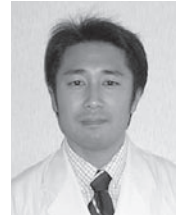


分子標的治療法開発にむけた低酸素研究

広島大学原爆放射線医科学研究所 遺伝子診断・治療開発研究分野

谷本 圭司



私も広島大学原爆放射線医科学研究所遺伝子診断治療開発研究分野ではヒト及びヒト疾患の基本的な分子・遺伝的情報の解析、これを基盤とする新規診断・治療法の開発研究を行っている。現在の研究主題は、ヒトがんの病態解明と増殖制御法の開発で、平成8年度頃から前西山正彦教授（現埼玉医科大学教授）のもと、薬物療法の個別化に資する実践的遺伝子解析システムの確立研究を、また5年前より不死化制御機構や低酸素応答機構の研究を基盤としてゲノム創薬標的の策定研究を開始し、ゲノム医療の創生を目指した研究を推し進めている。

具体的には、1. 「個」の医療（オーダーメイド癌治療）の確立研究として、薬理遺伝学的解析に基づく前向き臨床試験やゲノム薬理学的解析に基づく抗癌剤個別化化学療法の実現へ向けた効果予測モデルの確立を、胃がん、大腸がん、食道がん、卵巣がんや肺がんなどについて開発中である。また、2. 難治性固形がんに対するゲノム創薬標的の策定と分子標的治療の開発として、普遍的不死化関連遺伝子の同定、機能解析と分子標的治療法の開発を行っている。さらに、3. 固形がんにおける低酸素応答分子機構の解明研究を通じて、既存の治療法の改善法、新しい分子標的治療法の開発を目指している。

特に、私は低酸素研究を主題としているので、その概論とわれわれの研究の一部を紹介する。

酸素供給の維持は生命にとって必須であるが、細胞レベルで酸素欠乏（低酸素状態）に応答し防御する分子機構が次第に明らかとなりつつある。正常細胞同様に、がん細胞の機能維持にも酸素は必須であるが、固形がんの特徴には腫瘍血管新生の遅延や構造異常などによる低酸素・低栄養が知られており、酸素感知、防御システムが利用（悪用）され、がん細胞の生存、増殖、転移そして治療抵抗性獲得が促進されると考えられている¹⁻³⁾。1990年代半ばに、低酸素応答において中心的役割を果たしている転

写因子 hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) が同定され⁴⁾、低酸素応答機構の研究は加速度的に進歩してきた。がん細胞においては、HIF-1 α および標的遺伝子のがん組織特異的発現亢進や悪性化との関連性、そして、治療標的としての可能性が多数報告されており、低酸素がん細胞の克服が重要な課題であることが認識されている。一方で、がん細胞故の複雑性のために、その機構の全貌解明および治療法開発への応用展開にはまだ道半ばである。

低酸素応答性転写因子 HIF は α および β サブユニットのヘテロ二量体からなり、 α サブユニット蛋白は、通常酸素下ではプロリン水酸化酵素 prolylhydroxylase domain (PHD) 1~3 によりプロリン残基が水酸化され、癌抑制遺伝子 von Hippel-Lindau (pVHL) 蛋白との結合、ユビキチン化が促進され、プロテオソームにより素早く分解される⁵⁾。一方、低酸素下では、HIF- α 蛋白の pVHL 結合領域内のプロリン残基が水酸化されなくなり、pVHL から解離し、蛋白質安定化、核内移行、 β サブユニットとのヘテロ二量体形成を経て、標的遺伝子プロモーター上に存在する hypoxia response element (HRE) に結合し、転写活性化する。VHL 遺伝子は染色体第3番短腕上に存在する癌抑制遺伝子で、腎がんを初めとして、さまざまながんにおいて多数の変異が報告されている。変異は二カ所のホットスポットに集中しており、これらの領域に変異を持つ蛋白は HIF- α 蛋白分解を促進できないことが明らかとなっている。さらに、pVHL との結合にも関わり、転写活性化領域に相当する HIF1A 遺伝子エクソン12内に多型が存在することも報告されている。われわれは、頭頸部扁平上皮がん患者55名の HIF1A 遺伝子エクソン12内の多型を検索し、582番目のプロリンがセリンに置換されるアリルを有する遺伝子型 (C/T型)、588番目のアラニンがスレオニンに置換されるアリルを有する遺伝子型 (G/A型)

の HIF-1 α を持つ腫瘍は、有意に腫瘍内血管数が多いことを明らかにした⁶⁾。これらの結果は、一塩基の相違によって HIF-1 が活性化されている個体、組織が存在する可能性を示唆しており、低酸素応答に関わる因子の遺伝子レベルでの相違が、そのシグナルを増強していることが明らかとなり、腫瘍内微小環境におけるさまざまなストレスによって引き起こされる反応系に大きな影響を与えている可能性が考えられた。

固形がんの低酸素領域は、腫瘍内末梢血管から距離 (70 μm ~) があることにより薬剤の浸透性が悪く、抗がん剤が効きにくいことが知られている。また、低酸素下でエネルギー代謝の変化した、細胞分裂の減少したがん細胞には、活発な細胞分裂を標的として開発された多くの抗がん剤が効きにくいと考えられる。さらに、低酸素応答遺伝子には、抗がん剤耐性との関連性の示されている ABCB1 や VEGF など多くの遺伝子が含まれており、薬剤耐性形質獲得に HIF-1 経路が重要な働きをしていることが明らかとなってきた¹⁻³⁾。われわれの検討でも、これら分子レベルでの変化を考慮した薬剤の組み合わせ、治療法を開発する重要性、有用性が示されている。現在も主要な抗がん剤の一つである 5-Fluorouracil (5-FU) と共に、HIF-1 抑制活性が報告されているカンプトテシン誘導体 Irinotecan hydrochloride (CPT-11) に対する感受性を、複数の口腔癌細胞株を用いた MTT 法にて検討した。さまざまな濃度の抗がん剤に接触させ、通常酸素分圧下にて 72 時間培養し、IC₅₀ 値を比較したところ、感受性の高い (IC₅₀ 値の低い) 細胞から低い (IC₅₀ 値の高い) 細胞までさまざまであった。一方、薬剤接触後に低酸素下にて培養した場合、5-FU では多くの細胞株の感受性低下 (IC₅₀ 値の上昇) が観察されたが、CPT-11 感受性はほとんど変化しなかった。そこで、低酸素下での感受性変化の大きな HSC-2 を用いて、併用実験を行った。HSC-2 に低濃度 (2000 ng/ml、IC₈₀₋₉₀ に相当) の CPT-11 を前処理し、5-FU の感受性変化を観察した。その結果、低酸素刺激による 5-FU 耐性化が抑制された。すなわち、固形腫瘍の低酸素下癌細胞に起因する抗がん剤治療抵抗性に対し、低酸素の影響を受けない薬剤や HIF-1 活性を抑制する薬剤を併用することによりその耐性化を克服できる可能性

が示された。現在、世界中で低酸素、HIF-1 α 自体やその経路の因子を標的とした薬剤の開発が進められており、また、既存の抗がん剤や化合物にも HIF-1 抑制活性を示すものが報告されており、放射線療法を含めたさまざまな薬剤との併用療法の開発に期待がもたれる。

がん低酸素研究は古くて新しい重要な領域である。低酸素応答分子機構の大筋が明らかとなってきたが、これらの分子機構を分子標的としてがん治療に応用展開するまでには至っていない。がん低酸素研究は今後、益々注目度を増し、複雑となって来ることが予想されるが、複雑な機構の中から低酸素がんの悪循環を断ち切る様な分子標的が見出され、ほとんどの固形がんが放射線や薬剤による非侵襲治療で制御できるようになることを願っている。



現研究室メンバー

参考文献

- 1) Harris AL. Hypoxia-a key regulatory factor in tumour growth. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 38-47.
- 2) Semenza GL. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2003; 3: 721-32.
- 3) Poellinger L, Johnson RS. HIF-1 and hypoxic response: the plot thickens. *Curr Opin Genet Dev* 2004; 14: 81-5.
- 4) Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 5510-4.
- 5) Tanimoto K, Makino Y, Pereira T, Poellinger L. Mechanism of regulation of hypoxia-inducible factor-1 α by von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *EMBO J* 2000; 19: 4298-309.
- 6) Tanimoto K, Yoshiga K, Eguchi H, et al. Hypoxia-inducible factor-1 α polymorphisms associated with enhanced transactivation capacity, implying clinical significance. *Carcinogenesis* 2003; 24: 1779-1783.