

## 論文の内容の要旨

論文題目 腫瘍内ストレス環境への適応応答ならびに

その遺伝子発現ネットワークに関する研究

氏名 小井土 大

固形がんでは、血管形成不全によって特有の微小環境が構築され、酸素や栄養の供給が十分でない。したがって、がん細胞は腫瘍内ストレス環境に対する適応応答機構を活性化しつつ、増殖する必要がある。こうした適応応答を標的とするがん治療法に対して期待がもたれる一方で、未解明の細胞内適応応答機構も存在すると考えられており、これを遺伝子発現パターンから発見することは必ずしも容易でない。そこで本研究では、腫瘍内ストレス応答における遺伝子発現制御ネットワークの理解とその分子基盤の解明、さらにはこれら探索的研究を支える新規情報解析基盤の確立を目的とした。具体的には、低酸素ストレス下においてミトコンドリア依存的に惹起されるグローバルな転写制御メカニズムと腫瘍増殖速度との関連に着目した研究を展開しつつ、こうしたストレス応答で得られる遺伝子発現変動パターン中の上流・下流の関係性をデータ駆動的に再構築するアルゴリズムを考案・実証した。

### 1. ミトコンドリア欠損による腫瘍増殖能の低下と HIF-1 転写活性誘導能の欠如

腫瘍内ストレスに対する細胞内適応応答機構を制御するオルガネラの1つがミトコンドリアである。ミトコンドリアは酸化的リン酸化を介した ATP 産生や、高分子合成のための前駆体産生の役割をもつのみならず、酸化還元シグナル伝達や低酸素ストレス応答のような種々の細胞内ストレス応答の活性化においても重要である。実際に、ミトコンドリア機能欠損による腫瘍増殖速度の低下が知られている一方で、ミトコンドリアに依存したストレス応答機構と腫瘍増殖速度との間の関連は十分に明らかでない。今回、大腸がん細胞株 HT-29 のヌードマウス異種移植モデルにおいて、急速な腫瘍増殖にミトコンドリア機能が必要であることを見出した。興味深いことに、ミトコンドリア DNA を欠損した HT-29 細胞 (HT-29  $\rho^0$  細胞) がヌードマウスに生着し、緩やかに増殖した後に樹立できた ex vivo HT-29  $\rho^0$  細胞では、恒常的な低酸素応答の活性化に至っていた。こうした発見を端緒に、腫瘍内

ストレス環境において十分な速度を保ちつつ増殖するためには、ミトコンドリア依存的に惹起される低酸素ストレス応答が重要であると考え、そのメカニズム解明を目指した。低酸素応答における主要な制御分子である転写因子 hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) は、細胞内の解糖系を活性化しつつ、細胞外のがん微小環境を再構築するため、がんの生存や増殖、悪性化に寄与する。従来、低酸素ストレス下での HIF-1 経路の活性化は細胞内の HIF-1 複合体の $\alpha$ サブユニット (HIF-1 $\alpha$ ) の安定化を中心に議論されており、ミトコンドリアも一定の低酸素条件では HIF-1 $\alpha$ の安定化に関与すると考えられていた。その一方で、本研究では、HIF-1 $\alpha$ の安定化後に見られる HIF-1 転写活性の誘導能がミトコンドリア機能に著しく依存していることを明らかにした。興味深いことに、HT-29  $\rho^0$ 細胞とプロテアソーム阻害活性をもつ抗がん剤 bortezomib を処理した HT-29 細胞の親株との間で、低酸素ストレス下における遺伝子発現パターンが極めて類似しており、両者に共通した遺伝子発現制御機構の存在が示唆された (図 1)。さらに、臨床試験中の抗がん剤である metformin や arctigenin などのミトコンドリア阻害活性を有する化合物を処理すると、低酸素ストレス下で HIF-1 $\alpha$ の安定化に至るにも関わらず、やはり HIF-1 転写活性の誘導能が著しく低下した。以上より、ミトコンドリア依存的な HIF-1 転写活性誘導能と腫瘍増殖との関連が明らかとなった<sup>1</sup>。

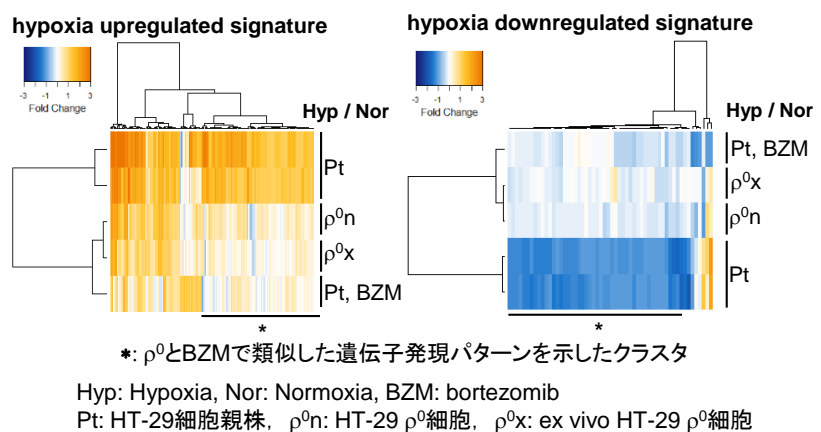


図 1. 低酸素ストレス下での発現変動遺伝子のパターン比較

## 2. TGF- $\beta$ と低酸素ストレスによって誘導される遺伝子 *PMEPA1* の、固形がん組織における遺伝子発現ネットワークへの関与

HIF-1 転写活性の調節機構を解明すべく、ex vivo HT-29  $\rho^0$ 細胞で高発現に至った遺伝子の 1 つ、Prostate transmembrane protein, androgen induced 1 (*PMEPA1*) に着目した。これまでに、*PMEPA1* が多くの固形がんで高発現すること、そして TGF- $\beta$ が *PMEPA1* の主要な発現調節因子であると同時に TGF- $\beta$ シグナル伝達経路の抑制に *PMEPA1* が直接的に関与することが報告されている。今回、*PMEPA1* が低酸素ストレス応答の正のフィードバック調節因子であり、かつ TGF- $\beta$ シグナル経路がその上流の制御因子であることを明らかにした (図 2a-2b)。次に、臨床の固形がん組織中での *PMEPA1* の役割を調べるために、The Cancer Genome Atlas (TCGA)からトランスクリプトームデータを取得し、*PMEPA1* との共発現ネットワーク解析

を実施した (図 2c-2d). 実験データと合致して, ほぼ全てのがん種で低酸素誘導性遺伝子や TGF- $\beta$ シグナル下流の遺伝子群が *PMEPA1* の共発現遺伝子にエンリッチメントしていた. TGF- $\beta$ シグナル伝達経路は, HIF と協調的に働き, 血管新生や上皮-間葉移行といったがん微小環境のリモデリングを活性化することが知られているが, これらの経路で発現増加する遺伝子群も *PMEPA1* の共発現遺伝子に強くエンリッチメントしていた. 以上より, 臨床のがん組織において, 低酸素ストレス応答や TGF- $\beta$ シグナル経路と *PMEPA1* が協調的に作用し, がんの悪性化に寄与していると考えられる<sup>2</sup>.

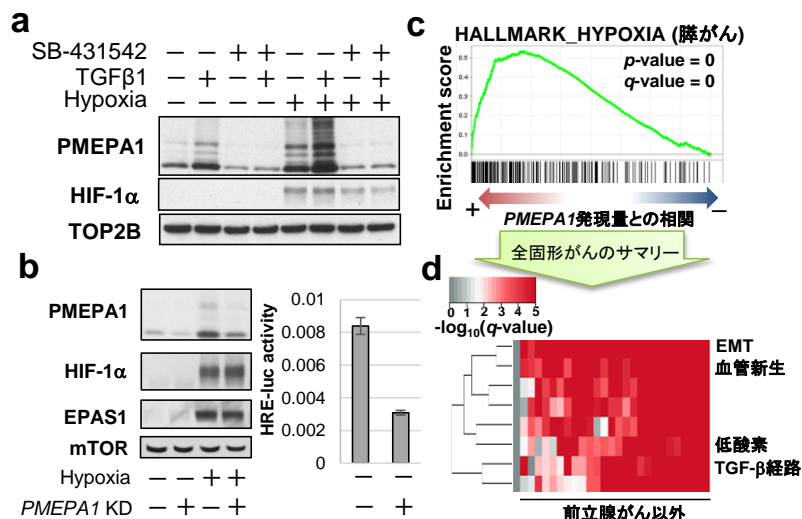


図 2. TGF- $\beta$ シグナルと HIF-1 経路に対する *PMEPA1* の協調的関与

### 3. 発現変動遺伝子ネットワーク中のハブ遺伝子検出法の開発

遺伝子発現制御ネットワークの構造解明と, その中で重要な制御分子の同定を目指したトランスクリプトームデータの新規解析手法を考案した. 従来, 2000 年代初頭に相次ぎ開発されたエンリッチメント解析手法によって, 発現変動遺伝子の情報から, それらを惹起したストレス条件に対しての生物学的解釈が付与されてきた. しかし, 発現変動遺伝子セットそのものの解析, すなわち, どのような細胞内プロセスを経て, 発現変動遺伝子が形成されたのかを解明することは

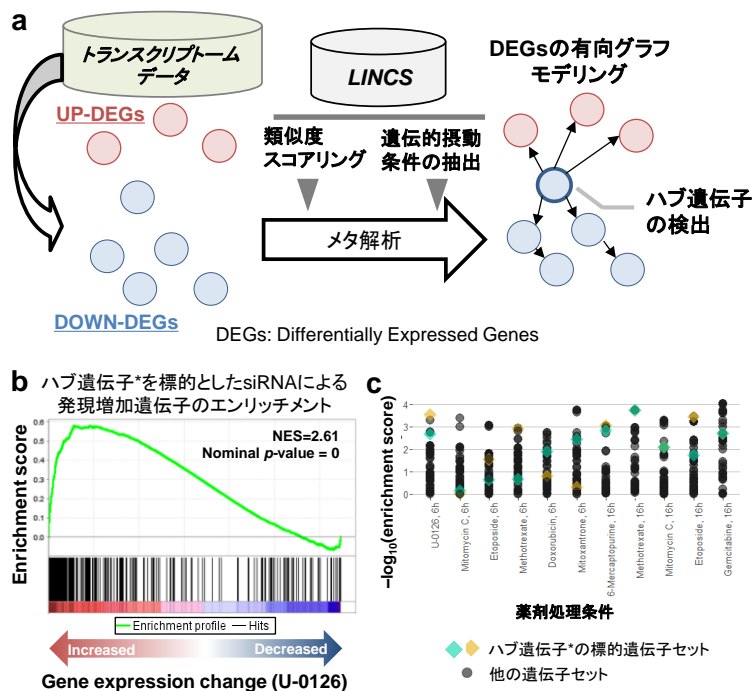


図 3. InDePTH 法の概要と検出されたハブ遺伝子の検証

依然として困難であった。そこで、特定のストレス条件下での発現変動遺伝子間の上流・下流の関係性をデータ駆動的に再構築し、その階層的ネットワーク中のハブとなる役割を有する遺伝子（ハブ遺伝子）を探索するアルゴリズム、influential gene detection in perturbed transcriptome hierarchical network (InDePTH) 法を開発した（図 3a）。実際、従来のトランスクリプトーム解析手法では発見困難であった、遺伝子制御ネットワーク中のハブ遺伝子の同定にも成功し、実験的検証からその仮説を実証できた（図 3b-3c）。InDePTH 法により、図 1 に記したミトコンドリア機能とプロテアソームに関連して惹起される低酸素応答性遺伝子群に対しても、その階層的ネットワーク構造を再構築できることがわかった。以上のように、InDePTH 法は、発現変動遺伝子セットを実用的に解釈する上で、非常に有用なアプローチである。

## 総括

腫瘍内ストレス環境でしばしば活性化する低酸素ストレス応答において、HIF-1 $\alpha$ が安定化した後の HIF-1 転写活性の誘導能が、ミトコンドリアに強く依存していることを見出した。この活性とプロテアソームの支配下にある制御機構とで、共通した分子基盤が存在すると考えられる。一方、HIF-1 転写活性の誘導能を制御する分子機序の一端として、固形がんでの高発現が知られる遺伝子 *PMEPA1* が、低酸素ストレスに対する正のフィードバック調節に関与することを見出した。さらに、臨床の多くのがん種の腫瘍組織で、血管新生や上皮-間葉移行関連遺伝子と *PMEPA1* との間に強い共発現の関係が見られた。したがって、*PMEPA1* が、低酸素ストレス応答や TGF- $\beta$ シグナル経路の協調的作用のバイオマーカーであるのみならず、その協調的活性を破綻させるための治療標的としても有望であることが期待された。さらに、新たな情報解析基盤として InDePTH 法を開発し、従来のエンリッチメント法では着目が困難でありつつも、確かにストレス下での遺伝子制御ネットワークの構成に寄与する遺伝子を InDePTH 法で検出できることが実証された。InDePTH 法を用いることで、これまでに解釈困難であった遺伝子制御ネットワークから新たな解釈を生み出すことが可能となる。これら実験科学と情報科学を駆使した研究成果によって、今後のがん治療研究に有用な知見が提供されるものと期待される。

## 参考文献

1. Koido, M. *et al.* Mitochondrial deficiency impairs hypoxic induction of HIF-1 transcriptional activity and retards tumor growth. *Oncotarget* **8**, 11841–11854 (2017).
2. Koido, M., Sakurai, J., Tsukahara, S., Tani, Y. & Tomida, A. *PMEPA1*, a TGF- $\beta$ - and hypoxia-inducible gene that participates in hypoxic gene expression networks in solid tumors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **479**, 615–621 (2016).