

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：82610

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K17233

研究課題名（和文）肺癌でのHIF-1aを介した癌幹細胞維持機構の解析

研究課題名（英文）Analysis of HIF-1a mediated cancer stem cell maintenance in lung cancer cells.

研究代表者

岩淵 千里 (Iwabuchi, chisato)

国立研究開発法人国立国際医療研究センター・研究所・疾患ゲノム研究部 研究員

研究者番号：20514441

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）：本研究課題では日本人の癌の部位別死亡順位で、常に上位にある肺癌について、癌幹細胞の維持機構に注目し研究を行った。癌幹細胞は薬剤耐性獲得・転移などに深く関与していることが報告されており、申請者はこれまでに低酸素応答因子のHIF-1aの発現上昇によって肺癌細胞が薬剤耐性を獲得すること、癌幹細胞の数が増加することを示している。そこで本研究ではHIF-1aの転写活性の有無によって癌幹細胞の維持機構が変化するかをタンパク質修飾の1つであるO-Glc-Nac修飾に着目して研究を行った。O-Glc-Nac修飾はリン酸化修飾などと同様にタンパク質の機能調節を行うことが知られており、解糖系の一環である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肺癌は男女ともに死亡率上位となる予後不良な疾患の1つである。効果的な治療法の開発は重要で急務である。本研究課題で着目した癌幹細胞は癌の転移や薬剤耐性獲得に大きく影響を及ぼす細胞である。この細胞の維持機構を破壊させることができれば薬剤耐性獲得解除や転移を防げる可能性を秘めており研究成果は多くの肺癌患者のQOLを向上させるのに有益な基礎研究の結果になると予想される。さらに他の癌においても応用が可能なかもしれない。申請者が報告してきたEGFR陽性NSCLC細胞でのHIF-1による薬剤耐性獲得機構に関する研究はこれまで報告がなく独自の研究である。

研究成果の概要（英文）：In this research project, we focused on the maintenance mechanism of cancer stem cells in lung cancer, which is one of the most common causes of cancer death in Japan. It has been reported that cancer stem cells are deeply involved in the acquisition of drug resistance and metastasis, and the applicant has previously shown that lung cancer cells acquire drug resistance and the number of cancer stem cells increases when the expression of HIF-1a, a hypoxia response factor, is upregulated. In this study, we focused on the O-Glc-Nac modification, a protein modification that is known to regulate protein function in the same way as the O-Glc-Nac oxidative modification, and is a type of glycolytic modification. It is a type of glycolytic system.

研究分野：分子生物学

キーワード：肺癌 HIF-1a 癌幹細胞

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

多くの癌における再発・転移には癌幹細胞の存在が重要であると報告されている。申請者はこれまで、肺がん(EGFR 変異 NSCLC)における薬剤耐性獲得機構の解析を行ってきた。EGFR 変異 NSCLC には分子標的薬ゲフィチニブ(商品名: イレッサ)が存在し、高い奏功性を示すことが報告されているが多くの患者で薬剤耐性を獲得することが知られている。申請者はこの薬剤耐性獲得に低酸素応答因子 HIF-1 が関与していることを見出した。HIF-1 は多くの遺伝子の転写を制御し、様々な機能活性化に関与することが報告されている。特に細胞増殖・血管新生・細胞内代謝の制御に関与しており、解糖系を亢進するのに重要であるとされている(1)。解糖系の亢進は癌幹細胞の維持に重要であると報告もあるため(2,3)、申請者は解糖系の中でもヘキソサミン酸合成経路に着目した。ヘキソサミン酸合成経路の最終性生物の UDP-Glc-Nac は多くのタンパク質を O-Glc-Nac 修飾する酵素であり、O-Glc-Nac 修飾はリン酸化と同様に多数のタンパク質で起こっており、標的タンパク質の機能活性化に関与している(図.1)。

そこで本研究課題では HIF-1 が O-Glc-Nac 修飾にどのように関与することで癌幹細胞の維持機構に働いているかを解明することとした。

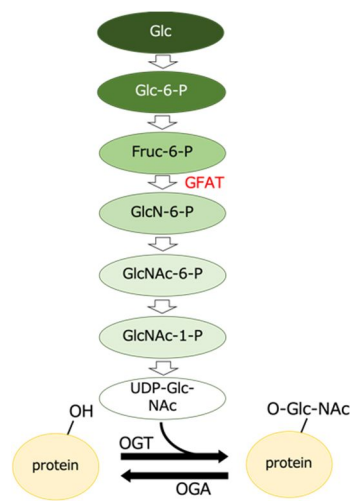


図1. O-Glc-Nac 修飾

2. 研究の目的

申請者はこれまでに、HIF-1 の転写活性の有無によって癌幹細胞の数が変化することを明らかにしている。癌幹細胞の維持に重要であると考えている O-Glc-Nac 修飾も HIF-1 の転写活性の有無によって変化することも明らかにしている。加えて O-Glc-Nac 修飾に必須な酵素 GFAT の発現変化も HIF-1 の転写活性依存的に変化することも見出した。そこで HIF-1 の阻害剤(YC-1)で処理した場合や HIF-1 knockdown 細胞へ O-Glc-Nac 活性化剤で処理した際の O-Glc-Nac 修飾の変化を調べ、HIF-1 が直接的に O-Glc-Nac 修飾を制御しているのか検討する。

これまでの報告で炎症性サイトカイン IL-8 が O-Glc-Nac 修飾を上昇させるという報告があり、IL-8 のシグナル伝達に HIF-1 が必須であることや HIF-1 から IL-8 へのフィードバックも起こることが報告されている(4)。これより癌幹細胞の維持に IL-8 シグナルがどのように関与するのか、さらに HIF-1 の転写活性がどのように関与するのかを調べる。

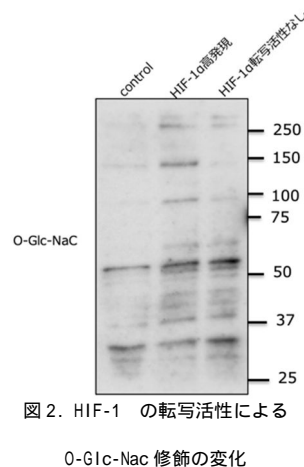


図2. HIF-1 の転写活性による O-Glc-Nac 修飾の変化

HIF-1 が O-Glc-Nac 修飾を亢進することで細胞の浸潤能へ変化を与えるかを調べる。申請者はこれまでに HIF-1 を高発現させた細胞をヌードマウスに移植すると野生型の細胞株よりも腫瘍形成能が上昇することを明らかにしている。さらに形成された腫瘍は野生型の腫瘍と比較して、筋組織への浸潤が多く見られた。そこで腫瘍形成だけでなく細胞浸潤能へも HIF-1 が影響するかを調べる。さらに O-Glc-Nac 修飾を阻害すると細胞浸潤能が変化するかも調べる。

3. 研究の方法

まず、HIF-1 の阻害剤(YC-1)で処理した細胞での O-Glc-Nac 修飾の変化をウエスタンブロットで検出する。さらに肺がん細胞での GFAT knockdown 細胞を作製し、癌幹細胞の数が変化するかを調べる。癌幹細胞に変化が見られた場合、GFAT knockdown 細胞に HIF-1 を過剰発現させ、癌幹細胞の数が回復するかを調べる。

次に、IL-8 と O-Glc-Nac 修飾との関係には IL-8 のリガンド阻害剤を使用し、IL-8 のシグナルを阻害した場合の O-Glc-Nac 修飾の変化と癌幹細胞の数の変化を調べる。そこに HIF-1 を高発現させることで癌幹細胞数に変化が見られるか捉える。

最後に細胞の浸潤能の上昇に HIF-1 が関与するかを調べるため invasion assay kit(CBA-110)を用いて O-Glc-Nac 活性化剤、HIF-1 阻害剤、O-Glc-Nac 阻害剤それぞれで処理した細胞での変化を捉える。

4. 研究成果

肺がん細胞である HCC827 細胞を使用して GFAT knockdown 細胞を作製した。癌幹細胞数の変化を調べると図3に示すように癌幹細胞数が減少した。そこで GFAT knockdown 細胞に HIF-1 を高発現させると癌幹細胞の数が有意に増加した。また、HIF-1 の転写活性がないものを

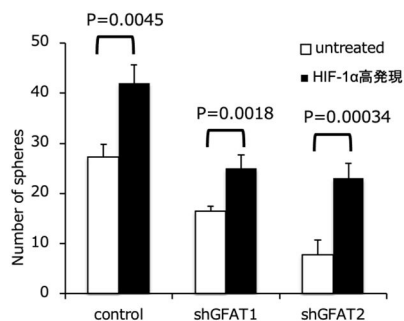


図3. GFAT knockdown 細胞株の癌幹細胞数の

高発現させても癌幹細胞の数は増加しなかった。これより癌幹細胞の増殖は、O-Glc-Nac 修飾が抑制されていても起こることが示唆され、GFAT の発現よりも HIF-1 の転写活性が重要であることが示唆された。さらに、YC-1 で処理した細胞での O-Glc-Nac 修飾を調べるとこちらも有意に減少していることが明らかとなった(図 4)。したがって HIF-1 が O-Glc-Nac 修飾を制御していることが明らかとなった。次に、IL-8 リガンド阻害剤で処理した細胞での O-Glc-Nac 修飾の変化を調べたところ、阻害剤で処理した細胞では O-Glc-Nac 修飾の上昇が見られた。さらに癌幹細胞の数の上昇も見られた。

HIF-1 の転写活性が細胞の浸潤能にどのような影響を与えるかを調べるため invasion assay を行った結果、HIF-1 阻害剤で処理した細胞では有意に浸潤能が低下した。一方で O-Glc-Nac 活性化剤で処理した細胞では浸潤能がわずかに上昇したものの、有意な差は見られなかった。

加えて IL-8 で処理した細胞での浸潤能についても検討したところ、O-Glc-Nac 活性化剤と同等の上昇度であり、有意な差は見られなかった。以上のことから細胞の浸潤能においても、O-Glc-Nac 修飾よりも HIF-1α の転写活性の有無がより顕著に影響を及ぼすことが示唆された。

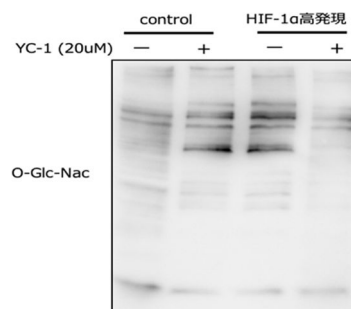


図4. YC-1 処理での O-Glc-Nac 修飾の変化

申請者はこれまで、肺がんにおける薬剤耐性獲得機構の研究を行っており、HIF-1 が高発現することで薬剤耐性を獲得し、HIF-1 の発現を抑制すると耐性が解除されることを見出している。

この耐性解除には HIF-1 阻害剤の使用も有効であったが、Chaperon-mediated-Autophagy(CMA)を活性化する薬剤でも薬剤耐性解除の効果があることを示した。CMA 活性化剤には複数での試験を行なったがいずれも同様の効果が得られた。

今回得られた結果と総合すると、HIF-1 が癌幹細胞の増殖・維持において最重要分子であることが示唆され、癌幹細胞の維持機構を破綻させるには HIF-1 阻害剤や CMA 活性化剤が有効であることが示唆された。

<引用文献>

- (1) Soeda A. et al. Oncogene. 2009
- (2) Li Z. et al. Curr Top Microbiol Immunol 2010
- (3) Teslaa T. et al. EMBO J 2015
- (4) Debangshu Samanta. et al. PNAS 2014

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 chisato iwabuchi(yoshida), nobuyuki tanaka
2. 発表標題 肺がんにおけるHIF-1 を介した薬剤耐性獲得機構の解析
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2022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
---------	---------