

從 2019 年諾貝爾生醫獎—談缺氧與乳癌的關係

文、圖 / 張金堅

台大醫院外科部

前言

氧氣是人體每個細胞生產能量的必需元素，細胞沒有氧就不能正常地生產能量。幾乎所有動物體內的細胞，都要利用氧氣才能將食物轉化為能量，德國生化學家瓦伯格(Dr. Otto Warburg, 1883-1970)於1923年提出「癌症是由細胞的呼吸系統缺氧引起」的理論，這就是著名的「瓦伯格效應」，他也因此贏得1931年諾貝爾生醫獎。他在一篇以《癌症的主要成因和預防》(The prime cause and prevention of cancer)為題的文章指出：「癌症的成因已不再是一個謎，我們知道，當任何細胞缺氧超過60%它的氧需求量，癌變就會發生。」幾十年後，美國國家癌症研究所(National Cancer Institute, NCI)的兩位研究者Dean Burn和Mark Woods進行了一系列實驗。進一步驗證瓦伯格的理論，他們發現，當降低細胞的氧含量，細胞開始用「無氧」糖解(glycolysis)生產能量；當氧降低到夠低的水平時，它們最終會癌變。

早在上個世紀初，比利時醫學家Corneille Heymans就發現了血氧可以透過頸動脈體(carotid body)來控制呼吸頻率，也因此榮獲1938年諾貝爾生醫獎。不過除了頸動脈體可快速適應缺氧環境外，還有其他生理機制也參與其中。另一個關鍵是稱為「紅血球生成素(erythropoietin, EPO)」的醣蛋白激素濃度升高，會增加紅血球生成量以提高攜氧量，但長期以來，科學家們並不清楚細胞如何去適應及控制體內氧氣值的變化。

直到半個世紀後，英國分子生物學家Sir Peter J. Ratcliffe研究觀察到，缺氧會使紅血球生成素增加，美國醫學家Gregg L. Semenza則發現缺氧誘導因子(hypoxia-inducible factor, HIF)，並進一步研究發表HIF由HIF-1 α 亞基與芳香烴受體核轉位子(aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator, ARNT，即HIF-1 β 亞基)這兩部分組成。美國癌症學家William Kaelin又發現了VHL蛋白質(von Hippel-Lindau)在氧氣充足時會把HIF-1破壞，但缺氧會讓VHL功能不彰，導致HIF-1、紅血球生成素等都增加，促進血管新生，為缺氧環境帶來更多氧氣(圖1)。這三位學者各自發現的蛋白質，在動物缺氧的環境中，上游、中游和下游的蛋白質會「一條鞭」式地反應，讓動物細胞適應缺氧，這對心臟和腦部等高耗氧器官，是很重要的生理機制功能。這些發現更可應用在癌症治療，因為癌症腫瘤就是生長在缺氧環境中。這三位科學家的發現可謂在細胞缺氧研究過程中互相呼應又互相銜接。

2019年諾貝爾生醫獎得主就是上述三位科學家：美國波士頓Dana-Farber Cancer Institute的William Kaelin博士，巴爾的摩Johns Hopkins University的Gregg Semenza博士，還有英國牛津Francis Crick Institute的Peter Ratcliffe博士。獲獎原因就是研究「細胞如何適應氧氣供應量的變化」。他們的開創性發現，揭露生命中，最不可或缺的一種適應程序：含氧量如何影響細胞代謝及生理功能，引導學術界和後續醫藥界，致力於研究能啟動或抑制細胞的氧氣感知機制

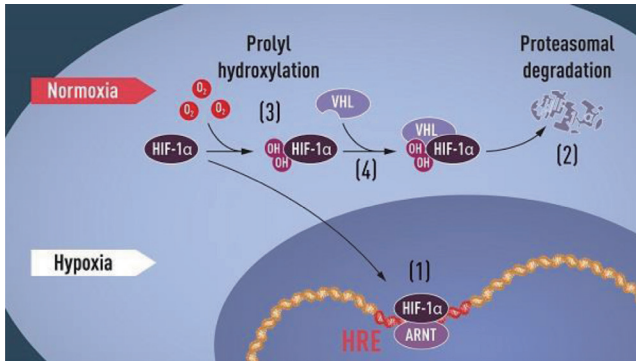


圖1 當氧水平低(低氧)時，HIF-1 α 被保護免於降解並聚集在細胞核中，它與ARNT(HIF-1 β) 結合併與低氧調節基因中的特定DNA序列(HRE)結合(1)。在正常的氧氣水平下，HIF-1 α 被蛋白酶體迅速降解(2)。氧氣通過向HIF-1 α 中添加羥基(OH)來調節降解過程(3)。然後，VHL蛋白可以識別並與HIF-1 α 形成複合物，導致其以氧依賴性方式降解(4)。

圖片出處：諾貝爾官網 The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2019. The Nobel Assembly at Karolinska Institutet. <https://www.nobelprize.org/uploads/2019/10/press-medicine2019.pdf>.

的新藥。為貧血、癌症、其他疾病的新治療策略打開新大門。

諾貝爾生醫獎的啟發

氧氣感測讓細胞在面對氧氣含量較少的環境中，可以調整生理機制，就像是我們在激烈運動時，肌肉所進行的調整，或是產生新血管、生產紅血球等。我們的免疫系統和許多生理功能也都會因為氧氣感測機制而變動。此外，氧氣感測也被證實是胎兒發育階段中，控制正常血管形成、胎盤發育等等重要的一環。對於很多疾病來說氧氣感測也非常重要：像是慢性腎功能衰竭的病人，常因缺氧、紅血球生成素降低而受貧血所擾。EPO由腎臟中的細胞製造，對於紅血球的製造非常重要。而氧氣調節的機制對於癌症來說也非常重要，在腫瘤中，氧氣調節機制會用來刺激血管形成並為癌細胞有效增生重塑代謝機制。

癌細胞生長很快，而血管新生跟不上癌細胞生長，因此可以發現腫瘤內，癌細胞間其實都是

缺氧的，而EPO、HIF、VHL這三種蛋白質就是幫助癌細胞「適應」缺氧環境的關鍵，甚至讓癌細胞更容易轉移、產生抗藥性。這些蛋白質控制細胞感應氧氣濃度，也幫助癌細胞適應缺氧，因此癌腫瘤就能在缺氧狀況下迅速長大，這些蛋白質本來是幫助動物適應缺氧，這時候卻是癌細胞和腫瘤的幫凶。知道這些蛋白質的作用後，未來就可能發展新藥物或新治療方式，來阻止或干擾這些蛋白質讓癌細胞適應缺氧，或許對癌症治療有很大助益。

Semenza和Ratcliffe分別投入了EPO基因的相關研究。在經過基因編輯的小鼠實驗中，Semenza發現位於EPO基因旁有一段長約五十個鹼基的特定DNA片段和氧氣濃度的感測極有關係，直接介入了缺氧反應。為理解這種介入缺氧反應的細胞成分，Semenza又培養了肝細胞，並從中發現一種稱為缺氧誘導因子的蛋白質複合物，會與上述特定DNA片段結合。因此，Semenza博士可說是最早揭開了這個氧氣濃度感測器的神秘面紗：HIF蛋白。HIF-1於1991年首次被發現，在正常環境下，HIF-1為細胞在缺氧時才會誘發其反應，並使其具備與DNA結合的特性⁽¹⁾。HIF-1可以辨識基因體上缺氧反應元(hypoxia response element, HRE)之DNA序列。當HIF-1與HRE的結合後，會促進EPO基因的表達，而這些基因的表現產物可以改變細胞的微環境，如增加血氧的供給甚至促進新的血管新生，以保護細胞抵抗缺氧所造成的損害。目前尚發現有許多其他受HIF-1調控的基因，例如血管內皮細胞生長因子(VEGF)、介白素-8、血小板源性內皮細胞生長因子(PDECGF)等。但是在惡性腫瘤中，這些基因被誘發後，會使癌細胞周圍血管新生，反而使癌細胞獲得氧氣及養分的來源，進而促進其惡化及轉移。

Semenza和其他實驗室團隊也接著發現，HIF蛋白並不是形單影隻，HIF蛋白實際上是由兩個不同的、各自能和DNA結合的轉錄因子(異二聚體轉錄因子複合物heterodimeric transcription factor complex)所組成，是為HIF-1 α 與HIF-1 β 。很多實驗室都證明，相較於HIF-1 β 在細胞內的存量相對穩定，HIF-1 α 的蛋白

質量變動極大。不過，有趣的是，以HIF-1 α 而言，這個蛋白質的消失，要比其存在，還更為學界所關心。在一般正常氧量的環境底下，HIF-1 α 蛋白質會被規律地降解掉(degradation)，不過，一旦氧氣濃度太低的時候，HIF-1 α 蛋白質就會逐漸積累到關鍵濃度，然後跑到細胞核裡，和HIF-1 β 蛋白結合，去管控許多基因的表現。也就是說，HIF-1 α 正是那個能夠感測氧氣濃度的感應器。1995年時，Semenza發表了鑑定編碼HIF的基因研究，他們找到了編碼一對DNA結合蛋白(DNA-binding protein)，當體內氧含量極高時，細胞中幾乎不含HIF-1 α ；當體內氧氣含量低時，HIF-1 α 含量就會增加，結合並調節EPO基因或其他具有HIF結合DNA片段的基因⁽²⁾。在缺氧環境下，HIF-1 α 通常不容易被降解，而在正常含氧量下，HIF-1 α 則會迅速被一種稱為泛素(ubiquitin)的小蛋白標記、接著被蛋白酶體(proteasomes)降解，科學家們好奇泛素如何透過氧依賴性方式結合HIF-1 α 。有氧狀態之下，HIF-1 α 的半衰期甚至不到5秒鐘，這使得HIF-1 α 成為哺乳動物細胞中已發現的降解速度最快的蛋白質。研究顯示，有氧狀態下，泛素蛋白酶體會迅速降解HIF-1 α ，特異性阻斷泛素蛋白酶體可以在有氧狀態下穩定HIF-1 α 及HIF-1轉錄複合體。近來有研究發現PI3K信號通路也參與了HIF-1的調節。

另一個諾貝爾桂冠得主Kaelin博士，便是解答出HIF-1 α 蛋白質的降解是如何被調控的。Kaelin博士原本是在研究林道症候群(von Hippel-Lindau, VHL)，已知這種疾病會增加罹患某些癌症的風險。Kaelin博士在研究VHL基因的時候，除了證實其所編碼的蛋白質能夠防範癌症的發生，還發現當癌細胞缺少VHL基因的時候，會同時不正常地增高跟缺氧反應有關的基因⁽³⁾。不過，當正常有功能的VHL基因被重新引入癌細胞之後，這些缺氧反應有關的基因所編碼的蛋白質，又會被回復到正常的表現量。這是第一個明確的實驗證據指出，VHL神奇地和缺氧反應的細胞內部調節機轉，息息相關⁽⁴⁾。

在Kaelin博士和Ratcliffe博士等不同實驗室各自努力下，缺氧調控機制裡的繁複細節，才慢

慢抽絲剝繭般的被釐清。他們發現，當細胞處在正常氧氣濃度下的時候，HIF-1 α 蛋白質會被脯胺醯基羥化酶(prolyl-hydroxylase)所作用，在兩處脯胺酸(proline)胺基酸的位置上「安裝上」羥基(-OH; hydroxyl group)，這反應就叫做脯胺醯基羥化作用(prolyl-hydroxylation)⁽⁵⁾。被脯胺醯基羥化後的HIF-1 α 蛋白質會發生結構上改變，能夠被VHL蛋白質所辨認而結合。一但被VHL蛋白質結合上的HIF-1 α ，就像是被好好裝在垃圾袋裡了，VHL能夠進一步把泛素套在HIF-1 α 身上，導致其被泛蛋白化而被降解。反之，當細胞處在缺氧環境下的時候，沒有氧原料的羥基可供以脯胺醯基羥化HIF-1 α ，而沒有羥基的HIF-1 α 就像是拭去濃妝艷抹後的素顏，讓VHL蛋白質有眼卻識不得，不會將其扔進垃圾袋裡丟掉，於是，HIF-1 α 濃度就會在細胞質裡逐漸攀高，而達到作用濃度了^(6,7)。

缺氧與癌症進展的關係

眾所皆知，癌症的特徵是逃避細胞凋亡的機制，自給自足的生長信號，對抑制生長因子的不敏感，持續的血管新生，具有無限複製潛力以及組織侵襲與轉移⁽⁸⁾。為了不斷增殖，在腫瘤血管生成因子的影響下，腫瘤形成自己的血管網絡和血液供應。血管新生和腫瘤細胞的生長，有著重大關係：在腫瘤剛形成時，大小在1-2mm³的癌細胞，只需靠細胞間的擴散作用，就可直接吸收周遭環境的養份或排除代謝廢棄物，即可存活；然而一旦腫瘤生長大小超過3mm³，細胞間的擴散作用就會不足，必需依賴血管新生的機制，來提供腫瘤生長的環境；否則腫瘤內部會因細胞生長過於旺盛而導致缺氧(hypoxia)，及因為代謝物的累積而酸化，最終誘發細胞凋亡(apoptosis)及細胞壞死(necrosis)。隨著腫瘤持續成長，此時有許多癌細胞會被推擠至距離血管較遠的區域，它們不但缺乏養分供給也缺少足夠氧氣，如果不設法改善惡劣的生長環境，癌細胞無法存活只能走向死亡。而且這些新形成的血管網絡與正常健康組織中的不同，呈現出一系列結構和功能改變。而這些改變可能會干擾血液和氧氣的充足供應，從而導致缺氧狀態。腫瘤微環境與

缺氧狀態已被研究了數十年，其影響惡性細胞是多方面的⁽⁹⁾。通常正常組織中氧氣(O₂)的供應量可以滿足細胞生長的需要，但由於腫瘤新形成血管的結構和功能異常，O₂從毛細血管擴散到腫瘤的範圍受到限制，從而導致腫瘤中發展出缺氧區域。

缺氧是腫瘤微環境的基本特徵之一，缺氧也是決定腫瘤惡性化發展的重要因素。缺氧不但會誘導癌細胞，使放射線治療失效，以及對化學治療產生耐藥性等問題，更重要的是，缺氧還會促進癌細胞的生長和轉移。近年來發現，細胞內氧含量的下降，會透過一系列的信號傳遞，激發了對缺氧環境敏感的缺氧誘導因子(HIF)的活性，當HIF這個轉錄因子表現增加後會活化「血管內皮細胞生長因子」(vascular endothelial growth factor, VEGF)基因表現，癌細胞內新生成的VEGF會進一步分泌到腫瘤組織並刺激微血管新生，如此可解除腫瘤內部缺氧的危機，也提供腫瘤持續增長的條件。再透過一連串細胞內訊號的傳遞，最後導致了癌細胞內與缺氧相關的基因之表現。

癌細胞的缺氧訊號是一個受到多重因子調控之過程。缺氧透過調節細胞內氧感應器分子，使其結構發生改變，並透過其他的影響因子，例如活性氧基(reactive oxygen species, ROS)而引發反應，其中最重要的是促使缺氧誘導因子HIF-1 α 的磷酸化，並且與HIF-1 β 結合而形成一個完整的HIF-1複合體，之後再與相對應於基因上的缺氧反應元(hypoxia response element, HRE)結合，促進某些基因(如血管內皮生成因子基因)的表達，於是促進了腫瘤旁微環境的血管新生作用。

總之，癌細胞的缺氧訊號通路是一個受多重因素調控的複雜過程。缺氧通過直接或間接的方式作用於氧感應器分子，使其結構發生改變，並透過第二信使-ROS與激酶系統發生互動關係：在缺氧時期，活性氧的積累會激活PI3k/Akt(protein-kinase B)和MAPK/ERK(extracellular signal-regulated kinase)等途徑，促使缺氧特異性轉錄因子-HIF-1 α 的磷酸化並與HIF-1 β 結合而形成一個完整的HIF-1轉錄複合體，從而與相對

應基因上的HRE結合，促進下游基因的活化與表現，這對於維持癌變，腫瘤血管生成至關重要。

腫瘤通常會因為癌細胞生長的調控異常，必然會產生某些缺氧區塊；缺氧會促使腫瘤產生缺氧誘導因子以改變癌細胞的代謝，並誘使腫瘤發炎，進而產生一連串的惡果：

1. 促進癌細胞的生長與惡化。
2. 讓癌細胞對於化療、放療極度不敏感。
3. 誘導腫瘤內充斥著負面的發炎細胞，壓抑抗癌免疫力；這往往讓昂貴的抗癌免疫療法有如肉包子打狗，不易產生療效。
4. 也會促成癌細胞侵襲、轉移至遠處器官。
5. 最可怕的在於缺氧會誘導腫瘤內產生「癌幹細胞」，讓癌細胞生生不息。

當腫瘤缺氧時，癌細胞或腫瘤內的發炎細胞還會分泌「細胞程式死亡配體-1(PD-L1)」而壓抑殺手T細胞；缺氧、發炎的腫瘤也會分泌其他免疫抑制因子。因此，不管我們的抗癌策略組合是開刀、化療、放射治療、免疫療法，我們都要設法讓腫瘤不缺氧。

癌細胞為何在缺氧環境下還能繼續分裂生長？

癌細胞生長到一定程度時，造成高度缺氧，在這逆境下，剛開始癌細胞並沒有法子來解決，只能跟大部分細胞一樣，細胞停止分裂然後死亡，但在經過一連串的適應後，癌細胞演化成可以在缺氧逆境下繼續分裂生長。但是長久以來，癌細胞如何適應缺氧逆境，最後促進癌症細胞快速生長、轉移，一直是個謎。

直到2014年，才由Gregg Semenza實驗室在美國國家科學院院刊(PNAS)發表一篇論文解開這個謎題⁽¹⁰⁾。Semenza教授本就是以發現HIF-1而聞名的一位科學家。在這一篇文章中，他們發現控制細胞分裂周期的蛋白激酶(cyclin-dependent kinases, Cdk) Cdk1和Cdk2可以與HIF-1接觸，並能控制HIF-1蛋白的量與功能。Cdk1和Cdk2分別負責細胞分裂周期(cell cycle)中的有絲分裂(G2/mitosis)以及DNA複製(G1/S)的進行。首先他們先證明了，在缺氧下，細胞內的Cdk1和Cdk2能跟HIF-1接觸，而且Cdk1和Cdk2均能影響HIF-1

蛋白的量與功能。有趣的是，對於HIF-1蛋白的影響，Cdk1和Cdk2卻是南轅北轍，Cdk1是會增加HIF-1蛋白的量與活性，而Cdk2則是會抑制HIF-1蛋白的量。他們進一步發現Cdk1和Cdk2控制HIF-1蛋白的含量是透過一種稱為伴護子細胞自噬(chaperone-mediated autophagy)的機制送到溶小體(lysosome)中來分解掉蛋白質，而不是一般常見的蛋白酶體(proteasome)的分解方式。不過令人意外的是，Cdk2雖然會降低HIF-1蛋白的量，但它卻會增加個別HIF-1蛋白的活性(圖2)。如此一來，癌細胞在缺氧逆境下，一開始HIF-1蛋白累積，然後抑制分裂生長，但之後它會藉由增加Cdk2的活性，一方面降低HIF-1蛋白的量，促進DNA複製使細胞恢復分裂；另一方面增強HIF-1蛋白的單位活性，不讓癌細胞在缺氧逆境下失去生存適應能力。

簡而言之，癌細胞能在缺氧逆境下，利用補償機制來控制HIF-1蛋白的量與功能而持續細胞分裂與生長，我們真的可以用分子標靶藥物在分子層次上與癌細胞搏鬥一較高下嗎？幸好Semenza實驗室也發現，在缺氧逆境下，HIF-1蛋白的多寡可透過伴護子細胞自噬-溶小體的機制來控制，或許這機制可作為在逆境下如何降低癌細胞的生存適應能力的抗癌新策略。Semenza團隊也發現，在高HIF-1 α 濃度的腫瘤中，給予Cdk抑制劑，如flavopiridol，可以有效抑制HIF-1 α 的轉錄活動及細胞週期的進展。因此，充分了解癌細胞的缺氧訊號之傳導路徑，進而阻斷這些傳導路徑的進行，可以達到治療或者是預防癌症惡化的目的。

HIF-1 參與的癌症抗藥性機制

除了HIF在常氧和缺氧環境中的作用外，大量研究證實HIF-1在缺氧誘導的抗藥性中也發揮著相當的作用。然而HIF引起抗藥性的分子機制是錯綜複雜的，並取決於腫瘤的種類，大致可分為以下幾種情況：

1. HIF-1參與藥物外流的調節。Comerford等人在2002年就已經發現，HIF-1在低氧環境中可以活化多重抗藥基因(multidrug resistance 1, MDR1)的表現⁽¹¹⁾，MDR1進一步誘發P-gp的表

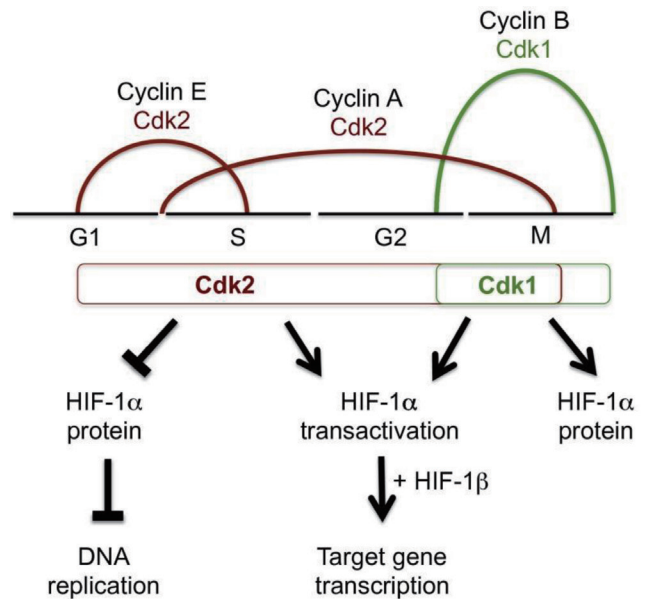


圖2 Cdk活性與HIF-1 α 水平，細胞週期的聯繫關係。整個細胞週期階段利用Cdk活性與HIF-1 α 水平的變化，從而造就細胞增殖，同時誘導適應性HIF-1轉錄反應：在G1/S過渡期和整個S期中，Cdk2-cyclinE和Cdk2-cyclinA複合體分別激發HIF-1 α 的溶酶體降解過程，從而促進DNA複製和細胞週期進展。Cdk2對HIF-1 α 轉錄活化區域(transactivation domain)功能具有正向作用，從而促進HIF-1標的基因的表現。而Cdk1-cyclinB複合物通過阻止HIF-1 α 的溶酶體降解來造成S期結束時HIF-1 α 的穩定和HIF-1標的基因的表達⁽¹⁰⁾。

現，後者已知可以降低細胞內化療藥物的濃度，而這一現象在胃癌、乳癌以及大腸癌中都會發生。

- HIF-1參與細胞增殖和存活水平的改變。細胞凋亡的缺陷和細胞週期調節的改變均是抗藥性產生的重要影響因素。研究發現，HIF可以調節一系列促凋亡因子(如BNIP3、NIX和NOXA)以及抗凋亡因子(如Bax、Bcl-xL、Bcl-2、NF- κ B、p53和survivin)的表現。同時，HIF-1也可以透過靶基因BNIP3的激化，引起自噬反應(autophagy)的產生，但HIF-1在調節凋亡過程中的確切作用還有待進一步研究。Rohwer等人發現，在胃癌細胞中，HIF-1拮抗化療藥物誘導的凋亡途徑可能是透過抑制p53路徑。
- HIF-1參與DNA損傷的抑制。研究發現，

HIF-1可以透過etoposide，一個經典的DNA雙鏈斷裂誘導劑，發揮更強的抗藥性作用。

4. HIF-1參與代謝重組。腫瘤惡性轉化與代謝重組密切相關，HIF-1可以透過不同的機制降低粒線體的活性，進而不僅控制了凋亡和壞死的發生，而且降低了活性氧基的產生，最終導致治療失敗。

HIF-1在癌症生物學的幾個關鍵步驟，扮演著重要作用，包括腫瘤血管生成(angiogenesis)，葡萄糖和能量代謝的調節，腫瘤侵犯(invasion)和轉移。目前世界各地研究者正在採取幾種抑制HIF-1活性的方法，包括RNA干擾(RNA interference)和小分子抑制劑等。Semenza教授團隊當前研究的重點是HIF-1在人類乳癌的血管和淋巴轉移中扮演的角色。他們正在研究改變HIF-1活性對腫瘤生長，代謝和血管形成的影響，雖然目前仍在臨床前模型(preclinical model)中。這些研究將提供原理證明，抑制HIF-1活性是一種新的癌症治療策略。

缺氧與乳癌

乳癌是全世界女性中最常被診斷出的癌症，也是主要的死亡原因。大約25%-40%的浸潤性乳癌展現出缺氧區域。使用極譜電極(polarographic electrodes)的研究表明，正常人的乳房組織中的氧分壓(pO_2)的中值是65 mmHg(1 mmHg = 133.3 Pa)。相反，人類乳癌的 pO_2 中位數為10 mmHg，明顯處於缺氧環境⁽¹²⁾。此外，根據統計所有乳癌中有一半以上的 pO_2 小於2.5 mmHg。研究表明，腫瘤內缺氧對乳癌病人的存活率有負面影響，而且與臨床腫瘤分期，組織學分級和淋巴結狀態等預後參數無關⁽¹³⁾。低氧性腫瘤與更具侵略性的表型，轉移風險增加，對放射療法和化學療法的抵抗力增加以及誘導的癌症免疫抑制有關。

三位諾貝爾獎得主中，William Kaelin博士，他的亡妻Carolyn Mary Kaelin博士，是美國的乳癌外科權威，和丈夫同在Dana-Farber癌症研究所工作。2003年，42歲的Carolyn被診斷乳癌，接著她的雙手因為治療而失去了知覺，只得放棄外科手術生涯。但是她仍為乳癌病人及其家

人制定了教育計劃和會議，幫助籌集資金治療貧困的癌症病人，並寫了《活著的乳癌》和《乳癌倖存者的健身計劃》兩本書，甚至開展了研究。不幸的是，2010年，Carolyn發現自己的打字能力出現問題，被診斷出第二個癌症：多發性神經膠質腦瘤(glioblastoma multiforme)。歷經兩次腦部手術和參與多項新治療的臨床試驗，2015年7月28日，Carolyn還是因為腦癌，永遠地離開了這個世界。妻子的患病讓Kaelin意識到基礎研究的重要性，他更加專注於對癌症的研究，希望可以快速研發出更好的治療手段。Carolyn去世後，Kaelin將遺憾化為力量，持續專注於癌症研究。妻子去世4年後，探索了40餘年癌症的Kaelin，因其在細胞感知和適應氧氣變化的機制方面的研究，獲得2019年諾貝爾生醫獎。他說道。「此刻她也在天上關注著，微笑著對我說：你看，我早就跟你說過獲獎是遲早的事吧！」

Kaelin博士發現，腫瘤抑制基因突變引發腎腫瘤大量分泌VEGF蛋白質，為腫瘤提供了另外一個供血的渠道，從而促進癌症生長。Kaelin博士在VHL蛋白質方面的工作激發學界對VEGF抑制劑之於癌症治療的臨床試驗，並大獲成功。雖然，Kaelin博士首次獲得臨床用途批准的藥物是用於治療貧血(anemia)，其作用原理是刺激紅細胞的生成。Kaelin博士發現VHL幫助控制HIF蛋白質水平，HIF蛋白質會增加或降低對低氧的反應，例如：紅細胞和新血管的生成。他證實，HIF蛋白質的一種：HIF-2 α ，激發了特定的腎癌，隨後他又發現了HIF-1 α 被三陰性乳癌(triple-negative breast cancers, TNBC)挾持的機制。目前，他正在開發以上述分子和其它癌症突變(如：突變酶IDH1和IDH2)為標的的治療策略。事實上，基於HIF-2 α 抑制劑對腎癌病人治療的強勁成果，HIF-2 α 抑制劑已被投入到第三期臨床試驗中。

除了腫瘤內缺氧環境外，在乳癌初診斷時，高水平的HIF-1 α 可預測早期復發和轉移，並與不良臨床預後相關。其中，在三陰性乳癌，HIF-1標的基因的表現增加是最明顯的。HIF-1在乳癌生物學的許多關鍵方面扮演關鍵作用，包括血管生成，幹細胞維持，代謝重編程(metabolic

reprogramming), 上皮-間質轉化(epithelial-mesenchymal transition, EMT), 侵襲, 轉移以及對放射療法和化療的抗藥性。

缺氧與三陰性乳癌治療新契機

三陰性乳癌(TNBC)是指雌激素受體(ER)、黃體素受體(PR)和人表皮生長因子受體(HER2)均陰性的一種特殊類型乳癌。TNBC約佔所有乳癌的15%，其許多生物學特性和基底細胞樣型乳癌相似，但兩者之間存在某些基因表達譜和免疫表型上的差異，因此亦不能完全等同。TNBC因缺乏內分泌及抗HER2治療的治療標的，目前尚無針對性的標準治療方案。醫生不得不用傳統化療藥物來治療病人，但這些藥物只在20%的三陰性乳癌病人中表現出長期的有效性。除了能夠對化療產生耐藥性之外，它們也產生了大量的乳癌幹細胞，這些細胞會引起復發，引發癌症病人於死地的轉移性腫瘤。過去的研究顯示，三陰性乳癌細胞中，許多已知由缺氧誘導因子(HIF)控制的基因活性明顯增加。有鑒於此，由Gregg Semenza帶領的研究小組，檢測HIF抑制劑是否能夠改善化療的效果。

Semenza教授指出：『我們的研究顯示，化療可打開HIF，而HIF可提高乳癌幹細胞的生存率，乳癌幹細胞是另一類刁蠻的癌細胞，必須殺死它們以防止復發和轉移。好消息是，我們有藥物阻斷HIF的行動。』相關研究結果發表在2014年的美國國家科學院院刊(PNAS)⁽¹⁴⁾。Semenza的研究，最開始是使用化療藥物紫杉醇治療實驗室培養的三陰性乳癌細胞株，並尋找HIF水平的變化。經過四天的治療之後，HIF蛋白和活性水平有所上升，存活細胞中乳癌幹細胞的百分比也上升。

HIF的作用是平衡氧氣的供需，進而防止活性氧基的過量產生對細胞造成傷害，腫瘤內癌細胞產生的ROS會誘導HIF活性⁽¹⁵⁾。研究人員發現，HIF提高幹細胞存活率的一種重要方法是，增加多抗藥性蛋白質1的水平，該蛋白就像一個幫浦，將化療藥物從癌細胞排出。然而，當三陰性乳癌細胞接受紫杉醇聯合HIF抑制劑毛地黃(digoxin)治療時，MDR1水平下降而不是上升。

毛地黃和其他強心配糖體(cardiac glycosides)是已知的HIF-1抑制劑^(16,17)，Semenza團隊在植入三陰性乳癌細胞的小鼠中，用毛地黃和紫杉醇聯合治療，比單獨使用紫杉醇治療，使腫瘤的大小降低了30%。聯合治療也降低了乳癌幹細胞的數量和MDR1的水平。用毛地黃聯合另一種化療藥物健擇(gemcitabine)治療，在三周內使腫瘤的體積減為零，並在治療結束時預防腫瘤的復發。此外對乳癌病人數據庫的分析中發現，在接受化療的三陰性乳癌女性當中，其腫瘤中HIF水平高於平均值的病人，死亡的可能性大於那些HIF水平低於平均值的病人。HIF抑制劑毛地黃過去已被美國FDA批准，用於治療心臟衰竭。抑制HIF的其他幾種藥物也已被確定，正在癌症病人中進行測試。因此，如果這些研究發現能在後續人體臨床試驗中得到驗證，那麼我們就可以給這些三陰性乳癌病人一種更有效的聯合療法。

此外，另一位諾貝爾桂冠得主Kaelin博士，進一步發現了HIF-1 α 被三陰性乳癌挾持的機制⁽¹⁸⁾：TNBC細胞釋放谷氨酸(glutamate)使癌症遲滯酶(cancer-stunting enzyme)Egln1失能。該酶的功能正是針對HIF-1 α 的轉錄因子在正常氧氣條件下降解。HIF-1 α 通過促進參與糖解(glycolysis)，血管生成和能量守恆(energy conservation)的基因，使細胞適應低氧條件。簡而言之，Kaelin研究小組發現TNBC細胞利用釋放谷氨酸來穩定HIF-1 α 的存活。他們的研究還衍生了至少兩種針對TNBC的可行藥物療法：對細胞外L-谷氨酸的拮抗作用和抑制L-谷氨酸從癌細胞中釋放。從而阻止谷氨酸為TNBCs所用有望提供一種有效的策略來抵抗這種難治性乳癌。Kaelin博士團隊也已經研發出藥物並進行臨床試驗中，值得拭目以待。

針對缺氧機制與腫瘤治療發展

當組織缺氧時，會誘導血管新生，給予更多的氧氣供給環境。因此，抑制血管新生可作為癌症治療或其他與血管新生有關疾病的一個新策略。目前已有許多的科學家想透過適當的方式來調控缺氧訊號的傳遞。過去幾年中，抗腫瘤血管新生的藥物已有重大的進展，2004年

美國FDA核准的VEGF單株抗體新藥bevacizumab (Avastin®)，會直接附著在VEGF上，而阻斷VEGF與其受體間的作用。臨床實驗發現，bevacizumab可以破壞腫瘤內混亂血管系統，使腫瘤縮小，並使留下的血管趨於正常，此時若合併傳統化療，這些較正常的血管反而更能有效的運輸化療藥物，以殺死癌細胞。此法在臨床上證實，的確可以延長直腸癌末期病人的壽命，但終極仍無法有效抑制腫瘤引發的死亡。推測抗血管新生療法無法有效抑制腫瘤生長可能的機制，2003年義大利的Selma Pennacchietti團隊，提出一個抗血管新生療法可能的副作用。他們發現：當腫瘤血管新生遭受抑制時，腫瘤組織容易缺氧及酸化，而缺氧會導致HIF-1 α 的累積及進一步導致細胞生長因子分泌量增加，造成腫瘤增生並促使癌細胞轉變成更易轉移的惡性型態⁽¹⁹⁾。這個研究的暗示得到許多後續研究的支持，解釋了抗血管新生療法的不完美性；但這並不代表抗血管新生療法是個錯誤的方向，而是因為殘留的腫瘤細胞找到了逃脫的大門。

自從上世紀末以來，用於癌症治療的新型分子標的鑑定已翻轉了藥物開發的範疇，現在大家更關注於研發能夠有效抑制癌細胞中失控信號通路的藥物。由於癌細胞暴露於隨時間和空間而變化的氧氣濃度中，從而觸發了正常細胞組織中通常不誘導的生存途徑的活化，並且可能被做為癌症治療的標的。長期以來，腫瘤內缺氧一直被認為是人類癌症中腫瘤進展的驅動力和不良預後因子。HIFs參與對氧氣水平變化的轉錄反應的發現，激起了人們對針對缺氧腫瘤微環境開發治療藥物的熱情。

針對缺氧機制所衍生的治療方式，多是以HIF-1為治療標的。目前在研發中的HIF-1抑制劑，根據其作用機制可分為五大類：1. HIF-1 α mRNA表達的抑制劑；2. HIF-1 α 蛋白轉譯(translation)抑制劑；3. 影響HIF-1 α 降解途徑的抑制劑；4. HIF-1與DNA結合的抑制劑；5. HIF-1 α 轉錄(transcription)活性抑制劑(圖3)⁽²⁰⁾。

然而，大多數(即使不是全部)HIF-1抑制劑的共同點是缺乏特異性(specificity)，也就是它會同時抑制多個標的，而且這些藥物的HIF-1抑制

功能不能輕易與其他活性分開，就像前面提到的毛地黃。由於缺乏可與腫瘤組織中的HIF-1抑制作用相一致的已知生物標誌物(biomarker)，阻礙了臨床前模型中對HIF-1抑制劑的驗證。但是，HIF-1抑制劑仍可能具有治療用途的。在目前已發表的研究中，使用各種不同的療效指標(end point)來評估HIF-1抑制作用，包括HIF-1 α 蛋白表達，HIF-1標的基因的mRNA表達以及更間接的，如血管生成和微管(microvessels)密度等。

由於HIF-1抑制劑的單一藥物治療可能缺乏足夠抗腫瘤活性，加上由抗VEGF治療引起的缺氧帶來新的挑戰，因而為開發抗VEGF藥物與HIF-1抑制劑的聯合策略提供了新機會。這一點甚至更為重要。當然，這些都有待於進一步設計良好的，基於藥效學的HIF-1抑制劑臨床試驗，以確認其活性並找出可用於聯合治療的藥物。

另外值得探討的是，因為癌細胞具有更高水平的活性氧基和過度表現的抗氧化酶(antioxidant enzymes)。因此，若能消除涉及抗氧化防禦機制中的酶，將可導致更高的氧化壓力(oxidative stress)，從而導致頑固細胞的死亡；根據該作用原理，ROS調節劑將可有效克服癌細胞中的多重抗藥性(MDR)。此外，由於缺氧容易製造酸性的腫瘤微環境，以酸誘導的腫瘤微標的可以提高腫瘤治療的特異性。近年來，質子幫浦抑制劑(PPI)在治療酸性環境中的應用很受歡迎。已有研究證實，PPI可以增加順鉑(cisplatin)在治療抗藥性卵巢癌的細胞攝取。針對酸性微環境的干預和新藥的聯合治療策略可能是未來的研究方向。

癌症治療因為分子生物學的進步，以及對於腫瘤微環境的研究更加透徹，治療模式將會針對病人目前所處的生理環境，設計給予相對應的治療方法，這樣的療法應當能夠立刻殺死癌細胞，無損於健康細胞，並且可以防止癌症復發。例如針對驅動基因突變(driver mutation)的標靶治療，將抗癌治療帶入一個新的里程碑。儘管近幾十年來，生物技術已經發生了革命性的進步，但人們仍然未能找出最理想的抗癌療法，隨著時間演進，抗藥性也一一出現，尤其對於晚期癌症病人的治療仍是不可避免以失敗告終。

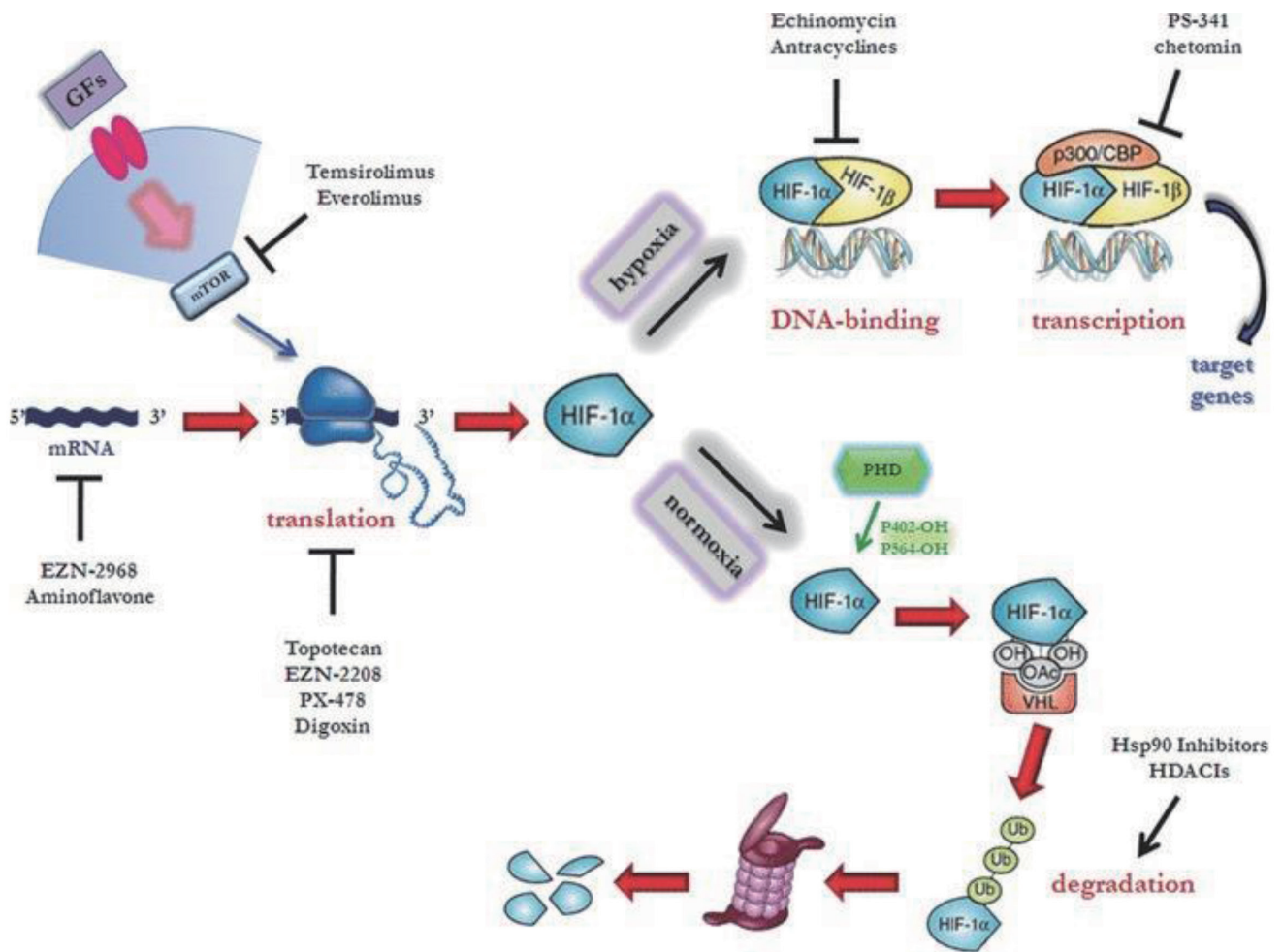


圖3 各種HIF-1抑制劑的可能機制。抑制HIF-1 α mRNA 表現的藥有EZN-2698, aminoflavone；抑制HIF-1 α 蛋白轉譯的有digoxin, toptecan, EZN-2208 (pegylated form of irinotecan)等；抑制HIF-1 α 降解調節的為Hsp90 inhibitors (galdanamycin), histone deacetylase inhibitors (sirtuin 1)；抑制HIF-1 DNA結合到缺氧反應元 (HRE)的是echinomycin, anthracyclines；可以抑製HIF-1 α 轉錄活性的有chetomin, bortezomib(PS-341)⁽²⁰⁾。

在缺氧環境下，細胞所因應的感應機制與生理調節不但可以套入任何細胞，癌細胞更是沒放過濫用此機制的機會。因此，在這條訊息傳導路徑上尋找可以「用藥」的標的，也一直是新藥研發的重點所在。現在有很多奈米及新藥，就是看準腫瘤的核心缺氧特徵，希望透過藥物進到癌腫瘤裡，破壞HIF-1的穩定性。但是仍需要時間和進一步臨床實驗來驗證。

結語

諾貝爾醫學獎雖然只頒給了三位實至名歸的科學家，但更重要的是後續一棒接一棒，使整

個領域持續發展，發揚光大。我們正步入腫瘤研究和治療的黃金年代。雖然，洞悉和控制癌症的征程充滿挑戰，但是近年來的許多癌症研究和治療方面的進展著實讓人驚喜。我們有更多的理由相信，戰勝癌症的未來終會降臨。我們一直走在戰勝疾病的路上，我們曾戰勝了無數的疾病，也許還會出現很多難以想象的疾病，但我們終將戰勝它們。正如MSKCC的腫瘤學家Joan Massague博士所說，「人類正在將癌症從絕症轉變為常規疾病，很多其他傳染性疾病都有抗生素或者其他治療手段，而我們與癌症的關係也終將變成那樣。」

參考文獻

1. Semenza GL, Neufeldt, MK, Chi SM, et al.: Hypoxia-inducible nuclear factors bind to an enhancer element located 3' to the human erythropoietin gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 5680-5684.
2. Wang GL, Jiang BH, Semenza GL, et al.: Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 5510-5514.
3. Iliopoulos O, Jiang C, Kaelin WG, et al.: Negative regulation of hypoxia-inducible genes by the von Hippel-Lindau protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:10595-10599.
4. Kaelin WG: The VHL tumor suppressor gene: insights into oxygen sensing and cancer. *Trans Am Clin Climatol Assoc* 2017; 128: 298-307.
5. Jaakkola P, Mole DR, Ratcliffe PJ, et al.: Targeting of HIF- α to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation. *Science* 2001; 292: 468-472.
6. Mircea I, Kondo K, Kaelin WG, et al.: HIF α targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: Implications for O₂ sensing. *Science* 2001; 292: 464-468.
7. Maxwell PH, Wiesener MS, Ratcliffe PJ, et al.: The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature* 1999; 399: 271-275.
8. Hanahan D, Weinberg RA: Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011; 144: 646-674.
9. Hu M, Polyak K: Microenvironmental regulation of cancer development. *Curr Opin Genet Dev* 2008; 18: 27-34.
10. Hubbi ME, Gilkes DM, Semenza GL, et al.: Cyclin-dependent kinases regulate lysosomal degradation of hypoxia-inducible factor 1 α to promote cell-cycle progression. *Proc Natl Acad Sci USA* 2014; 111:3325-3334.
11. Comerford KM, Wallace TJ, Karhausen J, et al.: Hypoxia-inducible factor-1-dependent regulation of the multidrug resistance (MDR1) gene. *Cancer Res* 2002;62: 3387-3394.
12. Vaupel P, Schlenger K, Knoop C, et al.: Oxygenation of human tumors: evaluation of tissue oxygen distribution in breast cancers by computerized O₂ tension measurements. *Cancer Res* 1991; 51: 3316-3322.
13. Lundgren K, Holm C, Landberg G: Hypoxia and breast cancer: prognostic and therapeutic implications. *Cell Mol Life Sci* 2007; 64:3233-3247.
14. Samanta D, Gilkes DM, Semenza GL et al.: Hypoxia-inducible factors are required for chemotherapy resistance of breast cancer stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2014; 111: E5429-5438.
15. Movafagh S, Crook S, Vo K: Regulation of hypoxia-inducible factor-1 α by reactive oxygen species: new developments in an old debate. *J Cell Biochem* 2015; 116: 696-703.
16. Zhang H, Qian DZ, Semenza GL et al.: Digoxin and other cardiac glycosides inhibit HIF-1 α synthesis and block tumor growth. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105: 19579-19586.
17. Gao P, Zhang H, Semenza GL et al.: HIF-dependent antitumorigenic effect of antioxidants in vivo. *Cancer Cell* 2007; 12: 230-238.
18. Kimberly BJ, Koivunen P, Kaelin WG, et al.: Paracrine induction of HIF by glutamate in breast cancer: EglN1 senses cysteine. *Cell* 2016; 166: 126-139.
19. Pennacchietti S, Michieli P, Galluzzo M, et al.: Hypoxia promotes invasive growth by transcriptional activation of the met protooncogene. *Cancer Cell* 2003; 3:347-361.
20. Onnis B, Rapisarda A, Melillo G: Development of HIF-1 inhibitors for cancer therapy. *J Cell Mol Med* 2009; 13: 2780-2786.