

氏 名	藤 末 裕
(ふりがな)	(ふじすえ ゆたか)
学位の種類	博士(医学)
学位授与番号	乙 第 号
学位審査年月日	平成25年7月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文題名	Induction of erythropoietin increases the cell proliferation rate in a hypoxia-inducible factor-1-dependent and -independent manner in renal cell carcinoma cell lines (ヒト腎癌細胞株において、エリスロポエチンは、hypoxia-inducible factor-1 依存的及び非依存的に誘導され細胞増殖能を促進する)
論文審査委員	(主) 教授 大 道 正 英 教授 樋 口 和 秀 教授 岡 田 仁 克

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

《目 的》

赤血球分化に必須なサイトカインとして知られるエリスロポエチン (Epo) は、エリスロポエチン受容体 (EpoR) を介して情報伝達を行なっている。Epo や EpoR は造血細胞等多くの正常細胞において発現しているが、近年、子宮頸癌、卵巣癌、乳癌等の悪性腫瘍においても発現が確認され、腫瘍進展との関連が注目されている。Epo の発現調節は、主に低酸素下で誘導される低酸素誘導因子 hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) を介して行われている。HIF-1 は、種々の細胞で Epo、血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) 等の発現やエネルギー代謝系の調節を行なっており、その調節機構の破綻は腫瘍の発生、進展と関連している。現在、HIF-1 や VEGF を標的とした血管新生阻害剤が開発されており、癌治療に

においてその効果が期待されている。

腎癌では、EpoR が腫瘍組織や種々の癌細胞株において発現しているということや、腎癌細胞株で Epo が細胞増殖を亢進することが報告されている。また、最近 EpoR や Epo 発現量と腎癌の進展に相関があるという報告もあり、HIF-1 に加え、EpoR、Epo が治療標的となる可能性が示唆される。

本研究の目的は、ヒト腎癌細胞株における EpoR、Epo の発現機序及び、細胞増殖との関連を分子レベルで明らかにすることである。

《方 法》

5 種類のヒト腎癌細胞株 (769P、786O、Caki1、Ku19/20、SKRC44) を用いて以下の項目について検討した。

- i) 各ヒト腎癌細胞株における *EpoR*、*Epo* の mRNA 発現量をリアルタイム PCR 法を用いて定量した。
- ii) 細胞増殖能測定 : 各ヒト腎癌細胞株の Epo 存在下での増殖能を、Cell Counting Kit-8 (同仁化学) により測定した。
- iii) Caki1 及び SKRC44 の HIF-1 α 誘導能を塩化コバルト (CoCl₂) 及び低酸素処理により検討した。HIF-1 α の検出には Western blotting 法を用いた。
- iv) 低酸素下での Caki1、SKRC44 の増殖能を ii) と同様に測定した。
- v) 遺伝子発現抑制 : Caki1、SKRC44 において、*Epo* 或いは *HIF-1 α* 遺伝子の発現抑制を各遺伝子特異的 siRNA を用いて行った。正常および低酸素下での細胞増殖能を ii) と同様に測定した。

《結 果》

i) *Epo* 遺伝子の発現 : 786O、Ku19/20、Caki1、SKRC44 において高い発現が認められた。

EpoR 遺伝子の発現 : Caki1、SKRC44 において高い発現が認められた。

ii) Epo 反応性細胞増殖能 : *EpoR*, *Epo* 両遺伝子を高発現する Caki1、SKRC44 においてのみ Epo 投与により細胞増殖能の有意な上昇が認められた。

以降は Caki1、SKRC44 両細胞の比較検討を行った。

iii) CoCl₂ 処理或いは低酸素処理による HIF-1 α 誘導能 : Caki1 においてのみ HIF-1 α の誘導が確認された。

iv) 低酸素下での細胞増殖能 : Caki1 は Epo 投与に関係なく、低酸素下で細胞は増殖した。一方、SKRC44 は、低酸素下での細胞増殖能は正常酸素下に比べ僅かな減少を示したが、Epo を投与することにより回復した。

v) siRNA を用いた *HIF-1 α* 或いは *Epo* 遺伝子の発現抑制が細胞増殖に与える影響

SKRC44 : *Epo* の発現抑制は、正常及び低酸素下いずれの状態においても、その細胞増殖を有意に抑制した。一方、*HIF-1 α* の発現を抑制しても増殖に変化はなかった。

Caki1 : *Epo* の発現抑制は、SKRC44 と同様に正常及び低酸素下いずれの状態においても、その増殖を有意に抑制した。*HIF-1 α* の発現抑制は、正常酸素状態での増殖には影響を与えなかったが、低酸素状態においては、*Epo* の発現を抑制した場合と同様に細胞増殖を有意に抑制した。

《考 察》

腎癌細胞株では Epo、EpoR 両分子が発現し、Epo は EpoR を介して細胞の増殖を促進していることが以前から示されている。我々は、本研究において淡明細胞癌細胞株である Caki1、SKRC44 が *EpoR*, *Epo* を高発現しており、Epo は両細胞の増殖を促進することを確認した。また、Epo の発現は、主に Von Hippel-Lindau 分子を介した HIF-1 α によって制御されていることから、Caki1、SKRC44 において、HIF-1 α の発現を調べたところ、Caki1 では HIF-1 α の発現が認められたが、SKRC44 では認められなかった。SKRC44 の方が定常的に Epo の発現が多いことを考えると、SKRC44 での Epo の発現は HIF-1 α に依存していない可能性が示唆された。低酸素下での増殖能を調べたところ、HIF-1 α が誘導される Caki1 では増殖が促進されたが、HIF-1 α が誘導されない SKRC44 では増殖促進は

見られず、また、*HIF-1α* の発現を抑制すると Caki1 の低酸素下での増殖は抑制されたが、SKRC44 にはほとんど影響が見られなかった。このことより、*HIF-1α* は多くの癌で高発現し癌治療の標的として注目されているが、SKRC44 のような *HIF-1α* 非依存性の淡明細胞癌には *HIF-1α* を抑制するような抗癌剤の薬効が低い可能性が示唆された。

一方で、*Epo* 発現の抑制は、*HIF-1α* 誘導能が異なる Caki1、SKRC44 両細胞において正常及び低酸素下での細胞増殖能を抑制した。このことより *HIF-1α* による発現制御の有無に関わらず *Epo* の作用を抑制することにより腎淡明細胞癌を制御できることが考えられた。今回我々は、*HIF-1α* 依存的のみならず非依存的にも発現する可能性のある *Epo* が腎淡明細胞癌の増殖を促進していることを示したが、*HIF-1α* に非依存性である *Epo* の制御機構を明らかにすることが出来れば、腎細胞癌、とりわけ、予後不良の淡明細胞癌の新しい治療標的になる可能性が示唆された。

論文審査結果の要旨

腎癌の治療法としては、手術による腫瘍摘出が最も一般的であるが、進行癌などの手術不能例に対しては従来の化学療法はあまり効果が期待できない。HIF-1 や VEGF を標的とした血管新生阻害剤が開発されてきているが、その効果は現在のところ限定的である。申請者は腎癌において EpoR、Epo の発現が腫瘍増殖因子として重要な役割を果たしている可能性に着目し、ヒト腎癌細胞株における EpoR、Epo の発現機序及び細胞増殖との関連性を検討している。

まず、申請者は淡明細胞癌細胞株である Caki1、SKRC44 が *EpoR*、*Epo* を高発現しており、*Epo* は両細胞の増殖を促進することを確認した。*Epo* は低酸素状態において誘導されることから、両細胞の HIF-1 α 誘導能を調べたところ、Caki1 においてのみ HIF-1 α の誘導が認められることを見出し、淡明細胞癌細胞株では *Epo* が HIF-1 に依存性と非依存性に発現する二つのタイプが存在する可能性があることを明らかにした。また、低酸素下での増殖能を調べたところ、Caki1 では増殖が促進されたが、SKRC44 では僅かながら増殖低下が見られ、その低下は *Epo* 投与により回復した。さらに、*HIF-1 α* の発現抑制による低酸素下における増殖能の抑制は Caki1 でのみ起こり、SKRC44 ではほとんど影響が見られなかったが、*Epo* の発現抑制では、Caki1、SKRC44 両細胞において正常及び低酸素下での細胞増殖能を抑制することを明らかにした。

申請者は本研究で、HIF-1 α 依存的のみならず非依存的にも発現する可能性のある *Epo* が腎淡明細胞癌の増殖を促進していることを明らかにし、HIF-1 非依存的 *Epo* 発現に関わる経路が腎淡明細胞癌の新しい治療標的となる可能性を示した。

以上により、本論文は本学学位規程第3条第2項に定めるところの博士（医学）の学位を授与するに値するものと認める。

(主論文公表誌)

Oncology letters 5(6): 1765-1770, 2013