

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 18 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790308

研究課題名(和文) 低酸素応答転写因子ががん転移に与える影響の解析

研究課題名(英文) Analysis of the effects of hypoxia inducible factor for tumor metastasis

研究代表者

山下 年晴 (YAMASHITA, Toshiharu)

筑波大学・医学医療系・助教

研究者番号：50400677

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：低酸素応答転写因子HIFは様々な生理機能を有している，経尾静脈転移モデルを用いて血管内皮細胞におけるHIF機能解析を行った結果，宿主血管の低酸素応答性ととりわけHIF-2alphaの活性が低いとき転移巣形成が低下することを見いだした．また低酸素応答に対し抑制性に働くHIF-3alphaが肺血管内皮細胞においてVEカドヘリンを抑制的に制御していることも明らかにした．またHIF-2alphaの活性をある一定水準以下に低下させるとHIF-1alphaが代償性に活性化される現象も見いだした．

研究成果の概要(英文)：Hypoxia inducible transcription factor (HIF) has various physiological functions. The results of the HIF functional analysis in vascular endothelial cells with tail vein injection metastasis model, we found that metastasis foci was reduced when transplanted into HIF-2alpha knockdown host mice. HIF-2alpha knockdown mice have low activities in HIF-2alpha in endothelial cells. Furthermore, HIF-3alpha acting on inhibitory to the hypoxic response is controlling to the inhibitory VE-cadherin expression in pulmonary vascular endothelial cells. We found the phenomenon that HIF-1alpha is activated in compensatory when HIF-2alpha was reduced to a certain level below threshold.

研究分野：再生医学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：分子腫瘍学 低酸素応答 血管内皮細胞 がん微小環境

## 1. 研究開始当初の背景

心筋梗塞や脳梗塞と言った血管障害が原因となる疾患は末梢組織の虚血を伴う。虚血部位では供給される酸素が不足する低酸素ストレスを受けることとなる。生体には低酸素に対する防御機構が備わっており、その中心的役割を担っているのが低酸素応答転写因子(HIF: hypoxia inducible factor)である。HIFには3つのサブタイプが存在しており、全身性に発現し、基礎代謝等を制御するHIF-1 alpha, 血管内皮細胞等に発現し血管新生や赤血球造血に関与するHIF-2 alpha, 活性が弱く抑制性に働くHIF-3 alphaが確認されている。HIF因子群の標的は低酸素ストレス応答に関係する物がよく知られていたが、近年恒常性の維持にも関連していることを指摘する報告がされてきている。当グループの先行研究によりHIF-2 alphaが赤血球造血においてこれまで報告されていた腎臓でのErythropoietin産生制御だけでなく、赤血球分化を支持するストローマ細胞(脾臓血管内皮細胞)において接着因子であるVCAM-1の発現制御を介して赤血球分化に関与している事が分かった(Yamashita et al. 2008)。このことは低酸素ストレスに対する応答だけではなく、通常の赤血球造血つまり恒常性の維持にも関与している事を示している。またHIF-3 alphaは抑制性に働くが抑制の機序は弱い転写活性を有するHIF-3 alphaがHIF-1 alphaあるいはHIF-2 alphaと競合する形で標的遺伝子を制御するため抑制能は小さいが緻密な制御が可能となる。この因子の欠損マウスはエンドセリン発現が亢進し、発生期に一過的に肺高血圧様の症状を示し、右心室の拡張という表現型を呈する(Yamashita et al. 2008)。このようにHIF因子は発生においても重要な役割を担っており、非常に多彩な機能を有していることが分かりつつある。そこで様々な疾患との関連性が指摘されるようになってきた。しかしHIFによる標的遺伝子の特異性、制御様式の詳細は未だに不明な点が多い。

## 2. 研究の目的

低酸素応答転写因子(HIF: hypoxia inducible factor)が低酸素ストレスに対する応答だけでなく、様々な生理機能を有していることが明らかになりつつある。特に血管内皮細胞における接着因子の制御にHIFが関与している事が興味深い。血管形成に関与しているHIF-2 alpha, HIF-3 alphaが血管内皮細胞で発現していること、また血管構造とがん転移は高い相関性を示すことから考えてHIF因子ががん転移に関与している事が予

想される。そこで本申請課題では血管におけるHIFとがん転移の関連を、遺伝子改変マウスを用いて*in vivo*, *in vitro*の両面から明らかにすることを目的とする。これまでの報告より初期転移巣形成に関与する接着因子の一部がVCAM-1, VE-cadherinであること、また血管内皮細胞ではHIF-2 alpha, HIF-3 alphaが発現しておりVCAM-1, VE-cadherinがHIF-2 alphaの標的であることが明らかになっている。またHIF-3 alpha欠損血管内皮細胞はHIF-2 alphaの活性が高くなっているにも関わらず、リモデリング能力の低下を示すこともわれわれの解析より明らかとなっている。HIFの研究分野においては、低酸素応答と腫瘍血管新生や腫瘍の増殖に関連する研究が主であり報告が多数あるが、転移と宿主細胞におけるHIFの関連性を詳細に解析している報告は無い。そこで本申請課題では血管内皮細胞におけるHIF-2 alphaおよびHIF-3 alphaの転移臓器における機能だけでなく、原発腫瘍において腫瘍細胞が転移性を有するに至る過程にどのような関わりがあるのかまで解析する。具体的には以下の点を明らかにする。

- 1) 転移巣形成における血管内皮細胞で発現しているHIFの作用点を明らかにする
- 2) 転移巣形成に関与する標的遺伝子およびその制御機構を明らかにする
- 3) 転移性獲得における血管内皮細胞の役割を明らかにする
- 4) HIF遺伝子の関与および標的を動物モデルで明確に示す。

これらの解析により転移巣形成における宿主側のHIF機能、特に腫瘍細胞と相互作用している血管内皮細胞でのHIFの機能およびその標的遺伝子を明らかにし、原発腫瘍が転移性の獲得すなわち血管を透過し血流に入る時点、また標的臓器での初期転移巣の形成すなわち血管内皮への接着においてHIF-2 alpha, HIF-3 alphaがどのような因子をどのように制御しているのかを明らかにする。この研究結果はこれまで不明確であったがん転移という生命現象の解明に大きな影響を与えると考えられる。これにより新しい因子を標的とした治療法や薬の開発へと応用が大いに期待される。

## 3. 研究の方法

宿主血管内皮細胞におけるHIF転写因子群が、がんの転移能獲得および転移巣形成にどのように関与しているのかを明らかにするために、

- 1) 血管内皮細胞における接着因子の制御への関与を明確にする。
- 2) 転移能獲得における血管内皮細胞の役割

を明らかにする。

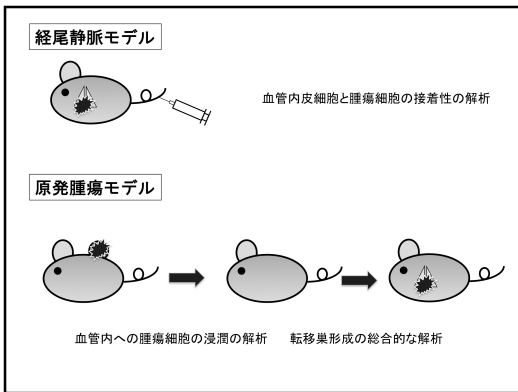
これらの2点に関して遺伝子改変マウスを用いた解析、並びに細胞レベルにまで材料を持って行き、分子機構の解明を行う。

(1) 接着因子の制御機構解析

経尾静脈モデルにおいて初期転移巣形成における血管内皮細胞の機能を明確に示す、特に血行性に移動してきた腫瘍細胞が標的臓器の血管内壁に接着する際に重要である接着因子の発現制御機構を詳細に解析する。

(2) 転移能獲得における腫瘍細胞と血管内皮細胞の相互作用を明確に示す

皮下腫瘍担がんマウスモデルを用いて、原発腫瘍が転移性を獲得する上で最も特徴的な現象である血管内への浸潤を解析する。腫瘍細胞が血管壁から浸潤し血行性の転移能を獲得する上で、血管内皮細胞と腫瘍細胞がどのような相互作用をしているのかを明らかにする。また血管内皮細胞において発現している HIF-2 alpha, HIF-3 alpha はどのような因子を標的として、どのように制御しているのかを解析し、転移メカニズムの解明に挑む(実験概要は下図参照)



具体的な実験内容は以下の通りである。

研究期間前半においては

HIF 遺伝子機能を的確に解析できる遺伝子改変動物実験モデルの確立および解析を実施する

1) 血行性転移モデルを作製し HIF-2 alpha, HIF-3 alpha がどのように作用するか明らかにする

i) 初期転移巣数, 大きさ, 形状を比較し HIF の作用点を解析する

ii) 時系列を追って解析し, HIF による制御メカニズムとの関連性を明確にする

iii) 血管内皮細胞と腫瘍細胞の相互作用との関連を解析する

2) 形態学的解析より得られた知見から, 標的遺伝子を特定し HIF との関連性を明らかにする

i) RT-PCR 法による既知遺伝子の発現解析を行う

ii) 未知遺伝子の関与を網羅的解析によって明らかにする

iii) 標的遺伝子の制御機構を明らかにする

さらに後半期間においてはより生体に近いモデルを用いてそのメカニズムを解明する。原発腫瘍からの転移形成モデル実験系を用いて血管内皮細胞と転移性獲得との関連を探る

1) HIF-2 alpha, HIF-3 alpha の各遺伝子改変マウスに原発腫瘍を作製, さらに切除・転移させるモデルを作製

i) 転移結節数・血中腫瘍細胞数を解析し, HIF 因子が転移形成に与える影響を明らかにする

ii) 原発巣の病理解析により腫瘍細胞の血管透過性と HIF の関連を解析する

iii) 関連する標的遺伝子を同定し制御機構および生理作用を解析する

2) 今回得られた HIF 機能の普遍性について検証する

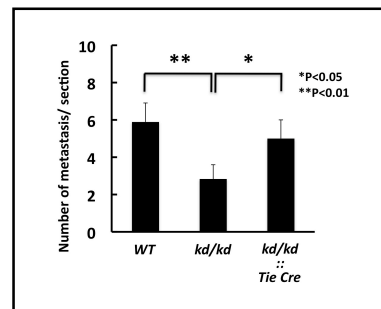
i) HIF-2 alpha :: HIF-3 alpha 複合遺伝子変異マウスを用いて制御機構を *in vivo* で証明する

ii) 異なる腫瘍および部位への播種による解析を行い, 特異性・普遍性を明らかにする

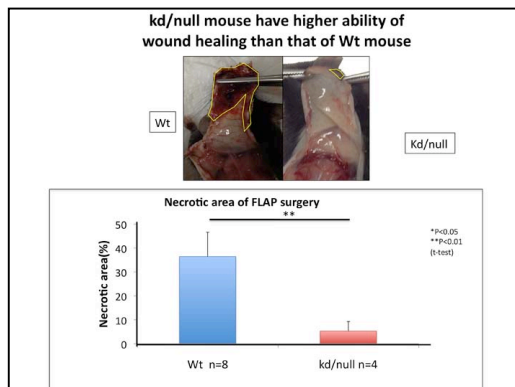
iii) 転移抑制を評価できるモデルを作製し, 得られた知見を評価する

#### 4. 研究成果

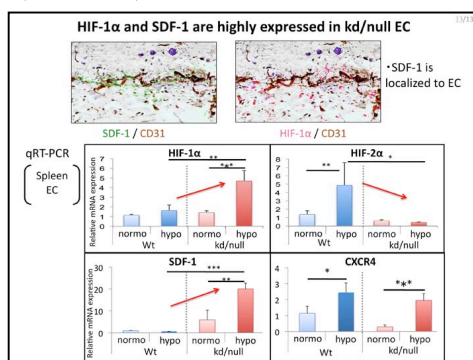
血管と腫瘍転移との関連性を証明する為に血行性転移モデルにて検証を行ったところ, 肺においては接着因子の関与よりも物理的な影響が強く正確な評価が出来なかった。そこで同じ実験モデルではあるが, 解析臓器を肝臓に変更し, 計測をおこなったところ野生型と HIF-2 alpha ノックダウンマウス間で有意な差が見られた。さらにこのマウスは全身性のノックダウンマウスであるために, 血管内皮細胞でのみ HIF-2 alpha の発現を回復させた HIF-2 alpha kd :: Tie1-Cre コンパウンドマウスを用いて肝臓における転移結節数を評価したところ, 血管内皮細胞における HIF-2 alpha が肝臓転移巣形成に重要であることが明らかとなった。(下図参照)



血管内皮細胞における HIF-2 $\alpha$  が血管新生およびがん転移巣形成に重要である事はこれまでに証明された。そこでさらに機能解析を動物モデルで解析する為、FLAP モデルを用いて虚血改善と HIF-2 $\alpha$  の関連を検証した。これまでの HIF-2 $\alpha$  の機能解析の結果から、HIF-2 $\alpha$  の発現を低下させたマウスでは虚血改善能の著しい低下が予想されたが、野生型よりも有意に虚血部位の改善効果が見られた。(下図参照)



この結果が意味するところは何かを探るべく、分子生物学的、病理学的解析を時系列を追って調べたところ、HIF-2 $\alpha$  ノックダウンマウスでは HIF-2 $\alpha$  が低下したことによって低酸素に対する対応力が低下し、一過的に野生型よりもシビアな低酸素状態に陥り、HIF-2 $\alpha$  のファミリー遺伝子である HIF-1 $\alpha$  が活性化し代償性に作用し、低酸素応答を補填している事を示唆する結果が得られた。この時の局所における遺伝子発現を RT-PCR にて解析したところ SDF-1 の発現が亢進していることが明らかとなった。SDF-1 はこれまでの報告では HIF-1 $\alpha$  の特異的な標的遺伝子とされていることから、確認のために連続切片を用いた免疫組織染色を行った結果、HIF-2 $\alpha$  ノックダウンの FLAP アッセイ個体の虚血部位において SDF-1 の発現を認めさらにそのシグナルは HIF-1 $\alpha$  と CD31 (血管内皮細胞のマーカー) と一致していることが明らかとなった。(下図参照)



その他の細胞種や一般の血管と性質が異なる腫瘍血管内皮細胞ではまだ確認が出来ていないが、少なくとも今回解析に用いた血管内皮細胞においては HIF-2 $\alpha$  を一定水準以上低下させると、HIF-1 $\alpha$  による代償性機構が働き、その時活性化される HIF-1 $\alpha$  特異的な標的遺伝子の種類によっては野生型と逆転した結果になることが示された。先の結果に戻って考察すると、がん転移に HIF-2 $\alpha$  が関与している事は、われわれの in vivo モデルにて証明されたが、今後これを応用して転移を抑制しようと分子標的治療を目指す場合、単純に HIF-2 $\alpha$  の活性を抑制するだけでは効果が無いことを示唆している。つまり HIF の転写制御を総合的に解析する必要があり、現在部分的に発現を抑えた物や HIF-2 $\alpha$  の発現を段階的に低下させて、HIF-2 $\alpha$  の発現量と代償機構の関連性、および代償性に HIF-1 $\alpha$  が活性化される分子機構を明らかにするべく初代培養細胞を用いて解析中である。さらに抑制性に働く HIF-3 $\alpha$  も同時に解析を進めてきており、HIF-3 $\alpha$  欠損肺血管内皮細胞では HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$  が抑制解除により活性化され VE カドヘリンを活性化し増殖や血管形成に影響を与えていることを証明した。HIF-3 $\alpha$  もこのように HIF を活性化する能力を有しており、この因子の関連性をあわせて解析を進める。本課題においてはがん転移における血管内皮細胞における HIF 機能を明らかにする計画であったが、がん転移と HIF-2 $\alpha$  の関連はクリアに証明出来たと考えている。その解析の中で HIF-2 $\alpha$  と HIF-1 $\alpha$  に代償機構が存在しており、それが虚血改善能に大きく関係していることを見いだせたことは予想外の大きな結果であると考えている。HIF を標的としたがん治療薬は多くの製薬メーカーにおいて開発中であり、このわれわれのモデルを用いて代償機構が明らかとなればより効果の良い治療薬の開発が期待できる。

## 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 5 件)

- ① Zhao Y, Matsuo-Takasaki M, Tsuboi I, Kimura K, Salazar GT, Yamashita T, Ohneda O. Dual Functions of Hypoxia-Inducible Factor 1 Alpha for the Commitment of Mouse Embryonic Stem Cells Toward a Neural Lineage. *Stem Cells Dev.* 2014 Feb 7. [Epub ahead of print], 査読有  
DOI: 10.1089/scd.2013.0328.

- ②Iwata K, Ikami K, Matsuno K, Yamashita T, Shiba D, Ibi M, Matsumoto M, Katsuyama M, Cui W, Zhang J, Zhu K, Takei N, Kokai Y, Ohneda O, Yokoyama T, Yabe-Nishimura C. Deficiency of NOX1/nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, reduced form oxidase leads to pulmonary vascular remodeling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2014 Jan;34(1):110-9. 査読有  
DOI: 10.1161/ATVBAHA.113.302107.
- ③Kimura K, Nagano M, Salazar G, Yamashita T, Tsuboi I, Mishima H, Matsushita S, Sato F, Yamagata K, Ohneda O. The role of CCL5 in the ability of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells to support repair of ischemic regions. *Stem Cells Dev.* 2014 Mar 1;23(5):488-501. 査読有  
DOI: 10.1089/scd.2013.0307.
- ④Fukuda S, Nagano M, Yamashita T, Kimura K, Tsuboi I, Salazar G, Ueno S, Kondo M, Kunath T, Oshika T, Ohneda O. Functional endothelial progenitor cells selectively recruit neurovascular protective monocyte-derived F4/80(+)/Ly6c(+) macrophages in a mouse model of retinal degeneration. *Stem Cells.* 2013 Oct;31(10):2149-61. 査読有  
DOI: 10.1002/stem.1469.
- ⑤Akimoto K, Kimura K, Nagano M, Takano S, To'a Salazar G, Yamashita T, Ohneda O. Umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells inhibit, but adipose tissue-derived mesenchymal stem cells promote, glioblastoma multiforme proliferation. *Stem Cells Dev.* 2013 May 1;22(9):1370-86. 査読有  
DOI: 10.1089/scd.2012.0486.

[学会発表] (計 9 件)

- ①IkkiTsuboi, Toshiharu Yamashita, Satomi Kobayashi, Osamu Ohneda. Deficient expression of HIF-2a in spleen results in compensatory angiogenesis by up-regulated of HIF-1a. 第 36 回 日本分子生物学会, 2013 年 12 月 3 日-6 日, 神戸.
- ②秋本恵子, 木村健一, 長野真澄, 山下年晴, 高野晋吾, 大根田修. ヒト間葉系幹細胞のグリオブラストマ増殖抑制に対する作用機構解明, 第 12 回 日本再生医療学会総会, 2013 年 3 月 21 日-23 日, 横浜.
- ③菊地豪, 山縣憲司, 佐藤和聡, 木村健一, 山下年晴, 大根田修. 異なる歯組織形成段階における歯髄幹細胞の比較検討. 第 12 回 日本再生医療学会総会, 2013 年 3 月 21 日-23 日, 横浜.

- ④加藤俊貴, 木村健一, 長野真澄, 山下年晴, 秋本恵子, 三島初, 大根田修. ステロイド薬投与による脂肪組織由来間葉系幹細胞への影響. 第 12 回 日本再生医療学会総会, 2013 年 3 月 21 日-23 日, 横浜.
- ⑤小林里美, 山下年晴, 長野真澄, 木村健一, 坪井一輝, 大根田修. Hypoxia inducible factor-3a regulates its target genes in association with HIF-1a and HIF-2a. 第 10 回 がんとハイポキシア研究会, 2012 年 12 月 6 日-7 日, 横浜.
- ⑥坪井一輝, 山下年晴, 木村健一, 小林里美, 長野真澄, 大根田修. Deficient expression of HIF-2a in endothelial cell cause upregulation of HIF-1a and compensatory angiogenesis. 第 10 回 がんとハイポキシア研究会, 2012 年 12 月 6 日-7 日, 横浜.
- ⑦白石章, 木村健一, 長野真澄, 山下年晴, 板東裕子, 原尚人, 大根田修. HIF-1a expression in ALDH-positive breast cancer is involved in cancer progression. 第 10 回 がんとハイポキシア研究会, 2012 年 12 月 6 日-7 日, 横浜.
- ⑧小林里美, 山下年晴, 長野真澄, 木村健一, 大根田修. 肺由来血管内皮細胞における低酸素応答転写因子 HIF-3a の機能解析. 第 35 回 日本分子生物学会年会, 2012 年 12 月 11 日-14 日, 福岡.
- ⑨坪井一輝, 山下年晴, 木村健一, 大根田修. HIF-2a kd/null ヘテロマウスを用いた造血機能解析. 第 35 回 日本分子生物学会年会, 2012 年 12 月 11 日-14 日, 福岡.

[図書] (計 0 件)  
該当無し

[産業財産権]  
該当無し

[その他]  
所属研究室ホームページ  
<http://www.md.tsukuba.ac.jp/basic-med/rmed/stemcell/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

山下 年晴 (YAMASHITA, Toshiharu)  
筑波大学・医学医療系・助教  
研究者番号: 50400677