

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670555

研究課題名(和文) 新たなモデルマウスの創出によるがん幹細胞ニッチとしての低酸素領域の評価

研究課題名(英文) Importance of hypoxic regions as cancer stem cell niche; in vivo analyses using a novel mouse model

研究代表者

平岡 眞寛 (Hiraoka, Masahiro)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：70173218

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究で我々は、放射線腫瘍生物学的がん幹細胞が腫瘍内低酸素領域に存在している可能性を検証することを目的に、新たなモデルマウスを用いる研究を実施した。まず、低酸素誘導性転写因子HIF-1に依存してジフテリア毒素受容体を発現する遺伝子を構築、これを安定に組み込んだがん細胞を樹立して、その移植腫瘍を対象に実験を実施した。その結果、ジフテリア毒素の投与48時間後に、低酸素マーカー(ピモニダゾール)陽性細胞群がTUNEL染色陽性を示すこと、すなわちアポトーシスに陥っていることを確認した。腫瘍内低酸素がん細胞を一掃したタイミングで放射線照射を行うことによって、腫瘍増殖を劇的に遅延できる可能性を見出した。

研究成果の概要(英文)：Accumulating evidence has suggested that cancer cells acquire radioresistance in hypoxic regions of solid tumors with the help of a transcription factor, HIF-1. However, there is no direct evidence for the involvement of HIF-1-active cancer cells in tumor recurrence after radiotherapy so far. Here, we established a novel system to specifically eliminate HIF-1-active hypoxic cells from a tumor xenograft by combining a HIF-1-dependent promoter (5HRE) with a diphtheria toxin receptor (DTR) and establishing breast cancer cell line, EMT6, with the plasmid (EMT6/5HRE-DTR), and approached the problem. Immunohistochemical analyses demonstrated that, when xenografted into immunodeficient nude mice, the EMT6/5HRE-DTR stable transfectant exhibited TUNEL-positive nuclei after DT treatment in HIF-1-active hypoxic regions. Growth delay assay demonstrated a possibility that the tumor recurrence after radiotherapy is influenced by the elimination of HIF-1-active hypoxic cells from tumor xenografts.

研究分野：放射線腫瘍生物学

キーワード：がん 放射線治療 がん幹細胞 低酸素 HIF-1

1. 研究開始当初の背景

放射線腫瘍生物学分野に於いて、がん幹細胞は「放射線治療を生き延びた後に、原発腫瘍と同様に多様な細胞集団で構成される再発腫瘍を生じる能力を持つ細胞集団」と定義されている (Baumann M., Krause M., Hill R. *Nat Rev Cancer*. 8:545-554.2008)。この様な背景の中、先行研究を通して我々は、腫瘍血管から70~100ミクロン程度離れて存在する低酸素がん細胞が、放射線治療後のがんの再発を担っていることを証明し、放射線腫瘍生物学的がん幹細胞が腫瘍内低酸素領域に巣くっている可能性を指摘してきた (Harada H. et al. *Nat Commun*. 3:783. 2012)。また、放射線治療を生き延びた低酸素がん細胞が hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) という転写因子依存的に腫瘍血管に向けて移動し、がんの再発を導くことを報告してきた。

2. 研究の目的

腫瘍内の低酸素がん細胞を遺伝子工学的手法によって自在に除去できるモデルマウスを作成する。そして、放射線腫瘍生物学的幹細胞様がん細胞が腫瘍内低酸素領域に存在している可能性を検証する。また、当該細胞群の生物学的特性を明らかにすることを目的に本研究を実施した。

3. 研究の方法

低酸素環境下で活性化する転写因子 hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) を活用し、HIF-1 依存的にジフテリア毒素受容体遺伝子 (DTR) を発現するベクターを構築する。この遺伝子構築物を利用して、低酸素環境下でジフテリア依存的に死滅する遺伝子組換え細胞株樹立、これをヌードマウスに移植して固形腫瘍を形成させる。当該移植腫瘍モデルマウスにジフテリア毒素を投与して、移植腫瘍内の HIF-1 陽性低酸素がん細胞を死滅させ、そのタイミングで放射線治療を実施する。放射線治療後のがんの再発速度と再発率に、原発腫瘍内低酸素がん細胞の存在が如何なる意味を持つのかを検証する。

4. 研究成果

低酸素環境下で活性化する転写因子 hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) を活用し、HIF-1 依存的にジフテリア毒素受容体遺伝子 (DTR) を発現するベクターを構築した。この遺伝子構築物を利用して、低酸素環境下でジフテリア依存的に死滅する遺伝子組換え細胞株樹立、これをヌードマウスに移植して固形腫瘍を形成させた。当該移植腫瘍モデルマウスにジフテリア毒素を実際に投与し、移植腫瘍を摘出した。そして、ジフテリア毒素受容体や HIF-1 タンパク質を検出する免疫組織化学染色実験を実施することを通

して、HIF-1 依存的プロモーターの機能によって移植腫瘍内の低酸素領域でジフテリア毒素受容体 (DTR) の発現が誘導されていることを確認することに成功した。この担がんマウスに様々な用量のジフテリア毒素を投与して腫瘍組織を摘出、TUNNEL 染色実験を行うことにより、ジフテリア毒素の投与48時間後に、低酸素マーカー(ピモニダゾール)陽性細胞群が TUNNEL 染色陽性を示すこと、すなわちアポトーシスに陥っていることを確認した。また、固形腫瘍内部の低酸素領域において効率良く細胞死を誘導できるジフテリア毒素の投与量を最適化した。この様に腫瘍内低酸素がん細胞を一掃したタイミングで放射線照射を行うことによって、腫瘍増殖を劇的に遅延できる可能性を見出し、もって原発腫瘍内の低酸素がん細胞ががんの再発で担う役割を確認することが出来た。

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14件)

*Harada H. Hypoxia-inducible factor 1-mediated characteristic features of cancer cells for tumor radioresistance. *J Radiat Res*. pp1-7. 2016. doi: 10.1093/jrr/rrw012.

Olcina M.M., Leszczynska K., Senra J.M., Isa N., Harada H., Hammond E.M. H3K9me3 facilitates hypoxia-induced p53-dependent apoptosis through repression of APAK. *Oncogene*. 35:793-799. 2016. doi: 10.1038/onc.2015.

Koyasu S., Tsuji Y., Harada H., Nakamoto Y., Nobashi T., Kimura H., Sano K., Koizumi K., Hamaji M., Togashi K. Evaluation of tumor-associated stroma and its relationship with tumor hypoxia using dynamic contrast-enhanced CT and 18F-misonidazole PET in murine tumor models. *Radiology*. 278:734-741. 2016.

Inoue M., Yoshimura M., Kobayashi M., Morinibu A., Itasaka S., Hiraoka M., *Harada H. PLK1 blockade enhances therapeutic effects of radiation by inducing cell cycle arrest at the mitotic phase. *Sci Rep*. 5:15666. 2015. doi: 10.1038/srep15666.

Tanaka S., Harada H., Hiraoka M. A novel method to visually determine the intracellular pH of xenografted tumor in vivo by utilizing fluorescent protein as an indicator. *Biochem Biophys Res Commun*. 464:1151-1156. 2015. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.07.095.

Zeng L., Morinibu A., Kobayashi M., Zhu Y., Wang X., Goto Y., Yeom C.J., Zhao T., Hirota K., Shinomiya K., Itasaka S., Yoshimura M., Guo G., Hammond E.M., Hiraoka M., *Harada H. Aberrant IDH3alpha expression promotes malignant tumor growth by inducing

HIF-1-mediated metabolic reprogramming and angiogenesis. *Oncogene*. 34:4758-4766. 2015. doi: 10.1038/onc.2014.411.

Matsuyama T., Tanaka T., Tatsumi K., Daijo H., Kai S., Harada H., Fukuda K. Midazolam inhibits the hypoxia-induced up-regulation of erythropoietin in the central nervous system. *Euro J Pharmacol*. 761:189-198. 2015. doi: 10.1016/j.ejphar.2015.05.024.

Gaowa A., Horibe T., Kohno M., Tabata Y., Harada H., Hiraoka M., Kawakami K. Enhancement of anti-tumor activity of hybrid peptide by conjugation with carboxymethyl dextran via disulfide linkers. *Eur J Pharm Biopharm*. 92:228-236. 2015. doi: 10.1016/j.ejpb.2015.03.015.

Goto Y, Zeng L, Yeom CJ, Zhu Y, Morinibu A, Shinomiya K., Kobayashi M., Hirota K., Itasaka S., Yoshimura M., Tanimoto K., Torii M., Sowa T., Menju T., Sonobe M., Kakeya H., Toi M., Date H, Hammond E.M., Hiraoka M., *Harada H. UCHL1 provides diagnostic and antimetastatic strategies due to its deubiquitinating effect on HIF-1 α . *Nat Commun*. 6: 6153.2015. doi: 10.1038/ncomms7153.

Miki K., Kimura A., Inoue T., Matsuoka H., Harada H., Hiraoka M., Ohe K. Synthesis of Biocompatible Polysaccharide Analogues and Their Application to In Vivo Optical Tumor Imaging. *Bull Chem Soc Jpn*. 88:792-803. 2015.

Wu J.B., Shao C, Li X., Shi C., Li Q., Hu P., Chen Y.T., Dou X., Sahu D., Li W., Harada H., Zhang Y., Wang R., Zhou H.E., Chung L.W. Near-infrared fluorescence imaging of cancer mediated by tumor hypoxia and HIF1 α /OATPs signaling axis. *Biomaterials*. 35: 8175-8185. 2014. doi: 10.1016/j.biomaterials.2014.05.073.

Miki K., Hashimoto H., Inoue T., Matsuoka H., Harada H., Hiraoka M., Ohe K. Sonication-Induced Formation of Size-Controlled Self-Assemblies of Amphiphilic Janus-Type Polymers as Optical Tumor Imaging Agents. *Small*. 10: 3119-3130. 2014. doi: 10.1002/sml.201400358.

Ohnishi K., Tani T., Bando S., Kubota N., Fujii Y., Hatano O., Harada H. Plastic induction of CD133AC133-positive cells in the microenvironment of glioblastoma spheroid. *Int J Oncol*. 45: 581-586. 2014. doi: 10.3892/ijo.2014.2483.

Zhao T., Zhu Y., Morinibu A., Kobayashi M., Shinomiya K., Itasaka S., Yoshimura M., Guo G.G., Hiraoka M., *Harada H. HIF-1-mediated metabolic reprogramming reduces ROS levels and facilitates the metastatic colonization of cancers in lungs. *Sci Rep*. 4:3793. 2014. doi: 10.1038/srep03793.

原田浩, 平岡真寛. 低酸素バイオロジーで迫るがん細胞の放射線抵抗性獲得機構. 日本放射線影響学会評議員学術講演会. 東京. Mar 29. 2016.

原田浩, 平岡真寛. 低酸素バイオロジーへのいざない. 幹細胞・がん・エピゲノムに関する合同リトリート. 滋賀. Mar 7. 2016.

原田浩, 平岡真寛. がん細胞の放射線抵抗性の理解. 第2回松島シンポジウム. Mar. 4-5. 2016.

原田浩, 平岡真寛. がん細胞の糖代謝経路リプログラミングと放射線抵抗性. 奈良. Feb. 4th. 2016.

Harada H, Hiraoka M. Tumor Hypoxia; a Potent Inducer of Tumor Malignant Phenotypes. International Symposium@The 4th Military Medical University. Xi'an. China. Jan. 7. 2016.

原田浩, 平岡真寛. Importance of Hypoxic Niche; Lessons from Hypoxia and Cancer Biology. Biochemistry and Molecular Biology 2015 (BMB2015). Kobe. Dec 2. 2015.

原田浩, 平岡真寛. Molecular Biology for the Advancement of Cancer Radiotherapy; in the Past and the Future. 日本放射線腫瘍学会 第28回学術大会. 群馬. Nov. 19. 2015.

Harada H, Hiraoka M. Tumor Hypoxia, a Potent Inducer of Malignant Phenotypes of Cancer Cells. 2nd IFOM-Kyoto University Joint International Symposium. Kyoto. Oct 7. 2015.

原田浩, 平岡真寛. IDH3-HIF-1 経路によるがん細胞の糖代謝リプログラミング. 第3回癌と代謝研究会. 金沢. Jul. 16-17. 2015.

原田浩, 平岡真寛. 低酸素バイオロジーに基づく放射線治療の新展開. 日本医学放射線学会 (JRS) 中四国地方会 放射線治療懇話会 特別講演. 山口. Jun 27. 2015.

原田浩, 平岡真寛. 低酸素バイオロジー研究に於けるデータベースの活用例. 第13回がんとハイポキシア研究会. 三島. Jun. 6-7. 2015.

Harada H, Hiraoka M. Tumor Hypoxia and Radioresistance. The 15th International Congress for Radiation Research (ICRR2015). Kyoto. May 25-29. 2015.

原田浩, 平岡真寛. 低酸素生物学に基づく生体内低酸素の可視化. 第54回日本生体医工学会. 名古屋. May 7-9. 2015.

原田浩, 平岡真寛. がん幹細胞と腫瘍内低酸素 -癌の診断と治療における重要性と展望-. 第74回日本医学放射線学会. 横浜. Apr. 17-19. 2015.

原田浩, 平岡真寛. 腫瘍内低酸素領域・HIF-1活性を診る意義 -低酸素バイオロジー研究で明らかになったがんの悪性形質獲得メカニズム-. 第17回国際癌治療増感シンポジウム. 奈良. Feb. 6-7. 2015.

原田浩, 平岡真寛. がんの微小環境研究を通して同定された新たな治療標的. 第3回国際先端生物学・医学・工学会議. 名古屋. Jan 15-16. 2015.

Harada H、Hiraoka M. UCHL1 provides novel diagnostic and antimetastatic strategy due to its deubiquitinating effect on HIF-1alpha. Hypoxia Meeting, Oxford. Jul. 4. 2014.

原田浩、平岡真寛. IDH3 によるがんの代謝リプログラミング機構の解明と新たな治療法確立への展開. 第 18 回日本がん分子標的治療学会学術総会. 仙台. Jun. 26. 2014.

〔図書〕(計 2 件)

後藤容子、平岡真寛、*原田浩. 低酸素シグナル. 生体の科学. 66:394-395. 2015.

後藤容子、平岡真寛、*原田浩. 低酸素がんとを標的とした治療. Bio Clinica. 30:145-150. 2015.

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称：新規抗腫瘍剤及び新規抗腫瘍剤のスクリーニング方法

発明者：原田浩、平岡真寛

権利者：国立大学法人京都大学

種類：特許権

番号：国内出願番号 (特願 2013-521531)、国際出願番号 (JP2012064964)、国際公開番号 (WO2012176651)

特願 2011-138981 (2011.6.22) JP

出願年月日：2012 年 6 月 12 日 (国際)

国内外の別：国際

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://radiotherapy.kuhp.kyoto-u.ac.jp/>

<http://radiotherapy.kuhp.kyoto-u.ac.jp/biology/>

http://www.med.kyoto-u.ac.jp/organization-staff/research/doctoral_course/r-080/

http://www.med.kyoto-u.ac.jp/en/organization-staff/research/doctoral_course/r-080/

http://www.lif.kyoto-u.ac.jp/j/?post_type=labos&p=6923

http://www.lif.kyoto-u.ac.jp/e/?post_type=labos&p=3701

6 . 研究組織

(1)研究代表者

平岡 真寛 (HIRAOKA, Masahiro)

京都大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号： 7 0 1 7 3 2 1 8

(2)研究分担者

原田 浩 (HARADA, Hiroshi)

京都大学・白眉センター・特定准教授

研究者番号： 8 0 3 6 2 5 3 1

(3)連携研究者
なし