

機関番号：12102

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790304

研究課題名 (和文) がん転移巣形成における HIF の機能解析

研究課題名 (英文) A functional analysis of HIF for tumor metastasis

研究代表者

山下 年晴 (YAMASHITA TOSHIHARU)

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・助教

研究者番号：50400677

研究成果の概要 (和文) : HIF-2 α ノックダウンマウスにおいて転移に関与すると推測される VCAM-1 の発現低下が転移標的組織にて認められ, VCAM-1 が HIF-2 α の標的であり転移に関与していることが示唆された. そこで血行性転移モデルを用いて生体における解析を行ったところ肝臓転移巣数が WT マウス (5.0 \pm 1.0 個/field) に比べ HIF-2 α ノックダウンマウス (2.8 \pm 0.76) では約 40%抑制されることが明らかとなった.

研究成果の概要 (英文) : VCAM-1 function was suggested that important for early metastasis foci formation. VCAM-1 expression reduced in HIF-2 α knockdown mice. These results suggested that HIF-2 α participate in metastasis via regulation of VCAM-1 expression. We analyzed by metastasis model in vivo. It number of the liver metastasis foci of HIF-2 α kd was reduced than WT (WT: 5.0 \pm 1.0/field, HIF-2 α kd: 2.8 \pm 0.76/field).

交付決定額

(金額単位: 円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：分子生物学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医科学

キーワード：分子腫瘍学, 低酸素応答転写因子

1. 研究開始当初の背景

心筋梗塞に代表される血管障害による虚血に伴う組織低酸素や, 呼吸器不全における全身性の低酸素症状に対する生体防御応答として赤血球造血, 血管新生, 嫌気性代謝促進等が誘導されるが, これらの生体応答反応は低酸素を感知し活性化される HIF 転写因子によって vascular endothelial growth factor (VEGF), erythropoietin (Epo)等の遺伝子の転写が活性化されることによって引

き起こされる現象である. HIF 遺伝子にはこれまでに 3 種類の遺伝子が発見されており, 全身性に発現の見られる HIF-1 α , 主に血管内皮細胞に発現している HIF-2 α , 低酸素応答遺伝子の転写に対して抑制に働く HIF-3 α とその splicing variant である IPAS (inhibitory PAS protein)が報告されている. この HIF 転写因子は腫瘍の血管新生や腫瘍の増大に大きな影響を与えているとされ, 近年がんと低酸素の研究が大きく躍進してき

た。これまでに HIF とがんとの関連性を解析した物においては解析方法の限界もあって、腫瘍細胞における低酸素応答性に関する物しかなかった。腫瘍血管という宿主の機能を分子レベルで解析する為には宿主の遺伝子を改変する必要がある。そこで我々は HIF-2 α ノックダウンマウスを作製した、このマウスは HIF-2 α 完全遺伝子破壊マウスでは胎生致死を回避し正常に発生させることが出来るマウスであった、このマウスを用いる事により宿主である血管機能を解析するシステムを構築し、宿主血管機能における HIF-2 α の役割を解析してきた。腫瘍血管新生における宿主機能の一部を解明出来たことは大変意義のある物であるが、未解明の部分も多く残されている。特に先の研究で新しい標的遺伝子として接着因子の制御に HIF-2 α が関与している事が発見された。これはがんの転移巣形成においては特に初期にこの接着因子が重要であることから、転移の標的臓器の正常な血管における HIF-2 α が転移に関与している事が推測された。これは転移における宿主血管機能を解析する上で大変興味深い。

2. 研究の目的

がんにおいて低酸素応答性は非常に重要であるが、それは必ずしも原発腫瘍でのみの現象ではなく転移巣形成においても低酸素応答は需要である。これまで正常組織である転移先の臓器における宿主血管内皮細胞の機能は不明であった。一方でがんの転移巣が形成される過程において宿主血管細胞とがん細胞の相互作用が重要であることは既によく知られた事実であるが、この時低酸素応答性やそれらに関する知見はほとんど得られていない。ましてや標的組織における宿主正常血管内皮細胞における HIF 転写因子がどのような役割を發揮するのかに関しては全く分かっていなかった。これまでの報告より転移巣形成に関与する接着因子の一つが VCAM-1 であること、肺血管内皮細胞では VCAM-1, HIF-2 α , HIF-3 α が発現しており VCAM-1 が HIF-2 α の標的であることが分かっている。HIF は主に腫瘍血管新生に関与するため腫瘍の増殖に関する研究に関しては多数の報告があるが、転移巣の形成と血管内皮細胞における HIF 機能の関連性について明らかにされていない。前述のように HIF-2 α が VCAM-1 を制御している事から、転移巣形成の初期段階に関与しているとの仮説を立て解析を行った。

これまで転移形成における HIF 因子の機能解析は主として腫瘍細胞の HIF 機能に関する報告であり、転移に重要である宿主血管における機能は解析がなされていなかった。

腫瘍だけでなく宿主の解析を進め相互作用の重要性並びにメカニズムを解明することによって新しい転移抑制治療法の開発へと結びつけることを目的とした。

3. 研究の方法

宿主血管の HIF 機能を解析する為には、腫瘍側の機能解析とは個となり、工夫が必要となる。具体的には宿主の遺伝子を改変する必要がある、我々が所有している HIF-2 α ノックダウンマウスはこの研究にも非常に適したマウスである。HIF-2 α ノックダウンマウスおよび HIF-3 α の遺伝子破壊マウスの血流中に腫瘍細胞を注入し、肺転移モデルを作製し、時期特異的に解析を行い、血管内皮細胞において HIF-2 α の作用している点を解析する。また HIF-3 α は HIF-2 α による転写活性化に対して抑制性に働くとされているが、血管内皮細胞における抑制性制御の重要性に関しても HIF-3 α 遺伝子破壊マウスを用いて解析を行い、標的遺伝子に対する転写を正および負の両方から解析を行い総合的な低酸素応答機構の解明を行った。

また本研究課題においては、これまで明らかにされていない正常組織の血管内皮細胞における HIF が転移巣形成に関与していることを解明するために以下の点において工夫した。1) これまでは腫瘍細胞の低酸素応答性ばかりが注目されていたが、肺血管内皮細胞における HIF の役割を明らかにするために HIF-2 α ノックダウンマウスおよび HIF-3 α ノックダウンマウスを用いたモデルを作製し解析を行い活性化と抑制の総合的な制御機構を解明する。2) 宿主細胞における標的遺伝子を明らかにし、その働きだけでなく制御機構まで明らかにし転移巣形成の分子機構を明らかにしていく。3) 血管内皮細胞を単離および培養する手法を既に確立しており、この技術を応用し標的遺伝子の作用および制御機構を詳細に検証する培養実験系を作製することが可能であり、腫瘍細胞との相互作用と低酸素応答機構の解明を目指した。

4. 研究成果

HIF-2 α が血管内皮細胞において接着因子の発現に関与していることに着目し、転移巣形成の初期段階に大きく関与しているのではないかと推測し、転移巣形成能の解析を行った。

転移臓器の血管内皮細胞における接着因子である VCAM-1 の発現を調べたところ、肺、肝臓、脾臓において HIF-2 α ノックダウンマウスにおいて発現の低下を認めた。そこで血行性転移モデルとして経尾静脈に LLC 細胞を投与したマウスの肝臓への転移を解析した結

果,初期の転移巣の数がWTマウス(5.0 ± 1.0 個/field)に比べHIF-2 α ノックダウンマウス(2.8 ± 0.76 個/field)ではWTマウスに比べて約40%に抑制されることが明らかとなった。

また今回見られた初期転移巣形成の抑制現象が血管内皮細胞において発現するHIF-2 α が起因していることを証明するために,血管内皮細胞のみHIF-2 α 発現量を戻したマウス(HIF-2 α :: TielCre コンパウンドマウス)を用いて検証したところ,転移コロニー数が5.0 ± 1.0 個/fieldと野生型とほぼ同程度まで有意差を持って回復した。このことから宿主臓器における血管内皮細胞のHIF-2 α が転移初期に影響を与えていることが証明された。

しかし今回問題点として,肺転移において有意な差が見られなかったことから,異なる腫瘍細胞を用いた再検証,およびより本来の病態における転移形成に近い原発腫瘍からの血行性転移を実現するモデルを作成中である。またHIF-2 α だけでなく抑制性に働くと推測されているHIF-3 α の遺伝子破壊マウスにおいても同様の解析を実施する予定である。またHIF-2 α /HIF-3 α の転移初期に関与する因子について分子生物学的な解析を進める。HIF-3 α に関しては,今回の解析から血管構造に重要なVEカドヘリンの発現がHIF-3 α 遺伝子破壊マウスにおいて増加していたことから影響があることが強く示唆される結果を得ており,新たにHIF-2 α だけでなくHIF-3 α による標的遺伝子の制御並びにその生理機能をあわせて総合的に解析を進めていくことが今後の課題である。

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 Tu TC, Kimura K, Nagano M, Yamashita T, Ohneda K, Sugimori H, Sato F, Sakakibara Y, Hamada H, Yoshikawa H, Son HN, Ohneda O. Identification of human placenta-derived mesenchymal stem cells involved in re-endothelialization. J Cell Physiol. Jan 226(1), 224-235, 2011. 査読有

② Takano S, Yamashita T, Ohneda O. Molecular therapeutic targets for glioma angiogenesis. J Oncol. 35, 1908-1918, 2010. 査読有

③ Nagano M, Kimura K, Yamashita T, Ohneda K, Nozawa D, Hamada H, Yoshikawa H, Ochiai

N, Ohneda O. Hypoxia responsive mesenchymal stem cells derived from human umbilical cord blood are effective for bone repair. Stem Cells Dev. Aug 19(8), 1195-1210, 2010. 査読有

[学会発表] (計24件)

① 山下年晴, 小林里美, 坪井一輝, 長野真澄, 大根田修 「血管内皮細胞におけるHIF因子とがん転移との関連性の解析」第8回がんとハイポキシア研究会 2011年1月30日 札幌

② 山下年晴, 小林里美, 坪井一輝, 長野真澄, 大根田修 「腫瘍血管内皮細胞におけるHIF機能解析」第33回日本分子生物学会 2010年12月8日 神戸

③ 小林里美, 山下年晴, 長野真澄, 木村健一, 大根田修 「マウス肺の血管内皮細胞におけるHIF-3 α の機能解析」第33回日本分子生物学会 2010年12月8日 神戸

④ 坪井一輝, 山下年晴, 木村健一, 大根田修 「マウス造血微小環境におけるHIF-2 α の機能解析」第33回日本分子生物学会 2010年12月8日 神戸

⑤ 白石章, 木村健一, 長野真澄, 山下年晴, 板東裕子, 原尚人, 大根田修 「低酸素応答性における乳がん細胞の機能解析」第69回日本癌学会学術総会 2010年9月24日 大阪

⑥ 高野晋吾, 益子良太, 山下年晴, 大根田修, 大須賀覚, 松村明 「CXCR7特異抑制物質による膠芽腫血管新生および増殖の抑制」第69回日本癌学会学術総会 2010年9月22日 大阪

⑦ 長野真澄, 山下年晴, 濱田洋美, 大根田絹子, 木村健一, 吉川裕之, 大根田修 「ヒト血管内皮細胞の虚血改善能におけるHIF-2 α とCXCR4の機能解析」第9回日本再生医療学会 2010年3月18日 広島

⑧ 山下年晴, 長野真澄, 坪井一輝, 大根田修 「がん転移形成におけるHIF-2 α の機能解析」第32回分子生物学会 2009年12月10日 横浜

⑨ 小林里美, 山下年晴, 植田崇史, 中井秀人, 長野真澄, 大根田修 「Hypoxia inducible factor-3 α の機能解析」第32回分子生物学会 2009年12月10日 横浜

⑩ 山下年晴, 長野真澄, 坪井一輝, 大根田

修 「がん転移巣形成における HIF-2alpha
の機能解析」第七回がんとハイポキシア研究
会 2009年12月5日 京都

⑩ 高野晋吾, 山下年晴, 長野真澄, 大須賀
覚, 益子良太, 大根田修 「SDF-1 と CXCR7
はグリオーマの血管新生の重要な標的分子
である」 第 68 回日本癌学会学術総会 2009
年 10 月 1 日 横浜

[その他]

ホームページ等

<http://www.md.tsukuba.ac.jp/stemcell/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山下 年晴 (YAMASHITA TOSHIHARU)

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・

助教

研究者番号 : 50400677