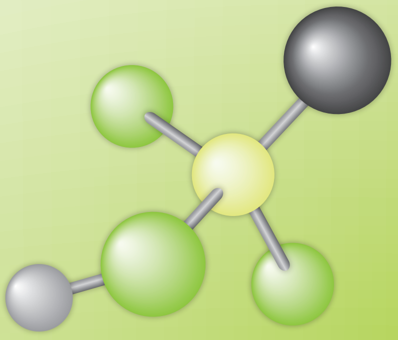
YAMAKIN

匠から科学へ、そして医学への融合



オーラルサイエンスレポート

Vol.3

低酸素の世界

生体科学安全研究室

目　次

1. はじめに ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 2

2. HIF-1の分子構造 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 3

3. HIF-1の発現ならびに活性制御機構 ・・・・・・・・・・・・ 4

3.1 プロリン残基の水酸化 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 5

3.2 アスパラギン残基の水酸化 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 5

3.3 リジン残基のアセチル化 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 5

3.4 リン酸化 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 5

3.5 S-ニトロ化 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 6

3.6 SUMO化 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 6

3.7 その他 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 6

4. HIF-1の標的遺伝子および生物学的作用 ・・・・・・・・・ 7

5. 歯科とHIF-1 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 8

6. 口腔癌におけるHIF-1の関わり ・・・・・・・・・・・・・・・ 8

7. HIF-1αをターゲットとした分子標的治療 ・・・・・・・ 11

8. おわりに ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 12

低酸素の世界

高知大学医学部歯科口腔外科学講座　教授　山本　哲也

1．はじめに

世界のトップレベルのマラソン選手などが米国コロラド州ボルダーや中国昆明などの高地でトレーニングを行っていることは多くの人に知られた事実であるが，北京オリンピック男子競泳100m平泳ぎ銀メダリストであるアレクサンデル・ダーレオーエン選手が高地トレーニング中に急死するなどその危険性も指摘されている．この高地トレーニングが注目されるようになったのは，1960年代に標高2000m前後の高地にあるエチオピアのマラソン選手であるアベベ・ビキラがオリンピックで２連覇を達成してからである．その後，この高地トレーニングがスポーツ医学的に研究されるのに伴い，このトレーニングの効能は高地特有の低酸素環境に基づくということが明らかとなり，近年では，低酸素トレーニング室を有するトレーニング施設も散見されるようになって来た．しかし，この高地（低酸素）トレーニングがなぜ有効であるのかを科学的に知っている人はそれ程多くないと思われる．平地と高地では何が異なるかというと，まずは気圧である．気圧は，高度０mでは1013hpsであるのに対し，高度1000mでは899hps，高度2000mでは795hps，高度3000mでは701hpsと，高度が高くなるに従って低下する．それに伴い酸素濃度も低下し，高度０mでは約20.9％であるのに対し，高度1000mでは約18.4％，高度2000mでは約16.3％，高度3000mでは約14.2％となる．この高地における酸素濃度の低下が人体に様々な影響を及ぼすのである．

下等動物から哺乳動物に至るすべての生物は変化する酸素濃度を認識し，それに適応して生存している．この酸素濃度変化に対する応答は細胞および個体レベルで営まれており，今日までにその応答機構の多くが分子レベルで詳細に明らかにされてきた．低酸素は空気中の酸素分圧の低下だけではなく生体内の局所においても生じ，虚血性心疾患，肺高血圧，関節リウマチ，神経変性疾患，悪性腫瘍などの多くの病態と密接に関連していることが示されている[1-5]．したがって，生物の低酸素ストレスに対する応答機序を明らかにすることはこれらの病態を理解する上で極めて重要で，さらには，この応答機序の解明は低酸素を標的とした新しい治療法の開発に繋がる．

低酸素状態に対する適応機序の解析は主として癌においてなされてきた．固形癌はその異常な増殖のために血液・酸素供給が不十分となり，腫瘍内には低酸素領域が生じるが，癌細胞はこの低酸素環境に適応して生き延びるだけではなく，低酸素ストレスによりその悪性度が高まり，抗癌剤や放射線に対し抵抗性となることが知られている．実際，臨床においても化学・放射線治療を行った場合，血液供給が辺縁部に比べ低いと想定される癌の中心部は，辺縁部に比べ，生残癌細胞が多数認められる[6]．このように，癌細胞は血液・酸素供給の低下に対して，種々の機構によって応答し，その増殖能を維持するが，その中で，転写因子であるHypoxia-inducible factor（HIF-1）が低酸素誘導性遺伝子応答のマスター遺伝子であることが明らかとなった[7]．HIF-1は癌細胞において様々な標的遺伝子の発現誘導を介して生存シグナルを活性化することが示されているが，その作用は生存・増殖のみならず，浸潤・転移，薬剤耐性など多岐に亘ることが知られるようになってきた．HIF-1は癌細胞のみならず様々な細胞においても発現されているが，HIF-1の発現制御機構は複雑で，転写，翻訳および翻訳後のレベルで制御されるとともに細胞内における局在もその活性化には重要であり，HIF-1の役割を明らかにするためにはまだまだ解明すべき点が多く残されている[8-10]．

本拙論においてはこのような背景の下に，HIF-1の基本的構造ならびにその主要な発現制御機構について解説するとともに，口腔におけるHIF-1の関わりについて最近の知見および我々の研究結果を交えて概説することとした．

2．HIF-1の分子構造

HIF-1は，HIF-1αおよびHIF-1β/Aryl hydrocarbon receptor-nuclear translocator（ARNT）からなるヘテロ２量体で，これらはともにBasic helix-loop-helix perid（Per)/Arnt/single-minded（Sim）(bHLH-PAS)型転写因子ファミリーに属し，それぞれ826個（分子量 120 kDa）および789個（分子量91~94 kDa）のアミノ酸からなっている（図１）[11,12]．HIF-1αおよびHIF-1βはいずれも，Nuclear localization signal（NLS），bHLHモチーフ，Per/Arnt/Sim（PAS）ドメインおよびTransactivationドメイン(TAD)を有しており，これらの中で，bHLHモチーフはDNAへの結合および２量体形成に，PASドメインは２量体形成に，TADはCREB-binding protein（CBP)/p300，Steroid receptor coactivator-1 (SRC-1)，Transcription intermediary factor-2 (TIF-2)などの共役因子との結合ならびに転写制御に重要な役割を果たしている[13,14]．HIF-1αにはHIF-1βと異なり，特徴的な２つのTAD(N-TADおよびC-TAD)が存在し，さらに，N-TADとオーバーラップした形でOxygen-dependent degradation (ODD)ドメインが認められる[15,16]．

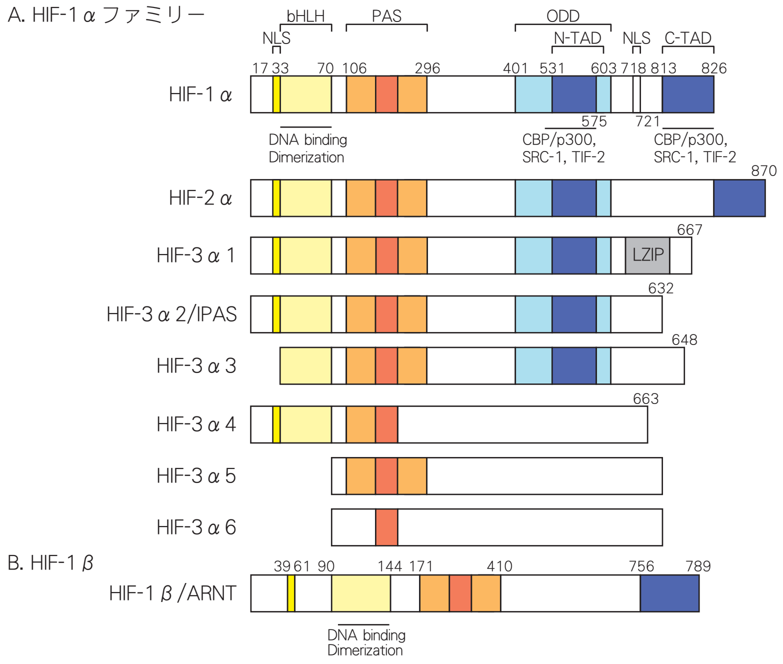


図1　HIFファミリー蛋白質の構造

HIF-1αにはアイソフォームとしてHIF-2αおよびHIF-3α1～6が同定されているが，これらのアイソフォームの組織分布や機能はHIF-1αと異なっている[17,18]．HIF-2αは，HIF-1αと同様に低酸素条件下においてHIF-1βと結合し，標的遺伝子の転写を促進する[19,20]．これに対し，HIF-3αはHIF-1αおよびHIF-2αと異なりbHLHとPASドメインは有するもののC-TADは有しておらず，HIF-1β/ARNTと結合はするもののHIF-1依存的遺伝子発現は誘導しない[21]．つまり，HIF-3αはDominant negativeに作用するアイソフォームで，HIF-1依存的遺伝子発現を抑制するInhibitory PAS domain protein (IPAS)もHIF-3αのSplicing variantのひとつである[22]．

３．HIF-1の発現ならびに活性制御機構

ヘテロ２量体であるHIF-1の酸素依存的発現制御は主としてHIF-1αによっており，HIF-1βの発現は酸素濃度非依存的に，核内においてHIF-1αと２量体を形成することによりHIF-1の転写活性に影響を及ぼしている（図２）[23,24]．このHIF-1αの発現ならびに活性の制御機構は非常に複雑で，酸素濃度のみならずEpidermal growth factor (EGF)やInsulin growth factor-1/2 (IGF-1/2)などの増殖因子，サイトカインによっても影響され，HIF-1α自身の転写レベル，翻訳レベルおよび翻訳後レベルで調節されている[8-10]．HIF-1αは主に転写因子であるSp1を介して構成的に発現されているが，AP-1，AP-2，NF-1およびNF-κBなどの転写因子もまたその転写に関与している[9]．しかしながら，正常酸素分圧下においてHIF-1αは非常に不安定で（半減期は５分以内）[25]，このターンオーバーはプロリンおよびアスパラギン残基の水酸化，さらには，リジン残基のアセチル化などの翻訳後修飾によって制御されている（図３）[8]．

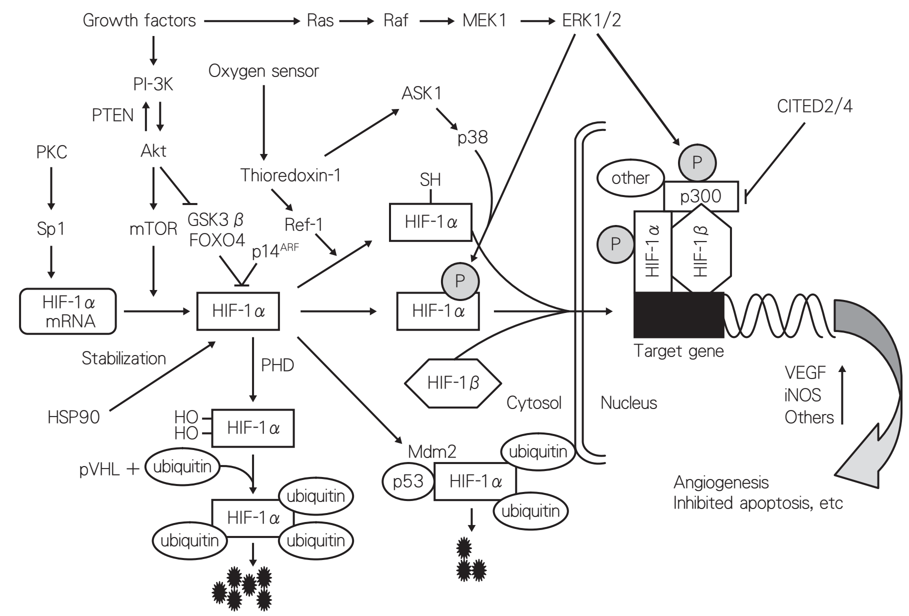


図2　HIF-1αの主要な発現制御機構（文献[77]を改変）

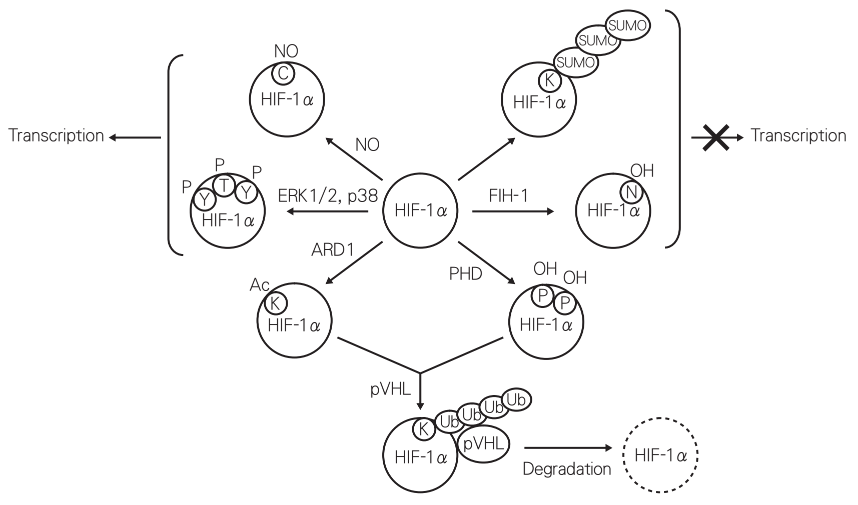


図3　HIF-1αの翻訳後修飾（文献[8]を改変）

３.１　プロリン残基の水酸化

HIF-1αのODD内に存在するプロリン残基（Pro402およびPro564）は正常酸素分圧下ではProlyl hydroxylase（PHD)によって水酸化修飾を受け，その結果，HIF-1αはvon Hippel-Lindau（VHL)病の原因遺伝子であるpVHL蛋白質と結合することによりユビキチン化され，プロテアソーム依存的に分解される[26,27]．PHDは2-oxoglutarate依存性oxygenaseに属し，現在，３種類（PHD1~3）あることが知られている[28,29]．PHDが作用するためには酸素，Fe^{2+}，ならびに，2-oxoglutarateが必要であるために，低酸素状態下においてはPHDの酵素活性は抑制され，その結果，HIF-1αとpVHLとの結合が生じず，HIF-1αは分解されずに核に移行し，HIF-1βと結合して転写活性を示すようになる．

３.２　アスパラギン残基の水酸化

正常酸素分圧下においては，HIF-1αのC-TADに存在するアスパラギン残基（Asn803）はFactor inhibiting HIF-1（FIH)によって水酸化修飾を受けるため，転写共役因子であるCBP/p300との相互作用が抑制され，その結果，HIF-1の転写活性が抑制されることとなる[30]．FIHもまた酸素およびFe^{2+}に依存的で，低酸素状態下においてはこの酵素活性は抑制され，その結果，CBP/p300がHIF-1αに結合してその転写活性が亢進する[31,32]．

３.３　リジン残基のアセチル化

HIF-1αのODD内のリジン残基（Lys532）がArrest-defective-1（ARD1)によってアセチル化されると，HIF-1αとpVHLとの結合が増強され，HIF-1αのプロテアソーム依存的分解が促進される[33]．ARD1はPHDと異なり酸素依存的ではないが，低酸素状態下ではARD1のmRNAおよび蛋白質の発現レベルが低下するためHIF-1αは安定化する．

３.４　リン酸化

MAPキナーゼの１つであるERK1/2は，HIF-1αのC-TADを直接リン酸化することが報告されており，このリン酸化はHIF-1αの安定性やDNAへの結合能には影響を与えないものの，その転写活

性を上昇させる[34]．さらに，ERK1/2はCBP/p300をリン酸化することによりHIF-1の転写活性を増強させる[35]．加えて，p38MAPキナーゼもHIF-1αをリン酸化することによりpVHLとの結合さらにはプロテアソーム依存的分解を抑制し，その発現を高めることが報告されている[36,37]．

3.5　S-ニトロ化

HIF-1αに対する一酸化窒素（NO）の作用に関しては議論のあるところであるが，一酸化窒素（NO）はHIF-1αのシステイン残基（Cys800）をS-ニトロ化（S-nitrosation）し，HIF-1αと共役因子であるCBP/p300との結合を促進し，転写活性を増強する[38]．

3.6　SUMO化

Small ubiquitin-like modifier (SUMO)は分子量が約12kDaの蛋白質で，転写因子をはじめとした蛋白質に結合し，その蛋白質の核内移行や安定化，標的遺伝子の転写活性制御に関与している[39,40]．HIF-1αのODD内のリジン残基（Lys391およびLys477）がSUMO化（SUMOylation）されるとHIF-1αの安定性および転写活性が抑制されること，さらには，Sentrin/SUMO-specific protease (SENP3)はHIF-1αの転写活性を増強することが知られている[41,42]．

3.7　その他

HIF-1αの発現および転写活性は，上述のような翻訳後レベルでの修飾以外でも様々な修飾を受け，それらは酸素分圧の影響をあまり受けない．例えば，ある種の増殖因子やサイトカインは，正常酸素分圧下においてもPI3-K/Aktおよびその下流に位置するMammalian target of rapamycin (mTOR)を介してHIF-1αの安定性や転写活性を増強する[43-46]．さらに，Heat shock protein 90 (HSP90)阻害剤であるGeldanamycinはpVHL非存在下にHIF-1αのユビキチン化ならびにプロテアソーム依存的分解を促進することより，HSP90はHIF-1αの安定化に関与していると考えられている[47,48]．

活性酸素もまた正常酸素分圧および低酸素分圧下においてHIF-1αの発現および転写活性の制御に関与している．過酸化水素処理あるいはNADPH oxidase Iの強発現などによってHIF-1αの安定性が増強すること[49,50]，低酸素処理によってミトコンドリアでの活性酸素産生が誘導されるとともにRotenoneやMyxothiazolなどのミトコンドリア呼吸鎖阻害剤は低酸素処理によるHIF-1α発現を抑制することより[51]，活性酸素はHIF-1αの発現を正に制御すると考えられる．さらに，HIF-1αはレドックス制御を受けており[52]，Thioredoxin-1 (Trx-1) はRedox factor-1 (Ref-1) を介してHIF-1αのC-TADと共役因子であるCBP/p300との結合を促進し，HIF-1αの転写活性を増強する[25,53]．Ref-1によるHIF-1αの活性化にはC-TADのシステイン残基の還元が重要であると考えられているが，その詳細な機序については十分には明らかにされていない．

一方，HIF-1αの転写活性を抑制する機構もいくつか存在する．CBP/p300 interacting transactivator with ED-rich tail (CITED) 2/CITED4はCBP/p300のCysteine-histidine (CH1) domainに結合することによりHIF-1αとCBP/p300との結合を抑制し，HIF-1αの転写活性を抑制する[54,55]．さらに，Phosphatase and tensin homologue on chromosome 10 (PTEN)はPI-3K/Aktシグナルを抑制することによりそれを介するHIF-1αの安定性や転写活性の増強を抑制し，Aktの下流位置するGlycogen synthase kinase 3β (GSK3β)やForkhead box O (FOXO)転写因子ファミリーのひとつであるFOXO4/ Forkhead transcription factor (AFX)はHIF-1α発現および活性を負に制御する[56,57]．加えて，癌抑制遺伝子産物p53はHIF-1αに直接結合してその転写活性を抑制するとともにMdm2に依存したHIF-1αの分解を促進し[58-60]，同じく癌抑制遺伝子産物p14^{ARF}もHIF-1αに直接結合してその転写活性を抑制することが報告されている[61]．

4．HIF-1の標的遺伝子および生物学的作用

転写因子であるHIF-1は，プロモーター領域に存在する5'-RCGTG-3' 配列のHypoxia-responsive element (HRE)に結合することにより転写を誘導する[62]．HREを有するHIF-1の標的遺伝子としては，*Erythropoietin (EPO)*や*Vascular endothelial growth factor (VEGF)*をはじめとしてこれまで60以上の遺伝子が明らかにされている（図４）[7,63,64]．これらの遺伝子産物の機能は，エネルギー代謝，細胞増殖・アポトーシス，浸潤・転移，血液供給，血管新生，物質輸送，転写など多岐に亘っており，HIF-1は細胞の様々な機能の調節に重要な役割を果たしている．

最初に述べた高地トレーニングではどのようなことが起こっているかというと，低酸素により上述のメカニズムでHIF-1が活性化され，その結果，その標的遺伝子*epo*の遺伝子産物であるErythropoietinにより赤血球が増加するとともに，*vegf*の遺伝子産物であるVascular endothelial growth factorにより血管新生が生じるとともに血流が増加すると考えられる．Erythropoietinは遺伝子組み換えによる医薬品が腎性貧血などに使用されているが，スポーツ選手がこれを使用するとドーピングとなるものの，高地トレーニングの場合は自分自身の体の中で生じたものであることよりドーピングにはならない．さらに，高地トレーニングには，HIF-1の標的遺伝子*Glucose transporter-1*および*-3*（*glut-1*および*glut-3*）の遺伝子産物を介して糖代謝が亢進するといった効果もある．

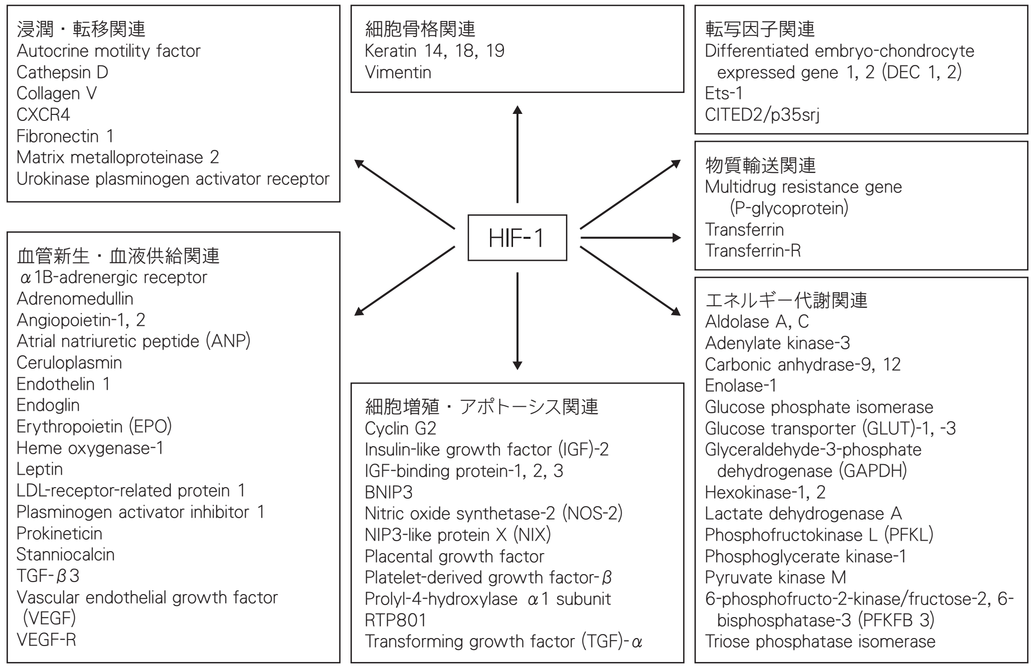


図4　HIF-1αの代表的な標的遺伝子群

5．歯科とHIF-1

歯牙を含めた口腔諸臓器の発育や歯科・口腔領域の疾患・病態における低酸素環境の影響についてもいくつかの報告がなされている．Nagaoka Rらは，低酸素症は鼻突起の癒合不全を引き起こして口唇形成を阻害すること，さらに，顔面の正常発生過程において特定の部位に低酸素状態が生じることを明らかにしている[65]．Kim YSらは，ニコチンやリポポリサッカライド（LPS）で歯根膜由来細胞を処理すると炎症に関わるプロスタグランディンE_2（PGE_2）や組織破壊に関わるマトリックスメタロプロテアーゼ-2および-9（MMP-2および-9）の産生が増強し，HIF-1αを阻害するかsiRNAを用いてノックダウンするとこれらの産生増強が抑制されることを示し，HIF-1αが喫煙やデンタルプラークによる歯周炎の治療のターゲットとなる可能性を示唆している[66]．Agis Hらは，プロリン水酸化酵素阻害剤は歯根膜由来の線維芽細胞においてHIF-1αの安定化を介してVEGF産生を増強し，この増強は炎症性サイトカインIL-1の存在下においてさえも生じることを明らかにしている[67]．Song ZCらは，咬合性外傷や喫煙によって歯周組織に酸素欠乏が生じているに違いないと考え，酸素欠乏が歯根膜由来細胞にどのような影響を及ぼすかを低酸素処理と同様の作用を及ぼす$CoCl_2$処理を行い検討した結果，$CoCl_2$処理によりHIF-1αを介するアポトーシスやオートファジーが誘導されることを報告している[68]．さらには，５％の低酸素条件下で歯髄細胞を培養すると硬組織形成能が正常酸素分圧下で培養したものに比べ有意に増強することや[69]，領域の疾患口腔領域動物実験の段階ではあるものの，HIF-1αを強発現させた骨髄間葉系幹細胞を用いることにより骨新生のみならず即時インプラントのオッセオインテグレーションがより強く生じることが報告されている[70]．このように，顎顔面の発育や口腔領域の疾患の発生や病態に低酸素が関わっていることは明らかであるが，今後更に詳細な関わりが明らかにされると思われる．

6．口腔癌におけるHIF-1の関わり

口腔癌を含めた頭頸部癌におけるHIF-1についての報告はそれほど多くはなされていない[71-74]．Aebersoldらは，口峡咽頭癌においてHIF-1αの発現程度はリンパ節転移の有無，放射線治療の効果および局所制御率と関連することを報告し[71]，Koukourakisらは頭頸部扁平上皮癌においてHIF-1αの発現は局所浸潤性，化学・放射線療法の効果，局所制御率を含めた予後と関連することを明らかにしている[72]．しかしながら，Beasleyらは，頭頸部扁平上皮癌においてHIF-1αを高発現している症例の予後は高発現していない症例に比べて良好であるとし[73]，Kyzasらは頭頸部扁平上皮癌におけるHIF-1αの発現程度と予後との間には関連は無いと報告している[74]．

株化口腔扁平上皮癌（OSC）細胞を用いて低酸素誘導アポトーシスに及ぼすHIF-1αの影響を検討したところ，OSC細胞を低酸素（1％O_2）下で培養するとHIF-1αの発現が増強するもののその発現程度は弱く，活性酸素産生ならびにアポトーシスが誘導された（図５）[75]．一方，HIF-1αを強発現させたOSC細胞においては，低酸素処理をおこなっても活性酸素レベルはコントロール細胞と比べ低く，アポトーシス誘導もほぼ完全に抑制された．さらに，HIF-1αを強発現させたOSC細胞においては癌細胞の生存シグナルに関わるPI-3K，リン酸化Aktおよびリン酸化ERK1/2の発現レベルが上昇し，チトクロームcのミトコンドリアから細胞質への放出も抑制されていた（図６）．さらに，Bcl-2ファミリー蛋白に及ぼす影響について見たところ，HIF-1α強発現OSC細胞ではBcl-2およびBcl-X_L蛋白質の発現は亢進し，逆に，BaxおよびBakの発現は抑制されることが明らかとなった．加えて，OSC細胞におけるHIF-1αの発現レベルと抗癌剤およびγ線に対する感受性を検討したところ，両者には逆の相関が認められ，HIF-1αを強く発現しているOSC細胞はHIF-1αの発現が弱いOSC細胞に比較してCDDP，5-FUおよびγ線に対してより抵抗性であることが明らかとなった（図７）．これらの結果は，OSC細胞におけるHIF-1は細胞生存シグナルを増強する一方で，アポトーシスシグナルを抑制することを意味しているが，頭頸部癌，とりわけ，口腔扁平上皮癌におけるHIF-1αの関わりについては更なる検討が必要であると思われる．

ところで，興味あることにCDDP，5-FUおよびγ線はOSC細胞におけるHIF-1α発現を誘導することが明らかになった（図５）．抗癌剤および放射線によるHIF-1α発現誘導の機序については不明であるが，我々はOSC細胞を抗癌剤や放射線で処理すると活性酸素産生が誘導されることを明らかにしている[76]．前述のように活性酸素はHIF-1αを正に制御することより，抗癌剤や放射線は活性酸素産生を介してHIF-1α発現を誘導するのではないかと考えられる．

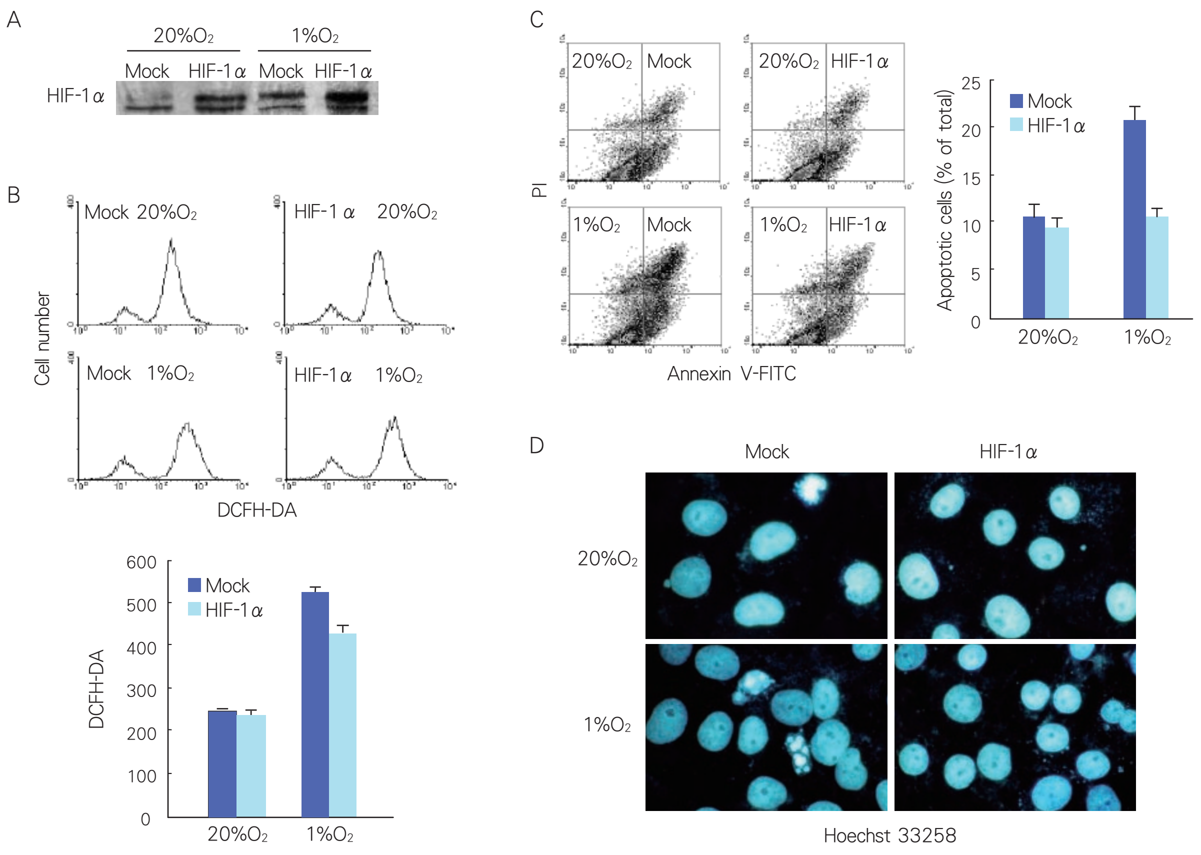


図5　低酸素によるOSC細胞のアポトーシス誘導に及ぼすHIF-1αの影響
コントロール（Mock）およびHIF-1α発現ベクター（HIF-1α）を導入したOSC-4細胞を20％O_2あるいは１％O_2の条件下で24時間培養したときのHIF-1α発現（A），細胞内活性酸素レベル（B），アポトーシス（C）およびDNA断片化（D）．

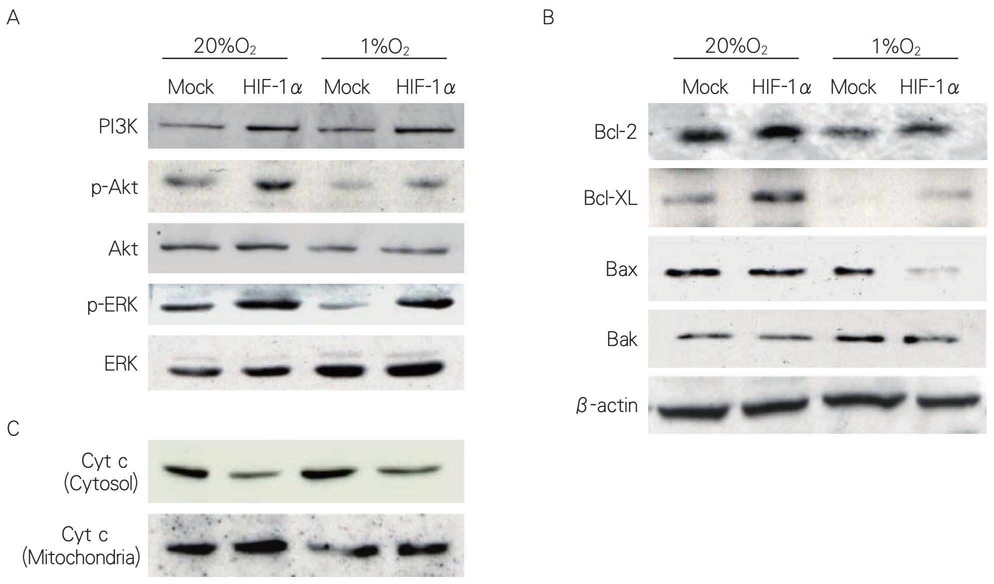


図6　OSC細胞における生存およびアポトーシスシグナルに及ぼす低酸素およびHIF-1αの影響
コントロール（Mock）およびHIF-1α発現ベクター（HIF-1α）を導入したOSC-4細胞を20%O_2あるいは1%O_2の条件下で24時間培養したときの各蛋白質の発現.

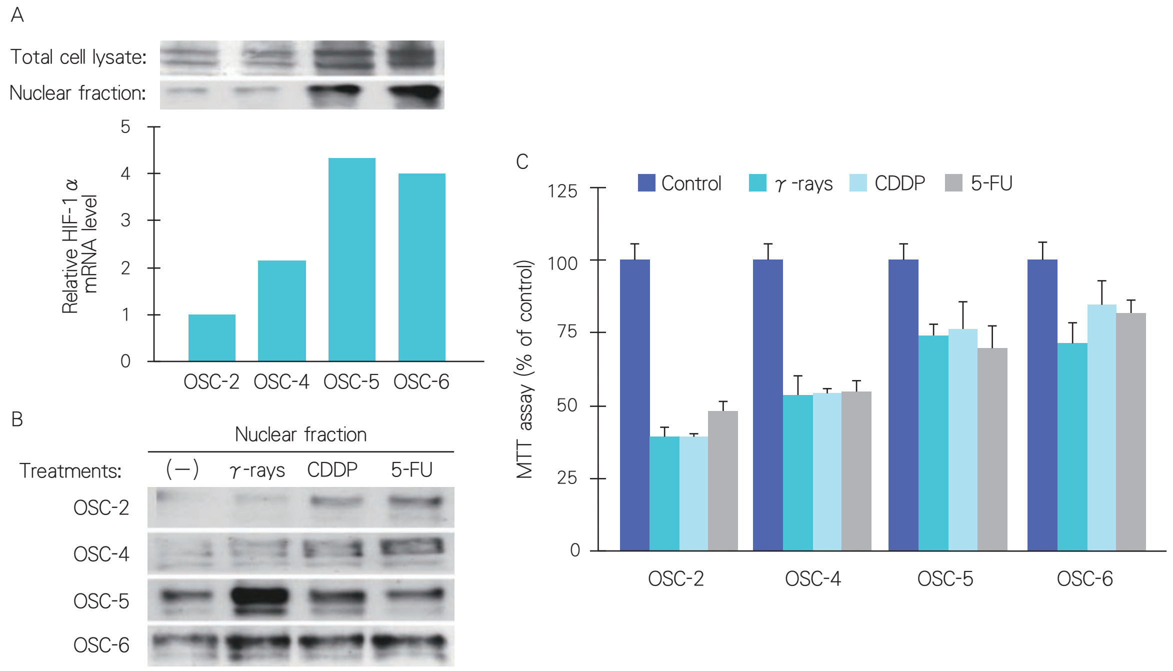


図7　OSC細胞におけるHIF-1αの発現と抗癌剤およびγ線に対する感受性
A：OSC-2，-4，-5および-6細胞におけるHIF-1αのmRNA（リアルタイムPCR）および蛋白質発現．B，C：各OSC細胞をγ線（30Gy）照射後24時間培養するか，あるいは，CDDP（100μM）ないしは5-FU（100μM）で24時間処理したときのHIF-1α発現（B）および細胞増殖（C）.

7．HIF-1αをターゲットとした分子標的治療

近年，EGF受容体やHER2蛋白質をはじめとした種々の分子に対する分子標的治療が開発され，実際，それらの中のいくつかは臨床使用されている．前述のように，多くの癌ではHIF-1αの発現は亢進しており，発現の亢進した癌は増殖能が活発で，化学・放射線療法に対しても抵抗性であることより，癌細胞におけるHIF-1αの活性を抑制することは腫瘍の増殖を抑制するだけではなく，化学・放射線治療に対する感受性を増強させることに繋がると考えられる．我々は，OSC細胞において抗癌剤およびγ線に低感受性のHIF-1α高発現株にHIF-1αのsiRNAを導入すると感受性が増強し，逆に，抗癌剤およびγ線に高感受性のHIF-1α低発現株にHIF-1α発現ベクターを導入すると感受性が低下することを確かめている（図８）．HIF-1α高発現OSC細胞の抗癌剤およびγ線に対する抵抗性の獲得には，HIF-1αの標的遺伝子であるMDR1，Heme oxygenase-1およびCeruloplasminが関わっており，MDR1遺伝子産物であるP糖蛋白質は抗癌剤の細胞外への排出を促進すること，抗酸化作用を有するHeme oxygenase-1およびCeruloplasminは抗癌剤やγ線による細胞死誘導に重要な活性酸素を消去することを明らかにしている（図９）．従って，HIF-1αに対するsiRNAはこれらの分子の発現を抑制することにより，OSC細胞の抗癌剤やγ線に対する感受性を増強しているものと考えられる．

HIF-1抑制作用を有する薬剤には多くのものがあり[77]，現在臨床使用されている分子標的薬であるTrastuzumab，Celebex，ImatinibなどにもHIF-1α抑制作用を有することが確認されている．それらに加え，HSP90抑制作用を有する17-allylamino，17-demethoxygeldanamycin(17AAG)およびエストロゲンの天然代謝産物である2-methoxyestradiol （2-ME2)もまたHIF-1α抑制作用を有し，現在，臨床試験が行われているところである．今後は，これらの薬剤と抗癌剤あるいは放射線との併用療法の効果が試され，口腔癌の治療成績の向上をもたらすものと期待される．しかしながら，HIF-1αのみをノックダウンしても代替経路としNF-κBを介したIL-8産生が誘導され，血管新生は抑制されないということが報告されており，いくつかの分子標的療法の併用といった方法をさらに検討すべきと考えられる．

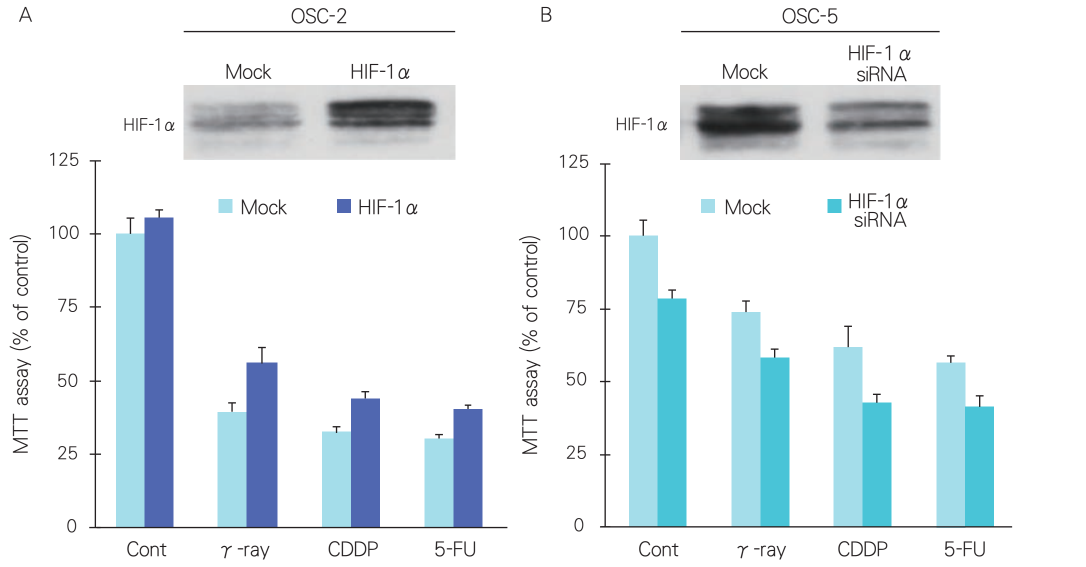


図8　HIF-1αノックダウンによるOSC細胞の抗癌剤およびγ線に対する感受性の増強
HIF-1α発現ベクターを導入したOSC-2およびHIF-1αに対するsiRNAを導入したOSC-5細胞のγ線（30Gy），CDDP（100μM）および5-FU（100μM）に対する感受性.

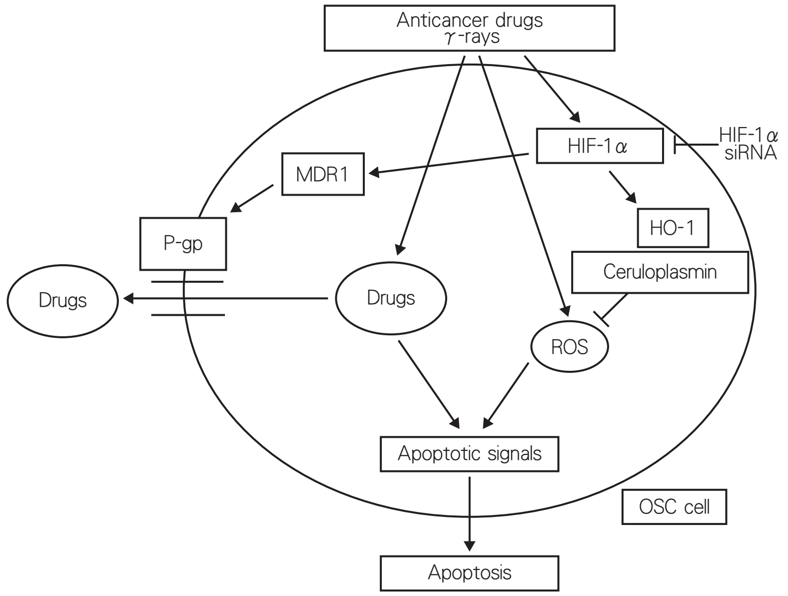


図9　OSC細胞の抗癌剤およびγ線に対する抵抗性獲得におけるHIF-1αの関与

8．おわりに

以上のように，HIF-1の発現制御機構は非常に複雑で，また，その標的遺伝子の機能も多岐に亘っており，HIF-1の役割は個々の細胞によって異なっていると考えられる．今後，個体発生のみならず様々な病態においてHIF-1の関わりが検討され，HIF-1を標的とした分子標的療法の開発が進むものと期待される．

《参考文献》

1）Sabbah HN, Sharov VG and Goldstein S: Cell death, tissue hypoxia and the progression of heart failure. Heart Fail Rev 5, 131-138 (2000)

2）Strange C and Highland KB: Pulmonary hypertension in interstitial lung disease. Curr Opin Pulm Med 11, 452-455 (2005)

3）Taylor PC and Sivakumar B: Hypoxia and angiogenesis in rheumatoid arthritis. Curr Opin Rheumatol 17, 293-298 (2005)

4）Freeman RS and Barone MC: Targeting hypoxia-inducible factor (HIF) as a therapeutic strategy for CNS disorders. Curr Drug Targets CNS Neurol Disord 4, 85-92 (2005)

5）Bacon AL and Harris AL: Hypoxia-inducible factors and hypoxic cell death in tumour physiology. Ann Med 36. 530-539 (2004)

6）Osaki T, Hirota J, Yoneda K, Yamamoto T and Ueta E: Distribution of surviving tumor cells after chemoradiotherapy in tongue and floor of mouth carcinomas. Head Neck 16, 218-226 (1994)

7）Zagorska A and Dulak J: HIF-1: the knowns and unknowns of hypoxia sensing. Acta Biochim Pol 51, 563-585 (2004)

8）Brahimi-Horn C, Mazure N and Pouyssegur J: Signalling via the hypoxia-inducible factor-1 α requires multiple posttranslational modifications. Cell Signal 17, 1-9 (2005)

9）Déry MA, Michaud MD and Richard DE: Hypoxia-inducible factor 1: regulation by hypoxic and non-hypoxic activators. Int J Biochem Cell Biol 37, 535-540 (2005)

10) Bardos JI and Ashcroft M: Negative and positive regulation of HIF-1: a complex network. Biochim Biophys Acta 1755, 107-120 (2005)

11) Wang GL and Semenza GL: Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1. J Biol Chem 270, 1230-1237 (1995)

12) Wang GL, Jiang BH, Rue EA and Semenza GL: Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O_2 tension. Proc Natl Acad Sci USA 92, 5510-5514 (1995)

13) Jiang BH, Rue E, Wang GL, Roe R and Semenza GL: Dimerization, DNA binding, and transactivation properties of hypoxia-inducible factor 1. J Biol Chem 271, 17771-17778 (1996)

14) Pugh CW, O' Rourke JF, Nagao M, Gleadle JM and Ratcliffe PJ: Activation of hypoxia-inducible factor-1; definition of regulatory domains within the α subunit. J Biol Chem 272, 11205-11214 (1997)

15) Jiang BH, Zheng JZ, Leung SW, Roe R and Semenza GL: Transactivation and inhibitory domains of hypoxia-inducible factor 1α. Modulation of transcriptional activity by oxygen tension. J Biol Chem 272, 19253-19260 (1997)

16) Huang LE, Gu J, Schau M and Bunn HF: Regulation of hypoxia-inducible factor 1α is mediated by an O_2-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway. Proc Natl Acad Sci USA 95, 7987-7992 (1998)

17) Wenger RH: Cellular adaptation to hypoxia: O_2-sensing protein hydroxylases, hypoxia-inducible transcription factors, and O_2-regulated gene expression. FASEB J 16, 1151-1162 (2002)

18) Semenza GL: Regulation of mammalian O_2 homeostasis by hypoxia-inducible factor 1. Annu Rev Cell Dev Biol 15, 551-578 (1999)

19) Wiesener MS, Turley H, Allen WE, Willam C, Eckardt KU, Talks KL, Wood SM, Gatter KC, Harris AL, Pugh CW, Ratcliffe PJ and Maxwell PH: Induction of endothelial PAS domain protein-1 by hypoxia: characterization and comparison with hypoxia-inducible factor-1α. Blood 92, 2260-2268 (1998)

20) Tian H, McKnight SL and Russell DW: Endothelial PAS domain protein 1 (EPAS1), a transcription factor selectively expressed in endothelial cells. Genes Dev 11, 72-82 (1997)

21) Hara S, Hamada J, Kobayashi C, Kondo Y and Imura N: Expression and characterization of hypoxia-inducible factor (HIF)-3α in human kidney: suppression of HIF-mediated gene expression by HIF-3α. Biochem Biophys Res Commun 287, 808-813 (2001)

22) Makino Y, Cao R, Svensson K, Bertilsson G, Asman M, Tanaka H, Cao Y, Berkenstam A and Poellinger L: Inhibitory PAS domain protein is a negative regulator of hypoxia-inducible gene expression. Nature 414, 550-554 (2001)

23) Gradin K, McGuire J, Wenger RH, Kvietikova I, fhitelaw ML, Toftgard R, Tora L, Gassmann M and Poellinger L: Functional interference between hypoxia and dioxin signal transduction pathways: competition for recruitment of the Arnt transcription factor. Mol Cell Biol 16, 5221-5231 (1996)

24) Kallio PJ, Pongratz I, Gradin K, McGuire J and Poellinger L: Activation of hypoxia-inducible factor 1α: posttranscriptional regulation and conformational change by recruitment of the Arnt transcription factor. Proc Natl Acad Sci USA 94, 5667-5672 (1997)

25) Huang LE, Arany Z, Livingston DM and Bunn HF: Activation of hypoxia-inducible transcription factor depends primarily upon redox-sensitive stabilization of its α subunit. J Biol Chem 271, 32253-32259 (1996)

26) Maxwell PH, Wiesener MS, Chang GW, Clifford SC, Vaux EC, Cockman ME, Wykoff CC, Pugh CW, Maher ER and Ratcliffe PJ: The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. Nature 20, 271-275 (1999)

27) Jaakkola P, Mole DR, Tian YM, Wilson MI, Gielbert J, Gaskell SJ, von Kriegsheim A, Hebestreit HF, Mukherji M, Schofield CJ, Maxwell PH, Pugh CW and Ratcliffe PJ: Targeting of HIF-α to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O_2-regulated prolyl hydroxylation. Science 292, 468-472 (2001)

28) Masson N and Ratcliffe PJ: HIF prolyl and asparaginyl hydroxylases in the biological response to intracellular O_2 levels. J Cell Sci 116, 3041-3049 (2003)

29) Lando D, Gorman JJ, Whitelaw ML and Peet DJ: Oxygen-dependent regulation of hypoxia-inducible factors by prolyl and asparaginyl hydroxylation. Eur J Biochem 270, 781-790 (2003)

30) Lando D, Peet DJ, Gorman JJ, Whelan DA, Whitelaw ML and Bruick RK: FIH-1 is an asparaginyl hydroxylase enzyme that regulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor. Genes Dev 16, 1466-1471 (2002)

31) Metzen E, Berchner-Pfannschmidt U, Stengel P, Marxsen JH, Stolze I, Klinger M, Huang WQ, Wotzlaw C, Hellwig-Burgel T, Jelkmann W, Acker H and Fandrey J: Intracellular localisation of human HIF-1α hydroxylases: implications for oxygen sensing. J Cell Sci 116, 1319-1326 (2003)

32) Linke S, Stojkoski C, Kewley RJ, Booker GW, Whitelaw ML and Peet DJ: Substrate requirements of the oxygen-sensing asparaginyl hydroxylase factor-inhibiting hypoxia-inducible factor. J Biol Chem 279, 4391-14397 (2004)

33) Jeong JW, Bae MK, Ahn MY, Kim SH, Sohn TK, Bae MH, Yoo MA, Song EJ, Lee KJ and Kim KW: Regulation and destabilization of HIF-1α by ARD1-mediated acetylation. Cell 111, 709-720 (2002)

34) Richard DE, Berra E, Gothie E, Roux D and Pouyssegur J: p42/p44 mitogen-activated protein kinases phosphorylate hypoxia-inducible factor 1α (HIF-1α) and enhance the transcriptional activity of HIF-1. J Biol Chem 274, 32631-32637 (1999)

35) Lee E, Yim S, Lee SK and Park H: Two transactivation domains of hypoxia-inducible factor-1α regulated by the MEK-1/p42/p44 MAPK pathway. Mol Cells 14, 9-15 (2002)

36) Sodhi A, Montaner S, Patel V, Zohar M, Bais C, Mesri EA and Gutkind JS: The Kaposi´s sarcoma-associated herpes virus G protein-coupled receptor up-regulates vascular endothelial growth factor expression and secretion through mitogen-activated protein kinase and p38 pathways acting on hypoxia-inducible factor 1α. Cancer Res 60, 4873-4880 (2000)

37) Kwon SJ, Song JJ and Lee YJ: Signal pathway of hypoxia-inducible factor-1α phosphorylation and its interaction with von Hippel-Lindau tumor suppressor protein during ischemia in MiaPaCa-2 pancreatic cancer cells. Clin Cancer Res 11, 7607-7613 (2005)

38) Yasinska IM and Sumbayev VV: S-nitrosation of Cys-800 of HIF-1α protein activates its interaction with p300 and stimulates its transcriptional activity. FEBS Lett 549, 105-109 (2003)

39) Melchior F, Schergaut M and Pichler A: SUMO: ligases, isopeptidases and nuclear pores. Trends Biochem Sci 28, 612-618 (2003)

40) Seeler JS and Dejean A: Nuclear and unclear functions of SUMO. Nat Rev Mol Cell Biol 4, 690-699 (2003)

41) Tojo M, Matsuzaki K, Minami T, Honda Y, Yasuda H, Chiba T, Saya H, Fujii-Kuriyama Y and Nakao M: The aryl hydrocarbon receptor nuclear transporter is modulated by the SUMO-1 conjugation system. J Biol Chem 277, 46576-46585 (2002)

42) Bae SH, Jeong JW, Park JA, Kim SH, Bae MK, Choi SJ and Kim KW. Sumoylation increases HIF-1α stability and its transcriptional activity. Biochem Biophys Res Commun 324, 394-400 (2004)

43) Semenza G: Signal transduction to hypoxia-inducible factor 1. Biochem Pharmacol 64, 993-998 (2002)

44) Minet E, Michel G, Mottet D, Raes M and Michiels C: Transduction pathways involved in hypoxia-inducible factor-1 phosphorylation and activation. Free Radic Biol Med 31, 847-855 (2001)

45) Hudson CC, Liu M, Chiang GG, Otterness DM, Loomis DC, Kaper F, Giaccia AJ and Abraham RT: Regulation of hypoxia-inducible factor 1α expression and function by the mammalian target of rapamycin. Mol Cell Biol 22, 7004-7014 (2002)

46) Mayerhofer M, Valent P, Sperr WR, Griffin JD and Sillaber C: BCR/ABL induces expression of vascular endothelial growth factor and its transcriptional activator, hypoxia inducible factor-1α, through a pathway involving phosphoinositide 3-kinase and the mammalian target of rapamycin. Blood 100, 3767-3775 (2002)

47) Katschinski DM, Le L, Schindler SG, Thomas T, Voss AK and Wenger RH: Interaction of the PAS B domain with HSP90 accelerates hypoxia-inducible factor-1α stabilization. Cell Physiol Biochem 14, 351-360 (2004)

48) Isaacs JS, Jung YJ and Neckers L: Aryl hydrocarbon nuclear translocator (ARNT) promotes oxygen-independent stabilization of hypoxia-inducible factor-1α by modulating an Hsp90-dependent regulatory pathway. J Biol Chem 279, 16128-16135 (2004)

49) Chandel NS, McClintock DS, Feliciano CE, Wood TM, Melendez JA, Rodriguez AM and Schumacker PT: Reactive oxygen species generated at mitochondrial complex III stabilize hypoxia-inducible factor-1α during hypoxia: a mechanism of O_2 sensing. J Biol Chem 275, 25130-25138 (2000)

50) Goyal P, Weissmann N, Grimminger F, Hegel C, Bader L, Rose F, Fink L, Ghofrani HA, Schermuly RT, Schmidt HH, Seeger W and Hanze J: Upregulation of NAD(P)H oxidase 1 in hypoxia activates hypoxia-inducible factor 1 via increase in reactive oxygen species. Free Radic Biol Med 36, 1279-1288 (2004)

51) Chandel NS, Maltepe E, Goldwasser E, Mathieu CE, Simon MC and Schumacker PT: Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-induced transcription. Proc Natl Acad Sci USA 95, 11715-11720 (1998)

52) Welsh SJ, Bellamy WT, Briehl MM and Powis G: The redox protein thioredoxin-1 (Trx-1) increases hypoxia-inducible factor 1α protein expression: Trx-1 overexpression results in increased vascular endothelial growth factor production and enhanced tumor angiogenesis. Cancer Res 62, 5089-5095 (2002)

53) Ema M, Hirota K, Mimura J, Abe H, Yodoi J, Sogawa K, Poellinger L and Fujii-Kuriyama Y: Molecular mechanisms of transcription activation by HLF and HIF1α in response to hypoxia: their stabilization and redox signal-induced interaction with CBP/p300. EMBO J 18, 1905-1914 (1999)

54) Bhattacharya S, Michels CL, Leung MK, Arany ZP, Kung AL and Livingston DM: Functional role of p35srj, a novel p300/CBP binding protein, during transactivation by HIF-1. Genes Dev 13, 64-75 (1999)

55) Braganca J, Eloranta JJ, Bamforth SD, Ibbitt JC, Hurst HC and Bhattacharya S: Physical and functional interactions among AP-2 transcription factors, p300/CREB-binding protein, and CITED2. J Biol Chem 278, 16021-16029 (2003)

56) Mottet D, Dumont V, Deccache Y, Demazy C, Ninane N, Raes M and Michiels C: Regulation of hypoxia-inducible factor-1α protein level during hypoxic conditions by the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/glycogen synthase kinase 3β pathway in HepG2 cells. J Biol Chem 278, 31277-31285 (2003)

57) Tang TT and Lasky LA: The forkhead transcription factor FOXO4 induces the down-regulation of hypoxia-inducible factor 1α by a von Hippel-Lindau protein-independent mechanism. J Biol Chem 278,30125-30135 (2003)

58) An WG, Kanekal M, Simon MC, Maltepe E, Blagosklonny MV and Neckers LM: Stabilization of wild-type p53 by hypoxia-inducible factor 1α. Nature 392, 405-408 (1998)

59) Blagosklonny MV, An WG, Romanova LY, Trepel J, Fojo T and Neckers L: p53 inhibits hypoxia-inducible factor-stimulated transcription. J Biol Chem 273, 11995-11998 (1998)

60) Ravi R, Mookerjee B, Bhujwalla ZM, Sutter CH, Artemov D, Zeng Q, Dillehay LE, Madan A, Semenza GL and Bedi A: Regulation of tumor angiogenesis by p53-induced degradation of hypoxia-inducible factor 1α. Genes Dev 14, 34-44 (2000)

61) Fatyol K and Szalay AA: The p14ARF tumor suppressor protein facilitates nucleolar sequestration of hypoxia-inducible factor-1α (HIF-1α) and inhibits HIF-1-mediated transcription. J Biol Chem 276, 28421-28429 (2001)

62) Guillemin K and Krasnow MA: The hypoxic response: huffing and HIFing. Cell 89, 9-12 (1997)

63) Semenza GL: Hydroxylation of HIF-1: Oxygensensing at the molecular level. Physiology 19, 176-182 (2004)

64) Yeo EJ, Chun YS and Park JW: New anticancer strategies targeting HIF-1. Biochem Pharmacol 68, 1061-1069 (2004)

65) Nagaoka R, Okuhara S, Sato Y, Amagasa T, Iseki S: Effects of embryonic hypoxia on lip formation. Birth Defects Res A Clin Mol Teratol 94:215-22 (2012)

66) Kim YS, Shin SI, Kang KL, Chung JH, Herr Y, Bae WJ, Kim EC: Nicotine and lipopolysaccharide stimulate the production of MMPs and prostaglandin E(2) by hypoxia-inducible factor-1α up-regulation in human periodontal ligament cells. J Periodontal Res May 9 (2012) doi: 10.1111/j.1600-0765.2012.01487.x. [Epub ahead of print]

67) Agis H, Watzek G, Gruber R: Prolyl hydroxylase inhibitors increase the production of vascular endothelial growth factor by periodontal fibroblasts. J Periodontal Res 47:165-73 (2012)

68) Song ZC, Zhou W, Shu R, Ni J: Hypoxia induces apoptosis and autophagic cell death in human periodontal ligament cells through HIF-1α pathway. Cell Prolif 45:239-48 (2012)

69) Li L, Zhu YQ, Jiang L, Peng W, Ritchie HH: Hypoxia promotes mineralization of human dental pulp cells. J Endod 37:799-802 (2011)

70) Zou D, He J, Zhang K, Dai J, Zhang W, Wang S, Zhou J, Huang Y, Zhang Z, Jiang X: The bone-forming effects of HIF-1α-transduced BMSCs promote osseointegration with dental implant in canine mandible. PLoS ONE 7:e32355 (2012)

71) Aebersold DM, Burri P, Beer KT, Laissue J, Djonov V, Greiner RH and Semenza GL: Expression of hypoxia-inducible factor-1α: a novel predictive and prognostic parameter in the radiotherapy of oropharyngeal cancer. Cancer Res 61, 2911-2916 (2001)

72) Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Sivridis E, Simopoulos C, Turley H, Talks K, Gatter KC and Harris AL: Hypoxia-inducible factor (HIF1A and HIF2A), angiogenesis, and chemoradiotherapy outcome of squamous cell head-and-neck cancer. Int J Radiat Oncol Biol Phys 53, 1192-1202 (2002)

73) Beasley NJ, Leek R, Alam M, Turley H, Cox GJ, Gatter K, Millard P, Fuggle S and Harris AL: Hypoxia-inducible factors HIF-1α and HIF-2α in head and neck cancer: Relationship to tumor biology and treatment outcome in surgically resected patients. Cancer Res 62, 2493-2497 (2002)

74) Kyzas PA, Stefanou D, Batistatou A and Agnantis NJ: Hypoxia-induced tumor angiogenic pathway in head and neck cancer: an in vivo study. Cancer Lett 225, 297-304 (2005)

75) Sasabe E, Tatemoto Y, Li D, Yamamoto T and Osaki T: Mechanism of HIF-1α-dependent suppression of hypoxia-induced apoptosis in squamous cell carcinoma cells. Cancer Sci 96, 394-402 (2005)

76) Yamamoto T, Yoneda K, Ueta E, Doi S and Osaki T: Enhanced apoptosis of squamous cell carcinoma cells by interleukin-2-activated cytotoxic lymphocytes combined with radiation and anticancer drugs. Eur J Cancer 36, 2007-2017 (2000)

77) Powis G and Kirkpatrick L: Hypoxia inducible factor-1alpha as a cancer drug target. Mol Cancer Ther 3, 647-354 (2004)

《オーラルサイエンスレポート　既刊》

Vol.1 歯科口腔外科とビスフォスフォネート製剤（2010年8月）
Vol.2 活性酸素 ーその生成，消去および作用ー（2011年4月）
Vol.3 低酸素の世界（2012年7月）

編集者 安楽 照男
発行者 山本 隆彦
印刷所 小西印刷所
発行年月日 2012年7月31日

YAMAKIN株式会社

本　　　社：〒543-0015 大阪市天王寺区真田山町3番7号　TEL.(06)6761-4739(代)　FAX.(06)6761-4743
生体科学安全研究室：〒783-8505 高知県南国市岡豊町小蓮 高知大学医学部 歯科口腔外科学講座研究室内
東京・大阪・名古屋・福岡・仙台・高知・生体科学安全研究室
http://www.yamakin-gold.co.jp

ISO 9001/13485 ISO 14001 認証取得

認証範囲
本社及び高知工場

QAIC/JP/0455
認証範囲：高知工場

営本20120731
20170707W