

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 20 日現在

機関番号：82713

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23501280

研究課題名(和文) 環境標的治療法開発のための Sp1 依存性癌細胞新規低酸素応答メカニズムの解明

研究課題名(英文) Analysis of Sp1-dependent adaptation mechanism of cancer cells to hypoxia for tumor microenvironment-targeted therapy

研究代表者

小井詰 史朗 (Koizume, Shiro)

地方独立行政法人神奈川県立病院機構神奈川県立がんセンター(臨床研究所)・その他部局等・その他

研究者番号：60416063

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000 円、(間接経費) 1,050,000 円

研究成果の概要(和文)：近年、低酸素環境等癌を取り巻く微細な環境の重要性が明らかにされ、これを標的とした治療法が開発されているが副作用の問題等克服すべき課題は多い。申請者らは、血液凝固第7因子遺伝子が低酸素環境下で活性化を受け、そのメカニズムこれまでに知られる一般的なメカニズムとは異なり、HIF2タンパク質がSp1タンパク質と作用することにより間接的に遺伝子を活性化する新しいメカニズムであることを見出した。本研究においてこの遺伝子活性化の詳細なメカニズム解明と同じメカニズムで活性化される遺伝子を探索し、その癌における役割を検討した。その結果、ICAM-1タンパク質が卵巣明細胞癌細胞の進展に寄与することを見出した。

研究成果の概要(英文)：Accumulating evidences have suggested that tumor microenvironment is an attractive target of cancer therapy. However, there are few effective strategies to accomplish it. We previously showed that FVII gene is synergistically induced under serum staved hypoxia in ovarian cancer cells. Mechanism of this transcriptional upregulation is associates with HIF2-Sp1 interaction and distinct from that of authentic hypoxia responsive genes such as VEGF. In this study, we investigated detailed mechanism of this novel transcriptional regulation. Genes regulated by similar Sp1 dependent mechanism and their function were further explored by various experiments. We found that ICAM-1 protein is robustly induced by this mechanism and contributes to growth acceleration of ovarian clear cell carcinoma cells.

研究分野：分子生物学

科研費の分科・細目：腫瘍学・腫瘍生物学

キーワード：ハイポキシア 卵巣癌 遺伝子発現

1. 研究開始当初の背景

近年、低酸素等癌の微小環境の重要性が明らかにされ、これを標的とした治療法が開発されているが副作用の問題等克服すべき課題は多い。ゆえに今後さらに詳細な癌の低酸素適応の分子機構の解明とそれに基づく癌組織と正常組織のより明確な差別化が重要になると考えられた。

2. 研究の目的

血液凝固第7因子 (fVII) 遺伝子が低酸素環境下発現誘導を受け、そのメカニズムは転写因子 HIF1 および HIF2 による一般的な転写誘導メカニズムとは異なり、HIF2 が既知の低酸素応答配列 (HRE) 非依存的に転写因子 Sp1 との相互作用を介して間接的にプロモータ領域 DNA に結合し、転写を活性化する新規メカニズムであることを見出した。本計画ではこの転写誘導の詳細なメカニズム解明と同様の機序で発現調節を受ける遺伝子群の網羅的な探索と生物学的意義付け、さらには、この新しい低酸素応答反応の癌治療標的としての有用性を検討する。

3. 研究の方法

主に明細胞型卵巣癌細胞 OVSAYO を用いて HIF2-Sp1 相互作用により誘導される遺伝子群 (以下標的遺伝子) を同定すると共に、そのメカニズムをクロマチン免疫沈降 (ChIP) 法、レポーターアッセイ、RNA 干渉法 (RNAi) などを用い解析した。具体的には cDNA マイクロアレイ解析を行ない低酸素環境下 Sp1 発現に依存して転写誘導される遺伝子群を同定し、解析の対象とした。続いて臨床検体 (外科切除癌組織) を用いて標的遺伝子産物について RT-PCR や免疫組織化学染色等を行ない、本メカニズムの生体内における重要性について検討した。さらに標的遺伝子産物を RNAi などによりノックダウンすることにより癌細胞をアポトーシスに誘導可能かなど治療標的としての有用性について検討した。

4. 研究成果

低酸素環境に暴露された癌細胞中において異所的 fVII 遺伝子発現が従来知られている低酸素誘導性転写因子 HIF1 および HIF2 (HIFs) によるメカニズムとは異なり、HIF2 の転写因子 Sp1 との相互作用が関与するメカニズムにより誘導されることを明らかにした。加えて本転写メカニズムは一般的な転写活性化メカニズムと異なり、ヒストンの脱アセチル化により活性化されること、低酸素に加え、細胞を低血清環境で培養すると遺伝子発現が相乗的に増強される等の特徴を備えた新規メカニズムであることを見出した。また、cDNA マイクロアレイ解析により類似の Sp1 依存性メカニズムで発現誘導を受ける遺伝子群を見出した。これら遺伝子群から選択した複数の遺伝子についてリアルタイム PCR、ウエスタンブロットを行なったところ、これ

ら遺伝子は fVII と同様に細胞が低酸素に加え、低血清環境に同時に暴露されることにより、発現が相乗的に増加する性質があること等を見出した。特に inter cellular adhesion molecule (ICAM1) をコードする ICAM1 遺伝子は、細胞を低酸素と低血清環境が共存する虚血性環境で培養すると高度に相乗的に転写活性化されることが分かった。ICAM1 発現が癌細胞のどのような悪性形質発現に関与するか解析するために、shRNA を安定発現させ、ICAM1 をノックダウンさせた卵巣癌細胞株を樹立した。これらの細胞を用いて細胞の生存能、浸潤能等について in vitro 実験により検討したところ、ICAM1 は虚血性環境における卵巣癌細胞の生存、浸潤性を増強することが明らかとなった。一方、ICAM1 の発現がほとんど検出されない正常酸素環境下ではこのような効果は観察されなかった。さらに、in vivo における ICAM1 の発現、腫瘍増殖における効果を検討するために卵巣癌細胞を NOD-SCID マウスに移植した。その結果、ICAM1 は腫瘍内の低酸素領域において強度に発現し、腫瘍の増殖を著しく増強させることが明らかになった。これらの結果は ICAM1 が卵巣癌の進展に重要な役割を担うことを示唆している。

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 13件)

- 1) Breast cancer phenotypes regulated by tissue factor-factor VII: possible therapeutic targets.
Koizume S, Miyagi Y. *World. J. Clin. Oncol.*, 査読有、in press.
- 2) Annexin A4 is involved in proliferation, chemoresistance and migration and invasion in ovarian clear cell adenocarcinoma cells.
Mogami T, Yokota N, Asai-sato M, Yamada R, Koizume S, Sakuma Y, Yoshihara M, Nakamura Y, Takano Y, Hirahara F, Miyagi Y, and Miyagi E. *PLOS ONE*, 査読有、8, 2013, e80539 doi:10.1371/journal.pone.0080359
- 3) Enhanced autophagy is required for survival in EGFR-independent EGFR-mutant lung adenocarcinoma cells.
Sakuma Y, Matsukuma S, Nakamura Y, Yoshihara M, Koizume S, Sekiguchi H, Saito H, Nakayama H, Kameda Y, Yokose T, Oguni S, Niki T, and Miyagi Y. *Lab Invest.*, 査読有、93, 2013, 1137-1146 doi:10.1038/labinvest.2013.102

- 4) NF- κ B signaling is activated and confers resistance to apoptosis in three-dimensionally cultured EGFR-mutant lung adenocarcinoma cells.
Sakuma Y, Yamazaki Y, Nakamura Y, Yoshihara M, Matsukuma S, Koizume S, and Miyagi Y. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 査読有、423, 2012, 667-671. doi: 10.1016/j.bbrc.2012.06.009.
- 5) HIF2 α -Sp1 interaction mediates a deacetylation-dependent *FVII* gene activation under hypoxic conditions in ovarian cancer cells.
Koizume S, Ito S, Miyagi E, Hirahara F, Nakamura Y, Sakuma Y, Osaka H, Takano Y, Ruf W, and Miyagi Y. *Nucleic Acids Res.*, 査読有、12, 2012, 5389-5401 doi: 10.1093/nar/gks201.
- 6) The association between RAS gene mutations and clinical characteristics in follicular thyroid tumors: new insights from a single center and a large patient cohort.
Fukahori M, Yoshida A, Hayashi H, Yoshihara M, Matsukuma S, Sakuma Y, Koizume S, Okamoto N, Kondo T, Masuda M, and Miyagi Y. *Thyroid*, 査読有、22, 2012, 683-689. doi: 10.1089/thy.2011.0261.
- 7) WZ4002, a third-generation EGFR inhibitor, can overcome anoikis resistance in EGFR-mutant lung adenocarcinomas more efficiently than Src inhibitors.
Sakuma Y, Yamazaki Y, Nakamura Y, Yoshihara M, Matsukuma S, Nakayama H, Yokose T, Kameda Y, Koizume S, and Miyagi Y. *Lab. Invest.*, 査読有、2012, 371-383.
doi:10.1038/labinvest.2011.187
- 8) Simple and precise detection of UGT1A1 polymorphisms with a modified loop-hybrid mobility shift assay using Cy5-labeled loop probes.
Matsukuma S, Saito H, Yamada K, Okamoto N, Ishikawa T, Yoshihara M, Koizume S, Sakuma Y, and Miyagi Y. *Clin. Chim. Acta.*, 査読有、412, 2011, 1668-1672. doi: 10.1016/j.cca.2011.05.021.
- 9) Differential detection of KRAS mutations in codons 12 and 13 with a modified loop-hybrid (LH) mobility shift assay using an insert-type LH-generator.
Matsukuma S, Yoshihara M, Suda T, Shiozawa M, Akaike M, Ishikawa, T, Koizume S, Sakuma Y, and Miyagi Y. *Clin. Chim. Acta.*, 査読有、412, 2011, 1874-1878.
doi:10.1016/j.cca.2011.06.030
- 10) ABT-263, a Bcl-2 inhibitor, enhances the susceptibility of lung adenocarcinoma cells treated with Src inhibitors to anoikis.
Sakuma Y, Tsunozumi J, Nakamura Y, Yoshihara M, Matsukuma S, Koizume S, and Miyagi Y. *Oncol. Rep.*, 査読有、25, 2011, 661-667. doi: 10.3892/or.2010.1123.
- 11) Mild phenotype in Pelizaeus-Merzbacher disease caused by a PLP1-specific mutation.
Osaka H, Koizume S, Aoyama H, Iwamoto H, Kimura S, Nagai J, Kurosawa K, and Yamashita S. *Brain Dev.*, 査読有、32, 2010, 703-707.
doi:10.1016/j.braindev.2009.11.004
- 12) Self-production of tissue factor-coagulation factor VII complex by ovarian cancer cells.
Yokota, N., Koizume S, Miyagi, E., Hirahara, F., Nakamura, Y., Kikuchi, K., Ruf, W., Sakuma, Y. Tsuchiya, E., and Miyagi, Y. *Br. J. Cancer*, 査読有、101, 2009, 2023-2029.
doi:10.1038/sj.bjc.6605406
- 13) HNF-4-independent synthesis of coagulation factor VII in breast cancer cells and its inhibition by targeting selective histone acetyltransferase.
Koizume S, Yokota, N., Miyagi, E., Hirahara, F., Nakamura, Y., Sakuma, Y., Yoshida, A., Kameda, Y., Tsuchiya, E. and Miyagi, Y. *Mol. Cancer Res.*, 査読有、7, 2009, 1928-1936.
doi:10.1158/1541-7786.MCR-09-0372

〔学会発表〕(計 19件)

1) 卵巣明細胞癌において HIF2 α /Sp1/mTOR

相互作用は脱アセチル化依存性転写を誘導する。

小井詰 史朗、宮城 悦子、平原 史樹、中村 圭靖、高野 康雄、宮城 洋平 第70回日本癌学会総会 2011年 10月 名古屋

2) 卵巣明細胞腺癌で高発現する annexin A4 の機能解析

最上 多恵、横田 奈朋、伊藤 慎、吉原 光代、中村 圭靖、佐久間 裕司、小井詰 史朗、辻 祥太郎、宮城 悦子、平原 史樹、宮城 洋平 第70回日本癌学会総会 2011年 10月 名古屋

3) 肝細胞癌で見られる TF 及び TFPI1 の特異的な発現

伊藤 慎、小井詰 史朗、中村 圭靖、高野 康雄、宮城 洋平 第70回日本癌学会総会 2011年 10月 名古屋

4) 浮遊状態の EGFR 変異陽性肺腺癌細胞は恒常的 EGFR 活性化により apoptosis を回避する。

佐久間 裕司、中村 圭靖、吉原 光代、小井詰 史朗、宮城 洋平 第70回日本癌学会総会 2011年 10月 名古屋

5) 低酸素、低血清環境下 HIF2 α , Sp1 依存的に相乗的に発現誘導される遺伝子について

小井詰 史朗、宮城 洋平 第9回 がんとハイポキシア研究会 2011年 11月 東京

6) 卵巣明細胞腺癌における ANXA4 発現の解析

最上 多恵、横田 奈朋、常住 淳、辻 祥太郎、小井詰 史朗、佐藤 美紀子、宮城 悦子、宮城 洋平、平原 史樹 第10回日本婦人科がん分子標的研究会学術集会 2011年 7月 松江

7) Hypoxic activation of *FVII* gene in cancer cells mediated by interaction among HIF2 α , Sp1, and HDAC4

Koizume S, Miyagi E, Hirahara F, Nakamura Y, Takano Y, Ruf W, Miyagi Y. The 102th AACR annual meeting, Orlando, FA, 2011.

8) HIF2 α -Sp1 相互作用が関与する *FVII* 遺伝子低酸素発現誘導

小井詰 史朗、宮城 洋平 第8回がんとハイポキシア研究会 2011年 1月 札幌

9) HIF2/Sp1/mTOR 相互作用による ICAM1 発現は虚血性環境における卵巣癌細胞生存を促進する

小井詰 史朗、宮城 悦子、平原 史樹、吉原 光代、高野 康雄、宮城 洋平 第71

回日本癌学会総会 2012年 9月 札幌

10) 肝細胞癌で発現する異所性 TFPI1 による癌細胞での接着障害

伊藤 慎、小井詰 史朗、高野 康雄、宮城 洋平 第71回日本癌学会総会 2012年 9月 札幌

11) 甲状腺濾胞性腫瘍における RAS 遺伝子変異の頻度と臨床病理学的意義

宮城洋平、吉田 明、松隈 章一、佐久間 裕司、小井詰 史朗、吉原 光代、岡本 直幸、横瀬 智之、近藤 哲夫、高野 康雄 第71回日本癌学会総会 2012年 9月 札幌

12) 卵巣明細胞癌において低酸素、低血清環境下 HIF, Sp1 依存的に相乗的に発現誘導される遺伝子とその機能について

小井詰 史朗、宮城 洋平 第9回 がんとハイポキシア研究会 2012年 12月 横浜

13) HIF2 α /Sp1/mTOR interaction mediates a deacetylation-dependent *FVII* gene activation under serum deprived condition in ovarian cancer cells.

Shiro Koizume, Etsuko Miyagi, Fumiki Hirahara, Yasuo Takano, Wolfram Ruf, and Yohei Miyagi. The 103th AACR annual meeting, Chicago, IL, 2012.

14) Functional analysis of annexin A4 and the implication in ovarian clear cell carcinoma (OCCA) phenotypes

Tae Mogami, Naho Yokota, Mitsuyo Yoshihara, Yoshiyasu Nakamura, Yuji Sakuma, Shiro Koizume, Mikiko Asai-Sato, Etsuko Miyagi, Fumiki Hirahara, and Yohei Miyagi. The 103th AACR annual meeting, Chicago, IL, 2012.

15) 相乗的 ICAM1 発現誘導の障害は明細胞卵巣腫瘍の増殖を抑制する

小井詰 史朗、伊藤 慎、吉原 光代、中村 圭靖、宮城 悦子、平原 史樹、高野 康雄、宮城 洋平 第72回日本癌学会総会 2013年 10月 横浜

16) 卵巣癌細胞により分泌される組織因子含有マイクロパーティクルの性質

伊藤 慎、小井詰 史朗、吉原 光代、中村 圭靖、宮城 悦子、平原 史樹、高野 康雄、宮城 洋平 第72回日本癌学会総会 2013年 10月 横浜

17) 前立腺がんにおける SPOP 遺伝子変異の頻度は本邦例と米国からの報告例の間に差を認めない

宮城洋平、松隈 章一、吉原 光代、中村 圭
靖、小井詰 史朗、岸田 健、横瀬 智之、
高野 康雄 第72回日本癌学会総会 2
013年 10月 横浜

18) 虚血性環境下相乗的に発現誘導される
ICAM-1 は卵巣明細胞腫瘍の増殖を促進する
小井詰 史朗、宮城 洋平 第11回 がん
とハイポキシア研究会 2013年 12
月 仙台

19) 虚血性環境下相乗的に発現誘導される
CD69 は卵巣明細胞癌において細胞運動能、浸
潤能を亢進する
金山 知彦、小井詰 史朗、宮城 洋平 第
11回 がんとハイポキシア研究会 20
13年 12月 仙台

〔図書〕(計 1件)

Ectopic synthesis of coagulation factor VII in breast cancer cells: Mechanisms, functional correlates, and potential for a new therapeutic target.

Koizume S, Miyagi Y. *Breast Cancer: Current and Alternative Therapeutic Modalities*, INTECH, 197-212 (2011).

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://kcch.kanagawa-pho.jp/kccri/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小井 諒 史朗 (KOIZUME, Shiro)
神奈川県立がんセンター臨床研究所・主任
研究員
研究者番号：60416063

(2) 研究分担者

宮城 洋平 (MIYAGI, Yohei)
神奈川県立がんセンター臨床研究所・部長
研究者番号：00254194

(3) 連携研究者

()

研究者番号：