

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K10073

研究課題名(和文) HIF-DEC下流のクリティカル遺伝子を標的としたがん治療分子標的治療法の開発

研究課題名(英文) Exploring molecular targets for anti-cancer therapies targeting critical genes downstream of HIF-DEC axis

研究代表者

谷本 圭司 (Tanimoto, Keiji)

広島大学・原爆放射線医科学研究所・准教授

研究者番号：90335688

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)：本研究では、網羅的遺伝子解析からがん特異的微小環境である低酸素環境下で働く遺伝子群と、遺伝毒性スクリーニングから選出されたがん細胞の生死に直接関わる遺伝子群を掛け合わせて、がん治療の分子標的候補として39遺伝子を選び出した。さらに、ウェブ解析ツールにより、頭頸部がんにおいてその遺伝子の高発現が不良予後と関連することが示された3遺伝子に絞り込んだ。そのうち一つは既知のEGFR遺伝子であったが、PおよびP2(仮称)遺伝子に関しては、論文報告が少なく、特にがんとの関連性については殆ど見当たらないなど、まだまだ注目されていないことが明らかとなり、新規治療標的分子となり得る可能性が高いことが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がん分子標的治療薬は、がん治療を大きく進歩させ、プレシジョン医療が現実のものとなった一方で、治療法が見つかる症例は全体の数～数%といわれており、有効な治療法の見つからない症例に向けた新たな分子標的薬の開発や関連シグナルのさらなる解明が強く望まれている。がん分子標的薬開発への直結を目指し、がん細胞の生死を指標としたスクリーニングとがん特有の微小環境である低酸素シグナル制御遺伝子の情報を掛け合わせて、さらに公共データベースからがんの予後に関係し、文献的に新規であることなどの条件を満たした有力な新規抗がん分子標的候補遺伝子を見出した。新規抗がん分子標的治療法の開発につながると期待された。

研究成果の概要(英文)：In this study, 39 genes were selected as candidate molecular targets for cancer therapy by combining a group of genes that act in hypoxia, a cancer-specific microenvironment, from comprehensive gene expression analyses and a group of genes directly related to cancer cell viability selected from a genotoxicity screen. In addition, web-based analysis tools narrowed down to three genes whose high expression was shown to be associated with a poor prognosis in head and neck cancer. One of these genes was a known EGFR gene, while the functions of P and P2 (tentative name) genes still unclear, especially their association with cancer.

研究分野：分子腫瘍学

キーワード：がん分子標的治療 低酸素 プレシジョンメディスン

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

近年のがん分子標的治療薬開発の成功は、がん治療を大きく進歩させた。がん細胞特異的な作用や劇的な効果により、がん患者の予後改善に大きく寄与してきた。一方、がん細胞で特異的に機能(変化)している分子・遺伝子を標的に作用を示すことから、制御可能な症例は、標的分子に依存しているがん細胞を持つ症例であり、全体の数～十数%に限られることが明らかとなっている。これら、分子・遺伝子の状態(変異や発現変動)を評価することにより、有効症例を選別するプレシジョン医療に大きく貢献する一方で、有効でない症例に向けた新たな分子標的薬の開発も強く望まれている。すなわち、細分化された治療法の確立に向けて、多くのがん細胞増殖機構に対応する分子標的薬の開発が必要とされている。

がんの微小環境の一つとして古くから低酸素環境が知られていたが、1995年に低酸素応答性転写因子 HIF-1 が同定され、その重要性や分子機構が急速に明らかにされてきた。その結果、HIF- $\alpha$  抑制機構を標的として HIF (HIF-1 及び HIF-2) を活性化させ、造血を促進する薬が腎性貧血の治療薬として、臨床に応用されるまでに至った。一方、多くのがん組織において活性化している HIF は、がん治療の分子標的として期待されているが、未だに標的としての有用性が確立されていない。その理由として、HIF の下流シグナルの多様性がある。すなわち、HIF の下流には、がん細胞の増殖、進展を促進するシグナルが多く存在する一方で、ネガティブフィードバックの様に、それらを抑制する機構が存在することが明らかになっている(生理的には HIF シグナルの暴走を制御し、バランスをとる機構として機能していると思われる)。申請者のこれまでの研究でも、がん細胞の増殖促進および抑制の両方に関わる HIF 標的遺伝子を複数見出している。そこで、低酸素環境下でがん細胞増殖に強く関わることを優先して候補遺伝子を探索することが、有効ながん治療の分子標的探索法であるとの仮説を立てた。

### 2. 研究の目的

本申請研究では、がん分子標的薬開発への直結を目指し、がん細胞の生死を指標としたスクリーニングと、がんの特徴的微小環境である低酸素シグナル応答遺伝子の情報を掛け合わせて選ばれた候補遺伝子の有用性を評価することを目的とした。

### 3. 研究の方法

本研究では、RNA-seq 解析から独自に見出したがん特異的微小環境である低酸素環境下で働く転写因子 HIF-1, HIF-2 (EPAS1), DEC1 (BHLHE40) や DEC2 (BHLHE41) の標的遺伝子群と、siRNA ライブラリーを用いたゲノトキシックスクリーニングから選出されたがん細胞の生死に直接関わる遺伝子を、掛け合わせるにより治療法開発へ直結するがん治療の分子標的候補として選出された。

1) *HIF1A*, *EPAS1* (*HIF2A*), *DEC1* (*BHLHE40*), *DEC2* (*BHLHE41*) の siRNA を導入した HeLa 細胞(子宮頸癌)や HSC2 細胞(口腔がん)および KD 細胞(正常口唇線維芽細胞)の RNA シークエンス解析から、低酸素応答遺伝子群、低酸素応答性転写因子の標的遺伝子群、口腔がん細胞にて発現変動している遺伝子群などを同定した。

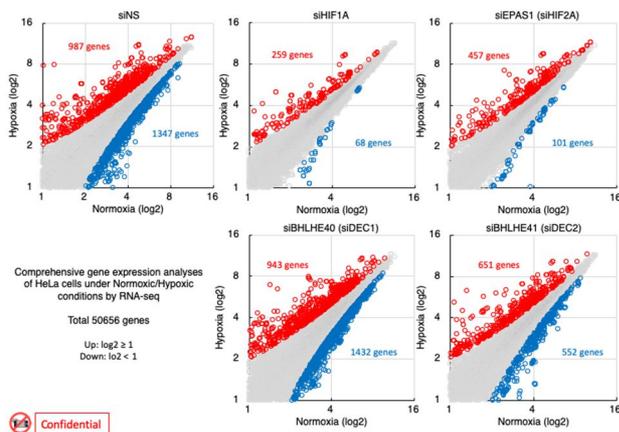
2) ヒトゲノム siRNA ライブラリーを 96 ウェルプレートに分注し HSC2 細胞に導入後、72 時間通常酸素(21% O<sub>2</sub>)または低酸素(1% O<sub>2</sub>)環境下培養する。INCell Analyzer2000 や MTT 法により細胞増殖能を測定し、コントロールに対する相対的増殖(%)が 75%以下に減少する増殖促進遺伝子、200%以上に増加する増殖抑制遺伝子に分類した。siRNA ライブラリーには様々な機

能単位があり, kinase ( 528 遺伝子 ), Ubiquitin/deubiquitin ( 202 ), Oxidoreductase ( 202 ), Nuclear hormone receptor ( 47 ), Chromatin regulator ( 154 ) の計 1133 遺伝子について解析した。

3) 同定された候補遺伝子のごとの関連性について, 公共データベース Kaplan Meier-Plotter を用いて, 予後予測解析をおこなった。また, 新規性および分子機能について Bibliome 解析から推定した。さらに, 公共データベース Drug Gene Budger にて候補遺伝子の活性化または抑制化合物を探索し, 抗腫瘍効果を MTT 法にて評価した。

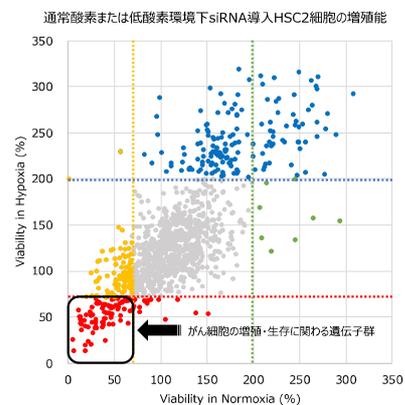
#### 4. 研究成果

1) *HIF1A*, *EPAS1* ( *HIF2A* ), *DEC1* ( *BHLHE40* ), *DEC2* ( *BHLHE41* ) の siRNA を導入した HeLa 細胞の RNA シークエンス解析から, 低酸素応答遺伝子群, 低酸素応答性転写因子の標的遺伝子群を同定した ( 右図 )。さらに, HSC2 細胞および KD 細胞の RNA シークエンス解析からも同様に低酸素応答遺伝子群, 口腔がん細胞特異的に発現変動している遺伝子群などを同定した。

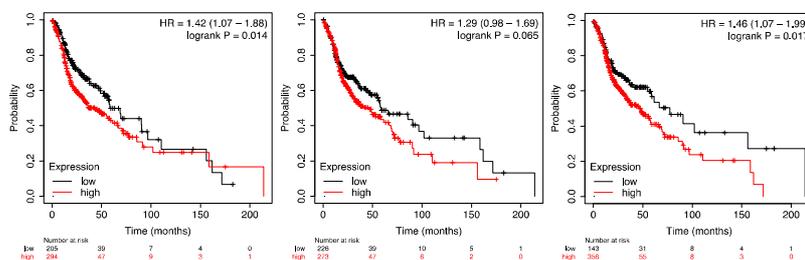


Confidential

2) ヒトゲノム siRNA ライブラリーを用いたゲノトキシックスクリーニングにて, 1133 遺伝子のノックダウン実験により通常酸素環境および低酸素環境下でも細胞増殖抑制した遺伝子群 ( 99 遺伝子 ) を同定した ( 右図 )。さらに, 上記低酸素環境下にて発現変動する 39 遺伝子に絞り込んだ。



3) 生存バイオマーカーの探索と検証を目的に 21 種類の腫瘍から得られた 3 万以上の RNA-seq データで作られたウェブ解析ツール The Kaplan Meier Plotter により, 頭頸部がんにおいてその遺伝子の高発現が不良予後と関連することが示された 3 遺伝子に絞り込んだ ( 下図 )。そのうちのひとつである *EGFR* 遺伝子に関しては, 抗 *EGFR* 薬としてセツキシマブと



パニツムマブが既に開発され, 頭頸部がん治療にも適応されている。一方, *P* ( 仮称 ) 遺伝子および *P2* ( 仮称 ) 遺伝子に関しては, PubMed 検

索にて 14 件と 106 件, それぞれと "Cancer" で検索して 4 件と 29 件と, まだまだ注目されていないこと, がんとの関連性も不明な点が多いことが明らかとなった。*P* 遺伝子は低酸素応答機構の重要分子 HIF プロリン水酸化酵素同様に, 二価鉄とアスコルビン酸を補因子とした 2-オキソグルタル酸オキシゲナーゼであり, 低酸素応答に直接関与してポジティブもしくはネガティブフィードバックループを形成している可能性もある。これら分子機能を明らかにすることは, がんにおける低酸素応答機構の新たな活性化機構の解明につながると共に, 新規抗がん分子標的治療法の開発につながることが期待された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 12件 / うち国際共著 4件 / うちオープンアクセス 12件）

|  |                         |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Kato Yutaka, Fukazawa Takahiro, Tanimoto Keiji, Kanawa Masami, Kojima Masato, Saeki Isamu, Kurihara Sho, Touge Ryo, Hirohashi Nobuyuki, Okada Satoshi, Hiyama Eiso | 4. 巻<br>115             |
| 2. 論文標題<br>Achaete scute family bHLH transcription factor 2 activation promotes hepatoblastoma progression   | 5. 発行年<br>2024年         |
| 3. 雑誌名<br>Cancer Science   | 6. 最初と最後の頁<br>847 ~ 858 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1111/cas.16051  | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>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<br>-               |

|   |                         |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Sakamoto Takako, Tanimoto Keiji, Eguchi Hidetaka, Sasaki Shunta, Tsuboi Kouki, Hayashi Shin-ichi, Ichihara Sahoko                               | 4. 巻<br>30              |
| 2. 論文標題<br>Resveratrol exhibits diverse anti-cancer activities through epigenetic regulation of E-cadherin and p21 in triple-negative breast cancer cells | 5. 発行年<br>2023年         |
| 3. 雑誌名<br>Breast Cancer   | 6. 最初と最後の頁<br>727 ~ 738 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1007/s12282-023-01465-2  | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>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<br>-               |

|   |                         |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Ayuningtyas Nurina Febriyanti, Chea Chanbora, Ando Toshinori, Sanninggar Karina Erda, Tanimoto Keiji, Inubushi Toshihiro, Maishi Nako, Hida Kyoko, Shindoh Masanobu, Miyauchi Mutsumi, Takata Takashi | 4. 巻<br>15              |
| 2. 論文標題<br>Bovine Lactoferrin Suppresses Tumor Angiogenesis through NF- B Pathway Inhibition by Binding to TRAF6  | 5. 発行年<br>2023年         |
| 3. 雑誌名<br>Pharmaceutics   | 6. 最初と最後の頁<br>165 ~ 165 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.3390/pharmaceutics15010165   | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>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<br>該当する            |

|  |                         |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Nakamura Shigeru, Tanimoto Keiji, Bhawal Ujjal K.  | 4. 巻<br>24              |
| 2. 論文標題<br>Ribosomal Stress Couples with the Hypoxia Response in Dec1-Dependent Orthodontic Tooth Movement | 5. 発行年<br>2022年         |
| 3. 雑誌名<br>International Journal of Molecular Sciences  | 6. 最初と最後の頁<br>618 ~ 618 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.3390/ijms24010618   | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>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<br>-               |

|   |                           |
|---|---------------------------|
| 1. 著者名<br>Fukazawa Takahiro, Tanimoto Keiji, Yamaoka Emi, Kojima Masato, Kanawa Masami, Hirohashi Nobuyuki, Hiyama Eiso | 4. 巻<br>14                |
| 2. 論文標題<br>Oncogenic Role of ADAM32 in Hepatoblastoma: A Potential Molecular Target for Therapy                         | 5. 発行年<br>2022年           |
| 3. 雑誌名<br>Cancers   | 6. 最初と最後の頁<br>4732 ~ 4732 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.3390/cancers14194732   | 査読の有無<br>有                |
| オープンアクセス<br>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<br>-                 |

|  |                      |
|--|----------------------|
| 1. 著者名<br>Kosim Maryami Yuliana, Fukazawa Takahiro, Miyauchi Mutsumi, Hirohashi Nobuyuki, Tanimoto Keiji | 4. 巻<br>13           |
| 2. 論文標題<br>p53 status modifies cytotoxic activity of lactoferrin under hypoxic conditions                | 5. 発行年<br>2022年      |
| 3. 雑誌名<br>Frontiers in Pharmacology  | 6. 最初と最後の頁<br>988335 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.3389/fphar.2022.988335  | 査読の有無<br>有           |
| オープンアクセス<br>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<br>-            |

|   |                         |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Shimabukuro Kiiichi, Fukazawa Takahiro, Kanai Akinori, Kawai Hidehiko, Mekata Kengo, Hirohashi Nobuyuki, Kakimoto Naoya, Tanimoto Keiji         | 4. 巻<br>11              |
| 2. 論文標題<br>Low-Dose-Rate Irradiation Suppresses the Expression of Cell Cycle-Related Genes, Resulting in Modification of Sensitivity to Anti-Cancer Drugs | 5. 発行年<br>2022年         |
| 3. 雑誌名<br>Cells   | 6. 最初と最後の頁<br>501 ~ 501 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.3390/cells11030501   | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>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<br>-               |

|   |                         |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Wang Xingzhi, Tewari Nitesh, Sato Fuyuki, Tanimoto Keiji, Thangavelu Lakshmi, Makishima Makoto, Bhawal Ujjal K. | 4. 巻<br>23              |
| 2. 論文標題<br>Biphasic Functions of Sodium Fluoride (NaF) in Soft and in Hard Periodontal Tissues                            | 5. 発行年<br>2022年         |
| 3. 雑誌名<br>International Journal of Molecular Sciences   | 6. 最初と最後の頁<br>962 ~ 962 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.3390/ijms23020962  | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>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<br>該当する            |

|   |                           |
|---|---------------------------|
| 1. 著者名<br>Wang Chen, Zhao Na, Sato Fuyuki, Tanimoto Keiji, Okada Hiroyuki, Liu Yang, Bhawal Ujjal K.  | 4. 巻<br>12                |
| 2. 論文標題<br>The roles of Y-box-binding protein (YB)-1 and C-X-C motif chemokine ligand 14 (CXCL14) in the progression of prostate cancer via extracellular-signal-regulated kinase (ERK) signaling | 5. 発行年<br>2021年           |
| 3. 雑誌名<br>Bioengineered   | 6. 最初と最後の頁<br>9128 ~ 9139 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1080/21655979.2021.1993537   | 査読の有無<br>有                |
| オープンアクセス<br>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<br>該当する              |

|  |                     |
|--|---------------------|
| 1. 著者名<br>Tanimoto Keiji, Hirota Kiichi, Fukazawa Takahiro, Matsuo Yoshiyuki, Nomura Toshihito, Tanuza Nazmul, Hirohashi Nobuyuki, Bono Hidemasa, Sakaguchi Takemasa | 4. 巻<br>11          |
| 2. 論文標題<br>Inhibiting SARS-CoV-2 infection in vitro by suppressing its receptor, angiotensin-converting enzyme 2, via aryl-hydrocarbon receptor signal               | 5. 発行年<br>2021年     |
| 3. 雑誌名<br>Scientific Reports   | 6. 最初と最後の頁<br>16629 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1038/s41598-021-96109-w   | 査読の有無<br>有          |
| オープンアクセス<br>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<br>-           |

|  |                        |
|--|------------------------|
| 1. 著者名<br>Watanabe Takayuki, Oba Takaaki, Tanimoto Keiji, Shibata Tomohiro, Kamijo Shinobu, Ito Ken-ichi                     | 4. 巻<br>16             |
| 2. 論文標題<br>Tamoxifen resistance alters sensitivity to 5-fluorouracil in a subset of estrogen receptor-positive breast cancer | 5. 発行年<br>2021年        |
| 3. 雑誌名<br>PLOS ONE   | 6. 最初と最後の頁<br>e0252822 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1371/journal.pone.0252822   | 査読の有無<br>有             |
| オープンアクセス<br>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<br>-              |

|  |                             |
|--|-----------------------------|
| 1. 著者名<br>Wang Xingzhi, Sato Fuyuki, Tanimoto Keiji, Rajeshwaran Niveda, Thangavelu Lakshmi, Makishima Makoto, Bhawal Ujjal K. | 4. 巻<br>22                  |
| 2. 論文標題<br>The Potential Roles of Dec1 and Dec2 in Periodontal Inflammation  | 5. 発行年<br>2021年             |
| 3. 雑誌名<br>International Journal of Molecular Sciences  | 6. 最初と最後の頁<br>10349 ~ 10349 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.3390/ijms221910349  | 査読の有無<br>有                  |
| オープンアクセス<br>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<br>該当する                |

〔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<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(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 |
|---------|---------|
|---------|---------|