

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590343

研究課題名(和文)慢性期の低酸素応答を規定する転写因子の作用機序の解明

研究課題名(英文)Molecular mechanism of transcriptional regulation during chronic hypoxic response

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) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：低酸素応答は、低酸素環境下での個体の恒常性の維持に働く。HIFはこの低酸素応答で主要な働きをする転写因子である。一方、私は低酸素応答の慢性期にHIFの活性が低下して、HIFとは異なる機構で遺伝子発現が制御されることをこれまでに見出してきた。そこで本研究では、慢性期の低酸素応答制御でHIFの働きを代替する転写因子の同定とその慢性期低酸素応答における役割を解明することを試みた。その結果、慢性期低酸素応答に働く転写因子として新たにCREB, NF- κ Bの同定に成功した。さらに、マウスへの移植実験から、これらの因子はがんの転移能獲得に必須であることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Hypoxic response plays an important role to maintain homeostasis under hypoxic condition. HIF is a transcription factor which has a central role during hypoxic response. I have identified that the activity of HIF becomes decreased in the chronic phase of hypoxia. In this study, we tried to identify and characterize the transcription factor(s) which will substitute HIF during the chronic phase. As a result, we identified CREB and NF- κ B as such molecules. Further, these factors had a critical role to regulate the tumor metastasis in a mouse transplantation model.

研究分野：細胞生物学

キーワード：低酸素応答 転写因子 がん転移 代謝制御

1. 研究開始当初の背景

低酸素応答は、造血・代謝などを調節して、低酸素環境下での個体の恒常性の維持に働く。低酸素応答は、大きな変化を伴い適応する急性期と、活動を保つ慢性期に区分できる。両過程にはいずれも、転写因子 Hypoxia Inducible Factor (HIF)が主要な働きをしていると考えられてきた。一方申請者は、慢性期に HIF の活性が低下して、HIF とは異なる機構で遺伝子発現が制御されることを新たに見出した。したがって、慢性の低酸素環境下では、HIF を代替する転写因子の働きが示唆された。

2. 研究の目的

本研究では、これまでの知見に基づき、慢性期低酸素下で誘導される遺伝子を同定して、そのプロモーターを解析することで、慢性低酸素環境で働く転写因子を同定することをめざした。さらに、同環境下で、同定された転写因子が担う細胞応答制御機構を明らかにすることを試みた。本研究で行った細胞実験では、急性期を 5 24 時間まで、慢性期を 24 時間以降と定義した。本研究では、主に以下の三つの点の解明をめざして進めた。

慢性期低酸素環境で HIF を代替する転写因子 X の同定とその標的遺伝子の決定

慢性期低酸素環境で転写因子 X が活性化される分子機序の解明

低酸素性癌の悪性化における転写因子 X の役割の解明

3. 研究の方法

(1)プロモーター解析

MMP1 プロモーターの転写開始点より上流の 3000bp のゲノム領域をルシフェラーゼベクターに組み込んで、レポーターを作製した。さらに、このベクターの上流 1500bp までのみを持つ上流変異体、ならびに、そこから 300bp ずつ削除した変異体のシリーズも作製した。これらのベクターを HeLa 細胞に導入して、通常酸素・低酸素環境で比較しながらルシフェラーゼアッセイを行い、慢性期低酸

素で活性化される領域を決定した。

(2)RNA-seq 解析

MDA-MB-231 細胞を通常酸素、または、低酸素環境で 48 時間培養した後に、mRNA を抽出した。抽出した mRNA を用いて逆転写反応を行った後、Ion PGM 次世代シーケンサーを用いて、慢性期低酸素で誘導される遺伝子を網羅的に同定した。

(3)ヌードマウスを用いた肺転移の検証

CREB/NF- B に対する siRNA を MDA-MB-231 細胞に同時に導入して、両分子のノックダウン細胞を作製した。生後 4 週のヌードマウスの尾静脈に control、または、CREB/NF- B ノックダウン細胞を 5×10^5 個移植した。6 週間飼育した後に、肺を摘出して、肺表面に形成された微小転移数を計測した。

(4)ピルビン酸脱水素酵素(PDH)の活性測定

PHD3^{+/+}、または、PHD3^{-/-}マウスより樹立された繊維芽細胞株を通常酸素・低酸素環境で 24 時間培養した後に、細胞よりタンパク質を抽出した。PDH 抗体がコーティングされたメンブレンを用いて、細胞抽出液から PDH を精製した後、PDH の酵素反応に必要な因子を添加して、発色反応により PDH 活性を測定した。

4. 研究成果

(1)慢性期低酸素に働く転写因子の同定

低酸素環境で 24 時間培養した HeLa 細胞を用いて DNA マイクロアレイ解析を行い、慢性期低酸素で発現が誘導される遺伝子として *MMP1* を同定した。*MMP1* プロモーターの低酸素応答性領域には、CREB, NF- B の結合配列が近接して存在していることが判明した。これらの転写因子は、48 時間以降の慢性期の低酸素環境でその活性が顕著に増加することが明らかになった (図 1)。

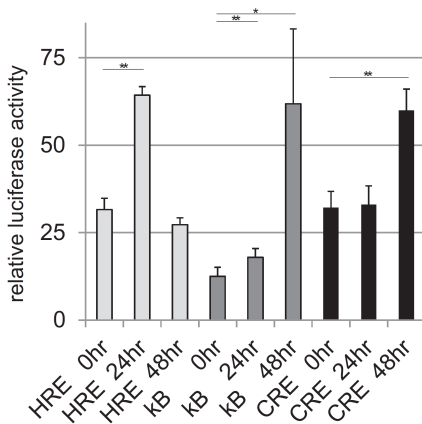


図 1 慢性的低酸素環境における NF- B, CREB の活性化

(2)慢性期低酸素応答に働く転写因子 CREB, NF- B の作用機序

低酸素培養 24~48 時間以降で活性が上昇する CREB, NF- B の活性制御機構について解析を進めた。HeLa 細胞や MDA-MB-231 細胞を用いた解析から、NF- B はその負の制御因子である I B の分解を介した canonical pathway により、CREB はリン酸化されることにより、活性が正に制御されていることが明らかになった。さらに、これらの分子の活性化に、急性期で働く HIF の活性が必要であるかを、HIF ノックダウン細胞を用いて検討したところ、NF- B 経路は正常に活性化されたが、CREB 経路はその活性が顕著に抑制されることが明らかになった。

(3)RNA-seq 解析による新規慢性期因子の同定

MDA-MB-231 細胞の慢性期低酸素 (48 時間以降) 培養で発現が増大してくる遺伝子の網羅的な同定を、次世代シーケンサーを用いた RNA-seq 解析により試みた。Gene ontology 解析より、膜受容体を介したシグナル経路に関与する遺伝子が主に増加することが判明した。また、発現量が顕著に増加する機能未知の遺伝子に着目して解析を進め、その発現

が慢性期に特異的に増加することを real time PCR を用いて明らかにした。また、これらの遺伝子のクローニングも実施して、その機能解析を細胞内の転写制御に着目して進めている。

(4)CREB, NF- B のがん転移における役割

CREB, NF- B のがん浸潤・転移における役割を、*in vitro* 実験およびマウスへの移植実験を用いて検証した。MDA-MB-231 細胞の CREB, NF- B, MMP1 をそれぞれノックダウンした stable line を樹立した。これらの株は野生型と比べて、細胞移動能、浸潤能が顕著に低下していた。さらに、CREB/NF- B ノックダウン細胞をヌードマウスに移植したところ、コントロール細胞と比べて顕著にがん転移能が抑制された (図 2)。このことから、慢性期低酸素で活性化される CREB/NF- B 経路が、MMP1 の発現誘導を制御して、がん転移に重要な働きをしていることが明らかになった。

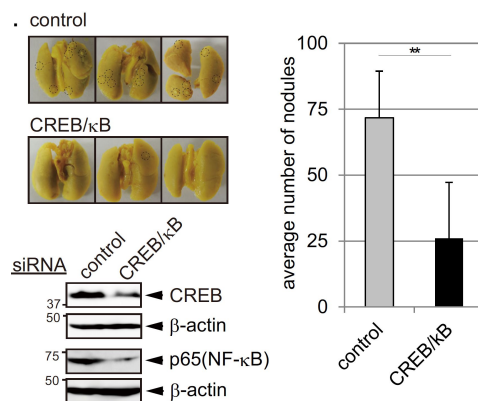


図 2 NF- B, CREB のノックダウンによる肺転移の抑制

(5)低酸素環境におけるがんの代謝制御

がんは低酸素環境を形成して、解糖系に依存した代謝様式を示す。ピルビン酸脱水素酵素 PDH はピルビン酸をアセチル CoA へと変換する酵素であり、解糖系と TCA 回路を結びつける役割を担う。PDH は E1、E1、E2、E3 の 4 つのサブユニットから構成される複合体として存在し、ミトコンドリア内で働く。

細胞分画実験から PHD3 もミトコンドリアに存在していることが明らかになり、さらに PHD3 は、四種すべてのサブユニットと結合することが判明した。そこで、PHD3 の発現を siRNA を用いて抑制したところ、PDH 複合体が不安定化して、PDH の酵素活性が有意に減少することが明らかになった。同様の結果が、PHD3^{-/-}マウスより得た繊維芽細胞においても認められた(図3)。これらの結果から、PHD3 は低酸素下のミトコンドリア内で、PDH と結合することにより PDH 複合体の安定性を保持し、PDH 活性を正に制御する分子であることが明らかになった。低酸素下では、PDH の活性は減少していく一方で、PHD3 との結合は強くなる。このことから、PHD3 は低酸素下での PDH 活性を微調整して、解糖系と TCA 回路のバランスを調節することで、低酸素の程度に応じた効率的なエネルギー産生ができるように働いていると考えられる。

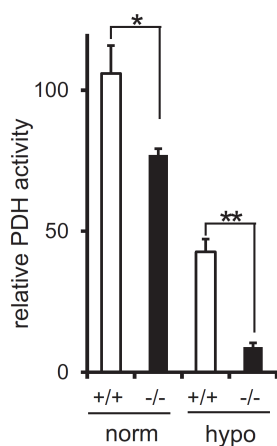


図3 PHD3^{-/-}細胞における PDH 活性の低下

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3件)

1. Kikuchi D., Minamishima YA., and Nakayama K. * Prolyl-hydroxylase PHD3 interacts with pyruvate dehydrogenase (PDH)-E1beta and regulates the cellular PDH activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 査読有り, **2014**, 451, 288-294.

2. Nakayama K., Nangaku M. Hypoxia-inducible factor and signal transducer and activators of transcription 3: two central regulators meet to regulate kidney pathophysiology. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 査読有り, **2013**, 40, 251-252.

3. Nakayama K.* CREB and NF-κB are activated during prolonged hypoxia and cooperatively regulate the induction of matrix metalloproteinase *MMP1*. *J. Biol. Chem.* 査読有り, **2013**, 288, 22584-22595.

[学会発表](計8件)

1. 中山 恒、他一名
HIFプロリン水酸化酵素PHD3はピルビン酸脱水素酵素 PDH-E1beta と結合して、細胞内のエネルギー代謝を制御する
第37回日本分子生物学会年会 2014年11月27日 横浜

2. 中山 恒

- HIFプロリン水酸化酵素PHD3とピルビン酸脱水素酵素PDHの相互作用を介したエネルギー代謝制御機構
2014年 第87回日本生化学会大会 10月17日 京都

3. Koh Nakayama

- Activation of NF- B/CREB pathway during prolonged hypoxia induces *Matrix Metalloproteinase (MMP)1* expression and promotes the invasive ability of cancer cells.

Keystone Symposia: Sensing and Signaling of Hypoxia

2014年1月9日 Breckenridge, USA

4. 中山 恒

- NF- B/CREB pathway is activated during chronic hypoxia and induces *Matrix*

Metalloproteinase (MMP)1 expression to promote the invasive ability of cancer cells.

第 36 回日本分子生物学会年会 2013 年 12 月 5 日 神戸

5. 中山 恒

長期の低酸素応答による NF- B/CREB 経路の活性化はマトリックスメタロプロテアーゼ *MMP1* の発現誘導を介してがん細胞の浸潤能を亢進する

第 86 回日本生化学会大会 2013 年 9 月 12 日 横浜

6. Koh Nakayama

Activation of NF- B/CREB pathway during chronic hypoxia induces *Matrix Metalloproteinase (MMP)1* expression and promotes the invasive ability of cancer cells.

Gordon Research Conference: Matrix Metalloproteinases 2013 年 5 月 23 日 Barga, Italy

7. 中山 恒

急性期と慢性期の低酸素応答において活性化される転写因子の機能解析

第 85 回日本生化学会大会 2012 年 12 月 14 日 福岡

8. 中山 恒

長期低酸素応答における NF- B/CREB 経路の活性化はマトリックスメタロプロテアーゼ *MMP1* の発現を誘導してがん細胞の浸潤能を亢進する

第 35 回日本分子生物学会年会 2012 年 12 月 12 日 福岡

〔図書〕(計 2 件)

1. 中山 恒・合田 亘人 (2012) 多彩な生命現象に働く低酸素応答システム 実験

医学 5 月号 Vol.30(8) 1246-1251、(羊土社)

2. 中山 恒 (2012) PHD によって制御される低酸素応答シグナル HIF 経路と HIF 非依存的経路の役割 実験医学 5 月号 Vol.30(8) 1283-1288、(羊土社)

〔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

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし