



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Detailed assessment of gene activation levels by multiple hypoxia responsive elements under various hypoxic conditions [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	竹内, 康人
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(歯学)
Dissertation Number	甲第11269号
Issue Date	2014-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/56303
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Yasuto_Takeuchi_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（歯学） 氏 名 竹 内 康 人

学位論文題名

Detailed assessment of gene activation levels

by multiple hypoxia responsive elements under various hypoxic conditions

（さまざまな低酸素条件における低酸素応答領域による遺伝子発現の評価）

【緒言】酸素濃度の低下した癌細胞では、HIF-1（hypoxia inducible factor 1: 低酸素誘導因子 1）が核内に蓄積し、DNA 上の HRE（hypoxia responsive elements: 低酸素応答領域）への結合によって低酸素に対する遺伝子応答が起こる。HIF-1 は、さまざまな低酸素関連遺伝子を調節する転写因子であり、HRE は、低酸素関連遺伝子のプロモーター領域に対して、エンハンサーとして働く配列である。代表的な低酸素関連遺伝子としては、エリスロポエチン（Epo）遺伝子や血管内皮増殖因子（VEGF）遺伝子などがある。癌細胞は、さまざまな低酸素関連遺伝子の発現の結果として、放射線治療・化学療法に対する治療抵抗性を獲得すると考えられている。したがって、HIF-1/HRE による遺伝子調節は、イメージングや難治性癌に対する治療の有用な標的とされている。これまでに HRE とレポーター遺伝子を組み合わせたイメージングや、HRE を利用した遺伝子治療の報告はあるが、*in vitro* で HRE による遺伝子発現の評価を行なった報告は少なく、HRE の基本的性質に関する検証も不十分である。そこで本研究は、（1）さまざまな低酸素環境や負荷時間における複数の HRE による遺伝子発現を評価すること、（2）HRE の双方向への遺伝子発現を評価すること、（3）腫瘍内の低酸素領域によって HRE が遺伝子発現を誘導するかどうか確認することを目的とした。

【方法】まず、ホタルルシフェラーゼレポーター遺伝子と複数の VEGF 由来の HRE（2, 4, 6, 8, 10, 12 個）を含むベクターを作製した（nHRE+, nHRE-）。作製したベクタ

一をヒト大腸癌細胞株 (Human colon carcinoma: HCT116) に一過性に遺伝子導入した。ルシフェラーゼアッセイを用いて、さまざまな低酸素負荷時間 (6, 12, 18, 24 時間)、酸素濃度 (1, 2, 4, 8, 16%)、DFO (deferrioxamine mesylate) による化学的な低酸素負荷 (20, 40, 80, 160, 320 μ g/mL) における、HRE による遺伝子発現を定量的に評価した。また、ホタルルシフェラーゼ遺伝子 (*Fluc*) とウミシイタタケシフェラーゼレポーター遺伝子 (*Rluc*) を HRE の両側に配置したベクター (dual-*luc*-nHRE) を作製し、同様に HCT116 に一過性に遺伝子導入した後、ルシフェラーゼアッセイにより、HRE の双方向への遺伝子発現を調べた。さらに、12HRE と NIS (sodium iodine symporter) 遺伝子を持つベクター (pGL-12HRE-NIS) を、レポーター遺伝子として HCT116 に導入し、NIS 安定発現細胞株を樹立した (HCT116-12HRE-NIS)。樹立した癌細胞株をヌードマウスの右側腹部に皮下注射し、担癌モデルマウスを作製した。腫瘍内に生じる低酸素領域によって、*in vivo* で HRE が遺伝子発現を誘導するかどうかを確認するために、担癌モデルマウスに $^{99m}\text{TcO}_4^-$ を尾静脈注射し、SPECT イメージングを行なった。

【結果】(1) 酸素濃度 1%に固定して、低酸素負荷時間を変えた時の HRE による遺伝子発現を調べた実験では、正常酸素と比較して 3~85 倍の HRE による遺伝子発現の増加が見られた。また、HRE コピー数の増加に伴って HRE による遺伝子発現は増加する傾向が見られたが、6~8HRE 以上のベクターでは、遺伝子発現の増加に頭打ちが見られた。負荷時間に関しては、低酸素負荷 6 時間から 12 時間にかけて HRE による遺伝子発現は著明な増加が見られたが、12 時間を超えた負荷時間では頭打ちであった。(2) DFO による化学的な低酸素負荷を行なった時の、HRE による遺伝子発現を調べた実験では、HRE コピー数の増加に伴って HRE による遺伝子発現は増加する傾向が見られ、DFO 濃度の増加に伴って HRE による遺伝子発現が増加した。(3) 酸素濃度による低酸素負荷を行なった時の、HRE による遺伝子発現を調べた実験では、HRE コピー数の増加に伴って HRE による遺伝子発現は増加する傾向が見られ、酸素濃度の低下に伴って HRE による遺伝子発現が増加した。また 16%という緩やかな低酸素においても HRE による遺伝子発現が認められた。(4) HRE の双方向への遺伝子発現に関しては、低酸素の程度や HRE コピー数に関わらず、HRE の双方向への遺伝子発現を認めた。線形回帰解析を行なったところ、HRE の双方向への遺伝子発現の比は、おおよそ 1 であった。(5) 予備実験として、*in vitro* において樹立した NIS 安定発現細胞株の $^{99m}\text{TcO}_4^-$ の取り込みを確認した。その結果、Wild type の HCT116 では正常酸素条件 (21%)・低酸素条件 (1%) 共に、 $^{99m}\text{TcO}_4^-$ の取り込みはほとんど見られなかったのに対して、樹立した細胞株 (HCT116-12HRE-NIS) は、正常酸素条件での $^{99m}\text{TcO}_4^-$ 取り込み量と比較して、低酸素条件下 (1%) で約 17 倍の $^{99m}\text{TcO}_4^-$ 取り込み量の増加を示した ($p = 0.0001$)。また、担癌モデルマウスを用いた *in vivo* SPECT イメ

ージングでは、安定発現細胞株を移植したマウスでは、腫瘍内に自然に生じる低酸素領域によって、NIS が発現したことを反映する、腫瘍への $^{99m}\text{TcO}_4^-$ 取り込みを認めた。一方、Wild type の HCT116 では、腫瘍への $^{99m}\text{TcO}_4^-$ 取り込みは見られなかった。

【考察】HRE の双方向への遺伝子発現に関しては、一般的に、エンハンサーとターゲット遺伝子の間で遺伝子発現を妨げるインスレーターが存在しなければ、エンハンサーは双方向への遺伝子を発現することが知られている。しかし、そのメカニズムは明らかになっていない。本実験では、低酸素負荷の程度に関わらず、HRE の双方向への遺伝子発現の比が一定であることを確認した。この結果は、HRE の双方向に異なる 2 つの遺伝子を組み合わせただけの応用に役立つと考えられる。

また、担癌モデルマウスを用いた SPECT イメージングでは、*in vitro* での実験で 6 ～8 コピー数以上の HRE を用いた時に、遺伝子発現の増加に頭打ちが見られたにも関わらず、12HRE を使用した。一般的に、生体内における複数の反復配列は不安定であるため、反復配列は DNA 複製や修復の際に、欠落しやすく、また組み換えも起こりやすいことが知られている。したがって、*in vitro* での遺伝子発現の程度が同程度であれば、より多い HRE コピー数を持ったベクターの方が *in vivo* での使用に適していると考えたため、12HRE を *in vivo* SPECT イメージングで使用した。

ニトロイミダゾール誘導体である ^{18}F -FMISO と非ニトロイミダゾール誘導体である $^{60/62}\text{Cu}$ -ATSM は、臨床で使用されている代表的な低酸素 PET トレーサーである。両トレーサーとも、細胞内の還元状態によって低酸素状態の細胞に集積し、両トレーサーの腫瘍への集積量は高いほど予後が悪く、有用な予後因子の 1 つとされている。一方で、両トレーサーの腫瘍内分布は互いに異なることが報告されている。難治性癌に対する、腫瘍内の低酸素領域をターゲットとした IMRT (Intensity Modulated Radiation Therapy: 強度変調放射線治療) のような新しい放射線治療を行なうために、どちらの低酸素 PET トレーサーの集積分布が治療抵抗性と関係した低酸素領域であるかを明らかにすることは非常に重要である。そこで我々は、HIF-1 活性化領域を治療抵抗性の基準として、低酸素 PET トレーサーの腫瘍集積量と腫瘍内分布を評価する研究を進めている。

【結果】本研究の結果は、低酸素下における複数の HRE の遺伝子発現メカニズムの理解と評価に役立ち、将来的に、低酸素を標的としたイメージングや治療における基礎となるであろう。