

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：30110

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26460466

研究課題名(和文) 低酸素微小環境によるHOX遺伝子の発現変化とがん細胞浸潤能の増強

研究課題名(英文) Enhancement of invasiveness of cancer cells by hypoxia-induced expression of HOX genes

研究代表者

浜田 淳一 (HAMADA, Jun-ichi)

北海道医療大学・看護福祉学部・教授

研究者番号：50192703

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：これまで、細胞の位置情報の担い手であるHOX遺伝子の発現異常ががん細胞の転移・浸潤能に影響を及ぼすことを研究してきた。本研究では、がん組織内にしばしば存在する低酸素微小環境ががん細胞のHOX遺伝子の一つであるHOXD3の発現を亢進し、転移・浸潤能を増強させること、ならびにHOXD3発現の高いがん細胞は低酸素環境への適応力に優れている可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：We have been demonstrating that dysregulated expression of HOX genes, which play an important role in giving cells positional information, influences invasive and metastatic ability of cancer cells. In this study, we revealed that hypoxia-induced expression of HOXD3 gene, one of the HOX genes, in cancer cells enhanced invasive and metastatic ability, and suggested that the cancer cells overexpressing HOXD3 had an advantage to adapt themselves to hypoxic condition.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：がん転移 ホメオボックス遺伝子 HOX 浸潤 低酸素

## 1. 研究開始当初の背景

癌の転移は、本来存在してはならない場所での癌細胞の増殖と捉えることができる。すなわち、癌細胞による正所・異所の誤認が転移を引き起こすと考えられる。そこで我々は、癌細胞のもつ位置情報と転移との関連性について研究を進めて来た。動物胚の形態形成過程において遺伝情報を位置情報に変換する遺伝子はホメオボックス遺伝子とよばれ、転写因子をコードしている。この遺伝子群が位置情報の最終的な担い手である細胞接着因子や増殖因子などの遺伝子発現を調節しながら形態形成を進めてゆく。ホメオボックス遺伝子ファミリーに属する HOX 遺伝子群は、ヒトでは 39 個知られており、9 から 11 個の HOX 遺伝子からなる 4 つのクラスター (A, B, C, D) を形成し、それぞれ異なった染色体上に位置している。

我々はこれまでに、1) 39 個の HOX 遺伝子の発現パターン (HOX コード) が胎生期だけでなくヒト成体においても臓器・組織に特徴的であること、2) 癌組織 (口腔癌、食道癌、大腸癌、肝癌、乳癌、肺癌および悪性黒色腫) における HOX コードは、非癌部組織のそれとは異なることならびに 3) 癌細胞の分化形質発現にも HOX 遺伝子が関与していることを報告してきた。これらの事実から、我々は HOX 遺伝子の発現異常が発癌や細胞分化に関与していると考察してきた。一方で、我々は特定の HOX 遺伝子の発現異常が癌細胞の悪性を高めることを示してきた。すなわち、HOX 遺伝子のひとつである HOXD3 をヒト肺癌 A549 細胞に過剰発現させると、1) 転移・浸潤・運動能が増強するとともに、2) 数多くの転移関連遺伝子の発現が変化することを報告してきた。さらに、HOXD3 を過剰発現させた A549 細胞の解析から、HOXD3 を上皮-間葉移行 (EMT) を誘導するマスター遺伝子として捉えてきた。つまり、HOXD3 の過剰発現は癌細胞の位置情報を乱し、その結果、癌細胞は正所 (原発巣) を異所 (居場所ではない) と認識し、原発巣から出て行く手段として EMT を引き起こすのではないだろうかと考えるに至った。そこで、HOXD3 の発現を亢進させるがん微小環境因子について興味を抱くようになった。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、以下の仮説を立て、その実証を試みることにした。固形癌組織に生じた低酸素領域に存在する癌細胞は、その場から逃避するために細胞のもつ位置情報を正所から異所に切り換える。A549 細胞においては、その切り換えを行うのが HOXD3 の発現亢進である。HOXD3 の発現亢進は EMT 関連遺伝子の発現を変化させ、その結果、運動・浸潤性が高まり、原発巣からの遊離が促進される。

## 3. 研究の方法

(1) 本研究では 5% FBS を添加した DMEM 培地 (1000 mg/L の D-グルコースを含む) を用いて、ヒト肺癌 A549 細胞を通常の CO<sub>2</sub> インキュベーター (= 正常酸素圧 (21% 酸素濃度)) あるいはハイポキシアチャンバー (酸素濃度が 1% になっている以外は庫内の条件は通常の CO<sub>2</sub> インキュベーターと同じ) で培養する。

(2) 低酸素環境において HOXD3 の転写活性化に必要なプロモーター領域の解析は、ルシフェラーゼを用いたレポーターアッセイを利用した。

(3) 低酸素応答性転写因子 HIF-1 あるいは HIF-2 の関与は、それぞれの mRNA を標的とした siRNA を A549 細胞に導入し、低酸素下に置かれた A549 細胞の遺伝子発現解析を定量的 RT-PCR 法で行った。

(4) HOXD3 過剰発現 A549 細胞の低酸素環境下の悪性形質 (増殖、運動および浸潤能、スフェア形成能) を対照細胞と比較した。細胞増殖能は 96 穴プレートを用いた MTT 法の変法 (WST-8) で、細胞運動能はファゴカインティック・トラック・アッセイ、およびトランズウエルを用いたケモタクティック・アッセイで、細胞浸潤能はトランズウエルと内皮下基底膜モデルであるマトリゲルを用いた浸潤アッセイで測定した。

(5) 遺伝子発現解析は、転写レベルでは主として定量的 RT-PCR 法、蛋白レベルではイムノプロット法で解析した。

## 4. 研究成果

(1) 低酸素環境下に置かれた A549 細胞は、低酸素応答遺伝子として知られる GLUT1 や VEGF などの発現が亢進した。また、低酸素環境は A549 細胞の E-カドヘリンの発現を低下させ、かつビメンチン発現を増加させる傾向が認められ、低酸素刺激が部分的な上皮-間葉移行を引き起こす可能性が示された。

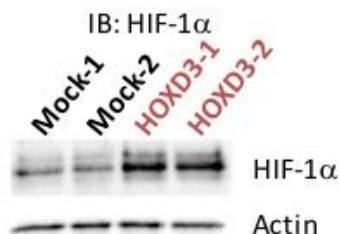
(2) 低酸素環境下に置かれた A549 細胞は、増殖能は低下したが、運動・浸潤能は正常酸素圧下に置かれたものに比べ有意に増強した。また、スフェア形成能も低酸素環境下で増強した。

(3) A549 細胞の HOXD3 の発現は、低酸素環境下で 1.5 倍程度高まるが、HOXD3 プロモーターを用いたレポーターアッセイでは 1.1~1.2 倍程度しか高まらないことがわかった。このことは、低酸素による HOXD3 の発現亢進は、プロモーター領域以外の調節領域を介している可能性を示唆している。

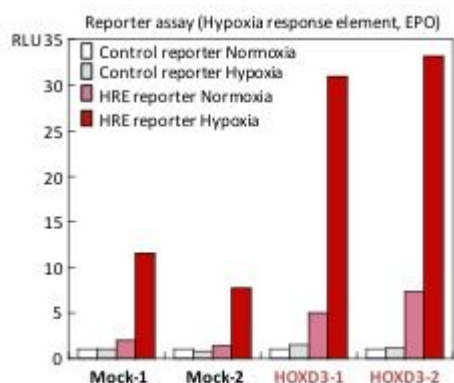
(4) HIF1α および HIF1β の mRNA を標的とした siRNA 導入実験の結果から、A549 にみられる低酸素応答性は HIF1α の活性化経路を介していることが明らかとなった。

(5) 当初の計画にはなかったが、HOXD3 過剰発現 A549 細胞と Mock 対照細胞の低酸素に対する応答性を調べたところ、以下の興味深いことがわかった。(i) 蛋白発現解析から、HOXD3 過剰発現細胞は、対照細胞に比べ HIF1α 発

の発現が高い、



(ii) EPO プロモーターを用いたレポーターアッセイから、HOXD3 過剰発現細胞は、対照細胞に比べ、正常大気圧でもプロモーター活性が高く、低酸素環境下ではさらに高くなることが明らかとなった。



(iii) HOXD3 過剰発現細胞は、対照細胞に比べ、スフェア形成能が高いことが明らかとなった。

## 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2件)

1. Kanda Y, Osaki M, Onuma K, Sonoda A, Kobayashi M, Hamada J, Nicolson GL, Ochiya T and Okada F. Amigo2-upregulation in Tumour Cells Facilitates Their Attachment to Liver Endothelial Cells Resulting in Liver Metastases. Sci. Rep., 2017, 7:43567. doi: 10.1038/srep43567

2. Maishi N, Ohba Y, Akiyama K, Ohga N, Hamada J, Nagao-Kitamoto H, Alam MT, Yamamoto K, Kawamoto T, Inoue N, Taketomi A, Shindoh M, Hida Y, Hida K. Tumour endothelial cells in high metastatic tumours promote metastasis via epigenetic dysregulation of biglycan. Sci Rep. 2016 6:28039. doi: 10.1038/srep28039

[学会発表](計4件)

1. 神田裕介・小沼邦重・園田彩奈・浜田淳二・小林正伸・尾崎充彦・岡田太: 肝転移のドライバー分子としての Amigo2 の同定, 第

26 回日本がん転移学会学術集会・総会, 2017.7.27・28 (大阪)

2. Terasaki, M., Hamada, J., Mutoh, M.: Metabolic markers related to suppression of epithelial-mesenchymal transition in cancer stem cells by fucoxanthinol. The 76th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, Sep. 28-30, 2017 (Yokohama).

3. Kanda, Y., Onuma, K., Sonoda, A., Hamada, J., Kobayashi, M., Osaki, M., Ochiya, T., Okada, F.: Amigo2 determines liver metastasis through selective adhesion to liver endothelial cells. The 76th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, Sep. 28-30, 2017 (Yokohama).

4. 間石奈湖・秋山廣輔・大賀則孝・浜田淳二・榎田京子: 腫瘍血管内皮細胞による biglycan の分泌を介したがんの転移促進, 第 25 回日本がん転移学会学術集会・総会, 2016.7.21 (米子)

[図書](計0件)

[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

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

浜田 淳一 (HAMADA, Jun-ichi)  
北海道医療大学・看護福祉学部・教授  
研究者番号: 50192703

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3)連携研究者

飯笹 久 ( IIZASA, Hisashi )

島根大学・医学部・准教授

研究者番号：80306662

(4)研究協力者

( )