

氏 名 どい のぶたか
土肥 伸岳

学位の種類 博士 (医学)

学位記番号 富医薬博甲第 127 号

学位授与年月日 平成 26 年 3 月 21 日

学位授与の要件 富山大学学位規則第 3 条第 3 項該当

教育部名 富山大学大学院医学薬学教育部 医学領域 博士課程
生命・臨床医学専攻

学位論文題目 **Acquired radioresistance in HeLa cells under hypoxia mimic was inhibited with decreased expression of HIF subunit genes by the RNA interference.**
(低酸素誘導因子(HIF)遺伝子を標的とした RNA 干渉による HeLa 細胞の放射線抵抗性の阻害-擬似低酸素下において-)

論文審査委員

(主査)	教授	井村 穰二
(副査)	教授	西条 寿夫
(副査)	教授	戸邊 一之
(副査)	教授	野口 京
(指導教員)	教授	近藤 隆

論文内容の要旨

[目的]

固形癌は、血管内皮増殖因子などを分泌することで、血管新生を促し、宿主からの栄養や酸素供給を調整している。宿主の血管は、腫瘍の外部から誘導されて周りを取り囲むように発達し、外側から栄養や酸素を供給するようになる。しかしながら、腫瘍の成長の速さ故、腫瘍内部には栄養や酸素が届かないことも多い。したがって、固形癌は、酸素濃度の違いによって外側の高酸素領域、その内側の低酸素領域、さらに内側の酸素が届かない壊死領域で構成される。

酸素が届きにくく、低酸素領域にある癌細胞は放射線抵抗性で、放射線治療後に起こる腫瘍の再発の原因の一つとなっている。低酸素領域にある癌細胞が放射線に対して抵抗性を示す理由として、低酸素領域では放射線の酸素効果が抑制されることや、低酸素誘導因子 (HIF) の活性化による遺伝子発現の変化が挙げられる。放射線の酸素効果の抑制に対しては、放射線の種類や線量と血管拡張剤などの併用によって克服が検討されている。しかし、HIF 転写因子の活性化による遺伝子発現の変化が放射線抵抗性にどのように影響するかについては不明な点が多い。

HIF 転写因子には HIF-1 α と HIF-1 β から構成される HIF-1 と HIF-2 α と HIF-1 β から構成される HIF-2 がある。本研究では、放射線抵抗性に対する、HIF 転写因子の発現抑制の影響を調べた。さらに、HIF 転写因子を標的として放射線抵抗性を阻害する shRNA の開発を検討した。

[方法並びに成績]

1. 実験にはヒト子宮頸癌由来の HeLa 細胞を用いた。200 μ M の CoCl₂ を含む培養液を用いることで HIF 転写因子が安定的に発現する擬似低酸素培養系を採用した。5 Gy X 線照射 48 時間後に生存している細胞を放射線抵抗性細胞とした。擬似低酸素下で 24 時間、48 時間、72 時間培養した細胞は、通常の条件で培養した細胞より放射線照射後の細胞生存率が、すべての時点において約 1.5 倍高くなった。
2. HIF 転写因子の各サブユニットを発現抑制する shRNA を持続的に発現する細胞をそれぞれ構築し、各サブユニットの放射線抵抗性に及ぼす影響を調べた。擬似低酸素下で 72 時間培養した場合、HIF-2 α と HIF-1 β を発現抑制した細胞で、80%程度に放射線抵抗性を抑制した。これより擬似低酸素下で 72 時間培養した場合の放射線抵抗性には HIF-2 が関与することが示唆される。一方、擬似低酸素下 24 時間及び 48 時間培養した場合には、HIF-1 α と HIF-2 α のどちらか一方だけを発現抑制しても放射線抵抗性に影響がなかったことから、両方が放射線抵抗性に影響することが示唆される。この HIF-1 α と HIF-2 α による放射線抵抗性への関与の一部は、HIF-1 β に依存しない可能性が示される。
3. 次に、HIF-1 α と HIF-2 α の両方を発現抑制することにより、擬似低酸素下で培養したときの放射線抵抗性に対する影響を調べた。まず、HIF-1 α と HIF-2 α を標的とするそれぞれの shRNA をコードする二つの遺伝子カセットを同一細胞に導入した。その結果、擬似低酸素下で 24 時間、48 時間培養した時の放射線抵抗性が、それぞれ、76%、82%に抑制された。
4. 二つの shRNA を同時に一つの細胞で発現させるのは、RNA 干渉の機構において競合する可能性があることから効率的ではないと考えられ、一つの shRNA で両 HIF サブユニットの発現抑制を試みた。HIF-1 α と HIF-2 α をコードする塩基配列間で相同性の高い領域を標的とし、miRNA の作用機構を利用して、三種類の shRNA を設定した。RISC に取り込まれやすいように中央位置にバルジ構造を持つよう設計した shRNA に最も高い

放射線抵抗性抑制効果があった。擬似低酸素下で 24 時間、48 時間培養した時の放射線抵抗性は、それぞれ 60%、61%に抑制された。その理由は HIF-1 α と HIF-2 α が効果的に発現抑制されているためと考えられる。

5. 最後に、擬似低酸素下において、最も放射線抵抗性を抑制した細胞の幹細胞マーカの発現を調べた。HIF-1 α と HIF-2 α の発現を抑制することで、放射線抵抗性を抑制された細胞は幹細胞マーカの発現が抑制されていることを確認した。擬似低酸素下での放射線抵抗性は HIF による幹細胞化が関係していることが示唆される。

[総括]

本研究では HIF-1 α と HIF-2 α の遺伝子両方の発現を一度に抑制するため、共通した塩基配列を標的として設計した shRNA が、擬似低酸素下における放射線抵抗性の抑制に有効であることを示した。放射線抵抗性において HIF-1 α と HIF-2 α が互いに相補し合うことが示唆される。

遺伝子の共通した部分を標的として、複数の遺伝子を一つの shRNA で発現抑制する方法は、遺伝子単位ではなく、細胞全体の機能を理解するうえで有効であり、今後の癌の放射線治療のみならず、広くは癌の研究において、RNA 干渉を利用した新たな治療の可能性を示すものである。

学位論文審査の要旨

【目的】

低酸素領域にある癌細胞は放射線抵抗性で、放射線治療後に起こる腫瘍の再発の原因の一つとなっている。低酸素領域にある癌細胞が放射線に対して抵抗性を示す理由として、低酸素領域では放射線の酸素効果が抑制されることや、低酸素誘導因子 (HIF) の活性化による遺伝子発現の変化が挙げられる。放射線の酸素効果の抑制に対しては、放射線の種類や線量と血管拡張剤などの併用によって克服が検討されている。しかし、HIF 転写因子の活性化による遺伝子発現の変化が放射線抵抗性にどのように影響するかについては不明な点が多い。

HIF 転写因子には HIF-1 α と HIF-1 β から構成される HIF-1 と HIF-2 α と HIF-1 β から構成される HIF-2 があり、本研究では、放射線抵抗性に対する、これら HIF 転写因子の発現抑制の影響を調べることを、加えて、放射線抵抗性を克服する HIF 転写因子を標的として shRNA の効果を調べることを目的とした。

【方法】

実験にはヒト子宮頸癌由来の HeLa 細胞を用いた。HIF 転写因子が安定的に発現する疑似低酸素培養系として CoCl₂ (200 μ M) を含む培養液処理を用いた。X 線照射線量として 5 Gy を用い、48 時間後の細胞生存率を指標に放射線抵抗性を評価した。ウェスタンブロット分析および、mRNA の定量 PCR 分析により各 HIF サブユニットの発現を評価し、mRNA の定量 PCR 分析により、幹細胞マーカーの発現を評価した。

【結果】

1. 擬似低酸素下で 24、48、および 72 時間培養した細胞は、放射線照射後の細胞生存率が対照群に比較して約 1.5 倍高くなった。
2. HIF 転写因子の各サブユニットを発現抑制する shRNA を持続的に発現する細胞をそれぞれ構築し、各サブユニットの放射線抵抗性に及ぼす影響を調べた。擬似低酸素下で 72 時間培養した場合、HIF-2 α および HIF-1 β を発現抑制した細胞で、放射線抵抗性を約 20%抑制した。
3. 次に、HIF-1 α と HIF-2 α の両方を発現抑制することにより、擬似低酸素下で培養したときの放射線抵抗性に対する影響を調べた。その結果、擬似低酸素下で 24、48、および 72 時間培養した時の放射線抵抗性を、いずれの時点においても約 20%抑制した。
4. 次に、一つの shRNA で両 HIF α サブユニットの発現抑制を試みた。RISC に取り込まれやすいように中央位置にバルジ構造を持つよう設計した shRNA に最も高い放射線抵抗性抑制効果があり、擬似低酸素下で 24、48、および 72 時間培養した時の放射線抵抗性を、すべての時点において約 40%抑制した。
5. 擬似低酸素下において、最も放射線抵抗性を抑制した細胞の幹細胞マーカーの発現についても調べた。HIF-1 α と HIF-2 α の発現を抑制することで、放射線抵抗性を抑制された細胞は幹細胞マーカーの発現が抑制されていることを確認した。

【総括】

本研究で土肥 伸岳君は、擬似低酸素下における放射線抵抗性に HIF-1 と HIF-2 の両方がどのように関与しているかを明らかにし、共通した塩基配列を標的として設計した shRNA にて、HIF-1 α と HIF-2 α の遺伝子両方の発現を一度に抑制することで、擬似低酸素下における放射線抵抗性の克服に有効であることを示した。遺伝子の共通した部分を標的

として、複数の遺伝子を一つの shRNA で発現抑制する方法は、遺伝子単位ではなく、細胞全体の機能を理解するうえで有効であり、今後の癌の放射線治療のみならず、広くは癌の研究において、RNA 干渉を利用した新たな治療の可能性を示すものである。HIF-1 α と HIF-2 α の遺伝子の相同性の高い領域の塩基配列を標的として設計した shRNA が、両者の発現を効率的に抑制することで、放射線抵抗性の克服に有効であることを初めて明らかにした点は新規性があり、低酸素細胞の放射線抵抗性を克服する可能性を示した点で学術的価値がある。

以上より本審査会は本論文を博士（医学）の学位に十分値すると判断した。