

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：32666

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670164

研究課題名(和文) 転写制御因子HIF-1による抗癌剤耐性獲得の分子機構とそれに対する癌治療法の開発

研究課題名(英文) Molecular mechanism underlying HIF-1-mediated acquisition of anti-cancer drug resistance and investigation of efficient cancer chemotherapy

研究代表者

田中 信之(Tanaka, Nobuyuki)

日本医科大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：80222115

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：EGFR陽性肺非小細胞癌のEGFに対する分指標的薬Gefitinibに対する抵抗性獲得の解析から、低酸素応答因子HIF-1の発現がこれに関与することを見出した。GefitinibによってHIF-1の発現は抑制されるが、Gefitinib耐性を誘導するHGF刺激やPTENの変異によってこの抑制が見られなくなる事、HIF-1の発現によってアポトーシスを抑制するBcl-2ファミリー分子の発現が高い事も見出した。同時に、Erk経路によるHIF-1の安定化が癌幹細胞の維持に関わる事を見出し、肺癌でのGefitinib耐性獲得や癌幹細胞の維持にHIF-1が重要であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In this research project, I analyzed the molecular mechanism underlying the acquisition of gefitinib, the EGFR specific tyrosine-kinase inhibitor, resistance in EGFR-positive non-small-cell lung cancer (NSCLC), and found that the expression of hypoxia-inducible factor (HIF)-1 is involved in gefitinib-resistance. In gefitinib-sensitive NSCLC cells, the expression of HIF-1 $\alpha$  was suppressed by gefitinib treatment. In contrast, this suppression was not observed under HGF, which is known to induce gefitinib-resistance, stimulation and in gefitinib-resistant cells by mutation of tumor suppressor PTEN. In addition, HIF-1 high expressing cells, the expression of anti-apoptotic Bcl-2 family proteins was enhanced. Moreover, I found that Erk signal-dependent stabilization of HIF-1 $\alpha$  is involved in lung cancer stem cell maintenance. From these results, I showed that HIF-1 is important for acquisition of gefitinib-resistance and cancer stem cell maintenance in NSCLC cells.

研究分野：分子生物学

キーワード：肺癌 HIF-1 gefitinib 耐性獲得 癌幹細胞

### 1. 研究開始当初の背景

癌の化学療法は、分子標的薬の開発が進むことで飛躍的に進歩すると考えられる。分子標的薬とその感受性・副作用の強弱を決める遺伝子診断を合わせることで更なる効果が期待できる。一方で、これらの治療に耐性な癌細胞の出現は、重要な問題となっている。

我々は、癌抑制因子 p53 による癌化抑制の分子機構を p53 の標的遺伝子の解析から行ってきた ( Science, 288,1053-1058,2000; Genes Dev.,17,2233-2238,2003 )。この過程で、p53 が細胞のグルコース代謝のレベルを制限していること、p53 の機能が消失するとこの制御が外れてグルコース代謝が亢進することを発見した。更に、p53 欠損線維芽細胞は ras 癌遺伝子単独でトランスフォームするが、この現象にグルコース代謝の亢進が必須であることを見出した ( Nat. Cell Biol.,10,611-618,2008 )。更に、グルコース代謝の増加により IKK $\beta$ -NF- $\kappa$ B 経路を介してグルコース代謝を更に亢進させる増幅機構が存在することから (PNAS,106,3431-3436,2009)、癌細胞が膨大なエネルギーを作り出す機構を明らかにし、細胞内代謝の制御から癌の研究を続けている。

この研究の流れで、癌細胞を抗癌剤治療する過程のエネルギー代謝の解析を始めた。肺癌は、癌死亡率が男性で 1 位、女性で 2 位の重要な疾患である。なかでも、上皮成長因子受容体 (EGFR) に変異のある肺癌は、Gefitinib 等の EGFR に対する分子標的薬を用いることで、一定の治療効果があがっている (N Engl J Med, 358,1160-74, 2008)。

### 2. 研究の目的

我々は、Gefitinib 感受性の肺癌細胞株を治療した際に、グルコース代謝を誘導する転写因子 HIF-1 の活性が速やかに低下すること、活性型の HIF-1 を発現させると Gefitinib 耐性になることを見出した。この機構を解析すると、肺癌細胞では EGFR-PI3K-mTOR-HIF-1 の経路で HIF-1 が活性化していること、Gefitinib 処理により、HIF-1 の抑制が起こることを見出した。実際、Gefitinib 耐性である PTEN に変異のある細胞株は、Gefitinib では HIF-1 が抑制されないが、mTOR 抑制因子との併用で細胞死を誘導出来た。これらの分子経路が Gefitinib 治療の際に働く流れを明らかにしたのは、我々が最初である。更に、EGFR-STAT3-MEP50-Gli1 の経路で転写因子 Gli1 が活性化する新たな機構を発見し、これが肺癌幹細胞の維持に働くことを見出している。

そこで本研究では、HIF-1 を介した Gefitinib 耐性獲得の機構を HIF-1 の制御経路から明らかにする。特に、臨床的に問題となる K-ras の変異による Gefitinib 耐性獲得がこの機構によるものかを明らかにする。Gefitinib 耐性肺癌細胞に対する治療法を、得られた耐性獲得の機序から確立する。

Gefitinib 治療でのアポトーシス誘導機構を明らかにする。肺癌の成因及び癌幹細胞維持に対するこの機構の関与を解析し、効果的な癌治療法を開発する。

本研究は、HIF-1 活性化経路の変化と HIF-1 誘導遺伝子による Gefitinib 耐性獲得の機序を明らかにし、Gefitinib 耐性癌細胞の治療の標的を定めることを目的とするもので、この方面からの研究は無く、肺癌の効果的な治療法を開発する点から、医学的にも重要な研究であると考えられる。

### 3. 研究の方法

HIF-1 を介した Gefitinib 耐性獲得の機構を HIF-1 の制御経路から明らかにする。我々は、HCC827 や PC9 等の Gefitinib 感受性肺癌細胞株を用いて、Gefitinib 処理を行ったところ、転写因子 HIF-1 $\alpha$  の発現が減少することを見いだした。HIF-1 $\alpha$  の発現は PI3K 抑制剤 Wortmanin で抑制されたことから、EGFR-PI3K の経路で誘導されると考えられる。HIF-1 の効果を調べるためにこれらの細胞に活性型の HIF-1 $\alpha$  を発現させると、興味あることに Gefitinib 耐性になった。HIF-1 $\alpha$  の発現を抑えるとグルコース代謝及び細胞増殖が抑えられることより、増殖を増強することで耐性になるかと考えたが、活性化 caspase-3 が Gefitinib 処理によって出現し、活性型 HIF-1 $\alpha$  によって抑えられることから、アポトーシスの阻害が耐性獲得に重要であると考えられた。更に、PTEN 変異によって Gefitinib 耐性を獲得した PC9 の 2 種類の亜種は、Gefitinib によって HIF-1 の抑制が見られないことを見出した。これらの結果を更に解析して、HIF-1 による Gefitinib の耐性機序を、シグナル及びアポトーシス誘導分子の解析から明らかにする。

Gefitinib 耐性肺癌細胞に対する治療法を、上述のシグナルの解析から確立する。一番の問題点は、HIF-1 抑制剤が効くかであるが、これに関しては開発されている何種類かの HIF-1 抑制剤を入手して検討する。一方、現実的な治療の為の検討としては、現在使われている、あるいは臨床試験が進んでいる抗癌剤の検討を進めていきたい。このために、作成した Gefitinib 耐性肺癌細胞及び多くの肺癌培養細胞株で、我々が発見した経路が活性化しているかを検討し、更にそれらのシグナルの阻害剤を用いて HIF-1 経路の重要性とそれに対する治療の有効性を明らかにする。これら、培養細胞の解析と平行して、ヌードマウスに移植した腫瘍に対する効果を、検討する。この目的で、肺癌細胞に luciferase 遺伝子を発現させる系を作っており、in vivo imaging system によって解析する準備を進めている。

Gefitinib 治療でのアポトーシス誘導機構を明らかにする。申請者は p53 誘導性の新規アポトーシス誘導因子 Noxa を同定し解析してきた実績から ( Science, 288,1053-1058,

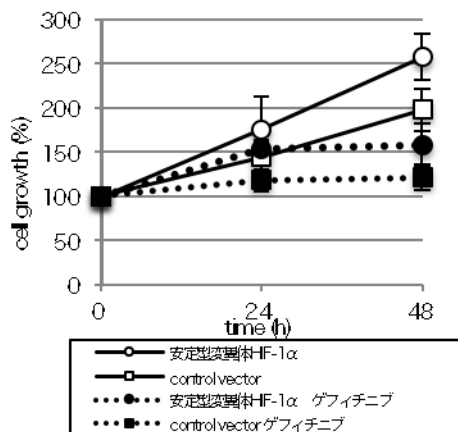
2000; Genes Dev.,17,2233-2238,2003 )、Gefitinib によるアポトーシス誘導の際に変化する Bcl-2 ファミリー分子を全て解析して、その分子機構を明らかにしていく。

4) 肺癌幹細胞維持における Gli1 の役割を解析し、効果的な癌治療法を開発する。

我々は、これまで hedgehog シグナルが転写因子 Gli1 を介して Mdm2 を活性化し、p53 の機能を抑制することを報告した (PNAS, vol. 105, pp. 4838-4843, 2008 )。次に、Gli1 の制御機構を解析する過程で、Gli1 が MEP50/PRMT5 メチル化酵素複合体によって活性化する事、MEP50 が STAT3 によって誘導されて Gli1 を活性化することを見いだした。EGFR-STAT3 の経路で MEP50 依存性に Gli1 の活性化が見られた。また、肺癌細胞では、癌細胞の増殖と ALDH1 陽性癌幹細胞の維持に MEP50-Gli1 の経路が重要であることを見いだしている。従って、効果的に肺癌の治療を目指すには、上記の治療に加えて、Gli1 阻害剤や Gli1 の活性化に関与する hedgehog 阻害剤の併用効果を調べる必要がある。そこで、癌幹細胞に対するこれらの薬剤の効果と、実験動物での抗癌剤治療後の再発が抑えられるかを検討する。

#### 4. 研究成果

VHL を介した分解を受けない安定型 HIF-1 を発現させた肺癌細胞株は Gefitinib に対して耐性を獲得した (図 1)。



そこでこの機構を解析する目的でアポトーシス制御因子の発現を全て調べたところ、感

図 1 HIF-1 による Gefitinib 耐性の誘導

受性細胞を Gefitinib 処理すると Bcl-2 ファミリー分子のうちのアポトーシス誘導に働く Bim の発現が誘導されると共に、アポトーシス抑制因子の Bcl-XL, Mcl-1, Bcl-2 の発現抑制が見られた。そこで、Bim の発現を RNAi 法でノックダウンすると Gefitinib 処理による肺癌細胞のアポトーシスが抑制されることから、この細胞死が Bim を介することを明らかにした。更に Gefitinib 処理によって AKT 活性抑制と転写因子 FoxO3 の活性化及び核への移行を観察した。Bim が FoxO3 に

よる転写誘導を介して誘導される事は既に報告されており、この経路を介して Bim が誘導される事が推測された。更に、ゲフィチニブ耐性獲得の多くの例で HGF/c-Met 経路の活性化が見られるが、ゲフィチニブ耐性獲得に重要な HGF 刺激を加えた際、ゲフィチニブ処理による HIF-1 の抑制が見られないことを見出した (図 2)。同時に、PTEN に変異があつて Gefitinib に耐性になった細胞では、

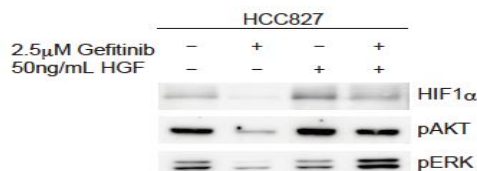


図 2 HGF による HIF-1 抑制の解除

AKT の下流で活性化する mTOR 抑制剤の Everolimus によって HIF-1 の抑制が観察された。そこで、Everolimus の効果を見たところ、単独ではあまり効果がないが、Gefitinib と Everolimus の併用によって効果的にアポトーシスを誘導することが出来た。これらのことから、EGFR-PI3K-AKT-mTOR-HIF-1 の経路でグルコース代謝、細胞増殖を亢進させ、更にアポトーシスを抑制していることが推測された。

これらの研究と平行して、我々は通常みられる HIF-1 のプロリンを介した分解誘導経路とは異なる分解・安定化経路が存在する事を見出した。これは、プロリンに変異を加えて VHL を介した分解が起こらない変異体でも肺癌細胞内で Gefitinib 処理によって分解される事、この分解には Erk 経路が重要であることを、阻害剤を用いた研究から明らかにした。更に、肺癌の癌幹細胞の解析から、HIF-1 経路が癌幹細胞の維持に関わっている事、HIF-1 の抑制や Erk 阻害剤によって癌幹細胞数が減少する事を見出しており、この経路の抑制が癌の効果的な治療につながることを示す結果が得られたと考えている。

Gli1 の制御機構を解析する過程で、Gli1 がアダプター分子 MEP50 を介してアルギニンアルギニンメチル基転移酵素 PRMT5 と複合体を作つて Gli1 の Arg990 と Arg1018 がメチル化されること、これによりユビキチンリガー Itch/Numb との結合が阻害されることで Gli1 が安定化して活性化することを見出した。興味あることに MEP50 と PRMT5 の両者は STAT3 によって転写誘導されること、EGF や HGF 等の細胞増殖因子や IL-6 等の炎症性サイトカイン刺激が STAT3 を介して Gli1 を活性化させることを見出した。更に EGFR に変異のある非小細胞肺癌の培養細胞を解析した結果、がん幹細胞の指標である CD44 や ALDH1 陽性細胞数、スフェア(細胞塊)形成細胞の数は MEP50, PRMT5, Gli1 のいずれかの発現を抑制すると低下した。更に、IL-6 や HGF 刺激、ヌードマウスに移植

した腫瘍を TPA で刺激すると、この経路依存的にがん幹細胞数が増加した。がんの微小環境では創傷治癒過程と同等の炎症と組織構築が行われており、がん幹細胞が腫瘍内に浸潤するマクロファージ等の免疫系細胞やがん間質線維芽細胞が産生する炎症性サイトカインや細胞増殖因子にさらされているが、この環境下では MEP50/PRMT5/Gli1 の経路を介してがん幹細胞が維持されていると考えられた。更に、非小細胞肺癌培養細胞をヌードマウスに移植して腫瘍を作らせた後、EGFR の分子標的薬 Gefitinib 治療により腫瘍は退縮するが、一定の期間が過ぎると腫瘍は再び増大した。しかし、MEP50, PRMT5, Gli1 のいずれかの発現を抑制すると、この腫瘍の再発は見られなかった。更に、日本医科大学呼吸器内科学教室との共同で、EGFR 陽性肺がん組織で MEP50/PRMT5/Gli1 の発現の高い症例は外科手術後の Gefitinib 治療による無増悪生存期間の期間が短く、予後が悪い傾向があることを明らかとした。これらの解析から、がんの微小環境でがん幹細胞の維持、がんの化学療法に対して耐性細胞が出現する新たな機構を明らかにした。

#### 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 6 件)

- 1) Matsumoto M, Nakajima W, Seike M, Gemma A, Tanaka N. Cisplatin-induced apoptosis in non-small-cell lung cancer cells is dependent on Bax- and Bak-induction pathway and synergistically activated by BH3-mimetic ABT-263 in p53 wild-type and mutant cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 473:490-496, 2016
  - 2) Nakajima W, Sharma K, Lee JY, Maxim NT, Hicks MA, Vu TT, Luu A, Yeudall WA, Tanaka N, Harada H. DNA damaging agent-induced apoptosis is regulated by MCL-1 phosphorylation and degradation mediated by the Noxa/MCL-1/CDK2 complex. *Oncotarget* doi: 10.18632/oncotarget.9217. 2016
  - 3) Nakajima, W., Tanaka, N. BH3 mimetics: Their action and efficacy in cancer chemotherapy. *Integr Cancer Sci Ther.* doi: 10.15761/ICST.1000184, 2016
  - 4) Nakajima, W., Hicks, M.A., Tanaka, N., Krystal, G.W., and Harada, H. Noxa determines localization and stability of MCL-1 and consequently ABT-737 sensitivity in small cell lung cancer. *Cell Death Dis* 5, e1052, 2014
  - 5) Yamauchi, S., Hou, Y.Y., Guo, A.K., Hirata, H., Nakajima, W., Yip, A.K., Yu, C.H., Harada, I., Chiam, K.H., Sawada, Y., Tanaka, N., Kawauchi, K. p53-mediated activation of the mitochondrial protease HtrA2/Omi prevents cell invasion. *J Cell Biol* 204, 1191-1207, 2014
  - 6) Guo, A.K., Hou, Y.Y., Hirata, H., Yamauchi, S., Yip, A.K., Chiam, K.H., Tanaka, N., Sawada, Y., and Kawauchi, K. Loss of p53 enhances NF-kappaB-dependent lamellipodia formation. *J Cell Physiol* 229, 696-704, 2014
- [学会発表](計 13 件)
- 1) Wataru Nakajima, Kanika Sharma, Mark A. Hicks, June Y. Lee, Nobuyuki Tanaka, Hisashi Harada. The role of Noxa/MCL-1 axis in solid tumors treated with DNA damaging agents. AACR Annual Meeting 2015
  - 2) 田中信之: 癌微小環境下での肺癌幹細胞の新たな維持機構の解析とそれを標的とした治療法の検討 第56回日本肺癌学会学術集会 シンポジウム、2015、東京
  - 3) 阿部芳憲、武内進、田中信之: PRMT5-Gli1 経路の遮断による肺がんの再発および抗がん剤抵抗性腫瘍の抑制効果 第38回日本分子生物学会年会、2015、神戸
  - 4) 松本優、中嶋亘、鈴木淳也、田中信之: 非小細胞肺癌細胞株におけるシスプラチンによるアポトーシスについての考察 第38回日本分子生物学会年会、2015、神戸
  - 5) 鈴木淳也、中嶋亘、田中信之: 肺癌の分子標的薬 crizotinib はオートファジーとネクローシスによる細胞死を誘導する 第38回日本分子生物学会年会、2015、神戸
  - 6) 上原郁野、田中信之: I型インターフェロンによる発がんの促進と癌幹細胞維持への関与 第38回日本分子生物学会年会、2015、神戸
  - 7) 谷村篤子、中里茜、田中信之: マウス繊維芽細胞での内在性活性化K-ras発現による癌抑制因子p53の下流遺伝子転写調節 第38回日本分子生物学会年会、2015、神戸
  - 8) Wataru Nakajima, Mark A. Hicks, Nobuyuki Tanaka, Geoffrey W. Krystal, Hisashi Harada. Noxa determines localization and stability of MCL-1 and consequently ABT-737 sensitivity in small cell lung cancer. Third AACR-IASLC Joint Conference on the Molecular Origins of Lung Cancer, San Diego, CA, 2014
  - 9) 上原郁野、谷村篤子、田中信之: サイトカイン受容体の糖鎖修飾阻害による抗炎症効果及び発癌抑制効果の検討 第79回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会、札幌、2014
  - 10) 谷村篤子、中里茜、上原郁野、田中信之: 炎症誘発の発癌過程におけるp53 - p21経

路抑制の抑制 第79回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会、札幌、2014

- 11) 阿部芳憲、田中信之：STAT3とアルギニンメチル基転移酵素PRMT5を介した新しい癌幹細胞用細胞の維持機構 ワークショップ がん幹細胞研究の新展開:多様性と可塑性、第37回日本分子生物学会年会、横浜、2014
- 12) 上原郁野、谷村篤子、田中信之：2-Deoxy-D-Glucoseの炎症誘発癌抑制効果 第37回日本分子生物学会年会、横浜、2014
- 13) 谷村篤子、中里茜、上原郁野、田中信之：炎症誘発の発癌過程におけるp53 - p21経路抑制の抑制 第37回日本分子生物学会年会、横浜、2014

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

田中 信之 (Nobuyuki Tanaka)  
日本医科大学・大学院医学研究科・教授  
研究者番号：80222115

### (2) 研究分担者

無し

### (3) 連携研究者

無し