

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 30 日現在

機関番号：84409

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21590459

研究課題名（和文）

VEGF 阻害が浸潤形質を誘導する分子メカニズムの解明

研究課題名（英文）

Mechanism of inducing invasive phenotype after VEGF inhibition

研究代表者 井上 正宏 (INOUE MASAHIRO)

地方独立行政法人大阪府立病院機構 大阪府立成人病センター（研究所）

研究所・総括研究員

研究者番号：10342990

研究成果の概要（和文）：

VEGF シグナル阻害により腫瘍に浸潤形質が誘導される。hypoxia inducible factor (HIF) は低酸素応答を司る転写因子である。マウス膵島腫瘍モデルを用いて HIF-1 α と VEGF の重複 KO を作成したところ、VEGF 単独 KO で見られた腫瘍の浸潤形質が著しく低下していた。VEGF 欠損腫瘍では E-cadherin の発現が低下していたが、重複 KO では野生型腫瘍と同等であった。以上から血管新生阻害によってもたらされる浸潤形質には、HIF が重要であり、E-cadherin の発現変化が関与している可能性がある。

研究成果の概要（英文）：

Invasive phenotype was induced by inhibition of VEGF signaling. Hypoxia inducible factor (HIF) is a transcription factor, which regulate hypoxic response. We generated double KO mice of HIF-1 α and VEGF in islet cell tumor model mice. Invasive phenotype was remarkably reduced in DKO mice. Levels of E-cadherin expression was reduced in VEGF KO tumors but recovered in DKO mice. Thus, HIF is important for invasive phenotype after angiogenesis inhibition, and decreased E-cadherin levels might be a downstream mechanism.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：腫瘍生物学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：血管新生、浸潤、VEGF、HIF

1. 研究開始当初の背景

血管新生は癌と宿主の間に起こる現象で、個体における解析が必須である。以前、我々は自然発症膵島腫瘍モデルマウス (Rip-Tag2) において腫瘍特異的に VEGF をノックアウトし、VEGF が腫瘍の初期形成に必須であることを実証した (Inoue 2002

Cancer Cell)。その中で、VEGF ノックアウト下では腫瘍血管は劇的に減少し、腫瘍体積も著明に減少するが、残存する微小病変は周囲外分泌組織への浸潤が顕著になることを見出した。VEGF シグナル阻害剤で Rip-Tag2 マウスを治療しても、同様の現象が確認されることを報告した (Pàez-Ribes

et al. Cancer Cell, 2009)。その分子メカニズムは明らかになっていなかった。

2. 研究の目的

VEGF シグナル阻害による転移・浸潤形質の誘導の分子メカニズムを明らかにすることを目的とした。まず、血管新生阻害がもたらす還流不全による低酸素の役割を明らかにすることを試みた。hypoxia inducible factor(HIF)は低酸素応答を司る転写因子であり、血管新生阻害による浸潤形質の誘導に重要な役割を果たしている可能性がある。HIF-1 腓島特異的ノックアウトマウスと VEGF ノックアウト RIP-Tag2 マウスとの交配を行うことにより、HIF-1 の機能を検討した。腫瘍の形態学的な解析、細胞株の樹立、初代培養がん細胞を用いて、HIF-1 の下流メカニズムの解析を試みた。特に VEGF 欠損腫瘍では E-cadherin の発現が低下していることを見出していたので、E-cadherin の発現変化にも注目した。

3. 研究の方法

マウス実験は大阪府立成人病センター動物実験委員会のガイドラインに従って行った。腫瘍から腫瘍細胞を単離し、血清存在下で接着培養することにより細胞株を樹立した。腫瘍細胞の初代培養は最近我々が開発した CTOS 法 (Cancer tissue originated spheroid 法) を用いて行った (Kondo 2011 PNAS)。

免疫組織染色は、細胞増殖を BrdU 染色、細胞死を TUNEL 染色、血管密度を CD31 染色、接着因子を E-Cadherin, N-Cadherin, NCAM 染色で行った。

遺伝子の発現解析は RT-PCR 法とマイクロアレイ法で行った。

4. 研究成果

HIF-1 α 腓島特異的ノックアウトマウス (RipCre, HIF-1 α flox) と RIP-Tag2 マウスとの交配を行うことにより、HIF-1 の腫瘍発生における役割を検討した。まず、RipCre, RIP-Tag2 マウスが RIP-Tag2 マウスと比較して短命であることが明らかになった (図 1)。

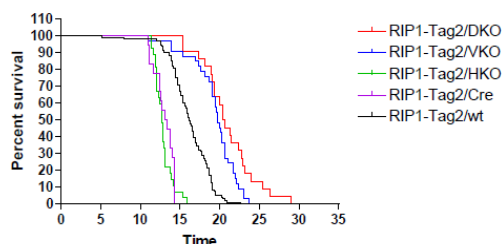


図 1 Kaplan-Myer 法による各遺伝子型マウスの寿命の比較

しかし RipCre, HIF-1 α flox, RIP-Tag2(HKO)マウスの寿命は RipCre, RIP-Tag2 マウスと同等であった。つまり、Cre の発現は RIP-Tag2 腫瘍形成を促進するが、HIF-1 α は影響しないことが明らかになった。HKO 腫瘍および HKO 腫瘍から樹立した細胞株で HIF-1 α が、ゲノム、mRNA, 蛋白レベルでノックアウトされていることを確認した。次に RipCre, Vegfflox, RIP-Tag2(DKO)マウスを作製した。DKO マウスは RipCre, Vegfflox, RIP-Tag2(VKO)マウスと同等に寿命が延長した。

13-15 週における腫瘍形成を検討した。肉眼的には VKO と同様に DKO は直径 2mm 以上の腫瘍形成はまれであった。顕微鏡的には、VKO では Wt との間に腫瘍数に差を認めなかった。つまり、腫瘍血管が減少しても、顕微鏡的サイズの病変は形成されることを示している。DKO では顕微鏡的病変のサイズが小さかった。腫瘍血管密度は VKO では Wt と比較して激減していたが、VKO と DKO の間に差はなかった。

次に増殖と細胞死を検討した。pimonidazole 染色陽性部分での BrdU の取り込みは、DKO と比較して VKO で減少していた。つまり、HIF-1 α は低酸素領域での細胞増殖を抑制していると考えられる。しかしこれは、DKO 腫瘍は VKO 腫瘍と比較して顕微鏡的サイズが小さいことの説明にはならない。TUNEL 染色による細胞死を検討したところ、DKO では VKO と比較して細胞死が増加していた。驚くべきことに、細胞死が増加していたのは pimonidazole 染色陰性部分であった (図 2)。Pimonidazole 染色が HIF-1 α の活性化部分と一致していないことが示唆されるが、HIF 欠損が VKO 腫瘍の細胞死を促進していることが明らかになった。

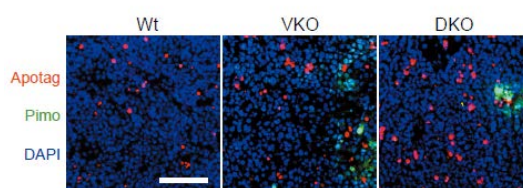


図 2 TUNEL 染色による細胞死の検討
赤 : TUNEL 陽性細胞、
緑 : pimonidazole 陽性精細胞、青 : 核

浸潤形質の頻度を検討したところ、DKO では VKO と比較して著しく低下しており、Wt と同等であった (図 3)。つまり HIF-1 α が VKO の浸潤形質に必須であることが明らかになった。

そこで、浸潤形質に関与した HIF-1 α 下流遺伝子の同定を試みた。RIP-Tag2 マウスの腫瘍発生において、接着因子が重要な役割

をすることが既に報告されている。E-cadherin を強制発現したマウスでは腫瘍のグレードが低いまま抑えられるのに対し、E-cadherin の dominant negative を強制発現したマウスでは浸潤・転移が促進する。逆に N-cadherin あるいは NCAM を強制発現すると転移が促進する。そこでこれら接着因子に着目して VEGF 欠損腫瘍を解析したところ、E-cadherin と N-cadherin、NCAM の発現が低下している腫瘍の割合が増え、低下は E-cadherin と N-cadherin、NCAM で相補的であった。DKO で接着因子の発現の変化を検討したところ、E-cadherin の発現は Wt と同等であった (図4)。

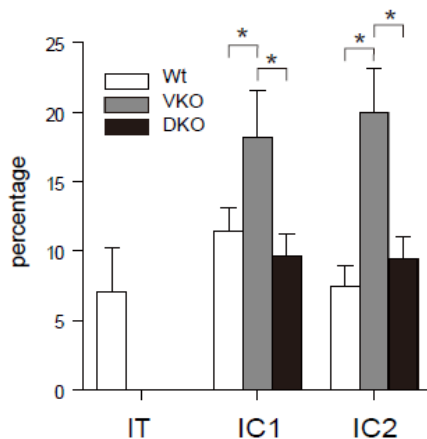


図3 浸潤形質を示す腫瘍数の比較
IT: islet tumor(adenoma),
IC1: moderately invasive carcinoma,
IC2: highly invasive carcinoma

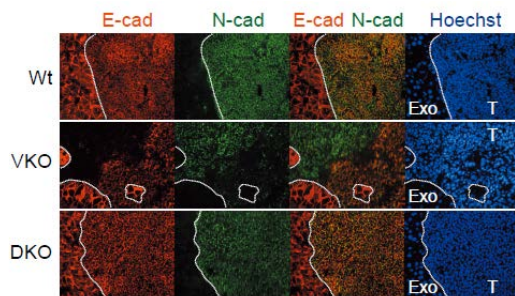


図4 接着因子の発現変化
E-cad: E-cadherin, N-Cad: N-Cadherin,
EXO: exocrine tissue, T: tumor
腫瘍辺縁を点線でトレースしている。

樹立した細胞株や初代培養細胞では短期間の低酸素暴露では接着因子の発現変化は観察されなかった。すなわち、接着因子の発現変化は、低酸素による HIF-1 α の活性化とそれに伴う直接的・急性期の転写誘導によるものではなく、間接的・慢性期の変化、

たとえば低酸素耐性クローンの選択などに関与した可能性がある。

本研究では HIF-1 α が慢性期の応答を支配していることが明らかになった。低酸素応答では急性期応答のみならず慢性期応答も重要な役割を果たしていることを示すことができた意義は大きい。しかし、慢性的・間接的な役割のメカニズムを解明することは困難であり、本研究でもそのメカニズムを解明するには至らなかった。

本研究では我々が新たに開発した初代癌細胞培養法を初めてトランスジェニックマウスの腫瘍モデルに応用した。その結果 HIF-1 α 欠失によってみられる現象は、HIF-1 α の急性期応答ではないことを明らかにすることができた。しかし、膵島腫瘍では未だ長期培養ができず、慢性期応答の解析には用いることができなかった。また、遺伝子導入が困難であることから、in vitro の遺伝子改変による解析が困難であった。今後これらの問題点を解決すれば、in vivo での現象のメカニズムの解析を in vitro で行う上で重要な手法になると考えられる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計5件)

- ① 奥山裕照, 井上正宏. 低酸素環境における遺伝子制御. THE LUNG-perspectives(査読無) 2012; 20(1): 69-74.
- ② Xie L, Duncan MB, Pahler J, Sugimoto H, Martino M, Lively J, Mundel T, Soubasakos M, Rubin K, Takeda T, Inoue M, Lawler J, Hynes RO, Hanahan D, Kalluri R. Counterbalancing angiogenic regulatory factors control the rate of cancer progression and survival in a stage-specific manner. Proc Natl Acad Sci USA (査読有) 2011; 108(24): 9939-44. DOI:10.1073/pnas.1105041108
- ③ Sato Y, Endo H, Okuyama H, Takeda T, Iwahashi H, Imagawa A, Yamagata K, Shimomura I, Inoue M. Cellular hypoxia of pancreatic beta-cells due to high levels of oxygen consumption for insulin secretion in vitro. J Biol Chem (査読有) 2011; 286(14): 12524-32. DOI:10.1074/jbc.m110.194738.
- ④ 奥山裕照, 井上正宏. 低酸素環境と Cancer Dormancy. 癌と化学療法(査読無) 2011; 38(10): 1559-1564.
- ⑤ 井上正宏. 低酸素と血管新生阻害療法抵抗性. 細胞工学(査読無) 2010; 別冊: 192-5.

〔学会発表〕(計 11 件)

- ① 井上正宏. VEGF 阻害がもたらす急性期・慢性期の腫瘍形質変化. AVASTIN Breast Cancer 適応拡大記念講演会. 2012 年 2 月 10 日. ホテルテラスザガーデンホテル水戸
- ② 井上正宏. がんの低酸素応答. 平成 23 年度北海道大学遺伝子病制御研究所共同研究集会. 2011 年 9 月 6 日. 北海道大学
- ③ Takaaki Takeda, Hiraoaki Okuyama, Shuhei Tomita, Yasuko Nishizawa, Masahiro Inoue. Hif-1 α is necessary for invasive phenotype after angiogenesis inhibition. 第 8 回がんとハイポキシア研究会. 2011 年 1 月 30 日. 北海道大学
- ④ 井上正宏. がんをとりまく微小環境の役割. 第 69 回日本癌学会学術総会. 2010 年 9 月 23 日. リーガロイヤルホテル大阪
- ⑤ Takaaki Takeda, Hiraoaki Okuyama, Yasuko Nishizawa, Masahiro Inoue. HIF-1 α is necessary for changes of adhesion molecules and invasive phenotype after angiogenesis. 第 69 回日本癌学会学術総会. 2010 年 9 月 22 日. リーガロイヤルホテル大阪
- ⑥ 井上正宏. Vegf 遺伝子欠損マウス膝島腫瘍における浸潤形質と接着因子発現の変化. 第 19 回日本がん転移学会学術集会・総会. 2010 年 6 月 16 日. 金沢市文化ホール
- ⑦ 井上正宏. Inhibition of angiogenesis in cancer therapy. XXth World Congress of the International Society for Heart Research 2010 Kyoto. 2010 年 5 月 16 日. 国立京都国際会館
- ⑧ 井上正宏. Hypoxia inducible factor-1 α is necessary for invasive phenotype due to angiogenesis inhibition. 第 68 回日本癌学会学術総会. 2009 年 10 月 2 日. パシフィコ横浜
- ⑨ 井上正宏. 癌の低酸素応答と分子標的治療. 癌治療開発を目指した最前線セミナー. 2009 年 9 月 7 日. 秋葉原 UDX
- ⑩ 井上正宏. VEGF 阻害による浸潤形質の誘導. 第 18 回日本がん転移学会学術集会/総会. 2009 年 7 月 23 日. 旭川グラントホテル
- ⑪ 井上正宏. 血管新生阻害による腫瘍内低酸素. 第 13 回日本がん分子標的治療学会学術集会. 2009 年 6 月 26 日. ホテルクレメント徳島

〔その他〕

成人病センター研究所ホームページに掲載
<http://www.mc.pref.osaka.jp/omc2/biochemistry.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井上 正宏 (INOUE MASAHIRO)
地方独立行政法人大阪府立病院機構
大阪府立成人病センター (研究所)・
研究所・総括研究員
研究者番号: 10342990

(2) 研究分担者

遠藤 洋子 (ENDO HIROKO)
地方独立行政法人大阪府立病院機構
大阪府立成人病センター (研究所)・
研究所・研究員
研究者番号: 20359300

奥山 裕照 (OKUYAMA HIROAKI)
地方独立行政法人大阪府立病院機構
大阪府立成人病センター (研究所)・
研究所・総括研究員
研究者番号: 50432373