

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：17201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591393

研究課題名(和文) 低酸素応答遺伝子HIF-1によるリンパ腫発生促進機構の解析

研究課題名(英文) The role of HIF-1 $\alpha$  in the development of lymphoproliferative diseases in transgenic mouse model

研究代表者

末岡 榮三郎 (SUEOKA, Eizaburo)

佐賀大学・医学部・教授

研究者番号：00270603

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：HIF-1 を恒常的に発現するトランスジェニックマウス(以下HIF-1 TG)を用いて以下の解析を行った。(1)HIF-1 の腫瘍原性、(2)HIF-1 の造血幹細胞に対する作用。(1)HIF-1 TGがリンパ系腫瘍を好発すること、リンパ球のアポトーシスが抑制されることを報告してきた(Sueoka et al, PLOS ONE 2013)。(2)高齢マウスにおいて、HIF-1 TGでは、造血幹細胞分画、コロニー形成能共に増加しており、HIF-1 の造血幹細胞の維持作用が示唆された。さらにBCR-ABLキメラ遺伝子をマウス造血幹細胞に導入することにより、白血病発症のモデル系を作成した。

研究成果の概要(英文)：Hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  (HIF-1  $\alpha$ ) plays an important role in the induction of various genes under hypoxic condition. We investigate the role of HIF-1  $\alpha$  in tumor development and metastasis, and established transgenic mice constitutively expressing HIF-1A gene under regulation of the cytomegalovirus gene promoter. HIF-1  $\alpha$  protein levels varied among organs, but the expression of HIF-1  $\alpha$  mRNA gradually increased in an age-dependent manner. The transgenic mice developed tumors in the lymphoid, lung, and breast; the most prominent tumor was lymphoma appearing in the intestinal mucosa and intra-mesenchymal tissues. The lymphocytes of the transgenic mice revealed prolonged survival under long-term culture conditions and revealed increased resistance to cytotoxic drugs. These results suggest that HIF-1  $\alpha$  play an important role in lymphomagenesis mediated through the prolonged survival of lymphocytes in this transgenic mouse model.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・血液内科学

キーワード：低酸素応答 HIF-1 リンパ腫 造血幹細胞 がん幹細胞 薬剤耐性

1. 研究開始当初の背景

HIF-1αは低酸素環境下で活性化される転写因子であり、標的遺伝子には、血管新生関連因子や糖代謝、エリスロポエチンなどがあり、HIF-1αの活性化は細胞増殖や転移、エネルギー代謝など様々な生命現象に関与することが明らかになってきている。HIF-1αとがんとの関連においては、各種がん組織での発現亢進や、HIF-1αの阻害や発現抑制により腫瘍の増殖が抑制されることが示されておりがんの発生や進展において重要な作用をしていることが推定される。(Keith and Simon, Cell, 129, 2007) 私どもは広島大学との共同研究により HIF-1αを高発現するトランスジェニックマウスを作製し、個体レベルでのHIF-1αの作用を検討してきた。その結果HIF-1αトランスジェニックマウスにおいてリンパ腫をはじめとする腫瘍が好発することを見出している。(図1、2)

2. 研究の目的

本研究では、HIF-1αの活性化が腫瘍発生や進展に及ぼす影響とそのメカニズムを個体レベルと細胞レベルで解析することを目的とする。そのために以下の内容について解析を行う。

1. 低酸素応答遺伝子 HIF-1αによるリンパ腫発生促進作用の機序の解析

HIF-1αを高発現するトランスジェニックマウスの腸管にリンパ腫が好発することを見出しており、HIF-1αとリンパ腫発症との関連を個体および細胞レベルで解明する。

2. HIF-1αによるがん幹細胞様細胞の維持作用の検討

Bcr-Abl 遺伝子導入によるマウス白血病モデルにおいて解析する。HIF-1αは niche における生存シグナルやがん幹細胞様細胞の幹細胞性の維持に重要な役割をすることが示されている。Bcr-Abl キメラ遺伝子導入骨髄細胞を HIF-1αトランスジェニックマウスに移植し白血病幹細胞様細胞の同定と HIF-1α阻害剤によるがん幹細胞様細胞の除去に関する検討を行う。

3. 研究の方法

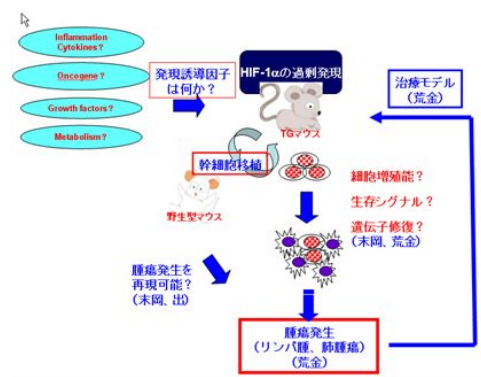
1. トランスジェニックマウスモデルを用いた HIF-1αによるリンパ腫発生促進作用の機序の解析

(1) トランスジェニックマウスにリンパ腫が発生するメカニズムについて、リンパ系臓器における表現形質の違い、増殖能の違い、サイトカイン産生能の違いについて解析する。リンパ腫細胞と腫瘍発生以前における遺伝子発現変化を網羅的に解析する。HIF-1αトランスジェニックの骨髄細胞を野生型マウスに移植した場合と野生型マウス骨髄をトランスジェニックマウスに移植した場合とリンパ腫発症に差が生じるかを検討する。

3. HIF-1α阻害剤によるがん幹細胞様細胞の除去に関する検討

(1) Bcr-Abl キメラ遺伝子を HIF-1αトラン

スジェニックマウス骨髄や野生型マウス骨髄に導入し、生着や増殖について解析する。



4. 研究成果

(1) HIF-1 トランスジェニックマウスに発生する腫瘍の解析

HIF-1 トランスジェニックマウスの約 80%に、リンパ増殖性病変が認められ、野生型マウスと比べ明らかに高率にリンパ増殖性疾患の発症を認めた。リンパ腫について、経時的にリンパ腫組織の免疫組織染色、フローサイトメトリーにより表現形質の解析を行い、一部にT細胞性モノクローナリティーの証明を行なった。また、その腫瘍は多臓器に浸潤傾向を認め、臨床的にはリンパ腫の病態を示した。しかしながら多くは腸管に発生するB細胞性の腫瘍であることが明らかになった。腫瘍組織における遺伝子発現を cDNA マイクロアレイを用いて行い、トランスジェニックマウスに発生するリンパ腫に共通する遺伝子のプロファイリングを行った。T細胞、B細胞共に約 200 種類の遺伝子発現の行進が認められたが、それらのなかにアポトーシス関連遺伝子が多く含まれており、また HIF-1 の標的遺伝子である、EpoR や c-Myc などが含まれていた。マウス骨髄、脾臓、パイエル板由来のリンパ球を単離し、T細胞およびB細胞分離後に細胞増殖能を解析した。特にT細胞において短期培養よりも長期培養において、生細胞数の増加が認められた。その機序として、HIF-1 トランスジェニックマウス由来リンパ球において、アポトーシスの抑制傾向が認められた。また、HIF-1 トランスジェニックマウス由来リンパ球では、トポイソメラーゼ阻害剤などの抗がん剤に対する感受性が低下しており、薬剤耐性の傾向が認められた。

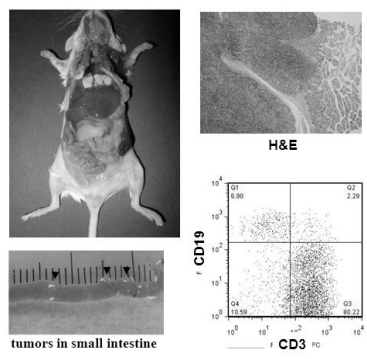


図1 HIF-1 $\alpha$ トランスジェニックマウスに発生する腸管リンパ腫

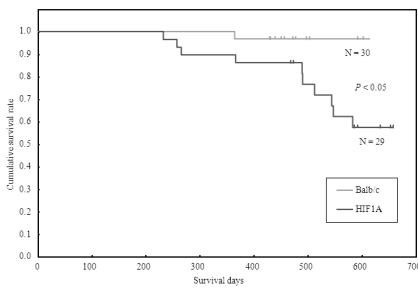
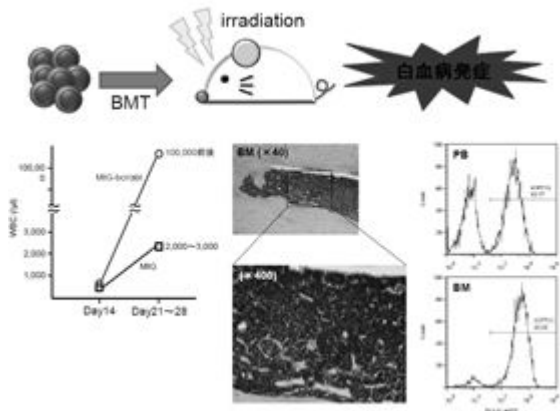


図2 トランスジェニックマウスの生存曲線

(2) 造血幹細胞に対する HIF-1 の作用に関する解析  
 マウス骨髄細胞を単離し、造血幹細胞分画の割合をフローサイトメトリーにより解析した。生後1年以上のマウスにおいては HIF-1 トランスジェニックマウスにおいて有意に造血幹細胞分画の増加が認められた。



次に、骨髄細胞にレトロウイルスを用いて慢性骨髄性白血病の原因遺伝子である bcr-Abl 遺伝子を導入したのち、HIF-1 $\alpha$ トランスジェニックマウスに骨髄移植を行い、白血病発症モデルマウスを作製した。bcr-Abl 遺伝子を導入した造血幹細胞分画をソーティングしたのち、骨髄移植を行うと約3週間で、末梢白血球数の増加、肝脾腫を伴って白血病を発症した。このマウスモデルにおいて、白血病発症における HIF-1 $\alpha$ の作用および、慢性骨髄性白血病の治療薬である、チロシンキナーゼ阻害による治療効果に対する HIF-1 $\alpha$ 阻害剤による影響についても検討中である。

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 19 件)

1. Yoshihara M, Itamura H, Fukushima N, Itoh M, Furukawa K, Nagatomo D, Kamachi K, Kitamura H, Shindo T, Kubota Y, Sueoka E, Morita S, Ichinohe T, Kimura S. Therapeutic management in cardiac

Lymphoma. Leuk Lymphoma. (査読あり) 2014 55:1215-7

2. 末岡榮三朗, 山田尚友, 山田麻里江, 久保田寧, 吉村麻里子, 板村英和, 出勝, 横尾眞子, 吉原麻里, 蒲池和晴, 北村浩晃, 進藤岳郎, 安藤寿彦, 小島研介, 東谷孝徳, 木村晋也, 電子カルテと輸血管理システムの連携による輸血後鉄過剰症モニタリングプログラムの運用とその課題, 日本輸血細胞治療学会誌, (査読あり) 2014, 60, 12-17

3. 山田麻里江, 山田尚友, 久保田寧, 木村晋也, 東谷孝徳, 末岡榮三朗, 抗 M (IgM+IgG) において抗体価測定時に反応増強剤無添加間接抗グロブリン試験で一部陰性を示した妊婦の1例, 日本輸血細胞治療学会誌, (査読あり) 2014, 60, 32-37

4. Uki N, Oho M, Nagasawa Z, Higashitani T, Ohta S, Sueoka E, Miyamoto H. Direct identification method for bacteria in positive blood culture bottles using MALDI biotyper. Rinsho Byori. (査読あり) 2013 Mar;61(3):224-30.

5. Fujiki H, Sueoka E, Suganuma M. Tumor promoters: from chemicals to inflammatory proteins. J Cancer Res Clin Oncol. (査読あり) 2013 Oct;139(10):1603-14.

6. Sueoka E, Sueoka-Aragane N, Sato A, Ide M, Nakamura H, Sotomaru Y, Taya C, Yonekawa H, Kitagawa T, Kubota Y, Kimura S, Nakachi K, Tanimoto K. Development of lymphoproliferative diseases by hypoxia inducible factor-1alpha is associated with prolonged lymphocyte survival. PLoS One. (査読あり) 2013 Apr 12;8(4):e57833.

7. 末岡榮三朗, 山田尚友, 山田麻里江, 久保田寧, 浦田千紗子, 吉村麻里子, 板村英和, 久富崇, 福島伯泰, 出勝, 横尾眞子, 吉原麻里, 蒲池和晴, 北村浩晃, 進藤岳郎, 一戸辰夫, 東谷孝徳, 木村晋也, 輸血後鉄過剰症の現状と問題点, 日本輸血細胞治療学会誌 (査読あり) 2013 59, 73-78

8. Takata Y, Kanaji T, Moroi M, Seki R, Sano M, Nakazato S, Sueoka E, Imamura Y, Okamura T. Platelets with a W127X mutation in GPIX express sufficient residual amounts of GPIb to support adhesion to von Willebrand factor and collagen. Int J Hematol. (査読あり) 96:733-42, 2012

9. Katsuya H, Yamanaka T, Ishitsuka K, Utsunomiya A, Sasaki H, Hanada S, Eto T, Moriuchi Y, Saburi Y, Miyahara M, Sueoka E, Uike N, Yoshida S, Yamashita K, Tsukasaki K, Suzushima H, Ohno Y, Matsuoka H, Jo T, Suzumiya J, Tamura K. Prognostic index for acute- and lymphoma-type adult T-cell leukemia/lymphoma. J Clin Oncol. (査読あり) 30:1635-40, 2012

10. Itamura H, Fukushima N, Kondo S, Urata C, Tanaka-Yoshimura M, Yokoo M, Ide M, Hisatomi T, Kubota Y, Sueoka E, Ichinohe

T, Kimura S. Successful reduced-intensity umbilical cord blood transplant for fulminant hemophagocytic syndrome in an adult with pre-existing rheumatoid arthritis and autoimmune hemolytic anemia. *Leuk Lymphoma*. (査読あり) 53:2307-9, 2012.

11. Yamaguchi M, Kwong Y, Kim K, Maeda Y, Hashimoto C, Suh C, Izutsu K, Ishida F, Isobe Y, Sueoka E, Suzumiya J, Kodama T, Kimura H, Hyo R, Nakamura S, Oshimi K, Suzuki R Phase II study of SMILE chemotherapy for newly-diagnosed stage IV, relapsed or refractory extranodal NK/T-cell lymphoma, nasal type: the NK-cell Tumor Study Group (NKTSG) study *J Clin Oncol*, (査読あり) 2011 ;29:4410-6

12. Nagasawa Z, Nakashima Y, Fukutomi Y, Uki N, Kusaba K, Nagumo F, Ohta S, Sueoka E, Miyamoto H. Influences of %T>MIC achievement probability due to the difference of the MIC measurement concentration range-analysis of meropenem for *Pseudomonas aeruginosa*. *Rinsho Biseibutshu Jinsoku Shindan Kenkyukai Shi*. (査読あり) 22:11-22, 2011

13. Fukushima N, Itamura H, Urata C, Tanaka M, Hisatomi T, Kunota Y, Sueoka E, Kimura S. Clinical presentation and outcome in patients of over 75 years old with malignant lymphoma. *Int J Clin Med*, (査読あり) 2: 246-253, 2011.

14. Urata C, Yoshimura M, Itamura H, Hisatomi T, Kubota Y, Fukushima N, Sueoka E, Kimura S. Lenalidomide in combination with dexamethasone induced rhabdomyolysis in a multiple myeloma patient treated with pravastatin. *Int J Hematol*, 2011, 94:216-7

15. Nakamura T, Sueoka-Aragane N, Iwanaga K, Sato A, Komiya K, Abe T, Ureshino U, Hayashi S, Hosomi, Hirai M, Sueoka E, Kimura S. A non-invasive system for monitoring resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors with plasma DNA. *J Thorac Oncol*, (査読あり) 2011 6:1639-48

16. Tanaka A, Sueoka-Aragane N, Nakamura T, Takeda Y, Mitsuoka M, Yamasaki F, Hayashi S, Sueoka E, Kimura S, Co-existence of positive MET FISH status with EGFR mutations signifies poor prognosis in lung adenocarcinoma patients, *Lung Cancer* (査読あり) 2012;75:89-94

17. Ureshino N, Sueoka-Aragane N, Nakamura T, Sato A, Komiya K, Iwanaga K, Mitsuoka M, Takeda Y, Hayashi S, Sueoka E, Kimura S A fully integrated, automated and rapid detection system for KRAS mutations. *Oncol Rep*. (査読あり) 2011;26:609-13.

18. Ureshino N, Aragane N, Nakamura T, Ide M, Mochinaga S, Fukushima N, Hayashi S,

Sueoka E, Kimura S. A fully integrated and automated detection system for single nucleotide polymorphisms of UGT1A1 and CYP2C19. *Oncol Res*. (査読あり) 2011;19:111-4.

19. Hisatomi T, Sueoka-Aragane N, Sato A, Tomimasu R, Ide M, Kurimasa A, Okamoto K, Kimura S, Sueoka E. NK314 potentiates anti-tumor activity with adult T-cell leukemia-lymphoma cells by inhibition of dual targets on topoisomerase IIa and DNA-dependent protein kinase. *Blood*. (査読あり) 2011;117:3575-84

[学会発表](計 19 件)

1 . Masaru Ide, Shinichi Koba, Yumi Nagano, Naoko Aragane-Sueoka, Akemi Sato, Takuya Inoue, Naomi Kobayashi, Noriyuki Misago, Yutaka Narisawa, Shinya Kimura, Eisaburo Sueoka, Establishment of a rapid and automated detection system for BRAF mutations in malignant melanoma, AACR Annual Meeting 2013, 2013,4,6-10

2 . Naoko Sueoka-Aragane, Akemi Sato, Naomi Kobayashi, Masaru Ide, Eisaburo Sueoka, Seiji Okada, Shinya Kimura, Development of animal model mimicking metastasis of human lung cancers using NOJ/SCID mice, AACR Annual Meeting 2013, 2013,4,6-10

3 . Eisaburo, Sueoka.; Naotomo, Yamada.; Marie, Yamada.; Yasushi, Kubota.; Shinya, Kimura, Establishment of automated monitoring program for transfusional iron overload using electronic medical recording system, EUROMEDLAB Milano 2013, 2013,5,19-22

4 . 末岡榮三朗、山田尚友、山田麻里江、東谷孝則、木村晋也、医療現場の隙間をうめる部門システムと電子カルテの連携 佐賀大方式輸血後鉄過剰症モニタリングプログラムの開発 , 平成24年度大学病院情報マネジメント部門連絡会議, 2013,2,7-8

5 . 出勝、荒金 尚子、佐藤 明美、木村晋也、末岡 榮三朗, Quenching probe 法を用いた BRAF 遺伝子変異検出システムの確立と本邦悪性黒色腫における BRAF 変異の臨床的特徴, 第 17 回日本がん分子標的治療学会学術集会, 2013,6,12-14

6 . 佐藤 明美、荒金 尚子、小林 直美、出勝、横尾 眞子、末岡 榮三朗、岡田 誠治、木村 晋也, NOJ/SCID マウスを用いたヒト肺がん転移モデルの確立, 第 17 回日本がん分子標的治療学会学術集会, 2013,6,12-14

7 . 末岡榮三朗、柘植薫、福島伯泰、久保田寧、吉原麻里、蒲池和晴、北村浩晃、板村英和、吉村麻里子、進藤岳郎、安藤寿彦、出勝、横尾眞子、一戸辰夫、木村晋也, HTLV-1 ウイルス関連疾患診療ネットワーク構築のための佐賀県における総合的な取り組み, 第 75

回日本血液学会総会, 2013.9.11-13

8 . Abe O, Yoshihara M, Kubota Y, Sueoka E, Kamachi K, Kitamura H, Itamura H, Nishi M, Shindo T, Fukushima N, Hamasaki Y, Kimura S, Deferasirox in iron-overloaded patients with hematologic disease at Saga University Hospital, 第75回日本血液学会総会, 2013.9.11-13

9 . Ureshino H, Miyahara M, Kamachi K, Yoshihara M, Kitamura H, Itamura H, Yoshimura M, Yokoo M, Ide M, Kubota Y, Shindo T, Fukushima N, Sueoka E, Kimura S, 10 cases of Mogamulizumab treatment for Adult T cell Leukemia in Saga prefecture., 第75回日本血液学会総会, 2013.9.11-13

10 . 末岡榮三朗, 出勝, 荒金尚子, 佐藤明美, 久保田寧, 木村晋也, 谷本圭司, 低酸素応答遺伝子 HIF-1 による腫瘍原性と造血幹細胞への作用, がんとハイポキシア研究会, 2013.12.11-13

11 . 荒金尚子, 中村朝美, 岩永健太郎, 小宮一利, 末岡榮三朗, 木村晋也, 耐性原因マーカーのモニタリングによるテーラーメイド治療, 日本分子標的治療学会, 32012.6.27

12 . 中村朝美, 荒金尚子, 岩永健太郎, 末岡榮三朗, 木村晋也, 血漿DNAを用いた非侵襲的EGFR遺伝子変異モニタリングシステムの確立, 日本分子標的治療学会, 32012.6.27

13 . 出勝, 古場慎一, 長野由美, 荒金尚子, 佐藤明美, 三砂範幸, 成澤寛, 木村晋也, 末岡榮三朗, 迅速診断法によるメラノーマにおけるBRAF変異の解析, 第44回日本臨床検査自動化学会, 2012.10.12-13

14 . 伊波英克, 池辺詠美, 手塚健太, 藤澤順一, 田中勇悦, 末岡榮三朗, 森下和弘, 堀光雄, レクチンアレイを用いたATL細胞に発現するグリカンのプロファイリング, 第71回日本癌学会総会, 2012.9.19-21

15 . Hisatomi T, Sueoka-Aragane N, Sato A, Tomimasu R, Ide M, Kunimasa A, Okamoto K, Kimura S, Sueoka E, DNA-dependent protein kinase as a promising molecular target for the treatment of adult T-cell leukemia-lymphoma., The 16th European Hematology Association Congress, 2011.6.9-12

16 . Ide M, Sueoka-Aragane N, Sato A, Nakamura T, Yokoo M, Kimura S, Tanimoto K, Sueoka E, Gene regulation induced by constitutive expression of HIF-1 in transgenic mice, AACR 102nd Annual Meeting, 2011.4.2-6

17 . Sueoka-Aragane N, Nakamura T, Iwanaga K, Sato A, Komiya K, Abe T, Ureshino N, Hayashi S, Hosomi T, Hirai M, Sueoka E, Kimura S, A non-invasive system for monitoring resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors with plasma DNA in lung cancer patients, AACR 102nd Annual Meeting,

2011.4.2-6

18 . Sueoka E, Sueoka-Aragane N, Sato A, Nakamura T, Iwanaga K and Kimura S, Development of New Methods for Detecting Circular Nucleic Acids as Cancer Biomarkers in Lung Cancer Patients, IIFCC WorrlldLab EuroMedLab Berrilliin 2011, 2011.5.16-19

19 . Sueoka E, Hisatomi T, Sueoka-Aragane N, Sato A, Tomimasu R, Ide M, Kimura S, Overexpression of hnRNP B1 inhibits DNA repair by interaction with DNA-dependent protein kinase complex in adult T-cell leukemia, 25th International Symposium of the International Association for Comparative Research on Leukemia and Related Diseases, 2011.9.15 - 17

〔図書〕(計 0 件)

なし

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

なし

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)

なし

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://www.intmed.med.saga-u.ac.jp/kenkyuugroup/group/blood-hp/index.html>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

末岡 榮三朗 ( SUEOKA Eizaburo )

佐賀大学・医学部・教授

研究者番号: 00270603

(2)研究分担者

荒金 尚子 ( ARAGANE Naoko )

佐賀大学・医学部・講師

研究者番号: 20321846

(3)連携研究者

出勝 ( IDE Masaru )

佐賀大学・医学部・助教

研究者番号: 00398124