

## 164. UCHL1-HIF-1 経路が化学放射線治療抵抗性を導く機序の解明

後藤 容子

京都大学 医学部附属病院 放射線治療科

Key words : 放射線治療, HIF-1, UCHL1, 代謝リプログラミング

### 緒言

固形腫瘍においては腫瘍の増殖速度と血管の形成速度が不均衡であり、血管から十分な酸素が供給されない低酸素領域が存在する<sup>1)</sup>。低酸素環境下のがん細胞は低酸素誘導性因子 (hypoxia inducible factor 1: HIF-1) を活性化し、血管新生、代謝のリプログラミング、転移・浸潤を来しがんの悪性化をもたらす。これまでに我々の研究室から HIF-1 が放射線治療後のがんの再発において重要な役割を果たすことを明らかにしてきた<sup>2)</sup>。また、様々ながん種において、HIF-1 高発現と放射線治療後の生命予後不良との相関が数多く報告されている。

我々は、悪性固形腫瘍内部で HIF-1 を活性化し、がんの悪性形質を亢進する新規遺伝子として Ubiquitin C-terminal hydrolase-L1 (UCHL1) を同定した<sup>3)</sup>。さらに UCHL1-HIF-1 経路ががんの遠隔転移を担い、治療標的として有用であり、がん患者の生命予後不良につながることを明らかにしてきた。

本研究では UCHL1-HIF-1 経路が、がんの遠隔転移形成を担うのみならず、化学放射線治療抵抗性にも寄与しているのではないかと仮説を立て、これを検証することを目的とした。

### 方法

HIF-1 は“Warburg 効果”として知られる酸化的リン酸化から解糖系への糖代謝経路のリプログラミングを起こし、抗酸化物質を産生する引き金を引くことで放射線治療抵抗性の一因となり得る<sup>2)</sup>。このことより、UCHL1-HIF-1 経路が糖代謝経路のリプログラミングを介して抗酸化物質である還元型グルタチオンを産生し、抗酸化能を上昇させることで放射線治療抵抗性の一因となっているのではないかと仮説を立て、これを検証するための実験を行った<sup>4)</sup>。

まずマウス乳がん細胞株 EMT6 においても UCHL1-HIF-1 経路が機能していること、つまり UCHL1 が HIF-1 を活性化していることを確認した。次に、EMT6 を用いて UCHL1 の糖代謝への影響を LC/MS を用いた糖代謝産物解析を施行することで評価した。具体的には解糖系の最終代謝産物である乳酸と、TCA サイクル代謝産物を評価した。さらに、UCHL1-HIF-1 経路がペントースリン酸経路を介した抗酸化物質産生増加に繋がっているかを評価した。最後にコロニーフォーメーションアッセイを実施し、UCHL1 の過剰発現によって放射線治療抵抗性が誘導されるかを評価する実験を行った。

### 結果

まずマウス乳がん細胞 EMT6 においても UCHL1 が HIF-1 に対して作用するかを評価した。EMT6 において UCHL1 の過剰発現により HIF-1  $\alpha$  タンパクが安定化し、HIF-1 活性が亢進することを確認した。一方で、脱ユビキチン化活性を欠失させた UCHL1 の点変異体 (UCHL1 C90S) を過剰発現させた場合には、HIF-1 活性の上昇は見られなかった。

次に、UCHL1 の糖代謝への影響を LC/MS を用いた糖代謝産物解析を施行することで評価した。解糖系の最終代謝産物である乳酸と、TCA サイクルの最初の代謝産物であるクエン酸、イソクエン酸について解析し、糖代謝経路の評価を行った。UCHL1 の過剰発現により乳酸は増加し、クエン酸およびイソクエン酸は減少していた。また、この変化は、HIF-1  $\alpha$  をサイレンシングすることで有意に抑制された。以上の結果より、UCHL1 は HIF-1 を介して糖代謝経路を解糖系優位な状態にリプログラミングしていることが示唆された。さらに、UCHL1 によるこの糖代謝のリプログラ

ミングがペントースリン酸経路を介した抗酸化物質産生増加に繋がっているのか否かを評価した。EMT6において UCHL1 を過剰発現させると、細胞内の NADPH、還元型グルタチオン量の上昇が認められた。この効果はペントースリン酸経路の重要な酵素である glucose-6-phosphate dehydrogenase X-linked (G6pdx) をサイレンシングすると有意にキャンセルされた。これらの結果より、UCHL1 はペントースリン酸経路依存的に NADPH の産生を促して、細胞内の還元型グルタチオン量を上昇させていることが示された。

最後にコロニー形成アッセイを実施して放射線感受性の評価を行った。UCHL1 の過剰発現によって、放射線治療抵抗性が誘導され、さらにその放射線抵抗性が HIF-1  $\alpha$  をサイレンシングした場合にキャンセルされること確認した。以上の結果より、UCHL1 は HIF-1 を介して放射線抵抗性を獲得することが明らかになった。

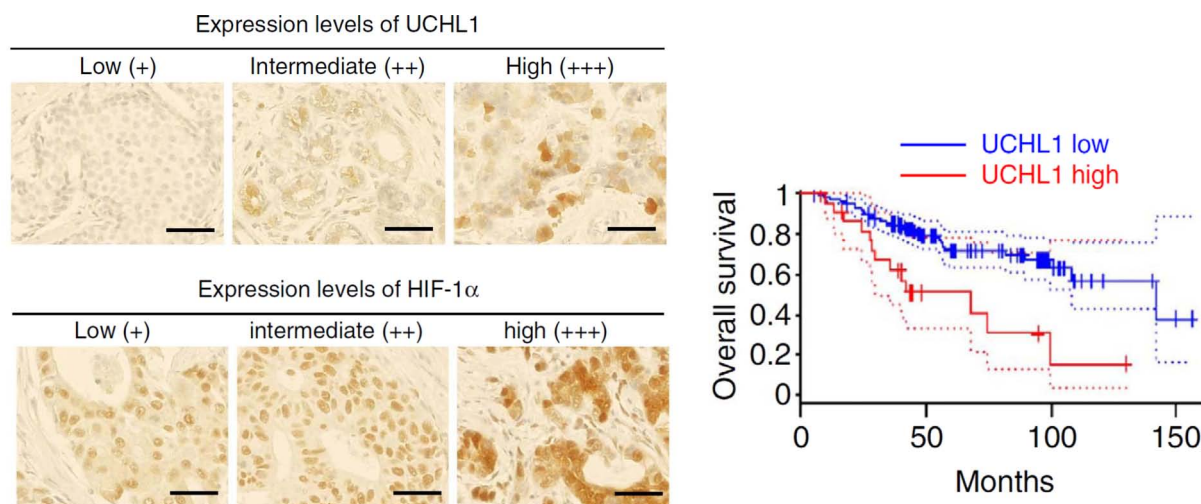


図1. UCHL1 は予後マーカーとして有用

ヒト乳がんにおいて UCHL1 と HIF-1  $\alpha$  の発現量には相関があり、また UCHL1 高発現群では術後の全生存率が有意に不良であった。

## 考 察

今回の研究から、UCHL1 は脱ユビキチン化活性により HIF-1  $\alpha$  タンパク質を安定化させ HIF-1 活性上昇をもたらす、糖代謝のリプログラミングを引き起こすことが明らかになった。また糖代謝のリプログラミングにより、抗酸化物質である還元型グルタチオンを増加させ抗酸化能の上昇をもたらすことで放射線治療抵抗を引き起こすことが示唆された。しかしながら、HIF-1 は放射線感受性に影響を及ぼしうるその他の多くの機能も有するため、今後さらに他の要素の関与についても検討が必要であると考えられる。

臨床検体を用いた評価から、実際の乳がん患者において UCHL1 の発現量は患者により差があり、また UCHL1 と HIF-1  $\alpha$  の発現量は相関していることをこれまでに明らかにしている。さらに、UCHL1 高発現群では生命予後が不良であるという結果も得ている (図1)。これらの結果から、UCHL1 は乳がんにおいて予後マーカーとなり得るのみでなく、UCHL1 高発現の患者群においては遠隔転移抑制および放射線治療増感のための有望な治療標的となり得る可能性が示唆される。

UCHL1-HIF-1 経路が化学療法の治療抵抗性をもたらすか否か、また放射線治療と併用した場合の影響については今後さらに解析を進めていく予定である。

本研究を進めるにあたり、公益財団法人上原記念生命科学財団より研究助成のご支援をいただきましたことを心より感謝申し上げます。

## 文 献

- 1) Vaupel P, Hockel M, Mayer A. Detection and characterization of tumor hypoxia using pO<sub>2</sub> histography. Antioxidants & redox signaling. 2007;9(8):1221-35. doi: 10.1089/ars.2007.1628. PubMed PMID: 17536958.

- 2) Harada H, Inoue M, Itasaka S, Hirota K, Morinibu A, Shinomiya K, et al. Cancer cells that survive radiation therapy acquire HIF-1 activity and translocate towards tumour blood vessels. *Nature communications*. 2012;3:783. doi: 10.1038/ncomms1786. PubMed PMID: 22510688; PubMed Central PMCID: PMC3337987.
- 3) Goto Y, Zeng L, Yeom CJ, Zhu Y, Morinibu A, Shinomiya K, et al. UCHL1 provides diagnostic and antimetastatic strategies due to its deubiquitinating effect on HIF-1alpha. *Nature communications*. 2015;6:6153. doi: 10.1038/ncomms7153. PubMed PMID: 25615526; PubMed Central PMCID: PMC4317501.
- 4) Harada H. Hypoxia-inducible factor 1-mediated characteristic features of cancer cells for tumor radioresistance. *Journal of radiation research*. 2016;57 Suppl 1:i99-i105. doi: 10.1093/jrr/rrw012. PubMed PMID: 26983985; PubMed Central PMCID: PMC4990106.