

称号及び氏名 博士（応用生命科学） 東村 泰希

学位授与の日付 平成23年3月31日

論文名 Transcription-dependent and -independent Regulatory Mechanisms by Hypoxia-inducible Factors in Cancer Cells
(がん細胞における低酸素誘導因子を介した転写依存的および非依存的な調節機構)

論文審査委員 主査 乾 博
副査 宮武 和孝
副査 笠井 尚哉
副査 山地 亮一

論文要旨

緒論

腫瘍細胞は正常細胞に比べて増殖速度が速いので、腫瘍内での血管新生は腫瘍細胞の増殖に追いつけない。それゆえ、腫瘍の生育環境は低酸素環境になる。腫瘍細胞はそのような低酸素環境という危機的な状況で生存するために低酸素応答系を活性化させる。低酸素応答系の活性化を担う遺伝子、つまり低酸素応答遺伝子の発現は、転写因子である低酸素誘導因子(HIF)によって主に調節される。

HIFにはファミリータンパク質としてHIF-1とHIF-2が存在し、それぞれHIF-1 α サブユニットとHIF-2 α サブユニットが共通のパートナーであるHIF-1 β サブユニットとのヘテロ二量体として構成される。常酸素下において α サブユニットは発現しているが、E3ユビキチンリガーゼを含むvon Hippel-Lindauタンパク質(VHL)複合体によってユビキチン化を受け、プロテアソームを介して迅速に分解される。一方、低酸素下において α サブユニットは安定に発現し核内へ移行する。その後、恒常的に発現している β サブユニットと会合し、ヘテロ二量体となり標的遺伝子に存在する低酸素応答配列(HRE)に結合することで標的遺伝子の転写を促進する。HIF-1 α とHIF-2 α は非常に類似した構造を持っているが、低酸素下での誘導様式や、標的とする遺伝子の種類が異なっている。さらに近年、HIF-1 α とHIF-2 α は細胞周期を調節する制御因子としても機能することが報告された。つまり、HIF-1 α とHIF-2 α は転写因子としてだけでなく、転写に依存しない様々な機能により、体系的に悪性腫瘍の発達を助長していると考えられる。

腫瘍細胞に特異的に発現する分子を標的とした分子標的治療に関する研究が進む中、HIFの α サブユニットもがん治療における分子標的の一つとして注目されている。多くのHIF- α 阻害剤が発見されているが、その特異性の低さゆえ、未だ有効な治療薬の開発には至っていない。つまり、HIFに関する詳細な分子機構の解明が急務とされている。そこで本研究において、第1章ではHIFの転写因子としての機能に焦点をあて、新規なHIFの転写活性化機構の解明を目指した。解糖系酵素であるグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ(GAPDH)の発現は低酸素下で亢進する。しかし、その亢進は細胞種に依存していることから、既存の分子機構とは異なる低酸素応答機構の存在が示唆される。それゆえ、GAPDHの低酸素応答機構について解析を行った。また第2章では、HIFの転写活性抑制を目的とし、ドミナントネガティブ体として作用するHIF-2 α のトランスクリプトバリエーションの探索と機能解析を行った。さらに第3章では、転写非依存的なHIFの機能に着目し、HIF-2 α がエストロゲン受容体(ER α)の発現量を調節することを見出した。

第1章 HIF-1はSp1に依存してGAPDHの発現を亢進する

低酸素下におけるグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ(GAPDH)の発現亢進は細胞種に依存することから、新規な分子機構の存在が示唆される。GAPDH遺伝子の5'上流領域(-1091~+25)には、低酸素誘導因子(HIF)の結合配列である低酸素応答配列(HRE)の候補が6つ存在しており、5'側から順にHRE1-6と名付けた。血管内皮細胞や前立腺がん細胞を用いた既知の報告では、転写開始点に近い3つのHRE、つまりHRE4-6が機能しているといわれている。種々の培養細胞において、レポーターアッセイによりGAPDHの低酸素応答機構について解析を行った結果、乳がん細胞においてのみ、HRE1-3に機能的なHREが存在する可能性が示された。それゆえ本章では、新規なHIFの転写活性化機構の解明を目指し、乳がん細胞におけるGAPDHの低酸素応答機構について解析を行った。

それぞれのHREに変異を導入しレポーターアッセイを行った結果、乳がん細胞株であるMCF-7細胞とSK-BR-3細胞ではHRE6とHRE1がHREとして機能した。一方で、前立腺がん細胞株であるLNCaP細胞ではHRE6のみが機能した。さらに、siRNAを用いたHIF-1 α のノックダウンおよび一過性の遺伝子導入によるHIF-1 α の高発現の結果、MCF-7細胞とLNCaP細胞におけるGAPDHの低酸素応答機構はHIF-1により制御されていることが判明した。また、クロマチン免疫沈降(ChIP)法の結果、両細胞においてHIF-1 α はHRE1に結合した。次に、HRE1の近傍に存在するGC-boxに変異を導入した結果、MCF-7細胞においてのみGAPDHの低酸素応答能が有意に抑制された。GC-boxに結合する転写因子であるSp1の抗体を用いてChIP法を行った結果、常酸素下と低酸素下の両方で培養したMCF-7細胞においてのみ、Sp1はGC-boxに結合することが判明した。さらに、siRNAを用いてSp1をノックダウンした結果、MCF-7細胞におけるGAPDHの低酸素応答能が有意に抑制された。以上の結果より、従来とは異なる新規な分子機構として、Sp1に依存したHIF-1の転写活性化機構が明らかとなった。

第2章 エキソン12-15を欠損したHIF-2 α のバリエーションはドミナントネガティブ体として機能する

緒論でも述べたように、HIF-1 α とHIF-2 α は悪性腫瘍の発達に関与する。HIF-1 α には6つのバリエーションが存在しており、その中の2つは細胞質においてHIF-1 β と複合体を形成するこ

とで、HIF-1 のドミナントネガティブ体として機能することが報告されている。しかし、HIF-2 α に関するこのような報告は未だされていない。それゆえ本章では、ドミナントネガティブ体として作用する HIF-2 α のバリエーションの探索を行った。

ヒト肝がん細胞で発現する HIF-2 α のバリエーションをサザンブロット法により解析した結果、エクソン 12 から 15 を欠損したバリエーションの存在が示された。このバリエーションを HIF-2 α (Δ E12-15)と名付け、組み換え体を作製し機能解析を行った。HRE を組み込んだレポーターベクターを作製し、HIF の転写活性におよぼす HIF-2 α (Δ E12-15)の影響を解析した。その結果、HIF-2 α (Δ E12-15)は低酸素暴露と、HIF-1 α および HIF-2 α の高発現により上昇した HIF の転写活性を有意に抑制した。また、免疫沈降法とプラスミド免疫沈降法の結果より、HIF-2 α (Δ E12-15)は HRE 上において HIF-1 β と複合体を形成することが明らかとなった。以上の結果より、HIF-2 α (Δ E12-15)は HIF-1 α のドミナントネガティブ体とは異なる作用機構により、HIF の転写活性を抑制することが判明した。

第3章 VHL を介した HIF-2 α の分解は ER α の発現量を調節する

乳がんは女性が最も罹患しやすいがんであり、現在もその罹患率は増加の一途を辿っている。乳がん発症には女性ホルモンのエストロゲンが関係しており、その機能はエストロゲン受容体 (ER α) を介して発揮される。エストロゲンと結合することで転写因子として機能する ER α は、標的遺伝子のエストロゲン応答配列 (ERE) に結合することで、乳がんの増殖に寄与する遺伝子の発現を制御する。つまり、ER α は乳がんの増殖を司る鍵因子である。既知の報告では HIF-1 α の高発現により ER α の発現量が減少することが知られているが、詳細な機構については不明な点が多い。それゆえ、本章では HIF の転写非依存的な機能として、HIF-1 α および HIF-2 α が ER α の発現量に及ぼす影響について解析を行った。

常酸素下および低酸素下で培養した MCF-7 細胞において、siRNA を用いて HIF-1 α と HIF-2 α をそれぞれノックダウンした結果、HIF-2 α をノックダウンした場合にのみ ER α の発現量が上昇した。また、ER α を発現していない乳がん細胞株である SK-BR-3 細胞に外因性の ER α を高発現させ同様の実験を行った結果、HIF-2 α のノックダウンにより ER α の発現量が上昇した。さらに、ER α の転写活性をレポーターアッセイにより解析した結果、HIF-2 α のノックダウンにより ER α の転写活性が有意に亢進した。次に、野生型 HIF-2 α と、酸素依存的な分解を回避する変異体である HIF-2 α DM をそれぞれ高発現させた結果、野生型 HIF-2 α を高発現させた場合にのみ ER α の発現量が減少した。また、常酸素下における HIF-2 α の分解を制御する von Hippel-Lindau タンパク質 (VHL) と野生型 HIF-2 α とともに高発現させた結果、野生型 HIF-2 α のみを高発現させた場合よりもさらに ER α の発現量が減少した。逆に、siRNA を用いた VHL のノックダウンにより ER α の発現量は上昇した。つまり、VHL に依存した HIF-2 α の分解が、ER α の発現量の調節に寄与していることが示唆された。また免疫沈降法の結果、HIF-2 α と ER α はリガンドであるエストロゲンの存在に関係なく複合体を形成した。さらに、培養細胞を用いた two-hybrid 法と GST pull-down 法の結果、HIF-2 α のアミノ酸 396-823 までの領域と ER α のリガンド結合領域が直接相互作用することが判明した。以上の結果より、HIF-2 α の転写非依存的な新規機能として、ER α の発現量を負に制御することを明らかにした。

総括

本研究において、従来とは異なる新たな分子機構として、Sp1 に依存した HIF-1 の転写活性化機構が明らかとなった。この分子機構は乳がん細胞特異的であることから、乳がん治療において効果的な分子標的となると考えられる。一方で、乳がん細胞では HIF-2 α の発現量を抑制することが ER α の発現上昇につながる事が判明した。つまり、少なくとも乳がんにおいては、HIF の発現を抑制することは適切な治療法ではなく、ドミナントネガティブ体など HIF の転写活性を標的とすることが望ましいと考えられる。

審査結果の要旨

悪性腫瘍の生育環境は低酸素状態であり、腫瘍細胞はこのような危機的な条件下で生存するために低酸素応答系を活性化させている。低酸素応答系において主要な調節因子として機能するのが低酸素誘導因子 (HIF) である。HIF は α サブユニットと β サブユニットから構成されるヘテロ二量体として機能する転写因子であり、その機能は酸素依存的に分解される α サブユニットの発現量により制御されている。 α サブユニットには HIF-1 α と HIF-2 α があり、それぞれ独自の機能により悪性腫瘍の生育に関与している。また、HIF-1 α と HIF-2 α は β サブユニットとの二量体形成を必要とせず、転写因子以外の機能を持つことも報告されている。すなわち、HIF は転写依存的な機能と非依存的な機能の両面で複合的に悪性腫瘍の発達に関与していると考えられる。したがって、HIF は、がんの予防や治療に有用な機能性食品成分の探索や医薬品の開発における分子標的の 1 つになりうるものと考えられる。本研究は、このような観点から、HIF の転写依存的および非依存的な機能に関して複合的な解析を行い、HIF に関する新たな知見を得ることを目的として行われた。

第 1 章では、HIF の転写因子としての機能に着目し、乳がん細胞における解糖系酵素であるグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH) の低酸素応答機構について解析した。乳がん細胞を低酸素下におくと、前立腺がん細胞や肝がん細胞など多くの細胞と同様に、HIF-1 が関与した GAPDH の発現亢進が観察された。GAPDH 遺伝子のプロモーター領域には、HIF の結合配列である低酸素応答配列 (HRE) の候補が 6 つ存在しているが、前立腺がん細胞や肝がん細胞などでは、最も 3'側に存在する HRE だけが機能している。ところが、乳がん細胞ではこの HRE に加えて最も 5'側に存在する HRE も機能していることを見いだした。さらに、この最も 5'側に存在する HRE が機能するためには近傍に存在する GC-box と転写因子である Sp1 の結合が必須であることを明らかとした。このような Sp1 に依存した HIF-1 の転写活性化機構は、これまでに報告のない新規なメカニズムである。

第 2 章では、HIF の転写活性の抑制を目的とし、ドミナントネガティブ体として機能する HIF-2 α のトランスクリプトバリエーションの探索を行った。その結果、エキソン 12 から 15 までを欠損したバリエーションの存在が示唆された。本バリエーションを HIF-2 α (Δ E12-15) と名付け、機能解析を行った。HIF の転写活性におよぼす HIF-2 α (Δ E12-15) の影響をレポーターアッセイにより解析した結果、HIF-2 α (Δ E12-15) は HIF-1 と HIF-2 のどちらに対してもドミナントネガティブ

ブ体として機能することが判明した。さらに、免疫沈降法とプラスミド免疫沈降法の結果より、HIF-2 α (Δ E12-15)は HRE 上において HIF-1 β と複合体を形成することを明らかにし、HIF-2 α (Δ E12-15)が HIF の転写活性を抑制する新たなツールとなることを示した。

第3章では、HIF の転写非依存的な機能に着目した解析により、HIF-2 α が乳がん細胞の増殖に深く関与する転写因子であるエストロゲン受容体 α (ER α) のタンパク質レベルを調節する制御因子として機能することを明らかとした。すなわち、乳がん細胞にを用いて siRNA で HIF-1 α と HIF-2 α をそれぞれノックダウンしたところ、HIF-2 α をノックダウンした場合にのみ ER α の発現量が上昇し、それに伴い ER α の転写活性が有意に亢進した。また免疫沈降法の結果より、HIF-2 α と ER α が複合体を形成していることが判明した。さらに two-hybrid 法と GST pull-down 法の結果より、HIF-2 α のアミノ酸 396-823 までの領域と ER α のリガンド結合領域が直接相互作用することが判明した。さらに、種々の変異体を用いた解析により、HIF-2 α は自身が分解される際に、ER α も分解へと導いていることが判明した。以上の結果より、HIF の転写非依存的な機能として HIF-2 α が ER α のタンパク質レベルを調整することを突き止め、HIF-2 α 発現量の抑制が乳がん細胞の増殖促進へとつながることを結論付けている。

以上、本研究は、HIF の転写依存的な機能に関して、従来とは異なる分子機構として Sp1 に依存した HIF-1 の転写活性化機構を明らかにし、その分子機構を抑制する新たなツールとして HIF-2 α (Δ E12-15)を同定した。また一方で、HIF の転写非依存的な機能に関して、HIF-2 α が ER α のタンパク質レベルを調節することを明らかにした。これらの成果は、生化学、細胞生物学、食品栄養学さらには医学の分野に大きく貢献するものであり、最終試験の結果と併せて博士（応用生命科学）の学位を授与することを適当と認める。