

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：10107

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化(B)）

研究期間：2018～2022

課題番号：18KK0233

研究課題名（和文）低酸素性がんの悪性化に働く遺伝子群の3D核内配置機構の包括的解析

研究課題名（英文）Comprehensive analysis of 3D nuclear gene position involved in malignant transformation of hypoxic cancer

研究代表者

中山 恒（Nakayama, Koh）

旭川医科大学・医学部・教授

研究者番号：10451923

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,800,000円

研究成果の概要（和文）：生体は酸素の少ない低酸素環境に曝されると、代謝、呼吸などの生理応答を調節して、適応する（低酸素応答）。低酸素応答はさまざまな遺伝子の発現を上昇させる、動的な応答である。本研究では、複数の低酸素応答性遺伝子のクロマチン構造を明らかにするために、イメージングを用いた網羅的な解析を実施した。その結果、低酸素下において、低酸素応答性遺伝子のクロマチン構造変化が活発に起きていることが明らかになった。一方で、クロマチン構造変化を引き起こした遺伝子の発現には、増加するものと、減少するものが存在しており、その法則性について今後の解析で明らかにしたい。

研究成果の学術的意義や社会的意義

低酸素環境に曝されることにより、がんは悪性形質を獲得して、進展する。がんの悪性化には、さまざまな遺伝子の働きが関与する。この遺伝子発現の一翼を担っているのが低酸素応答である。複数の遺伝子の協調的な働きにより低酸素応答は惹起され、この時にはクロマチン構造の変化が活発に起きている。低酸素応答時の遺伝子発現制御機構を、クロマチン構造変化に焦点を当てて理解することにより、複数の遺伝子を同時に調節することも可能となり、がんの悪性化のプロセスを効率的に阻害するアプローチに結びつくことが期待される。

研究成果の概要（英文）：Under hypoxic conditions, our body regulate multiple physiological responses, such as respiration or metabolism, to adapt to such condition. Hypoxic response is an active process which involves induction of multiple genes. In this study, we used comprehensive imaging approach to identify chromatin structure of hypoxia-inducible genes. As a result, we have identified that conformational change of chromatin is actively taking place under hypoxic condition. However, chromatin conformational change led to either increase or decrease of gene expression depending on genes. We will try to address if there is any rule of gene expression based on chromatin conformation under hypoxic condition in our future study.

研究分野：細胞生物学

キーワード：低酸素応答 遺伝子発現 クロマチン構造 HIF CREB

1. 研究開始当初の背景

生体は酸素の少ない低酸素環境に曝されると、代謝、呼吸などの生理応答を調節して、適応する(低酸素応答)。この低酸素応答はさまざまな遺伝子の発現を上昇させる、動的な応答である。低酸素応答時に誘導される遺伝子群は、特定の生理応答(代謝、細胞の生死、細胞の移動など)を担う分子がグループとしてまとまって誘導されることが多い。低酸素応答に必要な遺伝子は適切なタイミングで速やかに誘導されないと細胞は低酸素環境に順応できず、危機的な状況に陥る。したがって、これらの遺伝子を同じタイミングで迅速に誘導するためには、転写因子がこれらの遺伝子群に同調してアクセスできるような機構が必要であると考えられる。しかしながら、低酸素に応答したクロマチン構造変化は十分に明らかではなかった。本研究では、複数の低酸素応答性遺伝子のクロマチン構造を明らかにするために、イメージングを用いた大規模な手法を用いることを計画した。High-Throughput Imaging Positioning MAPping (HIPMap)法は、大規模イメージングにより核内の遺伝子配置を網羅的に決定するシステムであり、そのデータをもとにクロマチン構造変化の有無を明らかにできる。この先進的な手法は、海外の共同研究者によって開発されたものであり、データ取得から解析までの一連のシステムを保持する同研究室との共同研究により、はじめて実現可能となる。そこで、本研究課題への支援を受けて、国際共同研究体制を構築し、研究を推進した。

2. 研究の目的

生体内のいたる所に低酸素環境は存在しており、生体の恒常性の維持のためには、適切な低酸素応答は不可欠である。また、低酸素応答はがんや免疫性疾患、虚血性疾患などの様々な病気とも密接に関わっており、これら疾患の病態の理解や治療への応用の上でも、低酸素応答の分子機構の理解は必須である。本研究では、遺伝子発現に関与する転写因子側と遺伝子側の二つの制御のうち、遺伝子側の制御に焦点を当てることで、低酸素下における効率的、かつ、協調的な遺伝子発現を実現する分子機構を明らかにすることをめざす。さらに、「遺伝子配置」は、低酸素応答に限らず、生体内の様々なイベント時の協調的な遺伝子発現制御に作用していることが考えられるので、本研究で得られた知見を普遍化することをめざす。

3. 研究の方法

(1) 細胞と低酸素培養

本研究では、乳癌細胞株 MB231 を使用した。細胞は、DMEM に 10% FBS、penicillin/streptomycin を添加した培地で維持された。低酸素培養は、1% O₂, 5% CO₂, 94% N₂ の混合ガスで満たした低酸素ワークステーション内に、培養用プレートを入れることで行った。

(2) 遺伝子の選抜

解析対象とした 186 遺伝子のうち、HIF 標的遺伝子に関しては、既に報告されている遺伝子の中から代謝酵素を中心に 40 遺伝子を選抜した。CREB 標的遺伝子に関しては、私たちが実施したマイクロアレイ解析の結果に基づき、「野生型細胞では低酸素下で発現上昇するのに対して、CREB KD 細胞では変化が見られないもの」の中から、代謝酵素を中心に 135 遺伝子を選抜した。発現変化が認められない遺伝子をコントロールとして 11 遺伝子を選抜した。

(3) HIPMap 法

384well プレートに 2000 細胞/well で細胞を播種し、1 日後に通常酸素・低酸素培養を開始した。48 時間後に、4% PFA/PBS で 15 分間固定した。その後、界面活性剤処理、ブロッキングを行ってから、一次プローブ(ゲノムとハイブリダイズ)と二次プローブ(蛍光標識されており、一次プローブとハイブリダイズ)の混合液を各 well に添加して、37°C で一晩インキュベートし、ハイブリダイゼーションした。その後、プローブ液を除去して、2xSSC, 42°C, 5 分間の洗いを 3 回、2xSSC, 60°C, 5 分間の洗いを 3 回行った。最後に、DAPI(1:2500 希釈)で 15 分間染色をした後、画像取得を実施した。

(4) 画像の取得とデータ解析

画像データはハイコンテント蛍光共焦点顕微鏡(CV7000)を用いて取得した。各 well につき、6 視野を任意に選び、各視野につき Z 軸方向に 4 枚の画像を撮影した。4 枚の断層画像の情報

を集約して、データ解析に用いた。まず、細胞の DAPI 染色像をもとに、核領域を抽出した。次いで、スポットを同定するプログラムを作製して、FISH 画像より核内のスポットの自動検出を行った。このデータをもとに、各遺伝子に座標をふり、正確な位置を決定した。その後、radial distance 解析と relative distance 解析を行った。これらの一連の解析は、KNIME ソフトウェアを用いて、複数の node を結びつけることで自動化した。

4. 研究成果

(1) 網羅的な実験系における細胞の低酸素応答性の検証

大規模な遺伝子の核内配置を決定するために、384 well プレートを使用して、低酸素培養を行う系を立ち上げた。細胞数は、1 well あたり 2000 細胞を播くことで、回収時に細胞がコンフルエントになり、細胞周期が停止した状態で核内の遺伝子配置を決定できるように設定した。さらに、384 well プレートは 16 行 x 24 列の構造となっており、外側に位置する well と内側に位置する well の間で、低酸素の条件が均一であることを、乳酸産生量と HIF の発現を各 well で計測することで、検証した。その結果、各 well において、乳酸産生量の亢進と HIF の核内への蓄積が認められ (図 1 A, B)、プレートの外側か、内側かにかかわらず、同等に低酸素応答が惹起されることが明らかになった (図 1 C)。さらに、核内の遺伝子配置を検証するに当たり、核の形状が通常酸素・低酸素の間で変化しないことを確認した。核の形状を示す代表的な指標として、核の断面積と円形度を測定したところ、いずれも通常酸素・低酸素の間で有意な違いは認められなかった (図 2A, B)。これらの結果より、通常酸素・低酸素を比較した網羅的な解析に 384 well プレートを用いることは可能であることが確認され、この形式で網羅的なイメージング解析を実施した。

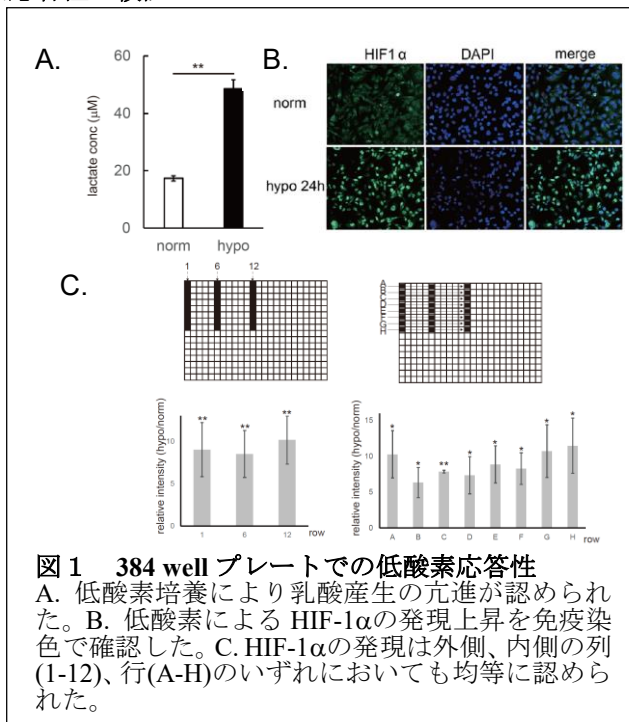


図 1 384 well プレートでの低酸素応答性
A. 低酸素培養により乳酸産生の亢進が認められた。B. 低酸素による HIF-1 α の発現上昇を免疫染色で確認した。C. HIF-1 α の発現は外側、内側の列 (1-12)、行 (A-H) のいずれにおいても均等に認められた。

(2) イメージングを用いた核内遺伝子の位置決定

イメージング解析を行うに当たり、まず、解析対象とする遺伝子を決定した。低酸素応答時に引き起こされる代謝変化に、代謝酵素の核内配置がどのように対応するのかを明らかにすることが本研究の目的である。低酸素応答時には、HIF、CREB などの転写因子が活性化され、低酸素応答性遺伝子の発現が誘導される。そこで、既知の HIF 標的遺伝子と、野生型細胞と CREB KD 細胞を比較したアレイ解析により同定した CREB の標的遺伝子の中から、代謝酵素を中心に、全部で 186 遺伝子を選抜して、解析した。一度に同時に検出できるのは三色であるため、各々の遺伝子間の距離を明らかにするために、複数枚のプレートを使用して、

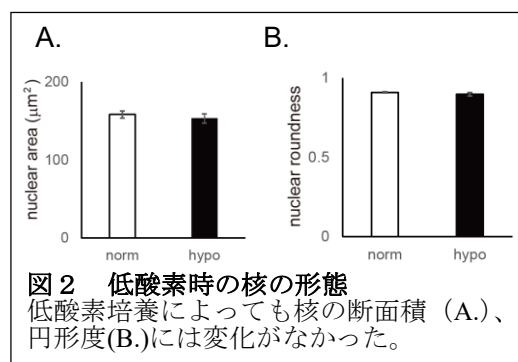


図 2 低酸素時の核の形態
低酸素培養によっても核の断面積 (A.)、円形度 (B.) には変化がなかった。

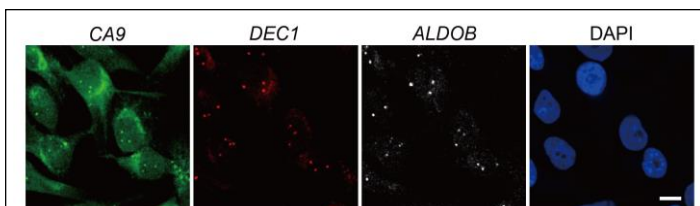


図 3 核内の遺伝子配置の決定
HIPMap 法により、3 つの遺伝子の核内配置を同時に決定した。

さまざまな遺伝子の組み合わせを検証した (図 3)。

(3) 核内における遺伝子配置の決定

核内における遺伝子の配置に変化があるのかを検証するために、まず、radial distance 解析を実施した。この解析方法は、核を正円と見立て、核膜を 0、核の中心を 1 として、その遺伝子が核膜からどのくらいの距離にあるのかを明らかにするものである (範囲は 0 から 1)。通常酸素と低酸素条件を比較して、数値が大きくなれば、遺伝子は核の中央に向かって移動したことを示し、逆に小さくなれば、核膜に向かって移動したことを示す。通常酸素、低酸素を比較した二回の実験で、十分な n 数が確保されて、かつ、再現性が高く、比較可能と判定された遺伝子は全部で 89 遺伝子あり、その中で、通常酸素と低酸素の間でその位置に有意な変化が認められたもの

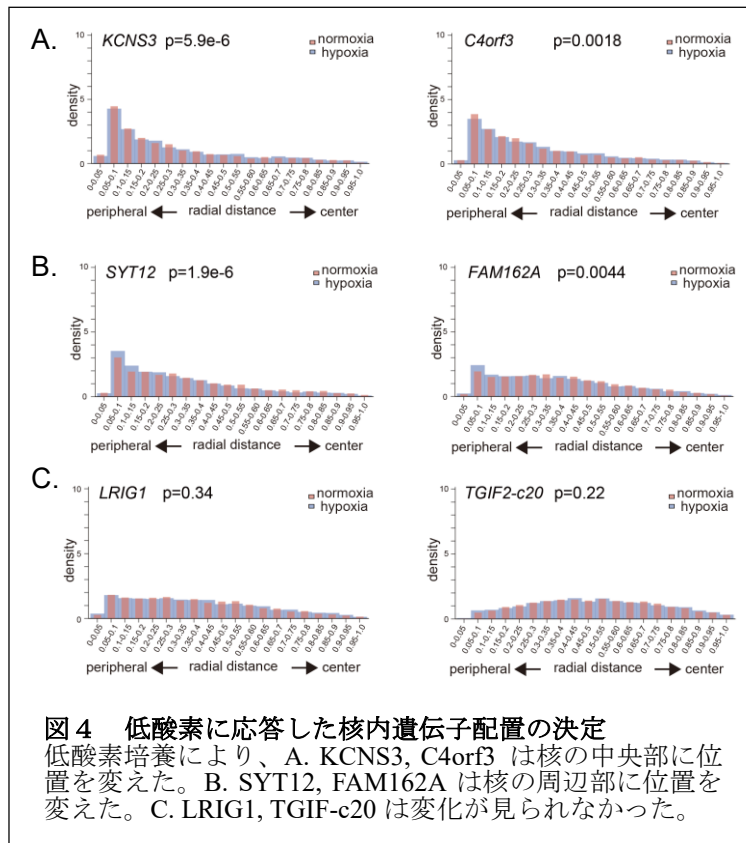


図 4 低酸素に応答した核内遺伝子配置の決定
低酸素培養により、A. KCNS3, C4orf3 は核の中央部に位置を変えた。B. SYT12, FAM162A は核の周辺部に位置を変えた。C. LRIG1, TGIF-c20 は変化が見られなかった。

は、21 遺伝子あった。カリウムチャネルの一つ KCNS3 や C4orf3 は核中央部に、シナプトタグミン SYT12 や FAM162A は核周辺部に向かって移動した (図 4 A, B)。コントロール遺伝子 LRIG1 と TGIF2-c20 は通常酸素・低酸素間での有意な位置変化は認められなかった (図 4 C)。これらの結果から、低酸素応答性遺伝子は低酸素に応じて、核中央に向かって移動するものと各周辺部に向かって移動するものに大別されることが明らかになった。

次に、画像内で認められる複数遺伝子の染色像 (最大 3 遺伝子) をもとに、同じ核内での遺伝子間の距離を測定する relative distance 解析を実施した。この解析では、核内に座標軸を設け、各遺伝子の核内染色像 (スポットとして検出、図 3) の位置を正確に決定し、二点間の距離を計算することで、遺伝子間の相対距離を求めた。その結果、解析した 159 組の遺伝子のうち、約 50% に当たる 74 組で、その距離が増加、もしくは、減少することが明らかになった。

(4) 遺伝子発現と遺伝子間距離の関連

次に、radial distance 解析と relative distance 解析で、通常酸素と低酸素の間で有意な差を示した遺伝子について、その遺伝子発現との関連を検証した。Radial distance 解析において、二条件間で有意な差を示した遺伝子は全部で 21 遺伝子あり、そのうち発現上昇が見られたのが 16 遺伝子、低下が見られたのが 5 遺伝子であった。発現上昇した遺伝子のうち、核の中央に向かって移動したものが 11 遺伝子、核の周辺部に向かって移動したものが 5 遺伝子であった。一方で、発現低下が見られたものでは、核の中央に向かって移動したものが 4 遺伝子、核の周辺部に向かって移動したものが 1 遺伝子であった (図 5)。この結果より、発現が上昇する遺伝子、発現が低下する遺伝子、いずれにおいても核の中央に移動する割合が高く、遺伝子発現様式が変化する時には、核の中央部への移動が起こる傾向が認められた。Relative distance 解析では、159 遺伝子ペアについてその遺伝子間の距離を測定したところ、そのうち 74 ペアで、低酸素に応答した有意な変化が認められた。これらの 74 ペアのうち 16 ペアでは、二遺伝子間の距離が短くなり、両遺伝

子とも発現が上昇していた(代表例を図6に示す)。一方で、17ペアでは、二遺伝子間の距離が長くなり、両遺伝子とも発現が上昇していた(代表例、図6)。残りの41ペアに関しては、片方、もしくは、両方の遺伝子の発現が低下していた。両方の遺伝子が発現低下した2ペアは、いずれも低酸素に応じて二遺伝子間の距離が短くなった。これらのことから、両遺伝子間の距離の長短と遺伝子発現には一定の相関が認められた。

(5) 考察と今後の展望

本研究では、低酸素下において遺伝子発現が変化する分子機構を、クロマチン構造に着目して解析した。Radial distance 解析により検証した低酸素応答性遺伝子の中では、発現上昇する遺伝子、発現低下する遺伝子、いずれにおいても核の中央に移動する割合が高く、遺伝子発現様式が変化する時には、核の中央部へ移動するような様式でのクロマチン構造変化が起こる可能性が示唆された。これは核の中央付近で、転写活性を制御する分子機構が存在する可能性を示唆するものかもしれない。一方で、逆の傾向を示すものも一定数存在することから、遺伝子によっては活性化される領域が、相対的に核の周辺部寄りにある可能性が考えられる。遺伝子移動の方向に法則性を見出すためには、解析の規模を大きくして、より多くの遺伝子を対象にした解析が必要であると考えられる。

本研究では、低酸素下において、クロマチン構造変化が活発に起きていることが明らかになった。それに伴う遺伝子発現は、上昇するもの、減少するもの、変化しないものが同程度の頻度で認められた。したがって、クロマチン構造変化を示すことがただちに遺伝子発現を変化させるものではないことが示唆された。クロマチンの構造変化を引き起こす分子機構として、ヒストンのアセチル化やメチル化が考えられる。ヒストン脱メチル化酵素 KDM は酸素濃度に応じて活性が変化する分子であり、そのノックアウトは、さまざまな低酸素応答性遺伝子の発現を増加させることを見出している。このことから、KDM ファミリー分子が低酸素を感知して、ヒストンメチル化状態を変化させ、クロマチン構造変化を引き起こす原動力となっている可能性が考えられ、その検証を今後の実験で進めていきたい。さらに、低酸素下で、特定の代謝酵素遺伝子のクロマチン構造が変化することは明らかになったが、その代謝経路がグループとして協調的に発現誘導されるかどうかは、今後解析対象とする遺伝子をさらに増やしていくことで明らかにしたい。

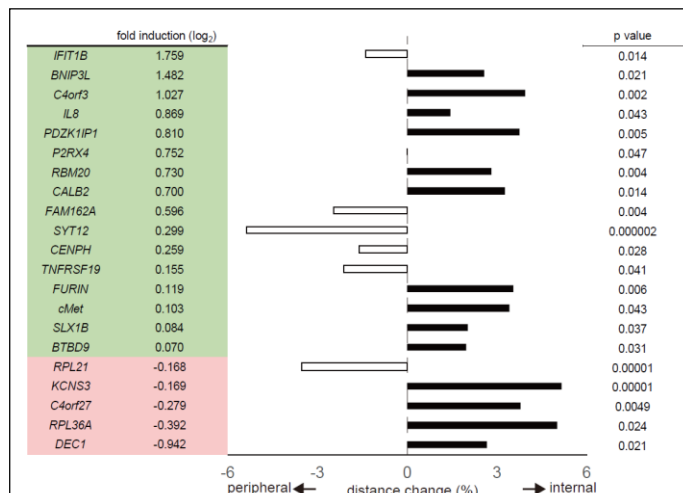


図5 低酸素応答時の遺伝子配置の変化
低酸素下で有意な位置変化を示す遺伝子を発現順に並べた。発現上昇した遺伝子を緑色、発現低下した遺伝子を赤色で示す。核の周辺部に移動した遺伝子は白色のバーで、核の中央部に移動した遺伝子は黒色のバーで示す。

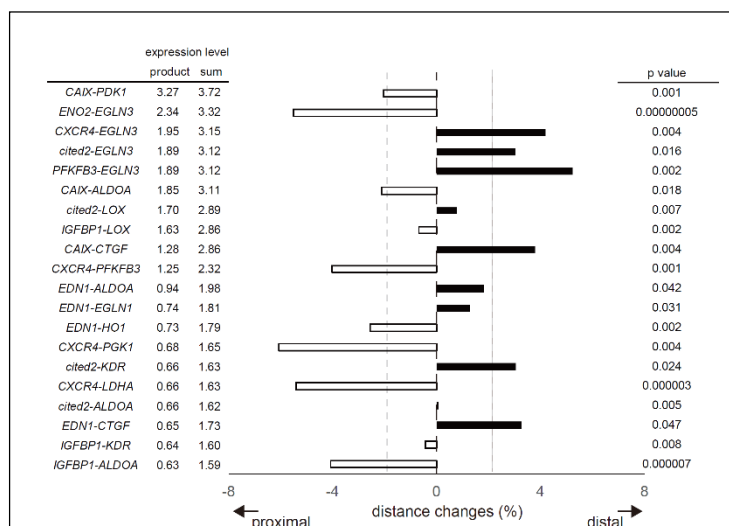


図6 遺伝子間の距離と遺伝子発現の関連
低酸素に応じて核内距離が変化する遺伝子ペアを、両遺伝子の発現変動の積が大きいものの順に配置した。白色のバーが、両遺伝子間の距離が接近したものを、黒色のバーが、両遺伝子間の距離が離れたものを示す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nakayama K.*, Shachar S., Finn EH, Sato H., Hirakawa A., Misteli T.*	4. 巻 33
2. 論文標題 Large-scale mapping of positional changes of hypoxia-responsive genes upon activation.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Mol. Biol. Cell	6. 最初と最後の頁 ar72
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1091/mbc.E21-11-0593.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Eguchi K. and Nakayama K.*	4. 巻 520
2. 論文標題 Prolonged hypoxia decreases nuclear pyruvate dehydrogenase complex and regulates the gene expression.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun.	6. 最初と最後の頁 128-135
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2019.09.109.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakayama K.* and Kataoka N.*	4. 巻 20
2. 論文標題 Regulation of Gene Expression under Hypoxic Conditions.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Int. J. Mol. Sci.	6. 最初と最後の頁 E3278(1-15)
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms20133278	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計19件（うち招待講演 8件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 中山 恒
2. 発表標題 がんの低酸素応答における早期と長期の遺伝子発現制御機構の解析
3. 学会等名 第96回 日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中山 恒
2. 発表標題 Regulatory mechanism of gene expression during early and late phase of hypoxic response
3. 学会等名 第45回 日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小林之乃、中山 恒
2. 発表標題 乳がんの腫瘍形成におけるピルビン酸デヒドロゲナーゼPDH-E1b の機能解明
3. 学会等名 第73回 日本薬理学会北部会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 谷内秀輔、中山 恒
2. 発表標題 低酸素環境で誘導される小胞体ストレス応答のタンパク質分解による制御機構
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中山 恒
2. 発表標題 低酸素環境に応答した核内遺伝子配置変化の解析
3. 学会等名 第72回 日本薬理学会北部会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中山 恒
2. 発表標題 クロマチン動態から考える低酸素下の遺伝子発現制御
3. 学会等名 がんとハイポキシア研究会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中山 恒
2. 発表標題 Hypoxia induces positional changes of genes in the nucleus
3. 学会等名 第44回 日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中山 恒
2. 発表標題 Repositioning of hypoxia-responsive genes in the nucleus under prolonged hypoxic conditions
3. 学会等名 第95回 日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中山 恒
2. 発表標題 Transcriptional and post-transcriptional regulation under hypoxic conditions
3. 学会等名 第43回 日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中山 恒
2. 発表標題 Novel role of pyruvate dehydrogenase PDH -regulation of histone acetylation and gene expression in breast cancer cells-
3. 学会等名 第94回 日本薬理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中山 恒
2. 発表標題 Formation of aberrant tumor metabolism under hypoxic condition
3. 学会等名 第94回 日本細菌学会総会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Nakayama K.
2. 発表標題 Nuclear pyruvate dehydrogenase complex is downregulated during prolonged hypoxia and regulates the gene expression.
3. 学会等名 Keystone Symposia: Hypoxia (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Nakayama K.
2. 発表標題 Prolonged hypoxic condition downregulates Pyruvate Dehydrogenase PDH-E1 and controls the tumor growth by altering the metabolic status in breast cancer cells.
3. 学会等名 27th FAOBMB meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中山 恒
2. 発表標題 Phd-HIFシステム依存的・非依存的に制御される細胞内エネルギー代謝の分子機構
3. 学会等名 第42回 日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中山 恒
2. 発表標題 核に局在するピルビン酸脱水素酵素PDHを介した遺伝子発現制御機構の解析
3. 学会等名 第17回 がんとハイポキシア研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中山 恒
2. 発表標題 分子シャペロンTCPファミリーによるピルビン酸脱水素酵素PDHの活性制御機構の解析
3. 学会等名 第92回 日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中山 恒
2. 発表標題 ピルビン酸脱水素酵素PDH-E1 は長期的な低酸素環境で減少してがん性代謝を制御する
3. 学会等名 第41回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中山 恒
2. 発表標題 長期低酸素環境はピルビン酸脱水素酵素PDH-E1 を減少させ、がん性代謝を制御する
3. 学会等名 第16回 がんとハイポキシア研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Koh Nakayama
2. 発表標題 Pyruvate dehydrogenase PDH-E1 is downregulated under prolonged hypoxic conditions and regulates tumor growth by altering the metabolic status in cancer cells
3. 学会等名 Keystone Symposia Hypoxia (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>旭川医科大学薬理学講座HP https://www.asahikawa-med.ac.jp/dept/mc/pharma/</p>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	谷本 幸介 (Tanimoto Kousuke) (60611613)	東京医科歯科大学・難治疾患研究所・助教 (12602)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	谷水 直樹 (Tanimizu Naoki) (00333386)	東京大学・医科学研究所・准教授 (12601)	
研究分担者	與那城 亮 (Yonashiro Ryo) (60453809)	東京医科歯科大学・難治疾患研究所・助教 (12602)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
米国	National Institutes of Health		