

平成 26 年 6 月 23 日現在

機関番号：10107

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23701094

研究課題名(和文)新規鉄輸送促進剤によるHIF-1 抑制作用とその肝癌治療効果の解析

研究課題名(英文) Inhibition of HIF-1 alpha using a novel Iron facilitator LS5-81 and its anti-cancer activity in hepatocellular carcinoma

研究代表者

田中 宏樹 (Tanaka, Hiroki)

旭川医科大学・医学部・特任講師

研究者番号：70596155

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：HIF-1 α 蛋白質は多くの癌において治療標的因子として注目されている。HIF-1 α 蛋白質は鉄と酸素の存在下において水酸化/分解される。本研究の目的は新規鉄輸送促進剤LS5-81の細胞への鉄輸送促進効果を利用してHIF-1 α 蛋白質を抑制することである。

LS5-81の鉄輸送促進効果は細胞内におけるHIF-1 α 蛋白質の水酸化、分解を促進し抑制することが明らかとなった。さらに、肝癌モデルマウスにおいてLS5-81の輸送促進効果はHIF-1 α 蛋白質を抑制し腫瘍を縮小させた。これらの結果から、LS5-81が肝癌の治療に応用できることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Targeting HIF-1 α has been of therapeutic interest. In normoxic conditions, HIF-1 α is hydroxylated by prolylhydroxylases (PHDs), which require iron for its activity. The tumor suppressor protein VHL binds to the hydroxylated HIF-1 α , which is then degraded by proteasomes. We focused on the degradation machinery of HIF-1 α mediated by PHDs. In this study, we aimed to inhibit the expression of HIF-1 α protein and growth of hepatocellular carcinoma (HCC) using the iron-facilitating activity of LS5-81. In the human HCC cell lines, a combination of LS5-81 and iron inhibited HIF-1 α protein expression. A mutated HIF-1 α protein, which has proline residues that were replaced with alanine and transfected into HEK293 cells, was not affected by the combination of LS5-81 and iron. Furthermore, LS5-81 inhibited tumor growth of mouse HCC models. These results indicate that LS5-81 inhibits HIF-1 α expression through prolyl-hydroxylation of HIF-1 α and might have a therapeutic effect in the treatment of HCC.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・臨床腫瘍学

キーワード：HIF-1 α 鉄

1. 研究開始当初の背景

(1) 我が国において肝癌はがん死亡率の上位を占めており、他臓器の悪性腫瘍と比較しても予後が悪い。肝癌は薬剤に対する抵抗性が高く、既存の抗癌剤による肝癌の治療は非常に困難であり、新規の治療薬の開発が必要である。我々はこれまでに、マウス化学発癌モデルを用いて肝発癌の初期段階から Hypoxia inducible factor-1 α (HIF-1 α)が高発現しており、それを抑制することにより肝癌細胞の増殖を抑制できることを報告してきた (Tanaka H. et al. Cancer Res 66: 11263-70 2006)。

(2) 生体が低酸素状態に曝されたとき、細胞内では生存に必要な様々な遺伝子発現が調節される。HIF-1 α は低酸素下で発現亢進する転写因子で、造血、血管新生、嫌氣的解糖酵素といった細胞の低酸素応答に関わる様々な遺伝子の発現を促進する (Semenza GL. Nat Rev Cancer 3: 721-32 2003)。このような機能は正常細胞の低酸素応答に役立っているが、一方で癌細胞における HIF-1 α の高発現は血管新生、細胞増殖、浸潤・転移、薬剤・放射線抵抗などを促進し癌の進展や治療抵抗性に関わっている。これまでに様々な悪性腫瘍において HIF-1 α が高発現している事が報告されており、癌治療の標的分子として注目されている (Semenza GL. Nat Rev Cancer 3: 721-32 2003)。

2. 研究の目的

HIF-1 α 蛋白質は常圧酸素環境下ではプロテアソームにより速やかに分解されるが、この分解過程は水酸化酵素である HIF-prolyl-hydroxylases (PHD1, 2, 3)がHIF-1 α 蛋白質を水酸化することで活性化される。この水酸化反応には酸素と鉄が必要とされ、Desferoxamine (DFO)などの鉄キレート剤を培養液に加えて細胞への鉄の取り込みを抑制するとHIF-1 α の分解が抑制されることが知られている (Wang GL. et al. Blood 82 : 3610-5 1993)。また、鉄を過剰に加えた培養液で細胞を培養すると HIF-1 α の発現が低下することも報告されている(Knowles HJ. et al Cancer Res 63 : 1764-8 2003)。これらのことは細胞内における鉄の取り込みを促進すればHIF-1 α 蛋白質の分解が促進され、癌の進展を抑制できる可能性を示唆している。本研究は鉄吸収促進剤LS5-81の細胞への鉄の取り込みを促進する作用によりHIF-1 α の分解を促進し、それによる肝癌治療効果を検討するものである。

3. 研究の方法

(1) ヒト肝癌細胞株 HepG2, Hep3B を LS5-81 とクエン酸鉄アンモニウム (FeAC) を加えた培養液を用いて常圧酸素、低酸素で培養した。このときの HIF-1 α の発現についてウェスタンブロット法、免疫蛍光染色、リアルタイム RT-PCR 法により解析を行った。

(2) 野生型 HIF-1 α 発現ベクターと HIF-1 α の

水酸化部位を置換した変異型 HIF-1 α 発現ベクターをそれぞれ HEK293 細胞に遺伝子導入し細胞株を樹立し LS5-81 と FeAC を加えて培養をした後に野生型 HIF-1 α と変異型 HIF-1 α 蛋白質の発現解析を行った。

(3) LS5-81 とクエン酸鉄アンモニウム (FeAC) を加えた培養液を用いて常圧酸素、低酸素で培養し 24, 48 時間後の生細胞数を MTS 法により解析した。

(4) Hep3B を免疫不全マウス皮下に移植して腫瘍を形成させ、LS5-81 を一週間腹腔内投与し、同時に腫瘍径を計測した。

4. 研究成果

(1) ヒト肝癌細胞株 Hep3B と HepG2 をそれぞれ LS5-81 と鉄の存在下で培養すると LS5-81 の濃度に依存して細胞内の鉄含有量が増加した (図 1A)。Hep3B と HepG2 をそれぞれ LS5-81 と鉄の存在下で培養すると HIF-1 α 蛋白質の発現が抑制された(図 1B, C, D)。しかし、同様の条件で培養しても HIF-1 mRNA の発現は抑制されなかった (図 1E)。これらの結果は LS5-81 の鉄輸送促進効果は翻訳後の HIF-1 α 蛋白質を抑制することを示唆している。

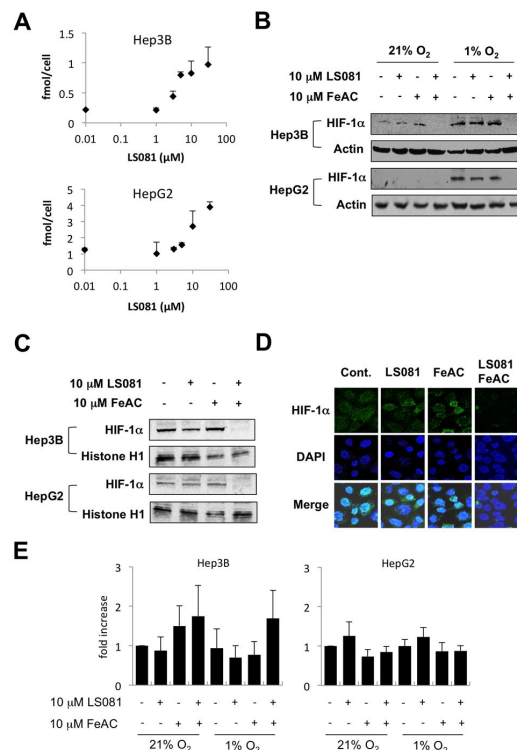


図 1 A 原子吸光法によるヒト肝癌細胞株 Hep3B と HepG2 の細胞内における鉄含有量の測定。B, C ウェスタンブロット方による HIF-1 α 蛋白質の発現解析 (B:全細胞蛋白質 C:細胞核蛋白質)。D 免疫蛍光染色による HIF-1 α 蛋白質の局在の解析。E リアルタイム RT-PCR 法による HIF-1 α mRNA 発現解析。

(2) Hep3B を LS5-81 と FeAC さらにプロテアソーム阻害剤である MG132 を加えて培養し HIF-1 α 蛋白質の発現を解析した。その結果、LS5-81 と FeAC により HIF-1 α 蛋白質の発現は低下するが、その影響は MG132 により抑制されることが明らかとなった (図 2A)。このことは LS5-81 の鉄輸送促進効果は主にプロテアソームによる分解を促進することで HIF-1 α 蛋白質の発現を低下させることを示している。次に、HIF-1 α の水酸化部位であるプロリン基をアラニン基に置換した変異型 HIF-1 蛋白質 (図 2B) を発現する細胞を樹立し、LS5-81 と鉄の存在下で培養すると変異型 HIF-1 α 蛋白質の発現は抑制されなかった (図 2C)。これらの結果は LS5-81 による鉄吸収促進作用は HIF-1 α 蛋白質の水酸化を促進しさらにプロテアソームによる分解を促進することが明らかとなった。

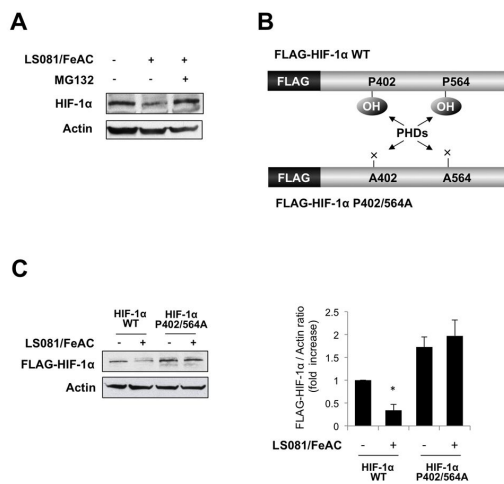


図 2 A Hep3B に LS5-81、FeAC、MG132 を加えて低酸素で培養を行いウェスタンブロット法により HIF-1 α 蛋白質の発現を解析した。B HIF-1 α の水酸化部位であるプロリン基をアラニン基に置換した変異型 HIF-1 α 蛋白質。C ウェスタンブロット法による変異型 HIF-1 α 蛋白質の LS5-81、FeAC 存在下における発現解析

(2) Hep3B と HepG2 を LS5-81 と鉄の存在下で通常酸素・低酸素培養すると細胞増殖が抑制された (図 3A, B)。さらに、免疫不全マウスに Hep3B を移植した移植肝癌モデルに対して LS5-81 を投与すると腫瘍が出血を伴い退縮した (図 4 A, C)。移植腫瘍組織における HIF-1 α 蛋白質の発現も LS5-81 を投与することによって抑制された (図 4B)。これらのマウスから採取した血清中の肝逸脱酵素活性を測定した結果それぞれの処置による影響は観察されなかった。これらの結果は LS5-81 による鉄輸送促進効果が HIF-1 α 蛋白質の水酸化を促進することで発現を抑制し、抗腫瘍効果を示すことを示している。さらに、血清中の肝逸脱酵素活性が変化しなかった

ことから LS5-81 は正常肝組織に対して毒性を示すことなく腫瘍特異的に効果を示すと考えられる。LS5-81 は肝癌治療における有力な化合物であることが明らかとなった。

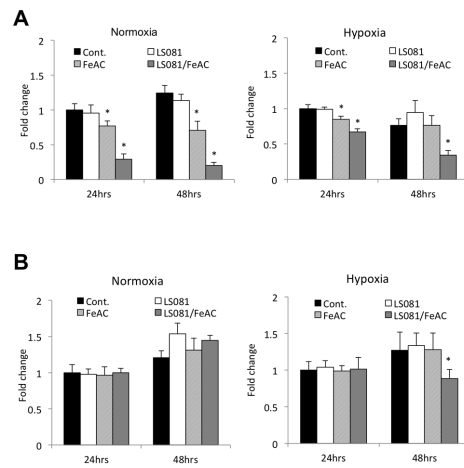


図 3 通常酸素条件下 (Normoxia) および低酸素条件下 (Hypoxia) における MTS 法による細胞増殖活性の解析 (A: Hep3B B: HepG2)

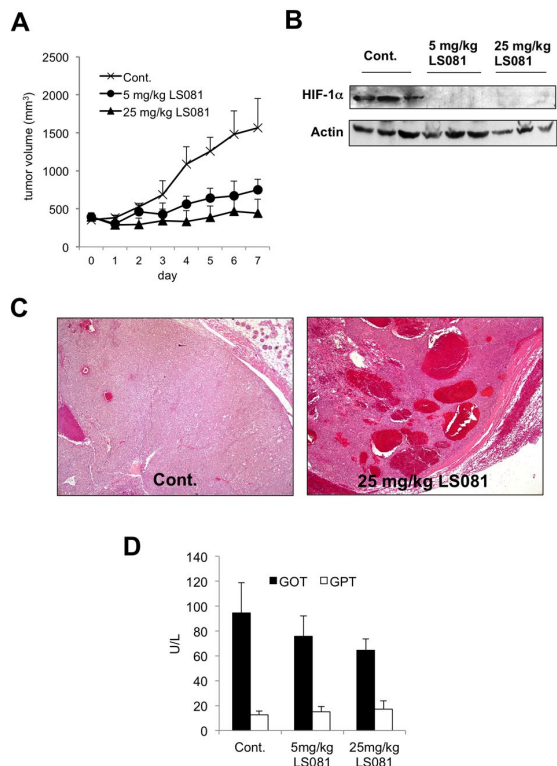


図 4 A 免疫不全マウスにおける移植腫瘍の体積変化。B 移植腫瘍内での HIF-1 α 蛋白質の発現解析。C 移植腫瘍の組織像。D 免疫不全マウス血清中肝逸脱酵素活性。

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 2 件)

- (1) Tanaka H, Li Z, Ikuta K, Addo L, Akutsu H, Nakamura M, Sasaki K, Ohtake T, Fujiya M, Torimoto Y, Glass J, Kohgo Y. Iron facilitator LS081 reduces hypoxia-inducible factor-1 α protein and functions as anticancer agent in hepatocellular carcinoma. *Cancer Sci.* 2012 Apr;103(4):767-74. doi: 10.1111/j.1349-7006.2011.02192.x. Epub 2012 Jan 29.
- (2) Li Z, Tanaka H, Galiano F, Glass J. Anticancer activity of the iron facilitator LS081. *J Exp Clin Cancer Res.* 2011 Mar 31;30:34. doi: 10.1186/1756-9966-30-34.

〔学会発表〕(計 4 件)

- (1) 田中宏樹, 生田克哉, 山本昌代, 安藤勝祥, 河本徹, 岡村直香, 伊藤貴博, 中村正雄, 阿久津弘明, 佐々木勝則, 鳥本悦宏, Zhen Li, Jonathan Glass, 高後裕「新規鉄輸送促進剤LS081によるHIF-1を標的とした肝癌治療効果」第9回日本臨床腫瘍学会学術集会, 横浜市, 2011
- (2) 田中宏樹, 生田克哉, 佐々木勝則, 細木卓明, 鳥本悦宏, 中村正雄, 阿久津弘明, Zhen Li, Jonathan Glass, 高後裕「A novel iron facilitator LS081 inhibits HIF-1 protein expression and functions as an anticancer agent」第70回日本癌学会学術集会, 名古屋市, 2011
- (3) Tanaka H, Ikuta K, Hosoki T, Sasaki K, Nakamura M, Akutsu H, Torimoto Y, Kohgo Y, Li Z, Glass J A novel iron facilitator LS081 inhibits HIF-1 α protein expression and functions as an anticancer agent Podium presentation, Fourth Congress of the International BioIron Society (IBIS) Biennial World Meeting 2011, Vancouver, BC, Canada.
- (4) 田中宏樹, 生田克哉, 佐々木勝則, 細木卓明, 鳥本悦宏, 中村正雄, 阿久津弘明, Zhen Li, Jonathan Glass, 高後裕「Iron uptake facilitator LS5-81のHIF-1発現抑制効果」第34回日本鉄バイオサイエンス学会学術集会, 東京都, 2010

6. 研究組織

(1)研究代表者

田中 宏樹 (TANAKA, Hiroki)
旭川医科大学・医学部・特任講師
研究者番号: 70596155