



Title	放射線治療感受性とHIF-1及びNotch pathwayの関連性の検討
Author(s)	池澤, 靖元
Description	配架番号 : 2070
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第11198号
Issue Date	2014-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k11198
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/64580
Type	doctoral thesis
File Information	Yasuyuki_Ikezawa.pdf



学位論文

放射線治療感受性と HIF-1 及び

Notch pathway の関連性の検討

(The analysis of the association of the
radiosensitivity and HIF-1 and Notch pathway)

2014 年 3 月

北海道大学

池澤 靖元

学位論文

放射線治療感受性と HIF-1 及び

Notch pathway の関連性の検討

(The analysis of the association of the
radiosensitivity and HIF-1 and Notch pathway)

2014 年 3 月

北海道大学

池澤 靖元

目次

発表論文目録および学会発表目録	1 頁
緒言	2 頁
略語表	19 頁
実験方法	20 頁
実験結果	25 頁
考察	41 頁
総括および結論	43 頁
謝辞	44 頁
引用文献	45 頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に投稿中である.

Oncogene

本研究の一部は以下の学会に発表した.

1. Yasuyuki Ikezawa, Jun Sakakibara-Konishi, Hidenori Mizugaki, Satoshi Oizumi, Masaharu Nishimura
The role of HIF-1 and Notch pathway in radioresistance of non small lung cancer cell lines
American Association for Cancer Research, April 6, 2013, Washington, DC
2. 池澤 靖元, 榊原 純, 水柿 秀紀, 大泉 聡史, 西村 正治
放射線治療感受性と HIF 及び Notch pathway の関連性の検討
第 72 回日本癌学会学術総会, 2013 年 10 月 3 日, 横浜
3. 池澤 靖元, 榊原 純, 水柿 秀紀, 大泉 聡史, 西村 正治
放射線治療感受性と HIF 及び Notch pathway の関連性の検討
第 54 回日本肺癌学会学術総会, 2013 年 11 月 21 日, 東京

緒言

1) 肺癌治療の現状

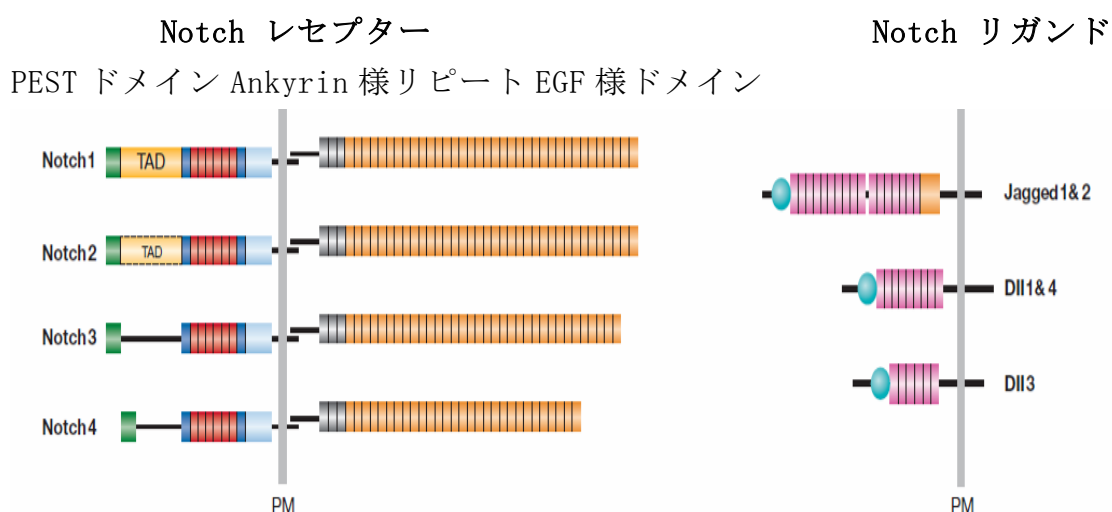
肺癌は全世界的に悪性新生物に関連した死亡率の第1位を占め、その罹患率は増加傾向にある。日本においても肺癌が1998年に癌死亡原因の第1位となってから既に10年以上が経過し、2010年の死亡数に関しても全癌死亡に対し男性24%、女性14%ともっとも頻度の高い癌の一つとなっている。進行非小細胞肺癌の治療としては、殺細胞効果を持つプラチナ製剤（シスプラチンまたはカルボプラチン）に、90年代に登場した新規抗癌剤（ゲムシタビン、ビノレルビン、イリノテカン、パクリタキセル、ドセタキセル）のうちいずれか1種類を併用し、3～4週ごとに4～6回治療することが標準的である。これらの治療による生存期間中央値は約1年、2年生存率は10～30%であり、必ずしも有効とは言えない^{1,2}。近年、上皮成長因子受容体チロシンキナーゼ阻害薬（EGFR-TKI）や抗血管内皮増殖因子（VEGF）抗体、ALK阻害薬などを含めた幾つかの分子標的治療薬の有効性が報告されている。EGFR遺伝子変異陽性例はアジア地域に多く、変異陽性例で70%以上にゲフィチニブ（EGFR-TKI）が奏功するのに対し、変異陰性例では10%程度であることが報告されている。日本人のEGFR遺伝子変異陽性患者に対し、初回治療においてゲフィチニブを投与した場合に、従来の第一選択薬であったカルボプラチン+パクリタキセルの併用治療と比べ無増悪生存期間が明らかに延長することが証明された³。VEGF抗体であるベバシズマブは非扁平上皮癌においてカルボプラチン+パクリタキセルの標準療法に併用することで有意な生存期間の延長を示した⁴。またEML4-ALK陽性例に対してALK阻害薬であるCrizotinib投与によって奏効率57%、病勢制御率87%と優れた治療効果を示した⁵。この様に近年徐々に分子標的治療薬を中心とした個別化治療が主体となってきている。しかし、いずれの治療においても副作用の問題や耐性獲得などによる再増悪など、その効果は十分ではないことが多い。よって非小細胞肺癌患者に対して治療効果や生存率を改善するために、新たな治療戦略の開発が必要と考えられる。

2) Notch pathway について

Notch 遺伝子は1917年にショウジョウバエにおいて最初に発見された。Notch 遺伝子の欠損が生じたショウジョウバエの羽にNotch（切れ込み）がみられたことからその名前に由来する。Notchは様々な組織（リンパ組織、神経、毛髪、感覚器、血管系等）の分化において必須なシグナルである。血

管系の分化においては胎生期・幼若期にその発現が増強し、成熟期においては発現が低下することが報告されている⁶⁻⁸。Notch ファミリーは4つの Notch 受容体ファミリー(Notch1-4)と Jagged(Jagged1, 2)と Delta-like(Dll1, 3, 4)の5つのリガンドの存在が示されている。Notch 受容体は300kDa にも及ぶ巨大な1回膜貫通蛋白質であり、細胞膜を介し約200kDaの細胞外ドメインと約100kDaの細胞内ドメインから形成されている。細胞外ドメインにはEGF様ドメインがあり、細胞内ドメインは6個のankyrin様リピートとPESTドメインにより構成される⁹⁻¹⁰ (図1)。

図 1

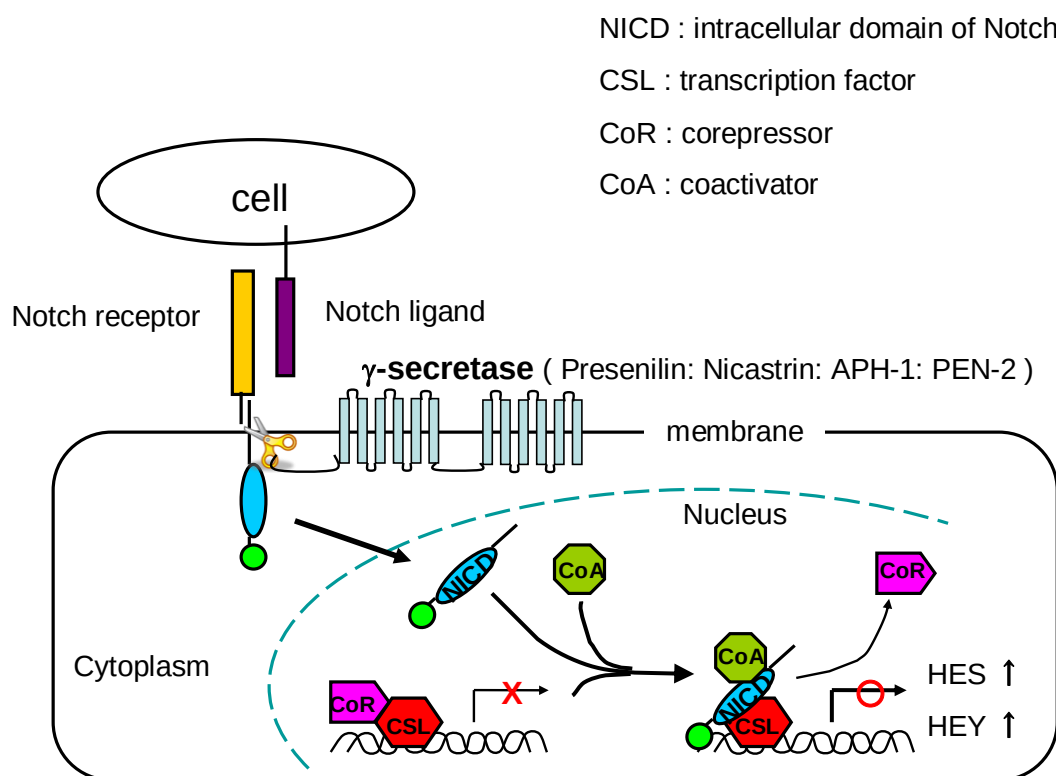


EMBO reports(2005) 6. より引用。

Notch pathway の活性化の機序としては、Notch 受容体の発現細胞と Notch リガンドの発現細胞とが接触し、受容体の細胞外ドメインとリガンドが結合すると γ -secretase と呼ばれるプロテアーゼにより、Notch 受容体が分解される。分解された活性型の細胞内ドメイン (NICD) は細胞膜より核内へ移行する。転写因子 (CSL: CBF1, Sel, Lag-1) には通常、転写活性を抑制する転写抑制因子 (CoR: corepressor) が結合しているが NICD が核内へ移行することで、転写活性因子 (CoA: coactivator) が CoR を置換し抑制が解除され、NICD/CSL/CoA 複合体を形成し、標的遺伝子 (HES、HEY) の転写活性が行われる (図2)。HES、HEY は bHLH loop 蛋白であり、正常組織においては神経細胞や表皮細胞の分化において抑制的に作用し、HES は Notch1 に誘導され、HEY は Notch3 に強く誘導されると報告されている¹⁰⁻¹¹。我々の肺癌細胞株に対しドミナント・ネガティブや Notch3 siRNA を用いた検討にお

いては、HEY1 の活性は Notch3 により調整されるが、一方で HES1 は Notch3 の影響を受けなかった¹²⁻¹³。

図 2



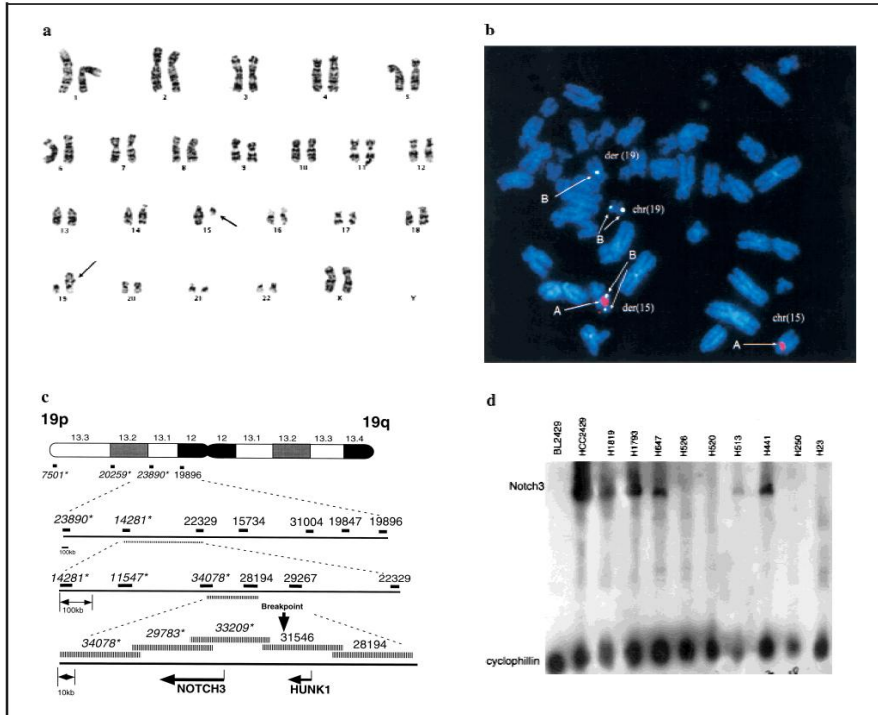
3) 癌と Notch との関連について

Notch と発癌の関連については、1991 年に Ellisen らによって、急性 T 細胞リンパ球性白血病において、遺伝子 t(7;9) 転座により恒常的に活性化状態にある Notch1 の発現が増強し、癌化に結びついていることが報告され¹⁴、その後多くの癌種において Notch pathway の異常活性と癌化に密接な関連があることが報告されている¹⁵⁻¹⁸。

肺癌と Notch との関連については、共同研究者の Thao P. Dang らによって 2000 年に最初の報告がされている。進行の速い非喫煙女性の肺腺癌において t(15;19) の転座を認め、Notch3 がコードされている領域の 50kb 上流に 19 番短腕の break point を確認した。この腫瘍から樹立した細胞株 HCC2429 は 19 番染色体の遺伝子異常をもつ他の非小細胞肺癌細胞株と比べ、Notch3 の過剰発現を認めた¹⁹ (図 3)。 また我々は、Notch3 が非小細胞肺癌細胞株

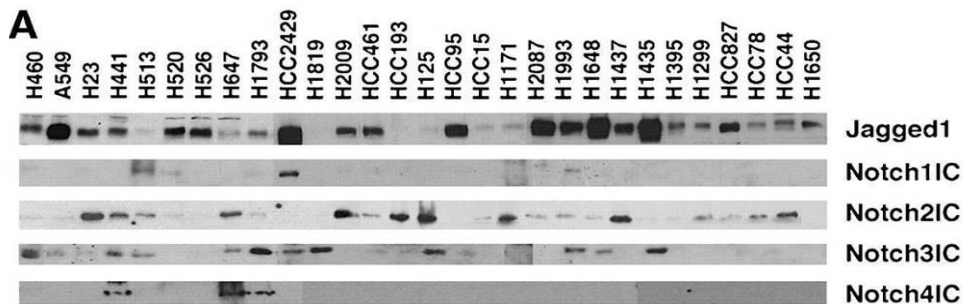
の約 40%に過剰発現していることを報告している¹³ (図 4)。

図 3



- a) 女性腺癌患者の腫瘍の核型で 15 番、19 番に転座を認める (矢印)、46, XX, t(15;19)(q11;p13)。
- b) FISH 解析で 15 番、19 番(R31546 cosmid probe)の break point を認める (A : 15 番、B : 19 番)。
- c) 19 番短腕上の break point は Notch3 の 50kb 上流に存在する。
- d) 19 番染色体の遺伝子異常をもつ細胞株は Notch3 の mRNA の発現が高い。
- 参考文献 19 : Dang, T.P. *et al.* *J. Natl. Cancer. Inst.* (2000)より引用。

図 4



29 例の肺癌細胞株に対する Notch レセプターとリガンドのウエスタンブロー

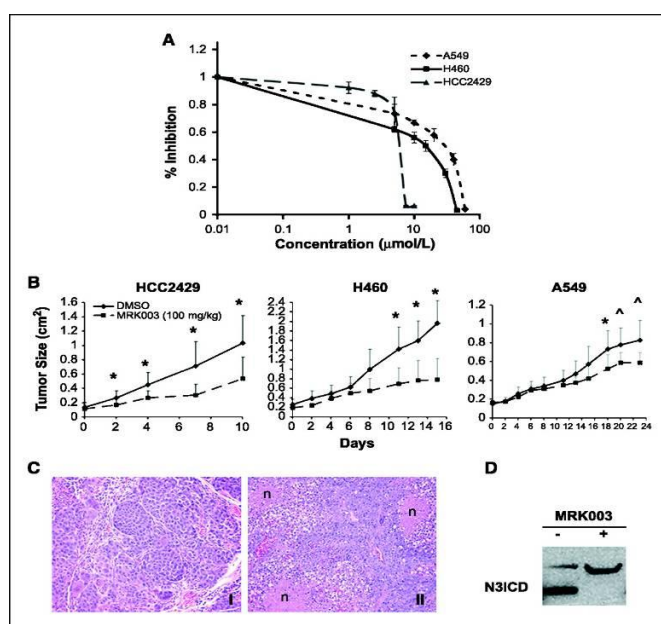
ッド法による検討の結果、24例でリガンドである Jagged1 の発現を認めた。Notch レセプターは Notch2 が 18 例 (62%)、Notch3 が 12 例 (41%) であった。Notch1、4 は数例の発現のみであった。

参考文献 13 : Konishi, J. *et al. Cancer. Res.* (2007) より引用。

4) γ -secretase inhibitor (GSI) について

GSI は γ -secretase を抑制することで Notch pathway の活性化を阻止すると考えられている。GSI は元々アルツハイマー病の治療薬として開発された。Amyloid β precursor 蛋白の切断を抑制し amyloid β peptides の脳への蓄積を抑制することで、アルツハイマーによる諸症状の改善が期待されている²⁰。また悪性腫瘍に対しては T-ALL や sarcoma において腫瘍の増殖を抑制しアポトーシスを誘導することが報告されていた^{15, 20}。我々はドミナント・ネガティブや GSI を用いて Notch3 を抑制すると *in vitro* またマウスモデルにおいて肺癌の増殖が阻止されることを報告してきた^{12, 13} (図 5)。

図 5



GSI (MRK003) の抗腫瘍効果。

A) *in vitro* における GSI の細胞障害活性。

B) xenograft model における GSI の腫瘍縮小効果。

C) control (左) に比べ GSI 投与 (右) マウスの腫瘍組織内には多数の necrosis (n) 部分を認める。

D) GSI は腫瘍組織の NICD3 の発現を抑制する。

参考文献 12 : Konishi, J. *et al. Cancer. Res.* (2007) より引用。

肺癌細胞増殖抑制のメカニズムとして、GSI が Notch3 を抑制することで MAPK pathway と Bcl-2 ファミリーを制御し肺癌細胞のアポトーシスを誘導することを報告した¹³。更に Bcl-2 ファミリー蛋白のサブファミリーである BH3-only 蛋白、Bim が Notch3 依存的なアポトーシスには必須であり、MAPK pathway を介して Bim が誘導されることも示してきた²¹。GSI と細胞周期との関係については、骨肉腫細胞株では G1 arrest、乳癌細胞株では G2/M arrest へ誘導されるとの報告がある^{22, 23}。

5) 癌と低酸素

癌細胞はその増殖スピードが早く、そのスピードに血管新生が追いつかない状況がしばしば認められ、その結果として細胞内部に酸素や栄養が十分にいきわたらない領域が存在する（慢性低酸素）。また癌組織の血管網は無秩序であり、非常に脆弱な特徴をもつため、その血流の不安定さより一時的な血管遮断を繰り返すという性質も併せ持つ（急性低酸素）²⁴。実際の患者の腫瘍においても Vaupel らは針電極を用い、直接腫瘍内部の酸素分圧を測定する事によって癌組織内の酸素分圧は非常に幅のある分布を示し、なかには非常に低分圧な領域があることも示した^{25, 26}（表 1）。こういった劣悪な環境下にかかわらず癌細胞は、その血流不足により抗がん剤に対し抵抗性を示し²⁷、放射線による殺細胞効果は酸素の存在に強く依存することより低酸素領域中心に放射線抵抗となり^{28, 29}、さらには低酸素環境にある癌細胞は移動・浸潤能力を亢進しその結果として生存し増殖する^{30, 31}。

表 1. 癌細胞と正常組織の酸素分圧の違い

tumor type	Median tumor pO ₂ (number of patients)	Median normal pO ₂ (number of patients)
Glioblastoma	4.9(10)	ND
	5.6(14)	ND
Head and neck carcinoma	12.2(30)	40(14)
	14.7(23)	43.8(30)
	14.6(65)	51.2(65)
lung cancer	7.5(17)	38.5(17)
breast cancer	10.0(16)	ND

pancreatic cancer	2.7 (7)	51.6 (7)
cervical cancer	5 (8)	51 (8)
	5 (74)	ND
	3 (86)	ND
prostate cancer	2.4 (59)	30 (59)
Sarcoma	6.2 (34)	ND
	18 (22)	ND

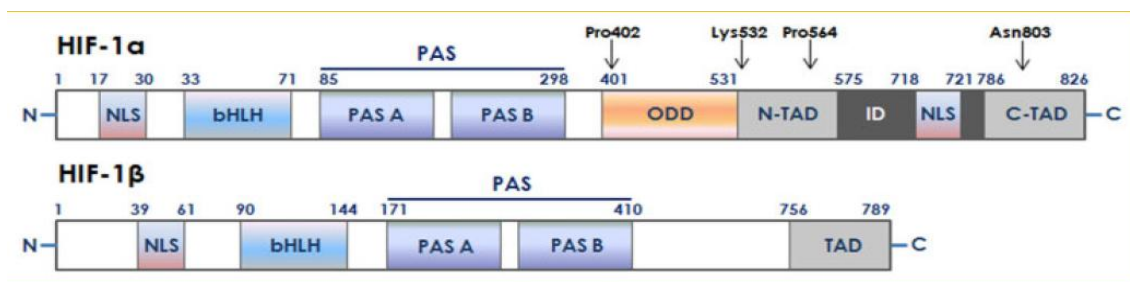
ND: not determined

参考文献 25 : Hockel, M. *et al. J. Natl. Cancer. Inst.* (2001) より引用。

6) HIF について

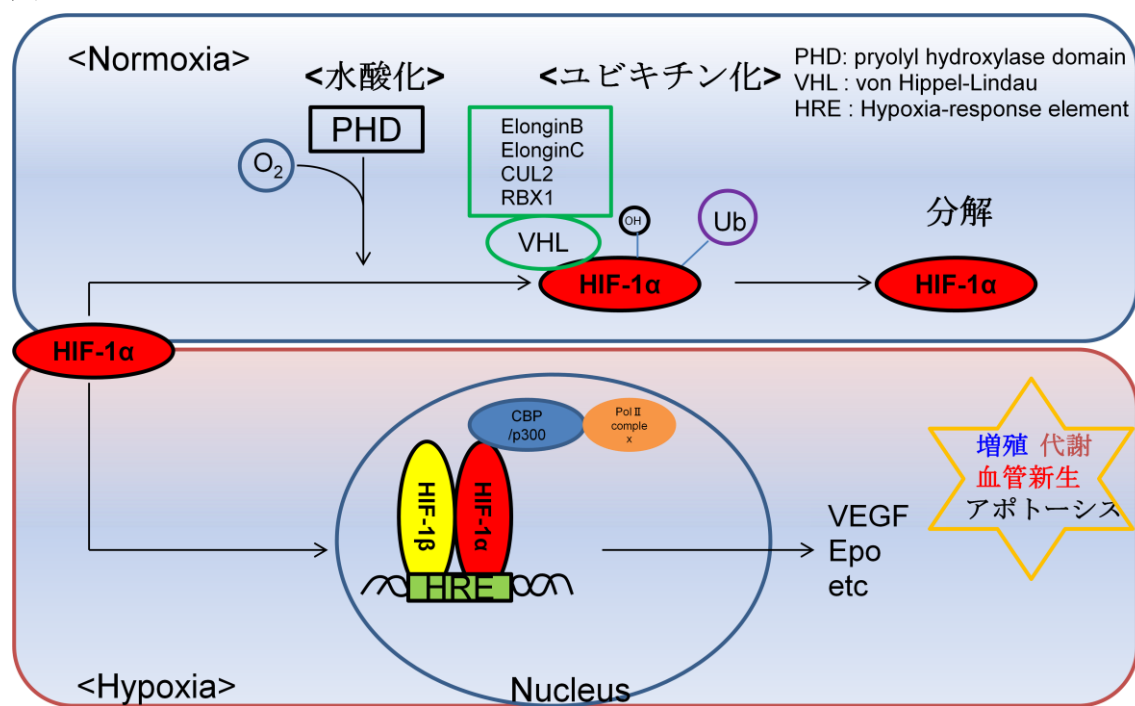
癌細胞は上記の様な低酸素という状況に対して Hypoxic inducible factor (HIF) という転写因子を活性化して適応を図っている。HIF は helix-loop-helix (HLH) と Per-Arnt-Sim (PAS) ドメインをもつ α サブユニット (HIF- α) と β サブユニット (HIF-1 β) が結合し 1 つの機能的なたんぱく質を構成する転写因子である (図 6)。 α サブユニットにはそれぞれ 1 α , 2 α , 3 α の 3 種類が存在しその中でも HIF-1 α は 1995 年に Semenza らによって発見された³¹。このうち HIF-1 α は通常酸素下ではプロリン水酸化酵素 (prolyl hydroxylase domain ; PHD) により水酸化され、さらに von Hippel-lindau (pVHL) によってユビキチン化後、プロテオソームによって速やかに分解される。逆に低酸素下ではこの PHD による水酸化が起こらないため、その先のユビキチン化からの分解反応が起こらない事によって HIF-1 α 蛋白は安定化し、核内に移行し HIF-1 β と結合して活性化された転写因子 HIF-1 となり様々な標的遺伝子の発現領域 (hypoxia response element; HRE) に結合し血管新生促進³³、pro-apoptotic 効果³³、anti-apoptotic 効果³⁴、糖代謝³⁵、Cell Cycle arrest³⁶などの機能を含め様々な標的遺伝子を活性化する³⁷ (図 7, 表 2)。

図 6



参考文献 38 Hu, Y., *et al.* *J. Cell. Biol.* (2013) より引用。

図 7



参考文献 30 : Adrian, L.H. *Nature. Rev. Cancer.* (2002) より引用・改編。

表 2 HIF の標的遺伝子

Iron metabolism	Collagen metabolism	Glucose metabolism
Ceruloplasmin	Pyolyl-4-hydroxylase - α (I)	Aldolase-A/C
Transferrin	Cell proliferation and survival	Enolase-1
Transferrin receptor	Cyclin G2	Hexokinase-1/2
Erythropoiesis	Insulin-like growth factor-2	Glucose transporter -1/3
Erithropoietin	IGF-binding protein -1/2/3	Glyceraldehyde-3-P- Dehydrogenase
pH regulation	Nitric oxide synthase-2	Lactate dehydrogenase-A
Carbonic anhydrase-9/12	p21	Phosphofructokinase -L
Apoptosis	WAF1	Phosphoglycerate kinase-a
BNIP3	Angiogenesis	Pyruvate kinase -M
NIX	Adrenomedullin	Triosephosphate isomerase
RTP801	Angiopoietin-2	Vascular tone
Regulation of HIF-1 activity	Plasminogen activator inhibitor-1	α 1B-Adrenergic receptor
p35 srj	Transforming growth factor- α	Endothelin-1
	Transforming growth factor - β 3	Haem oxygenase-1
	Vascular endothelial growth factor	Nitric oxide synthase-2

参考文献 37 : Patiar, S., *et al.* *Endocrine-Related. Cancer.* (2006) より引用。

7) HIF inhibitor (YC-1) について

HIF の抑制は腫瘍組織の低酸素という性質を考慮すれば腫瘍特異的な標的療法となりうる。さらにこの低酸素という環境は放射線治療や化学療法に対する抵抗性の大きな一因でもある。HIF pathway の活性に関しては非常に多岐にわたる pathway が関連している事より様々な inhibitor が開発・応用されてきている^{29, 37, 38} (表 3、図 8)。また当初低酸素癌細胞標的とする取り組みの一つとして低酸素放射線増感剤の開発研究もあった。

YC-1 は当初、可溶性グアニル酸シクラーゼの活性化及びサイクリック GMP レベルの増加と血小板凝集抑制効果に対して薬理的に用いていたが、その後 YC-1 が HIF-1 α の活性化を抑えることでその標的遺伝子も抑制し抗腫瘍効果を示す新たな抗癌剤であることが示された^{39, 40}。その機序に関しては詳細不明な部分も多いが、YC-1 によって p300 の recruitment を抑制すること⁴¹や癌細胞においては factor inhibiting HIF (FIH) を刺激する事によって HIF-1 α の活性化を抑制する⁴²といった報告も示された。更には放射線治療と併用する事によって低酸素癌細胞に対しての放射線増感剤としての効果がいくつか報告されている⁴³⁻⁴⁵。

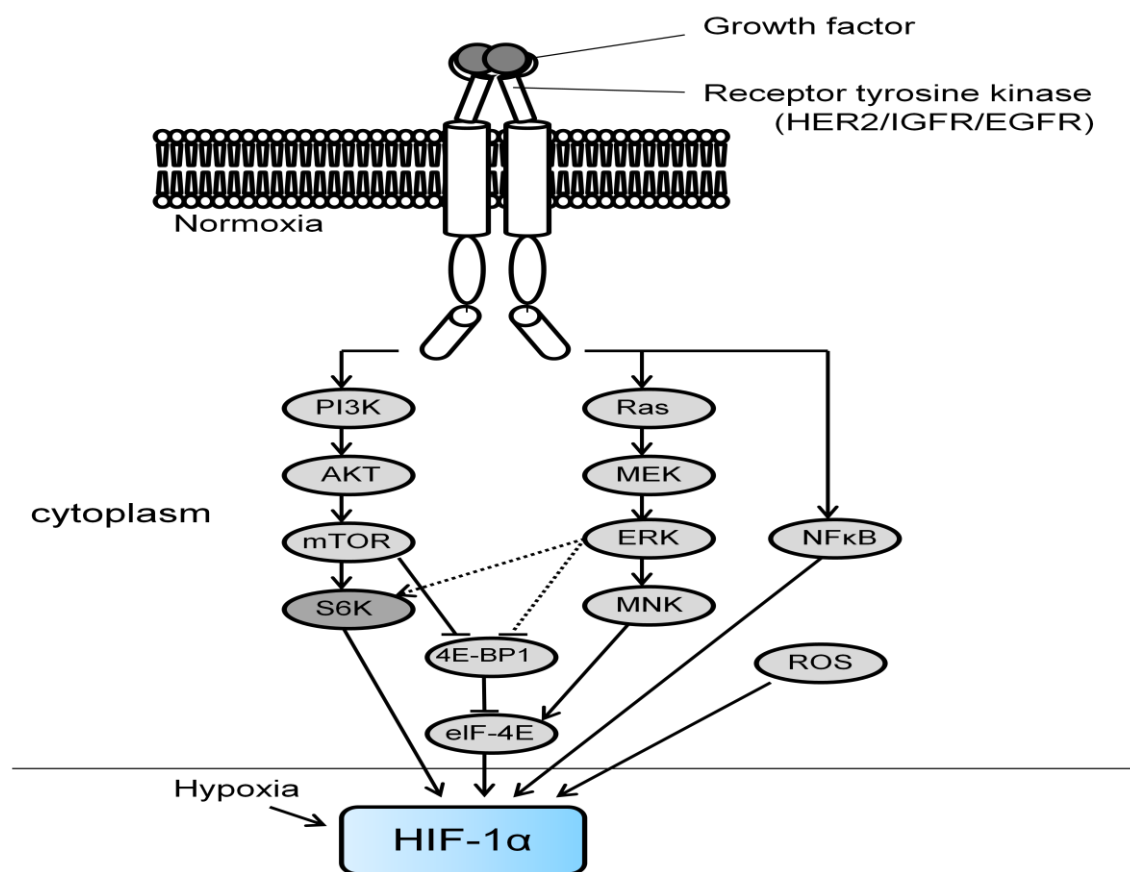
表 3 現在使用いられている HIF inhibitor

	Inhibition mechanisms	Agents
Transcriptional activity/ DNA binding	Regulate on multiple levels	YC-1 and analogs
	Inhibiting thioredoxin-1	PX-12
	Inhibiting thioredoxin-1 and DNA binding	Pleurotin AJM290/AW464
	Inhibiting HRE and DNA binding	Echinomycin (NSC-13502)
	Disrupting binding of HIF-1-HRE Inhibiting HIF-1 α gene transcription	Polyamides Flavopiridol (alvocidib)
HIF-1 α translation	Inhibiting p300 recruitment	Chetomin Bortezomib (Velcade, PS-341)
	Inhibiting FIH-1, and the p300 recruitment	Amphotericin B
	Inhibiting PI3K	LY294002 and Wortmannin
	Blocking mTOR	Rapamycin, Everolimus and CCI-779
	Blocking mTOR/p70S6K/4E-BP1 pathway Microtubule depolymerization	Silibinin 2ME2 and ENMD-1198
HIF-1 α degradation	Regulate on multiple levels, specific unknown Inhibit HIF-1 α mRNA translation Inhibiting Hsp90	PX-478 2-phenethyl isothiocyanate GA and analogs
		Radicicol and its derivants
	Inhibiting HDAC (Histone deacetylase)	Apigenin Trichostatin A (TSA) LAQ824 SAHA and FK228
	Increasing HIF-1 α and pVHL interaction	Wondonin
	Blocking signaling pathways Inhibiting ERK 1/2 and AKT activation	Green tea extract and EGCG Resveratrol

	Inhibition mechanisms	Agents
HIF-1 α stability	Attenuate HIF-1 α stabilization possibly through zinc deprivation Cetuximab reduced the cellular level of HIF-1 α in the presence of a proteasome inhibitor, lactacystin, indicating that cetuximab acts mainly at the level of protein synthesis	Metallothioneins (MTs) Cetuximab
Transcriptional activity	Implicated in the induction of HIF-1 α translation, has antiangiogenic effect by inhibiting HIF-1 dependent induction of VEGF	Herceptin
mRNA and protein expression	RNA interference is the process of sequence specific post-transcriptional gene silencing, small Interfering RNA (siRNA) have been demonstrated to have stronger suppressive effects, in order to inhibit HIF-1 α expression RX-0047 is a 20-mer phosphorothioate antisense oligonucleotide (ASO) that is a potent inhibitor of HIF-1 α . RX-0047 inhibits HIF-1 α by reducing expression of its mRNA and protein. The results have been tested by experiment in vivo and in vitro	Small Interfering RNA (siRNA) RX-0047
Dimerization of HIF-1 α and HIF-1 β	Single-domain llama antibodies (VHH) directed against the HIF-1 α oxygen dependent degradation domain (ODDD) which encompass the N-terminal transactivation domain (N-TAD), the combination of them can prevent the dimerization of HIF-1 α and HIF-1 β ; hetero-bivalent VHH markedly increased the binding affinity for HIF-1 α , to be novel agents for cancer therapy Anti-HIF-1 α VHH nanobodies (AHPC) screened by our laboratory is able to recognize HIF-1 α within the PAS domain and combine with it specifically in order to prevent the dimerization of HIF-1 α and HIF-1 β ; the further characteristic of it is still under research	Anti-HIF-1 α VHH and Hetero-bivalent VHH nanobodies (AG1-5) Anti-HIF-1 α VHH nanobodies (AHPC)

参考文献 37 : Patiar, S. *et al. Endocrine-Related. Cancer.* (2006) 及び
参考文献 38 : Hu, Y., *et al. J. Cell. Biol.* (2013) より引用。

図 8

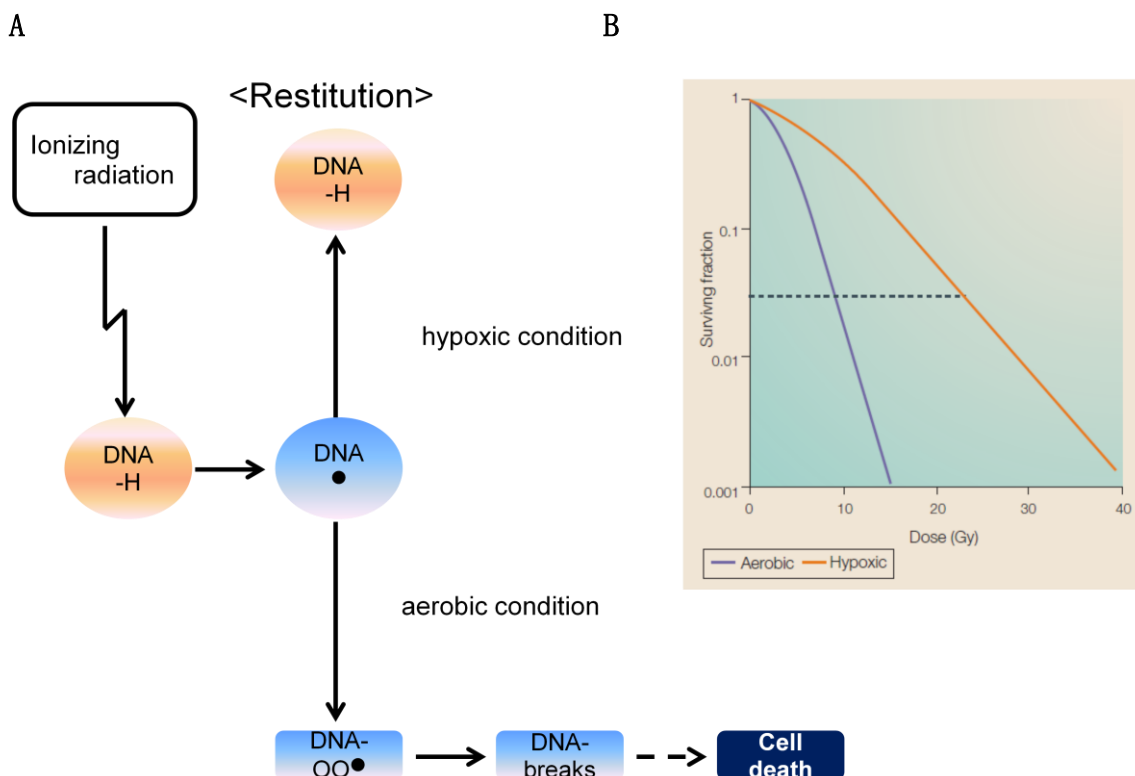


参考文献 37 : Patiar, S., *et al. Endocrine-Related. Cancer.* (2006) より引用・改編。

8) 放射線治療の現状と課題

放射線は日常診療において肺癌患者の治療に広く用いられている。切除不能な局所進行Ⅲ期非小細胞癌患者は化学放射線療法の適応となり、60～66Gyの放射線照射に併用される化学療法のレジメンとしてはカルボプラチン＋パクリタキセル、シスプラチン＋ビンORELビン/ドセタキセルなどが使用されることが多い。ただこれら化学放射線療法においても生存期間中央値は16ヶ月前後であり、更なる治療効果改善のため新たな治療選択を開拓していくことは重要な事となる。その一つとして分子標的治療薬との併用は今後期待される治療法のひとつであり、ゲフィチニブにおいては *in vitro/vivo* 共に放射線との相乗効果が報告されている^{46, 47}。放射線による細胞死には、細胞周期に関連した増殖死（分裂死：reproductive death）とアポトーシスに代表される間期死（interphase death）がある。放射線による細胞損傷の主たる標的は核内のDNAであり、二重鎖切断などの重篤なDNA損傷を受けた細胞は分裂が停止し、次の分裂期に死に至ることが多い^{48, 49}。しかしこの様に放射線治療は照射によってDNA損傷をおこし、癌細胞を破壊する事を目的としているが、癌細胞ではしばしばDNA損傷は修復されその結果、効果が一時的になり再発の問題が出てくる。更には癌細胞に対する殺細胞効果は有酸素状態と比較すると低酸素状態では2～3倍の線量を必要とする²⁶（図9）。それゆえ放射線治療を行う上で放射線抵抗性は重要な問題の1つであり、その機序の解明が必要と考えられる。

図 9



A) 放射線照射による DNA 損傷の模式図。

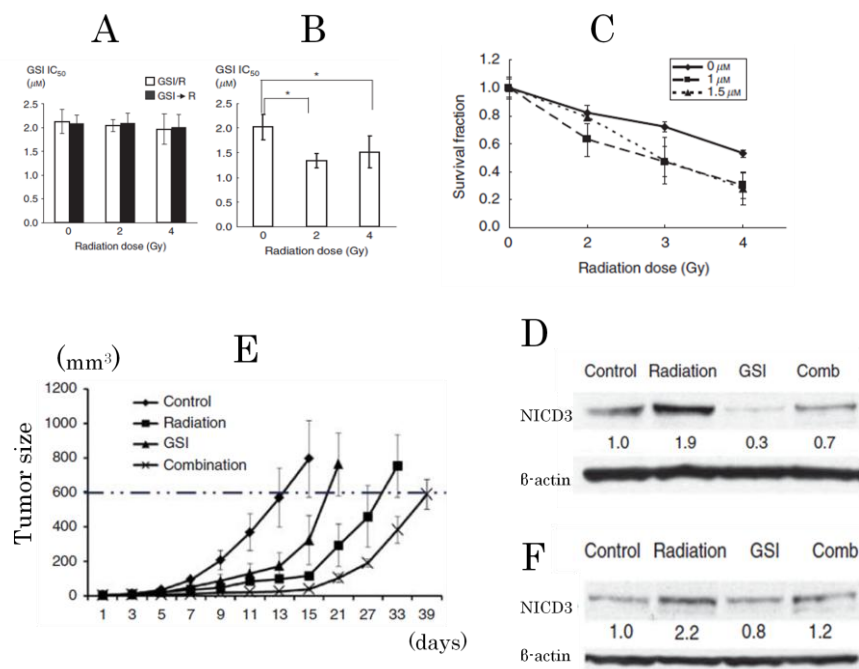
B) 通常及び低酸素状態における放射線照射による survival fraction のグラフ。

参考文献 26 : Brown, J.M. *et al. Nature. Rev. Cancer.* (2004) より引用。

9) 放射線と Notch pathway の関連について

乳癌幹細胞では放射線照射後に Notch1 とリガンドである Jagged1 の発現が増強することや⁵⁰、神経膠腫幹細胞では放射線照射後に Notch pathway の標的遺伝子が増強すること、また GSI と放射線照射の併用はアポトーシスを誘導し、より強い併用効果を認めるなどの報告がされている⁵¹。また我々は肺癌細胞株において放射線照射により活性化した Notch3 が放射線抵抗性に働くことや放射線と GSI の併用治療において GSI 投与のタイミングが非常に重要であり、放射線照射後に GSI を併用する事でより強い抗腫瘍効果を得られたことを報告した⁵² (図 10)。これらの報告より Notch pathway の活性が放射線抵抗性のメカニズムの一つである可能性が示唆されるが、その Notch pathway が放射線照射後に増強される詳細なメカニズムに関しては解明されていない。

図 10



- A) 放射線と GSI の同時併用群 (black) および GSI 先行投与群 (white) では IC50 に差を認めない。
- B) 放射線先行照射し、その 24h 後に GSI 投与群では IC50 に差を認める。
- C) 放射線先行群 (投与レジメンは B に同じ) では濃度・照射量依存性に抗腫瘍効果を認める。
- D) 放射線と GSI の併用 (投与レジメンは B に同じ) によって放射線による Notch3 の増強を減弱させる (*in vitro*)。
- E) *in vivo* において放射線と GSI の併用群が もっとも高い抗腫瘍効果を認める。
- F) *in vivo* での切除した腫瘍においても併用によって放射線による Notch3 の増強を減弱させる。

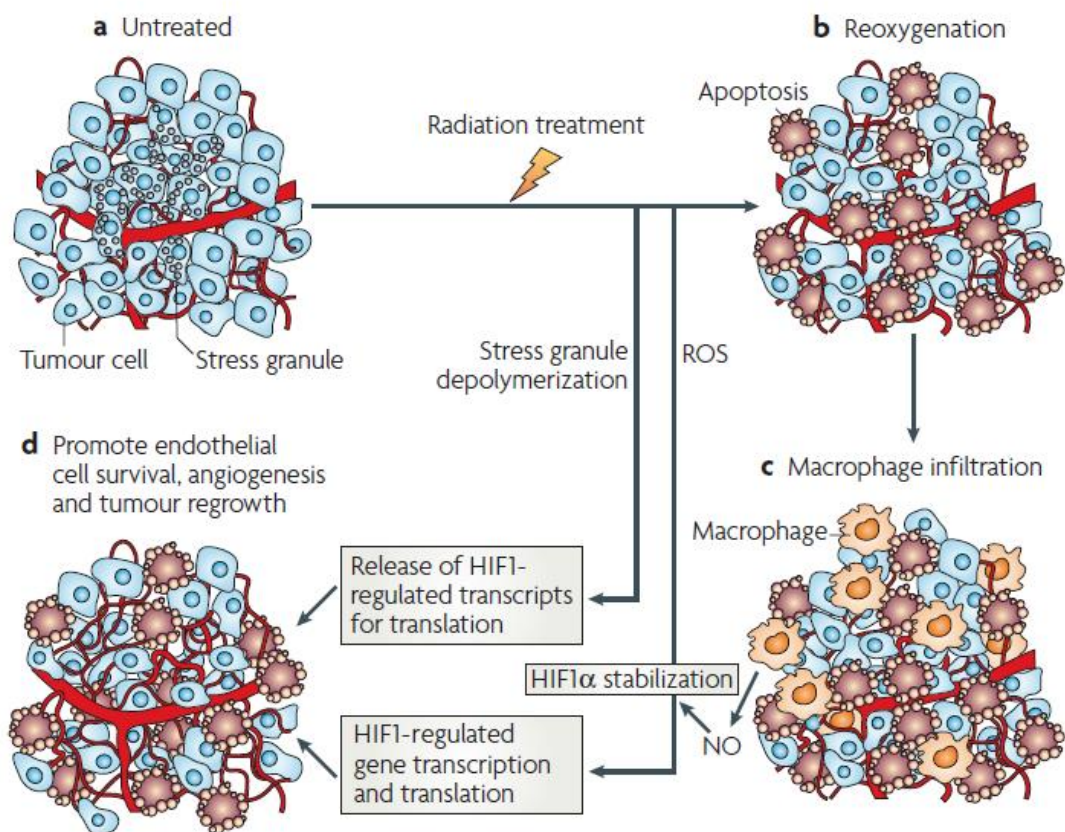
参考文献 52 : Mizugaki, H. *et al.* *Br. J. Cancer.* (2012) より引用。

10) 放射線治療と HIF の関連について

放射線抵抗性の原因の 1 つとして、上記に記載したように腫瘍細胞の低酸素環境が挙げられる。放射線の治療効果は酸素分圧に依存し、酸素の存在下では放射線により発生したラジカルが酸素により固定化されるため、より強い DNA 損傷を引き起こす。一方で、低酸素環境下ではその効果は有意に減弱する。そこには腫瘍細胞の低酸素環境を司るメディエーターである HIF-1 が放射線抵抗性の一因であると報告されている^{53, 54}。その機序としては放

射線照射後、有酸素の癌細胞に関しては細胞死が起こるがその結果低酸素の細胞に再酸素化（reoxygenation）が起こる。また stress granules の脱分極に伴い HIF-1 mRNA が放出され蛋白への翻訳が起こる。またこの際 reoxygenation によって傷害がおこり、その結果 reactive oxygen species（ROS；活性酸素）の産生、及び ROS による HIF-1 α の安定化が起こる。また照射の影響を受けた細胞がマクロファージを誘導することで nitric oxide (NO) が産生され、この NO によっても更なる HIF-1 α の安定化が起こる。こういった機序により HIF-1 α の活性化、さらには種々の標的遺伝子の増強によって放射線抵抗性を示すと言われている^{29, 55} (図 11)。

図 11



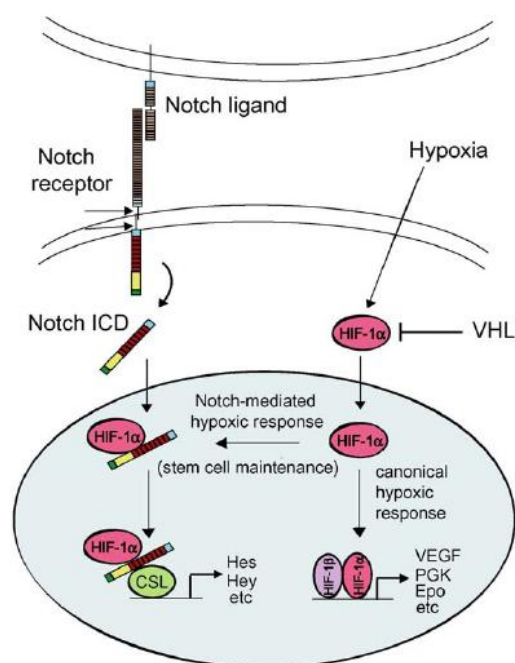
参考文献 29 : Dewhirst, *et al. Nature. Rev. Cancer.* (2008) より引用。

11) 低酸素状態における HIF と Notch の関連について

低酸素状態において、腫瘍細胞が Stem Cell の状態を維持するのに HIF が Notch の intracellular domain と結合することで Notch の安定化が起こり、最終的に HIF によって Notch の下流遺伝子を活性化するメカニズムの報

告⁵⁶やグリオブラストーマの細胞株で、HIF-1 α によりNotchの活性化が起こり、腫瘍の成長を促進するといった報告⁵⁷、低酸素環境下において乳癌細胞株でHIF-1 α がNotch3との直接的な結合によってHIFの下流遺伝子(carbonic anhydrase 9; CA9)の誘導を起こすなどの報告⁵⁸がある。このようにHIF-1 α とNotch pathwayの関連性が示唆されており、今回我々は放射線照射後にNotch pathwayが増強されるメカニズムにHIF-1 α が関連している可能性を考慮した(図12)。

図12

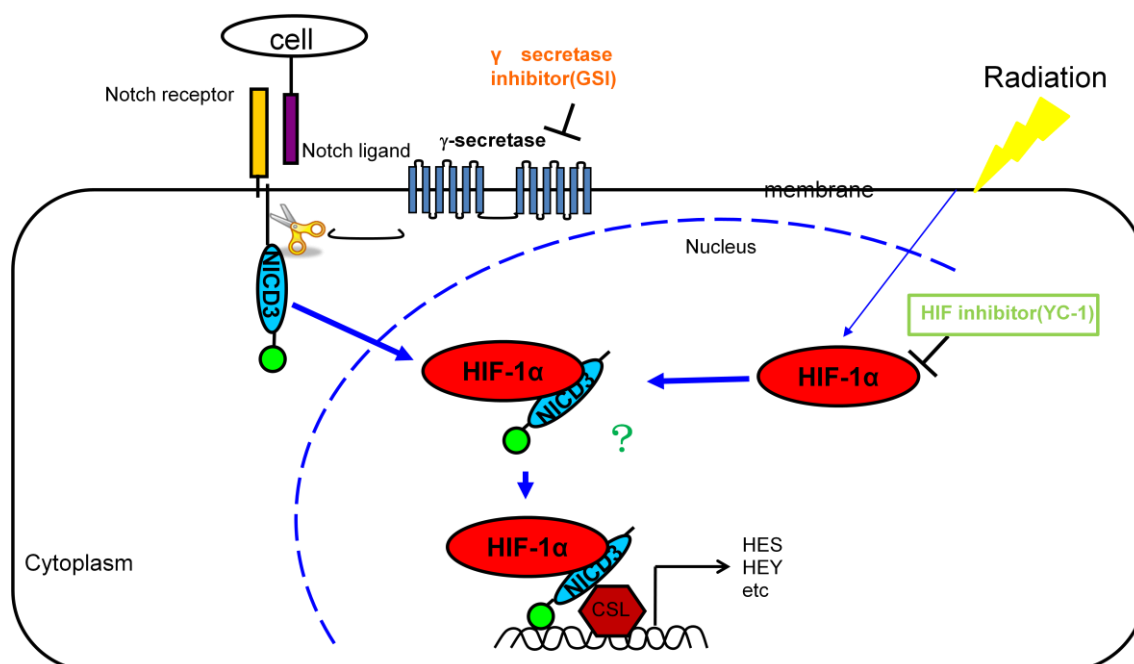


参考文献 56 : Gustafsson, M. V. *et al. Development.* (2005) より引用。

12) 本研究の課題

上記をふまえ、我々は新たな肺癌の治療法の探索のため、放射線照射後にNotch pathwayが増強されるメカニズムに関してHIF-1 α に着目し、その関連性の検討を行った(仮説図13)。更にはNotchを発現している肺非小細胞癌細胞株に対し、放射線、GSI、HIF inhibitorの併用治療による抗腫瘍効果を*in vitro*及び*in vivo*において検討を行い、その際のNotch及びHIF pathwayの発現状況に関して検討した。

仮説図 13



13) 本研究の結論

肺癌細胞株における放射線照射後の Notch Pathway の増強に関し siRNA を用いて HIF-1 α を抑制した細胞において、放射線未照射群と比較して放射線照射群において Notch3 およびその標的遺伝子の HEY1 がより強く抑制された事や、放射線とこれらいずれか単剤を併用した場合より両者を併用した場合に Notch3 の発現がより強く抑制されたことから、放射線照射によって Notch3 が増強される機序に HIF-1 α の関連が示唆された。

抗腫瘍効果に関して、GSI と HIF inhibitor を併用することで Notch 発現肺癌細胞に対して高い放射線感受性を示した。その際放射線照射による Notch 発現の増強は YC-1、GSI の併用治療にてより強く減弱していた。これらの結果から放射線照射にこれら 2 剤を併用する治療は非小細胞肺癌患者の新たな治療戦略の 1 つとなる可能性が考えられた。

略語表

本文中および図中で使用した略語は以下のとおりである。

ALK	anaplastic lymphoma kinase
CA9	carbonic anhydrase 9
eIF-4E	eukaryotic translation initiation factor 4E
ERK	extracellular signal regulated kinase
HES	hairy and enhancer of split
HEY	hairy/enhancer of split related with YRPW
HIF-1	hypoxia inducible factor 1
HRE	hypoxia response element
GSI	γ -secretase inhibitor
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MEK	MAP/ERK kinase
MNK	MAPK-integrating kinase
mTOR	mammalian target of rapamycin
NSCLC	non small cell lung carcinoma
NF κ B	nuclear factor kappa B
NICD	Notch intracellular domain
PARP	poly (ADP-ribose) polymerase
PHD	prolyl hydroxylase domain
PI3K	phosphoinositide 3-kinase
ROS	Reactive oxygen species
siRNA	small interfering RNA
VEGF	vascular endothelial growth factor
VHL	von Hippel- Lindau
4E-BP1	eIF-4E binding protein

実験方法

細胞株と GSI・HIF inhibitor

細胞株は Notch の発現に関し既に報告されている非小細胞肺癌株 (H460、HCC2429) を用いた¹³。HCC2429 は共同研究者ある Thao P. Dang 博士より譲渡された。*In vitro* の検討には H460・HCC2429 を使用し、*in vivo* の検討には H460 を用いた。細胞株は 5% CO₂ 下の 37°C 湿潤環境にて 10% の牛胎仔血清を含め RPMI で培養した。GSI は GSI XX (Calbiocem)、HIF inhibitor は YC-1 (AG scientific) を使用した。

低酸素培養

低酸素の培養には personal multi-gas incubator (ASTEC) を使用し、5% CO₂ 及び 1% O₂ 下の 37°C の環境として培養した。低酸素環境下での放射線照射後の各種蛋白の発現状況に関してはウエスタンブロット法で確認した。すべての *in vitro* の実験は低酸素培養下で施行した。

抗体、ウエスタンブロット法

各種蛋白の発現はウエスタンブロット法を用いて検討し、ウエスタンブロット法は NuPAGE プロトコールに従い施行した。

注入タンパク量を決定し、蛋白濃度より loading sample 量を計算後、メルカプトエタノール、LDS sample buffer と混合し GEL にそれぞれ注入し泳動した。この際 Running Buffer は目的蛋白の分子量に応じて MOPS もしくは MES を使用した。泳動後 Trans-buffer を用いてメンブレンへ Transfer (60 分) を行い、Transfer 後にボンソ S で染色し蛋白のローディングが均一であるかを確認した。確認後 TBST で 5 分×3 回の洗浄施行し、5% スキムミルクを用いて blocking を行い、再度 TBST で 5 分×3 回洗浄したのち、1 次抗体添加し over night とした。

Over night 後 TBST で 5 分×6 回の洗浄施行し、2 次抗体を 60 分添加。再度 TBST で 5 分×6 回洗浄して撮影を行った。感光液は ECL TM Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare) を用いた。1 次抗体に関しては抗 Notch2 抗体 (20000 倍 ; Cell signaling)・抗 Notch3 抗体 (500 倍 ; Orbigen)・抗 Actin 抗体 (1500 倍 ; Sigma) はラビットポリクローナル抗体を、抗 HIF-1 α (500 倍 ; BD bioscience)・抗 Notch1 抗体 (100 倍 ; Santa Cruz Biotechnology)・抗 Notch4 抗体 (1500 倍 ; Cell signaling)・抗 VEGF 抗体 (200 倍 ; Santa Cruz Biotechnology) はマウスモノクローナル抗体をそ

れぞれ使用した。

Real time RT-PCR

以下の処理はすべて RNAase free の器具を使用して行った。

1. RNA 抽出

RNA easy MINI Kit (Qiagen) を使用し、そのプロトコールに従い施行した。一晚培養後の細胞をトリプシン処理・細胞回収後 $300g \times 5$ 分遠心分離施行し細胞を沈殿させ、Buffer RLT plus を添加後シリンジにて細胞の破碎を行い専用のコレクションチューブに注入し $8000g \times 30$ 秒遠心施行。遠心後フロースロー液と同量の 70%エタノールを混合し専用のスピncラムに注入し $8000g \times 30$ 秒遠心を施行。その後 Buffer RW 及び Buffer RPE を用いてスピncラムを洗浄したのち RNAase free の水を添加し $8000g \times 1$ 分遠心行いコレクションチューブ内に RNA 抽出を行った。

2. Reverse transcription (TaqMan Reverse Transcription Reagents を使用)

1. にて抽出した RNA に上記 Kit 内の試薬 ($10 \times$ TaqMan RT Buffer、 $MgCl_2$ (25mM)、dNTP Mixture、Random Hexamer ($50 \mu M$)、RNase Inhibitor ($20U/\mu l$)) を混合・添加後、逆転写を行い (incubation ($25^\circ C \times 10$ 分) $\Rightarrow$ Reverse transcription ($48^\circ C \times 30$ 分) $\Rightarrow$ inactivation ($95^\circ C \times 10$ 分)) DNA 抽出した。

3. Real-time PCR

Standard として測定物質の発現が確認されている細胞の DNA を使用し、検量線を引くために DNA は濃度勾配を付けて Standard とした。内因性のコントロールとしては GAPDH (Applied Biosystems) を使用した。測定項目の溶液調整に関しては、Primer : Master mix : sample = 1 : 10 : 9 の割合で調整した (total $20 \mu l$ /well)。GAPDH に関しては probe : forward primer : reverse primer : 水 : Master mix : sample = 1 : 1 : 1 : 2 : 25 : 20 (total $20 \mu l$ /well) で調整した。sample 溶液調整後 ABI Prism 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems) を用いて RT-PCR ($50^\circ C/2min \Rightarrow 95^\circ C/10min \Rightarrow 95^\circ C/0.15min$ (40 サイクル) $\Rightarrow 60^\circ C/1min$) を施行した。

Small interfering RNA (siRNA)

6well プレートに H460・HCC2429 (いずれも 1×10^6 cells/well) を抗生剤無添加の培養液にて一晚培養を行った。培養後 3-5 割程度のコンフルエントの状態を確認し、OPTIMEN I (Life Technology) を溶媒として、 $100nmol/l$

HIF-1 α siRNA (ON-TARGET plus SMART pool L-004018-00) (Thermo Fisher Scientific) を Lipofectamin 2000 (invitrogen) と混合し、6 時間細胞へ添加し siRNA を導入後、放射線照射を行った。その後通常培地に戻した状態で低酸素下にて培養開始、各 6 及び 24 時間後に蛋白・細胞回収を行った。siRNA の導入確認はウエスタンブロット法を使用した。Scrambled siRNA には ON-TARGET plus Non-targeting pool (Thermo Fisher Scientific) を用いてコントロールとした。

遺伝子導入

HIF-1 α 、NICD の発現プラスミド及びコントロール用プラスミド 2 μ g を培地 OPTIMEM I 250 μ l と混ぜた後、ポリエチレンジオキサン 2 μ l を添加し、室温で 5 時間静置した。混合液を 6well プレートで 24 時間培養した 293T 細胞に添加し、6 時間培養後、培地を交換した。

免疫沈降

6well プレートに培養した細胞から蛋白回収し、30 分 on ice とした後 15000rpm $\times$ 10 時間遠心分離し蛋白精製を施行した。その蛋白濃度より必要な蛋白量を決定し lysis buffer に蛋白と HIF-1 α 抗体 (1 μ g ; Abcam) を入れ 4 $^{\circ}$ C 下で 1 時間 rotate して混合した。混合後の buffer に Protein A sepharose beads (BE healthcare) を注入し再度 4 $^{\circ}$ C 下で 1 時間 rotate して混合した。混合後 3000rpm $\times$ 5 分を 3 回行い beads の精製を行った後に SDS buffer を注入。作成された検体に対してウエスタンブロット法 (上記参照) を用いて蛋白発現状況を確認した。

MTT proliferation assay

1. YC-1 における治療スケジュールごとの抗腫瘍効果の検討

96well プレートに H460 (6000 cells/well) もしくは HCC2429 (10000 cells/well) を各々一晩培養後、放射線照射 (8Gy) と YC-1 投与同時併用、放射線照射後 24 時間後に YC-1 投与及び YC-1 投与 24 時間後に放射線照射 (8Gy) を行い、さらに 24 時間低酸素状態で培養した。細胞増殖活性の検討のために Dye solution を各 well に 10 μ l 注入し、その 4 時間後に stop solution 90 μ l を注入し、さらにその 1 時間後に MTT proliferation assay を施行した。MTT proliferation assay においては Thermo Fisher Scientific 社のマイクロプレートリーダー (Varioskan Flash) を使用して解析した。

2. 低酸素下での放射線と GSI 逐次併用による抗腫瘍効果の検討

96well プレートに H460 (6000 cells/well) もしくは HCC2429 (10000 cells/well) を各々一晩培養後、放射線照射 (8Gy) 施行 24 時間後に GSI 投与を行い、その後 24 時間低酸素状態で培養し、MTT proliferation assay を施行した。

CI isobrogram

96well プレートに H460 (6000 cells/well) もしくは HCC2429 (10000 cells/well) を各々一晩培養後、放射線照射 (8Gy) と YC-1 投与を同時に施行し、その 24 時間後に GSI XX を投与しさらに 24 時間低酸素状態で培養した。YC-1 と GSI の使用量に関しては、放射線との併用における IC_{50} よりその濃度比率を 1:1 と設定し、濃度勾配をつけて投与した。細胞増殖活性の検討のために Dye solution を各 well に 10 μ l 注入し、その 4 時間後に Stop solution 90 μ l を注入しさらにその 1 時間後に MTT proliferation assay を施行した。各放射線量における GSI と YC-1 の併用効果に関しては software Compusyn (Biosoft, Cambridge, UK) を用いて解析した⁵⁹。

Clonogenic assay

6well プレートで H460 (30000 cells/well) もしくは HCC2429 (50000 cells/well) を一晩培養し、放射線照射 (4, 8, 12Gy) 及び YC-1 を投与しさらに 2 日間低酸素状態で培養した。低酸素培養後、細胞はクリスタルバイオレッドに 0.5%濃度で混合したメタノール溶液を用いて固定・染色した。染色後、コロニーの数は目算で 3 回算定し、その平均値を採用した。Survival fraction (生存率) は (平均コロニー数) / (培養細胞数) $\times$ (プレーティング効率) で計算した。プレーティング効率は (放射線照射未施行の平均コロニー数) / (放射線照射未施行のコントロールの培養細胞数) で算出した⁶⁰。

各治療群の振り分け

In vitro における放射線に YC-1 と GSI をそれぞれ併用した際の Notch pathway 及び HIF-1 pathway への検討及び *in vivo* における抗腫瘍効果の検討のために以下に示す 8 つの治療を施行した。治療群として放射線 (RT) $\cdot$ GSI $\cdot$ YC-1 それぞれ単独施行群、放射線と GSI 併用群 (RT+GSI)、放射線と YC-1 併用群 (RT+YC-1)、GSI と YC-1 併用群 (GSI+YC-1)、放射線と GSI $\cdot$ YC-1 併用群 (RT+GSI+YC-1) に振り分けた。

ゼノグラフトマウスモデル

動物実験は北海道大学動物実験に関する規定に基づき施行した。5 週齢の雌のヌードマウス (nu+/nu+) を異種移植モデルに使用した。H460 (1×10^6 cells) を $100 \mu\text{l}$ の PBS で希釈し、ヌードマウスの右後ろ脚に皮下注射で移植した。腫瘍が触知可能となった段階でマウスを各治療群に無作為に振り分けた。治療プロトコールは **Figure 5A** に記載した。2 日おきにデジタルキャリパーで腫瘍を計測した。大きさ (Tumor Volume: TV) と成長率 (Tumor growth rate: %TV) は以下の計算式を用いた²¹。TV= (Length) $\times$ (Width) $\times$ (Height) /2⁶⁰。 %TV on dayX= (TV on dayX/TV on day1) $\times$ 100。治療の副作用の有無の確認のために体重を 2 日ごとに測定を行った。体重の 20%以上減少、腫瘍の潰瘍化、壊死、歩行障害などを認めた場合は安楽死とした。

免疫組織学的染色

治療開始 15 日目に、一部のゼノグラフトモデルの腫瘍を摘出し、腫瘍をパラフィン包埋後に切片を作製。その後キシレンとエタノールで脱パラフィン化施行後、オートクレーブで抗原賦活を行った。抗原賦活後メタノールと過酸化水素を用いて内因性ペルオキシダーゼ除去及び他種血清を用いて非特異的ブロッキング施行したのち 1 次抗体を添加し over night とした。1 次抗体に関しては抗 HIF (100 倍; Santa Cruz Biotechnology) 及び抗 Notch3 (2500 倍 ; Santa Cruz Biotechnology) を用いた。Over night 後、PBST にて 5 分 $\times$ 3 回洗浄後、2 次抗体添加 (30 分) し再度 PBST 5 分 $\times$ 3 回洗浄を行い、発色試薬 (ヒストファイン DAB 基質キット ; ニチレイバイオサイエンス) を用いて発色させた。その後 mil Q にて洗浄し、ヘマトキシリンで核染色施行した後に再度洗浄をおこなった。透徹を施行した後封入剤 (マリノール) を用いてスライドガラスに封入した。判定に関しては強拡大 (400X) で細胞を観察した。それぞれの細胞に対して、25%以下の染色比率を陰性、25%以上を陽性と判定。さらにその染色強度に関して 0 (negative), 1 (low), 2 (moderate) or 3 (strong) と分類し、強度 2 もしくは 3 のものを陽性細胞と判定した。この判定をそれぞれのグループに対して、重複しない領域で 3 回繰り返した。

統計解析

全ての解析は Student T test で施行した。統計学的有意差は P value < 0.05 とした。ソフトウェアは Microsoft Excell を使用した。

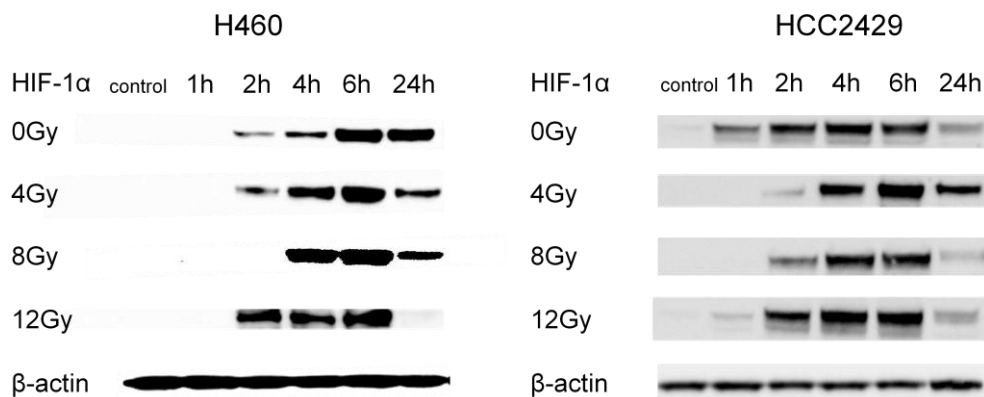
実験結果

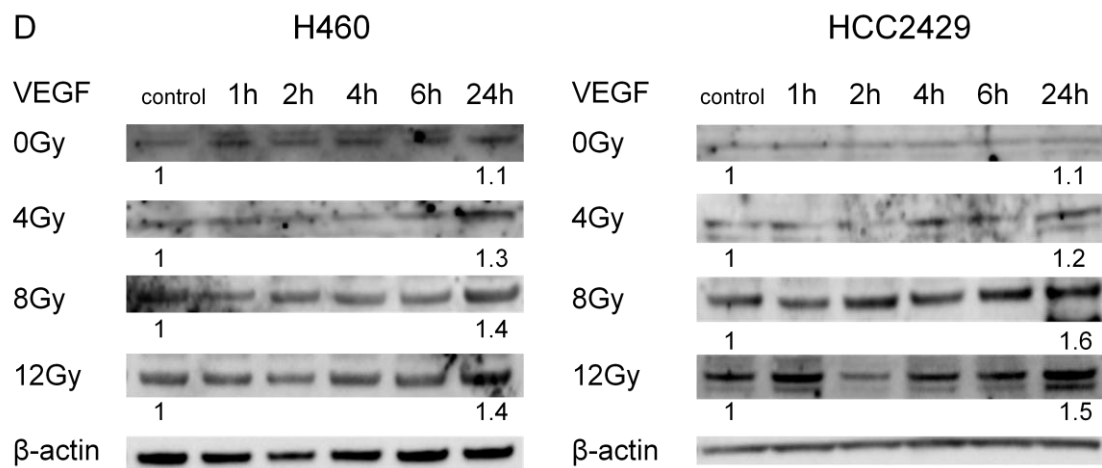
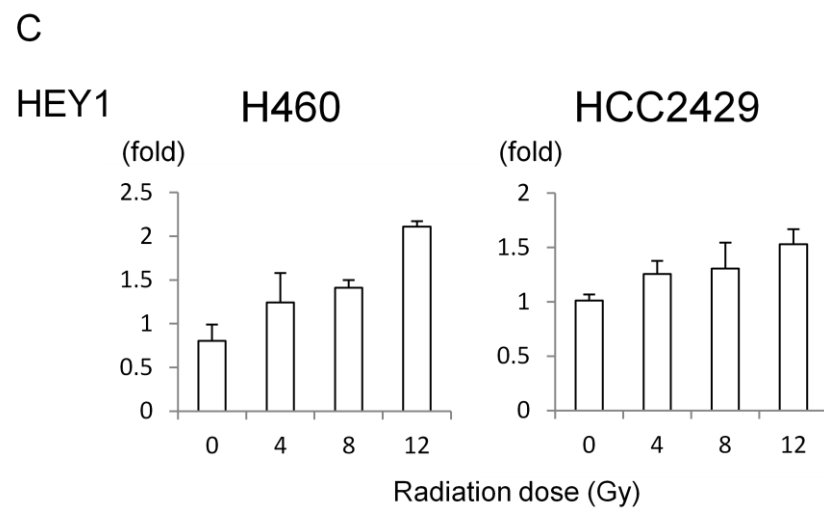
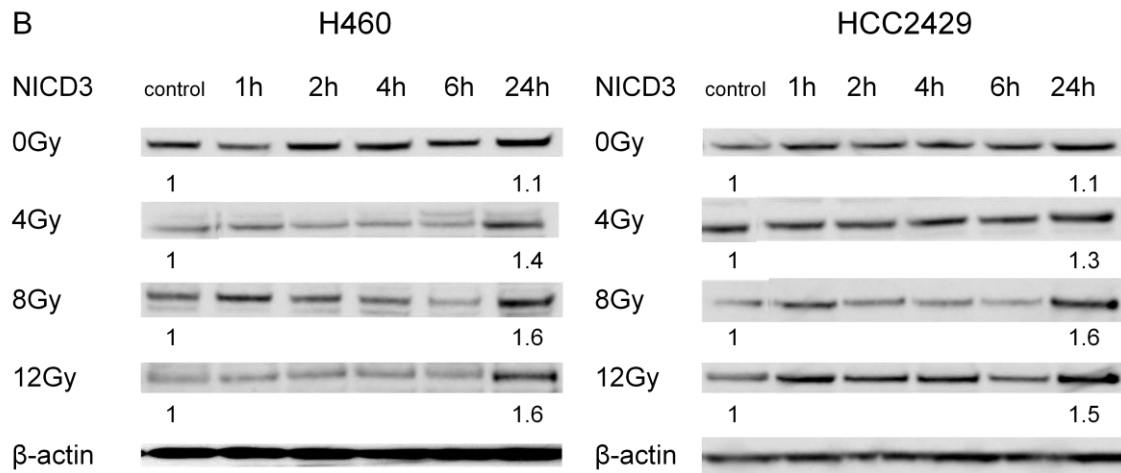
1) 低酸素下での放射線照射による Notch 及び HIF pathway への影響の検討

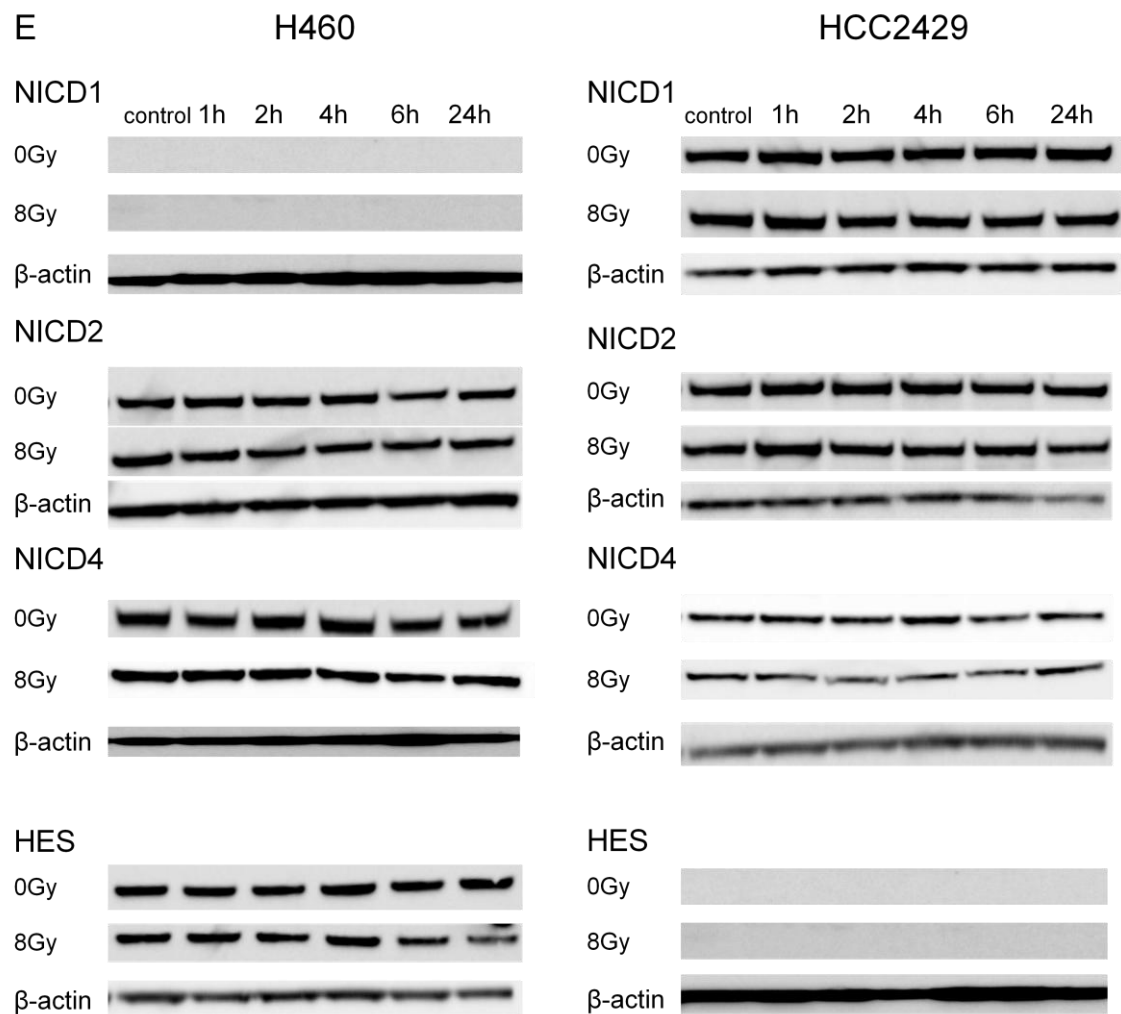
はじめに低酸素環境における放射線照射による Notch pathway 及び HIF pathway への影響をウエスタンブロット法にて検討した。HEY-1 に関しては Real time RT-PCR 法にて検討した。方法としては 1.0×10^6 個の H460 or HCC2429 を一晩培養し、放射線照射施行後直ちに低酸素下で培養開始し 6 時間及び 24 時間後に蛋白・細胞の回収を行った。ウエスタンブロット法で、H460・HCC2429 いずれの細胞株においても HIF-1 α は照射 6 時間後をピークに発現が認められその後減弱した。ただ HIF-1 α の発現に関しては未照射群 (0Gy) との比較で照射による発現の増強は認められなかった (**Fig. 1A**)。Notch3 は未照射群 (0Gy) でも低酸素環境培養で発現の増強を認めたが、照射後 24 時間をピークに発現がさらに増強した (**Fig. 1B**)。また Notch pathway の標的遺伝子である HEY-1 mRNA (**Fig. 1C**) 及び HIF pathway の標的遺伝子である VEGF 蛋白 (**Fig. 1D**) に関しても照射後低酸素培養 24 時間後に発現の増強が認められた。その他の Notch receptor や Notch pathway の標的遺伝子 の一つである HES に関しては照射及び低酸素培養により発現の変化を認めなかった (**Fig. 1E**)。以上の結果より HIF-1 α は照射後低酸素培養で 6 時間の時点を、Notch3 は 24 時間の時点を以下の実験で用いることとした。

Figure 1

A







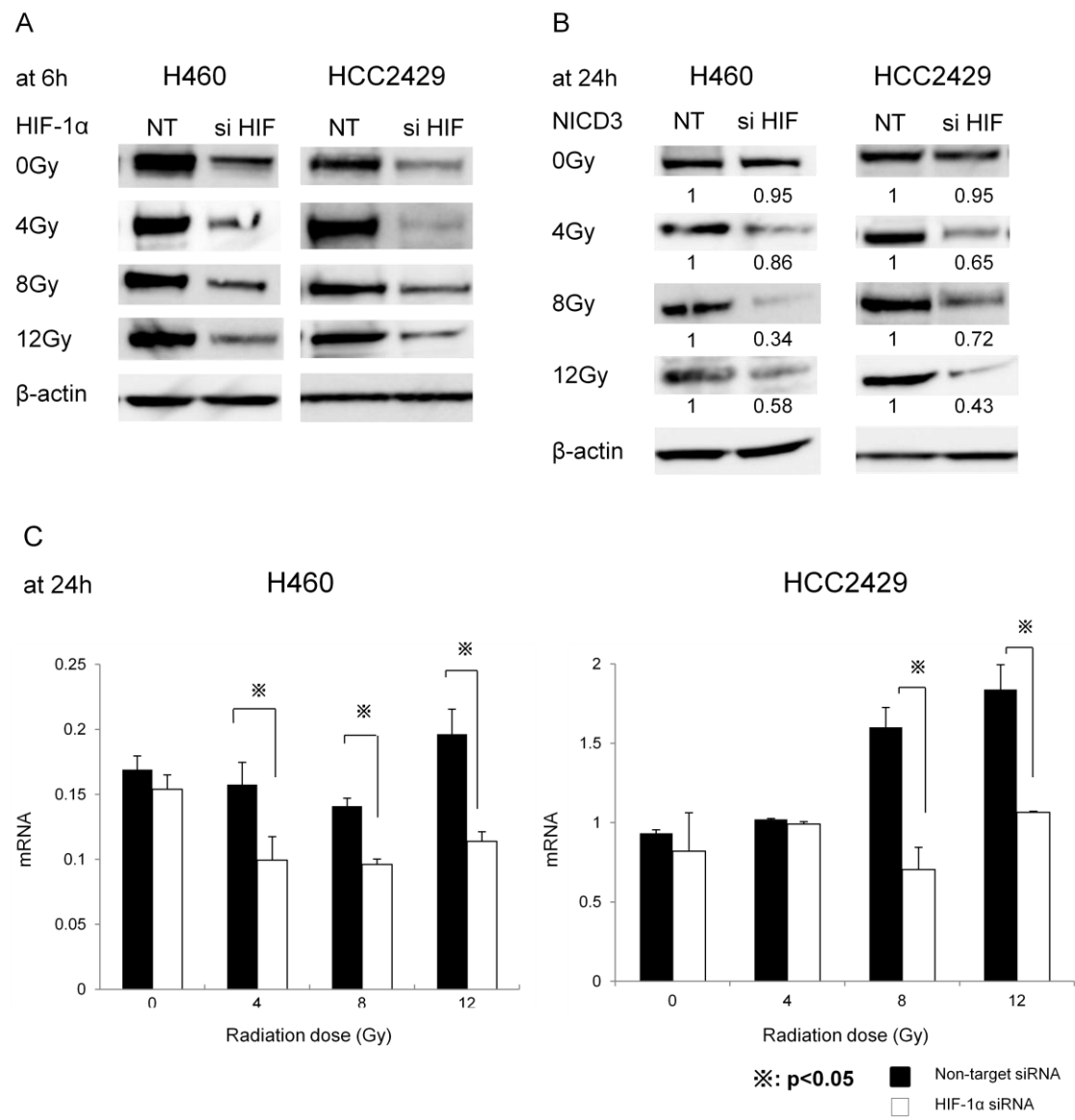
- A) 低酸素下放射線照射後の HIF-1 α の発現状況。
 B) 低酸素下放射線照射後の NICD3 の発現状況。
 C) 低酸素下放射線照射後 24 時間時点の HEY1 の mRNA。
 D) 低酸素下放射線照射後の VEGF の発現状況。
 E) 低酸素下放射線照射後の他の Notch receptor と HES の発現状況。

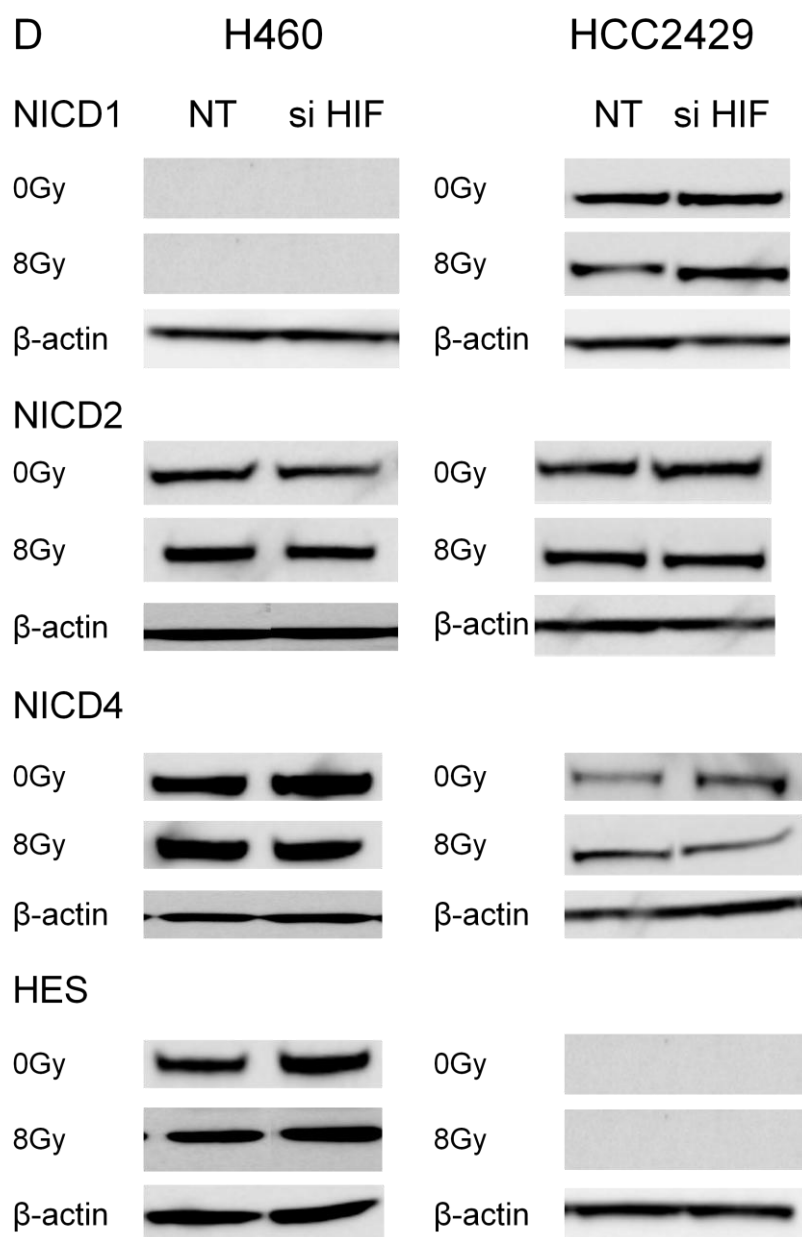
2) 放射線照射後の Notch 3 増強に関する HIF の関与の検討

放射線照射後の Notch3 増強のメカニズムとして HIF-1 α の関与を検討するために、siRNA を用いて HIF-1 α を抑制した際の Notch pathway の発現状況を確認した。HIF-1 α siRNA を導入 6 時間後に放射線照射 (4, 8, 12Gy) 施行しその後低酸素下で培養を行い、照射 6 時間・24 時間後に蛋白・細胞を回収しウェスタンブロット法及び RT-RT PCR にて検討した。siRNA 導入によって照射 6 時間後の HIF-1 α 発現が抑制された (**Fig. 2A**)。Notch3 に関しては照射施行後 24 時間の時点でその増強が抑制され、さらに未照射群と比較し有意に照射施行群の方の

発現が強く抑制された (Fig. 2B)。HEY1 mRNA についても同様の結果が得られた (Fig. 2C)。その他の Notch receptor 及び HES に関しては抑制効果を認めなかった (Fig. 2D)。

Figure 2





- A) HIF-1 α siRNA 導入細胞での低酸素下照射後 6 時間での HIF-1 α の発現状況。
 B) HIF-1 α siRNA 導入細胞での低酸素下照射後 24 時間での NICD3 の発現状況。
 C) HIF-1 α siRNA 導入細胞での低酸素下照射後 24 時間での HEY1 mRNA の状況。

※: $p < 0.05$

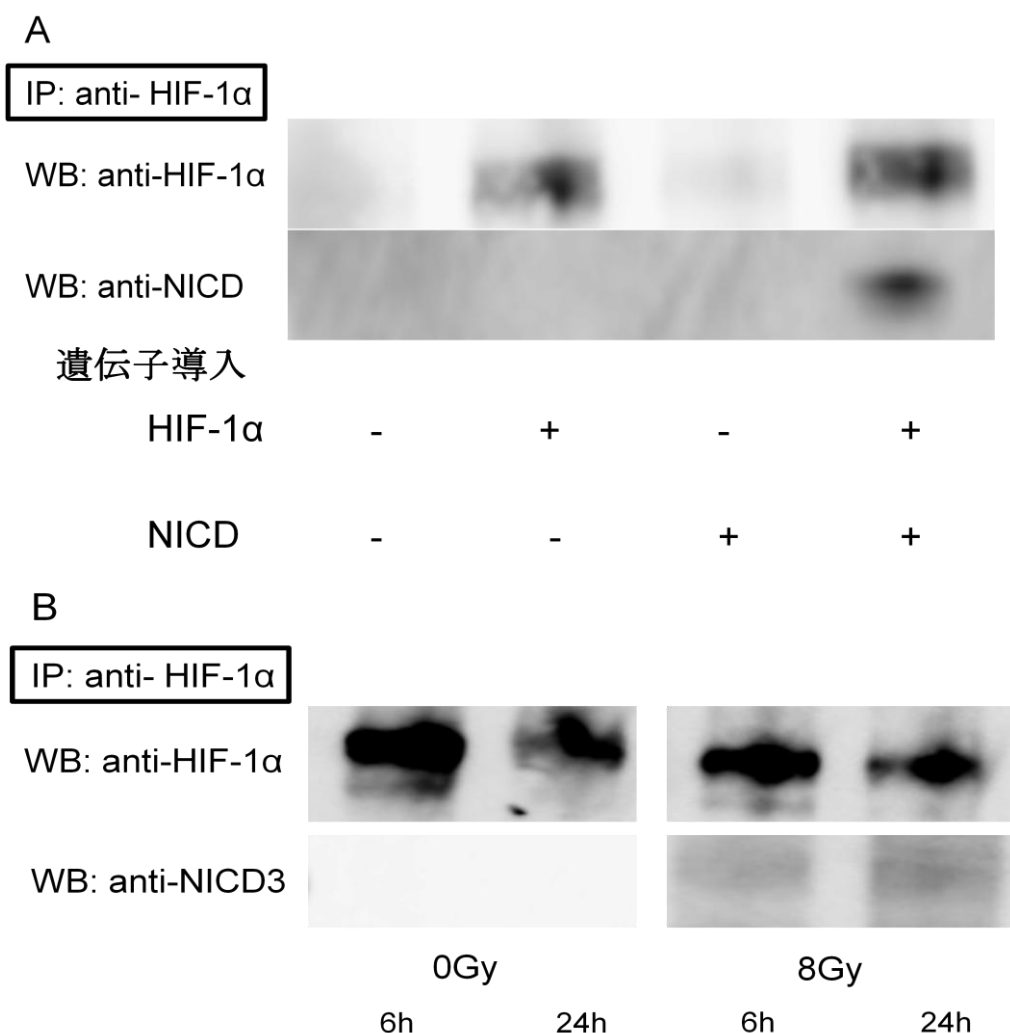
- D) HIF-1 α siRNA 導入細胞での低酸素下照射後 24 時間での Notch receptor 及び HES の発現状況。

NT: non-target siRNA, si HIF; HIF-1 α siRNA。

3) HIF-1 α と Notch3 の結合の検討

HIF-1 α と NICD をそれぞれ遺伝子導入し過剰発現させた細胞に対して、免疫沈降反応を用いてその結合に関して検討した。その結果、HIF-1 α と NICD を共に遺伝子導入した細胞においては抗 HIF-1 α 抗体で免疫沈降すると 1 次抗体として NICD 抗体を用いたウエスタンブロット法によって蛋白発現が認められており、HIF-1 α と NICD の蛋白レベルでの結合が確認された (Fig. 3A)。次に H460 及び HCC2429 細胞に対して放射線照射 (8Gy) 施行後低酸素培養を行った際の免疫沈降反応を施行しウエスタンブロット法を行ったが、明らかな結合を認める事ができなかった (Fig. 3B)。

Figure 3



A) HIF-1 α と NICD を遺伝子導入細胞に対し HIF-1 α で免疫沈降した際の NICD のウエスタンブロットの図。

B) 放射線照射+低酸素培養を施行した H460 細胞における HIF-1 α 免疫沈降し

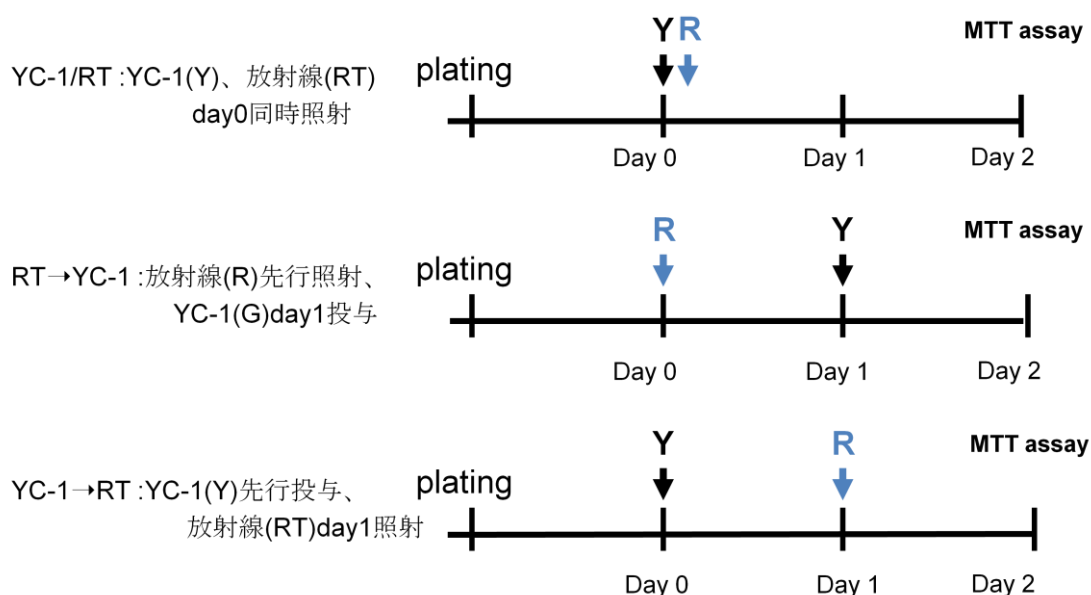
た際の NICD3 のウエスタンブロットの図。

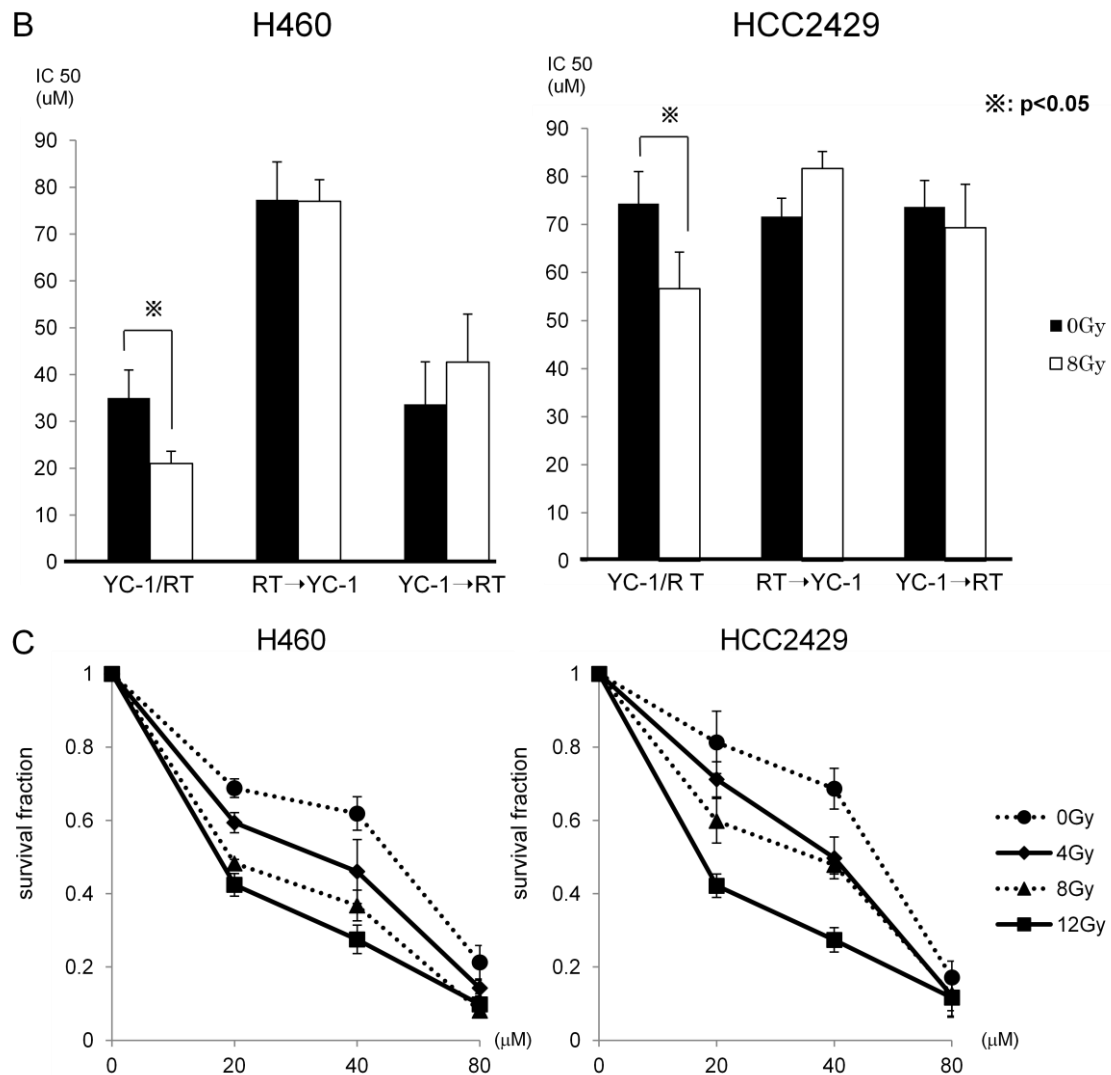
4) 放射線照射と YC-1 併用におけるスケジュールの検討

Harada らは放射線と YC-1 の併用において投与スケジュールにより抗腫瘍効果が異なり、*in vivo* で放射線前後 24 時間に YC-1 を投与した逐次治療の場合と比較し、放射線と YC-1 の同時併用治療においてより高い抗腫瘍効果を認めるという報告をした⁴⁴。本研究において *in vitro* で放射線と YC-1 の併用スケジュール (Fig. 4A) における抗腫瘍効果を検討するために放射線と YC-1 の同時併用、放射線照射 24 時間後 YC-1 投与もしくは YC-1 投与 24 時間後照射を行い MTT assay を行った。放射線先行群及び YC-1 先行群では YC-1 の 50% 阻害濃度 (IC_{50}) の差を認めなかったが、同時併用群では放射線照射を行う事で IC_{50} が減少した。同時併用群における IC_{50} に関しては、H460 においては YC-1 単独では $35 \mu M$ 、放射線 (8Gy) との併用では $21 \mu M$ であった。一方 HCC2429 においては、YC-1 単独では $74 \mu M$ 、放射線 (8Gy) との併用では $56 \mu M$ であった (Fig. 4B)。更にこの放射線と YC-1 の同時併用による放射線感受性の増強に関し検討するために同時併用スケジュールに従い、Clonogenic assay を行った。その結果、両細胞株において放射線量と YC-1 濃度依存的にコロニー形成が抑制された (Fig. 4C)。

Figure 4

A





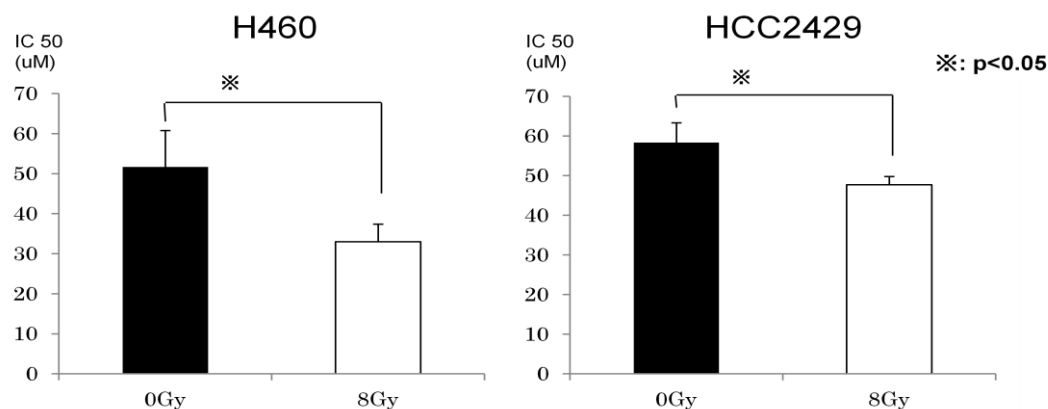
- A) 放射線と YC-1 の投与スケジュール。
 B) 併用スケジュールにおける IC₅₀ の比較。※: p<0.05
 C) 放射線と YC-1 の同時併用スケジュールにおける survival fraction の比較 (n=3)。

5) 低酸素環境における放射線と GSI 逐次併用による抗腫瘍効果の検討

以前、我々の研究室から通常酸素環境で、GSI に投与に関して適切なタイミングで放射線と併用することが重要であり、放射線照射 24 時間後に GSI を投与する逐次治療において放射線の効果を増強するという報告⁴⁹を行った。そこで、本研究では同様の逐次治療を低酸素環境で行った際に同様の結果が得られるか検討した。H460 では GSI 単独群での IC₅₀ は 51 μM、放射線併用群 (8Gy) での IC₅₀ は 33 μM、HCC2429 では GSI 単独群での IC₅₀ は 58 μM、放射線併用群 (8Gy) での IC₅₀ は 48 μM となり (Fig. 5)、GSI 投与単独群と比較し、放射線との併用

によって GSI の IC_{50} は有意に低下を認めた。

Figure 5



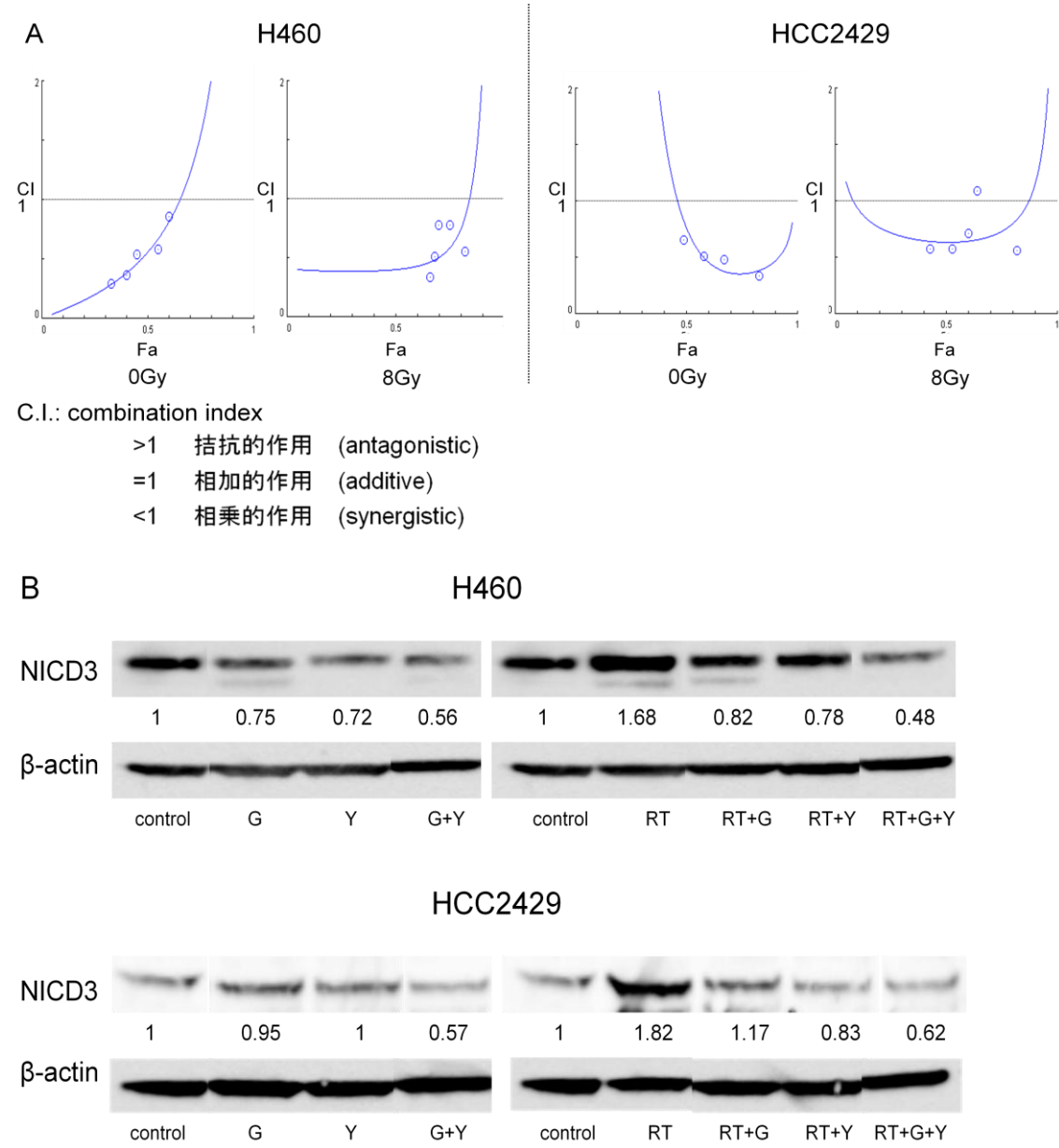
逐次併用スケジュールでの GSI 単独 (0Gy) と放射線併用 (8Gy) の IC_{50} の比較。

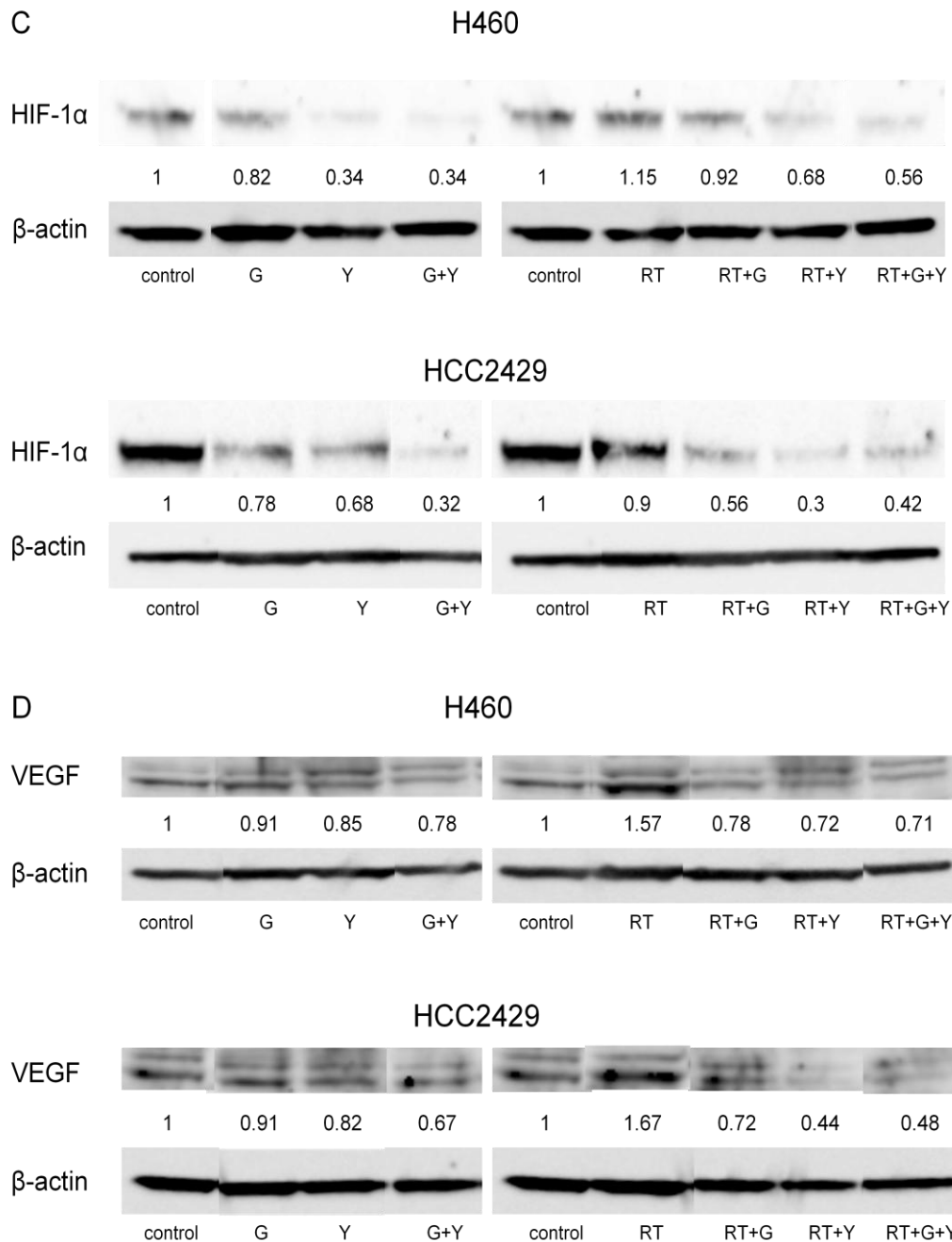
※ : $p < 0.05$

6) 放射線と GSI、YC-1 の併用による抗腫瘍効果の検討 (*in vitro*)

以上の結果より放射線照射時に Notch と HIF pathway が細胞増殖に大きく関連していることが示された。次に、*in vitro* で放射線照射に GSI・YC-1 を併用することで放射線感受性を認めるかの検討を行った。これまでの報告⁴¹⁻⁴³ 及び今回の我々の結果を踏まえ、*in vitro* における放射線と GSI 及び YC-1 の併用療法による抗腫瘍効果の検討を行った。この検討では Fa-CI plot 作成のための 2 剤同時併用における GSI と YC-1 の薬剤濃度に関しては IC_{50} の濃度に従い、その濃度比率を 1:1 とし、濃度勾配をつけて投与を行った (Fig. 4B、Fig. 5)。Fig. 6A に示すように GSI と YC-1 の併用は Fa-CI plot でいずれの群も CI が 1 以下を示している事より、放射線の有無にかかわらず相乗効果が認められた。次に放射線と GSI・YC-1 の 2 剤との併用における各種タンパクの発現状況への影響を検討した。方法としてそれぞれ単独・併用治療を行い、放射線照射 (8Gy) と YC-1 投与 (投与量 : H460 $30 \mu M$ 、HCC2429 $50 \mu M$) を同時行い、その 24 時間後に GSIXX (投与量 : H460 $30 \mu M$ 、HCC2429 $50 \mu M$) を投与した。さらに低酸素で 24 時間培養し、細胞回収後ウェスタンブロット法を行いその発現に関して比較した。放射線照射で増強された Notch3 の発現は GSI 併用にて抑制され、さらに YC-1 の追加でより抑制された (Fig. 6B)。HIF-1 α に関しては放射線照射での明かな増強を認めなかったが、YC-1 投与によりその発現の抑制が認められた (Fig. 6C)。HIF-1 α の標的遺伝子である VEGF に関し、放射線照射で増強された VEGF の発現は YC-1 もしくは GSI 併用にて抑制されていたが、両者を併用することによる更なる抑制効果は認めなかった (Fig. 6D)。

Figure 6





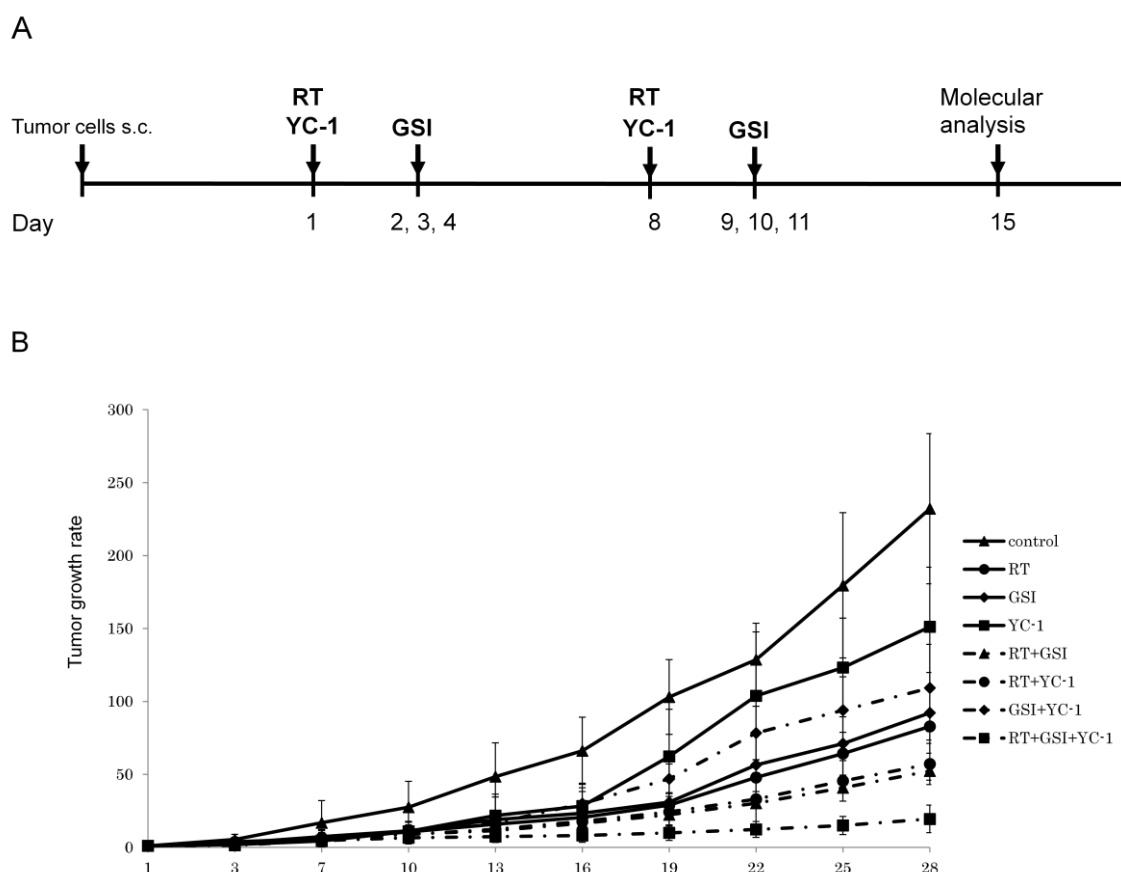
- A) GSI と YC-1 の併用効果に関する Fa-CI グラフ。
 B) 各治療群における Notch3 の発現状況。
 C) 各治療群における HIF-1 α の発現状況。
 D) 各治療群における VEGF の発現状況。

7) ゼノグラフトマウスモデルを用いた放射線、GSI、TC-1 併用治療の検討

Fig. 7A にマウス治療のプロトコールを示す。放射線は day1 と 8 に 8Gy 照射、YC-1 (15 μ g/g) は放射線と同時に腹腔内投与し、GSIXX (200 μ g/kg) は day

2, 3, 4 と 9, 10, 11 に腹腔内投与とし、それぞれ単独群・併用群の計 8 つの治療群に振りわけ腫瘍の大きさを計測した。その結果として全治療群においてコントロール群と比較して腫瘍増殖抑制効果を認めさらに放射線と GSI・YC-1 の 2 剤を併用した群では最も強く腫瘍の増大を抑制した (Fig. 7B)。また治療中体重減少や下痢を含めた重篤な副作用は示さなかった。

Figure 7



A) ゼノグラフトモデルにおける投与スケジュール。

B) 腫瘍成長曲線。

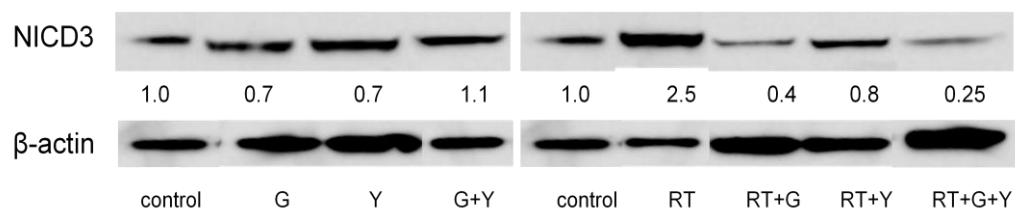
8) 腫瘍組織における Notch3・HIF-1 α 蛋白発現の検討

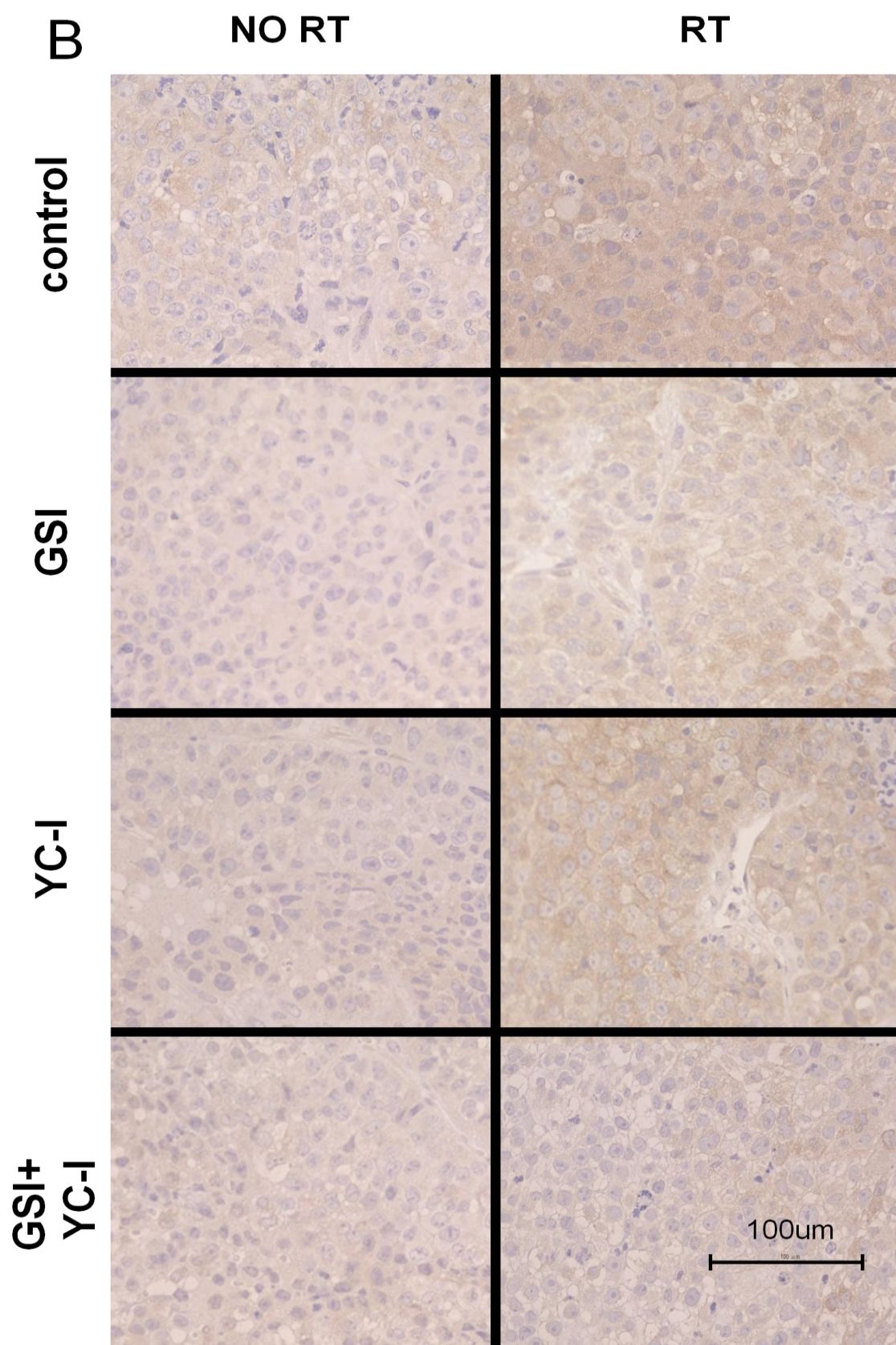
上記治療において Day15 に腫瘍を切除しウェスタンブロット法及び免疫染色法で Notch3 や HIF-1 α の発現を検討した。ウェスタンブロット法では *in vitro* の結果と同様に、放射線照射により増強された Notch3 の発現が GSI 投与で抑制され、YC-1 の追加投与で最も強く発現が抑制された (Fig. 8A)。免疫染色による解析では Notch3 に関してはコントロール群で Notch3 の発現陽性細胞が 64% だったのに対し照射により陽性細胞が 81% に増加したが GSI・YC-1 の併用によって発

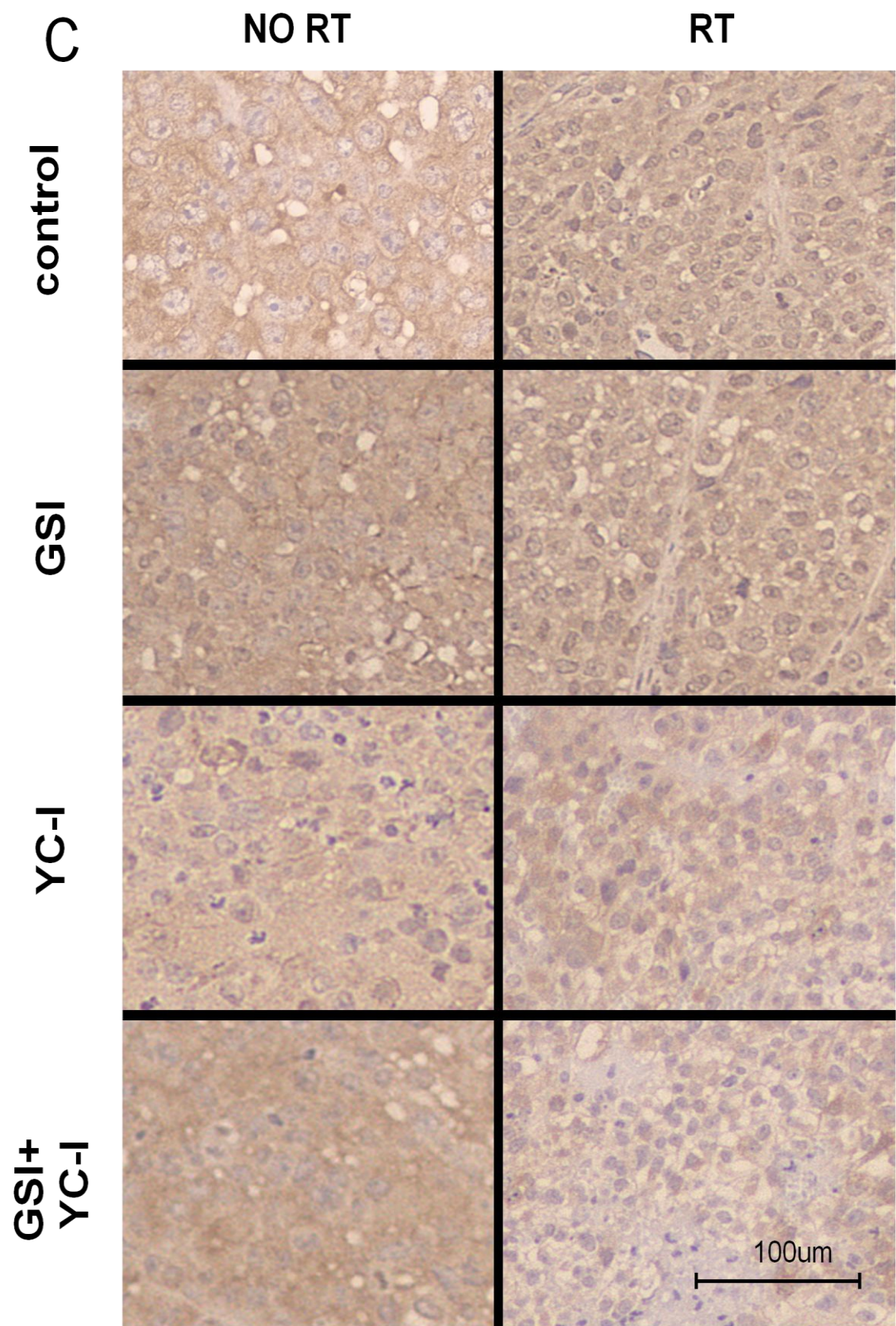
現率が 47%に減少した (Fig. 8B、8D)。一方 HIF-1 α に関しては照射にて軽度陽性細胞の上昇を認めたが (73%→80%)、YC-1 投与および GSI・YC-1 併用により陽性細胞の割合が減少した (それぞれ 72%と 68%) (Fig. 8C、8E)。

Figure 8

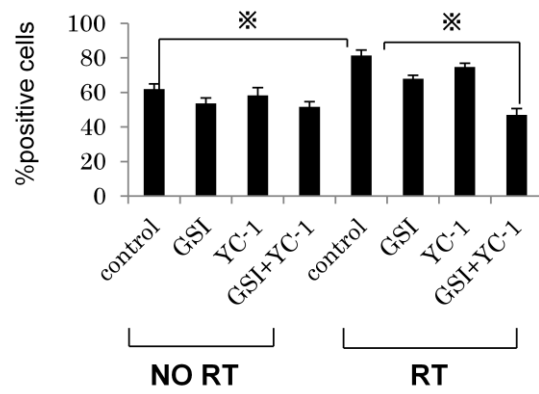
A



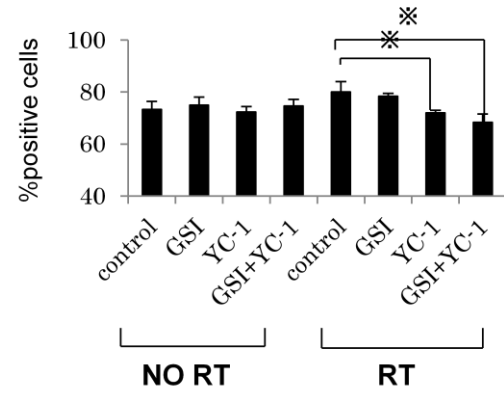




D



E



- A) 腫瘍の NICD3 の発現状況。
 B) 腫瘍の Notch3 の免疫染色。
 C) 腫瘍の HIF-1 α の免疫染色。
 D) 腫瘍の Notch3 陽性細胞のグラフ。※:p<0.05
 E) 腫瘍の HIF-1 α 陽性細胞のグラフ。※:p<0.05

考察

1) 放射線照射による Notch 増強メカニズムと HIF-1 α の関連

当研究室にて通常酸素環境において放射線照射後に肺癌細胞株で Notch3 が増強され、GSI 投与により Notch pathway が抑制され抗腫瘍効果の増強を示すことを報告した。この結果より Notch pathway が放射線抵抗性に関与している可能性が示された⁵²。しかし、放射線照射後に Notch pathway が活性化される機序に関しての検討は少なく今回本研究において放射線照射時の Notch と HIF-1 α の関連について検討を行った。

HIF-1 は放射線抵抗性の重要な要因として多数報告されている転写因子である。また低酸素状態において腫瘍細胞が Stem Cell の状態を維持するのに HIF-1 α が Notch の intracellular domain と結合し Notch の安定化が起こり、Notch の標的遺伝子をより活性化するメカニズムの報告⁵⁶やグリオブラストーマの細胞株で、HIF-1 α によって Notch を誘導し腫瘍の成長を促進するといった報告⁵⁷から、本研究では HIF-1 α が放射線照射後に Notch pathway が増強されるメカニズムへの関連性を検討した。HIF-1 α に関しては放射線照射後の活性化に関して *in vivo* での報告^{44, 61}はあるが *in vitro* での報告は少ない。その理由としては有酸素下で HIF-1 α が速やかに分解されることによる *in vitro* における HIF-1 α の不安定さや細胞種によつての発現の違いなどが考えられる^{62, 63}。本研究において低酸素下における放射線照射の有無による HIF-1 α の発現や YC-1 投与における HIF-1 α の検討、抗腫瘍効果の検討が *in vitro* においても施行されたことは今後の低酸素における HIF-1 α の役割を検討するうえで有意義なものと考えられる。

In vitro の検討において、低酸素下における放射線照射の有無では HIF-1 α の活性化には明らかな差を認めなかった。しかし siRNA を用いて HIF-1 α を抑制した細胞に対して放射線照射群と未照射群で Notch3 の発現を比較した結果、放射線を照射した細胞の方が Notch3 活性化をより強く抑制し (Fig. 2B)、さらには Notch pathway の標的遺伝子の一つである HEY1 も抑制した (Fig. 2C)。さらに YC-1 投与により放射線未照射時には NICD3 の発現抑制を認めなかったが、放射線照射後の活性化した NICD3 発現は抑制された (Fig. 6B)。以上より放射線照射により HIF-1 α を介し Notch3 の発現増強が起こり Notch pathway が活性化されると考えられた。今回の研究では、NICD と HIF-1 α を遺伝子導入した際には免疫沈降の検討で結合を確認できたが、放射線照射後の癌細胞においては CoCl₂ や蛋白阻害剤併用でも HIF-1 α と Notch3 の明らかな結合は認めなかった。今までに HIF pathway の標的遺伝子の一つである VEGF が Notch pathway の Ligand の一つである DLL4 を活性化し Notch pathway を誘導するといった報告が多数あり⁶⁴⁻⁶⁶、Notch3 と HIF-1 α の直接的な結合の他に、上記のような HIF pathway の

標的遺伝子や Notch pathway の ligands を介した間接的な刺激により放射線照射後に Notch の発現を増強している可能性も考えられた。

2) 非小細胞肺癌に対する放射線治療における適切なスケジュールを基にした Notch3 及び HIF-1 α 抑制の重要性

HIF-1 に関しては抗腫瘍効果を検討するうえでその多様性から適切なタイミングで発現を抑制することが重要であり、タイミングによっては効果が減弱する可能性がある。Harada らは放射線と YC-1 の併用において投与スケジュールにより抗腫瘍効果が異なるという報告をした。放射線に先行して YC-1 を投与した場合 HIF-1 が照射前に抑制されることで腫瘍の微小血管の抑制、それに伴う低酸素組織の増加が起こるために照射に対する感受性が低下する。一方で放射線と YC-1 を同時に投与すると照射によって活性化した HIF を抑制し高い抗腫瘍効果を示した⁴⁴。本研究においても *in vitro* において放射線と YC-1 の併用スケジュールにおいて、同時併用する群が他の逐次治療群よりもより高い抗腫瘍効果を示した。この投与スケジュールの重要性は GSI に関しても同様であり、我々の研究室では通常酸素下で照射 24 時間後に GSI を投与するスケジュールが他の治療と比べ有意に腫瘍増大の遅延を示すことを報告し⁵²、今回の研究でも低酸素環境下で同様の傾向がある事を示した。本研究ではこれらを踏まえ、放射線治療と YC-1 を同時に投与し、その 24 時間後に GSI を追加するというプロトコールでの検討を行った。結果としてこのプロトコールによる治療で、各単独治療や各々の薬剤を放射線に併用した場合と比較し、GSI・YC-1 両薬剤を放射線に併用した場合にもっとも強い感受性を認めた。さらには治療後の腫瘍組織の免疫染色やウエスタンブロット法での検討において、GSI・YC-1 の併用が放射線照射により活性化された Notch3 蛋白発現を最も抑制し、また YC-1 の投与により HIF-1 α の抑制を認めたことから、放射線治療によって増強した Notch3 や HIF-1 α の抑制が放射線感受性を高めることが示唆された。このような報告は今までになく今回の検討結果から放射線治療時の Notch-HIF-1 pathway が治療標的になりうる事が考えられ、今後さらなる研究を積んで臨床応用となることを期待したい。

総括及び結論

今回、本研究で得られた新知見として

- siRNA を用いて HIF-1 α を抑制することで、放射線未照射群と比較して放射線照射群においてより強く Notch3 およびその標的遺伝子の HEY が抑制された。その他の Notch family や HES などに関しては抑制効果を認めなかった。
- 放射線照射後に Notch3 の発現が増強されるメカニズムに HIF-1 α の関連が示唆された。
- *In vitro*, *in vivo* において放射線照射によって増強した Notch3 の発現は GSI の逐次併用にて減弱し、さらに HIF inhibitor を併用する事でより減弱した。
- ゼノグラフトマウスモデルにおいて、放射線照射に GSI、HIF inhibitor を併用することで最も強力な抗腫瘍効果を認めた。

であった。その新知見の意義として、今回放射線照射に GSI と HIF inhibitor を併用する治療によって腫瘍細胞に対する抗腫瘍効果をより増強することが証明された。癌組織における低酸素は放射線に限らず化学療法を含めた癌治療に対する抵抗性に関与する重要な因子といわれており、今回その低酸素状態で重要な働きを持つ HIF と Notch pathway を放射線治療時に抑制することでより高い腫瘍増殖抑制効果を得られたことは今後の新たな治療選択肢の一つとなると考えられる。今回の結果は、肺癌に対する GSI/HIF inhibitor と放射線の併用効果の有用性に関する最初の報告である。現在、GSI を用いた固形癌の臨床試験は肺癌を含め、乳癌、中枢神経系の悪性腫瘍を中心に進行しているが放射線併用という観点では HIF inhibitor 含め臨床試験は行われていない。更には GSI や HIF inhibitor 単独もしくは放射線単独では肺癌に対する治療効果には限界があり、今回の我々の結果からこれら 3 者を併用することで更なる抗腫瘍効果が認められたことから新たな治療戦略となる可能性が示唆された。また、GSI の臨床試験における毒性の 1 つが水様性の下痢であるが、今回の併用治療では、重篤な副作用発現は認められず、今後更なる実験データや臨床試験が必要であるが放射線との併用は実現可能と考えられる。

謝辞

本研究の機会を与えていただいた、北海道大学大学院医学研究科内科学講座 呼吸器内科学分野 西村正治教授に深謝致します。ならびに、適切な助言と直接の御指導を賜りました大泉聡史准教授、榊原純助教、国立がん研究センター 中央病院 水柿秀紀医師、北海道大学大学院医学研究科生理学講座 大場雄介教授、藤岡容一郎研究員に感謝の意を表します。Virginia 大学の Thao P. Dang 博士には細胞株を提供していただきました。この場を借りて感謝の意を表します。

引用文献

1. Ohe, Y. *et al.* Randomized phase III study of cisplatin plus irinotecan versus carboplatin plus paclitaxel, cisplatin plus gemcitabine, and cisplatin plus vinorelbine for advanced non-small-cell lung cancer: Four-Arm Cooperative Study in Japan. *Ann. Oncol.* 18, 317-323 (2007).
2. Schiller, J.H. *et al.* Comparison of four chemotherapy regimens for advanced non-small-cell lung cancer. *N. Engl. J. Med.* 346, 92-98 (2002).
3. Maemondo, M. *et al.* Gefitinib or chemotherapy for non-small-cell lung cancer with mutated EGFR. *N. Engl. J. Med.* 362, 2380-2388 (2010).
4. Sandler, A. *et al.* Paclitaxel-carboplatin alone or with bevacizumab for non-small-cell lung cancer. *N. Engl. J. Med.* 355, 2542-2550 (2006).
5. Kwak, E.L. *et al.* Anaplastic lymphoma kinase inhibition in non-small-cell lung cancer. *N. Engl. J. Med.* 363, 1693-1703 (2010).
6. Grego-Bessa, J., Diez, J., Timmerman, L., de la Pompa J.L.. Notch and epithelial-mesenchyme transition in development and tumor progression: another turn of the screw. *Cell. Cycle.* 3, 718-721 (2004).
7. Huppert, S.S., Ilagan, M.X., De-Strooper, B., Kopan, R. Analysis of Notch function in presomitic mesoderm suggests a gamma-secretase-independent role for presenilins in somite differentiation. *Dev. Cell.* 8, 677-688 (2005).
8. Kiernan, A.E. *et al.* The Notch ligands DLL1 and JAG2 act synergistically to regulate hair cell development in the mammalian inner ear. *Development.* 132, 4353-4362 (2005).
9. Allenspach, E.J., Maillard, I., Aster, J.C., Pear, W. S. Notch signaling in cancer. *Cancer. Biol. Ther.* 1, 466-476 (2002).
10. Iso, T., Kedes, L., Hamamori, Y. HES and HERP families: multiple effectors of the Notch signaling pathway. *J. Cell. Physiol.* 194, 237-255 (2003).
11. Beatus, P., Lundkvist, J., Oberg, C., Lendahl, U. The notch 3 intracellular domain represses notch 1-mediated activation through Hairy/Enhancer of split (HES) promoters. *Development.* 126, 3925-3935 (1999).
12. Haruki, N. *et al.* Dominant-negative Notch3 receptor inhibits mitogen-activated protein kinase pathway and the growth of human lung cancers. *Cancer. Res.* 65, 3555-3561 (2005).
13. Konishi J. *et al.* Gamma-secretase inhibitor prevents Notch3 activation

- and reduces proliferation in human lung cancers. *Cancer. Res.* 67, 8051-8057 (2007).
14. Ellisen, L.W. *et al.* TAN-1, the human homolog of the *Drosophila* notch gene, is broken by chromosomal translocations in T lymphoblastic neoplasms. *Cell.* 66, 649-661 (1991).
 15. Curry C.L. *et al.* Gamma secretase inhibitor blocks Notch activation and induces apoptosis in Kaposi's sarcoma tumor cells. *Oncogene.* 24, 6333-6344 (2005).
 16. Das, I. *et al.* Notch oncoproteins depend on gamma-secretase/presenilin activity for processing and function. *J. Biol. Chem.* 279, 30771-30780 (2004).
 17. Duechler, M. *et al.* Induction of apoptosis by proteasome inhibitors in B-CLL cells is associated with downregulation of CD23 and inactivation of Notch2. *Leukemia.* 19, 260-267 (2005).
 18. Reedijk, M. *et al.* High-level coexpression of JAG1 and NOTCH1 is observed in human breast cancer and is associated with poor overall survival. *Cancer. Res.* 65, 8530-8537 (2005).
 19. Dang, T.P. *et al.* Chromosome 19 translocation, overexpression of Notch3, and human lung cancer. *J. Natl. Cancer. Inst.* 92, 1355-1357 (2000).
 20. Micchelli, C.A. *et al.* Gamma-secretase/presenilin inhibitors for Alzheimer's disease phenocopy Notch mutations in *Drosophila*. *FASEB J* 17, 79-81 (2003).
 21. Konishi, J. *et al.* Notch3 cooperates with the EGFR pathway to modulate apoptosis through the induction of bim. *Oncogene.* 29, 589-596 (2010).
 22. Rasul, S. *et al.* Inhibition of gamma-secretase induces G2/M arrest and triggers apoptosis in breast cancer cells. *Br. J. Cancer.* 100, 1879-1888 (2009).
 23. Tanaka, M. *et al.* Inhibition of Notch pathway prevents osteosarcoma growth by cell cycle regulation. *Br. J. Cancer.* 100, 1957-1965 (2009).
 24. Vaupel, P., Kallinowski, F., Okunieff, P. Blood flow, oxygen and nutrient supply, and metabolic microenvironment of human tumors: a review. *Cancer. Res.* 49, 6449-6465 (1989).
 25. Hockel, M., Vaupel, P. Tumor hypoxia: definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects. *J. Natl. Cancer. Inst.* 93, 266-276 (2001).
 26. Brown, J.M., Wilson, W.R. Exploiting tumour hypoxia in cancer

- treatment. *Nature. Rev. Cancer.* 4, 437-447 (2004).
27. Teicher B.A. Hypoxia and drug resistance. *Cancer. Metastasis. Rev.* 13, 139-168 (1994).
 28. Moeller, B.J., Richardson, R.A., Dewhirst, M.W. Hypoxia and radiotherapy: opportunities for improved outcomes in cancer treatment. *Cancer. Metastasis. Rev.* 26, 241-248 (2007).
 29. Dewhirst, M.W., Cao, Y., Moeller, B.J. Cycling hypoxia and free radicals regulate angiogenesis and radiotherapy response. *Nature. Rev. Cancer.* 8, 425-437 (2008).
 30. Adrian, L.H. Hypoxia- a key regulatory factor in tumor growth. *Nature. Rev. Cancer.* 2, 38-47 (2002).
 31. Pennacchietti, S. *et al.* Hypoxia promotes invasive growth by transcriptional activation of the met protooncogene. *Cancer. Cell.* 3, 347-361 (2003).
 32. Semenza, G.L. *et al.* Structural and functional analysis of hypoxia inducible factor 1. *Kidney. Int.* 51, 553-555 (1997).
 33. Carmeliet, P. *et al.* Role of HIF-1 alpha in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis. *Nature.* 394, 485-490 (1998).
 34. Piret, J.P. *et al.* Hypoxia and CoCl₂ protect HepG2 cells against serum deprivation- and t-BHP-induced apoptosis: a possible anti-apoptotic role for HIF-1. *Exp. Cell. Res.* 295, 340-349 (2004).
 35. Semenza, G.L., Roth, P.H., Fang, H.M., Wang, G.M. Transcriptional regulation of genes encoding glycolytic enzymes by hypoxia inducible factor 1. *J. Biol. Chem.* 269, 23757-23763 (1994).
 36. Goda, N. *et al.* Hypoxia-inducible factor 1alpha is essential for cell cycle arrest during hypoxia. *Mol. Cell. Biol.* 23, 359-369 (2003).
 37. Patiar, S., Harris, A.L. Role of hypoxia-inducible factor-1 as a cancer therapy target. *Endocrine-Related. Cancer.* 13, s61-s75 (2006).
 38. Hu, Y., Liu J., Huang, He. Recent agent targeting HIF-1 α for cancer therapy. *J. Cell. Biol.* 114, 498-509 (2013).
 39. Shin, D.H. *et al.* Preclinical evaluation of YC-1, a HIF inhibitor, for the prevention of tumor spreading. *Cancer. Lett.* 255, 107-116 (2007).
 40. Yeo, E.J. *et al.* YC-1: a potential anticancer drug targeting hypoxia-inducible factor 1. *J. Natl. Cancer. Inst.* 95, 516-525 (2003).
 41. Chun, Y.S. *et al.* Inhibitory effect of YC-1 on the hypoxic induction of erythropoietin and vascular endothelial growth factor in Hep3B cells.

- Biochem. Pharmacol.* 61, 947-954 (2001).
42. Li, S.H. *et al.* A novel mode of action of YC-1 in HIF inhibition: stimulation of FIH-dependent p300 dissociation from HIF-1 (alpha). *Mol. Cancer. Ther.* 7, 3729-3738 (2008).
 43. Yasui, H. *et al.* Inhibition of HIF-1 α by the anticancer drug TAS106 enhances X-ray-induced apoptosis in vitro and in vivo. *Br. J. Cancer.* 99, 1442-1452 (2008).
 44. Harada, H. *et al.* Treatment regimen determines whether an HIF-1 α inhibitor enhances or inhibits the effect of radiation therapy. *Br. J. Cancer. JC* 100, 747-757 (2009).
 45. Moon, S.Y. *et al.* Using YC-1 to overcome the radioresistance of hypoxia cancer cells. *Oral. Oncology.* 45, 915-919 (2009).
 46. Bonner, J.A. *et al.* Anti-EGFR-mediated radiosensitization as a result of augmented EGFR expression. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 59, 2-10 (2004).
 47. Shintani, S. *et al.* Enhancement of radiosensitivity in head and neck cancer cells by ZD1839 ('IRESSA'), a selective epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor. *Am. J. Clin. Oncol.* 26, e150-156 (2003).
 48. Han, Y. *et al.* X-radiation induces non-small-cell lung cancer apoptosis by upregulation of Axin expression. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 75, 518-526 (2009).
 49. Zhuang, H.Q. *et al.* Radiosensitizing effects of gefitinib at different administration times in vitro. *Cancer. Sci.* 100, 1520-1525 (2009).
 50. Phillips, T.M., McBride, W.H., Pajonk, F. The response of CD24(-/low)/CD44+ breast cancer-initiating cells to radiation. *J. Natl. Cancer. Inst.* 98, 1777-1785 (2006).
 51. Wang, J. *et al.* Notch promotes radioresistance of glioma stem cells. *Stem. Cells.* 28, 17-28 (2010).
 52. Mizugaki, H. *et al.* γ -Secretase inhibitor enhances antitumor effect of radiation in Notch-expressing lung cancer. *Br. J. Cancer.* 106, 1953-1959 (2012).
 53. Arvola, N.D. *et al.* Hypoxia-induced radioresistance is independent of hypoxia-inducible factor-1A in vitro. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 62, 207-212 (2005).
 54. Khaitan, D., Chandna, S., Arya, M.B., Dwarakanath, B.S. Establishment

- and characterization of multicellular spheroids from a human glioma cell line; Implications for tumor therapy. *J. Transl. Med.* 4, 1-13 (2006)..
55. Moeller, B. J., Dewhirst, M. W. HIF-1 and tumour radiosensitivity. *Br. J. Cancer.* 95(1), 1-5 (2006).
 56. Gustafsson, M. V. *et al.* Hypoxia requires notch signaling to maintain the undifferentiated cell state. *Development.* 9, 617-628 (2005).
 57. Qiang, L. *et al.* HIF-1 α is critical for hypoxia-mediated maintenance of glioblastoma cells by activating Notch signaling pathway. *Cell. Death. and Differentiation.* 19, 284-294 (2011).
 58. Shareef, M. M. *et al.* Interaction of HIF-1 α and notch3 is required for the expression of carbonic anhydrase 9 in breast cancer cells. *Gene. Cancer.* 4, 513-523 (2013).
 59. Chao, C. Drug combination studies and their synergy quantification using the Chou-Talalay method. *Cancer. Res.* 70, 440-446 (2010).
 60. Chao C, Mu Y, Hallahan DE, Lu B. XIAP and surviving as therapeutic targets for radiation sensitization in preclinical models of lung cancer. *Oncogene.* 23, 7047-7052 (2004).
 61. Moeller, B. J., Cao, Y., Li, C. Y., Dewhirst, M. W. Radiation activates HIF-1 to regulate vascular radiosensitivity in tumors: Role of reoxygenation, free radicals, and stress granules, *Cancer. Cell.* 5, 429-441 (2004).
 62. Liu, J. *et al.* Real-time imaging of hypoxia inducible factor-1 activity in tumor xenografts. *J. Radiat. Res.* 46, 93-102 (2005).
 63. Harada, H. *et al.* The combination of hypoxia-response enhancers and an oxygen dependent proteolytic moiety enables real-time imaging of absolute HIF-1 activity in tumor xenografts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 360, 791-796 (2007).
 64. Yan, M., Plowman, G. D. Delta-like 4/Notch signaling and its therapeutic implications. *Clin. Cancer. Res.* 13, 7243-7246 (2007).
 65. Thurston, G., Noguera-Troise, I., Yancopoulos, G. D. The Delta paradox: DLL4 blockade leads to more tumour vessels but less tumour growth. *Nature. Rev. Cancer.* 7, 327-331 (2007).
 66. Thurston, G., Kitajewski, J. VEGF and Delta-Notch: interacting signaling pathways in tumour angiogenesis. *Br. J. Cancer.* 99, 1204-1209 (2008).