

低酸素癌の増殖と転移のタイミングを決める分子機構の解析

東京医科歯科大学 難治疾患研究所

フロンティア研究室 低酸素生物学

中山 恒

1. 序論

個体は、高地などの低酸素環境において、低酸素応答により呼吸や代謝を調節し、恒常性を維持する。また、体内微細環境における低酸素応答は、発生時の器官形成、幹細胞増殖などに働くことが知られている。さらに、低酸素応答の働きは癌や虚血性疾患などの病気にも関与している。Hypoxia Inducible Factor(HIF)は低酸素下で多数の遺伝子発現を調節し、細胞の増殖・分化・アポトーシスなどの細胞応答を制御する⁽¹⁾。さらに HIF は、癌の増殖から転移までの過程で広範に働く。HIF は低酸素下で様々な生理応答を制御することから、低酸素応答の中心分子として研究が進められてきた。一方で近年、低酸素応答には HIF 経路とは独立した、mTOR 経路や NF-κB 経路などのシグナル経路も働くことが明らかにされてきた。これらの経路は『HIF 非依存的経路』と呼ばれ、低酸素応答制御の新しい可能性として世界的に注目されている⁽²⁾。

低酸素コンプレックス構成分子の一つとして同定したPRP19は、急性の低酸素環境で細胞死を抑制して、慢性の低酸素環境で癌転移に関わる遺伝子の発現上昇に関与することが判明した。PRP19の二つの働きが低酸素初期の癌増殖と後期の癌転移に対応していることから、PRP19が低酸素癌の増殖と転移のタイミングを決める働きを担うことを仮説として、PRP19の下流に位置するMMP1の発現機構の解析により証明を試みた。

2. 方法

細胞培養と遺伝子導入

実験には、293T 細胞、HeLa 細胞、MCF7 細胞、PC12 細胞を用いた。細胞はダルベッコ変法イーグル培地(DMEM)に 10%のウシ胎仔由来血清を添加したものをを用いて培養した。細胞内に PRP19 を発現させるために、発現ベクターを構築した。発現ベクターは Fugene HD 試薬を用いてトランスフェクションした。

細胞の低酸素培養

細胞の低酸素培養 (1% 酸素濃度) は、低酸素ワークステーションを用いて行った。ワークステーション内の環境は、空気と混合ガス (窒素/二酸化炭素) を混合させることにより、常時<1% 酸素、5% 二酸化炭素、94% 窒素>の割合で保持されていた。

細胞増殖のアッセイ

HeLa 細胞、PC12 細胞に、PRP19 発現ベクターを、Fugene HD 試薬を用いてトランスフェクションした。トランスフェクションの培地交換後に、細胞を通常酸素もしくは低酸素環境で培養を開始して、24 時間ごとに経時的に細胞数を計測した。また、細胞の生存率を、トリパンプルー法を用いて検証した。

ノーザンブロットイング

低酸素培養した細胞を経時的に回収して、RNeasy キット(Qiagen)を用いて total RNA を抽出した。Total RNA 10ug をアガロースゲル上で電気泳動した後に、メンブレンに転写して、DIG 標識プローブにより検出した。

ルシフェラーゼアッセイ

細胞を通常酸素および低酸素環境で培養したのち、氷上で細胞を回収して、タンパク質を抽出した。得られたタンパク質に発光基質を添加して、発光量を、ルミノメーターを用いて測定した。

3. 結果 研究成果

PRP19は低酸素下での細胞死を抑制する

私達はこれまでに、HIFプロリン水酸化酵素PHD3が低酸素環境下で、高次の複合体「低酸素コンプレックス」を形成することを明らかにしてきた⁽³⁾。低酸素コンプレックスを構成する分子の

同定を試み、pre mRNA processing factor 19 (PRP19)を同定した。PRP19は様々な機能を持つことが知られているが、低酸素応答における役割は未知であり、またその癌における役割も未解明であった。293T細胞およびPC12細胞を用いた強制発現実験では、低酸素下での細胞死が抑制され、siRNAを用いたPRP19の発現抑制は細胞死を亢進した。したがって、PRP19は低酸素応答時に細胞死の抑制に働くことが判明した⁽⁴⁾。

PRP19の発現は低酸素下で減少する

PRP19の低酸素環境下における発現をノーザンブロット法に解析した。その結果、PRP19は低酸素環境下において発現が減少することが明らかになった。このことは、長期の低酸素環境において細胞死が亢進することと対応していた。PRP19 siRNA細胞で認められた細胞死の亢進は、低酸素環境におけるPRP19の発現減少を模倣していると考えられる。一方で、PRP19 siRNA細胞を低酸素環境で培養することで、細胞死とは独立して、細胞の接着性が低下する現象が認められた。そこで、PRP19 siRNA細胞で発現が変化する遺伝子の同定をマイクロアレイ解析により試みた。その結果、PRP19 siRNA細胞で3倍以上の発現上昇が認められた遺伝子を178個同定し、その中にはエストロゲン受容体*ESR2*、マトロプロテアーゼ*MMP1*、Naチャンネル*SCN3B*などが含まれていた。

マトリックスメタロプロテアーゼ*MMP1*のプロモーター解析

マイクロアレイ解析で同定した遺伝子のうち、癌の転移に働く*MMP1*に着目してその発現制御機構の解析を進めた。*MMP1*の転写開始点より上流3000bp(-3000 - +1)までのゲノム領域をルシフェラーゼアッセイベクターに組み込んで、ルシフェラーゼアッセイを用いたプロモーター解析を行った。その結果、同ベクターは通常酸素環境ではほとんど活性を示さず、低酸素培養後4-8時間以降の長期の低酸素環境で高い活性を示した。さらに、プロモーター配列を-3000 - -1500 および -1500 - +1の領域に分断して活性を測定したところ、-3000 - -1500の上流領域に転写活性化能をもつことが明らかになった(図1)。そこで、この領域を300bpずつ削除したような変異体を作成して、活性化領域を掘り下げたところ、-2100 - -1800の領域が必須であることが判明した。この領域にはGATA, AP-1, NF-κBなどの転写因子結合配列が存在していることが、データベース検索から明らかになった。この発現制御に関わる転写因子を明らかにするために、HIF-1αの発現ベクターを導入したところ、HIFの標的配列であるHREプロモーターの活性は顕著に上昇したものの、*MMP1*のプロモーター活性には変化が認められなかった。一方、NF-κBは長期の低酸素環境において高い活性化が認められた。そこで、NF-κBの発現を、siRNAを用いて抑制したところ、*MMP1*の発現が有意に減少することが明らかになった。したがって、長期の低酸素環境における*MMP1*の発現制御にはHIF非依存的に、NF-κBにより制御されていることが明らかになった。

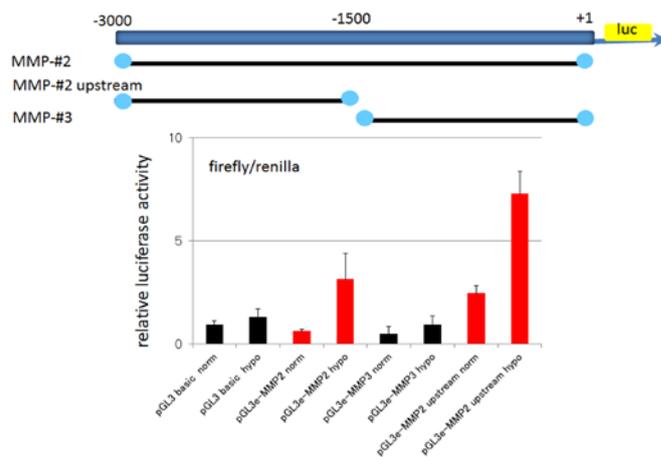


図1 *MMP1*プロモーター領域の解析

4. 考察 まとめ

PRP19と癌の増殖・転移のタイミング

PRP19は発現の高い急性期の低酸素応答では細胞死の抑制や増殖に働き、その発現の減少する慢性期の低酸素環境では*MMP1*の発現上昇や細胞の接着性の低下が認められたことから、癌の浸潤や転移に関わることが考えられた(図2)。このような機構を通して、PRP19の発現が、低酸素環境で引き起こされる癌の増殖と転移のフェーズを決める要素として作用することが考えられる。

HIF経路とHIF非依存的経路

低酸素応答において中心的な働きをするHIFは、癌の増殖・転移の過程においても重要な働きをすることがこれまでに報告されてきた。一方、*MMP1*の発現制御にはHIFは関与せずに、NF- κ Bを介したHIF非依存的な経路によってその発現が制御されることが判明した。

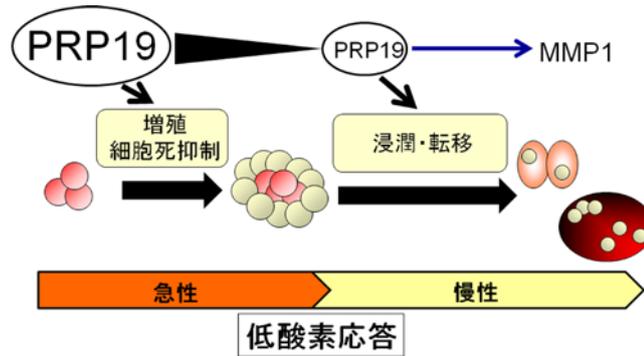


図2 低酸素環境におけるPRP19によるがんの進行制御

本研究を進めるにあたり貴重な助成を賜りましたアステラス病態代謝研究会に、深く感謝申し上げます。

5. 発表論文、参考文献

- 1) Wenger, R.H., Stiehl, D.P., & Camenisch, G.: Integration of oxygen signaling at the consensus HRE. *Sci STKE*, **306**: re12 1-13, 2005.
- 2) Qi, J., Nakayama, K., Gaitonde, S., Goydos, J.S., Krajewski, S., Eroshkin, A., Bar-Sagi, D., Bowtell, D.D., and Ronai, Z.: The ubiquitin ligase Siah2 regulates tumorigenesis and metastasis by HIF-dependent and -independent pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**: 16713-16718, 2008.
- 3) Nakayama, K., Gazdoui, S., Abraham, R., Pan, Z.Q., & Ronai, Z.: Hypoxia-induced assembly of prolyl hydroxylase PHD3 into complexes: implications for its activity and susceptibility for degradation by the E3 ligase Siah2. *Biochem J*, **401**: 217-226, 2007.
- 4) Sato, M., Sakota, M., and Nakayama, K.*: Human PRP19 interacts with prolyl-hydroxylase PHD3 and inhibits cell death in hypoxia. *Exp. Cell Res.* **318**: 2871-2882, 2010.