

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 8 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08260

研究課題名(和文) 慢性的低酸素環境において遺伝子発現を決定する選択的転写機構の解明

研究課題名(英文) Selective gene expression machinery during prolonged phase of hypoxia

研究代表者

中山 恒 (NAKAYAMA, Koh)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・准教授

研究者番号：10451923

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：研究代表者は、慢性的な低酸素環境でCREBが活性化されることをこれまでに明らかにしてきた。本研究では、CREBを活性化する慢性的な低酸素環境が、低酸素下での選択的な遺伝子発現を担う分子機構を明らかにすることをめざして研究を進めた。まず、コントロール細胞とCREB-KD細胞を比較して、慢性期低酸素でCREB特異的に発現が誘導される遺伝子群を同定した。この遺伝子群のgene ontology解析より、がんの悪性化と高い関連性が認められた。そこで、CREB-KD細胞をマウスに移植したところ、肺転移が顕著に抑制され、慢性期低酸素におけるCREBの活性化はがん転移に作用することが判明した。

研究成果の概要(英文)：We have identified that CREB becomes activated during prolonged phase of hypoxia. In this study, we aimed to understand how CREB regulates its target genes specifically under the prolonged hypoxic condition. I first compared control and CREB-KD cells, and identified a gene set which is specifically induced during prolonged phase of hypoxia. GO analysis of the gene set revealed many gene groups which are involved in malignant transformation of cancer. Finally, lung metastasis was highly inhibited in CREB-KD cells, indicating that CREB activation is involved in tumor metastasis.

研究分野：細胞医科学

キーワード：低酸素応答 転写因子 CREB 遺伝子発現

## 1. 研究開始当初の背景

個体や細胞が低酸素環境にさらされると、低酸素応答が引き起こされる。低酸素応答は呼吸や代謝、血管新生などを制御して、低酸素環境下での恒常性維持に働く。Hypoxia-Inducible Factor (HIF)は低酸素下で様々な生理応答を制御することから、低酸素応答で中心的な役割を担う転写因子として研究が進められてきた。ところが、持続した(慢性的な)低酸素環境ではHIFの発現や活性が低下することをこれまでに明らかにしてきた。さらにこの時、転写因子CREBが強く活性化されることを、研究代表者は明らかにした(JBC 2013)。CREBはcAMP刺激によって活性化されて、増殖・分化・生存などに関わる多数の遺伝子の発現を誘導することはよく知られていた。しかしながら、低酸素応答でCREBにより誘導される遺伝子群は、cAMP刺激で活性化された時のものとは同一ではないことを見出してきた。このことから、低酸素下では、CREBの標的遺伝子の中で、低酸素適応に必要な遺伝子を特異的に発現させ、不要な遺伝子の発現は抑制するという、選択的な転写が起きている可能性が考えられた。

## 2. 研究の目的

慢性期低酸素応答の分子機構の解析をCREBに着目して進めたところ、慢性低酸素下でCREBの活性化により発現する遺伝子は、cAMPを介した古典的経路のものとは一致せず、低酸素特異的な転写機構が存在することが考えられた。そこで本研究では、CREBを活性化する低酸素刺激(特に慢性的な応答)と古典的経路(cAMP刺激)を比較しながら、低酸素下での選択的な遺伝子発現を担う分子機構を明らかにすることをめざして研究を進めた。さらに、このCREBの選択的転写機構の生理的意義を、低酸素性がんのモデルを用いて明らかにしたい。

## 3. 研究の方法

### (1) 低酸素と古典的経路により活性化されるCREB標的遺伝子の網羅的な比較解析

野生型細胞とCREBノックダウン細胞を用いて実施した。これらの細胞を低酸素培養した後にmRNA-seq解析を実施し、野生型細胞で特異的に発現が上昇することを指標にCREBの標的遺伝子を網羅的に同定した。これらの遺伝子群と、これまでに報告されてきたCREBの標的遺伝子とを比較することで、低酸素に特異性を示す遺伝子を特定した。これらの遺伝子群について、それぞれのプロモーター領域をデータベースより取得して、その領域にCREBが特異的に結合する配列が存在するのかを解析した。この中のいくつかの遺伝子に関しては、CREB抗体を用いたChIP解析を実施して、CREBがプロモーター領域

に結合する可能性を検証した。また、mRNA-seqのデータに基づいたgene ontology解析を実施して、低酸素特異的なCREB経路の役割を検証した。さらに、定量PCR法を用いて、これらの遺伝子の発現が低酸素の時間経過に応じてどのように変化するかを解析した。

### (2) CREBのがん転移における役割の解析

CREBノックダウン乳がん細胞株とコントロール細胞のがん転移能を検証するために、これらの細胞をヌードマウスの尾静脈に移入して、肺転移を観察した。細胞を移入して、6週間後に肺を回収して、肺に形成された転移巣をカウントした。

### (3) 慢性期低酸素でのCREB活性化

乳がん細胞を低酸素下で培養し、経時的に回収した。また、同じ条件で、さまざまなキナーゼの阻害剤を添加した細胞も調製した。これらのサンプルをウェスタンブロットで解析し、リン酸化CREBに特異的な抗体を用いて、キナーゼ阻害剤の効果を検証した。さらに、低酸素応答を制御する遺伝子をノックダウンした細胞を調製して、その細胞におけるCREBの活性化の程度をウェスタンブロットにより検証した。

### (4) CREBの活性化と腫瘍形成能の相関

72時間まで長期的に低酸素環境で培養した乳がん細胞株におけるCREBの活性化を、リン酸化CREB抗体を用いて検証した。さらに、この細胞をヌードマウスの乳腺皮下に移植して、腫瘍の形成能を経時的に測定することで、検証した。さらに、低酸素環境下での代謝変化を、フラックスアナライザーを用いて測定した。

## 4. 研究成果

### (1) 慢性期低酸素でCREBによって誘導される標的遺伝子の同定

低酸素下で悪性化する表現型を示す乳がん細胞を材料として使用した。まず、乳がん細胞株MDA-MB231細胞からCREBを構成的にノックダウンした株(CREB-KD細胞)を樹立した。次に、コントロール細胞とCREB-KD細胞をそれぞれ低酸素環境で48時間培養した後に、発現が上昇、下降する遺伝子を、次世代シーケンサーを用いて網羅的に同定した。同定したこれらの遺伝子についてコントロール細胞とCREB-KD細胞を比較解析することで、慢性期の低酸素環境でCREB特異的に発現が誘導される遺伝子約1700個を明らかにした。次に、これらの遺伝子に関してgene ontology解析

を実施したところ、その上位には細胞外マトリックス構築、血管新生の促進、細胞間接着などに関わるグループが認められた。

#### (2) 慢性期低酸素におけるCREB標的遺伝子のがん形成における役割の解析

Gene ontology解析より明らかになった生理事象は、がんの悪性化過程と高い関連性を示すものであったことから、低酸素下におけるCREB標的遺伝子にはがん転移において何らかの役割を担うことが予想された。そこで、CREB-KD細胞をヌードマウスに移植したところ、このがん細胞の肺への転移が顕著に抑制されることが明らかになった。したがって、慢性期低酸素でCREBはがんの悪性化に働く遺伝子群を主たる標的としていることが考えられた。

#### (3) 低酸素応答時のCREB経路とERストレスシグナルのクロストーク

さらに、CREBの標的遺伝子として得られた分子には、ERストレス応答に働くPERK, IRE1aが含まれていることが判明した。そこで、CREB経路とERストレス応答経路の関連に着目した解析を新たに実施した。ERストレス経路の活性化を引き起こすツニカマシシンやタプシガルギンを培養細胞に処理したところ、CREBが活性化されることが明らかになった。一方で、ChIP解析から、PERK, IRE1a遺伝子のプロモーター領域にはCREBが結合して、その発現を正に制御していることを明らかにした。したがって、CREB経路とERストレス経路は低酸素応答時に相互に活性化し、相乗的に作用することが明らかになった。ここまでの成果を、論文として発表した。

#### (4) CREB 標的遺伝子のプロモーター領域の解析

野生型とCREB-KD細胞を比較した次世代シーケンサー解析のデータを基に、その発現量を指標としてCREB標的遺伝子の絞り込みを行い、166個(約1700個中)を低酸素慢性期にCREBによって強く制御される遺伝子と新たに定義した。絞り込んだCREB標的遺伝子の全てについて、上流1000bpまでの配列をデータベースから取得して、その領域のプロモーター解析を実施した。その結果、新たにCREB標的遺伝子と定義した群では、134遺伝子がプロモーター領域にCREB結合配列を所持していることが判明した。そこで、この遺伝子群の低酸素下での発現誘導をqPCRによって検証した。

#### (5) CREB標的遺伝子の染色体の構造解析

CREB標的遺伝子が慢性期低酸素で特異的に誘導されるためには染色体構造の変化も存在するのではないかと考えて、この134個の遺伝子を染色体構造解析の対象と決定し、そのために必要なプロープライブラリーの作製を行った。

#### (6) 低酸素慢性期でCREBが活性化される分子機構

低酸素選択性を決める分子機構として重要な位置づけにある、慢性期低酸素でCREBが活性化される分子機構の解析を実施した。CREBの活性化はリン酸化によって引き起こされることから、このリン酸化に働くキナーゼを明らかにするため、古典的経路でCREBの活性化に働く複数のキナーゼ阻害剤を処理したところ、キナーゼAの阻害剤がこのリン酸化を効果的に抑制することが判明した。一方で、急性期低酸素応答の活性化に働く因子をノックダウンしたところ、CREBの転写活性が低下することがルシフェラーゼアッセイにより明らかになった。したがって、慢性期低酸素でのCREBの活性化は急性期を経てはじめて起こることが明らかになった。そこで、キナーゼAが低酸素急性期で発現誘導される可能性を検証したが、そのような傾向は見られなかった。さらに、急性期の活性化に働く因子をノックダウンしてもCREBのリン酸化の減少は見られなかったことから、低酸素慢性期のCREBの活性を規定するのはリン酸化だけではないことが明らかになった。CREBの活性には核内移行が必要であることに着目して、この分子機構の解析に新たに着手した。

#### (7) 慢性期低酸素応答における代謝変化とがん悪性化の解析

慢性期低酸素におけるCREB標的遺伝子の中には、がんの悪性化に関与する分子が複数含まれていた。がん転移能に関与することは既に明らかにしたことから、慢性期低酸素ががん形成に及ぼす影響を次に検証した。慢性期低酸素まで長期的に培養した乳がん細胞は、顕著なCREBの活性化を示した。ところが、この細胞を免疫不全マウスに移植したところ、腫瘍形成は抑制されることが明らかになった。このことは、CREBの活性化ががんの増殖にはむしろ抑制的に働く可能性を示すものであった。このがん増殖能の低下には代謝酵素PDHの発現が関与することまでを明らかにすることができた。今後は、本研究で見出した知見を基に、CREBがPDHを含むがんの代謝にどのように作用するのかを明らかにしていきたい。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 2 件)

(1) Kikuchi D., Tanimoto K., and Nakayama K.\* CREB is activated by ER stress and modulates the unfolded protein response by regulating the expression of IRE1 $\alpha$  and PERK. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 469, 243-250, (2016) (査読あり)

(2) Yonashiro R., Eguchi K., Wake M., Takeda N.,

and Nakayama K\* Pyruvate dehydrogenase PDH-E1 $\beta$  is downregulated under prolonged hypoxic conditions and controls tumor progression by altering the metabolic status of cancer cells. *Cancer Res.*, 78, 1592-1603, (2018) (査読あり)

〔学会発表〕(計 6 件)

(1) 中山 恒  
がんの悪性化における低酸素応答シグナルと小胞体ストレス応答シグナルの新規クロストーク機構の解析 BMB2015 学会 2015年12月3日 神戸

(2) Koh Nakayama  
CREB regulates the expression of PERK and IRE1 $\alpha$ , and controls unfolded protein response under hypoxic conditions.  
*Experimental Biology2016(ASBMB annual meeting)* 2016年4月3日 San Diego, USA

(3) 中山 恒  
低酸素環境における解糖系に依存したエネルギー代謝を制御する新たな分子機構の解析 第39回日本分子生物学会年会 シンポジウム発表 2016年11月30日 横浜

(4) 中山 恒  
HIFプロリン水酸化酵素Phd3が形成するタンパク質複合体を介した細胞内エネルギー代謝機構の解析 第17回日本蛋白質科学会年会 ワークショップ発表 2017年6月20日 仙台

(5) 中山 恒  
慢性的低酸素環境においてピルビン酸脱水素酵素PDHの発現を制御する新たな分子機構の同定とそのがん性代謝確立における役割 第15回がんとハイポキシア研究会 2017年11月10日 淡路

(6) 與那城 亮、和氣 正樹、武田 憲彦、  
中山 恒  
慢性的低酸素環境はピルビン酸脱水素酵素PDHの発現を低下させてがん細胞の解糖系に依存した代謝を誘導する ConBio2017 学会 2017年12月8日 神戸

〔図書〕(計 2 件)

(1) 中山 恒: 低酸素センサー  
『**炎症と免疫**』Vol. 24(4), 271-276、先端医学社(2016)。

(2) 榎本 峻秀、中山 恒: 転写因子 CREB の長期的な低酸素応答における役割

『**細胞**』Vol. 50(4), 54-55、(ニューサイエンス社) (2018)。

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.tmd.ac.jp/mri/section/advanced/oxy/labo/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中山 恒 (NAKAYAMA, Koh)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・准教授

研究者番号: 10451923