬に抗がん効果があることを見出した。しかし、この HIF-1 $\alpha$ ~ANKRD37~REL 経路の胃がんでの役割はこれまで検討されていない。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、胃がんの発生と進行への低酸素の関与と、それを標的とした新たな抗がん治療の開発を進めていくことを目指す研究であり、以下の方法にて検討することとした。HIF-1 $\alpha$ ~ANKRD37~REL 経路の胃がんにおける役割を解明する。その遮断薬が胃がんにとって作用するのかについて検討する。喫煙者の胃がんでは HIF-1 $\alpha$  の発現が亢進しているかを検討する(詳細は、「3. 研究の方法」の項目に記載)。本研究の学術的独自性は、1 点目は HIF-1 $\alpha$ ~ANKRD37~REL 経路がこれまで胃がんでは検討されなかった点である。REL は NF- $\kappa$ B サブユニットのひとつであるが、これまで NF- $\kappa$ B の研究は RelA を中心になされている。REL に着目した研究は血液腫瘍や一部の固形腫瘍に限られており、胃がんでの検討はほとんどない。また、NF- $\kappa$ B が HIF を制御するとする報告はあるものの、HIF が NF- $\kappa$ B を制御するという報告はこれまでない。2 点目としては、同経路の遮断薬が有効な可能性のある患者群の推定を同時並行的に行うという点であり、HIF-1 $\alpha$  の発現が亢進し有用性が期待できる患者群として喫煙者に着目した点である。

### 3. 研究の方法

#### (1) HIF-1 ~ANKRD37~REL 経路の胃癌発癌、進行における役割の解明

低酸素状態での細胞培養法の確立。

胃癌細胞株を用いて、低酸素条件での培養のため、低酸素培養器具と低酸素ガスを準備し、実際に酸素計を用いて、低酸素環境で培養可能かについて検討を行う。

正常酸素、低酸素条件の HIF-1 の発現をウエスタンブロット法 (WB) で評価を行なう。

#### (2) HIF-1 ~ANKRD37~REL 経路の遮断薬の胃がんへの有効性の検討

胃がん細胞株を低酸素条件で培養し、細胞増殖への影響について検討する。至適な培養時間について検討する。

に REL の阻害剤である IT-901 を加えて、低酸素条件で培養し、細胞増殖を比較する。

#### (3) 喫煙者の胃がんでは HIF-1 の発現が亢進しているか。

喫煙者と非喫煙者の胃がん組織の免疫組織化学的な HIF-1 の比較検討を行なう。

喫煙者と非喫煙者の胃がん組織の免疫組織化学的な CA9 の比較検討を行ない、低酸素によりアポトーシスが発生しているかについて検討する。

喫煙者と非喫煙者の胃がんの臨床的特徴について、連続した臨床データを解析し検討する。

### 4. 研究成果

#### (1) HIF-1 ~ANKRD37~REL 経路の胃癌発癌、進行における役割の解明

低酸素状態での細胞培養法の確立。

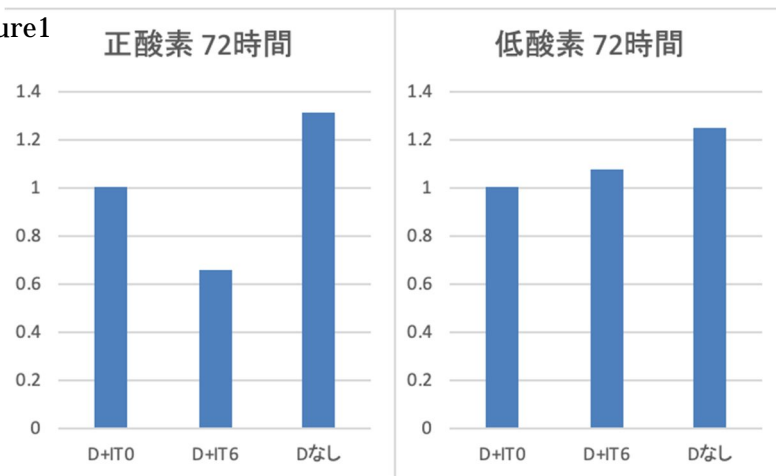
低酸素培養器具と低酸素ガスを準備した。低酸素ガスは、5%CO<sub>2</sub>、1%O<sub>2</sub>、94%N<sub>2</sub> の条件で作成した。実際に酸素濃度計を低酸素培養器具に入れ、低酸素ガスでフラッシュした後、72 時間後の酸素濃度計を確認したところ、酸素濃度は 1.7-1.8%に維持されていた。低酸素環境で培養可能な状況となったと考えられた。

正常酸素、低酸素条件の HIF-1 の発現について WB を行い、確認を行なった。

#### (2) HIF-1 ~ANKRD37~REL 経路の遮断薬の胃がんへの有効性の検討

胃がん細胞株を低酸素で培養し、細胞増殖への影響について検討した。24 時間や 48 時間だと細胞数のばらつきが大きい印象であったが、72 時間だと低酸素による細胞障害が安定して出

Figure1



であった。REL を阻害した場合に他の遺伝子経路が活性化し、低酸素に対応している可能性が考えられた。

(3) 喫煙者の胃がんで HIF-1 の発現が亢進しているか。

喫煙者と非喫煙者の患者背景と組織の比較では、2015年4月1日より2017年12月31日までの当科で診療し、喫煙の有無が把握でき、組織を採取しえた連続した20例（喫煙者8例、非喫煙者12例）で解析を行なった。

喫煙者と非喫煙者の胃がん組織の免疫組織化学的な HIF-1 の比較検討を行なった (Figure2)。有意な差ではなかったが、喫煙者の胃がん組織の方が HIF-1 の発現がやや強くみられる結果であった。(Figure2、腫瘍に占める HIF1 陽性の面積 0~3、強度 0~3 で評価し、その積を HIF-1 の発現強度として検討した。)

CA9 の検討では、今回の組織染色において、切除時の組織検診部分以外に CA9 の発現は、喫煙者、非喫煙者組織双方に認めなかった。

飲酒量については有意差があり、年齢、性別、治療法、他癌の併存、組織型、TNM 因子、再発の有無、HP 感染状況、PFS、OS などについては有意差が認められなかった。喫煙者の胃がんが低酸素に耐性があることを示唆する所見ではなかったが、飲酒量については検討の際に交絡の調整が必要と思われた。

<考察>

本研究において、胃がんでは低酸素における REL の役割については、その阻害のみで腫瘍の低酸素への耐性を阻害することはできなかった。これは、REL を阻害することにより、他の遺伝子経路が活性化し、低酸素への耐性を得ている可能性があり、これは以前の大腸癌を対象とした研究とは異なっており重要な知見であると考えられた。文献的には、肝細胞癌において REL の下流遺伝子(miR-93, miR-199a-5p)が HIF-1 を減少させるとする報告(Jiang Y et al. Oncotarget 2015)があり、癌種によっては REL が低酸素での生存性をむしろ負の方向に調整している可能性がある。すなわちそのような癌種では、REL の阻害により低酸素での癌細胞の生存性を高めることにつながる可能性がある。今後の展開としては、そのような REL の下流遺伝子の阻害剤の併用により腫瘍の増殖が防げるかの検討を予定している。また、喫煙と HIF-1 の明確な関係性は示されなかったが、やや傾向はみられた。今回、喫煙の有無がカルテで把握できない症例が多い傾向があったため、症例数が少ないことが原因と考えられる。また、喫煙者は飲酒者が多いなど交絡の調整が必要であり、多変量解析を行うには症例数が少なかつたことも要因と思われる。従って、今後は前向きに喫煙の有無の問診を十分に取った上での組織解析および患者背景統計解析を予定している。

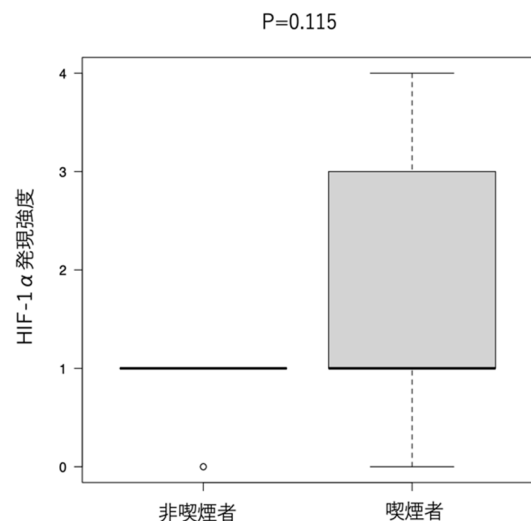
<結語>

胃がんにおける HIF-1 ~ANKRD37~REL 経路については、特に喫煙者でその傾向が示唆されたが、同経路の阻害が低酸素状態のがんの増殖を完全に阻止するものではなかった。REL を阻害することで下流の遺伝子の HIF-1 抑制効果の低下による低酸素への耐性獲得が考えられる。今後は REL の下流遺伝子の阻害剤との併用療法も視野に、本研究で得られた知見を生かし、検討を進めていく予定である。

現したため 72 時間を培養時間と設定した。

胃がん細胞株に REL の阻害剤である IT-901 (溶解のために Dimethyl sulfoxide (DMSO) を使用) を加えて、72 時間低酸素条件で培養し、細胞増殖を比較した (Figure1、D は DMSO、IT0 は IT-901 なし、IT6 は IT901 を 6 μM で培養)。その結果、低酸素で REL が活性化し、生存に寄与するため低酸素で REL 阻害剤を用いれば、REL 阻害剤を用いない培養よりも細胞数が減少することが予想されたが、逆に通常酸素濃度の方で、IT-901 で細胞数が減少し、低酸素の方ではむしろ細胞数が増加する結果

Figure2



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------