

博士論文

論文題目 低酸素環境が大腸癌細胞の抗癌剤感受性に及ぼす影響に関する検討

氏 名 室野 浩司

目次

・ 要旨	2
・ 序文	3
・ 本文	7
1 背景と目的	7
2 実験方法	13
3 実験結果	23
4 考察	36
5 まとめ	43
6 謝辞	44
7 引用文献	45

要旨

腫瘍中心部は血流が不十分で低酸素状態にあり、低酸素環境において癌細胞は抗癌剤耐性を獲得することが知られている。今回、低酸素下における大腸癌細胞の耐性獲得の機序について検討した。大腸癌細胞株 (HT29, SW480) を低酸素下で培養すると、正常酸素下と比較して、5-FU やオキサリプラチンに対する効果が減弱されたが、イリノテカンの活性型代謝産物である SN38 の効果は、正常酸素下とほぼ同様であった。低酸素下において Hypoxia inducible factor (HIF)-1 α の誘導が確認されたが、SN38 を投与した場合、HIF-1 α の発現が抑制されており、HIF-1 α は低酸素下での治療耐性獲得に重要な役割を果たしている可能性が考えられた。

序文

【低酸素と癌細胞について】

固形腫瘍の増殖・進展において、癌細胞に酸素・栄養素を供給するための血流の確保が必要不可欠であり、腫瘍組織で様々な血管新生誘導因子が産生され、新生血管が発達する。しかし、一般に新生血管は管腔構造が未熟であり腫瘍血管から新鮮な酸素を十分に供給できる距離は血管壁から 100～150 μm 以内に限られること、また腫瘍の増大に伴い腫瘍新生血管の発達は不十分となることが多いことから、固形腫瘍の内部は安定した血流が得られず、慢性的な低酸素状態に陥っていることが知られている。臓器により差があるものの、実際に多くの固形腫瘍の中心部は酸素分圧の中央値が 10 mmHg 以下であり、40～60 mmHg である正常組織と比較し、明らかに低酸素状態であることが確認されている¹⁾。

低酸素環境下に置かれた細胞は Hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α を高発現することが知られている。HIF-1 α は HIF-1 β と二量体を形成し、核内に移行して様々な遺伝子の転写因子として作用し、血管新生の促進や治療抵抗性の獲得、浸潤能・転移能の亢進といった多様な機

能や特性を獲得することが報告されている^{2 3}。治療抵抗性獲得の機序として、具体的には、**Bid, Bax** などのアポトーシス誘導タンパクの抑制による抗アポトーシス活性の獲得^{4 5 6 7}、細胞周期の停止^{8 9 10 11}、解糖系亢進によるエネルギー代謝の変化やそれに伴う周囲の pH 低下等^{12 13 14 15 16}が寄与していると考えられている。

低酸素環境における大腸癌の5-FUやオキサリプラチンに対する治療抵抗性獲得については既に知られており^{5 17}、その原因としてアポトーシス誘導タンパクの抑制が報告されている⁴。しかし、大腸癌治療に用いられる各抗癌剤の効果を、正常酸素および低酸素環境で比較検討した報告はない。また、大腸癌の治療抵抗性のメカニズムとして細胞周期停止に注目した報告も認められない。さらに、抗癌剤がHIF-1 α 発現に及ぼす影響についても未だ不明な点が多い。

大腸癌治療において、5-fluorouracil (FU) が最も一般的に用いられている抗癌剤であるが、近年では、5-FUとオキサリプラチン (FOLFOX) またはイリノテカン (FOLFIRI) を併用した治療プロトコールが使用されている。これらの治療プロトコールを選択する上で、腫瘍内部の低酸素状態を評価し、低酸素により誘導される治療抵抗性を克服し得る薬剤の選定は重要

な課題である。そこで、本研究では、上記大腸癌に対する治療薬として、実際の臨床において主要な抗癌剤を用いて、正常酸素 (normoxia) および低酸素 (hypoxia) 環境下で抗腫瘍効果について検討し、hypoxiaにおける治療抵抗性のメカニズムを明らかにすると同時に、腫瘍内部がhypoxia環境にあると考えられる腫瘍に対する治療効果増強を得るための対策について講じることを目的とした。

【本研究に至った経緯】

上記のとおり、固形腫瘍である大腸癌は、増殖する過程で十分な血管新生の発達が伴わず、中心部が低酸素状態に陥ることが多く、また、抗癌剤への治療抵抗性を示すことも多い。そこで、本研究では、2種類のヒト大腸癌細胞株 (HT29, SW480) を用い、大腸癌治療に一般的に用いられる5-FU、オキサリプラチン、およびイリノテカン (本研究においてはイリノテカンの活性型代謝産物であるSN-38を使用した) の抗腫瘍効果について、低酸素環境で検討し、正常酸素 (normoxia) における効果と比較することにした。それによって、低酸素下における抗癌剤抵抗性の機序を明らかにし、低酸素下における抗癌剤治療効果増強のための対策を講じることができると考えた。

低酸素環境が大腸癌細胞の抗癌剤感受性に 及ぼす影響に関する検討

1. 背景と目的

大腸癌は、欧米のみならず日本においても罹患率、死亡率の高い疾患である。大腸癌の治療としては、根治的な外科的切除が第一選択であるが、遠隔転移や局所再発などを伴う進行大腸癌症例に対しては、化学療法や放射線療法を組み合わせた集学的治療が行われている。

しかし、切除不能な進行再発大腸癌の生存期間は中央値 24 カ月と短く^{18 19}、現状では十分な治療成績が得られていない。治療効果が限定される要因として、癌細胞における治療抵抗性の獲得が挙げられる。したがって、この治療抵抗性のメカニズムを解明し、効率よく制御することにより、化学療法の効果を持続・増強することができ、大腸癌患者の予後改善が期待できるものと考えられる。

治療抵抗性のメカニズムの一つとして低酸素環境による癌細胞の性質変化が注目されてい

る²。癌細胞の増殖速度は正常細胞に比べて著しく速く、癌細胞に酸素・栄養素を供給するための血管新生の誘導が不可欠であるが、一定以上に腫瘍が増大すると、新生血管の形成が相対的に不十分となり、低酸素状態に陥ることが解っている^{1 20 21 22}。低酸素環境下にある細胞は、化学療法や放射線照射に対する治療抵抗性を獲得することが知られていたが、近年、そのメカニズムとして Hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α の高発現が注目されている³。HIF-1 α は酸素濃度に関わらず PI3 キナーゼ-AKT 経路や MAP キナーゼ経路により産生されるが、正常酸素分圧下ではプロリン残基がヒドロキシル化され、pVHL が認識することでユビキチン化され速やかに分解される (図 1)²。低酸素環境下ではプロリン残基がヒドロキシル化されず、HIF-1 α の分解が抑制されるため高発現となる。HIF-1 α は HIF-1 β と二量体を形成して核内に移行し、遺伝子の hypoxia response element (HRE) に結合することで、転写因子として機能することが知られている²³。具体的には、Bid, Bax などのアポトーシス誘導タンパクの抑制による抗アポトーシス活性の獲得^{4 5 6 7}、Cyclin D1 抑制による G0/G1 期における細胞周期の停止^{8 9 10 11} など多岐にわたるが、大きく分類すると抗アポトーシス活性の獲得、エネルギー代謝の変化、血管新生の促進、浸潤能、転移能の獲得に分類され、抗癌剤や放射性治療

から逃れ他臓器へ浸潤・転移し増殖する原因と考えられている^{2 24 25}。

実際に臨床検体を用いた研究においても様々な癌腫において HIF-1 α の高発現は血管新生や浸潤・転移に関与していると報告されている²⁶。HIF-1 α を抑制する治療薬の開発研究が進められているが、現在のところ臨床応用可能な薬剤は存在しない^{26 27 28}。一方で、COX-2 阻害薬^{29 30} や白血病の治療薬として用いられるイマチニブ³¹ のように一般に使用されてきた薬剤の中にも HIF-1 α を抑制する効果を有することが確認された薬剤があり、将来的な臨床応用が期待されている。

大腸癌においても HIF-1 α 高発現は治療抵抗性・浸潤・転移に関与し、予後不良となる危険因子の一つであることが報告されている^{32 33 34 35}。低酸素環境において、大腸癌細胞は HIF-1 α を高発現し、アポトーシス誘導タンパクが抑制され、その結果、治療抵抗性や⁴ 浸潤・転移能を獲得することが報告されている³⁶。しかし、大腸癌治療に用いられる抗癌剤が HIF-1 α 発現に及ぼす影響に関する報告は存在せず、それぞれの抗癌剤の効果が低酸素環境下で異なるかについては不明である。また、低酸素環境下における大腸癌の治療抵抗性の機序に細胞周期分布への影響が関与するかについても十分に解明されていない。さらに、大腸癌治療薬

として最も広く用いられる 5-fluorouracil (5-FU) に対する治療抵抗性には thymidylate synthase (TS), dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) 活性が重要であり (図 2)、5-FU の target となる TS や分解酵素である DPD 活性の高い腫瘍においては効果が減弱することが知られている。

しかし、これらの酵素活性が低酸素下でどのように変化するかについても報告されていない。

そこで、本研究では、まず、1%酸素濃度で大腸癌細胞 (HT29, SW480) を培養し、その大腸癌細胞にもたらす増殖能への影響を検討した。次に、大腸癌の治療薬として一般的に使用される薬剤である 5-fluorouracil (5-FU)、オキサリプラチン、イリノテカンの活性型代謝産物 SN-38 を用いて、それぞれの抗癌剤の効果が低酸素環境下においてどのような影響を受けるか、HIF-1 α の発現にどのような影響を与えるか、そして、どのようなメカニズムが関与しているかについて検討を加えることとした。それによって、現在、大腸癌治療プロトコールとして用いられている FOLFOX (5-FU とオキサリプラチンの併用) および FOLFIRI (5-FU とイリノテカンの併用) の効果を予測し、優先すべき治療法の選択に役立てることを目指したいと考えた。

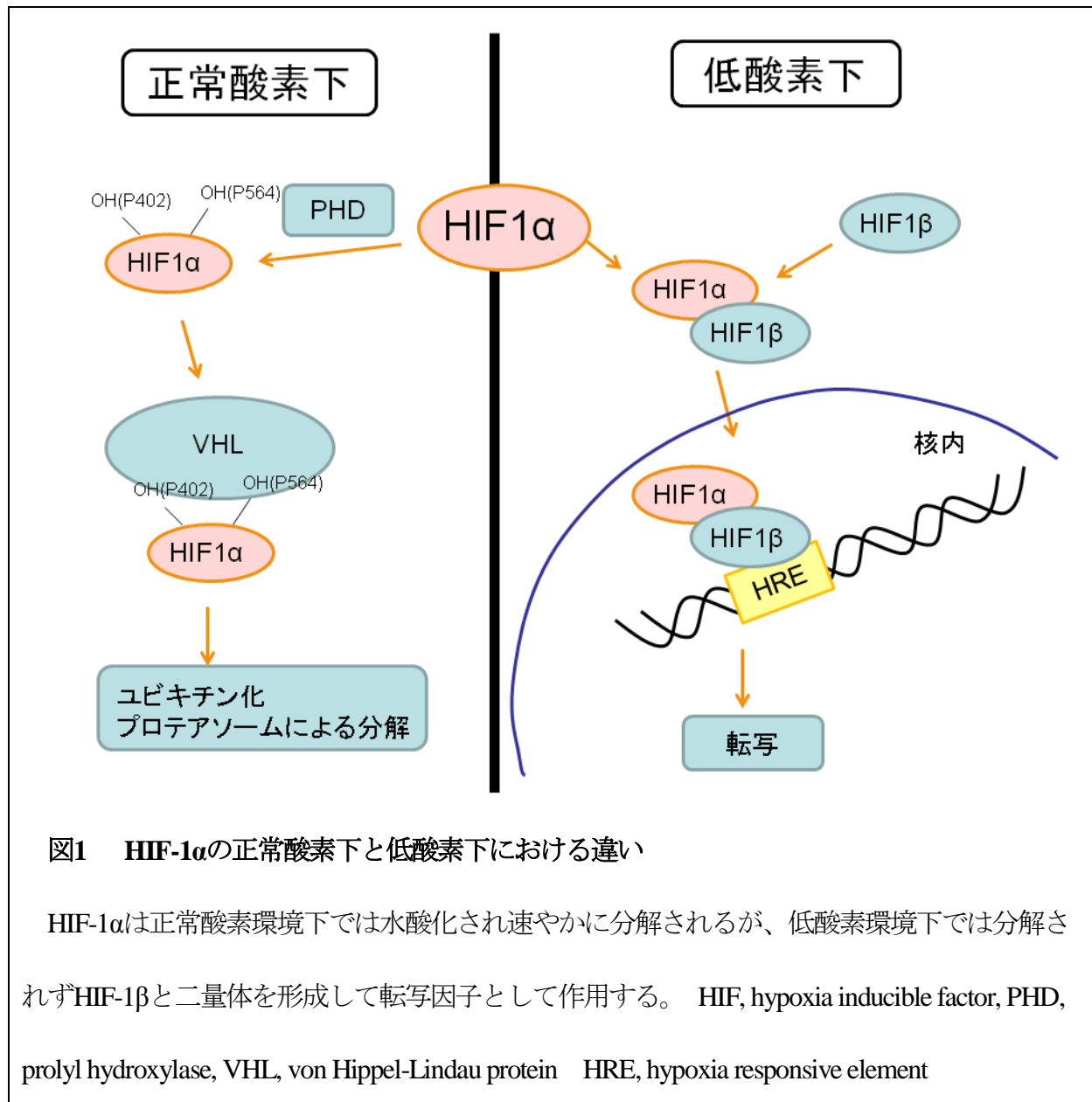


図1 HIF-1αの正常酸素下と低酸素下における違い

HIF-1αは正常酸素環境下では水酸化され速やかに分解されるが、低酸素環境下では分解されずHIF-1βと二量体を形成して転写因子として作用する。 HIF, hypoxia inducible factor, PHD, prolyl hydroxylase, VHL, von Hippel-Lindau protein HRE, hypoxia responsive element

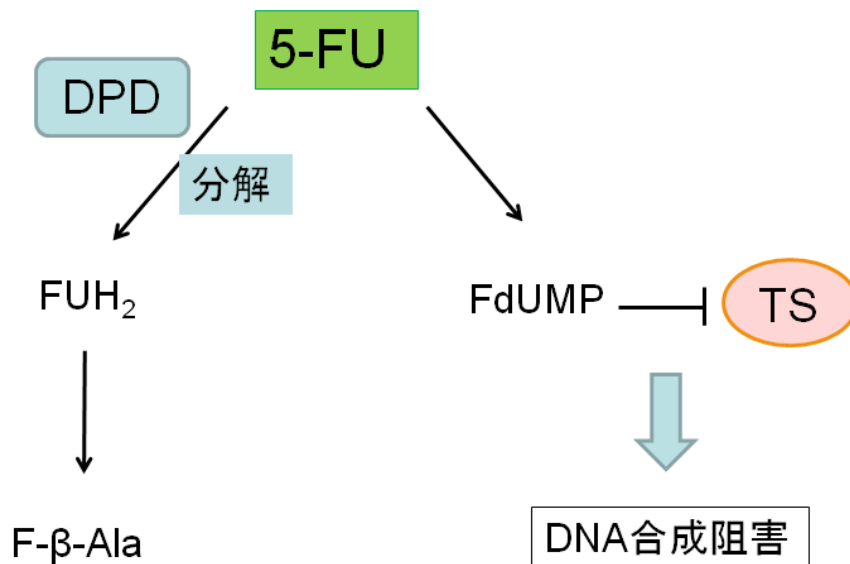


図2 5-FUの作用機序と代謝経路

5-FUはTSを阻害することでDNA合成阻害し、効果を発揮する。一方でDPDにより分解され、代謝される。そのため、TSやDPD活性の高い腫瘍においては5-FUの効果が減弱される。

5-FU, 5-fluorouracil, DPD, dihydropyrimidine dehydrogenase, TS, thymidylate synthase,

FdUMP, fluorodeoxyuridylate, F-β-Ala, α-fluoro-β-alanine

2. 実験方法

2.1 細胞株と抗癌剤

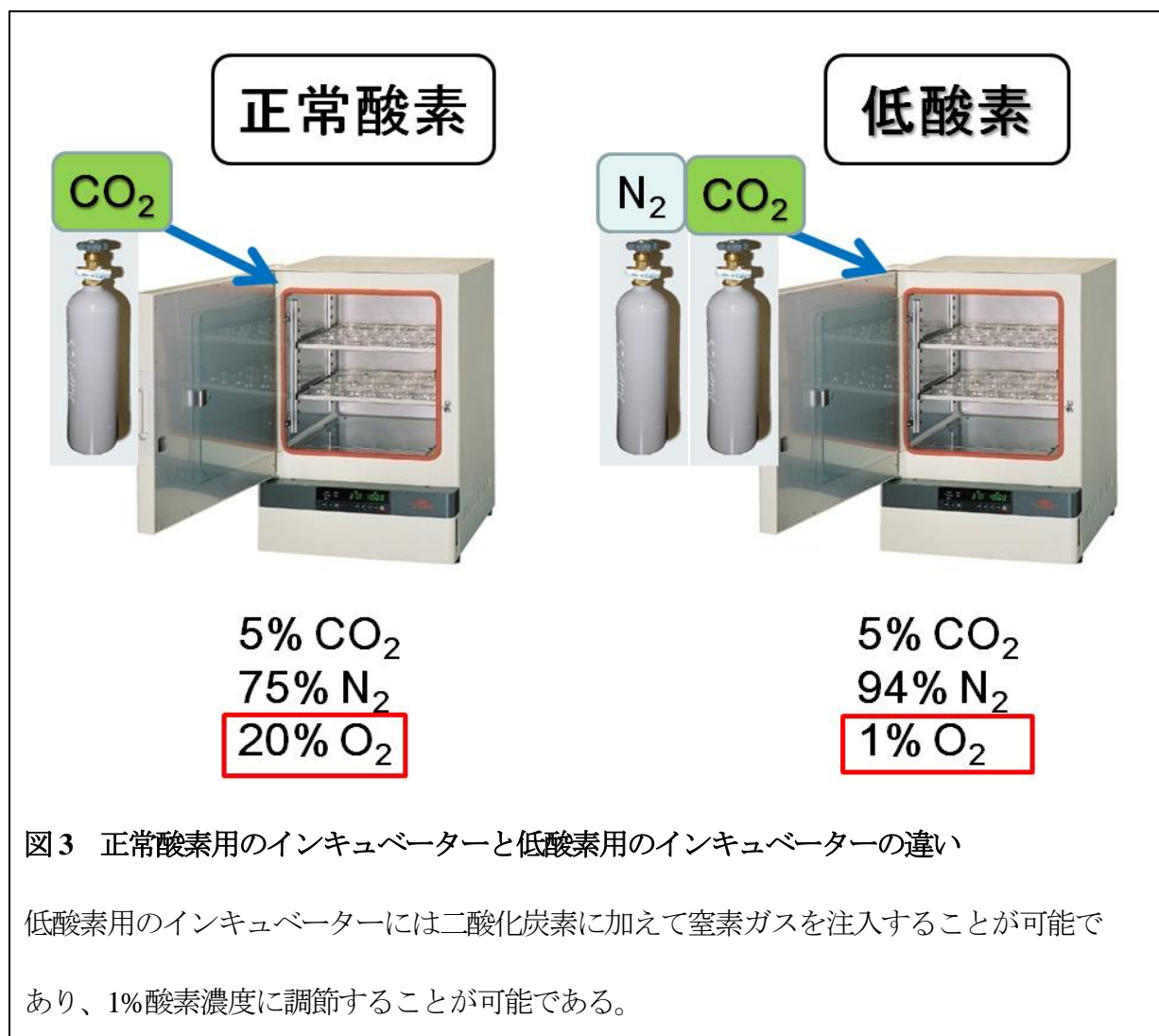
ヒト大腸癌細胞株である HT29, SW480 を Japanese Cancer Research Resource Bank (JCRRB) より購入した。HT29 は、44 歳の白人人種女性の大腸癌 (腺癌) 由来の細胞株で p53 は mutant (exon 8 codon273 (R→H))、SW480 は、50 歳の白人人種男性の大腸癌 (Dukes' B、腺癌) 由来の細胞で p53 は mutant (exon8 codon273 (R→H), exon9 codon309 (P→S))である。

抗癌剤は大腸癌治療薬として実臨床で広く使用されている薬剤である 5-fluorouracil (5-FU、分子式; $C_4H_3FN_2O_2$)、オキサリプラチン (oxaliplatin、分子式; $C_8H_{14}N_2O_4Pt$)、SN38 (分子式; $C_{22}H_{20}N_2O_5$) を使用した。5-fluorouracil はピリミジン系代謝拮抗剤、オキサリプラチンはプラチナ製剤であり Sigma Aldrich (St Louis, MO, USA) より購入した。SN38 はトポイソメラーゼ I 阻害薬であるイリノテカン (irinotecan、分子式; $C_{33}H_{38}N_4O_6$) の代謝産物であり Toronto Research Chemicals (North York, Ontario, Canada) より購入した。

2.2 培養方法と低酸素環境

5%胎児ウシ血清 (Fetal calf serum, FCS) 添加RPMI1640培養液 (Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA) に抗菌剤/抗真菌剤 (100 U/ml penicillin G, 100 µg/ml streptomycin sulfate, 250 ng/ml amphotericin B; Life Technologies, Grand Island, NY, USA) を加えた培地 (以後 5%FCS/RPMI と記載) にて 37°Cにて培養し実験を行った。

低酸素環境の作製には、図 3 に示すマルチガスインキュベーター (BIOLABO Multigas Incubator; JUJI FIELD, Japan) を用いた。通常のインキュベーターでは二酸化炭素ガスを用いて 20%酸素、5%二酸化炭素、75%窒素濃度になるように調節するのに対し、マルチガスインキュベーターは窒素ガスを用いて酸素濃度調節を行うことが可能であり、今回は 1% 酸素、5%二酸化炭素、94%窒素濃度となるように調整を行い、培養、実験を行った。



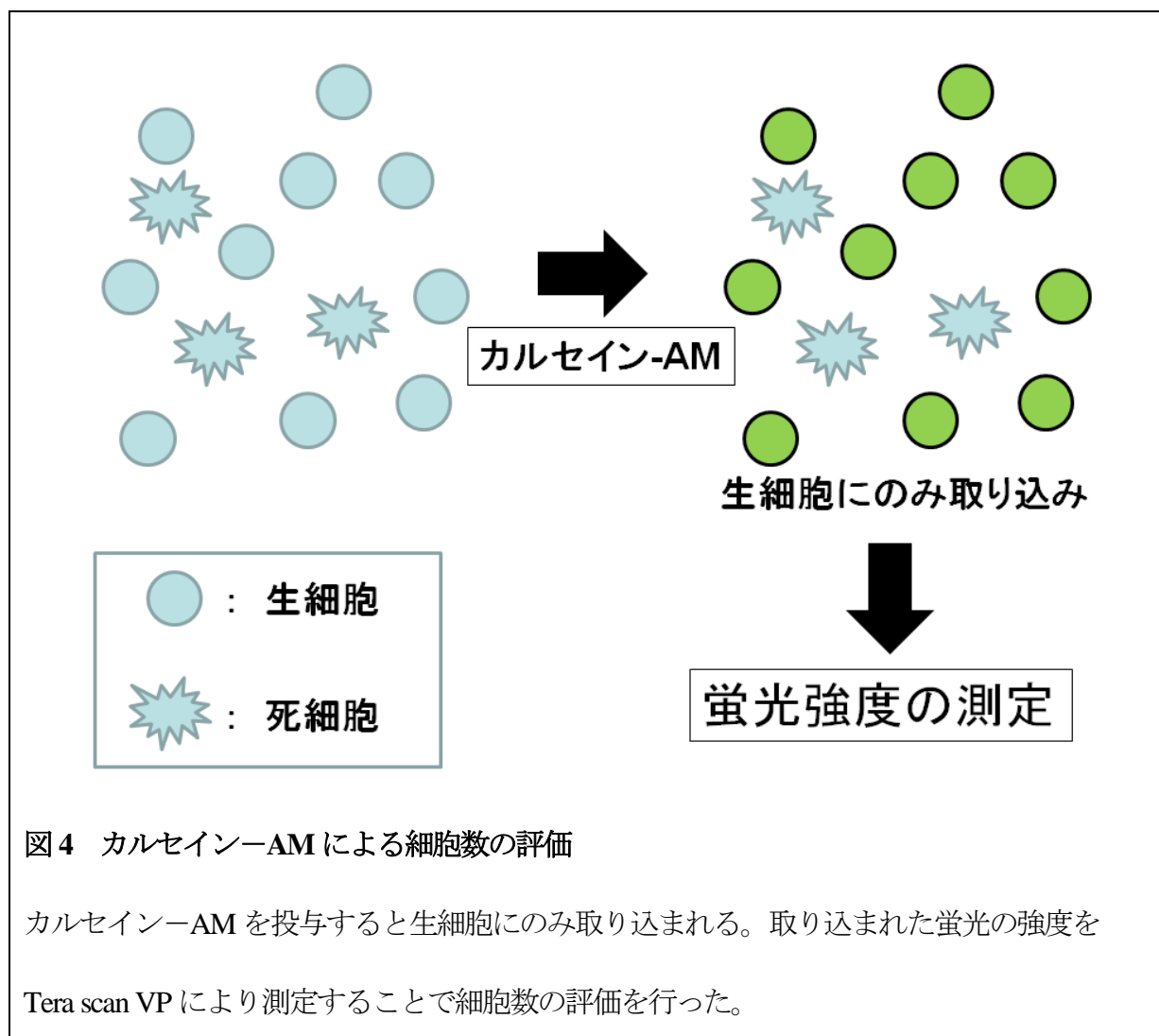
2.3 低酸素環境が細胞増殖に及ぼす影響の検討

細胞増殖能については、Trypan blue 染色した細胞数を計測して評価した。複数の 6-well flat-bottomed plates に 2×10^5 個/ well の大腸癌細胞株 (HT29, SW480) を分注し、それぞれを 24 時間 正常酸素下にて培養した後に、正常酸素下・低酸素下において 24 時間、48 時間、72 時間培養し、Trypan Blue (Gibco, Grand Island, NY, USA) にて染色後、生細胞数を光学顕微鏡

で計測した。これらはすべて Triplicate (3 wells) で行い、正常酸素下・低酸素下での培養開始時の細胞数をコントロールとし、コントロールに対する比率として平均値および標準偏差を提示した。

2.4 抗癌剤が細胞増殖に及ぼす影響の検討

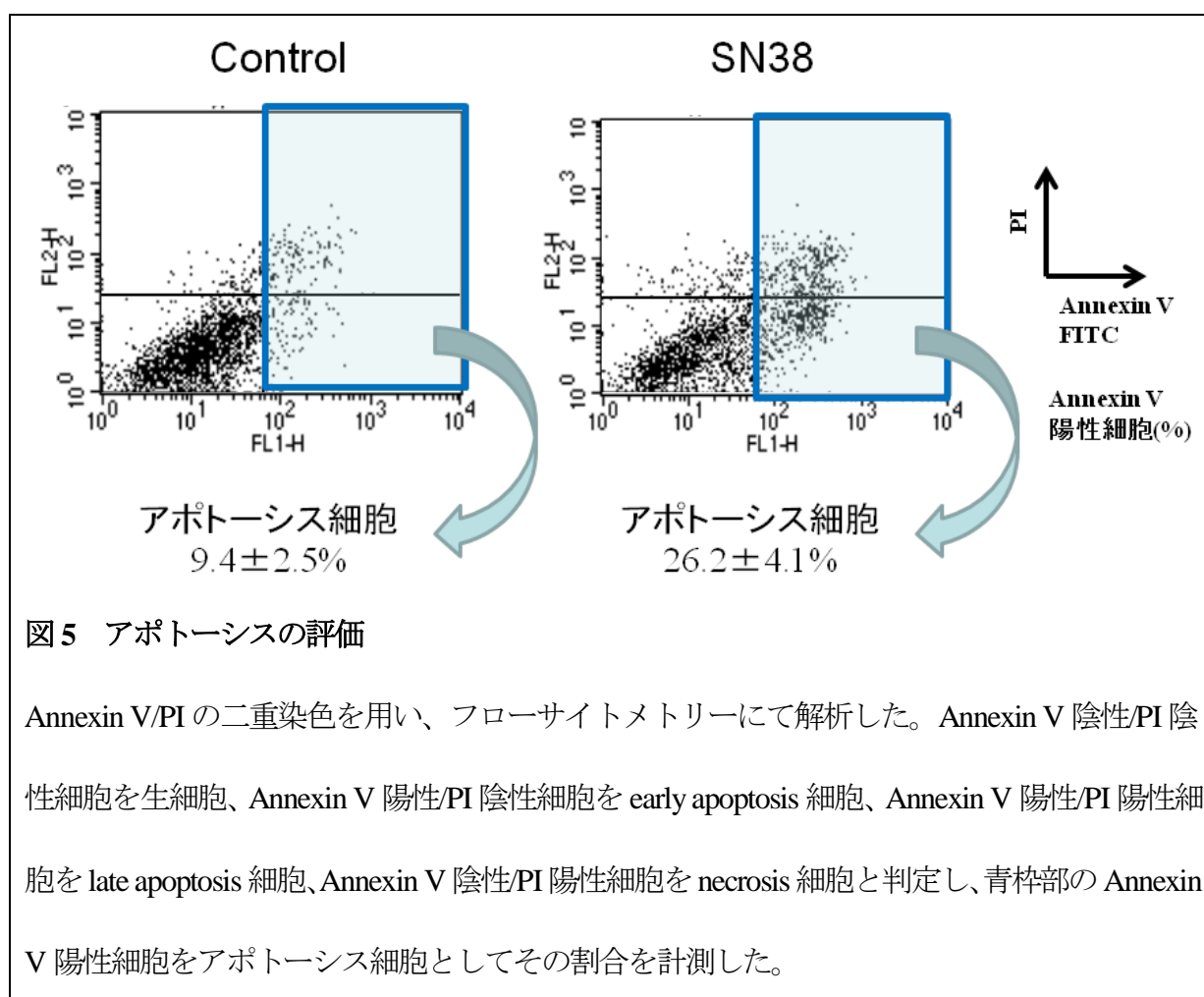
標識細胞の蛍光強度を蛍光測定装置にて測定する方法を用いた (図 4)。96-well flat-bottomed plate に 5×10^3 cells/well の大腸癌細胞株 (HT29, SW480) を加え、正常酸素下にて 24 時間培養した後に、正常酸素下・低酸素下に 24 時間培養した。その後、5-FU (0, 2.5, 5, 10, 20, 40 μ M)、オキサリプラチン (0, 2.5, 5, 10, 20, 40 μ M)、または SN38 (0, 0.25, 0.5, 1, 2, 4 μ M) を添加して 48 時間培養したのちに、1 μ l のカルセイン-AM (calcein tetraacetoxymethyl ester solution; Sigma Ardrich, St Louis, MO, USA) を添加して 30 分培養後に Tera scan VP (Minerva Tech, Tokyo, Japan) にて蛍光強度を測定した。これらもすべて 3 wells で行い、抗癌剤を投与しない状態で培養したコントロール細胞に対する比率として検討を行った。



2.5 アポトーシスの測定 - フローサイトメトリー法

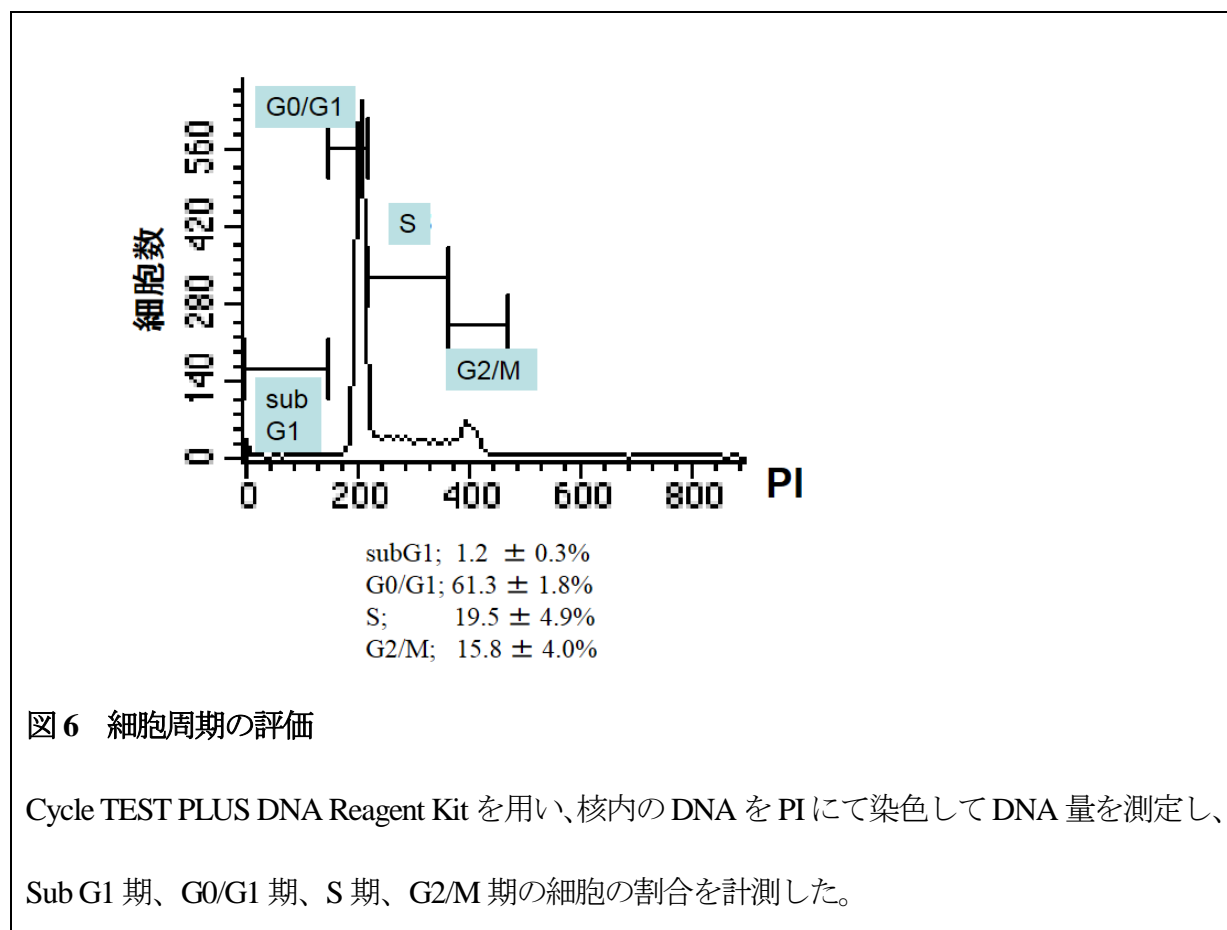
アポトーシスの評価は、Annexin V/PIの二重染色を用い、フローサイトメトリーにて解析した(図5)。6-well plateを用いて、前述のように正常酸素24時間、正常酸素/低酸素24時間培養後、抗癌剤(5-FU、オキサリプラチン、SN38)を添加し48時間培養した。細胞を回収し、PBSで洗浄した後、FITC標識 Annexin V および Propidium Iodide (PI) (Annexin V, FITC

Apoptosis Detection Kit; BD Pharmingen, San Jose, CA, USA) にて染色を行った。フローサイトメトリー法を用いて測定し、Annexin V 陰性/PI 陰性の分画を生細胞、Annexin V 陽性の分画をアポトーシス細胞集団と判定した。



2.6 細胞周期の測定 - フローサイトメトリー法

細胞周期の解析はフローサイトメトリーにて行った。6-well plate を用いて、アポトーシスの測定と同様に培養し、抗癌剤 (5-FU、オキサリプラチン、SN38) を添加して 48 時間後に測定を行った。細胞を回収し、PBS で洗浄した後、Cycle TEST PLUS DNA Reagent Kit (BD Pharmagen, San Jose, CA, USA) を用い、核内の DNA を PI にて染色した。フローサイトメトリー法を用いて測定し、sub-G1 期、G0/G1 期、S 期、G2/M 期の割合を計測した (図 6)。



2.7 Western blotting によるタンパク発現の検討

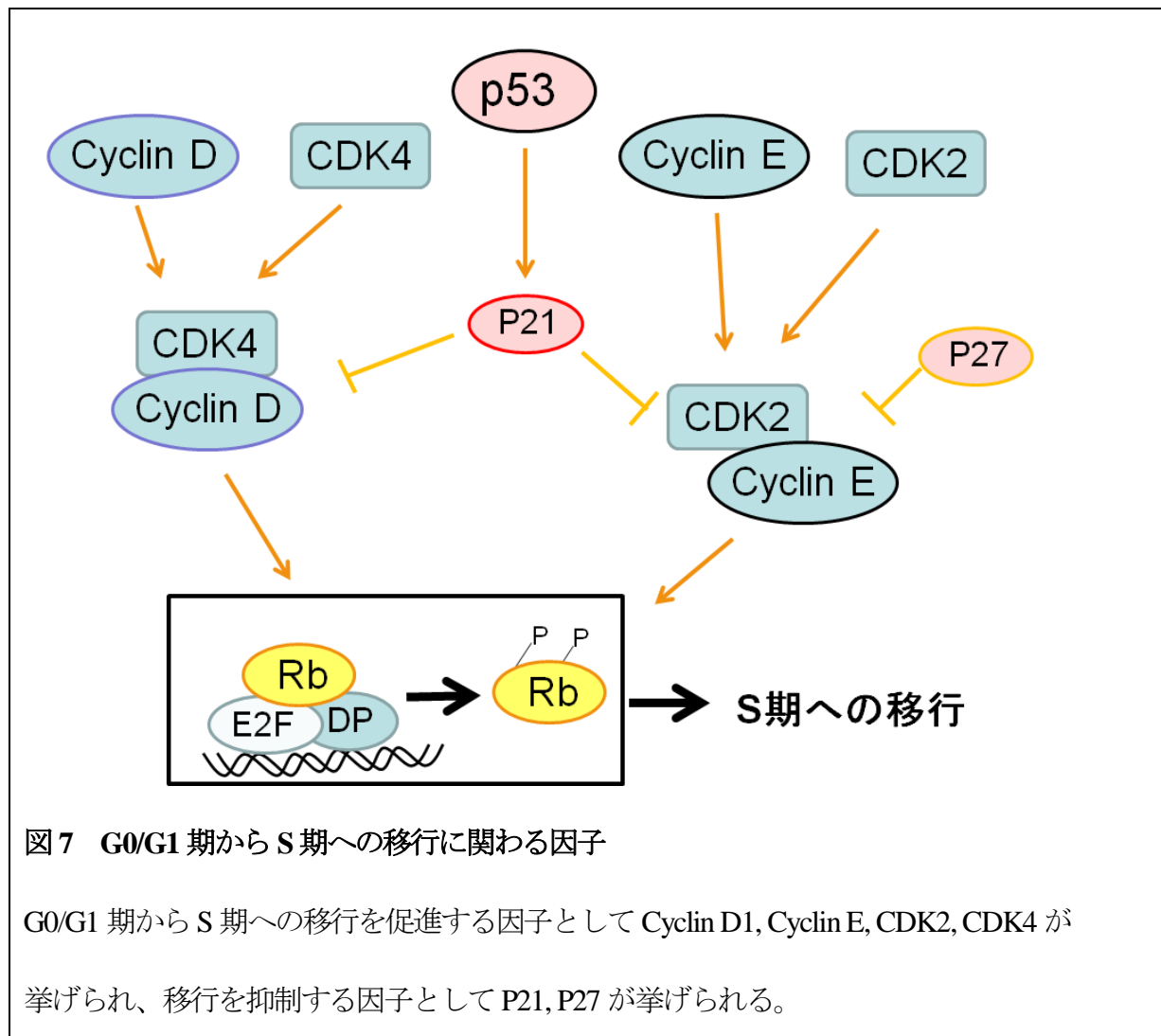
HIF-1 α の発現、G0/G1 期から S 期への移行に関わる因子 (図 7) 、5-FU に対する治療抵抗性に関わる因子である TS, DPD 活性について検討するために Western blotting によるタンパク発現の検討を行った。

Subconfluent の状態の大腸癌細胞株 (HT29, SW480) を正常酸素下に 24 時間培養後、正常酸素／低酸素下で 24 時間培養し、抗癌剤 (5-FU 40 μ M, オキサリプラチン 20 μ M, SN38 0.1, 0.2, 0.5 μ M) を添加して 24 時間培養した。培養終了後、培地を除去して PBS で 3 回洗浄した後、1% Triton X およびプロテアーゼ阻害剤を含む溶解液を加えて氷上で 1 時間静置し、癌細胞を溶解した。溶解液を遠心し、上清の蛋白濃度を 2 mg/ml に調整した。蛋白抽出液に 2% のメルカプトエタノール を加え、100°C で 5 分間煮沸した。

電気泳動は、必要に応じて 15%あるいは7.5% polyacrylamide ゲルを用いて行った。Hybond ECL ニトロセルロース膜 (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, England) に転写し、5% スキムミルクにて非特異的結合のブロッキングを 1 時間行った後、マウス抗 HIF-1 α モノクローナル抗体 (54/HIF1- α ; Becton-Dickinson, San Jose, CA, USA、250 倍で使用) 、ウサギ抗

Cyclin D1 ポリクローナル抗体 (clone H-295 ; Santa-Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA、200 倍希釈で使用) 、マウス抗 Cyclin E モノクローナル抗体 (Santa-Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA、200 倍希釈で使用) 、ウサギ抗 CDK2 ポリクローナル抗体 (Santa-Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA、200 倍希釈で使用) 、ウサギ抗 CDK4 ポリクローナル抗体 (Santa-Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA、200 倍希釈で使用) 、ウサギ抗 P21 ポリクローナル抗体 (Santa-Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA、200 倍希釈で使用) 、ウサギ抗 P27 ポリクローナル抗体 (Santa-Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA、200 倍希釈で使用) 、マウス抗 Thymidylate Synthase モノクローナル抗体 (TS106 ; Abcam, Cambridge, UK、1000 倍希釈で使用) 、マウス抗 DPD モノクローナル抗体 (Abcam, Cambridge, UK、1000 倍希釈で使用) または抗 β -actin モノクローナル抗体 (clone A-15, Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA、10000 倍希釈で使用) をそれぞれ加えて、一晩反応させた。洗浄した後、Horseradish peroxidase (HRP) 標識抗ウサギ (Vector Laboratories, Inc, Burlingame, CA, USA) 、もしくは抗マウス IgG (Vector Laboratories, Inc, Burlingame, CA, USA) を各々二次抗体として反応させた。その後、ECL detection system (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, England) を用いて現像し

た。



2.8 統計学的解析

統計学的有意差の検定には Student's t test を用いた。P 値が 0.05 以下を統計学的に有意とし

た。

3. 実験結果

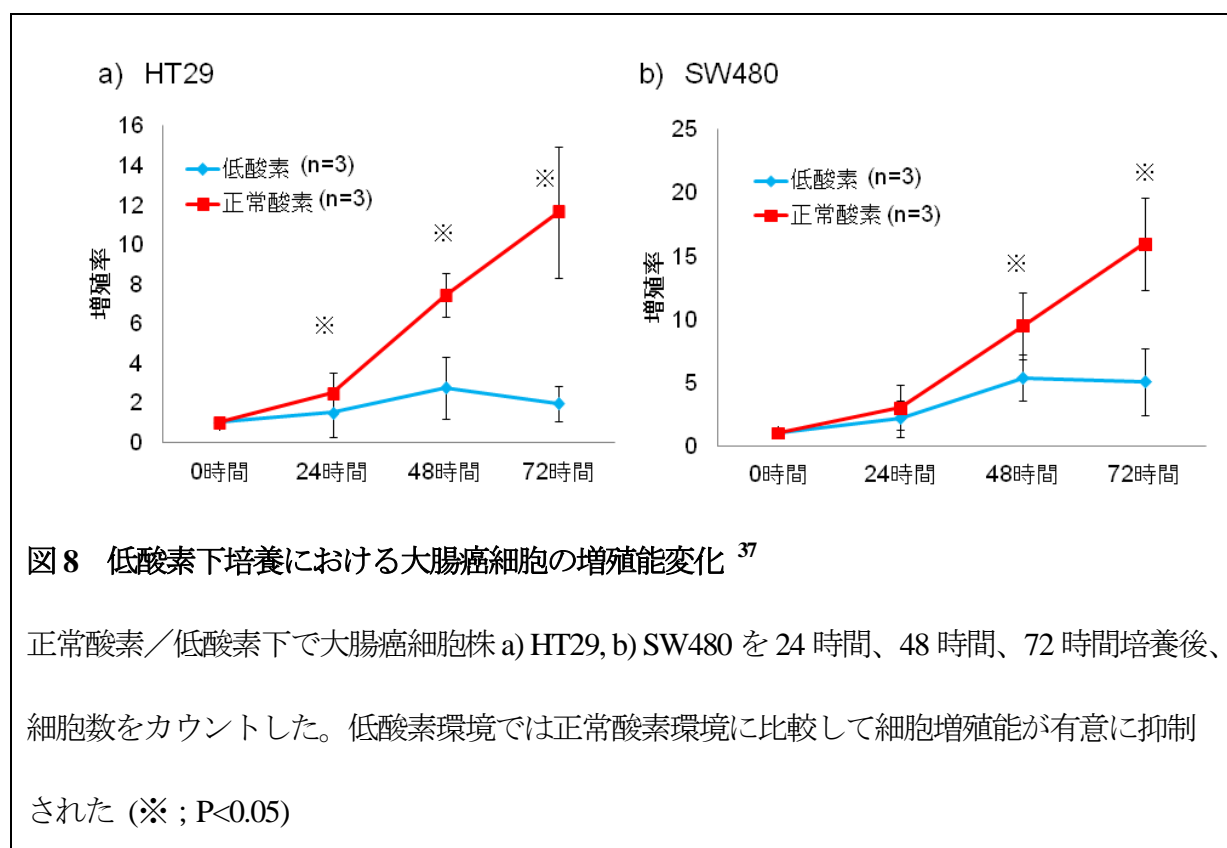
3.1 低酸素下培養による大腸癌細胞株の増殖能変化

大腸癌細胞株 (HT29, SW480) の増殖能を低酸素下 (1% O_2) および正常酸素下 (20% O_2)

で比較した結果を図 8 に示した。大腸癌細胞株 (HT29, SW480) は低酸素環境下では正常酸素

下と比較して増殖能が抑制された。HT29, SW480 いずれにおいても低酸素環境下では培養後

72 時間での細胞数は正常酸素下の半数以下であった。



3.2 低酸素環境下において抗癌剤が増殖能に及ぼす影響の変化

大腸癌細胞 (HT29, SW480) に抗癌剤 (5-FU、オキサリプラチン、またはSN38) を添加し、正常酸素／低酸素環境下で培養した際の増殖能の影響を図9に示した。正常酸素下では5-FU作用によりHT29細胞の増殖が抑制されたが、低酸素下では増殖抑制効果が見られず、SW480細胞でも同様の結果であった。オキサリプラチンに関しても同様に、正常酸素下ではオキサリプラチンにより大腸癌細胞株 (HT29, SW480) の増殖が抑制されたが、低酸素下では増殖抑制効果が減弱した。

一方でSN38投与下では、正常酸素下においても低酸素下においてもHT29細胞の増殖抑制効果に変化は見られなかった。SW480細胞に関しても同様に、低酸素下においてSN38の増殖抑制効果はやや減弱したが、正常酸素下と同様に増殖抑制効果が認められた。

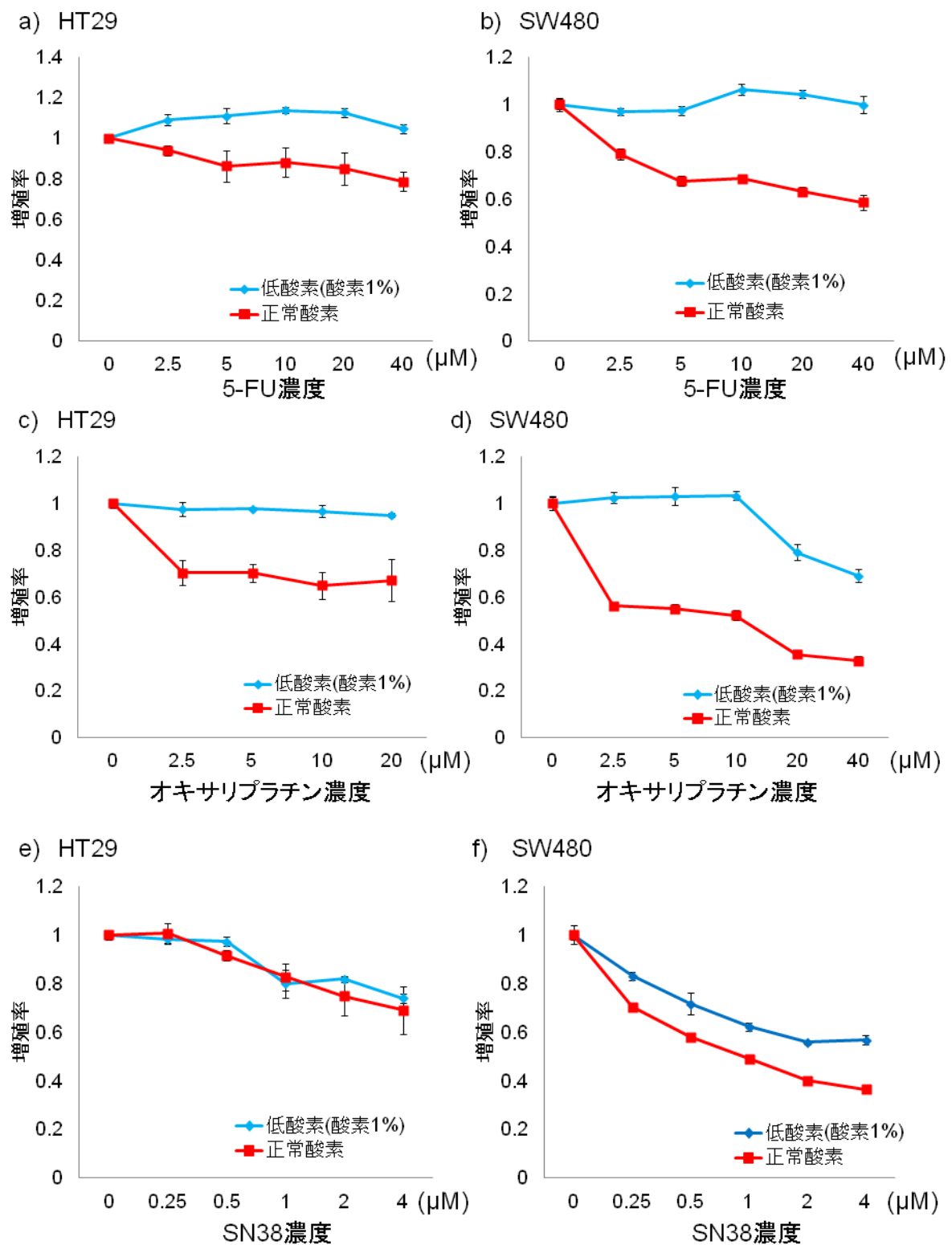


図9 大腸癌細胞の増殖に及ぼす抗癌剤の影響—正常酸素下および低酸素下の比較³⁷

カルセイン蛍光強度の測定により、正常酸素／低酸素下における抗癌剤の大腸癌増殖能に及ぼす影響を測定した。5-FU は正常酸素下では a) HT29 細胞ならびに b) SW480 細胞の増殖を抑制したが、低酸素下では増殖抑制効果が減弱した。また、オキサリプラチンに関しても同様で、c) HT29 細胞ならびに d) SW480 細胞の増殖抑制効果は低酸素下で減弱が見られた。一方で SN38 投与下においては、e) HT29 細胞の増殖抑制効果は低酸素下においても認められ、f) SW480 細胞に関しても低酸素環境において軽度減弱したものの、増殖抑制効果は認められた。

3.3 抗癌剤のアポトーシス誘導効果に及ぼす低酸素環境の影響

低酸素環境における抗癌剤の効果減弱の機序を解明するために、まず、アポトーシス誘導への影響について検討した (図 10)。フローサイトメトリーにて Annexin V 陽性細胞をアポトーシスと判断し、その割合を計算した。HT29 細胞では正常酸素環境下において 5-FU (10 μ M)、オキサリプラチン (10 μ M)、SN38 (1 μ M) 投与群では大腸癌細胞株 (HT29, SW480) のアポトーシス誘導効果を認めた。一方で低酸素環境下においてはオキサリプラチンのアポトーシス誘導効果の減弱が認められた ($16.0 \pm 1.9\%$ vs. $10.1 \pm 1.7\%$, $P = 0.02$)。5-FU に関しては有意差を認めないものの、低酸素環境下においてアポトーシスの割合は減少した ($14.6 \pm$

4.4% vs. $9.5 \pm 2.1\%$, $P=0.08$)。しかし、SN38 に関しては低酸素環境下においても正常酸素下と同様にアポトーシスが誘導され、低酸素による SN38 の効果減弱は認められなかった ($25.2 \pm 7.2\%$ vs. $26.2 \pm 4.1\%$, $P=0.84$)。

SW480 細胞に関しても同様の結果が得られ、低酸素環境下においては 5-FU、オキサリプラチンのアポトーシス誘導効果の減弱が認められた (5-FU ; $37.8 \pm 3\%$ vs. $14.3 \pm 1.4\%$, $P=0.0002$ 、オキサリプラチン ; $30.9 \pm 4.2\%$ vs. $19 \pm 6.3\%$, $P=0.03$)。しかし、SN38 に関しては低酸素環境下においても正常酸素下と同様にアポトーシスが誘導された ($40.5 \pm 2.3\%$ vs. $44.5 \pm 3.4\%$, $P=0.17$)。

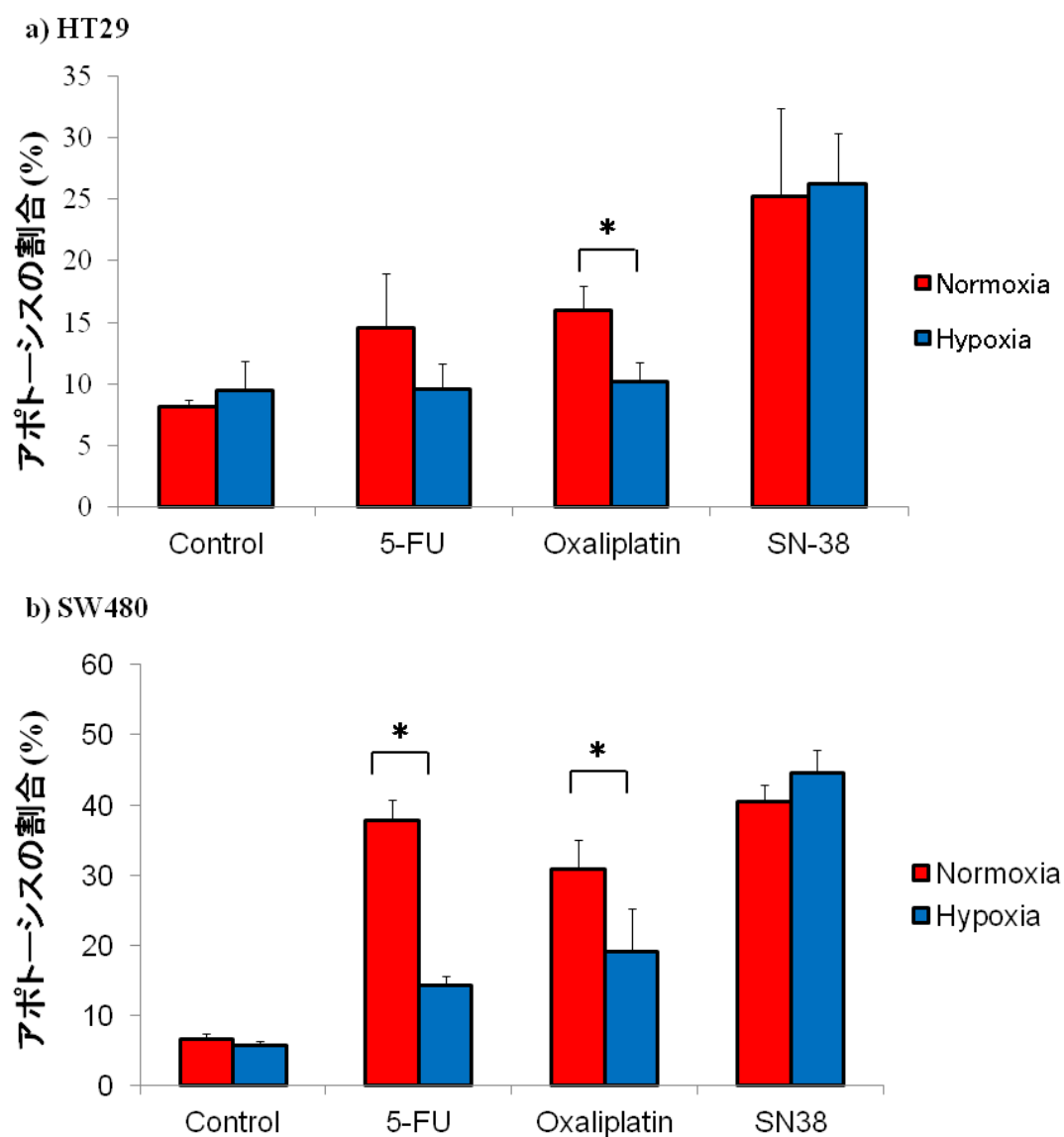


図 10 抗癌剤のアポトーシス誘導効果に及ぼす低酸素の影響³⁷

a) HT29 細胞では、オキサリプラチンのアポトーシス誘導効果は低酸素下では減弱したが、SN38 の効果は低酸素の影響を受けなかった。b) SW480 細胞でも同様の影響が認められ、低酸素下で 5-FU、オキサリプラチンのアポトーシス誘導効果が減弱したが、SN38 の効果には影響しなかった。 (* : $P < 0.05$)

3.4 抗癌剤投与による細胞周期分布に及ぼす低酸素の影響

次に、抗癌剤投与による細胞周期分布に及ぼす低酸素の影響について検討を行った (図 11) 。抗癌剤を投与しない状況 (コントロール) では、正常酸素下に比較して低酸素下でわずかに G0/G1 期が増加する傾向にあった (正常酸素 対 低酸素 ; HT29 ; $61.3 \pm 1.8\%$ vs. $66.0 \pm 3.4\%$, $P=0.06$, SW480 ; $67.6 \pm 0.7\%$ vs. $74.4 \pm 1.3\%$, $P=0.002$) 。

正常酸素下において大腸癌細胞株 (HT29, SW480) に 5-FU ($5 \mu\text{M}$) 、SN38 ($0.5 \mu\text{M}$) を投与した場合は、S 期細胞の割合が増加し、オキサリプラチン ($5 \mu\text{M}$) 投与では S 期および G2/M 期の割合が増加した。一方で、低酸素下で誘導された G0/G1 期細胞の割合増加は、抗癌剤投与時にも認められ、それに伴い、正常酸素下で 5-FU やオキサリプラチン投与時に見られた S 期や G2/M 期細胞の割合増加は減弱した。一方で SN38 投与時には低酸素下でも、正常酸素下と同様に HT29 細胞の S 期細胞の割合増加が認められた。SW480 細胞では、正常酸素下ほどの G0/G1 期細胞の増加は認められなかったものの、低酸素下での SN38 投与時に S 期細胞の割合増加効果は減弱した。

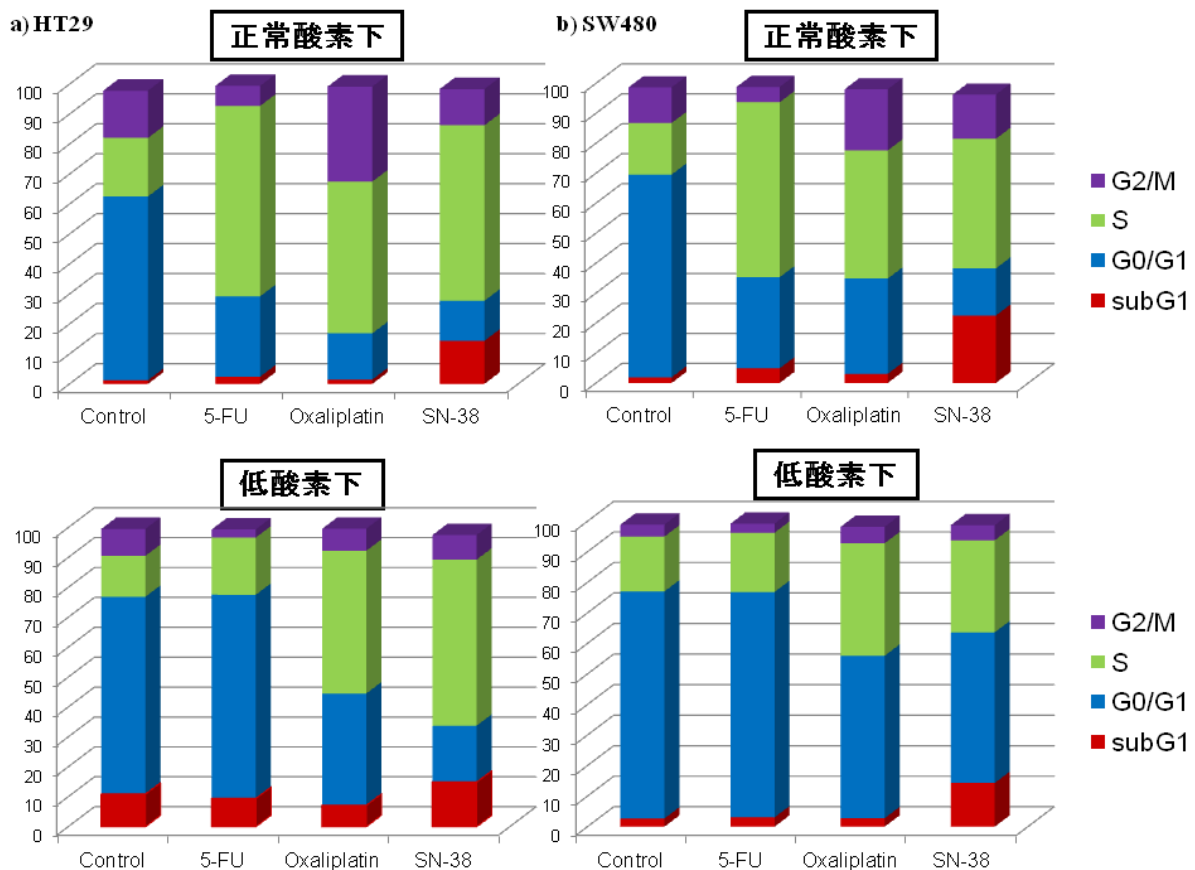


図 11 低酸素環境および抗癌剤投与が細胞周期分布に及ぼす影響

a) 抗癌剤を投与しない状況において (control)、低酸素下で G0/G1 期の割合はわずかに増加した。正常酸素下では 5-FU (5 μ M) 、およびオキサリプラチン (5 μ M) 投与により S 期ならびに G2/M 期細胞の割合が増加したが、低酸素では G0/G1 期細胞の割合が増加し、効果の減弱が認められた。一方、SN38 (0.5 μ M) 投与により正常酸素下で認められた S 期細胞の割合増加は、低酸素下でも同様に認められた。b) SW480 細胞でもほぼ同様の結果であったが、SN38 投与により認められた S 期細胞の割合増加も、低酸素下では減弱した。

3.5 大腸癌細胞の HIF-1 α 発現に及ぼす低酸素および抗癌剤投与の影響

低酸素下に置かれた細胞の多くは HIF-1 α を発現し、癌細胞の場合は、この HIF-1 α 発現が治療抵抗性の獲得に関与すると指摘されている。そのため、低酸素および抗癌剤投与が大腸癌細胞の HIF-1 α 発現に及ぼす影響について Western blotting で検討した。図 12 に示すように、正常酸素下で培養した大腸癌細胞株 (HT29, SW480) がほとんど HIF-1 α を発現しないのに対して、低酸素下では HIF-1 α が発現した。低酸素下で SN38 を作用した場合、両細胞株において HIF-1 α 発現が減少した。一方で、5-FU (40 μ M)、およびオキサリプラチン (20 μ M) を作用させた際、HIF-1 α の減弱は起こらず、オキサリプラチン投与ではむしろ HIF-1 α の発現が増強した。

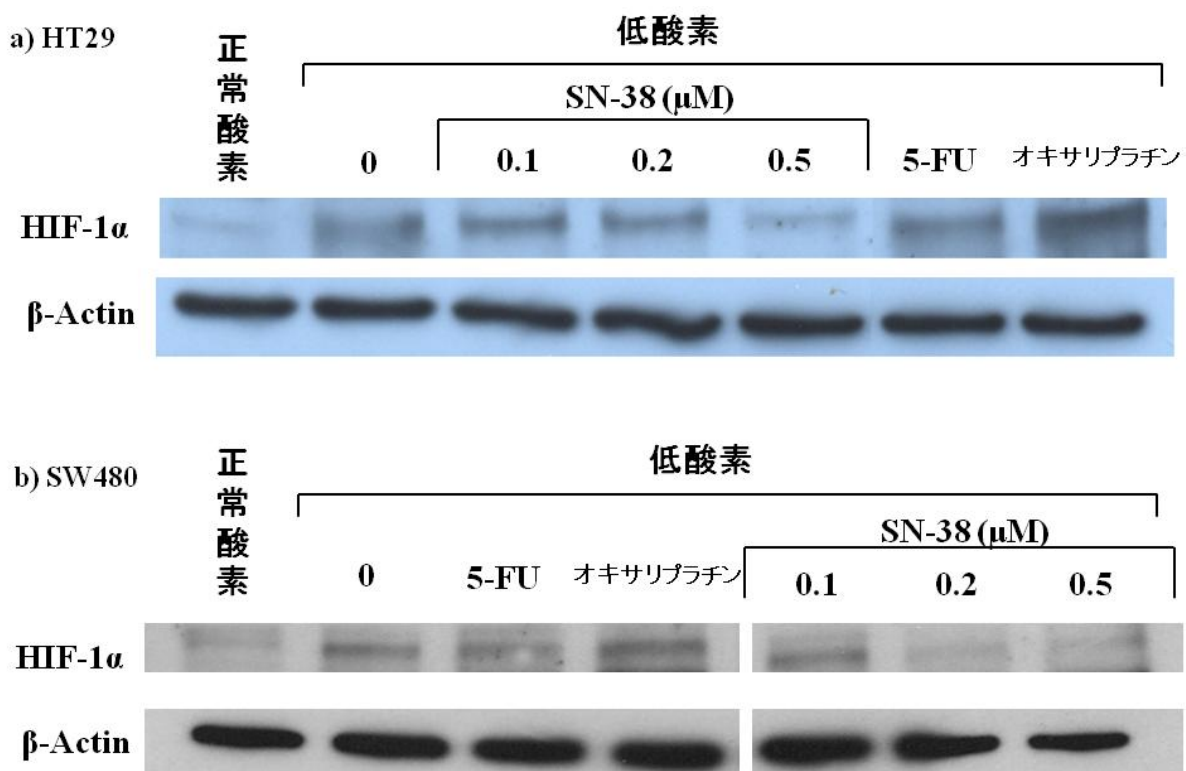


図 12 大腸癌細胞の HIF-1α 発現に及ぼす低酸素環境、および抗癌剤投与の影響³⁷

a) HT29 細胞では、低酸素下で HIF-1α 発現の増強が認められ、同環境での SN38 投与により、その発現は減弱した。一方、5-FU (40 μM) 投与は HIF-1α 発現に影響せず、オキサリプラチン (20 μM) 投与により、低酸素下での HIF-1α 発現は増強した。b) SW480 でも同様に、低酸素下で発現した HIF-1α は、5-FU やオキサリプラチンでは抑制されず、SN38 投与下では減弱した。

3.6 低酸素環境および抗癌剤投与が細胞周期分布に及ぼす影響—HT29 および SW480 の比較

SN38 に HIF-1 α の抑制作用があることを確認したが、SN38 投与が細胞周期分布に及ぼす影響については、HT29 細胞と SW480 細胞で異なっていた。低酸素環境において癌細胞の G0/G1 期細胞周期停止を認め、G0/G1 期細胞の割合が増加したが、SN38 投与下では SW480 細胞においてのみ G0/G1 細胞の割合の増加が認められ、HT29 細胞では認められなかった。そのため、図 7 に示すように細胞周期移行、特に G0/G1 期より S 期への移行に重要な調節因子である Cyclin D1, Cyclin E, CDK2, CDK4, P21, P27 の発現について検討を行った (図 13)。しかし、両細胞における Cyclin D1, Cyclin E, CDK2, CDK4, P21, P27 の発現につき明確な差は見出せなかった。

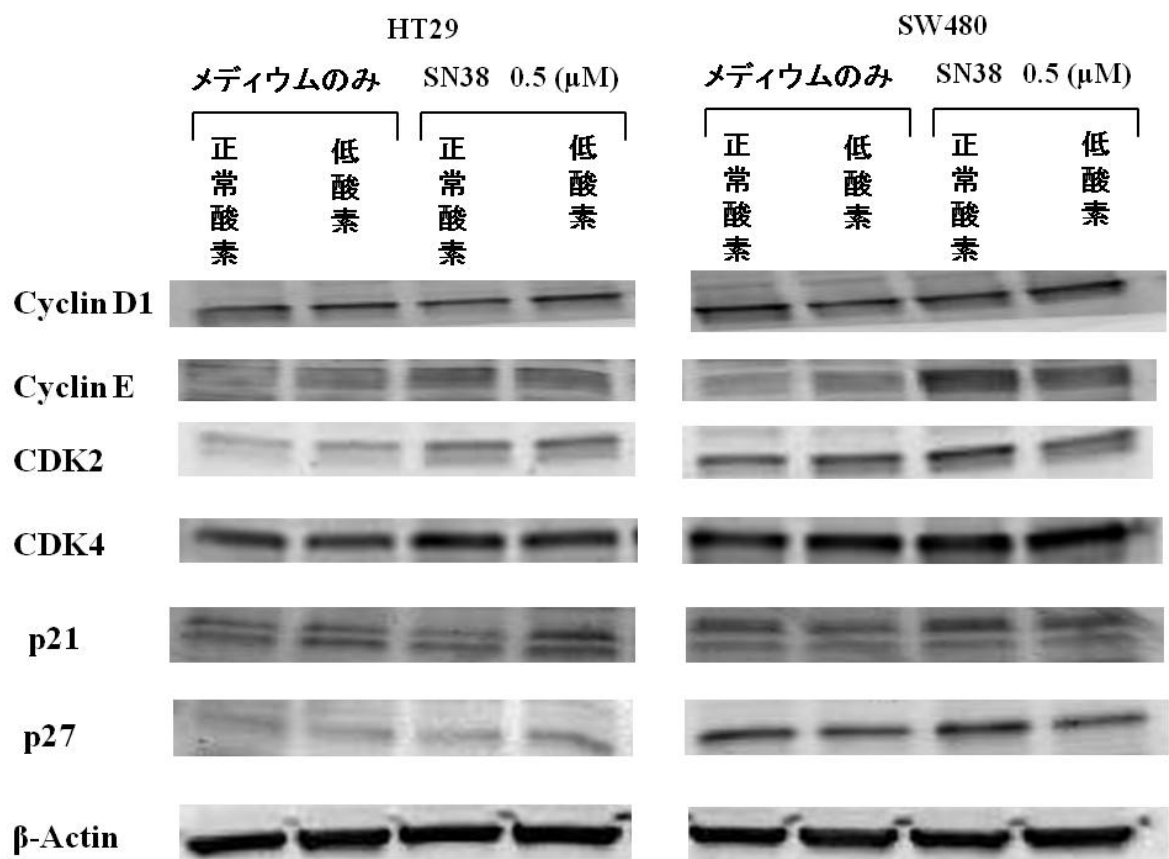


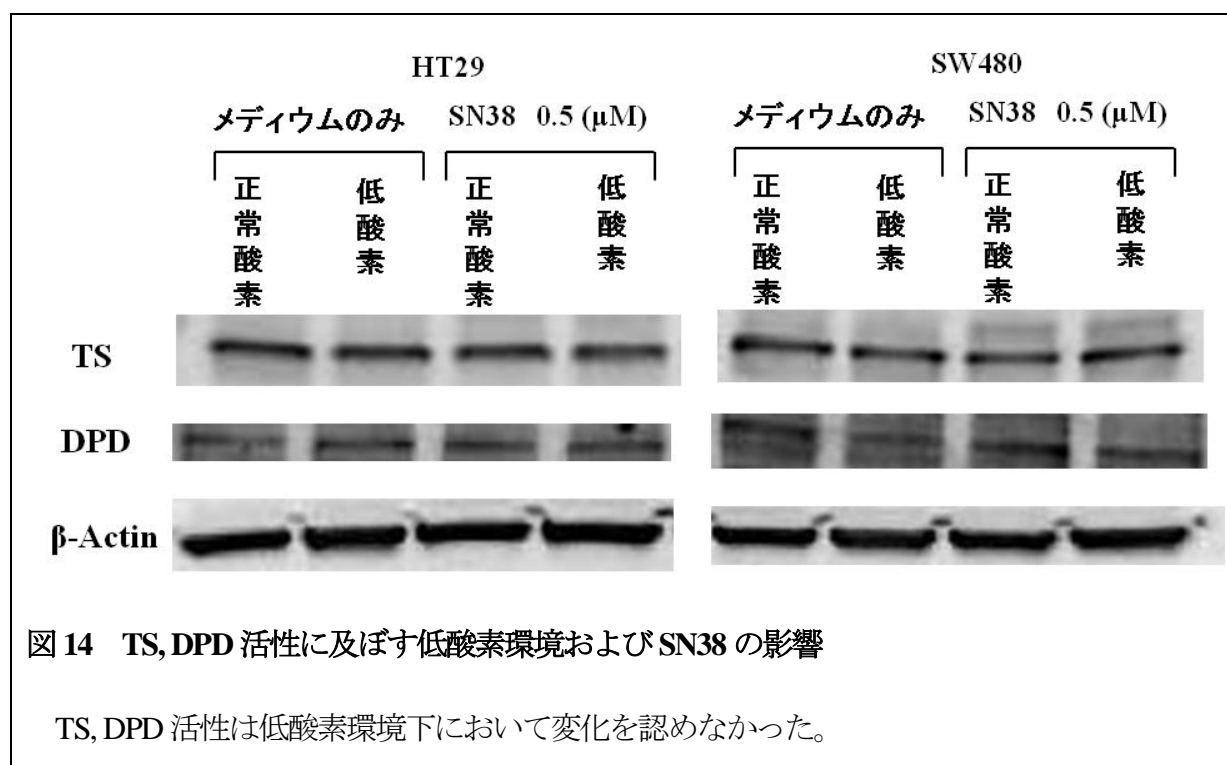
図 13 G0/G1 期より S 期への移行の調節因子発現に及ぼす低酸素環境および SN38 の影響
—HT29 および SW480 の比較

両細胞における Cyclin D1, Cyclin E, CDK2, CDK4, P21, P27 の発現につき明確な差は認められなかった。

3.7 Thymidylate synthase (TS) と dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) の発現に及ぼす低

酸素環境の影響

5-FU の代謝に関与する dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) 、また 5-FU の作用機序に重要な Thymidylate synthase (TS) の発現変化は、5-FU に対する治療抵抗性を引き起こすことがあるため、低酸素下におけるこれらの酵素の発現変化について検討を行った (図 14) 。 TS 活性、DPD 活性は HT29, SW480 いずれの細胞においても低酸素による影響は認められなかった。



4. 考察

本研究にて大腸癌細胞株 (HT29, SW480) は、低酸素下 (1% 酸素下) において 5-FU やオキサリプラチンに対する治療抵抗性を獲得し、抗腫瘍効果が減弱することを確認した。すなわち、正常酸素環境では、5-FU、およびオキサリプラチン投与により大腸癌細胞株の増殖は抑制されたが、低酸素下ではその抑制率は低下した。一方、イリノテカンの活性代謝物である SN38 の抗腫瘍効果は、低酸素環境の影響を受けないことを確認した。

大腸癌を含む多くの固形腫瘍は、増殖に伴い、中心部が低酸素環境に陥ることが知られており、それによって治療抵抗性を獲得する癌細胞が治療を困難にしていると考えられている。したがって、低酸素環境での抗癌剤抵抗性を克服できれば、大腸癌化学療法の成績向上につながると思われる。低酸素下での抗癌剤耐性の機序を検討するため、上記、低酸素環境で抗腫瘍効果が減弱した 5-FU とオキサリプラチン、および低酸素環境でも効果が認められた SN38 の抗腫瘍効果の機序について比較検討した。

最初にアポトーシス誘導について検討したところ、正常酸素下では、5-FU、オキサリプラチン、および SN38 はいずれも大腸癌細胞のアポトーシスを誘導した。一方で低酸素環境下では、5-FU、オキサリプラチン投与時にアポトーシス誘導効果は認められなかった。大腸癌

細胞において低酸素下では Bid、および Bax の発現が減弱し、その結果、アポトーシス誘導効果が減弱することが報告されている⁴。これまでの報告と同様、低酸素下では 5-FU および オキサリプラチンのアポトーシス誘導効果の減弱を認めたが、SN38 の効果には影響は見られなかった。

また、抗癌剤効果による細胞周期分布に及ぼす低酸素環境の影響について検討した。低酸素下において、細胞周期が停止し、G0/G1 期の細胞が増加することが報告されているが^{8 9 10} ¹¹、本研究においてもわずかに G0/G1 期の細胞割合が増加した。正常酸素下で 5-FU、および オキサリプラチンを投与した際、それぞれ S 期、G2/M 期の細胞割合の増加を認めたが、低酸素下ではいずれも G0/G1 期細胞割合の増加が見られ、これらの抗癌剤の効果が低酸素下で減弱することが分かった。これまでに口腔癌や卵巣癌において G0/G1 期の細胞割合が増加し、その結果、抗癌剤の抗腫瘍効果が減弱されることが報告されているが^{38 39} 大腸癌について検討した報告はなく、本研究では大腸癌細胞においても低酸素環境で誘導される G0/G1 期細胞周期停止が抗癌剤の細胞周期に及ぼす影響を減弱させることを確認した。

低酸素環境における治療抵抗性には HIF-1 α が寄与していることが報告されており^{2,23}、低

酸素環境や抗癌剤投与が HIF-1 α 発現に及ぼす影響について検討した。これまでの報告どおり、大腸癌細胞株 (HT29, SW480) を低酸素下で培養すると HIF-1 α が高発現した。低酸素下で 5-FU やオキサリプラチンを投与しても HIF-1 α の発現は減弱せず、オキサリプラチン投与ではむしろ HIF-1 α 発現は増強した。オキサリプラチン投与が HIF-1 α 発現に及ぼす影響についての報告はないが、放射線治療や炎症性変化など低酸素以外の刺激により誘導される HIF-1 α 発現増強が治療抵抗性の原因になり得ることが報告されている^{40, 41}。したがって、オキサリプラチン投与に際しても HIF-1 α 発現増強が治療抵抗性に関与している可能性が示唆された。

一方で、低酸素下で SN38 を投与した場合、HT29, SW480 いずれの細胞においても HIF-1 α 発現が減弱した。低酸素下では HIF-1 α 発現を介して抗アポトーシス活性や G0/G1 期細胞周期停止が誘導されることが報告されており⁴⁹、SN38 は低酸素下での HIF-1 α 発現を抑制することで、抗アポトーシス活性や G0/G1 期の細胞周期停止作用を減弱し、低酸素下においても正常酸素下と同等の抗腫瘍効果を発揮した可能性があると考えられた。ただし、SN38 が HIF-1 α 抑制効果を介して低酸素環境のアポトーシスや細胞周期への影響を減弱させたかどうかについて正確に評価するためには HIF-1 α ノックダウンや過剰発現細胞を用いた検討を行う必要

がある。

細胞周期分布に対する SN38 の効果は細胞株によって異なることが確認された。すなわち、今回の検討に用いた 2 種類の細胞株のうち、SW480 細胞では SN38 作用により G0/G1 期細胞割合の増加を認め、正常酸素下と同様に S 期細胞の割合増加が減弱したが、HT29 細胞では SN38 作用による G0/G1 期細胞割合の増加を認めなかった。低酸素下での SN38 投与で認めた G0/G1 期細胞周期停止の機序を検討するために G0/G1 期から S 期への移行に重要な調節因子である Cyclin D1, Cyclin E, CDK2, CDK4, P21, P27 発現変化について Western blotting 法で解析した。本研究において SN38 投与下における Cyclin D1, Cyclin E, CDK2, CDK4, P21, P27 発現変化について HT29 細胞と SW480 細胞の間には明確な変化を見いだせなかった。また、低酸素下で G0/G1 期細胞の割合が増加 (G0/G1 細胞周期停止) する機序の一つとして Cyclin D1 の抑制が指摘されているが⁹、本研究においては低酸素下での Cyclin D1 の発現にも明らかな変化は認められなかった。細胞周期の制御には p53 が重要な因子として挙げられ、Cyclin D1, Cyclin E, CDK2, CDK4, P21, P27 発現や機能に影響を及ぼしていると考えられるが⁴²、HT29 と SW480 はともに p53 mutant 細胞であり、そのために Cyclin D1, Cyclin E, CDK2, CDK4,

P21, P27 を正確に評価できていない可能性が考えられた。また、細胞周期の制御経路は単一ではなく、細胞によっても異なるため⁴³、本検討で SN38 が細胞周期に及ぼす影響が両細胞について異なる原因の評価を困難にしたものと思われる。低酸素環境における細胞周期への影響に関して、多くは HIF-1 α 発現の関与が確認されているが、HIF-1 α と独立した機序も報告されている^{44 36}。SN38 は本研究で用いた両細胞の HIF-1 α 発現を抑制することが分ったが、低酸素下での SN38 投与により SW480 細胞でのみ G0/G1 期細胞の割合増加がみられたため、HIF-1 α とは独立した機序が関与しているものと推測された。

一般的に切除不能大腸癌に対する化学療法として 5-FU、ロイコボリンに加えてオキサリプラチンを併用する FOLFOX 療法⁴⁵ならびにイリノテカン併用する FOLFIRI 療法⁴⁶が広く用いられており、両者において奏効率は同等とされている。一方で術後の補助化学療法として用いる場合にはオキサリプラチンを加えた化学療法の有用性が確認されているが^{47 48 49}、イリノテカンに関しては再発予防には寄与しなかったとする報告がある^{50 51}。その理由は明らかになっていないが、本研究においてイリノテカンの代謝産物である SN38 は HIF-1 α の発現抑制効果を有しており、腫瘍が大きく内部が低酸素であると予想されるような腫瘍に関し

ては FOLFOX よりも FOLFIRI の抗腫瘍効果が期待できるが、術後補助化学療法のように腫瘍が肉眼で確認できないほど非常に小さい腫瘍に関しては FOLFOX の方が強い効果を期待できる可能性が考えられた。

今回の検討でも示したとおり、HIF-1 α 発現は抗癌剤耐性の原因になり得ることから、HIF-1 α 阻害薬と併用することで抗癌剤の効果を増強できる可能性がある。しかし、現在のところ HIF-1 α 阻害薬については臨床応用されているものはなく、一般臨床で使用される薬剤で HIF-1 α 抑制作用を有すると報告されているものは今回の検討で用いたイリノテカンならびにセツキシマブの 2 剤のみである^{52 53 54}。副作用の観点から一次治療として FOLFOX が用いられることが多いが、腫瘍が非常に大きく内部が低酸素であると予想されるような腫瘍に関しては FOLFIRI の方が高い治療効果が得られる可能性があり、今後の検討課題であると考えられた。また、原発巣で HIF-1 α が高発現する腫瘍は転移巣でも HIF-1 α が高発現している可能性が高いとする報告があり⁵⁵、術後再発症例で HIF-1 α が高発現していることが分かっている腫瘍に関しても FOLFIRI やセツキシマブを加えた治療が有効である可能性があり、今後の検討が必要である。

低酸素下にある癌細胞は治療抵抗性を獲得するのみならず、浸潤・転移能を獲得することが報告されている^{24 25 36}。低酸素下では正常酸素に比べて増殖速度は遅いが、治療抵抗性を獲得して死滅せず、他臓器に転移して増殖するものと考えられる。直腸癌に関しては術後の局所再発の減少効果が期待できることから術前に化学放射線療法を行うことが多いが^{56 57}⁵⁸、化学放射線療法の場合、手術までに約3か月の期間があり、原発巣が縮小したにも関わらず、その間に遠隔転移を認める場合がある。HIF-1 α 抑制により転移が制御できる可能性もあり、術前化学放射線療法にイリノテカンを加えることで得られる効果についても検討が必要であると考えられた。

現在、HIF-1 α 阻害薬で臨床応用可能な薬剤はなく、一般臨床で用いられる薬剤でHIF-1 α 抑制作用を有する薬剤を同定することは非常に重要である、と考えられた。今後、さらなる検討を加えることによって、HIF-1 α を対象とした新しい治療法の開発につながると考える。

5. まとめ

低酸素環境の大腸癌に及ぼす影響を検討し、以下の結論を得た。

1)低酸素環境により、細胞の増殖能は低下した。

2)低酸素環境により 5-FU やオキサリプラチンの効果は減弱したが、SN38 に対する効果に及ぼす影響は軽度であった。

3)低酸素環境下において、抗アポトーシス活性や G0/G1 期細胞周期停止を示すことが知られており、5-FU やオキサリプラチンの効果が減弱する原因と考えられた。

4)低酸素環境により HIF-1 α が高発現するが、SN38 投与下ではその発現が抑制された。

本研究が発端となり、HIF-1 α の抑制メカニズムがさらに解明され大腸癌に対して HIF-1 α の発現を考慮した化学療法の選択が行われるようになることを期待する。

6. 謝辞

本研究をすすめるにあたり、東京大学大学院 医学系研究科 外科学専攻 臓器病態外科学講座 腫瘍外科学・血管外科学 渡邊聡明教授にはひとかたならぬ御指導・御鞭撻を賜り、深く感謝いたします。腫瘍外科学・血管外科学 名川弘一前教授には研究の機会を賜りました。そして、腫瘍外科学・血管外科学 北山丈二准教授、須並英二先生、石原聡一郎先生、輸血医学 津野寛和先生には、具体的な実験方法、実験手技の習得、データの解釈、研究の進め方など、多岐に渡る詳細な御指導を頂きました。同大学院輸血医学 高橋孝喜前教授・岡崎仁教授には実験の場を提供していただき、また論文の作成にあたってもひとかたならぬ御指導・御鞭撻を賜りました

さらに、実際の実験に際しては、多くの先生方に多大なるご協力を頂きました。

ここに深甚なる謝意を表します。

7. 参考文献

1. Brown JM, Wilson WR. Exploiting tumour hypoxia in cancer treatment. *Nat Rev Cancer* 2004;4:437-47.
2. Semenza GL. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2003;3:721-32.
3. Bertout JA, Patel SA, Simon MC. The impact of O₂ availability on human cancer. *Nat Rev Cancer* 2008;8:967-75.
4. Erler JT, Cawthorne CJ, Williams KJ, Koritzinsky M, Wouters BG, Wilson C, Miller C, Demonacos C, Stratford IJ, Dive C. Hypoxia-mediated down-regulation of Bid and Bax in tumors occurs via hypoxia-inducible factor 1-dependent and -independent mechanisms and contributes to drug resistance. *Mol Cell Biol* 2004;24:2875-89.
5. Ravizza R, Molteni R, Gariboldi MB, Marras E, Perletti G, Monti E. Effect of HIF-1 modulation on the response of two- and three-dimensional cultures of human colon cancer cells to 5-fluorouracil. *Eur J Cancer* 2009;45:890-8.
6. Sasabe E, Zhou X, Li D, Oku N, Yamamoto T, Osaki T. The involvement of hypoxia-inducible factor-1 α in the susceptibility to gamma-rays and chemotherapeutic drugs of oral squamous cell carcinoma cells. *Int J Cancer* 2007;120:268-77.
7. Mayes PA, Dolloff NG, Daniel CJ, Liu JJ, Hart LS, Kuribayashi K, Allen JE, Jee DI, Dorsey JF, Liu YY, Dicker DT, Brown JM, Furth EE, Klein PS, Sears RC, El-Deiry WS. Overcoming hypoxia-induced apoptotic resistance through combinatorial inhibition of GSK-3 β and CDK1. *Cancer Res* 2011; 71:5265-75.
8. Ameltem O, Loffler M, Pettersen EO. Regulation of cell proliferation under extreme and moderate hypoxia: the role of pyrimidine (deoxy)nucleotides. *Br J Cancer* 1994;70:857-66.

9. Wen W, Ding J, Sun W, Wu K, Ning B, Gong W, He G, Huang S, Ding X, Yin P, Chen L, Liu Q, Xie W, Wang H. Suppression of cyclin D1 by hypoxia-inducible factor-1 via direct mechanism inhibits the proliferation and 5-fluorouracil-induced apoptosis of A549 cells. *Cancer Res* 2010;70:2010-9.
10. Gardner LB, Li Q, Park MS, Flanagan WM, Semenza GL, Dang CV. Hypoxia inhibits G1/S transition through regulation of p27 expression. *J Biol Chem* 2001;276:7919-26.
11. Green SL, Freiberg RA, Giaccia AJ. p21(Cip1) and p27(Kip1) regulate cell cycle reentry after hypoxic stress but are not necessary for hypoxia-induced arrest. *Mol Cell Biol* 2001;21:1196-206.
12. Denko NC. Hypoxia, HIF1 and glucose metabolism in the solid tumour. *Nat Rev Cancer* 2008;8:705-13.
13. Kim JW, Tchernyshyov I, Semenza GL, Dang CV. HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. *Cell Metab* 2006;3:177-85.
14. Papandreou I, Cairns RA, Fontana L, Lim AL, Denko NC. HIF-1 mediates adaptation to hypoxia by actively downregulating mitochondrial oxygen consumption. *Cell Metab* 2006;3:187-97.
15. Zhang H, Gao P, Fukuda R, Kumar G, Krishnamachary B, Zeller KI, Dang CV, Semenza GL. HIF-1 inhibits mitochondrial biogenesis and cellular respiration in VHL-deficient renal cell carcinoma by repression of C-MYC activity. *Cancer Cell* 2007;11:407-20.
16. Dang CV, Kim JW, Gao P, Yustein J. The interplay between MYC and HIF in cancer. *Nat Rev Cancer* 2008;8:51-6.
17. Roberts DL, Williams KJ, Cowen RL, Barathova M, Eustace AJ, Brittain-Dissont S, Tilby MJ, Pearson DG, Ottley CJ, Stratford IJ, Dive C. Contribution of HIF-1 and drug penetrance to oxaliplatin

resistance in hypoxic colorectal cancer cells. *Br J Cancer* 2009;101:1290-7.

18. Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, Cartwright T, Hainsworth J, Heim W, Berlin J, Baron A, Griffing S, Holmgren E, Ferrara N, Fyfe G, Rogers B, Ross R, Kabbinavar F. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 2004;350:2335-42.
19. Van Cutsem E, Kohne CH, Hitre E, Zaluski J, Chang Chien CR, Makhson A, D'Haens G, Pinter T, Lim R, Bodoky G, Roh JK, Folprecht G, Ruff P, Stroh C, Tejpar S, Schlichting M, Nippgen J, Rougier P. Cetuximab and chemotherapy as initial treatment for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 2009;360:1408-17.
20. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 1971;285:1182-6.
21. Ferrara N. VEGF and the quest for tumour angiogenesis factors. *Nat Rev Cancer* 2002;2:795-803.
22. Lunt SJ, Chaudary N, Hill RP. The tumor microenvironment and metastatic disease. *Clin Exp Metastasis* 2009;26:19-34.
23. Harris AL. Hypoxia--a key regulatory factor in tumour growth. *Nat Rev Cancer* 2002;2:38-47.
24. Kim SH, Xia D, Kim SW, Holla V, Menter DG, Dubois RN. Human enhancer of filamentation 1 Is a mediator of hypoxia-inducible factor-1alpha-mediated migration in colorectal carcinoma cells. *Cancer Res* 2010;70:4054-63.
25. Ryu MH, Park HM, Chung J, Lee CH, Park HR. Hypoxia-inducible factor-1alpha mediates oral squamous cell carcinoma invasion via upregulation of alpha5 integrin and fibronectin. *Biochem Biophys Res Commun* 2010;393:11-5.
26. Semenza GL. Evaluation of HIF-1 inhibitors as anticancer agents. *Drug Discov Today*

2007;12:853-9.

27. Melillo G. Targeting hypoxia cell signaling for cancer therapy. *Cancer Metastasis Rev* 2007;26:341-52.

28. Wilson WR, Hay MP. Targeting hypoxia in cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2011;11:393-410.

29. Palayoor ST, Tofilon PJ, Coleman CN. Ibuprofen-mediated reduction of hypoxia-inducible factors HIF-1alpha and HIF-2alpha in prostate cancer cells. *Clin Cancer Res* 2003;9:3150-7.

30. Fukuda R, Kelly B, Semenza GL. Vascular endothelial growth factor gene expression in colon cancer cells exposed to prostaglandin E2 is mediated by hypoxia-inducible factor 1. *Cancer Res* 2003;63:2330-4.

31. Mayerhofer M, Valent P, Sperr WR, Griffin JD, Sillaber C. BCR/ABL induces expression of vascular endothelial growth factor and its transcriptional activator, hypoxia inducible factor-1alpha, through a pathway involving phosphoinositide 3-kinase and the mammalian target of rapamycin. *Blood* 2002;100:3767-75.

32. Cao D, Hou M, Guan YS, Jiang M, Yang Y, Gou HF. Expression of HIF-1alpha and VEGF in colorectal cancer: association with clinical outcomes and prognostic implications. *BMC Cancer* 2009;9:432.

33. Rasheed S, Harris AL, Tekkis PP, Turley H, Silver A, McDonald PJ, Talbot IC, Glynne-Jones R, Northover JM, Guenther T. Hypoxia-inducible factor-1alpha and -2alpha are expressed in most rectal cancers but only hypoxia-inducible factor-1alpha is associated with prognosis. *Br J Cancer* 2009;100:1666-73.

34. Baba Y, Nosho K, Shima K, Irahara N, Chan AT, Meyerhardt JA, Chung DC, Giovannucci

EL, Fuchs CS, Ogino S. HIF1A overexpression is associated with poor prognosis in a cohort of 731 colorectal cancers. *Am J Pathol* 2010;176:2292-301.

35. Kwon HC, Kim SH, Oh SY, Lee S, Kwon KA, Choi HJ, Park KJ, Kim HJ, Roh MS. Clinicopathological significance of p53, hypoxia-inducible factor 1alpha, and vascular endothelial growth factor expression in colorectal cancer. *Anticancer Res* 2010;30:4163-8.

36. Hongo K, Tsuno NH, Kawai K, Sasaki K, Kaneko M, Hiyoshi M, Murono K, Tada N, Nirei T, Sunami E, Takahashi K, Nagawa H, Kitayama J, Watanabe T. Hypoxia enhances colon cancer migration and invasion through promotion of epithelial-mesenchymal transition. *J Surg Res* 2013;182:75-84.

37. Murono K, Tsuno NH, Kawai K, Sasaki K, Hongo K, Kaneko M, Hiyoshi M, Tada N, Nirei T, Sunami E, Takahashi K, Kitayama J. SN-38 overcomes chemoresistance of colorectal cancer cells induced by hypoxia, through HIF1alpha. *Anticancer Res* 2012;32:865-72.

38. Yoshida S, Ito D, Nagumo T, Shiota T, Hatori M, Shintani S. Hypoxia induces resistance to 5-fluorouracil in oral cancer cells via G(1) phase cell cycle arrest. *Oral Oncol* 2009;45:109-15.

39. Huang L, Ao Q, Zhang Q, Yang X, Xing H, Li F, Chen G, Zhou J, Wang S, Xu G, Meng L, Lu Y, Ma D. Hypoxia induced paclitaxel resistance in human ovarian cancers via hypoxia-inducible factor 1alpha. *J Cancer Res Clin Oncol* 2010;136:447-56.

40. Moeller BJ, Cao Y, Li CY, Dewhirst MW. Radiation activates HIF-1 to regulate vascular radiosensitivity in tumors: role of reoxygenation, free radicals, and stress granules. *Cancer Cell* 2004;5:429-41.

41. Frede S, Freitag P, Otto T, Heilmaier C, Fandrey J. The proinflammatory cytokine interleukin 1beta and hypoxia cooperatively induce the expression of adrenomedullin in ovarian carcinoma cells

through hypoxia inducible factor 1 activation. *Cancer Res* 2005;65:4690-7.

42. Gil J, Peters G. Regulation of the INK4b-ARF-INK4a tumour suppressor locus: all for one or one for all. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006;7:667-77.

43. Malumbres M, Barbacid M. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nat Rev Cancer* 2009;9:153-66.

44. Su Y, Loos M, Giese N, Metzen E, Buchler MW, Friess H, Kornberg A, Buchler P. Prolyl hydroxylase-2 (PHD2) exerts tumor-suppressive activity in pancreatic cancer. *Cancer* 2011; 118:960-72.

45. de Gramont A, Figier A, Seymour M, Homerin M, Hmissi A, Cassidy J, Boni C, Cortes-Funes H, Cervantes A, Freyer G, Papamichael D, Le Bail N, Louvet C, Hendler D, de Braud F, Wilson C, Morvan F, Bonetti A. Leucovorin and fluorouracil with or without oxaliplatin as first-line treatment in advanced colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2000;18:2938-47.

46. Douillard JY, Cunningham D, Roth AD, Navarro M, James RD, Karasek P, Jandik P, Iveson T, Carmichael J, Alakl M, Gruia G, Awad L, Rougier P. Irinotecan combined with fluorouracil compared with fluorouracil alone as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: a multicentre randomised trial. *Lancet* 2000;355:1041-7.

47. Andre T, Boni C, Mounedji-Boudiaf L, Navarro M, Tabernero J, Hickish T, Topham C, Zaninelli M, Clingan P, Bridgewater J, Tabah-Fisch I, de Gramont A. Oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment for colon cancer. *N Engl J Med* 2004;350:2343-51.

48. Kuebler JP, Wieand HS, O'Connell MJ, Smith RE, Colangelo LH, Yothers G, Petrelli NJ, Findlay MP, Seay TE, Atkins JN, Zapas JL, Goodwin JW, Fehrenbacher L, Ramanathan RK, Conley BA, Flynn PJ, Soori G, Colman LK, Levine EA, Lanier KS, Wolmark N. Oxaliplatin combined with

weekly bolus fluorouracil and leucovorin as surgical adjuvant chemotherapy for stage II and III colon cancer: results from NSABP C-07. *J Clin Oncol* 2007;25:2198-204.

49. Haller DG, Tabernero J, Maroun J, de Braud F, Price T, Van Cutsem E, Hill M, Gilberg F, Rittweger K, Schmoll HJ. Capecitabine plus oxaliplatin compared with fluorouracil and folinic acid as adjuvant therapy for stage III colon cancer. *J Clin Oncol* 2011;29:1465-71.

50. Saltz LB, Niedzwiecki D, Hollis D, Goldberg RM, Hantel A, Thomas JP, Fields AL, Mayer RJ. Irinotecan fluorouracil plus leucovorin is not superior to fluorouracil plus leucovorin alone as adjuvant treatment for stage III colon cancer: results of CALGB 89803. *J Clin Oncol* 2007;25:3456-61.

51. Ychou M, Hohenberger W, Thezenas S, Navarro M, Maurel J, Bokemeyer C, Shacham-Shmueli E, Rivera F, Kwok-Keung Choi C, Santoro A. A randomized phase III study comparing adjuvant 5-fluorouracil/folinic acid with FOLFIRI in patients following complete resection of liver metastases from colorectal cancer. *Ann Oncol* 2009;20:1964-70.

52. Luwor RB, Lu Y, Li X, Mendelsohn J, Fan Z. The antiepidermal growth factor receptor monoclonal antibody cetuximab/C225 reduces hypoxia-inducible factor-1 alpha, leading to transcriptional inhibition of vascular endothelial growth factor expression. *Oncogene* 2005;24:4433-41.

53. Lu H, Liang K, Lu Y, Fan Z. The anti-EGFR antibody cetuximab sensitizes human head and neck squamous cell carcinoma cells to radiation in part through inhibiting radiation-induced upregulation of HIF-1alpha. *Cancer Lett* 2012;322:78-85.

54. Lu H, Li X, Luo Z, Liu J, Fan Z. Cetuximab Reverses the Warburg Effect by Inhibiting HIF-1-Regulated LDH-A. *Mol Cancer Ther* 2013;12:2187-99.

55. Shimomura M, Hinoi T, Kuroda S, Adachi T, Kawaguchi Y, Sasada T, Takakura Y, Egi H, Okajima M, Tashiro H, Nishizaka T, Ohdan H. Overexpression of Hypoxia Inducible Factor-1 Alpha is

an Independent Risk Factor for Recurrence After Curative Resection of Colorectal Liver Metastases.

Ann Surg Oncol 2013; 20:S527-36.

56. Improved survival with preoperative radiotherapy in resectable rectal cancer. Swedish Rectal Cancer Trial. N Engl J Med 1997;336:980-7.

57. Kapiteijn E, Marijnen CA, Nagtegaal ID, Putter H, Steup WH, Wiggers T, Rutten HJ, Pahlman L, Glimelius B, van Krieken JH, Leer JW, van de Velde CJ. Preoperative radiotherapy combined with total mesorectal excision for resectable rectal cancer. N Engl J Med 2001;345:638-46.

58. Sauer R, Becker H, Hohenberger W, Rodel C, Wittekind C, Fietkau R, Martus P, Tschmelitsch J, Hager E, Hess CF, Karstens JH, Liersch T, Schmidberger H, Raab R. Preoperative versus postoperative chemoradiotherapy for rectal cancer. N Engl J Med 2004;351:1731-40.