

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:14301

研究種目:若手研究(B)

研究期間:2010~2011

課題番号:22791190

研究課題名(和文) 低酸素を標的とした新たながん転移治療の開発

研究課題名(英文) New treatment for cancer metastasis targeting tumor hypoxia

研究代表者

板坂 聡(ITASAKA SATOSHI)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号:90378054

研究成果の概要(和文):

新たに開発したマウスの肺転移モデルにて肺転移形成時の腫瘍増大が一定の速度で進行するのではなく、一過性の低酸素応答因子の上昇により急速増大することを明らかにした。この一過性の低酸素応答因子の誘導は、腫瘍内低酸素ではなく活性酸素によるものであり、それに応じてミトコンドリア酸化リン酸化から乳酸発酵への細胞内代謝の変化が起きていた。HIF-1阻害剤の投与により一過性の低酸素応答因子の誘導を抑制すると肺転移の形成を有意に抑えられることを明らかにした。

研究成果の概要(英文):

We have developed the mouse lung metastasis model that allows us to monitor intra-tumor hypoxia during the formation of lung metastasis. We found that progress of lung metastasis was accelerated by transient up-regulation of HIF-1 activity that was dependent upon reactive oxygen species (ROS). This lead to a cellular metabolic reprogramming, that is a change from mitochondrial oxidative phosphorylation to lactic acid fermentation. The use of HIF-1 inhibitor significantly decreased the formation of lung metastasis.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,100,000	630,000	2,730,000

研究分野:医歯薬学

科研費の分科・細目:内科系臨床医学・放射線科学

キーワード:放射線治療生物学・転移・放射線治療・低酸素・イメージング・肺転移モデル

1. 研究開始当初の背景

がん転移のメカニズムを探り、転移抑制の有効な手法の確立することはがん治療に大きな進展をもたらす。これまでも様々な研究が行われてきたがその中で、腫瘍内の低酸素領域の増大が転移を促進する、また腫瘍が転移

巣に着床する際も低酸素状態になり、浸潤、増殖を促進することが報告されている。それに加え、腫瘍増殖の源であるがん幹細胞の存在部位であると考えられ、腫瘍内低酸素の克服は単に放射線治療抵抗性や化学療法抵抗性を改善する以上に、がんの根治に対してイ

ンパクトがあることがわかってきた。

2. 研究の目的

がんの転移過程において腫瘍細胞が転移部位に着床、増殖する際に低酸素状態にさらされるが、この低酸素が転移に与える影響を低酸素応答因子 (HIF-1) を中心に明らかにし、新たな転移抑制方法を探る。

3. 研究の方法

1) マウス乳がん細胞 EMT6 にルシフェラーゼ遺伝子、あるいは HIF-1 誘導性のルシフェラーゼ遺伝子を導入し、尾静脈から腫瘍細胞を注入するマウス多発肺転移モデルを作成した。このマウス肺転移モデルにて、IVIS® Imaging System を用い光イメージングが可能か検証した。また、分泌型のルシフェラーゼ遺伝子を恒常的にマウス乳がん細胞 EMT6 に発現させることによって、血清中のルシフェラーゼ活性から腫瘍量を推測出来るか検討した。HIF-1 誘導性のルシフェラーゼ遺伝子と同時に分泌型のルシフェラーゼ遺伝子を発現させることによって腫瘍量と腫瘍内の低酸素を同時に定量的に評価できるシステムの確立について検討した。

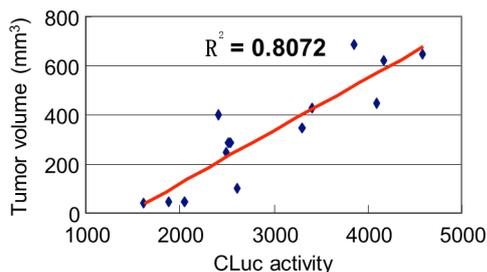
2) HIF-1 活性が上昇する移植後、5-6 日の時点での腫瘍内低酸素を pimonidazole 染色にて、また HIF-1 活性に影響を与える ROS について in vivo, in vitro において抗酸化剤の N-アセチル-L-システイン (NAC) を投与し、HIF-1 活性への影響を調べた。

3) 低酸素誘導因子阻害剤 YC-1 を投与し肺転移増大に対する影響を肺転移モデルの光イメージングにて検討した。

4. 研究成果

1) まず分泌型のルシフェラーゼ遺伝子を導入した EMT6 の皮下腫瘍にて、血清中のルシフェラーゼ活性と腫瘍体積が相関することを確認した (図1)。

図1 血清中の分泌型ルシフェラーゼ活性と皮下腫瘍サイズの相関

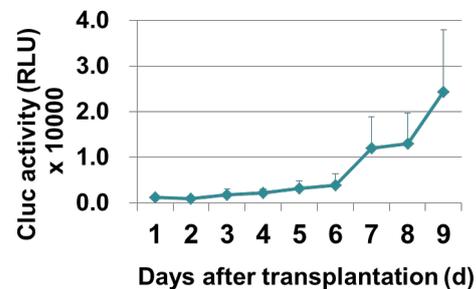


血清中の分泌型ルシフェラーゼ活性と腫瘍体

積はよく相関している。

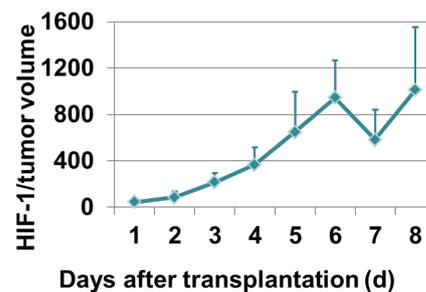
HIF-1誘導性のルシフェラーゼ遺伝子と分泌型のルシフェラーゼ遺伝子を両方導入し、EMT6 の肺転移モデルにおいて血清中の分泌型ルシフェラーゼの活性から腫瘍量の定量、光イメージングから肺転移巣のHIF-1活性の定量の両方が同時に同一個体マウスで経時的に計測できるシステムを確立した。この肺転移モデルでの観察から、肺転移の増大が一定の速度で進行するのではなく一過性のHIF-1の上昇が肺転移の急速増大に影響をあたえることを明らかになった (図2、3)。移植後6-7日目に急速な腫瘍増大が見られるが、HIF-1活性は移植後6日目に上昇し、その後一旦低下しており、HIF-1活性の一過性の上昇と腫瘍増大の関係が示唆された。この新しい光イメージングモデルはこれまで腫瘍体積の推測が難しかった、多発転移モデルでも容易に腫瘍量の推移を経時的、非侵襲的に観察可能であり、今回の検討ではHIF-1活性を腫瘍量で補正することによってより正確な活性を検討することが可能となり非常に有用なモデルである。

図2 血清中の分泌型ルシフェラーゼ活性でみる肺転移の腫瘍増殖



移植後6-7日目に急速な腫瘍増大があることが示されている。

図3 肺転移のHIF-1活性：腫瘍体積 (血清中の分泌型ルシフェラーゼ活性) にて補正



HIF-1活性は移植後6日目に上昇し、その後一

且低下している。

2) 次にHIF-1活性が上昇する移植後6日の時点で、HIF-1 活性を上昇させる要因について検討した。まず腫瘍内低酸素について pimonidazole 染色にて検討したところ、移植後6日の時点でそれぞれの多発肺転移は微小で血管新生はまだ伴わないが低酸素領域の増大はみとめなかった。一方、低酸素以外にてHIF-1活性を上昇させることが知られているROSの活性についてNACで抑制すると移植後6日の時点で腫瘍量には影響を与えず、一過性のHIF-1活性上昇は有意に抑制され、一過性のHIF-1活性上昇の要因としてROSの関与が示唆された。

また、移植後6日の時点の免疫染色でlactate dehydrogenase A (LDHA)の発現及び、pyruvate dehydrogenaseのE1サブユニットのリン酸化の誘導が明らかとなり、肺肺転移巣におけるミトコンドリア酸化的リン酸化から乳酸発酵への細胞内代謝の変化が示唆された。この細胞内代謝の変化により細胞に有害なROSは減少することが示唆され、HIF-1活性の7日目での低下およびその後の急速な腫瘍増大につながる事が推測された。

3) 次に低酸素誘導因子阻害剤YC-1の投与により肺転移の形成をおさえられるか、検討した。YC-1は肺転移の増大を抑えることを、光イメージングにおいても、また肺の摘出標本にても個数やサイズが抑制されることを確認した(図4)

図4 肺の摘出標本



YC-1 Control
移植後、3、4、5日にYC-1を投与し、10日目に肺を摘出した、YC-1投与群はコントロールに比べ、肺転移の個数もサイズも減少している。

4) 今回の検討により、肺転移形成時に単純に腫瘍内低酸素が発生し、その後の血管新生を誘導し転移巣の増大につながっているわけではないことが明らかになった。肺転移形成の初期段階の腫瘍内低酸素がまだみられ

ない微小な転移巣において、ROSを通したHIF-1活性上昇が、転移巣増大の引き金になっていることが明らかになった。また、腫瘍増大の引き金になるHIF-1活性の抑制は、肺転移の増大をマウスの肺転移モデルにて有意に抑制した。HIF-1の阻害剤の転移に対する治療として特に初期段階での有用性が示唆され、転移の予防、抑制に対して非常に有望なことを明らかにした。

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3件)

1. Nishimura Y, Koike R, Ogawa K, Sasamoto R, Murakami Y, Itoh Y, Negoro Y, Itasaka S, Sakayauchi T, Tamamoto T. Clinical practice and outcome of radiotherapy for esophageal cancer between 1999 and 2003: the Japanese Radiation Oncology Study Group (JROSG) Survey. *International Journal of Clinical Oncology* 17(1) 2012, 48-54

DOI: 10.1007/s10147-011-0254-y

2. Higashi T, Nishii R, Yamada S, Nakamoto Y, Ishizu K, Kawase S, Togashi K, Itasaka S, Hiraoka M, Misaki T, Konishi J. Delayed initial radioactive iodine therapy resulted in poor survival in patients with metastatic differentiated thyroid carcinoma: a retrospective statistical analysis of 198 cases. *The Journal of Nuclear Medicine* 52(5) 2011, 683-689

DOI: 10.2967/jnumed.110.081059

3. Zhao T, Harada H, Teramura Y, Tanaka S

Itasaka S, Morinibu A, Shinomiya K, Zhu Y, Hanaoka H, Iwata H, Saji H, Hiraoka M. A novel strategy to tag matrix metalloproteinases-positive cells for in vivo imaging of invasive and metastatic activity of tumor cells *Journal of Controlled Release* 144 2010, 109-114

DOI: 10.1016/j.jconrel.2010.01.023

[学会発表] (計2件)

1. Zhao T, Harada H, Teramura Y, Tanaka S, Itasaka S, Morinibu A, Shinomiya K, Zhu Y, Hanaoka H, Iwata H, Saji H, Hiraoka M. Optical imaging probe for matrix metalloproteinases activity in malignant tumors, 2010 World Molecular Imaging Congress 平成22年9月9日(京都)

2. Zhao T, Zhu Y, Itasaka S, Ogura M, Y
oshimura M, Harada H, Hiraoka M. Influe
nce of glucose-deprivation on cell cycl
e status and cellular radioresistance
under hypoxic conditions, 第13回癌治療
増感研究シンポジウム 平成23年2月12日(奈
良)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

板坂 聡 (ITASAKA SATOSHI)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：90378054