



# 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             | <a href="https://hdl.handle.net/2115/56303">https://hdl.handle.net/2115/56303</a>                                                                                                         |
| Rights(URL)         | <a href="https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/">https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/</a>                                                                 |
| Type                | doctoral thesis                                                                                                                                                                           |
| File Information    | Yasuto_Takeuchi_review.pdf, 審査の要旨                                                                                                                                                         |



## 学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称      博士(歯学)      氏 名 竹内 康人

### 審 査 担 当 者

主査 教授 北川 善政

副査 教授 鄭 漢忠

副査 教授 進藤 正信

副査 准教授(川崎医科大学) 犬伏 正幸

### 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領域による遺伝子発現の評価)

審査は、審査委員全員の出席の下に口頭試問の形式により行われた。申請者に対して提出論文とそれに関連した学科目について試問を行った。審査論文の概要は以下の通りである。

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、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。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、*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。

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-)。作製したベクターをヒト大腸癌細胞株 (Human colon carcinoma: HCT116) に一過性に遺伝子導入し、ルシフェラーゼアッセイを用いて、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 µg/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、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) を作製し、NIS 安定発現細胞株を樹立し (HCT116-12HRE-NIS)、担癌マウスを作製した。腫瘍内に生じる低酸素領域によって、*in vivo* で HRE に

よる遺伝子発現が起こるかどうかを確認するために、 $^{99m}\text{TcO}_4^-$ を用いた SPECT イメージングを行なった。

本研究から以下の結果が得られた。(1)1%の低酸素下における HRE による遺伝子発現は、正常酸素と比較して 3~85 倍の増加が見られ、HRE コピー数の増加に伴って増加する傾向が見られたが、6~8HRE 以上のベクターでは、頭打ちが見られた。(2)低酸素負荷時間に関しては、6時間から12時間にかけて遺伝子発現の著明な増加が見られ、12 時間を超えた負荷時間では頭打ちであった。(3)酸素濃度による低酸素負荷における HRE の遺伝子発現は、酸素濃度の低下に伴って増加する傾向が見られた。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)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。線形回帰解析の結果、HRE の双方向への遺伝子発現の比は、およそ1であった。(5)*in vitro* での  $^{99m}\text{TcO}_4^-$ の取り込みを調べた結果、樹立した NIS 安定発現細胞株(HCT116-12HRE-NIS)の  $^{99m}\text{TcO}_4^-$ の取り込みは、正常酸素下(21%)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 イメージングの結果、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た低酸素領域による腫瘍への  $^{99m}\text{TcO}_4^-$ 取り込みを認めた。

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。現在、HRE による遺伝子発現を治療抵抗性の新しい基準として、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。これにより、低酸素に関連する癌の難治性に関する分子遺伝子レベルでの新たな知見が得られることが期待される。

論文審査にあたって、論文申請者による研究要旨の説明後、本研究ならびに関連する研究について口頭試問を行った。主な質問事項は、1)現在臨床で使用されている低酸素 PET トレーサーの集積原理について、2)12 個の HRE を用いた根拠について、3)NIS 遺伝子をレポーター遺伝子として使用した理由について、4)光イメージングと核医学イメージングの違いについて 5)HIF-1 の転写因子としての機能について、6)腫瘍内の細胞死の領域とピモニダゾール陽性領域ならびに NIS 発現領域との関係について、7)腫瘍細胞から見た遺伝子応答と治療抵抗性との関係について、8)本研究で得られた HRE の基本的な性質が将来、具体的にどのようなことに役立つと考えられるのかについて等であった。

これらの質問に対して申請者から適切かつ明快な回答、説明が得られ、研究の立案と遂行、結果の収集とその評価について申請者が十分な能力を有していることが確認された。本研究は、腫瘍における低酸素の分子・遺伝子レベルでの解明につながるものであり、その内容が高く評価された。申請者は、関連分野にも幅広い学識を有していると認められ、さらに発展的研究へのモチベーションも高く将来性についても評価された。本研究業績は腫瘍における低酸素領域の診断のみならず関連領域にも寄与すること大であり、博士(歯学)の学位に値するものと認められた。