

令和 2 年 5 月 29 日現在

機関番号：32666

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K15627

研究課題名(和文) 低酸素応答因子HIF-1 による薬剤耐性獲得機構と癌幹細胞維持機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of molecular mechanism by HIF-1a in gefitinib-resistance acquisition in lung cancer

研究代表者

岩淵 千里 (iwabuchi, chisato)

日本医科大学・大学院医学研究科・研究生

研究者番号：20514441

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：申請者はEGFR陽性NSCLCにおけるゲフィチニブ治療においてHIF-1aの転写活性が重要である事を見出した。さらにHIF-1aを高発現させることにより腫瘍形成能、浸潤能の向上が見られることも明らかにした。さらに癌幹細胞マーカーの発現量について調べた結果、HIF-1aの転写活性依存的に変化することも捉えた。そこでマウスを用いた動物実験において、ゲフィチニブ治療で再発する腫瘍に対しHIF-1aの阻害剤であるYC-1を併用投与すると有意に腫瘍の再増殖が遅延する結果が得られた。これよりHIF-1aの転写活性を抑制することでゲフィチニブに耐性を獲得する治療群にも新たな治療法の可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

申請者が見出した、HIF-1aの転写活性を抑制することで再発した腫瘍の増殖が遅延することは今後の薬剤耐性解除の機構解析において重要な情報になると思われる。さらにゲフィチニブがオートファジー(CMA)を誘導し、それによりHIF-1aが分解されることは本研究で初めて示されたことである。これにより薬剤耐性を獲得している細胞群についてCMAを活性化することによりHIF-1aの分解を促進し薬剤耐性を解除できる可能性が示された。以上のことから、今後のEGFR陽性NSCLC治療において新たな選択肢の候補が示され、患者のQOL向上に非常に有用であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Gefitinib is specific inhibitor of EGFR-TKIs, have been found to be highly effective against the EGFR-positive NSCLC. However, many patients have resistance to gefitinib. We found that HIF1a is degraded by gefitinib at NSCLC cell lines and gefitinib degraded HIF1a in VHL-independent manner. We investigated why is HIF1a degraded by gefitinib and why is HIF1a-overexpression cell showed gefitinib-resistance. We made HIF1a-overexpression cell(RGWT), HIF1a-transcriptional inactive cell(RG803).

As a result, RGWT cell shows high resistance to gefitinib. We assessed tumorigenesis of RGWT and RG803 cell. RGWT promoted tumor growth significantly, whereas RG803 delayed tumor growth. These results suggest that transcriptional activity of HIF1a is key factor in tumor growth. The degradation of HIF1a was inhibited by Bafilomycin, and HIF1a bound to LAMP2A which were key factor of Chaperon-Mediated Autophagy (CMA). Therefore, gefitinib might induced CMA, and degraded HIF1a in VHL-independent manner.

研究分野：分子生物学

キーワード：HIF-1a 肺癌 薬剤耐性

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ゲフィチニブ(商品名:イレッサ)はEGFR 変異 NSCLC の分子標的薬として高い奏功性を示す事が知られている^①。しかし投与後、薬剤耐性を示す患者が現れることも多数報告されており、治療において大きな障壁となっている^{②③}。申請者はEGFR 陽性 NSCLC 細胞株 HCC827 や PC 9 細胞で、ゲフィチニブ処理により低酸素応答因子 HIF-1 α の発現が抑制されることを見出した。そこで本研究では HIF-1 α に着目し、研究を行った。まず、安定型変異体 HIF-1 α 発現細胞株を作製し、ゲフィチニブに対する感受性を調べた。その結果、ゲフィチニブに対する IC50 が顕著に高くなることを見出した。アポトーシス関連因子について調べた結果、活性型 caspase3 の発現が抑制されていることを見出した(図. 1)。そこで第一の研究目的として、ゲフィチニブ耐性獲得機構において HIF-1 α がどのようにアポトーシスを抑制しているのかを解析する。さらに申請者は、HIF-1 α 野生型 NSCLC 細胞株に Erk 抑制剤処理を行うと HIF-1 α が分解を受ける事を見出した。同時に、HIF-1 α の分解に必要な VHL をノックダウンした細胞にゲフィチニブ処理を行っても HIF-1 α が分解を受けることを見出した。

これよりゲフィチニブによる HIF-1 α の分解は、VHL を介さない新たな経路で分解が起きていることが示唆された。そこで HIF-1 α の新たな分解経路解明を第二の目的とした。HIF-1 α の発現が癌幹細胞の維持に重要であることは既に報告されている

④。癌幹細胞は薬剤耐性を獲得していることが知られており、その維持機構に HIF-1 α が関与していることが推察される。そこで HIF-1 α と癌幹細胞の維持機構の関係性および癌幹細胞の薬剤耐性獲得に HIF-1 α がどのように関与するのかを第三の目的とした。

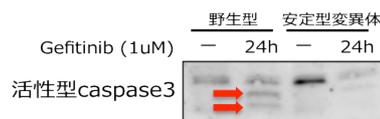


図. 1 活性型 caspase3 の発現

2. 研究の目的

＜なぜ HIF-1 α によりゲフィチニブ耐性を獲得するのか＞

NSCLC 細胞はゲフィチニブによってアポトーシス誘導因子 Bim が誘導される事、また Bim の発現を抑制するとアポトーシスが抑制される事を見出している。そこで、HIF-1 α によるアポトーシス抑制機構をより詳細に解析するため、アポトーシス誘導及び抑制する Bcl-2 ファミリー分子の発現と Bim に対する相互作用を解析する。

＜ゲフィチニブによる HIF-1 α の新たな分解経路とは＞

ゲフィチニブ処理により HIF-1 α が分解する経路についての解析は既に開始しており、現在報告されている VHL を介する経路ではないことを見出している。VHL 以外の HIF-1 α 分解候補分子となるものの探索も開始しており、HIF-1 α と候補分子が結合していることを見出している。そこで候補分子のノックダウン細胞を作製し HIF-1 α の分解にどのように影響するかを解析する。

＜HIF-1 α による薬剤耐性獲得と癌幹細胞の維持機構を解析＞

安定型変異体 HIF-1 α を発現させた細胞での癌幹細胞形成能を調べ、HIF-1 α の転写活性がどのように幹細胞の維持機構に作用しているかを解析する。さらに安定型変異体 HIF-1 α 発現株での腫瘍形成能を通常の肺癌細胞株と比較検討する。そして HIF-1 α を高発現させた癌幹細胞およびヌードマウスに移植した腫瘍内での遺伝子発現プロファイリングを行い、通常細胞との比較を行う事で分子機構を解析する。

3. 研究の方法

(1) ゲフィチニブによる Bim の誘導機構を JNK 等の FoxO3 の活性化シグナルから解析して NSCLC 細胞株でのゲフィチニブによるアポトーシス誘導機構を明らかにする。更に、Bim とマルチドメイン Bcl-2 ファミリー分子(Bcl-XL, mcl-1 等)の発現及び相互作用を安定型変異体 HIF-1 α を発現させた NSCLC 細胞解析し、HIF-1 α がどの段階でアポトーシスを抑制するか解析する。また、安定型変異体 HIF-1 α を発現させた NSCLC 細胞でのアポトーシス誘導因子の発現を細胞染色でも確認し、野生型 HIF-1 α 発現株と分子の局在変化が見られるかも確認する。さらに、HIF-1 α によるアポトーシス抑制作用が、癌幹細胞の保護に働いているかの解析を、HIF-1 α の標的分子をノックダウンして解析する。

(2) HIF-1 α の新たな分解経路については、分解経路に関わると思われる key 分子(現在 3 種類の候補がある)をノックダウンし、ゲフィチニブ処理にて HIF-1 α が分解を受けるか検討する。また、key 分子の発現変化(mRNA、ウエスタンブロット等)を安定型変異体 HIF-1 α 発現株と野生型 HIF-1 α 発現株と比較し、さらにゲフィチニブ処理による発現量の変化も比較検討する。これにより HIF-1 α による転写調節を受ける分子か検討することが出来る。また、key 分子の有無でゲフィチニブに対する感受性が変化するか否かも調べる。その後、key 分子の下流や上流

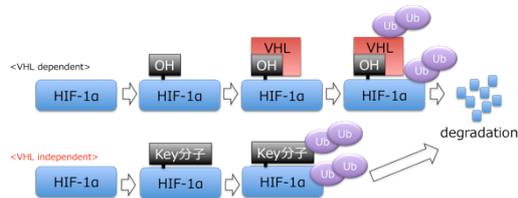


図. 2 新規 HIF-1 α 分解経路

の細胞増殖関連因子およびアポトーシス関連因子についてもウエスタンブロットや免疫沈降法などを用いて検討し、新たな分解経路を明らかにする。また、申請者は HGF 刺激を行うとゲフィチニブ処理を行っても HIF-1 α の分解が見られない事を見出していることから、HGF 刺激と新たな key 分子の関係性についても解析する。

(3) 安定型変異体 HIF-1 α を NSCLC 細胞に発現させ、癌幹細胞数を計測する。同時に、HIF-1 α のノックダウン細胞も作製し、癌幹細胞数の比較検討を行う。さらに、安定型変異体 HIF-1 α 発現株と HIF-1 α ノックダウン細胞株での癌幹細胞を回収し、遺伝子発現をジーンチップ解析により行う。これによって、それぞれの役割とシグナル経路、共通の標的、相互作用を明らかにする。加えて、安定型変異体 HIF-1 α 発現株と HIF-1 α ノックダウン細胞株をヌードマウスへ移植し、腫瘍形成能を通常の細胞株と比較検討する。HIF-1 α による癌幹細胞の維持機構を、標的遺伝子をノックダウンする事で解析する。更には、これらの転写因子による幹細胞維持や上皮間葉転換に関わる遺伝子群の発現への影響を解析する事で、直接的に癌幹細胞を制御する機構を明らかにする。更に、形成された腫瘍内での癌幹細胞を計測し、HIF-1 α 高発現による癌幹細胞への影響を調べる。さらに癌細胞を移植したヌードマウスへゲフィチニブ治療を行い、HIF-1 α をノックダウンする事で再発が抑えられるかを検討する。

4. 研究成果

(1) 安定型変異体 HIF-1 α を発現させた NSCLC 細胞株ではゲフィチニブによるアポトーシスがなぜ減少するのか検討した結果、抗アポトーシス分子である MCL1, Bcl-XL の発現量が mRNA レベルでも、タンパク質レベルでも上昇していることが明らかとなった(図. 3)。野生型の細胞株ではゲフィチニブ処理により、MCL1, Bcl-XL の分解が見られるが安定型変異体 HIF-1 α を発現させた細胞株では分解が抑えられていた。そこで、MCL1 のユビキチン化酵素および脱ユビキチン化酵素の発現量を mRNA レベルで確認した結果、安定型変異体 HIF-1 α によってこれらの酵素の発現量が変化することはなかった。さらに野生型と安定型変異体 HIF-1 α 発現細胞株に MCL1, Bcl-XL それぞれをノックダウンした細胞株を作製し、ゲフィチニブへの薬剤感受性を調べた結果、MCL1, Bcl-XL をノックダウンすると薬剤耐性が解除されることが示唆された。

以上の結果より、HIF-1 α は MCL1, Bcl-XL の発現を上昇させ、さらに安定化させることでアポトーシスを抑制しゲフィチニブへの薬剤耐性を獲得している事が示唆された。

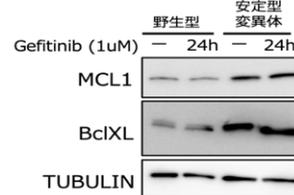


図.3 抗アポトーシス分子の発現変化

(2) ゲフィチニブによる HIF-1 α の新たな分解経路について

様々な阻害剤とゲフィチニブを併用し HIF-1 α の分解が抑制される薬剤の探索を行った結果、オートファジー阻害剤である Bafilomycin A1 で処理をするとゲフィチニブによる HIF-1 α の分解が抑制されることが明らかとなった。さらに、オートファジーの中でも Chaperon Mediated Autophagy (CMA) に注目し、CMA の key 分子である LAMP2A や HSC70 の発現量や HIF-1 α と結合するか免疫沈降法にて確認した。その結果、ゲフィチニブ処理により LAMP2A の発現上昇が見られ、さらに HIF-1 α が LAMP2a, HSC70 と結合していることが示された(図. 4, 5)。そこで VHL での分解を受けない変異体細胞株に対し LAMP2a を欠損させてゲフィチニブ処理を行った。その結果、HIF-1 α の分解が抑制されていることが示された。これよりゲフィチニブは CMA を誘導し、VHL を介さない経路で HIF-1 α の分解することが示唆された。

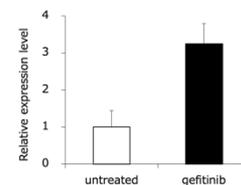


図.4 LAMP2a の発現変化

さらに HGF 刺激ではゲフィチニブによる HIF-1 α の分解が抑制していることから HGF 刺激と CMA の関係について解析した。申請者は HGF 刺激により PTEN の発現が変化していることを明らかにした。そこで PTEN 欠損 NSCLC 細胞株 H1650 でのゲフィチニブ処理による HIF-1 α の分解および CMA 関連分子の発現量について検討した結果、H1650 ではゲフィチニブ処理による HIF-1 α の分解は抑制され、CMA 関連分子の発現減少が見られた。これより PTEN の発現は CMA の誘導には重要であることが示唆された。この解析については現在も継続して行っている。

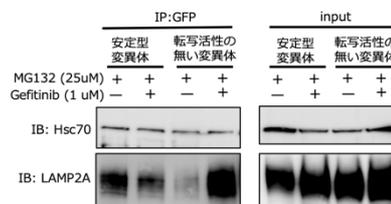


図.5 免疫沈降による HIF-1 α と CMA 分子の結合

(3) HIF-1 α の癌幹細胞への重要性

安定型変異体 HIF-1 α を発現させた NSCLC 細胞株と野生型細胞株との癌幹細胞数を比べた結果、HIF-1 α 発現細胞株の方が有意に増加した。さらに転写活性の無い HIF-1 α を発現させた細胞株を作製し、癌幹細胞数の変化を調べた結果、野生型よりも有意に減少した。また、HIF-1 α を欠損させた細胞株でも野生型と比較して有意に減少していた。これより、HIF-1 α が癌幹細胞の維持に重要であることが示唆された。そこで安定型変異体 HIF-1 α 発現細胞株、転写活性の無い HIF-1 α 発現細胞株、野生型の 3 種の細胞株について EMT 関連分子および幹細胞関連分子の発現

量の変化を調べた。その結果、NANOG, SOX2, SLUG, OCT3/4などがHIF-1 α 転写活性依存的に発現量が増減した。さらに、解糖系の制御に関する分子GFATの発現量もHIF-1 α の転写活性依存的に発現量が変化していた。

これよりHIF-1 α が幹細胞関連分子や解糖系分子の発現量を制御し、幹細胞数の増加を促進している可能性が示唆された。さらに、安定型変異体HIF-1 α を発現させたp53KOMEFRas細胞株と転写活性の無いHIF-1 α を発現させたp53KOMEFRas細胞株を作製し、HIF-1 α が腫瘍形成に与える影響について調べた。p53KOMEFRas細胞株は腫瘍形成が早く約3週間で腫瘍を形成するため、検討試験として行った。作製した2種の細胞株と野生型を合わせた3種をヌードマウスへ移植し、腫瘍形成能の変化について調べた。その結果、安定型変異体HIF-1 α を発現させたp53KOMEFRas細胞株では有意に高い腫瘍形成能を示し、転写活性の無いHIF-1 α を発現させたp53KOMEFRas細胞株では有意に低い腫瘍形成能を示した。

形成された腫瘍組織から切片を作製しHE染色を行った結果、安定型変異体HIF-1 α 発現腫瘍では筋層への高い浸潤が見られたのに対し、転写活性の無いHIF-1 α 発現腫瘍ではこのような浸潤は見られなかった。これよりHIF-1 α の転写活性は浸潤能へも寄与していることが示唆された。

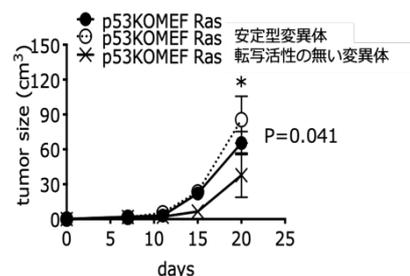


図.6 腫瘍形成能の変化

<引用文献>

- ① Oncology 2010;24:392-399
- ② Clin Lung Cancer 2009;281-289
- ③ Mol Clin Oncol 2016;488-490
- ④ Br J Cancer 2010;102(5):789-95

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 岩淵 千里、 田中 信之
2. 発表標題 転写因子HIF-1aによる薬剤耐性獲得と癌幹細胞維持機構の解析
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岩淵 千里、 田中 信之
2. 発表標題 肺癌における転写制御因子HIF-1aの薬剤耐性獲得機構と癌幹細胞維持機構の解析
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
--	---------------------------	-----------------------	----