

平成21年 6月16日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19591655
 研究課題名（和文） 腫瘍内低酸素による肺癌細胞の脱分化と転移能亢進に対する
 HIF 阻害剤の効果の検討
 研究課題名（英文） Effect of HIF inhibitors on tumor hypoxia-induced dedifferentiation
 and metastasis of lung carcinoma cells
 研究代表者
 越川 信子（KOSHIKAWA NOBUKO）
 千葉県がんセンター（研究所）・化学療法研究部・研究員
 研究者番号・90260249

研究成果の概要：ヒト肺癌由来細胞株A549を用いて、腫瘍内低酸素状態が低酸素誘導転写因子（HIF-1およびHIF-2）を介して脱分化を誘導し、逆に幹細胞様の細胞に変化させることを見出した。また、HIF阻害剤がこれらの変化を抑制すると共に、低酸素による実験的肺転移能の亢進を抑制すること、NOD/SCIDマウス肺同所移植実験モデルにおいて、縦隔リンパ節や腋下リンパ節への転移を抑制する傾向を示すこと見出した。

交付額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2007年度 | 1,700,000 | 510,000 | 2,210,000 |
| 2008年度 | 1,200,000 | 360,000 | 1,560,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 2,900,000 | 870,000 | 3,770,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・胸部外科学

キーワード：低酸素、肺癌、脱分化、転移能、HIF 阻害剤

1. 研究開始当初の背景

がん細胞は腫瘍内で生じる低酸素環境に適応するために様々な遺伝子を発現させ、その結果、増殖能、生存能、浸潤・転移能などが大きく変化する。また、低酸素下のがん細胞は化学療法や放射線治療に抵抗性を示すためがん治療の大きな障害となっている。こ

これらの低酸素に対する細胞応答の大部分は転写因子 hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) を介した遺伝子発現に基づいているが、HIF-1 は HIF-1 α と HIF-1 β のヘテロダイマーから構成される。HIF-1 β は恒常的に発現されているのに対して、HIF-1 α は低酸素に応答して発現量が著明に増加する。従っ

て、腫瘍における HIF-1 α の発現はがんの悪性度の1つの指標として考えられている。

我々は、がん細胞の低酸素下での挙動や遺伝子発現の全体像の解明が、がん治療や転移の抑制のための分子標的の検索という意味からも重要な研究課題であるとの立場から、HIF-1 の標的遺伝子のマイクロアレイ解析と遺伝子産物の機能解析、HIF-1 α 遺伝子の転写・翻訳制御機構の解析、並びに低酸素下の肺癌細胞を標的にした治療法の開発を行ってきた。

我々は、2種類のヒト肺癌細胞株（腺癌及び扁平上皮癌由来）を低酸素下で数日間培養するとクララ細胞、1型肺胞細胞及び2型肺胞細胞の分化マーカーである CCA、AQP5 及び SP-C の発現が顕著に低下することを最近見出した。これと並行して幹細胞マーカー遺伝子である *CD133* や *Oct-4* 遺伝子の発現が亢進する一方で、*TAp63* 遺伝子の発現低下が惹起され、さらに転移能が亢進することを見出した。このことは、低酸素下で肺癌細胞が脱分化を起し、より幹細胞に近い性状を示すとともに、転移能も亢進されることを示唆している。さらに、これらの遺伝子発現の変化には HIF-1 が密接に関与しており、HIF-1 阻害効果を示す日本独自に開発された化合物 TX-402 が *in vitro* でこれらの遺伝子発現変化を抑制することを予備的に見出した。最近、世界的に HIF 活性（DNA 結合能、発現あるいはシグナル伝達）を阻害する化合物のスクリーニングが盛んに行なわれるようになってきたが、現段階ではすべて *in vitro* での知見であり、これら化合物の *in vivo* におけるがん細胞に対する効果の確認が急務となっている。このことは、分子標的治療薬の開発という観点からも大切な課題である。HIF 阻害剤単独では腫瘍の縮小効果自体はあまり期待できない。しかし、我々の実験結果は、HIF-1 活性を阻害すれば低酸素による肺癌細胞の脱分化及び転移能の亢進、すなわち悪性化の亢進を抑制できる可能性を示唆している。本研究の開始当初の背景は、現在までに開発されている TX-402 を含む HIF 阻害剤あるいはその誘導体の肺癌細胞の脱分化、転移抑制効果を動物実験レベルで解析し、HIF 阻害剤の有用性を証明し、さらなる阻害剤の開

発に結びつけようとする点であった。

2. 研究の目的

本研究課題では、

(1) ヒト肺癌細胞株が形成するがん組織内低酸素領域における分化マーカー及び幹細胞マーカー遺伝子の発現状況

(2) *In vivo* におけるこれら分化及び幹細胞マーカー遺伝子の発現に対する TX-402 を含む HIF 阻害剤の効果

(3) 低酸素によるヒト肺癌細胞の実験的転移能に対する TX-402 を含む HIF 阻害剤の効果

(4) 低酸素によるヒト肺癌細胞の自然転移に対する TX-402 を含む HIF 阻害剤の効果を検討することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 半定量的RT-PCR

A549細胞を1%酸素濃度下（低酸素下）で1～5日間培養した後、全RNAを抽出した。このRNAとoligo(dT)プライマーを用いてcDNAを合成した。作製したcDNAと肺胞分化マーカー遺伝子（CCA, AQP5, SP-C）及び幹細胞マーカー遺伝子（CD133, Oct-4）に対するプライマーセットを用いてRT-PCRを行い、発現量を比較した。対照として、 β -アクチン遺伝子の発現を用いた。

(2) 実験的転移能及び自然転移能の測定

①実験的転移能

A549細胞を1%酸素濃度下で3～5日間培養した後、ヌードマウスの尾静脈より移植し、1.5～2ヶ月後に肺表面に形成された転移巣数を計測した。

②自然転移能

NOD/SCIDマウスの腋下より、マトリゲル中に懸濁した 1×10^6 個のA549細胞を肺内に同所移植し腫瘍を形成させた。1.5～2ヶ月後に、肺を摘出し、肺内転移巣数の計測および縦隔、腋下リンパ節への転移を観察した。

(3) 腫瘍内低酸素領域における幹細胞マーカー遺伝子の発現

肺癌細胞株を皮下移植したヌードマウスに、低酸素細胞指向性薬剤であるEF5を投与した。2時間後にマウスを屠殺し肺癌組織を摘出し

た。これをOCTコンパウンド中に包埋した後、凍結切片を作製した。免疫組織染色法により、EF5陽性（低酸素）及び陰性（常酸素）領域における幹細胞マーカータンパク質の発現状況を検討し、低酸素領域と常酸素領域とで比較した。

4. 研究成果

ヒト肺癌由来培養細胞を用いて、低酸素下における遺伝子発現の検討、転移能の変化及び遺伝子発現の変化を検討した。また、HIF阻害剤TX-402の*in vitro*および*in vivo*における効果について検討した。

(1) ヒト肺癌由来細胞株A549細胞を1%酸素濃度（低酸素）下で培養し、常酸素濃度下で培養した細胞と肺胞分化マーカー遺伝子（*CCA*, *AQP5*, *SP-C*）及び幹細胞マーカー遺伝子（*CD133*, *Oct-4*）の発現をRT-PCRで比較したところ、低酸素下では*CCA*, *AQP5*及び*SP-C*の発現がいずれも低下し、逆に*CD133*及び*Oct-4*の発現が亢進することが判った。また、低酸素処理によりA549細胞の実験的肺転移能が亢進することも判った。さらに、これらの変化にはHIF-1 α 及びHIF-2 α が関与していることが明らかになった。

(2) TX-402は低酸素による上記の遺伝子発現及び転移能の変化を阻害することが明らかになった。

(3) A549細胞で皮下腫瘍を形成させたヌードマウスの腹腔内に低酸素領域に集積するEF5を投与した。採取した腫瘍から凍結切片を作製し、抗EF5抗体と抗CD133抗体を用いた免疫二重染色を行った。その結果、CD133の発現が低酸素領域で上昇していることが判った。

(4) A549細胞をNOD/SCIDマウスの肺に同所移植した自然転移動物実験モデルを用いて、TX-402が肺内転移やリンパ節転移を抑制するかどうかを検討した。NOD/SCIDマウスの腋下より、マトリゲル中に懸濁した 1×10^6 個のA549細胞を肺内に同所移植し、3日後からTX-402（0.25 mg/マウスまたは0.5 mg/マウス）あるいはコントロールとして生理的食塩水を3日毎に9回あるいは13回腹腔内に投与した。移植後49日目あるいは40日目にマウスを屠殺し肺内転移及び縦隔、腋下リン

パ節への転移を観察した。肺同所移植が成立し、評価可能なマウスについて検討したところ、腫瘍増殖はTX-402投与群と対照群において変化はなかった。肺内転移巣の数についても顕著な差は認められなかった。しかし、縦隔リンパ節や腋下リンパ節への転移はTX-402投与群において減少傾向が認められた。

以上の結果より、TX-402が低酸素によるA549細胞の脱分化および転移能の亢進を阻害することが明らかになった。また、A549細胞の肺同所移植実験系においても、TX-402がリンパ節転移を抑制する傾向が観察された。HIF阻害剤がリンパ節転移を抑制する可能性があり、今後、TX-402投与スケジュールの検討により、転移抑制効果をさらに検証する必要があると思われた。

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3件）

- ① Ishikawa K, Takenaga K, Akimoto M, Koshikawa N, Yamaguchi A, Imanishi H, Nakada K, Honma Y, Hayashi J. ROS-generating mitochondrial DNA mutations can regulate tumor cell metastasis. *Science*, 320, 661-664, 2008.
- ② Ishikawa K, Koshikawa N, Takenaga K, Nakada K, Hayashi J. Reversible re-regulation of metastasis by ROS-generating mtDNA mutations. *Mitochondrion*, 8, 339-344, 2008.
- ③ Ishikawa K, Hashizume O, Koshikawa N, Fukuda S, Nakada K, Takenaga K, Hayashi J. Enhance glycolysis induced by mtDNA mutations does not regulate metastasis. *FEBS Letter*, 582, 3525-3530, 2008.

〔学会発表〕（計6件）

- ① 竹永啓三、石川 香、秋元美穂、越川信子、山口 綾、今西泰起、中田和人、本間良夫、林 純一：ミトコンドリアND6

遺伝子の病理性ミッセンス変異による転移能の亢進. 第16回日本がん転移学会総会, 2007.7.9 富山.

- ② Koshikawa N, Ishikawa K, Akimoto M, Yamaguchi A, Imanishi H, Nakada K, Honma Y, Hayashi J-I, Takenaga K: Reversible control of metastasis by a pathogenic mtDNA mutation in ND6. 第66回日本癌学会総会, 2007.10.4 横浜.
- ③ Mochizuki S, Koshikawa N, Ohira M, Haraguchi S, Nakagawara A, Takenaga, K: Expression of cancer stem cell-related genes in hypoxia-resistant human lung adenocarcinoma A549 cells. 第66回日本癌学会総会, 2007.10.3 横浜.
- ④ 小嶋彰吾, 百武明, 越川信子, 竹永啓三. マウス由来細胞株および組織で発現する新規MCL-1 バリエーションの同定. 第67回日本癌学会学術総会, 2008.10.28. 名古屋.
- ⑤ 望月重信, 越川信子, 原口清輝, 中川原章, 竹永啓三. HIF-2 α による幹細胞マーカー*CD133* 遺伝子の発現制御. 第67回日本癌学会学術総会, 2008.10.29. 名古屋.
- ⑥ 越川信子, 石川香, 今西秦赳, 中田和人, 林純一, 竹永啓三. ROS産生を伴うミトコンドリアDNA突然変異によるヒトがん細胞の転移能の制御. 第67回日本癌学会学術総会, 2008.10.29. 名古屋.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

越川 信子 (KOSHIKAWA NOBUKO)
千葉県がんセンター (研究所)・研究局・
研究員
研究者番号: 90260249

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

竹永 啓三 (TAKENAGA KEIZO)
島根大学医学部 生命科学講座 腫瘍生
物学・准教授
研究者番号: 80260256