

Title	RENAL CANCER CELLS LACKING HYPOXIA INDUCIBLE FACTOR (HIF)-1 α EXPRESSION MAINTAIN VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR EXPRESSION THROUGH HIF-2 α
Sub Title	HIF-1 α が欠損した腎癌細胞株ではHIF-2 α によりVEGFの発現が維持される
Author	篠島, 利明
Publisher	慶應医学会
Publication year	2007
Jtitle	慶應医学 (Journal of the Keio Medical Society). Vol.84, No.2 (2007. 6) ,p.33-
JaLC DOI	
Abstract	
Notes	号外
Genre	Journal Article
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00069296-20070602-0033

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the Keio Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

RENAL CANCER CELLS LACKING HYPOXIA INDUCIBLE FACTOR (HIF)-1 α EXPRESSION MAINTAIN VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR EXPRESSION THROUGH HIF-2 α (HIF-1 α が欠損した腎癌細胞株ではHIF-2 α により VEGFの発現が維持される)

篠 島 利 明

内容の要旨

腎細胞癌においてはvon Hippel-Lindau (VHL) 腫瘍抑制遺伝子の不活化を頻繁に認める。VHL蛋白はユビキチンリガーゼとしての機能を有し、正常酸素濃度化ではHypoxia inducible factor (HIF) の分解を行う。VHLの不活化によりHIFは恒常的に活性化され、vascular endothelial growth factor (VEGF) を誘導している。このことが腎細胞癌における特徴的な血管増生の主要なメカニズムと考えられる。本研究ではヒト腎癌細胞株における、VHL遺伝子の変異、HIFのサブタイプであるHIF-1 α 、HIF-2 α の発現、VEGFの産生を検討した。

9種のヒト腎癌細胞株からDNA、mRNAの抽出を行った。VHL遺伝子変異に関してダイレクトシーケンシング法、メチル化特異的PCR法で検索した。各HIFサブタイプmRNAの発現をRT-PCR法、ノーザンブロット法で検討した。またバイサルファイシーケンシング法によりHIF-1 α 遺伝子のプロモーター領域のメチル化解析を行った。HIF蛋白の発現は、細胞株を正常酸素、低酸素(1%O₂、6時間)条件下に培養しウェスタンブロット法にて比較した。HIF-1 α 、HIF-2 α をそれぞれターゲットとしたsiRNAを用いて発現のノックダウンを行った。VEGFの発現は培養上清中の濃度をELISA法により測定した。

4つの腎癌細胞株にVHL遺伝子の変異、プロモーター領域のメチル化を認めた。これらの細胞株ではHIF-1 α mRNAの3'末端の欠損や、mRNA発現量が極めて低いことなどにより、HIF-1 α 蛋白の発現が認められなかった。VHL変異を認めない5株では4株に低酸素刺激により増強されるHIF-1 α 蛋白の発現を認めたが、1株では欠損していた。HIF-1 α 遺伝子のメチル化解析では各細胞株間でプロモーター領域のメチル化の頻度に大きな差を認めず、mRNAの発現量を調節している因子としてトランスエレメントの関与が示唆された。HIF-2 α 蛋白の発現は8株で明らかであったが、VHL変異を有する1株でmRNA低発現によりHIF-2 α 蛋白が欠損していた。siRNAによるHIFサブタイプの特異的なノックダウンにより、HIF-1 α の発現が欠損している細胞株ではHIF-2 α が、HIF-1 α 、HIF-2 α がともに発現している細胞株ではHIF-1 α が、それぞれVEGFの発現に強く関与していることが示された。以上から腎細胞癌においてVHL/HIF pathwayを利用した治療戦略を計画する場合、HIF-1 α 、HIF-2 α の両者が分子標的として重要である可能性が示唆された。

論文審査の要旨

Hypoxia inducible factor (HIF) はvon Hippel-Lindau (VHL) 蛋白を介した翻訳後制御により低酸素状態で活性化される転写因子であり、血管内皮増殖因子(VEGF)の産生を誘導する。本研究では9種のヒト腎癌(RCC)細胞株の解析をおこない、HIF-1 α の発現欠損が多くの細胞株で見られることを明らかにした。またsiRNAを用いたHIF α サブタイプの特異的なノックダウンにより、HIF-1 α の発現が欠損している細胞株ではHIF-2 α が、HIF-1 α 、HIF-2 α がともに発現している細胞株ではHIF-1 α が、それぞれVEGFの発現に強く関与していることを明らかにした。

審査では、まずVHL遺伝子変異に関してヘテロ接合性の喪失(LOH)の解析、VHL蛋白発現の検討がなされていない点について指摘があり、LOHによりVHL mRNAの発現量に変化が生じる可能性、またwild-typeでもVHL不活化が起きる可能性が問われた。それに対し、VHL蛋白はmonomerで働くため、1つのアレルの不活性化のみでは機能を失わないとされているが、発現量が異なる可能性はあること、またウェスタンブロットによる蛋白発現の検討は至適な抗体がなく困難であったとの回答がされた。臨床検体でのVHL遺伝子変異、メチル化の頻度の具体的な数字に関して、さらに今回VHL遺伝子変異を有する細胞株で、HIF-1 α 発現がすべて欠損していた事実は、臨床的に合致するか否かの質問がなされた。散発性淡明細胞型RCCではVHL変異、メチル化の頻度はそれぞれ50-70%、5-10%であるが、VHLが不活である場合のHIF-1 α の発現は70-80%とする報告があり合致しないとの回答がされ、その理由の考察が求められた。それに対し細胞内のHIF-1 α の恒常的な発現がp53の安定化やBnip3の転写といったpro-apoptoticな因子の誘導に関わることにより、株として樹立される際にselectionがかかってしまっている可能性があるとの回答がされた。またsiRNAを用いる際には複数の配列を用いて同じ結果を示すことが必要であること、各細胞株を皮下移植した場合の腫瘍組織内発現の検討も重要であることが指摘された。さらにHIF α サブタイプの転写選択性にかかわるメカニズム、HIF α の分子標的治療の可能性に関して考察が求められ、今回の結果を今後発展させてゆく重要性が返答された。

以上のように本研究はさらに検討されるべき課題を残しているものの、腎細胞癌におけるVEGFの誘導にHIF-1 α 、HIF-2 α の両者が関与していることを明確に示した点で有意義であると評価された。

論文審査担当者 主査 泌尿器科学 村井 勝
病理学 岡田 保典 病理学 坂元 亨宇
先端医科学 河上 裕
学術確認担当者: 池田 康夫
審査委員長: 岡田 保典

試問日: 平成19年1月16日