

令和 2 年 5 月 24 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10474

研究課題名(和文) がん細胞の低酸素応答と放射線抵抗性を担う新規遺伝子の探索； 放射線増感を見据えて

研究課題名(英文) Novel gene network responsible for hypoxic response and radioresistance of cancer cells

研究代表者

森嶋 章代 (Morinibu, Akiyo)

京都大学・生命科学研究科・研究員

研究者番号：20722648

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：悪性固形腫瘍内の低酸素領域でがん細胞が放射線抵抗性を獲得することが知られている。この問題を克服する基盤を築くため、本研究では、低酸素環境下で発現し、強力に放射線抵抗性を誘導する2つの遺伝子を見出し、その作用機序と機能を解析した。まず、ソニックヘッジホッグ経路のリガンドであるShhの発現がHIF-1依存的に低酸素環境下で増加すること、そして当該Shhタンパク質が分泌された後、線維芽細胞の増殖を惹起し、腫瘍組織内の低酸素領域を増加させ、最終的に腫瘍組織の放射線抵抗性を誘導することが明らかになった。また、低酸素刺激に応答して発現・分泌される新規遺伝子を見出し、その放射線抵抗性誘導機構を解明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究プロジェクトにより、低酸素環境下でがん細胞の放射線抵抗性を惹起する2つの遺伝子経路が同定された。当該遺伝子ネットワークを治療標的とすることで、低酸素がん細胞の放射線抵抗性を抑制し、がんの再発を抑制する新たな治療法の確立に繋がることが期待される。

研究成果の概要(英文)：It is known that cancer cells acquire radioresistance in hypoxic regions of malignant solid tumors. In order to overcome the problem, here we focused on two genes, which we found to be expressed in hypoxic environment and induce radioresistance, and analyzed their mechanism of action and function. First, we found that the expression of Shh, which is a ligand of the sonic hedgehog pathway, increased under hypoxic environment in a HIF-1-dependent manner. Shh protein was secreted from hypoxic cells, increased hypoxic fraction in tumor tissue by inducing fibroblast proliferation, and eventually enhanced radioresistance of tumor tissue. We also discovered a novel gene that is expressed and secreted in response to hypoxic stimulation, and elucidated molecular mechanism about how it induced radioresistance of hypoxic cells.

研究分野：放射線腫瘍生物学

キーワード：がん 放射線 低酸素 放射線抵抗性

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

放射線治療学・放射線腫瘍学分野においては、「ターゲット内に意図的な線量勾配を作る標的  
内同時ブースト法 (Butler et al. *IJROBP*.1999)」が確立され、放射線に抵抗性を示す腫瘍内分  
画に高線量の放射線を集中するアイデアが生まれた。しかしながら、そもそも悪性腫瘍内の何  
処で如何にしてがん細胞の放射線抵抗性が誘導されているのかは解明されておらず、高精度放  
射線治療の利点を活かし切れていないのが現状である。このような状況を改善する為には、がん細胞  
の放射線抵抗性を担う遺伝子ネットワークを明らかにし、その活性を阻害する薬剤と放射線  
を併用することが肝要である (Baumann et al. *Nat Rev Cancer*. 2016.)。

がん細胞の放射線抵抗性を左右する遺伝子として、DNA 損傷修復遺伝子や、抗酸化活性を持  
つ遺伝子、さらにはアポトーシス抑制因子が挙げられる (Begg et al. *Nat Rev Cancer*. 2015.)。  
従来の放射線腫瘍生物学に於いては、これらの遺伝子の活性を遺伝子工学的に 1 つ 1 つ抑制し  
て、放射線治療効果の増感に繋がる標的を探索してきた。しかし、この研究手法は必ずしも効率  
的とは言えず、最適な治療標的因子をゲノムワイドに探索することは不可能であった。

低酸素環境に曝されたがん細胞は、低酸素誘導性因子 1 (HIF-1) に代表される転写因子を活  
性化して、環境への適応を図る。近年の放射線腫瘍学・放射線生物学研究を通して、この細胞の  
低酸素応答機構ががん細胞の放射線抵抗性を亢進する機能を持っていることが明らかになりつ  
つある (Harada et al. *J Radiat Res*. 2016.)。しかしながら、低酸素環境を完治するセンサーと  
して HIF-1 が広く知られている一方で、低酸素環境下で活性化して放射線抵抗性の亢進を図る  
エフェクター分子は同定されていない。

このような状況下、予備的検討に実施したゲノムワイドスクリーニング実験を通して研究代表者  
は、低酸素環境下で発現する遺伝子を見出してきた (Morinibu et al. unpublished.)。これを活  
用して放射線抵抗性に関わる遺伝子ネットワークを同定できると着想し、本プロジェクトを開  
始するに至った。

### 2. 研究の目的

以下の研究を通し、放射線治療抵抗性の克服につながる新たな治療標的を同定する。

1. 低酸素環境で発現する候補遺伝子の中から、放射線抵抗性を誘導する新規遺伝子候補を絞り  
込み、その発現制御機構と放射線抵抗性を誘導する機序を分子細胞生物学的に解析する。
2. 当該遺伝子による放射線抵抗性誘導能を放射線腫瘍生物学的に検証する。

### 3. 研究の方法

本研究では、低酸素応答遺伝子群の中から「放射線抵抗性を最も強力に誘導する遺伝子」を見  
出し、がんの放射線治療抵抗性を克服する基盤を確立することを目指して研究を展開した。

予備的研究を通じて研究代表者らが準備してきた「低酸素環境下で発現する遺伝子の一覧」か  
ら、「低酸素依存的に放射線抵抗性を誘導する遺伝子」を同定した。そして分子細胞生物学、及  
び放射線腫瘍生物学研究を展開することで、当該新規遺伝子が低酸素環境下で発現するメカニ  
ズムと、放射線抵抗性を亢進するメカニズムを解析した。

本プロジェクトで動物研究を実施した際に生じた問題点に対し、以下の様に対応した。インビ  
ボの実験においては、研究の特性上、結果に大きなバラつきが生じることがある。この問題に苛  
まれた際に、免疫組織染色法に依存した従来の手法に、インビボ光イメージングを組み合わせた。  
研究代表者らは、日本に分子イメージング技術がもたらされた 2003 年から、いち早く光イメー  
ジング技術を導入し、固形腫瘍内 HIF-1 活性や低酸素領域をリアルタイムに可視化する技術を  
確立してきた (Harada et al. *Cancer Res*. 2002; Harada et al. *Mol Imaging*. 2005; Harada  
et al. *Oncogene*. 2007. など)。本プロジェクトにおいても、その経験を活かして効率的な動物  
実験を展開した。光イメージング技術を用いることで、同一個体を対象とする経時的解析が可能  
となり、個体間のバラつきによる実験誤差を最小限にできた。また使用する動物の数を抑えられ  
るという利点もあった。

### 4. 研究成果

本プロジェクトでは、低酸素環境下で発現量が増加する sonic hedge hog 遺伝子 (Shh) と、  
もう一つの新規遺伝子 (特許の関係で遺伝子名は非開示) に着目して、以下の研究成果を得た。

膵臓がん組織は、他の悪性腫瘍組織と比較して“低酸素領域”と“がん間質線維芽細胞”に富  
むことを特徴としている。前者では hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) ががん細胞の低酸  
素適応応答を惹起することで、後者ではヘッジホッグシグナル伝達経路ががん間質線維芽細胞  
の増殖を促進することで、腫瘍の悪性形質と放射線治療抵抗性が誘導されることが報告されて  
いるが、両者を結ぶメカニズムとその機能には不明な点が多い。本研究では、膵臓がん細胞株を  
低酸素条件下で培養した場合にヘッジホッグシグナル伝達経路のリガンド蛋白質 (Sonic  
hedgehog protein : SHH 蛋白質) の細胞外分泌量が増加するという予備的知見を根拠に、『HIF-1  
が膵臓がん細胞の分泌する SHH 蛋白質量を増加させ、がん間質線維芽細胞の増殖をヘッジホッ  
グシグナル伝達経路依存的に促進し、膵臓がん特有の微小環境を形成している』との仮説を立て、  
以下の研究を行った。

低酸素環境下の膵臓がん細胞において、SHH の発現量の増加に加えて、SHH 蛋白質の細胞外分  
泌効率の亢進もまた HIF-1 に依存していることを示した。加えて、分泌量の増加した SHH 蛋白質

が、パラクライン的ながん間質線維芽細胞のヘッジホッグ経路を活性化し、その増殖を促進することも示した。具体的には、抗 HIF-1 抗体で共沈降してくる SHH プロモーターを定量的 RT-PCR で解析することにより、HIF-1 タンパク質が SHH のプロモーター領域に結合していることを明らかにした。また、膵臓がん細胞において HIF-1 の主要制御サブユニット (HIF-1 $\beta$ ) をノックダウンした時に、低酸素刺激による SHH 発現量の上昇のみならず細胞外分泌効率の上昇も抑制されることを見出した。さらに、低酸素環境下で分泌量が増加した膵臓がん細胞由来の SHH タンパク質が、がん間質線維芽細胞のヘッジホッグ経路の活性を促進し、細胞増殖を加速させることを示した。

独自に実施した遺伝子スクリーニング実験を通じて、低酸素応答性に発現上昇する新規遺伝子を同定した。qRT-PCR で、複数のがん腫で当該遺伝子の mRNA 量が上記 DNA マイクロアレイ実験の結果と矛盾なく、低酸素環境下で増加していることを確認した。また、転写阻害剤アクチノマイシン D を用いた実験により、低酸素刺激下での当該遺伝子の発現量の増加が、mRNA の安定性レベルではなく転写開始レベルで制御されていることを明らかにした。次に、当該遺伝子を過剰発現させた場合に、通常酸素条件下であっても培養液中に当該遺伝子産物が分泌されたことから、当該遺伝子産物は合成後に酸素環境非依存的に細胞外に分泌される可能性が示唆された。DNA 二重鎖切断部位に集積する活性を持つ 53BP1 タンパク質の M ドメインと EGFP の融合蛋白質を発現するプラスミドを用いて DNA 二重鎖切断量を定量したところ、当該遺伝子の過剰発現により、放射線照射後の DNA 二重鎖切断量が有意に減少することを確認した。コロニー形成試験により、当該遺伝子のがん細胞の放射線抵抗性を誘導することを示唆する結果を得た。

本研究プロジェクトにより、低酸素環境下でがん細胞の放射線抵抗性を惹起する 2 つの遺伝子経路が同定された。当該遺伝子ネットワークを治療標的とすることで、低酸素がん細胞の放射線抵抗性を抑制し、がんの再発を抑制する新たな治療法の確立に繋がることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Koyasu S, Shimizu Y, Morinibu A, Saga T, Nakamoto Y, Togashi K, Harada H.	4. 巻 145
2. 論文標題 Increased 14C-acetate accumulation in IDH-mutated human glioblastoma: implications for detecting IDH-mutated glioblastoma with 11C-acetate PET imaging.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Neurooncol.	6. 最初と最後の頁 441-447
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nagao Ayako, Kobayashi Minoru, Koyasu Sho, Chow Christalle C. T., Harada Hiroshi	4. 巻 20
2. 論文標題 HIF-1-Dependent Reprogramming of Glucose Metabolic Pathway of Cancer Cells and Its Therapeutic Significance	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 238 ~ 238
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.3390/ijms20020238	査読の有無 有
オープンアクセス 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 該当する

1. 著者名 Koyasu Sho, Kobayashi Minoru, Goto Yoko, Hiraoka Masahiro, Harada Hiroshi	4. 巻 109
2. 論文標題 Regulatory mechanisms of hypoxia-inducible factor 1 activity: Two decades of knowledge	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 560 ~ 571
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.13483	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

1. 著者名 Katagiri Tomohiro, Kobayashi Minoru, Yoshimura Michio, Morinibu Akiyo, Itasaka Satoshi, Hiraoka Masahiro, Harada Hiroshi	4. 巻 9
2. 論文標題 HIF-1 maintains a functional relationship between pancreatic cancer cells and stromal fibroblasts by upregulating expression and secretion of Sonic hedgehog	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 10525 ~ 10535
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.18632/oncotarget.24156	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

1. 著者名 Katagiri Tomohiro, Kobayashi Minoru, Yoshimura Michio, Morinibu Akiyo, Itasaka Satoshi, Hiraoka Masahiro, Harada Hiroshi	4. 巻 9
2. 論文標題 HIF-1 maintains a functional relationship between pancreatic cancer cells and stromal fibroblasts by upregulating expression and secretion of Sonic hedgehog	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 10525-10535
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18632/oncotarget.24156	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

1. 著者名 Kobayashi Minoru, Morinibu Akiyo, Koyasu Sho, Goto Yoko, Hiraoka Masahiro, Harada Hiroshi	4. 巻 284
2. 論文標題 A circadian clock gene, PER2, activates HIF-1 as an effector molecule for recruitment of HIF-1 to promoter regions of its downstream genes	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 The FEBS Journal	6. 最初と最後の頁 3804 ~ 3816
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/febs.14280	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakashima Ryota, Goto Yoko, Koyasu Sho, Kobayashi Minoru, Morinibu Akiyo, Yoshimura Michio, Hiraoka Masahiro, Hammond Ester M., Harada Hiroshi	4. 巻 7
2. 論文標題 UCHL1-HIF-1 axis-mediated antioxidant property of cancer cells as a therapeutic target for radiosensitization	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 6879
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-017-06605-1	査読の有無 有
オープンアクセス 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 該当する

1. 著者名 Miki Koji, Kojima Kentaro, Oride Kazuaki, Harada Hiroshi, Morinibu Akiyo, Ohe Kouichi	4. 巻 53
2. 論文標題 pH-Responsive near-infrared fluorescent cyanine dyes for molecular imaging based on pH sensing	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Chemical Communications	6. 最初と最後の頁 7792 ~ 7795
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/c7cc03035e	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 5件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Harada H
2. 発表標題 Functions of HIF-1 in tumor hypoxia and beyond.
3. 学会等名 Bio-Group Symposium 2018 (Taipei) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 原田浩
2. 発表標題 低酸素/HIF-1バイオロジーを基軸とする放射線腫瘍生物学研究 -放生研の研究プラットフォームを交えて-
3. 学会等名 日本放射線影響学会第61回大会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 原田浩
2. 発表標題 腫瘍低酸素に係る基礎研究と臨床応用
3. 学会等名 第31回日本放射線腫瘍学会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Harada H
2. 発表標題 HIF-1 and Tumor Progression
3. 学会等名 The 24th Conference of International Union of Biochemistry and Molecular Biology (Seoul) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 原田浩
2. 発表標題 HIF-1 in tumor hypoxia and beyond.
3. 学会等名 第24回国際癌治療増感研究会学術大会（招待講演）
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>京都大学大学院生命科学研究科がん細胞生物学ホームページ  <a href="http://www.rbc.kyoto-u.ac.jp/cancer_biology/">http://www.rbc.kyoto-u.ac.jp/cancer_biology/</a></p>
---

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	小林 稔  (Kobayashi Minoru)  (40644894)	京都大学・生命科学研究科・特定助教   (14301)	遺伝学的実験と低酸素バイオロジー実験
研究分担者	原田 浩  (Harada Hiroshi)  (80362531)	京都大学・生命科学研究科・教授   (14301)	全ての実験の実施と統括の補佐
研究分担者	子安 翔  (Koyasu Sho)  (80781913)	京都大学・医学研究科・特定病院助教   (14301)	放射線生物学的研究