

56. がん抑制遺伝子と低酸素応答機構の相互作用機序と機能

原田 浩

*京都大学 白眉センター

Key words : がん, 多段階発がん, 低酸素微小環境, HIF-1 (hypoxia-inducible factor 1), 転移・浸潤

緒 言

大腸がんが発生する初期過程で、がん遺伝子やがん抑制遺伝子に段階的に変異が蓄積するモデルが提唱されている。すなわち、極めて初期の段階で、がん抑制遺伝子 (APC) の異常によってポリープが生じ、次にごん遺伝子 (K-ras など) の異常でポリープが成長、これにごん抑制遺伝子 (p53) の変異が重なることで最終的にポリープががん化するとされている。この大腸がん多段階発がんモデルが Vogelstein 等によって提唱されてから既に 25 年ほど経ったが¹⁾、『p53 の機能が低下した後に、がんの悪性形質が誘導されるメカニズム』には不明な点が多い。

一方、がん細胞の転移・浸潤能や血管新生の誘導、さらにはグルコース代謝経路のリプログラミングといった悪性形質を誘導する遺伝子として、低酸素誘導性因子 1 (HIF-1) が同定されている²⁾。これまでにプロリン水酸化酵素 PHDs やフォン・ヒッペル・リンドウ遺伝子 VHL による HIF-1 の抑制機構は明らかにされているが、HIF-1 の活性化を担うメカニズムは十分には解明されていない。また、p53 と HIF-1 の相互作用や、HIF-1 に依存したがんの悪性化が大腸がんの初期発生過程で機能しているのか否かは全く分かっていない。これが「がんの本質的理解」と「的確な治療法の確立」を妨げる障壁となっている。

この様な状況の中で我々の研究室は、HIF-1 活性化因子を網羅的に探索する遺伝学的なスクリーニング系を確立し³⁻⁵⁾、機能未知の新規遺伝子を同定することに成功した (unpublished, 以降 HPF4 と呼ぶ)。そして、HPF4 が HIF-1 の活性化を介して、マトリックスメタロプロテアーゼ群の発現を誘導することを見出した (unpublished)。また、予備的検討を通して、p53 が HPF4 の機能を抑制する傾向を捉えた。さらに、データベースを活用したメタ解析を通して、HPF4 の腫瘍内発現量が高いがん患者は生命予後が不良である可能性を見出した (unpublished)。これらの予備的知見に基づくと、『大腸がんの多段階発がん過程の中で、p53 の機能が低下することを引き金に p70 が HIF-1 を活性化するようになり、がん細胞の中で転移・浸潤能などが誘導される』という仮説が成り立つ。そこで、①HPF4 が HIF-1 を活性化する機序、②HPF4-HIF-1 経路ががんの悪性形質に及ぼす影響、③HPF4 の腫瘍内発現量と予後不良の相関を解析することによって、腫瘍悪性化の本質を捉え新たな治療法の確立に繋げることができると考え、本研究に着手するに至った。

方 法

HIF-1 の活性は主にその主要制御サブユニット HIF-1 α タンパク質の安定性に依存することが知られている。しかしその他にも、*hif-1a* 遺伝子の転写開始段階や、*hif-1a* 遺伝子の翻訳開始段階、さらには HIF-1 α 蛋白質の転写活性化活性 (transactivation activity) 等、様々なレベルで制御されていることが明らかになっている。そこで、まず HPF4 が HIF-1 を活性化する作用点を同定するため、*hif-1a* プロモーターの制御下でルシフェラーゼを発現するレポーター遺伝子 *hif-1a* 5'FS-luciferase、*hif-1a* 遺伝子の翻訳開始効率をルシフェラーゼ発光としてモニターするためのレポーター遺伝子 *hif-1a* 5'UTR-luciferase、HIF-1 α タンパク質の安定性をルシフェラーゼ発光としてモニターするためのレポーター遺伝子 *SV40p-ODD-luciferase*、HIF-1 α 蛋白質の転写活性化能をルシフェラーゼ発光としてモニターするための TAD Assay システムなど、独自のレポーター遺伝子を用いてルシフェラーゼアッセイを実施した (図 1)。それに先立ち、この実験を実施する為に必要になる HPF4 発現ベクターや HPF4 ノックダウン用ベクター、p53 発現ベクターな

*現所属：京都大学 放射線生物研究センター ゲノム動態研究部門 がん細胞生物学分野

どを構築した。一方、HIF-1 α 発現ベクターや HIF-1 応答性レポーター遺伝子等、本研究の「低酸素バイオロジー実験」で使用する遺伝子構築物については、我々がこれまでの研究で作製してきたものを有効に活用した。

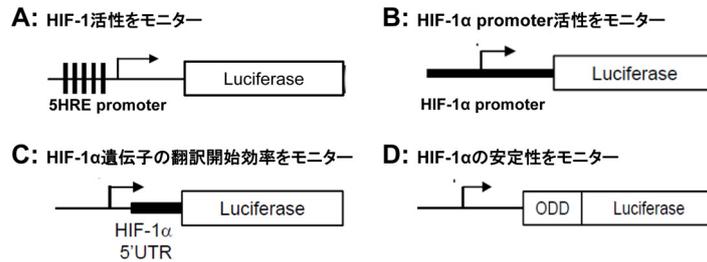


図1. 本研究で用いたレポーター遺伝子

HIF-1 活性 (A)、*hif-1a* 遺伝子のプロモーター活性 (B)、*hif-1a* 遺伝子の翻訳開始効率 (C)、HIF-1 α 蛋白質の安定性 (D) をルシフェラーゼ発光としてモニターするためのレポーター遺伝子。

がん細胞の浸潤能は、汎用の trans-well chamber による invasion assay で定量した。

肺癌患者の臨床検体を用いた研究は、所属機関の倫理委員会の承認の下、京都大学医学部附属病院で収集したヒト肺癌サンプルを対象に、Tissue Microarray [6\)](#) を作製して実施した。HPF4 に対する抗体を用いて免疫組織化学染色実験を実施し、二重盲検法で HPF4 発現量を定量・スコア化し、がん患者の生命予後との相関を解析した。

結果

1. HPF4 が HIF-1 活性を亢進する作用点の同定

ヒト大腸がん由来細胞株 HCT116 p53^{-/-}、およびヒト子宮頸がん由来細胞株 HeLa を細胞培養用プレートに播種し (10,000 cells/well in 24-well plate)、*hif-1a* プロモーターの制御下でルシフェラーゼを発現するレポーター遺伝子 *hif-1a 5'FS-luciferase* と、HPF4 発現ベクターもしくはその空ベクターを導入した。24 時間通常酸素条件下で培養した後、細胞を 21%もしくは 0.1%酸素濃度下で 24 時間追加培養し、プロメガ社製の Passive Lysis buffer を用いて細胞抽出液を得た。このサンプルを対象に Luciferase assay をすることによって、HPF4 が *hif-1a* 遺伝子の転写開始効率に影響を及ぼさないことが確認された (表 1)。

同様に *hif-1a* 遺伝子の翻訳開始効率をルシフェラーゼ発光としてモニターするためのレポーター遺伝子 *hif-1a 5'UTR-luciferase* や、HIF-1 α タンパク質の安定性をルシフェラーゼ発光としてモニターするためのレポーター遺伝子 *SV40p-ODD-luciferase* を用いて実験を行うことによって、HPF4 が *hif-1a* 遺伝子の翻訳開始効率にも、タンパク質の安定性にも何ら影響を及ぼさないことが確認された (表 1)。

一方、HIF-1 α タンパク質の転写活性化能をルシフェラーゼ発光としてモニターするためのシステム (TAD Assay) を活用して実験したところ、HPF4 の過剰発現によって HIF-1 α タンパク質の TAD 活性が亢進することが見出された (表 1)。

表 1. HPF4 の HIF-1 に対する作用点の同定

レポーターシステム	HIF-1 α 5' FS-luc	HIF-1 α 5'UTR-luc	SV40p-ODD-luc	TAD Assay System
評価項目	HIF-1 α 転写開始効率	HIF-1 α 翻訳開始効率	HIF-1 α 蛋白質安定性	HIF-1 α 転写活性化能
HPF4の影響の有無	-	-	-	+++

各種のレポーター遺伝子を活用して、HPF4 が HIF-1 活性を正に制御する作用点を同定した。

Western blotting 実験や定量的 RT-PCR 実験によって、ルシフェラーゼアッセイの結果を支持する結果が得られた。すなわち、HPF4 の発現量を遺伝子工学的に操作しても、HIF-1 α mRNA や HIF-1 α タンパク質の発現量に変化は見られなかった。以上、一連の *in vitro* の実験を通じて、HPF4 が HIF-1 α の転写活性化能を正に制御する因子であると結論付けた。

2. HPF4-HIF-1 経路の活性化による浸潤能の亢進

HPF4 の活性化によってがん細胞の浸潤能が亢進するか否かを検証する目的で、trans-well chamber を用いた実験を実施した。HCT116 p53^{-/-}細胞、および HeLa 細胞に HPF4 発現ベクターを導入し、trans-well chamber に播種、細胞外マトリックス模倣した高分子膜を消化して浸潤してきた細胞数をカウントした。その結果、HPF4 を過剰発現した場合に、細胞の浸潤能が有意に亢進することが確認された (P < 0.05、data not shown)。また、HPF4 による HIF-1 の活性化が p53 によって抑制されるという予備的知見と一致して、この HPF4 による浸潤能の亢進は p53 発現細胞では認められなかった。

3. HPF4 の腫瘍内発現量とがん患者の生命予後不良の相関

ヒト肺がんの臨床検体を対象に tissue micro array を作製し、HPF4 抗体を用いて免疫組織化学染色実験を実施した。そして、各腫瘍内の HPF4 発現量を定量し、患者の予後不良との相関を解析した。その結果、HPF4 の発現レベルが高い場合に、がん患者の生命予後が不良であることが明らかになった。この結果は、公開されているマイクロアレイデータベースを対象にした Prognoscan 解析による結果と一致した (図 2)。

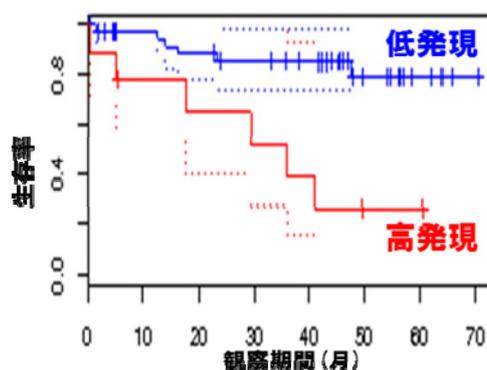


図 2. HPF4 とがん患者の予後不良の相関

Prognoscan データベース解析を通して、HPF4 の腫瘍内発現量が高い場合に、大腸がん患者の生命予後が不良であることが確認された。

考 察

がん抑制遺伝子 p53 の機能が失われた時に HPF4 が HIF-1 を活性化するようになり、がん細胞が悪性進展するというメカニズムの存在が示唆された。また、p53 変異型の場合に HPF4-HIF-1 経路を遮断することが有効な治療法となる可能性が示された。今後、*p53*、*hif-1 α* 、*hpf4*をはじめとする遺伝子のノックアウトマウスを、自然発がんモデルマウスなどと掛け合わせることによって、多段階発がんにおけるこれらの遺伝子の機能を解明することが必要である。

共同研究者

本研究の共同研究者は、京都大学放射線生物研究センターの子安翔研究員・森嶋章代研究員、京都大学大学院医学研究科呼吸器外科学の伊達洋至教授・毛受 暁史助教・西川滋人大学院生、日本赤十字社 和歌山医療センターの平岡真寛院長 (元京都大学大学院医学研究科放射線腫瘍学・画像応用治療学教授) である。本研究にご支援くださいました上原記念生命科学財団に厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC. p53 mutations in human cancers. *Science*. 1991 Jul 5;253(5015):49-53. doi: 10.1126/science.1905840. PMID: 1905840.
- 2) Semenza GL. Oxygen sensing, homeostasis, and disease. *N Engl J Med*. 2011 Aug 11;365(6):537-47. doi: 10.1056/NEJMr1011165. PMID: 21830968.
- 3) Goto Y, Zeng L, Yeom CJ, Zhu Y, Morinibu A, Shinomiya K, Kobayashi M, Hirota K, Itasaka S, Yoshimura M, Tanimoto K, Torii M, Sowa T, Menju T, Sonobe M, Kakeya H, Toi M, Date H, Hammond EM, Hiraoka M, Harada H. UCHL1 provides diagnostic and antimetastatic strategies due to its deubiquitinating effect on HIF-1 α . *Nat Commun*. 2015 Jan 23;6:6153. doi: 10.1038/ncomms7153. PMID: 25615526.
- 4) Zeng L, Morinibu A, Kobayashi M, Zhu Y, Wang X, Goto Y, Yeom CJ, Zhao T, Hirota K, Shinomiya K, Itasaka S, Yoshimura M, Guo G, Hammond EM, Hiraoka M, Harada H. Aberrant IDH3 α expression promotes malignant tumor growth by inducing HIF-1-mediated metabolic reprogramming and angiogenesis. *Oncogene*. 2015 Sep 3;34(36):4758-66. doi: 10.1038/onc.2014.411. PMID: 25531325.
- 5) Yeom CJ, Zeng L, Goto Y, Morinibu A, Zhu Y, Shinomiya K, Kobayashi M, Itasaka S, Yoshimura M, Hur CG, Kakeya H, Hammond EM, Hiraoka M, Harada H. LY6E: a conductor of malignant tumor growth through modulation of the PTEN/PI3K/Akt/HIF-1 axis. *Oncotarget*. 2016 Oct 4;7(40):65837-65848. doi: 10.18632/oncotarget.11670. PMID: 27589564.
- 6) Fujimoto M, Yoshizawa A, Sumiyoshi S, Sonobe M, Kobayashi M, Koyanagi I, Aini W, Tsuruyama T, Date H, Haga H. Stromal plasma cells expressing immunoglobulin G4 subclass in non-small cell lung cancer. *Hum Pathol*. 2013 Aug;44(8):1569-76. doi: 10.1016/j.humpath.2013.01.002. PMID: 23465276.