

研究報告書

「pH恒常性制御による動物個体の形態維持とその破綻」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 26 年 10 月～平成 30 年 3 月

研究者: 原田 浩

1. 研究のねらい

健常成人の体は基本的に何年にも亘って同じ形態で維持されるが、その構成要素である細胞は、適正な制御の下で必要に応じて入れ替わっている。言い換えると、「ヒトの体は動的平衡状態を保ちながら形態を維持している」と表現できる。この動的平衡には、“ゲノム DNA に変異が入った古い細胞”を、“幹細胞の分化によって生まれる変異の無い(少ない)細胞”と入れ替え、発がんのリスクを避ける狙いがあると考えられている。したがって、幹細胞のゲノム DNA が損傷を受けにくい理由を解明することは、ヒトがヒトとしての形態を維持するメカニズムを理解する上で、また、その破綻によって悪性腫瘍(がん)が生じるメカニズムを解明し、新たな治療法の確立に繋げる上で、極めて重要である。

細胞の通常な糖代謝経路と比較して、組織幹細胞やがん細胞は、特殊なグルコース代謝経路(すなわち酸化的リン酸化よりも ATP 産生効率の低い解糖系)を取って活用し、もって活性酸素種(ROS)が生まれるリスクの低減と抗酸化活性の亢進、そして究極的には DNA 損傷が生じるリスクからの回避を図っていることが示唆されている。このような状況下、本研究プロジェクトに先立って実施した予備的検討を通して私は、細胞の pH 調節や低酸素応答を担う遺伝子ネットワークの破綻によって、ゲノム DNA の不安定化とがんの悪性形質が誘導される可能性を見出していた。この予備的な知見から、『糖代謝のリプログラミング・pH 恒常性制御機構・低酸素応答機構の 3 者が協調することでゲノム DNA が保護されて動物の形態維持(動的平衡の維持)が可能になっており、その協調関係が破綻した時にがんが生じ、悪性化する』と考えた。

本研究で私は、生体内の低酸素環境や pH を可視化・系譜解析するための遺伝子改変マウスを作製し、インビボ光イメージング実験を実施することを計画した。また、生体の pH 制御や低酸素応答を担う遺伝子ネットワークを同定し、その破綻によって腫瘍の発生と悪性形質が導かれる機序を解明することを目的に研究に着手した。そして最終的に、がんに対する新規治療法の確立に繋がる礎を築くことを目指して、本研究プロジェクトを展開した。

2. 研究成果

(1) 概要

本研究で私は、以下の 3 つに大別されるプロジェクトを遂行し、糖代謝・pH 恒常性制御・低酸素応答の 3 者の相互作用を解明すること、そしてその破綻によってがんが生じ、悪性進展する機序を明らかにすることを目指し、研究を展開した。

- ① 生体の pH 制御や低酸素応答を担う遺伝子ネットワークの同定、およびその破綻によって腫瘍の発生と悪性形質が導かれる機序の解明(テーマ A)
- ② 生体内の低酸素環境や pH、DNA 損傷部位を可視化するための遺伝子改変マウスの作

製、及び酸素・pH 恒常性制御が機能する領域の時空間解析(テーマ B)

③ 酸素・pH 恒常性制御機構が機能している細胞群を生体内から排除する遺伝子改変マウスの作製、及び酸素・pH 制御機構の破綻によって生じる疾病の解明(テーマ C)

研究テーマ A に関しては、基礎と臨床を組み合わせた研究によって、pH 恒常性制御因子 CA9 と低酸素誘導性転写因子 HIF-1 ががん細胞の抗がん剤や放射線抵抗性に係わることを確認した(Sowa T et al. *Cancer Med.* 6:288-297. 2017.)。細胞の低酸素応答と pH 恒常性制御を担う複雑な遺伝子ネットワークを解き明かす目的で新規遺伝子を探索し、IDH3、UCHL1、LY6E を HIF-1 活性化因子として同定した。そして IDH3 が糖代謝経路のリプログラミングと血管新生を誘導することで腫瘍増殖を亢進すること(Zeng L et al. *Oncogene.* 34:4758-4766. 2015)、UCHL1 が HIF-1 の主要制御サブユニット HIF-1 α の脱ユビキチン化を介してマトリックスメタロプロテアーゼと解糖系関連因子の発現を誘導し、がんの遠隔転移能と放射線抵抗性を亢進すること(Goto et al *Nat Commun.* 6: 6153.2015; Nakashima et al. *Sci Rep.* 7:6879. 2017.)、LY6E が HIF-1 α 遺伝子の発現を転写開始段階で誘導し、血管新生の誘導を介して腫瘍増殖を亢進することを見出した(Yeom et al. *Oncotarget.* 7:65837-65848. 2016.)。

研究テーマ B と C に関しては、pH 恒常性制御因子 CA9 の発現をルシフェラーゼ発光として可視化する Tg マウス、pH のリアルタイムイメージングを可能にする Tg マウス、タモキシフェン誘導型 Cre リコンビナーゼ遺伝子 Cre-ER^{T2} を HIF-1-CA9 経路依存的に発現する Tg マウスを樹立したが、いずれも数世代の継代後に trans gene 発現がサイレンシングされてしまった。バックアップとして樹立を進めていた各人工遺伝子の ROSA locus ノックインマウスの樹立に成功し、今後実験を実施する用途は立ったものの、さきがけ期間中に予定通りに研究を完遂することが出来なかった。

研究成果の詳細は後述する通りである。

(2) 詳細

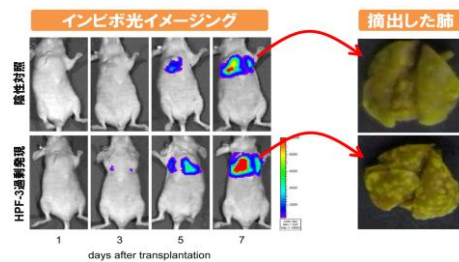
研究テーマ A:「pH 恒常性／低酸素恒常性維持機構の破綻による影響の解析」(達成度 120%)

A-1: 培養細胞を対象にした *in vitro* の研究と、導入化学療法後に外科手術を施した肺がん患者の検体を対象とする臨床研究を組み合わせ、研究を行った(Sowa T et al. *Cancer Med.* 6:288-297. 2017.)。低酸素誘導性転写因子 HIF-1 依存的に発現が誘導される pH 恒常性制御因子 CA9 の活性を抑制することによって、がん細胞の抗がん剤(例: Vinorelbine)抵抗性が抑制されることを見出した。また、HIF-1 の主要制御サブユニット HIF-1 α や CA9 の腫瘍内発現レベルががん患者の生命予後不良と相関することを明らかにし、酸素／pH 恒常性制御機構を予後予測マーカーや治療標的として活用する意義を示した。

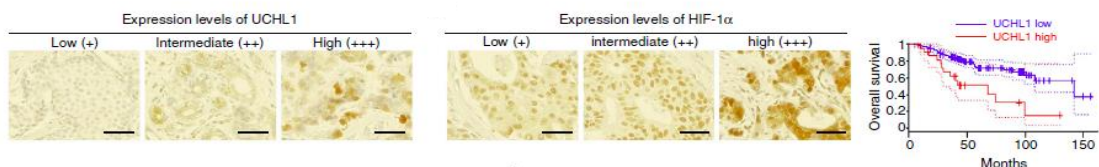
A-2: 細胞外の低酸素環境や低 pH 環境に対する細胞の適応応答機構を解明するため、マスターレギュレーター-HIF-1 の活性を正に制御する遺伝子をスクリーニングした。具体的には、(1)HIF-1 依存性プロモーターの制御下でブラストシジン耐性遺伝子 *bsd* を発現する人工遺伝子を構築し、(2)これをゲノム DNA に安定に組み込んだ細胞株を樹立、そして(3)当該細胞株に cDNA ライブラリーを導入して、(4)ブラストシジン耐性を獲得したコロニーを選択した。結果的に、IDH3、UCHL1、LY6E という3つの遺伝子を同定し、以下の通り各遺伝子の作用機序と機能を解明した。

A-2-1: がん細胞は好气的環境にあっても解糖系優位なグルコース代謝経路を活用し、さらにペントースリン酸回路を活性化して細胞コンポーネントを産生することで、高い増殖能を獲得している。私は、これが IDH3-HIF-1 経路の亢進によって引き起こされることを以下の様に明らかにした(Zeng L et al. *Oncogene*. 34:4758-4766. 2015)。IDH3 はイソクエン酸と α ケトグルタル酸の相互変換を担う酵素として古くから知られていたが、我々は様々ながん細胞が IDH3 の律速サブユニット(IDH3 α)を過剰発現しており、これが細胞内 α ケトグルタル酸(α -KG)レベルの低下につながっていることを見出した。その結果、 α -KG 要求性の prolyl-4-hydroxylases (PHDs)と asparaginyl-hydroxylase (FIH-1)の活性が低下し、HIF-1 活性の亢進につながることを見出した。IDH3 が HIF-1 を活性化した場合に、グルコース代謝経路が解糖系優位な状態に変換されること、また血管新生誘導因子 VEGF の発現量が高まることを見出した。担がんマウスを対象にした実験で、IDH3 の過剰発現によって移植腫瘍の増殖速度が亢進することを明らかにした。マイクロアレイデータベースを対象にした解析で、IDH3 α の腫瘍内発現レベルが高い場合に、がん患者の生命予後が不良であることを示すデータを得た。以上の様に、IDH3-HIF-1 経路を予後予測マーカーとして、また治療標的として活用し得ることを報告した。

A-2-2: UCHL1 が HIF-1 の活性を亢進するメカニズムを解明するとともに、UCHL1-HIF-1 経路の活性化によってがんの遠隔転移能が亢進することを報告した(Goto et al *Nat Commun*. 6: 6153.2015.)。まず分子細胞生物学研究を通して、UCHL1 が脱ユビキチン化活性依存的に HIF-1 α を安定化することを明らかにした。また、HIF-1 の下流遺伝子を対象



にした DNA マイクロアレイ解析を通して、UCHL1 によって HIF-1 が活性化した場合に、がん細胞の転移・浸潤を司る一連の遺伝子群の発現が誘導されることを見出した。がん細胞を免疫不全マウスの尾静脈に移植することでがんの肺転移を再現する実験モデルを活用し、UCHL1 を過剰発現した場合にがん細胞の肺転移形成率が HIF-1 依存的に上昇すること(右上図)、逆に、がん細胞内で高発現している内在性 UCHL1 の発現をノックダウンした場合に肺転移能が有意に低下することを確認した。さらに、UCHL1 阻害剤 LDN57444 が HIF-1 活性を抑制する作用を持つことや、乳がん細胞の肺転移を有意に抑制する作用を持つことを明らかにし、新たな治療法の確立に向けた道を拓いた。最後に、京都大学医学部附属病院で採集したヒト由来の腫瘍サンプルを対象に免疫組織染色を実施し、UCHL1 や HIF-1 α の腫瘍内発現量ががん患者の生命予後不良と相関することを確認した(下図)。

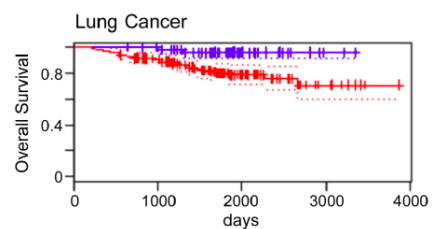
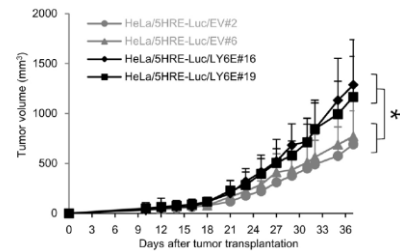


また、UCHL1-HIF-1 経路依存的にがん細胞のグルコース代謝経路が解糖系優位な状態にリプログラミングされた時、ペントースリン酸経路から供給される NADPH 量が増加して抗酸化物質 GSH が産生されることを見出した。これががん細胞の放射線抵抗性を誘導すること、およびペントースリン酸経路の律速酵素 G6PDX を阻害した場合にがん細胞の放射線抵抗性を解

除できることを見出し、新たな放射線増感法の開発に向けた道を拓いた(Nakashima et al. *Sci Rep.* 7:6879. 2017.)。

A-2-3: 以下の研究を通じて、LY6E が HIF-1 を活性化し腫瘍増殖速度を亢進する機序を明らかにした(Yeom et al. *Oncotarget.* 7:65837-65848.

2016.)。分子生物学的研究によって、LY6E が PTEN の発現を負に制御し、結果的に PI3K-Akt 経路依存的に HIF-1 α 遺伝子の転写開始効率を上昇させることを見出した。担がんマウスを対象にした研究によって、LY6E を過剰発現した腫瘍では、HIF-1 依存的に腫瘍血管新生が亢進し、腫瘍増殖速度が高まることを明らかにした(右図)。ヒト臨床検体を対象にした研究によって、正常乳房組織と比較して腫瘍組織内で LY6E 発現が有意に増加していること、また LY6E の腫瘍内発現レベルが、肺がん患者、および乳がん患者の生命予後不良と相関することを確認した(右図)。



研究テーマ B: 「pH 恒常性維持機構が活性化した細胞の時空間解析」

pH 恒常性制御因子 CA9 の発現をルシフェラーゼ発光として可視化する Tg マウスの樹立に向け、pH のリアルタイムイメージングを可能にするレポーター遺伝子を構築した(Tanaka et al. *Biochem Biophys Res Commun.* 464:1151-1156. 2015.)。この遺伝子を受精卵にマイクロインジェクトすることを通じ、最終的に 1 系統のヘテロ遺伝子改変マウス(Tg マウス)を樹立した。

CA9 の発現をルシフェラーゼ発光として可視化する Tg マウスの樹立に向け、CA9 プロモーターと同様の活性制御機構でルシフェラーゼを発現するレポーター遺伝子を構築し、これを組込んだマウスを樹立した。インビボ光イメージング実験によって、1 系統が期待通りの Phenotype (CA9 発現誘導剤 DFO でルシフェラーゼ発光を発現)を示すことを確認できたが、継代を重ねるうちにトランスジーンサイレンシングが起こってしまった。樹立したマウスが予定通りに phenotype を発現しなくなってしまったこと、またインビボ光イメージング機器が修理不能の故障を起こし、新規機器の購入に時間がかかってしまったことなどから、計画通りにインビボ研究を進めることが叶わなかった。

研究テーマ C: 「pH 恒常性維持機構が活性化した細胞の系譜解析と人為操作」

タモキシフェン誘導型 Cre リコンビナーゼ遺伝子 Cre-ER^{T2} を HIF-1-CA9 経路依存的に発現する人工遺伝子(Harada et al. *Nat Commun.* 3: 783. 2012.)を活用して、遺伝子改変マウスを作製した。期待通りの genotype と phenotype を示す Tg マウスを樹立したものの、マウスの継代を重ねるうちに trans-gene の発現がサイレンシングされてしまった。この問題を克服するために、CA9 プロモーターの制御下に Cre-ER^{T2} をノックインしたマウス(KI マウス)を樹立した。pH 恒常性維持機構が活性化した細胞の系譜解析と人為操作のために、当該 KI マウスを floxed STOP-luc マウス(Cre による組換え後に発光を呈するマウス)、および floxed STOP-iDTR マウス(Cre による組換え後にジフテリア毒素依存的に細胞死を起こすことが出来るマウス)と掛け合わせた。インビボ実験を実施する時間がなく、当初の研究計画を完遂出来なかった。さき

がけ研究終了後に研究を完了する予定である。

3. 今後の展開

テーマ A に関しては、本研究プロジェクトを通じて ICH3、UCHL1、LY6E を治療標的とする POC を取得し、かつ各遺伝子に対する阻害剤をスクリーニングする系を確立してきた。この成果をもとに、実際に阻害剤の探索を進める予定である。

テーマ B、C については、本研究を通じて作成して来た独自の遺伝子改変マウスを用いて、引き続き「pH 恒常性維持機構が活性化した細胞の時空間解析と系譜解析」を進める予定である。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

テーマ A に関しては、順調に研究を展開することができ、生体の pH・酸素恒常性維持を担う重要なパスウェイを複数同定するに至った。特に近年大きな注目が集まっているがん細胞特有のグルコース代謝経路リプログラミングや遠隔転移を担う遺伝子ネットワークを同定したことは、がん研究に大きなインパクトを与えたと考えている。その成果は、さきがけ研究を開始した 2014 年 10 月以降、計 22 報の論文を公表するとともに、計 46 回の招待講演をこなした実績に繋がっている。

本プロジェクトの研究成果を出発点に、製薬企業や英国オックスフォード大学との共同研究を開始した。後者については、JSPS 二国間交流事業から 2 期(計 4 年)に亘ってサポートを受けていることから、客観的にも我々の研究が評価されているものと考えている。さきがけ研究の成果から新たに生じた科学的疑問を解決すべく、科学研究費補助金(基盤研究 B・新学術領域研究・挑戦的研究)と、AMED 創薬基盤推進研究事業などから、継続して研究助成を頂戴している。これも、我々の研究成果が評価されていること、また今後の研究に期待を持って頂いていることの現れであると考えられる。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

本研究課題では、生体の pH 制御や低酸素応答を担う遺伝子ネットワークを同定し、その破綻によって腫瘍の発生と悪性形質が導かれる機序を解明することを目的とした。pH 恒常性制御因子 CA9 と低酸素誘導性転写因子 HIF-1 ががん細胞の増殖や放射線抵抗性に係わることを見いだすとともに、HIF-1 活性化因子として新規の分子を同定し、その機序を明らかにした。この成果を出発点に、製薬企業や英国オックスフォード大学との共同研究も開始した。

原田浩研究者はこれらの成果等をもとに数多くの論文と、招待講演も受けるとともに教授として自分の研究室を持つことになった。以上のように本さきがけ研究は研究者としての飛躍に大きな役割を果たしたと考えられる。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Kobayashi M, Morinibu A, Koyasu S, Goto Y, Hiraoka M, *Harada H.(責任著者) A circadian clock gene, PER2, activates HIF-1 as an effector molecule for recruitment of HIF-1alpha to promoter regions of its downstream genes. *FEBS J.* 284: 3804-3816. 2017.
2. Nakashima R, Goto Y, Koyasu S, Kobayashi M, Morinibu A, Yoshimura M, Hiraoka M, Hammond EM, Harada H. UCHL1-HIF-1 axis-mediated antioxidant property of cancer cells as a therapeutic target for radiosensitization. *Scientific Reports.* 7:6879. 2017.
3. 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(責任著者). LY6E: a conductor of malignant tumor growth through modulation of the PTEN/PI3K/Akt/HIF-1 axis. *Oncotarget.* 11670. 2016.
4. 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(責任著者). Aberrant IDH3alpha expression promotes malignant tumor growth by inducing HIF-1-mediated metabolic reprogramming and angiogenesis. *Oncogene.* 34:4758-4766. 2015.
5. 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(責任著者). UCHL1 provides diagnostic and antimetastatic strategies due to its deubiquitinating effect on HIF-1 α . *Nature Communications.* 6: 6153. 2015.

(2) 特許出願

研究期間累積件数: 2件(公開前の出願件名については件数のみ記載)

1. 登録済み特許

発明者: 原田 浩、平岡 真寛

発明の名称: 新規抗腫瘍剤及び新規抗腫瘍剤のスクリーニング方法

出願人: 国立大学法人 京都大学

出願日: 2012/6/12(登録日: 2016/11/15)

出願番号: 特願 2013-521531 (登録番号::特許第 6046618 号)

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

1. 主要な学会発表(国際学会における代表的な招待講演を抜粋)

- 1.1. Harada H. Harada H. How can we overcome tumor radioresistance; lessons from hypoxia biology. China-Japan Int'l Joint Symposium on Radiation Biology and Therapeutics (iSRBT). Oct. 31. 2017.
- 1.2. Harada H. Tumor hypoxia; an imaging and therapeutic target of interest for innovative radiation therapy. The 3rd Bordeaux Symposium: The Week 26. Bordeaux, France. Jun. 29. 2017.
- 1.3. Harada H Radioresistance of Cancer Cells; Lessons from HIF-1 Biology. Annual

- Meeting of Association for Radiation Research 2016. Leicester. UK. Jun 27–29. 2016.
- 1.4. Harada H. Tumor Hypoxia; a Potent Inducer of Malignant Phenotypes and Radioresistance of Cancer Cells. The 2nd KU–CEA Joint Workshop. Apr 11–12. 2016.
 - 1.5. Harada H. Tumor Hypoxia and Radioresistance. The 15th International Congress for Radiation Research (ICRR2015). May 25–29. 2015.

2. 受賞

(公社)日本放射線腫瘍学会 第12回 優秀教育講演賞、原田浩、2014/12/12

3. プレスリリース

がんの遠隔転移を担う新規遺伝子ネットワーク UCHL1–HIF-1 の発見、2016/1/13

http://www.kyoto-u.ac.jp/ja/research/research_results/2014/150113_1.html