

令和 2 年 4 月 28 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K15589

研究課題名(和文) 腫瘍内低酸素がん細胞ダイナミクスとHIF-1をターゲットとした新規治療法作製

研究課題名(英文) Development of novel therapies targeting the dynamics of tumor microenvironment and HIF-1

研究代表者

小林 稔 (Kobayashi, Minoru)

京都大学・生命科学研究科・特定助教

研究者番号：40644894

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)：低酸素領域に存在するがん細胞が放射線抵抗性を持ち、放射線治療後の再発に寄与することが知られているが、腫瘍内微小環境のダイナミックな変化に対する知見が不足していることから、腫瘍内微小環境を標的とした治療法はいまだ確立されていない。そこで我々は腫瘍内微小環境の時空間的な変化、特にHIF-1が活性化しているがん細胞の局在と動態を理解するために、HIF-1活性依存的に光標識を導入、追跡できる人工遺伝子5HREp-Lucおよび5HREp-Cre-ERT2を構築し、該当遺伝子を導入したマウスを作成した。今後このマウスを用いて腫瘍内微小環境の時空間的な変化に対する知見が得られることが期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で作成したTIGRE遺伝子座に5HREp-Lucをknock-inしたマウスを発がんモデルマウスと掛け合わせることで、刻一刻と変化する腫瘍内の低酸素領域とそこに存在するがん細胞を可視化するとともに、さらに現在作成に取り掛かっている5HREp-Cre-ERT2をknock-inしたマウスを用いることで上記した低酸素がん細胞がその後どのような運命を辿るのかを知ることが可能になる。これらのマウスを用いて、抗がん剤治療や放射線治療を行った後の低酸素がん細胞の動態を知ること、化学放射線療法や放射線多分割照射の効果を最大限に発揮することを可能とする、新たな治療戦略につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：It is known that cancer cells in hypoxic region are radioresistant and contribute to recurrence after radiotherapy. Therefore, the development of therapies that target the tumor microenvironment is desired. However, therapies targeting the tumor microenvironment have yet to be established because of the lack of knowledge about the dynamics of tumor microenvironment. In order to understand the dynamics of tumor microenvironment, especially the HIF-1 activated cells, we constructed the artificial genes 5HREp-Luc and 5HREp-Cre-ERT2, which labeled and tracked cells in a HIF-1-dependent manner. And we generated these genes knock-in mice from TIGRE locus. We expect that these mice will be used to get insight into the dynamics of tumor microenvironment.

研究分野：放射線腫瘍学

キーワード：低酸素 腫瘍内微小環境

1. 研究開始当初の背景

申請者の所属する研究室から、移植腫瘍を用いた実験で、放射線に対して高い抵抗性を持つ低酸素領域に存在するがん細胞が、腫瘍の増殖過程で日々入れ替わっていること、そして低酸素領域に存在し、放射線治療を生き延びたがん細胞が、HIF-1 活性を獲得しがんの再発を直接的に引き起こすことを報告している [1]。このような背景の下、申請者は腫瘍内低酸素部位や HIF-1 を治療ターゲットとする有効性を見出している。

しかしながら、腫瘍増殖とともに刻一刻と変化する腫瘍内微小環境のダイナミックな変化に対する知見が不足していることから、腫瘍内微小環境を標的とした有効な治療法は未だ確立されていない。また、様々な腫瘍で、低酸素領域以外でも HIF-1 が活性化していることが見出されているが [2]、低酸素以外の HIF-1 活性化機構が十分に解明されていないことから、HIF-1 を標的とした有効な治療薬の開発も遅れているのが現状である。

このことから、不均質な腫瘍内微小環境の時空間的な変化、特に HIF-1 が活性化しているがん細胞の局在と動態を理解するとともに、腫瘍増悪に寄与する HIF-1 の新規活性化因子を見出す必要がある。

2. 研究の目的

放射線治療後の再発がんが、主に原発腫瘍内の「低酸素がん細胞（血管から 70 ミクロンほど離れて存在するがん細胞）」に由来することが知られている。これまでの研究で申請者らは、腫瘍内低酸素細胞に光標識を導入できる人工遺伝子 5HREp-Cre-ERT2 と CAGp-floxed STOP-luc を構築し、「移植腫瘍内の低酸素領域に存在するがん細胞が、腫瘍の増殖過程で日々入れ替わっていること」、そして「低酸素領域に存在するがん細胞による再発に、放射線治療後に起こる HIF-1 の活性化が重要であること」を証明した [1]。この知見から、低酸素がん細胞に由来する再発を防ぐためには、低酸素がん細胞が入れ替わる動的平衡のタイムコースを明らかにし、その情報をもとにして放射線分割照射の間隔を最適化することや、放射線治療後に起こる HIF-1 の活性化を抑制する必要があることが示唆される。しかしながら、実臨床における不均質な腫瘍内で低酸素がん細胞がどのような動的平衡を持っているのかは依然として不明なままである。

そこで本研究では、移植腫瘍と比較して、より人の臨床病態に近いマウスの発がんモデルの中で、がんの再発に寄与する HIF-1 活性化がん細胞の腫瘍内ダイナミクスの情報を、我々が構築した人工遺伝子 5HREp-Cre-ERT2 を導入した遺伝子改変マウスを用いることで明らかにする。そして、得られた情報を基に、放射線分割照射プロトコルの最適化を行う。それに加えて、腫瘍再発に寄与する HIF-1 新規活性化因子のスクリーニングを行い、当該因子を阻害する薬剤を獲得する。得られた薬剤を使用することで、再発、腫瘍増悪につながる HIF-1 の活性化の抑制を目指す。これら二つの研究により得られた知見を組み合わせることで、腫瘍の放射線治療抵抗性や悪性を克服し、さらに分割照射の効果を最大限に発揮することを可能とする、新たな治療戦略へ礎を築く。

3. 研究の方法

(1) HIF 依存的な光標識マウスの構築

まず、HIF-1 依存的に部位特異的組み換えタンパク質 Cre-ERT2 を発現する 5HREp-Cre-ERT2 遺伝子を活用して、独自の遺伝子改変マウス（HIF-Cre マウス）を樹立するところから研究に着手する。当該遺伝子をマウス胚にマイクロインジェクションし、

卵移植、ファウンダーマウスの作製を行い、HIF-Cre マウスを樹立する。次に、樹立した HIF-Cre マウス を ROSA26-floxed STOP-luc マウスなどの、Cre 活性依存的に光標識が入るマウスとかけ合わせるにより、タモキシフェンの投与を引き金として、生体内で HIF-1 が活性化した部位にのみ光標識が入る動物モデルを確立する。

このマウスを、さらに自然発がんマウスモデルとかけ合わせることや、化学発がんモデルに供することで、形成される腫瘍内部でタモキシフェン投与時に HIF-1 が活性化している細胞に光標識を導入できるマウスモデルを作出する。

4. 研究成果

(1) ROSA26-5HREp-Cre-ERT2 knock-in マウスの構築

昨年度に HIF-1 依存的に部位特異的組換えタンパク質 Cre-ERT2 を発現する遺伝子 5HREp-Cre-ERT2 を、遺伝子改変マウス作出の際に導遺伝子を安全に挿入可能なセーフハーバー遺伝子座と考えられ、この領域に導入された遺伝子はほぼ全ての組織で発現することが知られている ROSA26 遺伝子座に knock-in したマウスを樹立していた。しかしながら、本マウスや本マウスから樹立した細胞において、低酸素刺激による Cre-ERT2 の発現上昇、低酸素とタモキシフェン投与による luciferase の発現誘導が確認できなかった。この結果から ROSA26 遺伝子座に導入した 5HREp が不活化された可能性が考えられる。

(2) TIGRE 遺伝子座に導入した 5HRE promoter 依存的な遺伝子発現の検討

そこで次に、別のセーフハーバー遺伝子座として知られる TIGRE 遺伝子座に遺伝子導入を行うことを考え、まず CRISPR/Cas 9 システムを用いて、Mouse embryonic fibroblast (MEF) に 5HREp-Luc、または 5HREp-Cre-ERT2 遺伝子を導入した細胞を作成し、低酸素による遺伝子発現誘導や活性の変化などを検討した。

その結果、5HREp-Luc を導入した MEF では低酸素処理による luciferase 活性の上昇が (図 1A)、5HREp-Cre-ERT2 を導入した ROSA26-floxed STOP-luc 由来の MEF では、低酸素処理による Cre-ERT2 の mRNA の発現誘導 (図 1B)、および低酸素とタモキシフェン投与依存的な luciferase 活性の上昇が確認された (図 1C)。

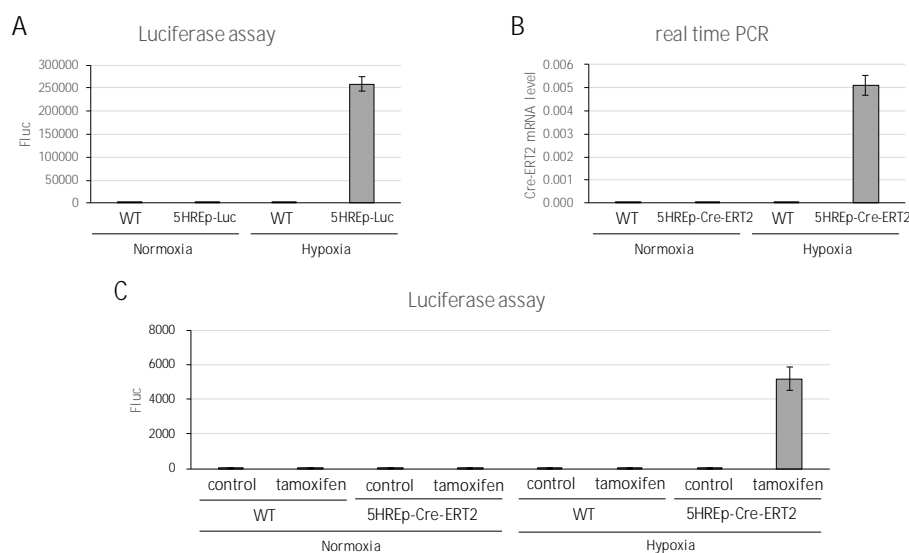


図 1. MEF を用いた TIGRE 遺伝子座に導入した 5HREp の低酸素依存的な活性の検討

A. TIGRE 遺伝子座に 5HREp-Luc を導入した MEF の低酸素処理による luciferase 活性上昇。B. TIGRE 遺伝子座に 5HREp-Cre-ERT2 を導入した MEF の低酸素処理による Cre-ERT2 mRNA 発現上昇。C. TIGRE 遺伝子座に 5HREp-Cre-ERT2 を導入した ROSA26-floxed STOP-Luc MEF の低酸素処理および tamoxifen 処理による luciferase 活性上昇

これらの結果から、TIGRE 遺伝子座が低酸素依存的に下流遺伝子の発現を誘導する 5HREp を含む人工遺伝子の導入に適していることが期待される

(3) TIGRE-5HREp-Luc knock-in マウスの構築

そこで次に、実際にマウス個体において、TIGRE 遺伝子座に導入した 5HREp が働くかどうかを確認するために、MEF に用いたのと同様に CRISPR/Cas9 システムを用いて、5HREp-Luc を TIGRE 領域に knock-in したマウスを作成した。そして当該マウスから樹立した細胞を用いて luciferase 活性の検討を行った。その結果、knock-in マウスから樹立した細胞において、低酸素刺激による luciferase 活性の上昇が確認された (図 2)。

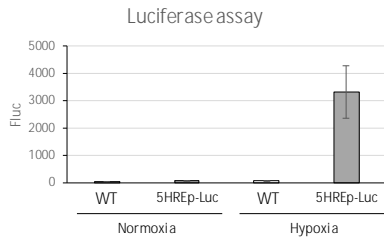


図 2. TIGRE-5HREp-Luc knock-in マウスより樹立した細胞における低酸素依存的な luciferase 活性の検討

現在 TIGRE 遺伝子座に 5HREp-Cre-ERT2 を導入したマウスを作成中である。

引用文献

1. Harada H. et al. Cancer cells that survive radiation therapy acquire HIF-1 activity and translocate towards tumour blood vessels. *Nat. Commun.* 2012 Apr 17;3:783.
2. Koyasu S. et al. Regulatory mechanisms of hypoxia-inducible factor 1 activity: Two decades of knowledge. *Cancer Sci.* 2018 Mar; 109(3): 560–571.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

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） 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4件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Minoru Kobayashi, Akiyo Morinibu, Sho Koyasu, Yoko Goto, Masahiro Hiraoka, Hiroshi Harada
2. 発表標題 A Circadian Clock Gene, PER2, Activates HIF-1 as an Effector Molecule for Recruitment of HIF-1 to Promoter Regions of Its Downstream Genes
3. 学会等名 第34回放生研国際シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Minoru Kobayashi, Tomohiro Katagiri, Masahiro Hiraoka, Hiroshi Harada
2. 発表標題 HIF-1 maintains a functional relationship between pancreatic cancer cells and stromal fibroblasts by upregulating Shh.
3. 学会等名 第77回 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Minoru Kobayashi, Akiyo Morinibu, Sho Koyasu, Yoko Goto, Masahiro Hiraoka, Hiroshi Harada
2. 発表標題 A circadian clock gene, PER2, activates HIF-1 as an effector molecule for recruitment of HIF-1 to promoter regions of its downstream genes
3. 学会等名 The 17th International Joint Mini-Symposium on Molecular and Cell Biology
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 5.Minoru Kobayashi, Akiyo Morinibu, Sho Koyasu, Yoko Goto, Masahiro Hiraoka, Hiroshi Harada
2. 発表標題 A circadian clock gene, PER2, activates HIF-1 as an effector molecule for recruitment of HIF-1 to promoter regions of its downstream genes
3. 学会等名 Keystone symposia Therapeutic Targeting of Hypoxia-Sensitive Pathways (V1) (国際学会)
4. 発表年 2018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