

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：14301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06337

研究課題名(和文) がん特異的なUCHL1-HIF-1経路制御機構解明と放射線治療効果増感への展開

研究課題名(英文) Elucidation of the upstream regulatory mechanism of UCHL1-HIF-1 pathway in cancer microenvironment and development of the pathway for enhancing radiosensitivity

研究代表者

後藤 容子 (Goto, Yoko)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：60755651

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：低酸素環境下のがん細胞は低酸素誘導性因子(HIF-1)を活性化しがんの悪性化をもたらす。申請者は、悪性固形腫瘍内部でHIF-1を活性化し、がんの悪性形質を亢進する新規遺伝子としてUCHL1を同定した。さらにUCHL1-HIF-1経路ががんの遠隔転移を担い、がん患者の生命予後不良に繋がることを明らかにしてきた。本研究ではUCHL1-HIF-1経路の制御メカニズムの解明を目指した。また、UCHL1-HIF-1経路が放射線治療抵抗性にも寄与していることを明らかにし、放射線治療増感のための有望な治療標的であることを見出した。

研究成果の概要(英文)：Cancer cells under hypoxic environment activate hypoxia-inducible factor (HIF-1), resulting in enhancing malignant phenotype. We identified UCHL1 as a novel upstream activator of HIF-1 through an original genetic screening strategy. Furthermore, we revealed that the UCHL1-HIF-1 pathway is responsible for distant metastasis of cancer and leads to poor prognosis of cancer patients. In this study, we aimed to elucidate the upstream regulatory mechanisms of the UCHL1-HIF-1 pathway. In addition, we elucidated that UCHL1-HIF-1 pathway contribute to radioresistance of cancer cells via metabolic reprogramming and proved a rational basis for targeting this pathway for radiosensitization.

研究分野：放射線生物学

キーワード：放射線治療 低酸素 HIF-1 UCHL1

1. 研究開始当初の背景

固形腫瘍においては腫瘍の増殖速度と血管形成のアンバランスから、血管から十分な酸素が供給されない低酸素領域が存在する。低酸素環境下のがん細胞は転写因子 HIF-1 を活性化し、血管新生や代謝のリプログラミング、転移・浸潤や治療抵抗性を来し、がんの悪性化をもたらす。

申請者の研究室から HIF-1 が放射線治療後のがんの再発において重要な役割を果たすことを明らかにしてきた。また、これまでに様々ながん種において、HIF-1 高発現と放射線治療後の生命予後不良との相関が報告されている。

申請者はこれまでに HIF-1 の活性化機構を解明するため、遺伝学的な手法を用いて HIF-1 活性化因子のスクリーニング実験を行い、Ubiquitin C-terminal hydrolase-L1

(UCHL1) が新規 HIF-1 活性化因子であると同定した。さらに UCHL1-HIF-1 経路ががんの遠隔転移を担い、治療標的として有用であることを明らかにしてきた (Fig. 1,2)。しかし UCHL1 の発現制御を担う上流因子については十分に解明されておらず、これらを明らかにすることは UCHL1 を予後マーカーおよび治療標的とする場合に非常に重要であると考えられる。

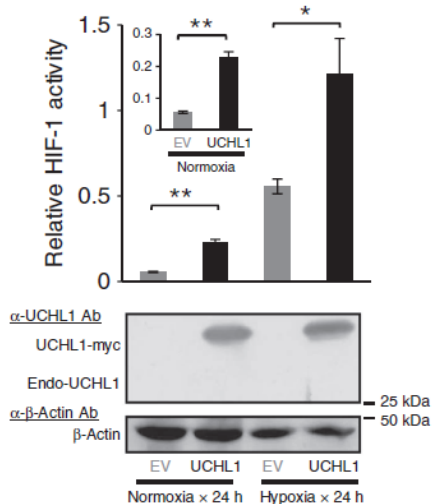


Figure 1. UCHL1 の過剰発現によって、HIF-1 活性の上昇が認められた。

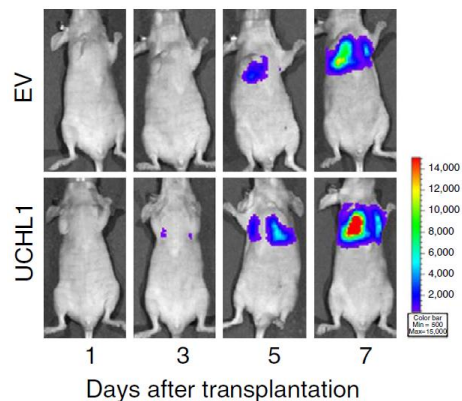


Figure 2. 恒常的にルシフェラーゼを発現するがん細胞を免疫不全マウスの尾静脈から移植し、肺における転移巣の形成を光イメージングで評価した。UCHL1 の過剰発現によって、肺に形成された転移コロニー数が有意に増加することが明らかになった。

さらに、HIF-1 が放射線治療後のがんの再発に重要な役割を果たすことから、UCHL1-HIF-1 経路が腫瘍内微小環境下で制御を受け、放射線治療後のがんの再発に寄与する可能性があるのではないかと仮説を立て、本研究を着想するに至った。

2. 研究の目的

これらの背景から、本研究において申請者は、

(1) 腫瘍内微小環境において UCHL1-HIF-1 経路が活性化されるメカニズムを解明する。さらに、(2) UCHL1-HIF-1 経路が放射線治療抵抗性に寄与するか解明する、ということを目적으로した。

これらの実験を通して UCHL1-HIF-1 経路ががんの遠隔転移のみならず、放射線治療後のがんの再発に寄与するか否かを明らかにし、がんの治療効果増感のための新たな治療法確立に寄与することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 腫瘍内微小環境において UCHL1-HIF-1 経路が活性化されるメカニズム解明の検討
腫瘍微小環境においては、血管から十分な酸

素と糖が供給されない低酸素かつ低栄養の状況が生じることが知られている。この低酸素・低グルコース環境下で UCHL1 の発現に変化が見られるか、検討を行った。

(2) UCHL1-HIF-1 経路の放射線感受性への影響検討

まず、*In vitro* のコロニー形成実験を行い、UCHL1 の発現レベルの違いにより放射線感受性に影響を及ぼすか検討した。さらに、その放射線感受性へ影響を及ぼすメカニズムの解明を行った。

4. 研究成果

(1) 腫瘍内微小環境において UCHL1-HIF-1 経路が活性化されるメカニズム解明の検討

低酸素、低グルコース培養条件下で子宮頸癌由来細胞株 HeLa を培養すると、UCHL1 遺伝子の mRNA レベルが有意に上昇することを確認した (Fig. 3)。この低酸素、低グルコース培養条件下での UCHL1 の発現上昇が HIF-1 活性上昇に影響を及ぼし、がんの腫瘍内微小環境への適応を図っているのではないかとの仮説を立て、引き続き検討を行っている。

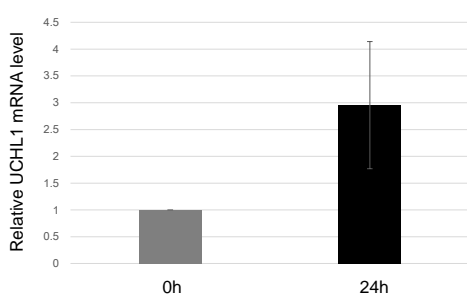


Figure 3. 低酸素・低グルコース条件下で 24 時間培養することにより、UCHL1 遺伝子の mRNA レベルの上昇がみられた。

(2) UCHL1-HIF-1 経路の放射線感受性への影響検討

まず、マウス乳がん細胞株 EMT6 を用いてコロニー形成アッセイを実施し、放射線感受性

の評価を行ったところ、UCHL1 の過剰発現によって、放射線抵抗性が誘導されることが示された (Fig. 4)。さらにその放射線抵抗性が HIF-1alpha をサイレンシングするとキャンセルされることを確認した。これらの結果より UCHL1 は HIF-1 を介して放射線抵抗性を獲得することが明らかになった。

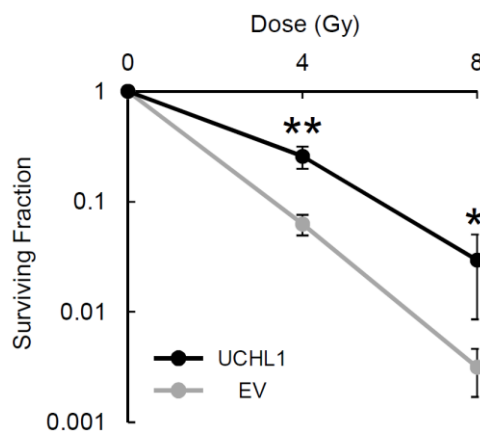


Figure 4. UCHL1 の過剰発現によって放射線抵抗性が誘導された。

HIF-1 は“Warburg 効果”として知られる酸化的リン酸化から解糖系への糖代謝経路のリプログラミングを引き起こし、抗酸化物質を産生することで放射線治療抵抗性の一因となり得ることが近年明らかになってきている。申請者は、UCHL1-HIF-1 経路が糖代謝経路のリプログラミングを介して抗酸化物質である還元型グルタチオンを産生し、抗酸化能を上昇させることで放射線治療抵抗性の一因となっているのではないかとの仮説を立て、これを検証するための実験を行った。

まず、UCHL1 の糖代謝への影響を解糖系の最終代謝産物である乳酸と、TCA サイクルの最初の代謝産物であるクエン酸、イソクエン酸について解析し、糖代謝経路の評価を行った。UCHL1 の過剰発現により乳酸は増加し、クエン酸およびイソクエン酸は減少していた。また、この変化は、HIF-1alpha をサイレンシングすることで有意に抑制された。以上

の結果より、UCHL1 は HIF-1 を介して糖代謝経路を解糖系優位な状態にリプログラミングしていることが示唆された。

さらに、UCHL1 によるこの糖代謝のリプログラミングがペントースリン酸経路を介した抗酸化物質の産生増加に繋がっているのか否かを評価した。EMT6 において UCHL1 を過剰発現させると、細胞内の NADPH、還元型グルタチオン量の上昇が認められた。この効果はペントースリン酸経路における重要な酵素である glucose-6-phosphate dehydrogenase X-linked (G6pdx) をサイレンシングすると有意にキャンセルされた。これらの結果より、UCHL1 はペントースリン酸経路依存的に NADPH の産生を促し、細胞内の還元型グルタチオン量を上昇させていることが示された。最後に、抗酸化作用を有する N-アセチルシステインを加えてコロニー形成アッセイを実施すると、UCHL1 の過剰発現による放射線抵抗性がキャンセルされることを確認した。UCHL1 が抗酸化能上昇を介して放射線抵抗性を獲得していることが明らかになった。以上の結果より、UCHL1-HIF-1 経路は、がんの遠隔転移を担うのみならず、放射線治療増感にも資する、有望な治療標的であることが示された。

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 1 件)

1. Yeom CJ, Zeng L, Goto Y, Morinibu A, Zhu Y, Shinomiya K, Kobayashi M, Itasaka S, Yoshimura M, Hur CG, Kakeya H, Hammond EM, Hiraoka M, Harada H. LY6E: A Conductor of Malignant Tumor Growth through Modulation of the PTEN/PI3K/Akt/HIF-1 Axis, Oncotarget. 2016 Aug 29

[学会発表] (計 4 件)

1. Yoko Goto, Masahiro Hiraoka, Hiroshi Harada. Tumor hypoxia and radioresistance (腫瘍内低酸素と放射線治療抵抗性について), the 29th annual meeting of the Japanese Society for Radiation Oncology (JASTRO), 2016 年 11 月 27 日、京都
 2. Yoko Goto, Masahiro Hiraoka, Hiroshi Harada. UCHL1 provides diagnostic and antimetastatic strategies due to its deubiquitinating effect on HIF-1alpha, Summer Camp for Young Scientists in Radiation Biology, 2016 年 9 月 3 日、滋賀
 3. 後藤容子. HIF-1 とがんの悪性化、治療抵抗性について 一新規 UCHL1-HIF-1 経路を中心に一、原子炉セミナー、2016 年 8 月 1 日、大阪
 4. 後藤容子. UCHL1 は HIF-1alpha の脱ユビキチン化を介して癌の遠隔転移を促進する、「幹細胞・癌・エピゲノム」に関する合同リトリート、2016 年 3 月 8 日、滋賀
6. 研究組織
- (1) 研究代表者
後藤 容子 (GOTO, Yoko)
京都大学・大学院医学研究科放射線腫瘍学・画像応用治療学・助教
研究者番号：60755651
 - (2) 研究分担者
なし
 - (3) 連携研究者
なし
 - (4) 研究協力者
なし