

氏名(本籍)	おがもと きよし 岡本 淳 (茨城県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	博甲第6289号
学位授与年月日	平成24年5月31日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
審査研究科	人間総合科学研究科
学位論文題目	<b>Microregional antitumor activity of a small-molecule hypoxia-inducible factor 1 inhibitor</b> (微小環境における低分子 HIF-1 阻害剤の抗腫瘍活性の解析)
主査	筑波大学教授 医学博士 加藤 光保
副査	筑波大学准教授 医学博士 安部井 誠人
副査	筑波大学准教授 博士(医学) 鶴嶋 英夫
副査	筑波大学助教 博士(理学) 山下 年晴

## 論文の内容の要旨

### (目的)

腫瘍内は低酸素状態になり、低酸素環境に適応するマスター制御遺伝子として転写因子 HIF-1 が機能する。HIF-1 は、がん細胞の増殖・生存能、浸潤・転移能、血管新生誘導能を亢進させるため、がん治療の分子標的として注目されている。本研究では、筆者らがスクリーニング系を立ち上げて同定した新規低分子 HIF-1 阻害剤 ER-400583-00 の抗腫瘍作用を評価することを目的として研究を行った。

### (対象と方法)

ER-400583-00 のヒトグリオーマ細胞株 U-251 に対する HIF-1 抑制作用を *in vitro* および *in vivo* の実験で評価している。U-251 細胞の xenograft model における腫瘍内低酸素領域は、免疫組織科学的手法によりパイボキシアプローブ (pimonidazole) を検出して、HIF-1 $\alpha$  発現の分布と比較解析した。さらに、持続的に HIF-1 $\alpha$  を抑制できる投与量の ER-400583-00 を3日間連続投与し、連続投与後に細胞増殖の指標とする BrdU と血液還流域の指標とする Hoechst33342 を投与した後に腫瘍を採取した。腫瘍内のがん細胞の増殖活性は、免疫組織科学的手法により BrdU 陽性細胞を数えて評価した。比較のため、放射線照射 (10 Gy) 後の腫瘍内のがん細胞の増殖活性も同様に評価した。最後に、ER-400583-00 と放射線照射との併用効果についても検討している。

### (結果)

U-251 細胞を用いた *in vitro* 解析の結果、ER-400583-00 は低酸素による HIF-1 $\alpha$  のタンパク質発現量を IC<sub>50</sub> = 3.7 nM で抑制し、HIF-1 の転写活性に反応するレポーター活性を IC<sub>50</sub> = 7.9 nM で抑制した。また、ER-400583-00 は、内在性の HIF-1 標的遺伝子の低酸素による発現誘導も抑制した。U-251 細胞の xenograft model においては、ER-400583-00 を 100 mg/kg の投与量で経口投与することにより、投与後3時間において腫瘍内の HIF-1 $\alpha$  量がコントロールの 10% 以下に低下した。HIF-1 $\alpha$  量の低下は投与後 24 時間持続した。また、同様の経口投与によって、腫瘍内の HIF-1 標的遺伝子の発現も低下した。

免疫組織科学的解析の結果、xenograft model の腫瘍においては、血液還流域から離れるに従い低酸素の程

度と HIF-1 $\alpha$  の発現が亢進し、血液還流域から約 150  $\mu$ m 離れた地点でピークに達していた。

U-251 xenograft 実験で、ER-400583-00 を 100 mg/kg の経口投与を行い、腫瘍内のがん細胞の増殖活性を評価した結果、血液還流域付近のがん細胞の増殖はコントロール腫瘍と同等であったが、血液還流域から離れるに従って、増殖抑制作用が認められ、血流から約 150  $\mu$ m 離れた地点で増殖抑制が最大となっていた。一方、放射線照射後の腫瘍においては、照射後 2 日目では、腫瘍全体で 3 割程度の増殖抑制が認められた。照射後 7 日目には、血液還流域付近の細胞増殖抑制が 4 割程度と増強されたが、血流から離れた地点での増殖抑制は 2 割程度の抑制に減弱していた。そこで、ER-400583-00 と放射線照射との併用効果を検討した結果、併用により、各単剤の薬効を上回る抗腫瘍効果が得られた。

#### (考察)

U-251 細胞の xenograft model の腫瘍内では、血管の近傍には低酸素状態が認められず、血液還流域から離れるに従い低酸素状態となっていた。このことから、このモデルでは、酸素の拡散限界が低酸素の主要な規定因子になっており、一時的な血流の途絶や貧血などの影響の少ないモデルであると考えられた。

持続的に HIF-1 $\alpha$  を抑制できる投与量 (100 mg/kg) の ER-400583-00 を 3 日間連続投与した結果、血管から離れた位置にあるがん細胞の細胞増殖がより強く抑制された。血管から離れたがん細胞は、低酸素環境下に置かれており、HIF-1 $\alpha$  の発現亢進が認められていたため、HIF-1 の働きにより、低酸素環境下での増殖を維持されていた可能性を示していると考えられる。そのために、ER-400583-00 により HIF-1 の働きを阻害されたことにより、細胞の増殖が阻害されたと考えられた。一方で、放射線照射の影響を解析した結果、血管近傍のがん細胞の増殖が持続的に抑制されたのに対して、血管から離れた位置にあるがん細胞の増殖抑制は一過的であった。このことから、U-251 細胞の xenograft model の腫瘍内では、血管から離れた低酸素領域のがん細胞は放射線照射に対して比較的抵抗性であると考えられた。そこで、ER-400583-00 と放射線照射との併用効果を検討した結果、併用により、各単剤の薬効を上回る抗腫瘍効果が得られた。放射線治療が血管近傍のがん細胞に対して抗腫瘍作用を発揮する一方、ER-400583-00 が低酸素領域のがん細胞に対して抗腫瘍作用を発揮することで、併用の効果が得られたと考えられた。

以上により、低分子 HIF-1 阻害剤 ER-400583-00 は、腫瘍内の低酸素領域のがん細胞に対して抗腫瘍作用を発揮する可能性が示された。また、放射線照射療法に ER-400583-00 を併用することにより、治療効果を高められることが示唆された。

## 審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究は、経口投与可能な新規の HIF-1 阻害剤が腫瘍内の低酸素領域で強く細胞増殖を抑制し、低酸素領域では、効果が低い放射線療法と併用することでより強い抗腫瘍効果が得られることを明らかにした点で優れた論文であると判断される。より長期の投与と実験の腫瘍増殖に対する作用や低酸素条件下における HIF-1 $\alpha$  のタンパク量の増加を抑制する分子機構の解明など今後、本研究を元にした研究の発展が期待される。

平成 24 年 3 月 28 日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもと論文について説明を求め、関連事項について質疑応答を行い、最終試験を行った。その結果、審査委員全員が合格と判定した。

よって、著者は博士 (医学) の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。