

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861088

研究課題名(和文)低酸素・概日周期・代謝制御の相互作用による腫瘍の悪性化と放射線抵抗性機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of mechanisms for tumor malignancy and radioresistance by crosstalk between Hypoxia, circadian rhythm and metabolic regulation

研究代表者

小林 稔(kobayashi, minoru)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・特定研究員

研究者番号：40644894

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：これまで、概日リズムと低酸素応答の間に相互作用があることは知られていたが、そのメカニズムは不明であった。そこで、本申請では概日リズムを制御する遺伝子の一つPER2と低酸素応答の間の相互作用機構について解析を行った。その結果、低酸素によるPER2遺伝子発現上昇は、低酸素誘導因子(HIF)に依存せず、転写開始点近傍の配列が重要であることが明らかになった。また、PER2のN末端領域によって、HIF-1のC末端転写活性化領域の転写活性化能が亢進することが明らかになった。今後、さらに詳細なメカニズムを明らかにすることで、生理学的・病態生理学的意義の解明につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：Previously, crosstalk between circadian rhythm and hypoxia response were reported but this mechanism is unclear. So, we analyzed mechanisms of crosstalk between PER2 which is one of circadian regulated genes, and hypoxia response. Then we revealed that the short sequence near transcription start site is important for PER2 gene upregulation by hypoxia but Hypoxia-Inducible Factor (HIF) does not contribute to this regulation. And we found that PER2 protein N-terminal region enhance transactivation activity from HIF-1 C-terminal transactivation domain. In future, by clarify the mechanisms of crosstalk between circadian rhythm and hypoxia responses, we expect unraveling of physiological and pathophysiological significance in this crosstalk.

研究分野：放射線腫瘍学

キーワード：低酸素 概日リズム

1. 研究開始当初の背景

代謝や睡眠など、多くの生命現象は約 24 時間周期の変動リズム(概日リズム)を持っており、そ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こされることが知られている。さらに、近年の報告で、抗がん剤の効果が投与する時間帯により大きく変化することが明らかとなっている。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。

これまでに、いくつかの概日リズム調節因子が低酸素環境によって影響を受けることが明らかとなっているが、どのような機序により、概日リズム因子が変化するのかについてはほとんど明らかとなっていない。また近年、概日リズム調節因子の一つである PER2 が低酸素誘導因子(HIF)-1 α を安定化し、虚血耐性に関わることが報告され、概日リズム因子の低酸素応答への影響が明らかとなった。しかし、この HIF-1 α 安定化の詳細なメカニズムは明らかとされていない。

これらの報告に加え、申請者らは予備的検討より、PER2の大量発現によって細胞の低酸素応答が増強するという結果と、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という結果を得ており、「概日リズム」と「細胞の低酸素レスポンス」が相互作用を持つことが示唆される。

また、これら 2 つの要素は代謝の調節と相互作用を持つことが知られていることから、腫瘍においても「エネルギー代謝制御」に関与していることが考えられた。

2. 研究の目的

上記のような背景から、これまで独立して捉えられてきた「概日リズム」、「細胞の低酸素応答」、「エネルギー代謝制御」の 3 つの間に相互作用があることが予想される。

本研究では、概日リズムと低酸素応答の相互作用メカニズムの詳細な解明を行うとともに、この相互作用がエネルギー代謝制御への影響を解析する。

さらに、これらの相互作用が放射線抵抗性にどのような影響を及ぼすか解析することで、概日リズムと低酸素応答、代謝システムの相互作用による腫瘍悪性化・放射線抵抗性機構の全容に迫る。

3. 研究の方法

(1)低酸素による PER2 遺伝子誘導メカニズムの解析

HIF のノックダウンを用いて、HIF の活性を変化させた細胞における PER2 遺伝子の発現変化を判定量 PCR にて評価することで、PER2 遺伝子発現への HIF の影響を調べた。

PER2 プロモーターを系統的に短縮していった配列組みこんだレポーター遺伝子を用いて、低酸素による PER2 遺伝子誘導に重要なプロモーター領域を探索した。

(2)PER2 による HIF-1 活性亢進メカニズムの解析

HIF-1 プロモーターや 5'-UTR による翻訳制御、酸素依存的分解ドメイン(ODD) 融合 luciferase、GAL4-DNA binding domain と HIF-1 α C 末端転写活性化領域(C-TAD) 融合タンパクを用いた転写活性化制御など、HIF 制御機構をそれぞれ評価するための各種レポーターを用いて、PER2 が HIF-1 活性を亢進する作用点を解析した。

PER2 タンパクの一部だけを発現する欠失変異体発現ベクターを用いて、HIF-1 活性亢進に重要な PER2 タンパクの領域を探索した

4. 研究成果

(1)低酸素による PER2 遺伝子誘導メカニズムの解析

HIF-1 のノックダウンを行っても、PER2 の低酸素による遺伝子発現上昇は抑えられなかった。

系統的に短縮した PER2 プロモーター配列を用いた luciferase アッセイを行なった。(図 1) その結果転写開始点近傍の短い配列で、低酸素依存的な遺伝子発現誘導が見られた。また、この遺伝子発現誘導は低酸素刺激をミミックすることで知られるキレート剤 DFX の処理でも同様に誘導された。

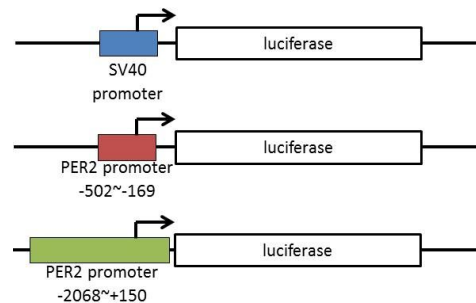


図 1 系統的に短縮した PER2 プロモーター

以上の結果から、低酸素による PER2 の誘導は、HIF 非依存的で、転写誘導に重要なプロモーター領域は転写開始点近傍の短い領域に存在することが明らかになった。

(2) PER2 による HIF-1 活性亢進メカニズムの解析

HIF-1 の作用点を解析する各種レポーターのうち、HIF-1 α C-TAD を用いたレポーターのみ、PER2 の過剰発現によって luciferase 活性が上昇した。

図 2 PER2 過剰発現による HIF-1 α C-TAD の活性化

PER2 の欠失変異体(図 2)のうち、N 末端領域で構成されるタンパクで HIF-1 活性の亢進が認められた。

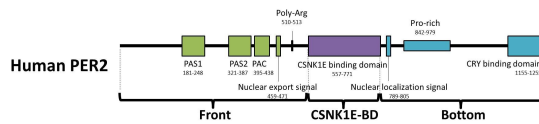


図2 PER2 欠失変異体

以上の結果から、PER2 による HIF-1 活性の亢進は、PER2 の N 末端領域による HIF-1α C-TAD の転写活性化能の上昇によるものであることが明らかになった。(図3)

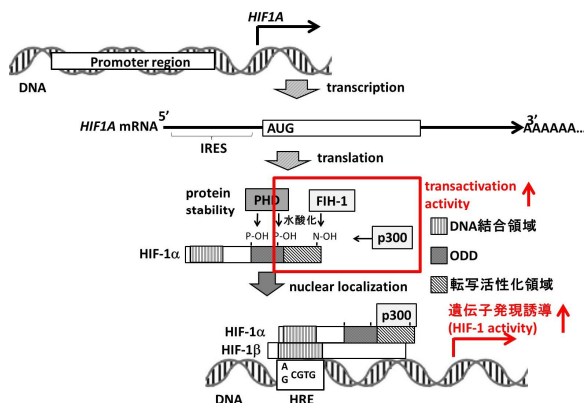


図3 PER2 による HIF-1 活性亢進メカニズム

近年、HIF-1 が腫瘍の放射線や薬剤に対する抵抗性に関与することや、抗がん剤治療の効果が投与時刻によって変化することが報告されている。今回明らかとなった低酸素応答と概日リズムのクロストーク機構は、これらの報告を説明し、さらなる発展へと繋がることで、新たな治療戦略開発に繋がることが期待される。

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 3 件)

1. Yoko Goto, Lihua Zeng, ChanJoo Yeom, Yuxi Zhu, Akiyo Morinibu, Kazumi Shinomiya, Minoru Kobayashi, Kiichi Hirota, Satoshi Itasaka, Michio Yoshimura, Keiji Tanimoto, Masae Torii, Terumasa Sowa, Tosih Menju, Makoto Sonobe, Hideaki Kakeya, Masakazu Toi, Hiroshi Date, Ester M. Hammond, Masahiro Hiraoka, Hiroshi Harada

UCHL1 provides diagnostic and antimetastatic strategies due to its deubiquitinating effect on HIF-1α.

Nature Communications. 2015 Jan 23. 6: 6153 doi: 10.1038/ncomms. 7153. 査読あり.

2. Lihua Zeng, Akiyo Morinibu, Minoru Kobayashi, Yuxi Zhu, Xiaowu Wang, Yoko Goto, ChanJoo Yeom, Tao Zhao, Kiichi Hirota, Kazumi Shinomiya, Satoshi Itasaka, Yoshimura M, Guo G, Hammond EM, Masahiro Hiraoka, Hiroshi Harada

Aberrant IDH3α expression promotes malignant tumor growth by inducing HIF-1-mediated metabolic reprogramming and angiogenesis.

Oncogene. 2014 Dec 22. doi: 10.1038/onc.2014.411. 査読あり

3. Tao Zhao, Yuxi Zhu, Akiyo Morinibu, Minoru Kobayashi, Kazumi Shinomiya, Satoshi Itasaka, Michio Yoshimura, Guozheng Guo, Masahiro Hiraoka, Hiroshi Harada.

HIF-1-mediated metabolic reprogramming reduces ROS levels and facilitates the metastatic colonization of cancers in lungs.

Scientific Reports. Jan 23(4) 3793. 2014. 査読あり 3793. doi: 10.1038/srep03793.

〔学会発表〕(計 5 件)

1. 小林 稔, 後藤 容子, 平岡 真寛, 原田 浩 時計遺伝子 PER2 と低酸素応答機構の相互作用メカニズムの解析

第 13 回 がんとハイポキシア研究会 2015 年 6 月 6 日 国立遺伝学研究所 (静岡県・三島市)

2. Minoru Kobayashi, Hiraoka Masahiro, Harada Hiroshi

Cancer cells that survive radiation therapy acquire HIF-1 activity and translocate towards tumour blood vessels.

15th International Congress of Radiation Research. Kyoto International Conference Center. Kyoto, Japan. May 27. 2015

3. 小林 稔, 平岡 真寛, 原田 浩

時計遺伝子 PER2 と低酸素応答機構の相互作用メカニズムの解析

第 12 回 がんとハイポキシア研究会 2014 年 11 月 22 日 ホテルマリタール創世佐賀 佐賀県 佐賀市

4. Minoru Kobayashi, Masahiro Hiraoka, Hiroshi Harada

Cancer cells that survive radiation therapy acquire HIF-1 activity and translocate towards tumour blood vessels.

Radiation Research Society 60th Annual Meeting Las Vegas, Nevada Sep 21. 2014

5. 小林 稔, 曾 麗華, 後藤 容子, 井上 実, 板坂 聡, 吉村 通央, 原田 浩, 平岡 真寛 IDH3 は HIF-1α を安定化して腫瘍増殖を亢進する

第 19 回 国際癌治療増感研究会 2013 6 月 8 日 東京医科歯科大学 東京都 文京区

〔図書〕(計 1 件)

1. 小林 稔, 原田 浩

“低酸素ストレスと HIF”

公益社団法人日本生化学会. 生化学 85. (2013). 187-195.

〔その他〕

ホームページ等

1. 京都大学大学院 医学研究科 放射線腫瘍学・画像応用治療学ホームページ

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

2. Nature Communications 誌に掲載された研究成果のプレスリリース(京大ホームページ)

http://kyoto-u.ac.jp/ja/resarch/resarch_results/2014/150113_1.html

3. Nature Communications 誌に掲載された論文が「注目の論文」にて紹介されたページ

<http://www.natureasia.com/ja-jp/ncomms/abstracts/61434>

6. 研究組織

(1)研究代表者

小林 稔 (KOBAYASHI, Minoru)

京都大学大学院 医学研究科 特定研究員

研究者番号：40644894