

主論文の要旨

**Repressive role of stabilized hypoxia inducible factor 1 $\alpha$   
expression on transforming growth factor  $\beta$ -induced  
extracellular matrix production in lung cancer cells**

肺癌細胞における TGF $\beta$  誘導細胞外マトリックス産生に対する  
HIF1 $\alpha$  安定発現の抑制的役割

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻  
病態内科学講座 呼吸器内科学分野

(指導：橋本 直純 准教授)

安藤 啓

## 【緒言】

Transforming growth factor  $\beta$ (TGF $\beta$ )は遷延性低酸素刺激とともに癌微小環境に影響を与え、cadherin/catenin 複合体の解離を介して上皮間葉系移行(Epithelial-Mesenchymal Transition; EMT)の特徴である過剰な細胞外マトリックス(ECM)の産生を誘導する。低酸素誘導因子(HIF)発現は組織の低酸素への特徴的な応答であるが、癌における異常な ECM 産生における HIF1 $\alpha$  発現の役割はまだ明らかではない。今回 TGF $\beta$  刺激によって誘導される cadherin/catenin 複合体解離、及び過剰な ECM 産生における HIF1 $\alpha$  安定発現の役割を検討した。

## 【方法】

TGF $\beta$  及び低酸素刺激による ECM 産生をヒト肺癌細胞(H358 細胞)、ヒト成人肺線維芽細胞(CC2512 細胞)、ラット肺胞上皮細胞(RLE-6TN 細胞)で評価した。通常酸素濃度下でも HIF1 $\alpha$  が安定発現するようにプロリン基を一部アラニン基に改変した HIF1 $\alpha$ dPA を作成し、ドキシサイクリン(Dox)調節型遺伝子発現システムを有する H358 細胞に遺伝子導入した。内因性 HIF1 $\alpha$  安定剤として塩化コバルト(Co)、FG4592(FG)を用いた。ウエスタンブロッティング法による ECM の発現評価と共焦点レーザー顕微鏡を用いた  $\beta$ -catenin、E-cadherin の細胞内局在評価を行った。

## 【結果】

### 1. H358 細胞の EMT 表現型に及ぼす TGF $\beta$ 、低酸素の影響

TGF $\beta$  及び低酸素刺激による EMT 表現型である ECM 産生誘導は 6 時間の時間経過では認められなかったが、96 時間の経過では認められた(Fig.1A-C)。また HIF1 $\alpha$  発現は 6 時間時点では有意な発現増加が認められたが、24 時間時点で発現の減弱が観察されて 96 時間では 6 時間と比較して 75%の減弱を認めた(Fig.1L)。

### 2. H358 細胞における TGF $\beta$ 誘導 EMT 表現型に対する内因性 HIF1 $\alpha$ 転写抑制の影響

siHIF1 $\alpha$  単独では EMT を誘導しなかったが、siRNA 非処理細胞と比べて siHIF1 $\alpha$  処理細胞において TGF $\beta$  刺激による有意な EMT 誘導増強が認められた(Fig.2E-I)。

### 3. H358 細胞における TGF $\beta$ 誘導 EMT 表現型に対する安定化 HIF1 $\alpha$ 発現の影響

H358 細胞において HIF1 $\alpha$ dPA の安定発現により TGF $\beta$  誘導 ECM 産生が抑制され、 $\beta$ -catenin の細胞内移行が抑制された(Fig.3E-I)。

### 4. H358 細胞における TGF $\beta$ 誘導 EMT 表現型に対する内因性 HIF1 $\alpha$ 安定誘導の役割

H358 細胞における Co、FG による内因性 HIF1 $\alpha$  安定誘導は TGF $\beta$  に誘導される EMT表現型を抑制した(Fig.4B-F, H-L)。HIF1 $\alpha$  に対する siRNA 処理を施行した H358 細胞では、FG による TGF $\beta$  誘導 EMT 表現型への抑制効果は減弱した(Fig.4M-Q)。

### 5. RLE-6TN 細胞及び CC2512 細胞における内因性 HIF1 $\alpha$ 安定化の影響

FG 投与による RLE-6TN 細胞及び CC2512 細胞の内因性 HIF1 $\alpha$  安定化は、TGF $\beta$  誘導 ECM 産生を抑制した(Fig.5A, D-M)。

### 6. H358 細胞における内因性 HIF1 $\alpha$ 及びプロテインホスファターゼと TGF $\beta$ 誘導 EMT

## 表現型との関連

プロテインホスファターゼ(PP2A)阻害薬である ocadaic acid(OA)を投与すると、TGF $\beta$  単独投与時に比べて強い ECM 産生誘導が認められた(Fig.6AB)。また安定化 HIF1 $\alpha$ PA 発現細胞に対して OA を投与すると、安定化 HIF1 $\alpha$  による TGF $\beta$  誘導 EMT 表現型への抑制効果が減弱した(Fig.6GH)。

## 【考察】

癌微小環境における癌細胞と癌関連線維芽細胞(CAF)との間の異常な応答を介した EMT 表現型の獲得は、肺癌の発症及び進展に重要であり、EMT 表現型の獲得制御は重要な標的になりうる。肺癌細胞における ECM 産生は、TGF $\beta$  または遷延化低酸素の刺激によって誘導される  $\beta$ -catenin の細胞膜から細胞質・核への移行と密接に関連している。今回、TGF $\beta$  及び低酸素による複合刺激において、 $\beta$ -catenin/E-cadherin 複合体の細胞膜からの解離が 6 時間の極めて短期間な刺激では観察されなかったが、24 時間の刺激では起こることを明らかにした。

HIF1 $\alpha$  は癌の進展と関連があるとされるが、HIF1 $\alpha$  タンパクの安定発現は組織損傷を抑制することが報告されている。本研究では、TGF $\beta$  及び低酸素による複合刺激によって、HIF1 $\alpha$  タンパク質の発現レベル低下が 24 時間から観察されて長期間(96 時間)暴露により有意に減少することを明らかにした。その結果、H358 細胞の  $\beta$ -catenin/E-cadherin 複合体の細胞膜からの解離を誘導して、TGF $\beta$  と低酸素による長期間(96 時間)複合刺激により、有意な ECM 産生が誘導されたと考えられた。

さらに、H358 細胞における siRNA による HIF1 $\alpha$ -mRNA の抑制により、TGF $\beta$  が誘導する cadherin 複合体の解離及び fibronectin の産生が増悪することが観察された。遷延性低酸素刺激に起因する HIF1 $\alpha$  転写抑制による HIF1 $\alpha$  タンパク質発現抑制は TGF $\beta$  誘導 ECM 産生を増悪することが推察された。

また、HIF1 $\alpha$ PA による HIF1 $\alpha$  タンパク質安定化が TGF $\beta$  に誘導される cadherin 複合体の解離及び fibronectin 産生を抑制することを明らかにした。これにより、HIF1 $\alpha$  発現安定化誘導により TGF $\beta$  刺激による過剰な ECM 産生を制御できる可能性を示唆した。

HIF1 $\alpha$  安定化剤である Co 及び FG を用いた内因性 HIF1 $\alpha$  安定化が、TGF $\beta$  に誘導される  $\beta$ -catenin の細胞膜からの解離及び ECM の産生を抑制することを明らかにした。これらは薬剤により内因性 HIF1 $\alpha$  安定化を誘導できる可能性を示唆している。この内因性 HIF1 $\alpha$  安定化による効果は、ヒト肺上皮細胞のみならず、ラット肺胞上皮細胞やヒト繊維芽細胞でも認められた。以上より HIF1 $\alpha$  安定化による TGF $\beta$  誘導 ECM 産生の抑制効果は細胞型や種を超えて誘導できる可能性があると考えられた。

既報ではプロテインホスファターゼの一つである PP2A が細胞膜での catenin/cadherin 複合体の保持と安定化に不可欠であることが示されている。本研究において安定化 HIF1 $\alpha$  タンパク質発現による TGF $\beta$  誘導 EMT 表現型の抑制は、PP2A 機能抑制により減弱した。以上より HIF1 $\alpha$  タンパク質の安定発現による TGF $\beta$  誘導 ECM 産生の抑制

は部分的に PP2A を介していると考えられた。

**【結語】**

HIF1 $\alpha$  タンパク質発現の安定誘導は TGF $\beta$  活性化を伴う腫瘍微小環境を標的とする肺癌細胞に対する新規治療法となる可能性が示唆された。