

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K16324

研究課題名（和文）食道扁平上皮癌におけるFra-1による低酸素誘導因子カスケード制御機構の解析

研究課題名（英文）Analysis of the mechanism of hypoxia-inducible factor cascade regulation by Fra-1 in esophageal squamous cell carcinoma.

研究代表者

豊住 武司 (Toyozumi, Takeshi)

千葉大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：80645606

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：食道癌細胞株を用いたFra-1ノックダウンモデルにおけるHIF-1 発現抑制を確認し、低酸素環境下のHIF-1 の高発現、細胞機能（増殖能、遊走能、浸潤能、幹細胞化、細胞周期、EMT関連蛋白発現）変化を確認した。HIF-1 ノックダウンモデルにおける細胞機能変化抑制、5FU感受性増強を確認し、動物モデルにおいてHIF-1 高発現と腫瘍増大の相関を確認した。HIF-1 の下流制御タンパクとしてWnt/ β -catenin経路関連タンパク発現を確認し細胞株における β -cateninとHIF-1 の直接結合を明らかにした。臨床検体においてHIF-1 高発現が予後増悪因子であることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

食道扁平上皮癌におけるFra-1発現とHIF-1 発現の関連やHIF-1 の下流カスケードを明らかにした研究報告は少なく、食道扁平上皮癌の低酸素環境における分子病態学的変化についてはいまだに不明点が多い。本研究成果はFra-1の下流カスケードとしてのHIF-1 、さらにHIF-1 の下流カスケードとしてのWnt/ β -catenin経路関連タンパクの存在を明らかにし、食道扁平上皮癌の低酸素環境解析における新たな研究シーズならびに治療ターゲットを提供した。

研究成果の概要（英文）：We confirmed suppression of HIF-1 expression in a Fra-1 knockdown model using an esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) cell line, and observed high expression of HIF-1 in a hypoxic environment. In a HIF-1 knockdown model, we confirmed suppression of changes in cell function and enhancement of 5FU sensitivity. We confirmed a positive correlation between high HIF-1 expression and tumor growth using a mouse subcutaneous implantation model. We revealed that Wnt/ β -catenin pathway-related proteins are downstream regulatory proteins of HIF-1, and revealed direct binding between β -catenin and HIF-1 in ESCC cell lines. Furthermore, the results of immunostaining using preoperatively untreated esophageal cancer resection specimens showed that high HIF-1 expression is a factor that worsens the prognosis of esophageal squamous cell carcinoma.

研究分野：消化器外科

キーワード：食道扁平上皮癌 Fra-1 HIF-1 低酸素

1. 研究開始当初の背景

食道扁平上皮癌に対する Fra-1 (Fos related antigen-1) 発現の基礎的検討や Fra-1 の下流遺伝子解析は国内外においてもほとんど行われておらず、当科が世界に先駆けて研究・開発を行ってきた。また研究開始当初においていずれの癌種においても Fra-1 と HIF (Hypoxia Inducible Factor)-1 ならびに下流カスケードの関連性を明らかにした研究報告や、低酸素環境下における細胞分子学的検討を行った研究報告はなかった。食道扁平上皮癌における Fra-1 発現をターゲットにした新規治療開発検討もほとんど行われておらず、HI-1 やその下流カスケードをターゲットにした治療法開発も行われてこなかった。

2. 研究の目的

低酸素環境下における HIF-1 ならびにその下流カスケードの上流制御因子としての Fra-1 の分子病態学的意義を解明する。また低酸素環境下における Fra-1、HIF-1 ならびにその下流カスケードが食道扁平上皮癌に与える影響を探る。Fra-1 発現や機能をターゲットにした治療戦略が低酸素環境下における HIF-1 ならびに下流カスケード制御を介した新たな治療シーズになり得るかを検討する。

3. 研究の方法

- (1) 低酸素環境下の食道扁平上皮癌細胞株における Fra-1 と HIF-1 の発現解析を行った。
- (2) 低酸素環境下の食道扁平上皮癌細胞株における HIF-1 の機能解析を行った。
- (3) 食道扁平上皮癌細胞株における HIF-1 の下流カスケードとして Wnt/ カテニン経路を同定し、HIF と Wnt/ カテニン経路の関連性とそれぞれの機能解析を行った。
- (4) 食道扁平上皮癌の臨床検体と用いて HIF-1 ならびに下流カスケードとしての Wnt/ カテニン経路の臨床病理学的意義を明らかにした。

4. 研究成果

(1) 食道扁平上皮癌細胞株を用いて Fra-1 と HIF-1 の発現解析を行い、通常環境下ならびに低酸素環境下において Fra-1 発現と HIF-1 発現が正の相関関係を持つことを明らかにした。一方で Fra-1 と HIF-1 の直接的な相互作用については明らかにならなかった。

(2) 通常環境下ならびに低酸素環境下における HIF-1 の機能解析を行うために siRNA を用いた HIF-1 ノックアウト株を作成した。これらノックアウト株を用いた機能解析実験を行い、HIF-1 の高発現が増殖能、遊走能、浸潤能の促進と強く関連することを示した。さらに食道扁平上皮癌細胞株のアポトーシス誘導や細胞周期変化、EMT 関連タンパク発現とも一定の関連性をもつことを明らかにした(Figure1)。

一方でヌードマウスに食道扁平上皮癌細胞株を移植した動物モデルを用いて in vivo でも上記細胞株実験と同様の傾向が得られることを確認した。

さらに食道扁平上皮癌に対する代表的な化学療法薬剤である 5FU(Fluorouracil)を用いた実験系を用いて細胞株ならびに動物モデルにおいて HIF-1 のこの発言が5FUの治療抵抗性と関連することを明らかにした(Figure2)。

(3) 食道扁平上皮癌細胞株において HIF-1 がその下流カスケードとして Wnt/ カテニン経路を制御する可能性を見出し、基礎的検討を行った。

Co-IP(co-immunoprecipitation) などの実験系から Wnt/ カテニン経路に属するとされる TCF4(Transcription factor 4)/TCF7L2(Transcription factor 7-like 2) の promoter region に HIF-1 が直接結合しこれらを制御する可能性を明らかにした。

HIF-1 の下流カスケードとして Wnt/ カテニン経路が低酸素環境下の食道扁平上皮癌機能を制御する可能

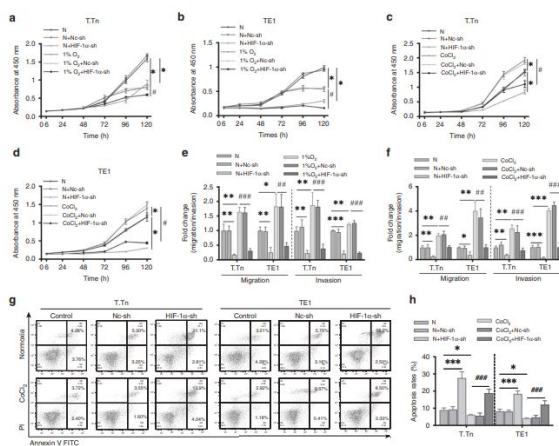


Figure1

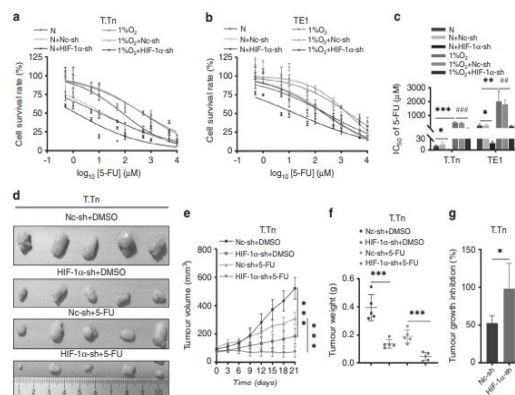


Figure2

性を示し、HIF-1 の低酸素環境応答のメカニズム候補を明らかにした。

(4) 当科が保有する術前未治療の食道扁平上皮癌切除検体に対して免疫染色を用いた臨床病理学的検討を行った。

HIF-1 ならびにその下流カスケードである Wnt/カテニン経路の TCF7L2 がそれぞれ食道上皮癌の切除後全生存率(overall survival)と相関することを明らかにした。さらに HIF-1 の高発現は食道扁平上皮癌における独立した予後不良因子であった。

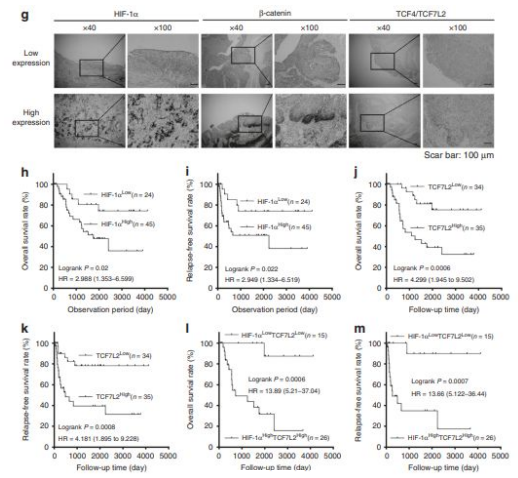


Figure3

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kang Tang, Takeshi Toyozumi	4. 巻 127
2. 論文標題 HIF-1 stimulates the progression of oesophageal squamous cell carcinoma by activating the Wnt/ -catenin signalling pathway	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 British Journal of Cancer	6. 最初と最後の頁 474-487
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41416-022-01825-3.	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3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 豊住武司
2. 発表標題 HIF-1 はWnt/ -catenin経路の亢進を介して食道扁平上皮癌の進行に関与する
3. 学会等名 第81回 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Takeshi Toyozumi
2. 発表標題 Hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) stimulates the progression of oesophageal squamous cell carcinoma by activating the Wnt/ -catenin signalling pathway.
3. 学会等名 the 18th ISDE (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 豊住武司
2. 発表標題 Hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) stimulates tumor progression of Esophageal squamous cell carcinoma by targeting Wnt/ -catenin signal pathway.
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020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
--	---------------------------	-----------------------	----

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