

令和 3 年 6 月 4 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22595

研究課題名（和文）腫瘍内微小環境依存的な浸潤を通じて放射線治療後のがん再発を起こす責任遺伝子の探索

研究課題名（英文）A novel invasion-related gene involved in tumor recurrence after radiation therapy

研究代表者

原田 浩（Harada, Hiroshi）

京都大学・生命科学研究科・教授

研究者番号：80362531

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：我々は、放射線治療後のがんの再発を引き起こす責任細胞が、主に原発腫瘍内の低酸素領域に存在していることを、低酸素がん細胞の細胞系譜実験で証明してきた。また、その再発過程で、低酸素がん細胞が腫瘍血管方向に浸潤することで、がんの再発を引き起こしていることも明らかにした。しかしながら、ここで低酸素がん細胞の浸潤能を誘導する遺伝子は同定されていない。本研究で我々は、当該遺伝子を探索するスクリーニング実験を展開し、新規遺伝子を同定した。当該遺伝子の発現が、転写開始レベルで低酸素誘導性転写因子HIF-1依存的に誘導されることを見出した。in vitroスクラッチアッセイで、浸潤を誘導する機能も確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって、低酸素がん細胞の浸潤能を担う新たな責任遺伝子を同定することが出来、かつその発現制御機構の一端が明らかになった。今後、更に発現制御機構の詳細を明らかにすることで、当該新規遺伝子の機能を阻害し、がんの浸潤能を抑制、そして放射線治療後の再発を抑える新たな治療法の確立に繋がることが期待される。

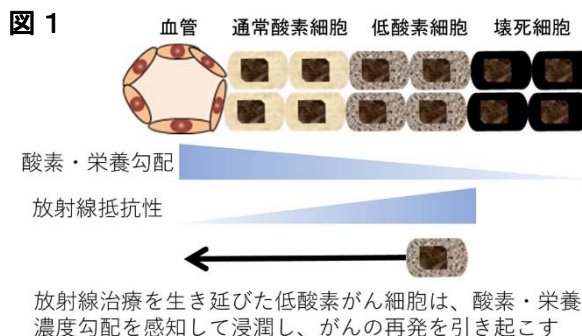
研究成果の概要（英文）：We previously demonstrated in cell lineage experiments of hypoxic cancer cells that cancer cells responsible for tumor recurrence after radiation therapy are predominantly present in hypoxic regions within a tumor tissue. It was also clarified that during the recurrence process, hypoxic cancer cells that survive radiation therapy infiltrate toward the tumor blood vessels, causing cancer recurrence. However, the gene that induces the infiltration ability of hypoxic cancer cells has not been identified yet. In this study, we developed a screening experiment to search for the gene and could successfully identify a novel gene. We found that the expression of the gene was induced at the transcription initiation level in a hypoxia-inducible transcription factor (HIF-1)-dependent manner. An in vitro scratch assay also confirmed its ability to induce invasiveness of cancer cells under hypoxia.

研究分野：がん細胞生物学、低酸素バイオロジー

キーワード：がん 低酸素 浸潤・転移関連遺伝子 放射線治療 放射線抵抗性 HIF-1

1. 研究開始当初の背景

悪性腫瘍組織内部の微小環境は不均一である。例えば、血管からの距離に応じて酸素・栄養素・増殖因子等の濃度勾配が存在する。この環境の違いが個々のがん細胞の放射線感受性・抵抗性の差異を生じることが、放射線腫瘍生物学の歴史の中で経験的に知られていた。その様な状況下で申請者らは「悪性固形腫瘍内の低酸素・低栄養領域に存在するがん細胞が放射線治療を優位に生き残り、酸素・栄養環境の良い血管近傍に浸潤して、がんの再発を引き起こす」という再発機構を解明し、この浸潤の抑制により再発を抑制できる可能性を報告してきた (Harada et al. *Nature Communications*. 2012 など)。この知見に基づく『がん細胞が酸素・栄養環境の悪い領域から良い領域へと浸潤する際に必要な未知の遺伝子を同定し、その働きを阻害する手法を考案することで、放射線治療後の再発を抑制する治療法を確立できる』と考えられた。本研究に先立って申請者らは、低酸素環境下でがんの浸潤能を亢進する遺伝子をスクリーニングする手法を確立していた。この独自の手法を活用すれば、『がん細胞の浸潤を担う責任遺伝子を同定し、当該遺伝子を阻害するユニークな放射線治療効果増感法を確立できる』と確信し、本研究を着想した。



2. 研究の目的

これまでの研究で申請者は「悪性固形腫瘍内の低酸素・低栄養領域のがん細胞が放射線治療を優位に生き残り、酸素・栄養環境の良い血管近傍に浸潤して、がんの再発を引き起こす」という『がんの再発メカニズム』を解明し、「この浸潤を阻害することで再発を抑制できること」を報告してきた (Harada et al. *Nature Communications*. 2012 ; Zhu et al. *Oncogene*. 2014)。この独自の知見に基づいて本研究で申請者は、以下の研究を展開することとした。

- ★ がん細胞が酸素・栄養環境の悪い領域から良い領域へと浸潤する際に必要な責任遺伝子を網羅的に探索し、同定した遺伝子が放射線治療後の再発で果たす機能を解明する。
- ★ 同定した遺伝子の作用機序を解明し、その働きを阻害する手法の確立に繋げる。

以上、再発を担う責任因子の同定という探索研究を基に、放射線治療効果の増強に繋がる新規治療コンセプトの確立を目指す「挑戦的かつ波及効果の大きい萌芽的研究」を展開する。

3. 研究の方法

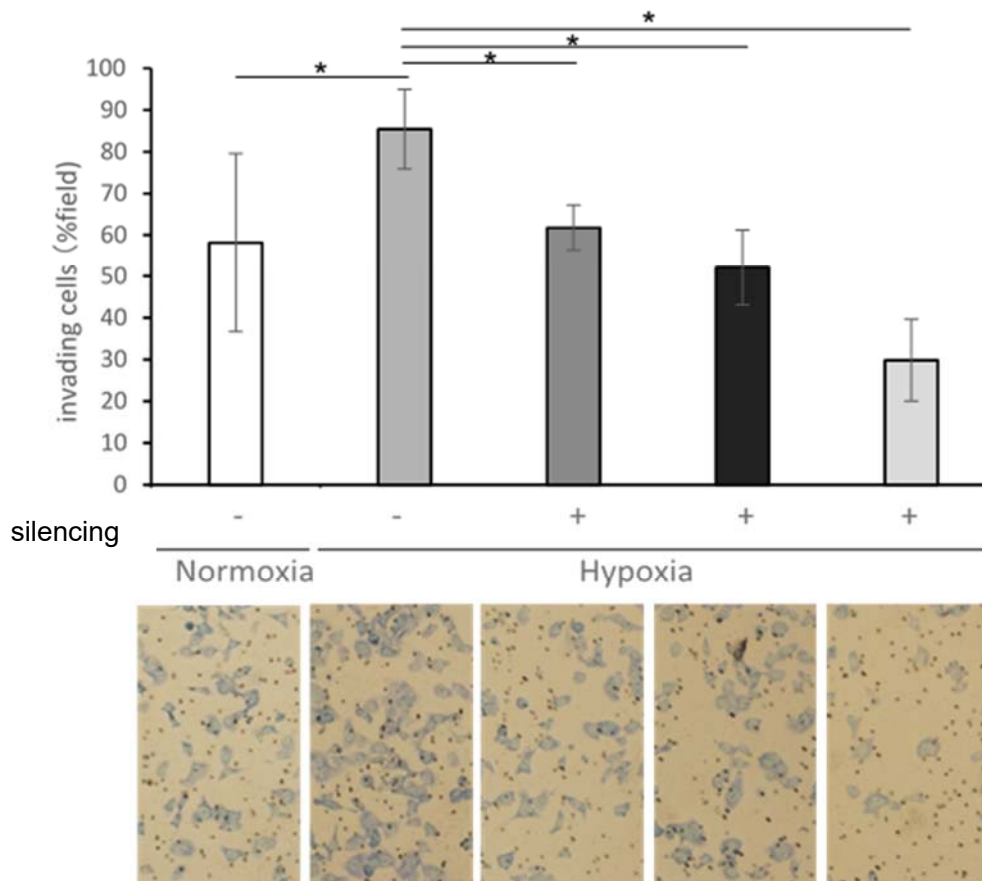
低酸素環境下でがんの浸潤能を亢進する遺伝子をスクリーニングする独自の手法を活用して、新規遺伝子を探索した。得られた遺伝子の低酸素依存性を解明するため、まず、低酸素応答のマスター転写因子の関与を検証した。次に低酸素環境下で浸潤を亢進する機能を検証した。

4. 研究成果

本研究で我々は、低酸素条件下で発現が誘導される新規浸潤関連遺伝子を見出し、その発現制御メカニズムとがん細胞の浸潤能獲得における機能を解析した。DNA マイクロアレイ解析と定量的 RT-PCR によって、同新規浸潤関連遺伝子の mRNA レベルが低酸素環境下で約 35~40 倍上方制御されることを見出した。また、ウェスタンブロット実験によってタンパク質レベルでも同新規浸潤関連遺伝子の発現が低酸素刺激依存的に誘導されることを確認した。この誘導は、HIF-1 の調節サブユニット HIF-1 α をサイレンシングすることによって有意に抑制され、逆に HIF-1 α 恒常活性化型変異体 HIF-1 α 3A の発現ベクターを導入することで通常酸素環境においても有意に促進された。これらの結果から、同新規浸潤関連遺伝子の低酸素環境下での発現誘導が、HIF-1 依存的であることが示された。次に我々は同新規浸潤関連遺伝子のプロモーターの制御下でルシフェラーゼを発現するレポーター遺伝子を用いて、HIF-1 が同新規浸潤関連遺伝子の転写を活性化する可能性を検証した。その結果、HIF-1 α 3A 変異体を過剰発現した場合に、同新規浸潤関連遺伝子のプロモーター活性が誘導されることを見出し、同新規浸潤関連遺伝子の転写開始が確かに HIF-1 の制御下にあることが確認された。同新規浸潤関連遺伝子の転写開始点から上流のプロモーターを含んだレポーター遺伝子は HIF-1 依存的にルシフェラーゼ発光を呈したが、転写開始点上流を除いたレポーター遺伝子は HIF-1 依存性を示さず、-42~+1 のプロモーター領域に HIF-1 依存性を担うエンハンサー配列 hypoxia response element (HRE) が存在することが予想された。同新規浸潤関連遺伝子のプロモーターの HIF-1 依存的な活性誘導比は約 3 倍に過ぎず、qRT-PCR で見られた約 35~40 倍の同新規浸潤関連遺伝子の mRNA 低酸素誘導比を説明で

きないことから、転写開始レベルの他に同新規浸潤関連遺伝子の発現を制御するステップが存在することが示唆された。実際、転写阻害剤アクチノマイシンDを用いて mRNA の新規合成を停止し、mRNA の安定性を定量する qRT-PCR 実験を実施した場合に、同新規浸潤関連遺伝子の mRNA が低酸素環境下で安定化することを示唆する結果が得られた。最後に、同新規浸潤関連遺伝子ががんの浸潤を誘導するかを検証するため、ボイデンチャンバーを用いた浸潤アッセイを実施した。その結果がん細胞が低酸素環境下において浸潤能を獲得すること、そして同新規浸潤関連遺伝子をサイレンシングした場合にその低酸素依存的な浸潤性が有意に阻害されることを確認した (図2)。これらの結果は、同新規浸潤関連遺伝子の発現が転写開始レベルおよび mRNA 安定性

図 2



レベルで低酸素誘導されること、および HIF-1 依存的な同新規浸潤関連遺伝子の活性化が低酸素環境におけるがんの浸潤で重要な機能を果たしていることを示している。HIF-1-同新規浸潤関連遺伝子からなる経路を治療標的として用いることでがんの浸潤を抑制し、予後不良を改善できる可能性が示唆された。また、HIF-1 や同新規浸潤関連遺伝子の活性、もしくは発現量をモニターすることで、がん患者の予後を予測することができる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Roudkenar MH, Fukumoto M, Roushandedeh AM, Kuwahra Y, Uroshihara Y, Harada H, Fukumoto M	4. 巻 72
2. 論文標題 Disturbance in the regulation of miR 17-92 cluster on HIF-1- expression contributes to clinically relevant radioresistant cells: an in vitro study	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cytotechnology	6. 最初と最後の頁 141-153
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 該当する

1. 著者名 Li Xuebing, Hattori Akira, Takahashi Senye, Goto Yoko, Harada Hiroshi, Kakeya Hideaki	4. 巻 111
2. 論文標題 Ubiquitin carboxyl terminal hydrolase L1 promotes hypoxia inducible factor 1 dependent tumor cell malignancy in spheroid models	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 239 ~ 252
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.14236	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 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 J Neurooncol	6. 最初と最後の頁 441-445
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 Suwa T, Kobayashi M, Nam JM, Harada H	4. 巻
2. 論文標題 Tumor microenvironment and radioresistance	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Experimental & Molecular Medicine	6. 最初と最後の頁 in press
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 Shirai Y, Chow CCT, Kambe G, Suwa T, Kobayashi M, Takahashi M, Harada H, Nam JM	4. 巻
2. 論文標題 An Overview of the Recent Development of Anticancer Agents Targeting the HIF-1 Transcription Factor	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 in press
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 オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計11件 (うち招待講演 11件 / うち国際学会 5件)

1. 発表者名 原田浩
2. 発表標題 低酸素と放射線の関わり.
3. 学会等名 第10回日本放射線腫瘍学会 (JASTRO) 放射線生物学セミナー (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 原田浩
2. 発表標題 放射線腫瘍学における低酸素バイオロジー.
3. 学会等名 第49回. 京都放射線腫瘍研究会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Harada H
2. 発表標題 A link between activation of HIF-1 and defect in p53 in malignant progression of cancers.
3. 学会等名 International Seminar on Stress Medicine and Precision Healthcare; from Hypoxia and DNA Damage Response to Therapeutic Intervention. National Taiwan University (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 原田浩
2. 発表標題 新規HIF-1活性化因子の発現スクリーニングで明らかになったHIF-1活性制御機構.
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 原田浩
2. 発表標題 Radioresistance of hypoxic tumor cells; Lessons from hypoxia and HIF-1 biology.
3. 学会等名 The 3rd isRTB (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 原田浩
2. 発表標題 低酸素・腫瘍生物学研究で迫る癌治療増感.
3. 学会等名 日本放射線腫瘍学会第32回学術大会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 原田浩
2. 発表標題 放射線治療効果の増強につなげる腫瘍生物学・低酸素生物学研究.
3. 学会等名 第57回日本癌治療学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Harada H
2. 発表標題 Tumor hypoxia; its influences on malignant progression and therapyresistance of cancer cells.
3. 学会等名 Special Seminar in Kobe University GraduateSchool of Medicine (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Harada H
2. 発表標題 A link between HIF-1 and defect in p53 under hypoxic stress.Core Sumposium 1: Microenvironmental Stress,
3. 学会等名 The 78th Annual Meeting ofJapanese Cancer Association (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 原田浩
2. 発表標題 低酸素がん細胞の治療抵抗性と再発を担う能動的休眠制御.
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会. (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Harada H
2. 発表標題 Radioresistance of hypoxic tumor cells; Lessons from hypoxia& HIF-1 biology and beyond.
3. 学会等名 The 16th International Congress of RadiationResearch 2019 (ICRR2019) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

京都大学大学院 生命科学研究科 がん細胞生物学（原田研究室）ホームページ
http://www.rbc.kyoto-u.ac.jp/cancer_biology/

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	森嶋 章代 (Morinibu Akiyo) (20722648)	京都大学・生命科学研究科・研究員 (14301)	
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)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------