

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461886

研究課題名(和文) 腫瘍内微小環境と概日リズムの相互作用による放射線抵抗性機構の解明とその克服

研究課題名(英文) Interplay between a circadian clock regulator, PER2, and HIF-1

研究代表者

森嶋 章代 (Morinibu, Akiyo)

京都大学・放射線生物研究センター・研究員

研究者番号：20722648

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)：PER2がHIF-1 の発現量に影響を及ぼさないことを確認した。PER2蛋白質がHIF-1 蛋白質と結合し、HIF-1 のHREへのリクルートを促進することが分かった。PER2によるHIF-1の活性化は、HIF-1 N803が水酸化されていない時のみ観察された。しかし、PER2蛋白質とHIF-1 蛋白質のインタラクションは、N803の水酸化ステータスの影響を受けなかった。以上の結果は、N803の水酸化状態をモニターできるセンサー分子の助けを借りて、PER2がHIF-1 のHREに対するリクルートを促進するエフェクター分子として機能する可能性を示唆している。

研究成果の概要(英文)：HIF-1 is a transcription factor functioning in cellular responses to hypoxia. Recent studies have suggested that HIF-1 activity is upregulated by a circadian clock gene, PER2. Here, we analyzed its underlying mechanism in detail. Co-immunoprecipitation experiments and CHIP assay revealed that PER2 interacted with HIF-1 and facilitated the recruitment of HIF-1 to its enhancer, HRE. The PER2-mediated activation of HIF-1 was observed only when HIF-1 N803 was unhydroxylated. However, the extent of PER2-HIF-1 interaction was equivalent regardless of the N803 hydroxylation status. Taken together, these results suggest that, with the help of an unknown sensor molecule for the N803 hydroxylation status, PER2 functions as an effector molecule for the recruitment of HIF-1 to promoter regions of its downstream genes. Our findings provide a novel regulatory step in the activation of HIF-1, which can be targeted to develop therapeutic strategies against HIF-1-related diseases, e.g. cancers.

研究分野：放射線腫瘍生物学

キーワード：がん 低酸素 概日リズム

## 1. 研究開始当初の背景

がん細胞のエネルギー代謝経路(特に糖代謝経路)が、正常細胞のそれとは大きく異なることが知られている。例えば、がん細胞では嫌氣的解糖系が亢進し、逆に酸化的リン酸化が抑制されている(Warburg 効果として知られている)。エネルギー代謝経路の変化は、およそ全てのがん細胞に共通に見られる特徴として近年注目を集めているが、Warburg 効果が誘導されるメカニズムは十分に解明されていない。

低酸素誘導性転写因子(hypoxia-inducible factors: HIFs)は低酸素環境におかれた細胞の内部で活性化し、細胞の低酸素レスポンスで重要な役割を果たす転写因子である。HIFsは血管新生、細胞の運動性、糖代謝経路の最適化などをはじめとする多くの細胞機能に関与しており、がんを含む様々な疾患の発症と悪性化に関与していることが知られている。このような状況下、HIFsの活性制御機構に関する研究が盛んにおこなわれている。中でも、HIF-1がWarburg効果のマスター遺伝子として機能していることが明らかになっているが、その活性制御メカニズムには依然として不明な点が多い。

代謝や睡眠をはじめとする生命現象の多くは、約24時間周期で変動することが知られ、概日リズムと呼ばれている。概日リズムの破綻によって、がんや生活習慣病などを含む様々な疾患が引き起され、また悪性化することが知られている。また近年、抗がん剤を投与する時間帯によって、その治療効果が大きく左右されるという興味深い研究成果も報告されている。このことから、腫瘍内の概日リズム制御の重要性が示唆されている。

本研究プロジェクトに着手するまでに、概日リズム制御因子の活性が、酸素分圧の低下した微小環境の影響を受けることが報告されていた。我々は、低酸素で処理した細胞においてPER2の遺伝子発現が増強することを見出していた。また、概日リズム制御機構から低酸素応答機構への影響については、概日リズム調節因子の一つであるPER2が、HIF-1 $\alpha$ 蛋白質を安定化し、細胞の虚血抵抗性を向上させることも報告されていた。我々の研究室でも、PER2の過剰発現によって細胞の低酸素応答が増強するという結果を得ていた。この様に、細胞の低酸素応答機構と概日リズム制御機構のクロストークが報告されてきたが、その根底に存在する制御メカニズムは十分には解明されていなかった。

このような状況下、「概日リズム」と「細胞の低酸素レスポンス」の二者をつなぐ制御機構を解明することによって、がんの悪性化や治療抵抗性を導くメカニズムの一端に迫ることが出来ると着想するに至った。

## 2. 研究の目的

(1) 概日リズムと低酸素応答の相互作用を担う分子機構を解明することを目指した。

(2) がんが悪性形質や治療抵抗性を獲得するメカニズムに迫ることを目指した。

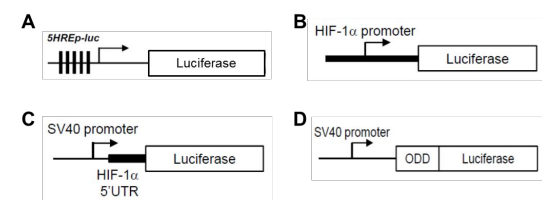
(3) PER2がHIF-1活性を亢進する機序を解明することを目指し、研究を進めた。

## 3. 研究の方法

(1) PER2によるHIF-1活性亢進メカニズムの解析

本研究に着手するまでの研究で我々は、HIF-1活性(A)、HIF-1 $\alpha$ プロモーター活性(B)、HIF-1 $\alpha$ 遺伝子の翻訳開始効率(C)、HIF-1 $\alpha$ 蛋白質の安定性(D)、HIF-1 $\alpha$ のtrans-activation活性のそれぞれをルシフェラーゼ発光強度として定量するレポーター遺伝子を構築してきた(図1)。これらを用いて、PER2が、いかなる作用点でHIF-1を活性化するのかを同定した。そして、同定された作用点に応じて、Western blottingやquantitative RT-PCR、免疫沈降法、クロマチン芽根木沈降実験等の実験を適宜組み合わせ、作用機序解析を行った。

図1. 本研究で用いたレポーター遺伝子



## 4. 研究成果

HIF-1活性をルシフェラーゼ発光としてモニターできるレポーター遺伝子(図1A)を用いて、PER2の過剰発現によってHIF-1活性が有意に亢進することを確認した。HIF-1 $\alpha$ 遺伝子の転写開始効率をルシフェラーゼ発光としてモニターできるレポーター遺伝子HIF-1 $\alpha$  promoter-luc(図1B)を用いて、PER2の過剰発現によって転写開始効率が変化しないことが明らかになった。HIF-1 $\alpha$ 遺伝子の翻訳開始効率をルシフェラーゼ発光としてモニターできるレポーター遺伝子HIF-1 $\alpha$  5'UTR-luc(図1C)を用いて、PER2の過剰発現によって翻訳開始効率が変化しないことが明らかになった。HIF-1 $\alpha$ 蛋白質の安定性をルシフェラーゼ発光としてモニターできるレポーター遺伝子SV40p-PDD-lucを用いて、PER2の過剰発現によってタンパク質安定性が影響を受けないことを確認した。共免疫沈降実験とクロマチン免疫沈降実験によって、PER2蛋白質がHIF-1 $\alpha$ 蛋白質と結合し(少なくとも複合体を形成し)、HIF-1 $\alpha$ 特異的エンハンサーhypoxia-response element(HRE)へのHIF-1 $\alpha$ のリクルートを亢進していることが明らかになった。PER2によるHIF-1の活性化は、(1)HIF-1 $\alpha$  N803をAに改変すること、(2)HIF-1 $\alpha$  N803を水酸化するFIH-1の阻害剤 deferozamine で細胞を処理すること、および(3)細胞を低酸素環境下で培養すること

によって、HIF-1 $\alpha$  N803 が水酸化されていない時のみ観察された。しかしながら、PER2 蛋白質と HIF-1 $\alpha$  蛋白質のインタラクションは、N803 の水酸化ステータスに関わらず、常に一定であった。

以上の結果は、N803 の水酸化状態をモニターできるセンサー分子の助けを借りて、PER2 が HIF-1 $\alpha$  の HRE に対するリクルートを促進するエフェクター分子として機能する可能性を示唆している。

## 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 5 件)

- (1) Yeom CJ, Zeng L, Goto Y, Morinibu A, Zhu Y, Shinomiya K, Kobayashi M, Itasaka S, Yoshimura M, HurCG, Kakeya H, Hammond EM, Hiraoka M, \*Harada H. LY6E: a conductor of malignant tumor growth through modulation of the PTEN/PI3K/Akt/HIF-1 axis. *Oncotarget*. 11670. 2016. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27589564>. doi: 10.18632/oncotarget.11670.
- (2) Inoue M, Yoshimura M, Kobayashi M, Morinibu A, Itasaka S, Hiraoka M, \*Harada H. PLK1 blockade enhances therapeutic effects of radiation by inducing cell cycle arrest at the mitotic phase. *Scientific Reports*. 5:15666. 2015. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=26503893>. doi: 10.1038/srep15666.
- (3) Zeng L, Morinibu A, Kobayashi M, Zhu Y, Wang X, Goto Y, Yeom CJ, Zhao T, Hirota K, Shinomiya K, Itasaka S, Yoshimura M, Guo G, Hammond EM, Hiraoka M, \*Harada H. Aberrant IDH3 $\alpha$  expression promotes malignant tumor growth by inducing HIF-1-mediated metabolic reprogramming and angiogenesis. *Oncogene*. 34:4758-4766. 2015. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25531325>. doi: 10.1038/nc.2014.411.
- (4) Goto Y, Zeng L, Yeom CJ, Zhu Y, Morinibu A, Shinomiya K, Kobayashi M, Hirota K, Itasaka S, Yoshimura M, Tanimoto K, Torii M, Sowa T, Menju T, Sonobe M, Kakeya H, Toi M, Date H, Hammond EM, Hiraoka M, \*Harada H. UCHL1 provides diagnostic and antimetastatic strategies due to its deubiquitinating effect on HIF-1 $\alpha$ . *Nature Communications*. 6: 6153.2015. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25615526>. doi: 10.1038/ncomms7153.

- (5) Zhao T, Zhu Y, Morinibu A, Kobayashi M, Shinomiya K, Itasaka S, Yoshimura M, Guo G, Hiraoka M, \*Harada H. HIF-1-mediated metabolic reprogramming reduces ROS levels and facilitates the metastatic colonization of cancers in lungs. *Scientific Reports*. 4:3793. 2014. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24452734>. doi: 10.1038/srep03793.

[学会発表](計 9 件)

- (1) 中島良太、後藤容子、子安翔、小林稔、森嶋章代、吉村通央、平岡真寛、HAMMOND EM、原田浩. UCHL1-HIF-1 経路の阻害による放射線治療抵抗性改善の可能性. 第 19 回癌治療増感研究シンポジウム. 奈良. 2017 年 2 月 4 日.
- (2) 堤ゆり江、森嶋章代、吉村通央、平岡真寛、原田浩. HIF-1 陽性低酸素がん細胞が放射線治療後の再発に及ぼす影響. 第 19 回癌治療増感研究シンポジウム. 奈良. 2017 年 2 月 4 日.
- (3) Tsutsumi Y, Yoshimura M, Morinibu A, Hiraoka M, Harada H. The Influence of hypoxic cancer cells on recurrence after irradiation. The 29th Annual Meeting of Japanese Society of Radiation Oncology. Kyoto. Nov. 25-27. 2016.
- (4) 堤ゆり江、森嶋章代、吉村通央、平岡真寛、原田浩. 低酸素がん細胞が放射線治療後の再発に及ぼす影響. 第 22 回癌治療増感研究会学術総会. 沖縄. 2016 年 7 月 2 日.
- (5) Koyasu S, Morinibu A, Hammond EM, Harada H. A novel HIF-1-promoting factor, HPF-4, as a target for radio-sensitization. The 2nd KU RBC-CEA Joint Workshop. Kyoto. Apr 11-12. 2016.
- (6) 小林稔、森嶋章代、子安翔、後藤容子、平岡真寛、原田浩. Molecular mechanisms underlying the crosstalk between period circadian clock 2 (PRE2) and hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1). 第 14 回がんとハイポキシア研究会. 岐阜. 2016 年 11 月 4 日.
- (7) Koyasu S, Morinibu A, Hammond EM, Harada H. A novel HIF-1-promoting factor, HPF-4, may promote tumor invasiveness. The 32nd. International Symposium of Radiation Biology Center, Kyoto University 2016. Kyoto. Sep. 1-2. 2016.
- (8) Kobayashi M, Morinibu A, Koyasu S, Goto Y, Nakashima R, Hiraoka M, Harada H. Molecular mechanisms underlying the crosstalk between circadian clock gene, PRE2, and

- hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1). The 32nd. International Symposium of Radiation Biology Center, Kyoto University 2016. Kyoto. Sep. 1-2. 2016.
- (9) Tsutsumi Y, Koyasu S, Kobayashi M, Morinibu A, Yoshimura M, Goto Y, Hiraoka M, Harada H. The involvement of hypoxic cancer cells in tumor recurrence after radiotherapy. The 32nd. International Symposium of Radiation Biology Center, Kyoto University 2016. Kyoto. Sep. 1-2. 2016.

(4)研究協力者  
なし

〔図書〕(計 0 件)

なし

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

なし

○取得状況(計 0 件)

なし

〔その他〕

ホームページ等

京都大学放射線生物研究センターがん細胞生物学分野ホームページ:

<http://radiotherapy.kuhp.kyoto-u.ac.jp/biology/index.html>

京都大学大学院生命科学研究科がん細胞生物学分野ホームページ:

[http://www.lif.kyoto-u.ac.jp/j/?post\\_type=labos&p=6923&doing\\_wp\\_cron=1496479570.3485410213470458984375](http://www.lif.kyoto-u.ac.jp/j/?post_type=labos&p=6923&doing_wp_cron=1496479570.3485410213470458984375)

京都大学大学院医学研究科ゲノム動態研究部門ホームページ:

[http://www.med.kyoto-u.ac.jp/organization-staff/research/doctoral\\_course/r-080/](http://www.med.kyoto-u.ac.jp/organization-staff/research/doctoral_course/r-080/)

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

森嶋 章代 (MORINIBU, Akiyo)

京都大学・放射線生物研究センター・研究員

研究者番号: 20722648

### (2)研究分担者

原田 浩 (HARADA, Hiroshi)

京都大学・放射線生物研究センター・教授  
研究者番号: 80362531

吉村 通央 (Yoshimura, Michio)

京都大学・大学院医学研究科・助教  
研究者番号: 40597936

### (3)連携研究者

なし