

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 3 月 31 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790158

研究課題名（和文）癌組織の低酸素環境を標的とする、新規の時間遺伝子治療法の開発

研究課題名（英文） Development of a new hypoxia -targeting chrono-gene therapy in cancer.

研究代表者

松永 直哉（Matsunaga Naoya）

九州大学・薬学研究院・助教

研究者番号：10432915

研究成果の概要（和文）：

癌組織内では正常組織と比較し、新生血管の構造異常や間質圧上昇によって低酸素環境下におかれている。そのため癌組織は、低酸素環境下に適応し生存、増殖を可能とするための様々な因子を発現する。低酸素環境下にある細胞内では、転写促進因子(HIF)と遺伝子のプロモーター上に存在する低酸素応答配列(HRE)による低酸素環境下特有の遺伝子発現機構が存在する。また、この転写機構には日周リズムが存在し、癌組織の恒常性を制御し癌の進行を促している。本研究では、癌組織での低酸素遺伝子発現リズム機構を応用し、癌組織への選択性また発現増強を指向した遺伝子発現システムを構築する。そして癌を標的とする新規の時間遺伝子治療法の開発を行う。実験計画として癌組織の低酸素環境応答性の遺伝子発現ベクターの作製および機能評価の検討および至適投与方法の構築をめざした。

これまでに癌細胞の低酸素環境下において、発現が亢進する遺伝子を数種同定している。これら遺伝子上流に存在する HRE 配列を合成し、サイトメガロウイルス (CMV) プロモーターの上流に挿入し、低酸素感受性遺伝子発現ベクター (HRE-CMV-vector) を作製した。機能評価を行った結果、低酸素においてプロモーター活性が増強された。また新規ベクターに shRNA 配列を導入したベクターを作成し、抗腫瘍効果が認められるか否かを、腫瘍移植モデルマウスを用いて評価した。その結果、低酸素応答配列を有しないコントロールベクターと比較し、低酸素応答ベクターの抗腫瘍効果は増大した。また、抗癌タンパク NK4 の低酸素感受性遺伝子発現ベクターを作製し、抗腫瘍効果を測定した結果、低酸素応答ベクターの抗腫瘍効果は増大した。本研究より、新規の低酸素応答ベクターは、通常の発現ベクターと比較し、抗腫瘍効果を増強できることを初めて立証し、低酸素環境の時刻依存的な変化に対応した遺伝子治療を可能とするツールを開発した。

研究成果の概要（英文）：

Tissue specific gene expression occurs throughout specific transcriptional factor and corresponding response element. CMV promoter is one promoter of type II RNA polymerase which endogenously transcript mRNA tissue-specifically. Then, CMV promoter was selected as a basal promoter. In this study, hypoxia response HRE-CMV

promoter was constructed and HRE-CMV driven anti-tumor plasmid vectors were evaluated its anti-tumor effect in tumor bearing mice.

In the first, HRE-CMV promoter was constructed and evaluated the response under hypoxic condition. HRE-CMV promoter contained four HREs derived from glycolytic related genes. The mRNA expression of glycolytic related genes were promoted in 1% O₂ condition regardless cell types. HRE-CMV promoter had a high transcriptional activity hypoxic conditional-dependently throughout inserting HRE oligonucleotide. HRE-CMV promoter constructed in this study could express downstream genes in wide range of cell types.

In the second, HRE-CMV promoter driven NK4 expression vector was constructed and evaluated its anti-tumor effect in U251 bearing mice. HRE-CMV-NK4 vector suppressed tumor growth strongly compared to CMV-NK4 vector in U251 bearing mice. HRE-CMV-NK4 vector suppressed HGF/c-Met signaling strongly for a long-term compared to CMV-NK4 vector, which was correlated with NK4 protein expression. The high expression of NK4 from HRE-CMV promoter was also confirmed in cultured cells.

In the third, HRE-CMV promoter driven bcl-2 shRNA expression vector was constructed and evaluated its anti-tumor effect in Colon-26 bearing mice. HRE-CMV-shbcl-2 vector induced apoptosis throughout bcl-2 mRNA knockdown and suppressed tumor growth strongly compared to CMV-shbcl-2 vector in Colon-26 bearing mice. HRE-CMV promoter expressed shRNA efficiently compared to CMV promoter in CoCl₂-treated Colon-26 cells. Moreover, the shRNA expression activity from HRE-CMV promoter was comparable levels compared to CMV promoter in non-CoCl₂-treated Colon-26 cells. These results suggest that inserting HRE oligonucleotide activates shRNA expression in hypoxic tumor and affect little gene expression under normoxic condition.

In conclusion, the constructed HRE-CMV promoter could apply to express several anti-tumor genes downstream of HRE-CMV promoter because almost plasmid vectors enable to insert thousands bases pairs of optional genes. HIF-1/HRE transcriptional factor is correlated with tumor grade and participates in tumor growth and aggravation in 70% of human cancers, especially solid tumor. Therefore, HRE-CMV promoter could widely apply to the treatment for many cancers. In gene therapy, the enhancement of tissue specific gene expression could not only obtain high therapeutic results but also avoid adverse effects. These results may contribute to investment of more efficiency and safety for gene therapy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医療薬学

科研費の分科・細目：6806, 薬学・医療系薬学

キーワード：c, 医療薬剤学

1. 研究開始当初の背景

近年、癌組織の周辺の微小環境が、癌細胞の生存や増殖を制御し、また浸潤や転移のしやすさに深く関与していることが明らかと

なってきた。またこの癌の微小環境は、癌幹細胞の生存や分裂を制御するニッチとして重要であり、癌の微小環境を制御することが癌治療における新しい標的として着目されている。(Das, B. et al; Stem Cells

26,1818,2006)癌の微小環境は低酸素、低 pH、低グルコースなどで特徴づけられ、固形癌では癌細胞の無秩序な増殖により、非常に不規則な血管新生を引き起こし、癌組織内で虚血となる部位が生じる。(Harris, A. et al;Cancer 2, 38,2002,Vaupel, P. et al;Cancer Res 49,6449,1989)この低酸素環境下にある癌細胞は、癌の悪性や癌治療の抵抗性に重要であることが明らかとされてきている。癌細胞はこの低酸素環境下に適応し、生存、増殖をするための様々な因子を発現する。この発現を制御している転写因子として HIF-1(hypoxia induced factor-1)と、標的遺伝子上の結合配列である HRE(hypoxia response element)が重要であることが明らかとされ、HIF-1 を標的とする抗癌剤の開発が行われている。(Wang,G. et al;PNAS 92,5510,1995)しかしながら、腫瘍組織の多様性により低酸素環境を標的とする創薬は、乗り越えるべき多くの課題が存在する。

2. 研究の目的

本研究は、癌組織における低酸素環境特有の転写リズム機構に着目し、この転写リズム機構を応用した癌組織を標的とする新規の時間遺伝子治療法の構築を目指すところにある。一般的に遺伝子治療をする際に問題となるのは、治療として十分な効果を得るための遺伝子発現効率にある。ウイルスベクターは非常に効率良く遺伝子発現をするが、宿主への感染に関して未だ安全性には多くの問題を抱えている。その一方で、プラスミド DNA を基本とする遺伝子発現は、標的組織における遺伝子発現効率の低さに問題がある。本研究ではこれらの問題点を考慮し、癌組織に認められる低酸素環境下の転写リズム機構を応用することで、癌組織により選択的にまた効率の良い遺伝子発現を実現し、癌の遺伝子治療を実践展開するための、これまでに無い新しい方策を提示する点に大きな特色がある。

癌組織の低酸素環境下において活性化される HIF-1 転写機構は癌細胞の生存、増殖を維持するための重要な転写経路である。HIF-1 タンパクは、 α 、 β となる2つのサブユニットからなり、正常組織では β サブユニット (HIF-1 β) は恒常的に発現しているが、 α サブユニット (HIF-1 α) は酸素濃度依存的に分解を受けほとんど発現していない。よって、癌組織の低酸素環境下では、HIF-1 α が細胞内で安定化し HIF-1 α 、 β タンパク複合体が遺伝子のプロモーター上の HRE 配列に結合し遺伝子の転写を促進する。また、様々な生体機能には日周リズムが存在し生体の恒常性を維持している。これら日周リズムは時計遺伝子によって構成される体

内時計により制御されている。最近の研究により時計遺伝子が、HIF-1 の転写リズムを制御し、癌組織の恒常性に影響し癌組織の増殖、進展に寄与している。

現在の癌薬物療法において、従来の細胞毒性を主作用とする薬物を補う細胞増殖抑制薬の需要が高まっている。また癌を一つの組織として考え、癌組織の微小環境を標的とする薬剤が開発されている。これまでに我々は、生体の恒常性に関わる様々な生体機能の日周リズム制御機構を解明してきた。そして、正常組織のみならず癌組織の恒常性は、体内時計の分子機構によって制御されていることを明らかとしている。体内時計の分子機構に着目し、癌組織の低酸素環境下で増殖、脱分化に影響を及ぼす因子 X (特許性がある) を明らかとした。これらの研究結果は、癌組織の恒常性 (癌の環境リズム) を制御することが癌治療の標的となりうる可能性を示唆している。本研究では、癌細胞内での HIF-1 転写リズム機構を応用し、因子 X を標的とする miRNA を癌組織選択的に発現させ正常細胞への影響を最小限にさせた、新規の時間遺伝子治療法の開発を目指す。

3. 研究の方法

癌組織の低酸素環境下応答性の遺伝子発現ベクター (低酸素感受性遺伝子発現ベクター) の作製および機能評価の検討

実験 1 ; 低酸素感受性遺伝子発現ベクターの作製

これまでに癌細胞の低酸素環境下において、発現が亢進する遺伝子を数種同定している。これら遺伝子の upstream に存在する HRE 配列を合成し、サイトメガロウイルス (CMV) プロモーターの upstream に挿入し、低酸素感受性遺伝子発現ベクター (HRE-CMV-vector) を作製する。またコントロールベクターとして CMV-vector を用いる。

実験 2 ; 低酸素感受性遺伝子発現ベクターの機能評価

実験 1 で作製した (HRE-CMV-vector) の機能評価をする。HRE-CMV-vector または CMV-vector の CMV プロモーターの下流にルシフェラーゼの配列を挿入した HRE-CMV-Luc-vector および CMV-Luc-vector を作製する。培養したマウス肝癌細胞 (Hepa1-6) に HRE-CMV-Luc-vector または CMV-Luc-vector をトランスフェクションし、低酸素インキュベ

ターで培養後 48 時間目にルシフェラーゼアッセイを行い、HRE-CMV-vector が低酸素において転写活性を示すか否かを検証する。

実験 3 ; 低酸素感受性遺伝子発現ベクターのリズム発振機能評価

培養細胞に高濃度血清処理を施すことにより、生体に認められる体内時計の分子機構を再構築できる。また我々は経時的にルシフェラーゼ活性を測定できるルミサイクルを用い、リアルタイムに遺伝子発現リズムを測定可能である。癌細胞内の HIF-1/HRE 転写活性には日周リズムが存在することから、作製した HRE-CMV-vector の転写活性にリズムが生じるか否かを検証する。培養 Hepa1-6 に HRE-CMV- Luc-vector または CMV- Luc-vector をトランスフェクションし 24 時間後に高濃度血清処理をする。処理後培養細胞を低酸素インキュベーターで培養し、経時的にルシフェラーゼ活性を測定する。

実験 4 ; 腫瘍移植マウスを対象とした低酸素感受性遺伝子発現ベクター機能評価

低酸素により誘導される代表遺伝子である VEGF の発現に付随し蛍光タンパク GFP が安定発現する Hepa1-6 を、ICR マウス背部皮下に移植する。HVJ envelope vector を用い HRE-CMV- Luc-vector または CMV- Luc-vector をトランスフェクションし、In vivo Luminescent Image Analyzer を用い発光しているか否かを確認する。また、蛍光強度の測定も同時に行い、発光と蛍光イメージをマージし低酸素部位で HRE-CMV- Luc-vector が機能しているか否かを検証する。また、蛍光と発光を経時的に測定し、リズム発振機能を検証する。GFP 安定発現細胞は樹立済みであり、In vivo Luminescent Image Analyzer は九州大学の共同機器を使用する。

実験 5 ; 低酸素感受性因子 X miRNA 発現ベクターの作製

これまでに癌の発生過程において発現が増加する因子 X を同定した。また因子 X をノックダウンすることで、癌の増殖を抑制することを明らかとしている。HRE CMV vector を基本とし、CMV プロモーターの下流に因子 X を標的とする miRNA を挿入し、低酸素感受性 miRNA 発現ベクター (HRE CMV XmiRNA vector) を作製する。コントロールとして、

CMV vector に miRNA を挿入した CMV XmiRNA vector も作製する。

実験 6 ; ジエチルニトロソアミン (DEN) 誘発性原発性肝癌モデルを用いた、低酸素感受性因子 X miRNA 発現ベクターの機能評価

我々は DEN を用いマウス肝臓に原発性の肝癌を誘発するモデルを構築している。また、これまでにトランスフェリンリポソームを用い、癌組織に効率的に薬物を輸送する時間薬物送達法を開発している。そこでこのモデル動物を対象に、HRE CMV XmiRNA vector または CMV XmiRNA vector をトランスフェリンリポソームに封入した製剤を作製し、肝癌モデル動物に尾静脈より単回投与する。投薬後 1, 2, 3, 7 日目に肝臓を採取し、肝臓組織のスライスパンチングサンプリングを行い、低酸素部位における miRNA および因子 X の発現量を確認する。低酸素部位の確認は、低酸素プローブ (2-nitroimidazole compound piromidazole; PIM) を用い、PIM 抗体による免疫染色後に低酸素部位の同定を行う。また、作製した製剤の体内動態を検討する目的とし、薬物投与後経時的に血液および各種臓器をサンプリングし、XmiRNA 発現およびベクター量を real time RT-PCR により測定する。また薬物投与後のマウス生存率の測定、マウス肝臓に発生した癌組織の程度を病理検査にて確認し、肝癌に及ぼす HRE CMV XmiRNA vector または CMV XmiRNA vector の効果を検証する。トランスフェリンリポソームに封入した製剤を作製する技術についてはすでに構築している。

4. 研究成果

これまでに癌細胞の低酸素環境下において、発現が亢進する遺伝子を数種同定している。これら遺伝子の upstream に存在する HRE 配列を合成し、サイトメガロウイルス (CMV) プロモーターの upstream に挿入し、低酸素感受性遺伝子発現ベクター (HRE CMV vector) を作製した。機能評価を行った結果、低酸素においてプロモーター活性が増強された。また新規ベクターに shRNA 配列を導入したベクターを作成し、抗腫瘍効果が認められるか否かを、腫瘍移植モデルマウスを用いて評価した。その結果、低酸素応答配列を有しないコントロールベクターと比較し、低酸素応答ベクターの抗腫瘍効果は増大した。また、抗癌タンパク NK1 の低酸素感受性遺伝子発現ベクターを作製し、抗腫瘍効果を測定した結果、低酸素応答ベクターの抗腫瘍効果は増大した。本研究より、新規の低酸素応答ベクターは、通常の発現ベクターと比較し、抗腫瘍効果を増強できることを初めて立証し、低酸素環境の時

刻依存的な変化に対応した遺伝子治療を可能とするツールを開発した。

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1件)

Fujioka, T., Mitsunaga, N, Okazaki, H, Koyanagi, S, and Odo, S
Hypoxia response plasmid vector producing bcl-2 shRNA enhances the apoptotic cell death of mouse rectum carcinoma.
J. Pharmacol. Sci. 113: 353-361, 2010.

[学会発表] (計4件)

松永直哉、小柳悟、大戸茂弘. 時間薬物送達システム第18回日本時間生物学会学術大会 2011年11月25日(金)名古屋

藤岡孝志、松永直哉、小柳悟、大戸茂弘. マウス結腸がん細胞の増殖に及ぼす低酸素感受性 bcl-2 shRNA 発現ベクターの影響 次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム (福岡) 2009年11月14-15日

藤岡孝志、松永直哉、小柳悟、大戸茂弘. マウス結腸がん細胞の増殖に及ぼす低酸素感受性 shRNA 発現ベクターの影響 第23回日本薬物動態学会年会 (2008年10月29日-11月1日、熊本)

藤岡孝志、松永直哉、小柳悟、大戸茂弘. マウス結腸がん細胞の増殖に及ぼす低酸素感受性 shRNA 発現ベクターの影響 第2回次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム (2008年12月20日-12月21日、京都)

藤岡孝志、松永直哉、小柳悟、大戸茂弘. マウス結腸がん細胞の増殖に及ぼす低酸素感受性 shRNA 発現ベクターの影響 第2回次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム (2008年12月20日-12月21日、京都)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：

番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者 松永直哉
()

研究者番号：

(2) 研究分担者
()

研究者番号：

(3) 連携研究者
()

研究者番号：