

博士論文（要約）

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

小井土 大

【目次】

略語一覧.....	1
序論	4
第1章：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	11
1－1．本章の要旨.....	11
1－2．序文.....	12
1－3．材料および方法.....	14
1－4．結果.....	23
1－5．考察.....	41
第2章：TGF- β と低酸素ストレスによって誘導される遺伝子 <i>PMEPA1</i> 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	52
2－1．本章の要旨.....	52
2－2．序文.....	53
2－3．材料および方法.....	56
2－4．結果.....	61
2－5．考察.....	69
第3章：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	72
総括	73
論文目録.....	75
参考文献.....	76
謝辞	90

略語一覽

4EBP1	eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1
ACTB	β -actin
ANT	antimycin A
ATP	adenosine triphosphate
BLCA	bladder urothelial carcinoma
BRCA	breast invasive carcinoma
BZM	bortezomib
c-index	concordance index
CESC	cervical squamous cell carcinoma and endocervical adenocarcinoma
CHOL	cholangiocarcinoma
CMap	connectivity map
COADREAD	colon/rectum adenocarcinoma
DB	database
DEGs	differentially expressed genes
DLBC	lymphoid neoplasm diffuse large B-cell lymphoma
DNP	2, 4-dinitrophenol
EMT	epithelial-mesenchymal transition
FCCP	trifluoromethoxy carbonyl cyanide phenylhydrazone
FDR	false discovery rate

GBMLGG	glioblastoma multiforme/brain lower grade glioma
GSEA	gene set enrichment analysis
HIF-1	hypoxia-inducible factor-1
HK2	hexokinase 2
HNSC	head and neck squamous cell carcinoma
HRE	hypoxia response element
KIPAN	pan kidney
LIHC	liver hepatocellular carcinoma
LINCS	library of integrated network-based cellular signatures
LUAD	lung adenocarcinoma
LUSC	lung squamous cell carcinoma
MESO	mesothelioma
mTOR	mechanistic target of rapamycin
MUC1	mucin 1
NDUFAF4	NADH:ubiquinone oxidoreductase complex assembly factor 4
OLG	oligomycin
OV	ovarian serous cystadenocarcinoma
OCR	oxygen consumption rate
p70 S6K	70 kDa ribosomal protein S6 kinase 1
PAAD	pancreatic adenocarcinoma

PCPG	pheochromocytoma and paraganglioma
PCR	polymerase chain reaction
PDK1	pyruvate dehydrogenase kinase
PMEPA1	prostate transmembrane protein, androgen induced 1
PRAD	prostate adenocarcinoma
pVHL	von Hippel-Lindau protein
ROC	receiver operating characteristic
RTN	rotenone
S6	ribosomal protein S6
SARC	sarcoma
SKCM	skin cutaneous melanoma
STES	stomach adenocarcinoma/esophageal carcinoma
TCGA	the cancer genome atlas
TGCT	testicular germ cell tumors
THCA	thyroid carcinoma
THYM	thymoma
TOP2B	DNA topoisomerase II β
UCEC	uterine corpus endometrial carcinoma
UCS	uterine carcinosarcoma
UVM	uveal melanoma

序論

日本人の 2 人に 1 人が生涯でがん罹患し、男性が 4 人に 1 人、女性が 6 人に 1 人は生涯でがんにより死亡すると推計されている (2017 年時点の推計値)¹。世界規模では、1410 万人のがん罹患患者と 820 万人のがん死亡者が 2012 年だけでも報告されている²。すなわち、がんは非常に身近な疾患であり、その治療法の開発が世界レベルで急務である。特に化学療法に目を配ると、従来では細胞分裂や DNA 複製阻害を狙った化学療法が主流だったのに対し、現在ではがん分子標的治療薬、すなわちがん細胞の生存・増殖に重要な役割を果たす分子の機能阻害を狙った治療法が台頭し、その急速な普及ががん患者の治療戦略を一変させてきた³。一方で、がん分子標的治療薬の大半が、がん種ごとの特定の遺伝子上の特徴を有する患者に有効な治療法であり³、より多くのがん患者を治療するためには別の観点からのがん治療標的の同定が必要となる。その中で本研究が着目したのが、固形がん内で一般に生ずる低酸素や低栄養などの代謝ストレスに対しての、がん細胞のストレス応答機構である。

固形がんでは、血管形成不全によって特有の微小環境 (がん微小環境) が構築され、酸素や栄養の供給が十分でない^{4,5}。例えば、正常乳腺組織に対し乳がん組織では、酸素分圧が中央値で約 35 mmHg 低かった症例や⁶、胃がん組織や大腸がん組織におけるグルコース濃度が、正常組織に対して著しく減少していたことが報告されている⁷。このような代謝ストレス環境下において、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。一方で、がん細胞自身は、がん遺伝子やがん抑制遺伝子などによって、生存・増殖に有利な代謝形質を獲得している。1924 年に Otto Warburg によって発見された Warburg 効果、すなわち、がん細胞が酸素の有無依らず解糖系を亢進する好氣的解糖も、がん遺伝子 *MYC* やがん抑制遺伝子 *TP53*, *VHL*, *LKB1* などの変異の結果として誘導される形質である^{8,9}。解糖系ではミトコンドリアにおける酸化的リン酸化に比べて、ATP 産生効率が低いものの、ATP 産生速度は速い¹⁰。また、解糖系から分岐するペントースリン

酸経路を介し、がん細胞は増殖に必要な核酸などの高分子を合成する⁸。したがって、増殖能が高いがん細胞にとって、解糖系の亢進は有利な形質である^{8,11,12}。他にも、メチオニン¹³、アルギニン^{14,15}、グルタミン¹⁵、あるいは各種ビタミン類など¹⁶、がん細胞は様々な栄養に対する高い要求性を有する。すなわち、腫瘍内の代謝ストレス環境下において、がん細胞はその栄養要求性を満たしつつ生存・増殖する必要がある、細胞内外の状況に応じて細胞内ストレス応答を動的に活性化する必要がある（図1）。

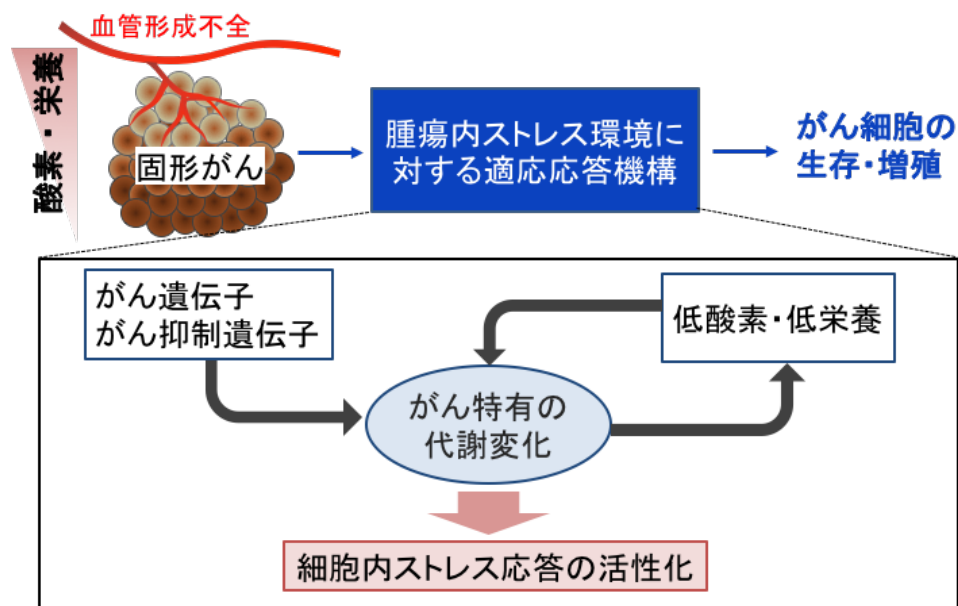


図1. 腫瘍内ストレス環境とがん細胞の細胞内ストレス応答

こうしたがん細胞に特有の代謝環境への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る。こうした細胞内ストレス応答機構に関する探索的研究においては、網羅的に遺伝子発現を測定するトランスクリプトーム解析が有効な手段の1つである。特に公共の遺伝子発現データベースや既知の遺伝子セット・データベースが相次ぎ開発・整備されたことによって、発現変動遺伝子をもたらした特定のストレス条件に対して生物学的解釈を付与することに数多くの成功が見られている¹⁷⁻²⁰。しかしながら依然として、特定のストレス条件下での発現変動遺

伝子セットから生物医学情報を引き出すためには、十分な生化学に関する事前知識と高度な情報処理能力が必要であった²¹。

こうした背景の下、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。まず、腫瘍内ストレスの1つである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遺伝子発現の転写制御機構と腫瘍増殖との関連に着目した研究を展開した(第1章)。ここで見いだされた低酸素ストレス下における転写因子 HIF-1 の転写活性誘導能に着目し、新たな機能分子 *PMEPA1* を見出した。さらには臨床固形がん組織でのネットワーク解析から *PMEPA1* 発現の臨床上の意義を明らかにすることに成功した(第2章)。一方で、数ある遺伝子の中から、*PMEPA1* のような遺伝子、すなわち過剰発現やノックダウンによる実験系で代謝ストレス応答に関連しうる形質を示す遺伝子を見出すことは、遺伝子発現解析のゴールドスタンダードであるエンリッチメント解析などを用いても非常に困難であった。こうした動機を背景に、代謝ストレスなどによる膨大な発現変動遺伝子群の中から着目すべき遺伝子を見出せないかと考え、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(第3章)。以下、第1章から第3章の概要を示す。

第1章. 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²²、酸化還元シグナル伝達²²や低酸素ストレス応答²³⁻²⁷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 ρ^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 ρ^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 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²⁸。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 α サブユニット (HIF-1 α) 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 α の安定化に関与すると考えられていた^{23-27,29}。その一方で、本研究では、HIF-1 α 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 ρ^0 細胞とプロテアソーム阻害活性をもつ抗がん剤 BZM 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。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^{30,31}を処理すると、低酸素ストレス下で HIF-1 α 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 (図 2)³²。

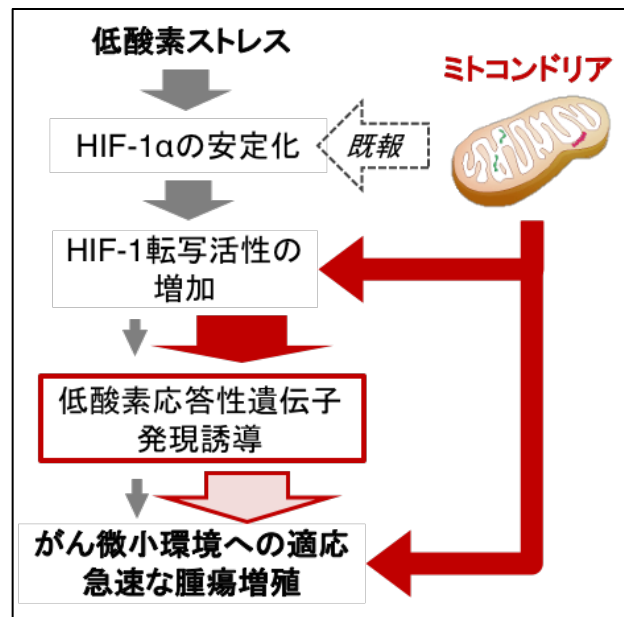


図 2. 本論文で見出したミトコンドリアと低酸素応答，腫瘍増殖能の関連

第 2 章. TGF- β 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 ρ^0 細胞で高発現に至った遺伝子の 1 つ， *PMEPA1* に着目した．これまでに，*PMEPA1* が多くの固形がんで正常組織よりも高発現すること³³⁻³⁵，そして TGF- β が *PMEPA1* の主要な発現調節因子であると同時に TGF- β 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^{36,37}．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- β 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．次に，臨床の固形がん組織中の *PMEPA1* の役割を調べるために，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．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- β 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- β 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^{38,39}, 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- β 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 (図 3)⁴⁰.

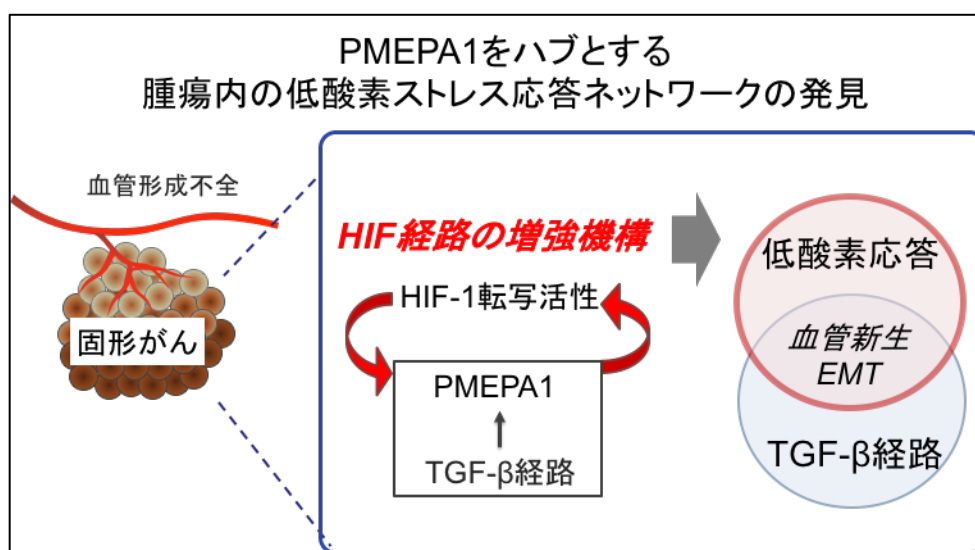


図 3. *PMEPA1* の腫瘍内低酸素ストレス応答ネットワーク中の役割の模式図

第 3 章. 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¹⁷⁻²⁰. 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 4）．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．InDePTH 法により，上述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．

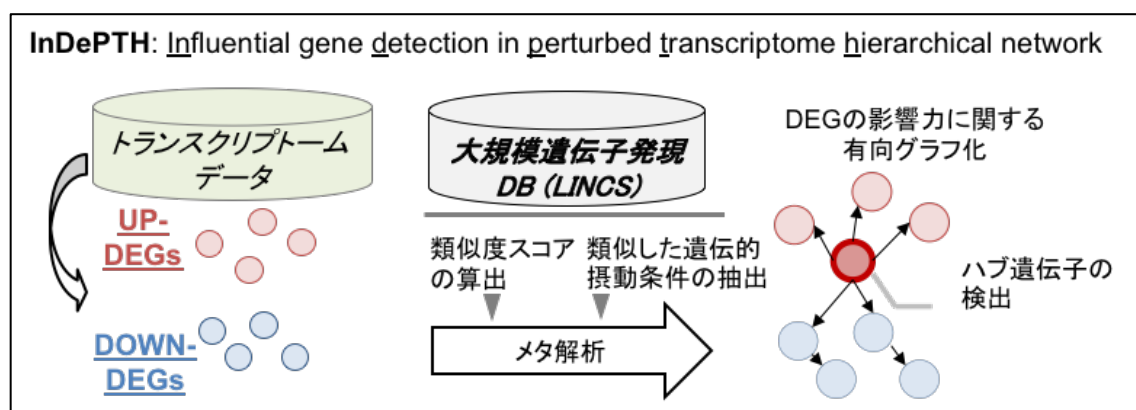


図 4. InDePTH 法のアルゴリズムのイメージ図

本論文は，序章と上述した全 3 章，そして総括とで構成されている．第 1 章から第 3 章までは，それぞれ，「本章の要旨」「序文」「材料および方法」「結果」「考察」の節から構成されている．

第 1 章：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

1-1. 本章の要旨

ミトコンドリアは、低酸素ストレスに対する細胞内ストレス応答を制御するとともに、腫瘍増殖も制御する。しかしながら、両制御機構の関連はほとんど明らかでない。本章では、ミトコンドリア欠損によって、低酸素ストレス下における HIF-1 の転写活性誘導能が損なわれると同時に、がん異種移植モデルにおける腫瘍増殖能が著しく低下することを示す。mtDNA を欠損した ρ^0 細胞株を用いたところ、 ρ^0 細胞の異種移植モデルに比べて親株の異種移植モデルが急速な増殖を示したが、両者で HIF-1 経路の活性化は同等に生じていた。興味深いことに、 ρ^0 細胞の異種移植片から樹立した *ex vivo* ρ^0 細胞では、酸素濃度に関わらず、HIF-1 α タンパクの発現量が僅かに増加し、HIF-1 経路が恒常的に活性化していた。*ex vivo* ρ^0 細胞で恒常的に HIF-1 経路が活性化するに至ったことに対応して、 ρ^0 細胞では低酸素ストレス下における HIF-1 転写活性の誘導がほとんどみられず、酸化的リン酸阻害剤を処理した親株でもその誘導がみられなかった。興味深いことに、これら条件下においても、HIF-1 α タンパクは通常通り増加していた。以上より、ミトコンドリア欠損によって低酸素ストレス下での HIF-1 転写活性誘導能が著しく損なわれた状態で腫瘍内ストレス環境に適応応答した結果として、恒常的な HIF-1 経路の活性化に至ったことが強く示唆された。

1-2. 序文

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、酸素の供給が十分でない。したがって、腫瘍内ストレス環境で生存・増殖するために、がん細胞は低酸素ストレスに対する適応応答を活性化する必要がある^{4,5}。低酸素応答における主要な制御因子は転写因子 hypoxia-inducible factor (HIF) である。HIF は解糖系を活性化し、また、細胞外の腫瘍内微小環境の再構築を進めるため、がんの生存や増殖、悪性化に繋がる²⁸。HIF は HIF- α と HIF- β から構成されている。哺乳類では3種の α サブユニットが知られており、そのうち HIF-1 α と EPAS1/HIF-2 α の発現は確かに腫瘍増殖と悪性化に寄与することが報告されている⁴¹。HIF- β は細胞内で恒常的に発現する一方で、HIF- α は酸素濃度依存的に存在している²⁸。すなわち、通常酸素条件下ではプロリン水酸化酵素によって HIF- α がヒドロキシル化され、pVHL との相互作用によるユビキチン化を経て、HIF- α がプロテアソームによる分解を受ける^{8,28,41,42}。低酸素ストレス下では、HIF- α タンパクは安定化して存在しており、恒常的に発現する HIF- β タンパクとのヘテロダイマーを形成する。この複合体はやがて核移行し、DNA 上の HRE 配列に結合することで、低酸素ストレス下への適応に必要な遺伝子数百種の発現に至る^{28,43}。

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担っている²²。さらに、酸化還元シグナル伝達²²、小胞体ストレス応答⁴⁴、そして低酸素応答²³⁻²⁷のような種々の細胞内ストレスシグナル経路の活性化においても、

ミトコンドリアは重要な役割を担う。これら広範な細胞機能へのミトコンドリアの関与に対応し、ミトコンドリア DNA (mtDNA) を欠損した細胞 (ρ^0 細胞) をマウスに異種移植した研究から、ミトコンドリアが急速な腫瘍増殖に関与することが知られている^{45,46}。ヒト臨床研究においても、mtDNA 中の一塩基多型とがんの予後との関連が報告されている^{47,48}。腫瘍にとっての好ましい役割がミトコンドリア機能に対して知られる一方で、甲状腺や膵臓、腎臓、結腸がんなどの多くのがん種において、mtDNA の突然変異や mtDNA コピー数の低下が報告されている他、ミトコンドリア量の低下に起因したミトコンドリア機能の低下や欠損に至る例が多く報告されている⁴⁹⁻⁵⁵。これは、腫瘍増殖中のミトコンドリア機能の低下に対して、未同定の適応機構が存在することを示唆している。

本章では、ヌードマウスを用いた異種移植モデルにおいて、ミトコンドリア機能の欠損が腫瘍の表現型に与える影響を検討した。ヒト大腸がん細胞株 HT-29 の親株 (HT-29 Pt 細胞) および mtDNA を欠損させた HT-29 ρ^0 (ρ^0n 細胞) を免疫不全マウスに移植し、比較した所、腫瘍増殖能が両細胞間で著しく異なっていた。一方で、ミトコンドリアが低酸素応答の活性化に寄与するという既報があるものの²³⁻²⁷、mtDNA の有無に依らず、生着した異種移植片においては低酸素応答性遺伝子群が発現増加していた。この既報との明らかな相違点の背景を説明すべく、HT-29 ρ^0n 細胞において腫瘍内ストレス環境への未同定の適応機構が活性化したと仮説を立て、異種移植モデルでの腫瘍増殖を経た *ex vivo* HT-29 ρ^0 細胞を樹立した。HT-29 ρ^0 細胞と *ex vivo* HT-29 ρ^0 細胞の比較解析の結果、低酸素ストレス下での

HIF-1 転写活性誘導能が mtDNA 欠損によって著しく損なわれることを発見した。

1-3. 材料および方法

細胞培養と化合物処理

ヒト結腸がん細胞株 HT-29⁴⁴, ヒト膵臓がん細胞株 PANC1⁴⁴, ヒト線維肉腫細胞株 HT1080⁵⁶ およびヒト胎児腎細胞株 293T⁵⁷ を用いた。HT-29 ρ^0 n 細胞および HT1080 ρ^0 細胞は、当研究室でこれまでに樹立した細胞株である³²。HT-29 ρ^0 x 細胞の樹立については後述した。HT-29 細胞と PANC1 細胞, HT1080 細胞については PRMI-1640 (Wako, Osaka, Japan) で培養し, 293T 細胞については DMEM (Wako) で培養した。各培地には 10% FBS (熱処理により非働化) および 100 μ g/ml のカナマイシンを添加した (以下, 増殖用培地という)。

HT-29 ρ^0 n 細胞や HT-29 ρ^0 x 細胞, HT1080 ρ^0 細胞を培養する際には, 増殖用培地に 50 μ g/mL uridine (Sigma, St. Louis, MO, USA) および 1mM sodium pyruvate (Sigma) を添加した (以下, ρ^0 増殖用培地)。同一条件下で HT-29 Pt 細胞と HT-29 ρ^0 n 細胞, HT-29 ρ^0 x 細胞を比較するために, HT-29 Pt 細胞および HT1080 細胞の親株も, 前培養から ρ^0 増殖用培地で培養した。本研究で用いた全ての細胞には, MC-210 (DS Pharma Biomedical, Osaka, Japan) 処理を事前に施した。

腫瘍増殖能評価

6 週齢の BALB/cAJcl-nu/nu マウス (Charles River, Kanagawa, Japan) の右脇腹に細胞を皮下移植し, 移植後 8 日の時点から計測を開始した. 腫瘍の長径 (Length, L) および短径 (Width, W) を計測し, 腫瘍体積を $(L \times W \times W)/2$ (mm^3) ($\text{mean} \pm \text{SEM}$, $N = 7$) と近似し算出した⁵⁸. 統計解析ソフトウェア R (version 3.0.3) により, HT-29 $\rho^0\text{n}$ 細胞と HT-29 $\rho^0\text{x}$ 細胞由来の腫瘍体積に対して Welch の 2 標本 t 検定を実施した. マウスを用いた動物実験は, がん研究会が規定として定める動物実験指針に基づき, 動物実験委員会に承認された動物実験計画書に従って実施された.

HT-29 $\rho^0\text{x}$ 細胞の単離

まず, 6 週齢の BALB/c-nu/nu マウス (Charles River Japan) に 1×10^7 個の HT-29 $\rho^0\text{n}$ 細胞を移植した. 148 日後, HT-29 $\rho^0\text{n}$ 細胞由来の移植腫瘍片から 2 mm^3 を摘出し, 別個体の BALB/c-nu/nu マウスに直接移植した. さらに 35 日後に, 3 回目となる別個体への移植を行った. さらに 47 日後, dispase 1 (Wako) と collagenase (Sigma) を用いてマウス線維芽細胞を酵素的に消化し, HT-29 $\rho^0\text{x}$ 細胞を単離した.

化合物条件

RTN (Calbiochem, Darmstadt, Germany), ANT (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), OLG (Calbiochem), FCCP (Sigma) および DNP (Nacalai, Kyoto, Japan) を DMSO (Wako)

に溶解してストックした． Metformin (Sigma) を蒸留滅菌水に溶解してストックした． 低酸素ストレス環境を構築するために，酸素吸収剤である AnaeroPack-Kenki 5% (Mitsubishi Gas Chemical, Tokyo, Japan) を 2.5-L AnaeroPack-Rectangular Jar (Mitsubishi Gas Chemical) に封入した． 製造業者によると， AnaeroPack-Kenki 5%によって，大気中の酸素濃度が 1 時間以内に 1%以下に低下し，最終的にはほぼ無酸素状態に至る． 本研究における低酸素条件では，培地中に僅かに溶存酸素が残る可能性があることに留意する必要がある．

HRE レポーターアッセイ

Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 用いて，ホタルルシフェラーゼ含有 5×HRE レポーターベクター (Dr. Toru Shibata より供与頂いた⁵⁹⁾ およびウミシイタケルシフェラーゼ含有 phRL-CMV (Promega, Fitchburg, WI, USA) を細胞にトランスフェクションした． ウミシイタケルシフェラーゼを内部標準とした Dual-Glo Luciferase Assay System (Promega) により，ウミシイタケルシフェラーゼ活性に対するホタルルシフェラーゼ活性の比 (mean±SEM, N=4) を，製造業者の標準プロトコルに従って測定した．

HIF-1 DNA 結合アッセイ

Nuclear Extract Kit (Active Motif, Carlsbad, CA, USA) で細胞を細胞質と核に分画

し、等量の核タンパク量に揃えた。その後、TransAM HIF-1 (Active Motif)の標準プロトコルによって HIF-1 DNA 結合能 (mean \pm SEM, N = 3) を測定した。

イムノブロット解析

イムノブロット解析は、過去に当研究室によって実施された方法に従った⁶⁰。簡潔に述べると、等量のタンパク抽出物を SDS-ポリアクリルアミド勾配ゲル上で分離し、ニトロセルロース膜上に転写の後、後述する一次抗体でプローブ化した。続いて、特異的なシグナルを可視化するために、化学発光検出システム系で適切な二次抗体 (Perkin-Elmer, Waltham, MA, USA) を処理した。本章で用いた一次抗体は次のとおりである。anti-TOP2B (Abcam, Cambridge, MA, USA), anti-HIF-1 α , anti-ARNT/HIF-1 β (BD Transduction, San Jose, CA, USA), anti-EPAS1/HIF-2 α , anti-mTOR, anti-MUC1, anti-HK2, anti-PDK1, anti-4EBP1, anti-phospho-4EBP1 (Ser65), anti-S6, anti-phospho-S6 (Ser235/236), anti-S6K, anti-phospho-S6K (Thr389), anti-RPS3 (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA)。TOP2B や mTOR, RPS3 をローディングコントロールとして用いた。

RNA 調整

RNeasy RNA purification kit (Qiagen, CA, USA) を用いて、培養細胞からのトータ

ル RNA を抽出した. 異種移植片については Allprotect Tissue Reagent (Qiagen) で安定化した後に TissueLyser (Qiagen) で破碎し, 細胞中の RNA を抽出した. RNA 抽出後, 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) を用いて RNA の品質を確認した. マイクロアレイ分析のために, ノードマウスに異種移植した HT-29 Pt 細胞を, 移植後 13 日と 37 日の時点で回収した. 同様に, ノードマウスに移植した HT-29 p^0n 細胞の異種移植片から, 次のように細胞を回収した. まず, 移植後 20 日および 148 日において, 異なる個体から 2 つの試料を採取した. 3 つ目の試料については, HT-29 p^0n 細胞をノードマウスに移植した 148 日後, 異なる個体のノードマウスに再度移植し, さらに 35 日後にサンプルを回収した. ノードマウスに移植した HT-29 p^0x 細胞については, 移植後 13 日および 20 日の時点で細胞を回収した.

マイクロアレイ解析

GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 アレイ (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) の標準プロトコルに従い, マイクロアレイデータを取得した. 統計解析ソフト R のパッケージ *frma* (バージョン 1.14.0) ⁶¹ のデフォルトパラメータを用いて, frozen robust multiarray analysis (*frma*) 法により, データを正規化した. 発現増加および発現低下プローブ決定のために, 各コントロールサンプルに対するシグナル強度 (Signal Intensity, SI) 比を計算し, 次の(i)–(iv)の条件で発現変動遺伝子を決定した: (i) 分母の SI が 100 以上かつ SI 比が 2 倍以上ならば,

発現増加 (upregulated), (ii) 分子の SI が 100 以上かつ SI 比が 1/2 以下ならば, 発現減少 (downregulated), (iii) 分母の SI が 100 未満かつ分子の SI が 300 以上ならば, 発現増加 (upregulated), (iv) 分子の SI が 100 未満かつ分母の SI が 300 以上ならば, 発現減少 (downregulated). これらクライテリアに基づき, 以下 5 つの発現変動遺伝子セット (シグネチャー) を定義した: (i) **hypoxia upregulated (downregulated) signature**, HT-29 Pt 細胞と HT-29 ρ^0n 細胞, HT-29 ρ^0x 細胞, 「BZM を処理した HT-29 Pt 細胞」のいずれか 1 つにおいて, 18 時間の低酸素ストレス下での培養によって発現変動したプローブ, (ii) **ρ^0x upregulated (downregulated) signature**, HT-29 ρ^0n 細胞に対して HT-29 ρ^0x 細胞で発現変動したプローブ, (iii) **ρ^0n_vivo upregulated (downregulated) signature**, *in vitro* で培養中の HT-29 ρ^0n に対して異種移植片中の HT-29 ρ^0n 細胞で発現変動したプローブ, (iv) **BZM upregulated (downregulated) signature**, HT-29 Pt 細胞において BZM を処理し発現変動したプローブ, (v) **xenograft upregulated (downregulated) signature**, *in vitro* で培養中の HT-29 Pt 細胞と HT-29 ρ^0n 細胞に対して異種移植片中の同細胞でそれぞれ発現変動したプローブのうち, HT-29 Pt 細胞と HT-29 ρ^0n 細胞で共通して選ばれたプローブ. 選択されたプローブリストは, 章末の表 1-表 10 を参照されたい. 教師なしの階層的クラスタリング解析には, Euclidean 距離と Ward の連結法を用いた. GSEA ソフトウェア (v2.0.14, Broad Institute) ^{17,18} を用いて, Molecular Signatures Database (MSigDB, v4.0) の c2 curated genes ¹⁸, あるいは上述した独自に定義した遺伝子セットに対してのエンリッチメントを評価した. GSEA の際,

比較サンプル中のいずれかで SI が 100 以上のプローブのみを用いた。マイクロアレイデータセットは、NCBI Gene Expression Omnibus に寄託した (accession no. GSE80320)。

酸素消費速度測定

XF24 Extracellular Flux Analyzer (Seahorse Bioscience, North Billerica, MA, USA) の標準プロトコルを用いて酸素消費速度 (OCR) (mean \pm SEM, N=4) を測定した。異なる細胞間の OCR を比較するために、OCR 測定後、CDA-500 粒子カウンター (Sysmex, Hyogo, Japan) を用いて 1 ウェル中の細胞数を計数し、同一細胞数あたりの OCR を比較した。定常状態の OCR 比較には、測定開始後 4 回目の値を用いた。

リアルタイム定量 PCR

精製した RNA を、ABI Prism 700 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) の標準プロトコルに従って評価した。 *mitochondrially encoded NADH dehydrogenase 6 (MTND6)* や *mitochondrially encoded cytochrome c oxidase II (MTCO2)* を標的とした、ヒトあるいはマウスの FAM 標識 D-LUX プライマーセット (Invitrogen) は、D-LUX Designer ソフトウェア (Invitrogen) によって次のように設計した： *MTND6* (Forward), 5'-TTCACCCACAGCACCAATCCTA-3'; *MTND6* (Reverse), 5'-

CGCTATGAGTGTTTTAGTGGGGTTAG[FAM]G-3';	<i>MTCO2</i>	(Forward),	5'-
CGTCCACAGATGCAATTCCCGGA[FAM]G-3';	<i>MTCO2</i>	(Reverse),	5'-
CGGTCGTGTAGCGGTGAAAG-3';	<i>mtnd6</i>	(Forward),	5'-
CGCTAAAGGAGGGATTGGGGTAG[FAM]G-3';	<i>mtnd6</i>	(Reverse),	5'-
AATACCCGCAAACAAAGATCACC-3';	<i>mtco2</i>	(Forward),	5'-
CGGTTCAAGCAACAGTAACATCAAAC[FAM]G-3';	<i>mtco2</i>	(Reverse),	5'-
GACAATGGGCATAAAGCTATGGTT-3'.			

細胞内 ATP 量評価

細胞を 96 ウェルプレートに 5×10^3 cells/well で播種し 24 時間の培養後、「化合物条件」に記載方法で処理した低酸素ストレス下あるいは通常酸素条件下にてさらに 18 時間培養した。その後、CellTiter-Glo luminescent cell viability assay (Promega) の標準プロトコルに従い、細胞内 ATP 量を評価した。ATP 量は、測定時点での細胞数で標準化した。

VHL 配列の評価

HT-29 Pt 細胞および HT-29 p⁰x 細胞から得た cDNA 中のヒト *VHL* の全長を PCR で増幅し、pFlag-CMV-5c 発現ベクター (Sigma) の HindIII/Kpn I 部位に組み込み、*VHL* 発現ベクターの配列を 3130xl ジェネティックアナライザ (Applied Biosystems) を用いて確認した。クローニングに用いたプライマーの配列は以下の通りである。

Forward: 5'-CCCAAGCTTGCCACCATGCCCCGAGGGCGGAGAACTGG-3'

Reverse: 5'-GGGGTACCAATCTCCCATCCGTTGATGTGCAATG-3'

1-4. 結果

mtDNA 非依存的な、異種移植片における低酸素応答の活性化

HT-29 Pt 細胞と HT-29 ρ^0 n 細胞をヌードマウスに移植したところ、HT-29 ρ^0 n 細胞の腫瘍増殖速度が、HT-29 Pt 細胞の腫瘍増殖速度よりも著しく低下していた（図 5a）。一方で、マイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現プロファイリングにより、HT-29 ρ^0 n 細胞と HT-29 Pt 細胞との間で、培養細胞から異種移植片にかけての遺伝子発現パターンが非常に類似していたことを見出した（図 5b, 5c）。さらに、GSEA によって、HT-29 ρ^0 n 細胞と HT-29 Pt 細胞の異種移植片で低酸素応答性遺伝子群の活性化に至ったことを見出された（図 5d）。低酸素応答性遺伝子群を用いた階層的クラスタリング解析により、HT-29 ρ^0 n 細胞と HT-29 Pt 細胞の異種移植片において、低酸素応答性遺伝子群が同等に発現していたことも明らかとなった（図 5e, 5f）。

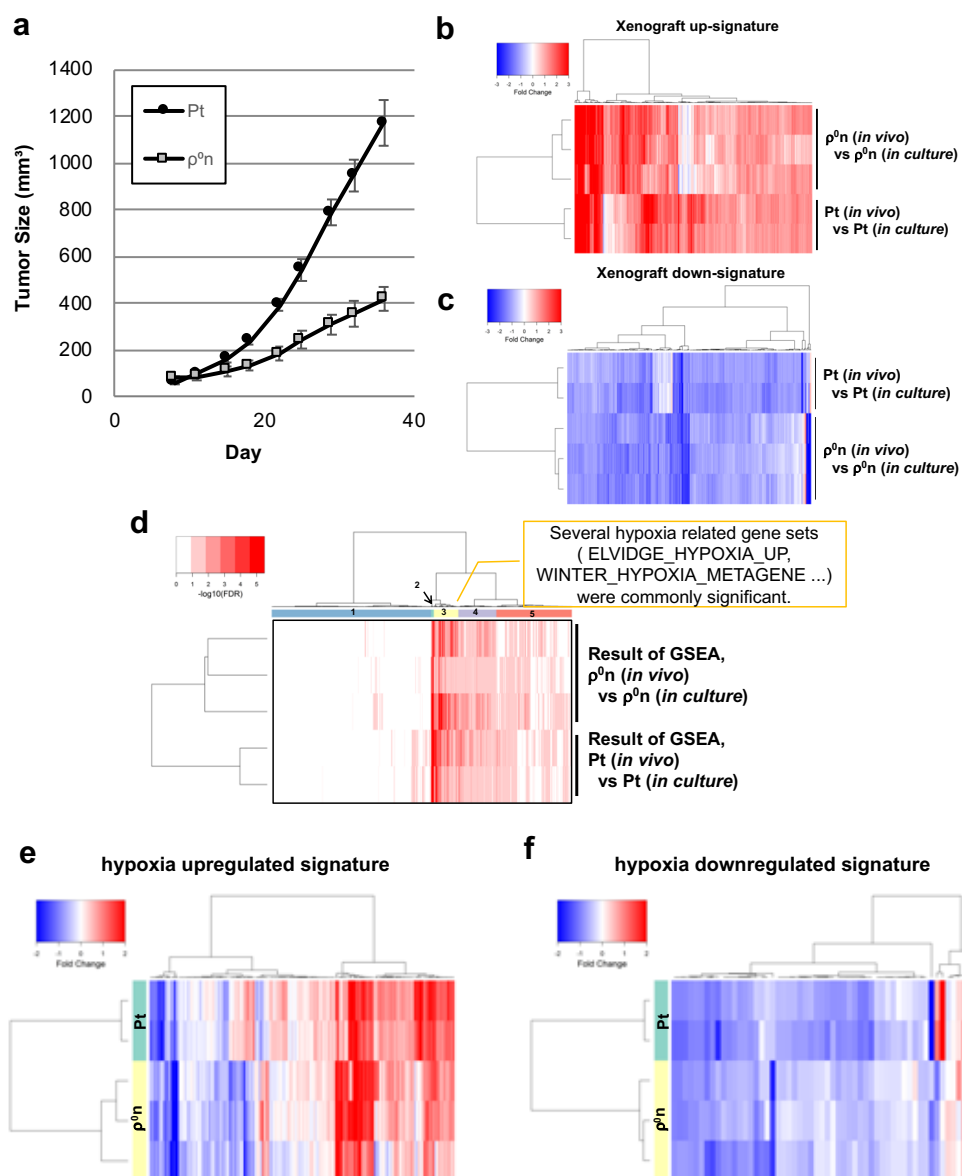


図 5. ミトコンドリア依存的な腫瘍増殖速度と移植細胞中の低酸素ストレス応答の活性化

(a) HT-29 ρ^0n 細胞由来の腫瘍 (移植時 1×10^7 cells/mouse, N = 7) および HT-29 Pt 細胞由来の腫瘍 (移植時 1×10^6 cells/mouse, N = 7)の腫瘍増殖速度. (b, c) 遺伝子発現のシグナル強度比の階層的クラスタリング. ヌードマウス異種移植モデルで増殖時の HT-29 Pt 細胞と HT-29 ρ^0n 細胞を, *in vitro* で増殖時の両細胞に対して比較した. (b) に xenograft upregulated signature を, (c) に xenograft downregulated signature を用いた. (d) HT-29 Pt 細胞と HT-29 ρ^0n 細胞の異種移植片を, *in vitro* で増殖中のそれぞれの細胞に対して比較した GSEA (MSigDB c2 コレクションを使用). FDR を常用対数変換し, 階層的クラスタリングとヒートマップで示した. (e, f) 遺伝子発現のシグナル強度比. HT-29 Pt 細胞と HT-29 ρ^0n 細胞由来の異種移植片を, それぞれの *in vitro* 培養時の細胞と比較した. hypoxia-upregulated signatures を (e) に, hypoxia-downregulated signatures を (f) に用い, 遺伝子発現パターンの変化を比較した.

HT-29 ρ^0 細胞の異種移植片に由来する細胞株の樹立

ヌードマウスへの異種移植片から単離された HT-29 ρ^0 n 細胞を培養し, *ex vivo* 細胞 (HT-29 ρ^0 x 細胞) を樹立した. HT-29 ρ^0 x 細胞は, ヒトまたはマウスの mtDNA の再獲得には至っておらず (図 6a-6c), ミトコンドリア依存的な酸素消費も示さなかった (図 6d). HT-29 ρ^0 x 細胞は, 元の HT-29 ρ^0 n 細胞と同等の *in vitro* の細胞増殖速度を示し (図 6e), 他方, ニードマウス異種移植モデルでは HT-29 ρ^0 x 細胞で細胞増殖速度が僅かに高まるも, 有意な差ではなかった ($p = 0.1149$) (図 6f).

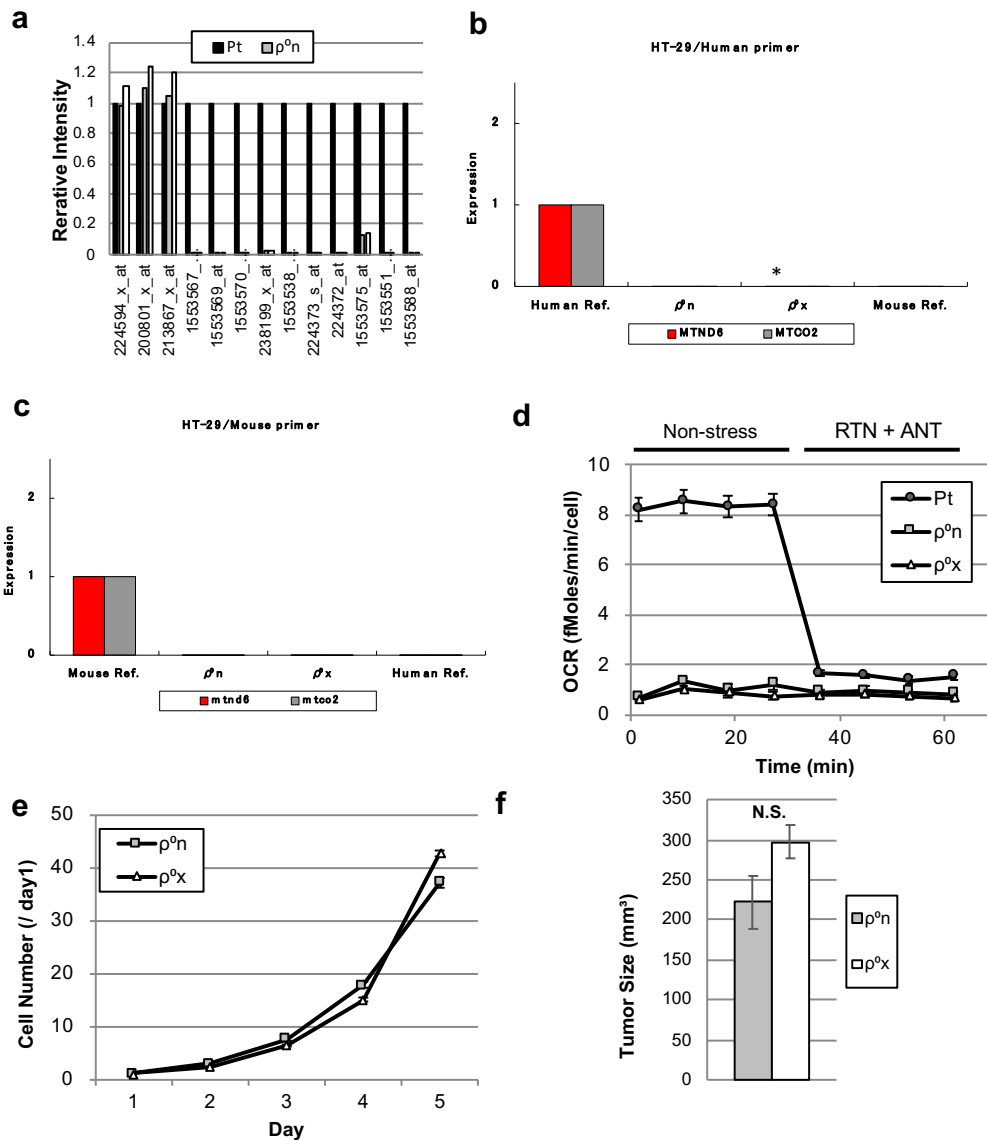


図 6. *ex vivo* ρ^0 細胞の樹立とその性状解析

(a) mtDNA を認識するプローブセットのシグナル強度比 (対, HT-29 Pt 細胞比). 224594_x_at, 200801_x_at, 213867_x_at は *ACTB* を認識するプローブであり, 他のプローブはすべて mtDNA 由来 mRNA を認識する. (b, c) ヒトおよびマウスの *MTCO2* に対する qRT-PCR 解析. ヒト由来に対して設計されたものを (b) に, マウス由来に対して設計されたものを (c) に示した (mean \pm SD, n=3). 発現強度は, それぞれの種の参照 RNA を用いた. *: 著しく低いシグナル強度のために定量できなかった 1 サンプルがあることを意味. (d) HT-29 Pt 細胞と HT-29 ρ^0n 細胞, HT-29 ρ^0x 細胞における酸素消費速度 (OCR). 定常状態における OCR を 4 度測定した後, RTN (0.5 μ M) と ANT (0.5 μ g/ml) を添加した. (e) HT-29 ρ^0n 細胞と ρ^0x 細胞の *in vitro* 培養における細胞増殖速度 (day1 比, n=3). (f) HT-29 ρ^0n 細胞と HT-29 ρ^0x 細胞の腫瘍増殖速度比較. 1×10^7 cells/mouse を移植し, 移植後 24 日の時点で腫瘍体積を比較した (各々 N = 7).

トランスクリプトーム解析より，HT-29 ρ^0x 細胞と元の HT-29 ρ^0n 細胞の間の遺伝子発現パターンに明確な違いが見出された（図 7a, 7b）．まず，培養中の HT-29 ρ^0x 細胞と HT-29 ρ^0n 細胞を比較し，HT-29 ρ^0x 細胞で恒常的に発現増加した 69 個のプローブセット，および発現減少した 29 個のプローブセットを同定した．これら遺伝子セット (ρ^0x signature) を用いて，培養中の HT-29 ρ^0x 細胞における遺伝子発現パターンが，異種移植片中の HT-29 ρ^0n 細胞の遺伝子発現パターンと類似していることを見出した（図 7a, 7b）．次に，異種移植片中の HT-29 ρ^0n 細胞を培養中の HT-29 ρ^0n 細胞と比較し，異種移植モデルでの培養によって発現増加した 213 個のプローブセット (ρ^0n_vivo upregulated signature)，および発現減少した 161 個のプローブセット (ρ^0n_vivo downregulated signature) を同定した． ρ^0n_vivo upregulated signature と ρ^0n_vivo downregulated signature はそれぞれ，HT-29 ρ^0n 細胞に比べて HT-29 ρ^0x 細胞で発現する遺伝子に濃縮（エンリッチメント）していた（図 7c, 7d）．このように，HT-29 ρ^0n 細胞の異種移植片での表現型の一部を，培養中の HT-29 ρ^0x 細胞が保持していた．これは異種移植片を形成する増殖過程で獲得されたと考えられる．

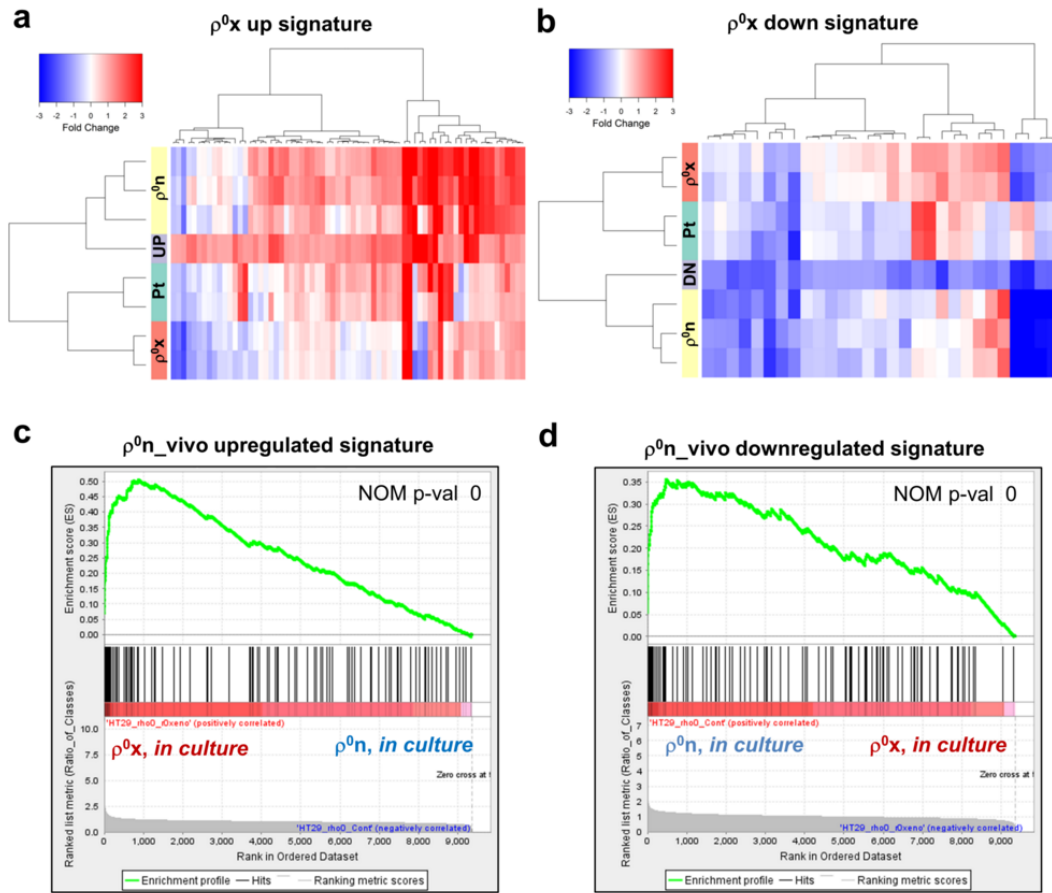


図 7. *in vitro* の HT-29 ρ^0x 細胞で維持された異種移植片中 HT-29 ρ^0n 細胞の形質

(a, b) 遺伝子発現のシグナル強度比. HT-29 Pt 細胞と HT-29 ρ^0n 細胞, HT-29 ρ^0x 細胞について, 異種移植片中の遺伝子発現パターンを, それぞれの *in vitro* で培養中の細胞の遺伝子発現パターンと比較した. ρ^0x upregulated signature を (a)で, ρ^0x downregulated signature を (b)で用いた. *in vitro* で培養中の HT-29 ρ^0x 細胞の遺伝子発現強度は, *in vitro* で培養中の HT-29 ρ^0n 細胞の遺伝子発現強度と比較し, 図中では UP/DN と示した. (c, d) HT-29 ρ^0x 細胞と HT-29 ρ^0n 細胞の遺伝子発現パターンの違いに対する, ρ^0n_{vivo} upregulated signature と ρ^0n_{vivo} downregulated signature の エンリッチメントプロット.

培養中の HT-29 ρ^0x 細胞と HT-29 ρ^0n 細胞の GSEA を進めたところ、HT-29 ρ^0x 細胞で高発現する遺伝子に、複数の低酸素誘導性遺伝子セットがエンリッチメントしていた (図 8a, 8b). さらに、HT-29 ρ^0n 細胞よりも HT-29 ρ^0x 細胞で HIF-1 α タンパク量が恒常的に増加していた (図 8c). これらの結果と一致して、HT-29 ρ^0n 細胞よりも HT-29 ρ^0x 細胞で、同量の核内タンパクにおける HIF-1 の DNA 結合活性が 2 倍程度高かった (図 8d). 同じく、HRE レポーターアッセイによって測定した HIF-1 転写活性も HT-29 ρ^0x 細胞で 5 倍程度高かった (図 8e). 一連のデータから、同一の通常酸素条件下において、HT-29 ρ^0x 細胞が HIF-1 α タンパク量増加を伴って、低酸素応答の恒常的活性化に至ったことが示された.

次に、pVHL をコードする遺伝子 *VHL* について cDNA 配列を調べたところ、標準配列 (NCBI Reference Sequence: NM_000551.3) に対して、HT-29 ρ^0x 細胞では変異が認められなかった ($N=3$). 続いて、HIF-1 α の翻訳調節に関与する mTOR シグナル伝達経路の活性化を調べるために、S6 や p70 S6K, そして 4EBP1 の恒常的なリン酸化状態を調べた^{62,63}. 4EBP1 のリン酸化が HT-29 ρ^0n 細胞と HT-29 ρ^0x 細胞で同等程度であった一方で、p70 S6K および S6 のリン酸化は、HT-29 ρ^0n 細胞よりも HT-29 ρ^0x 細胞でわずかに高まっていた (図 8c). 一方で、HT-29 Pt 細胞は、HT-29 ρ^0n 細胞や HT-29 ρ^0x 細胞よりも p70 S6K および S6 のリン酸化状態が遥かに強かった (図 8c). したがって、mTOR シグナル伝達経路の活性化の程度は恒常的な HIF-1 α のタンパク量の違いと一致した傾向を示さず、それらは mtDNA の有無によって異なる調節を受けていると考えられる.

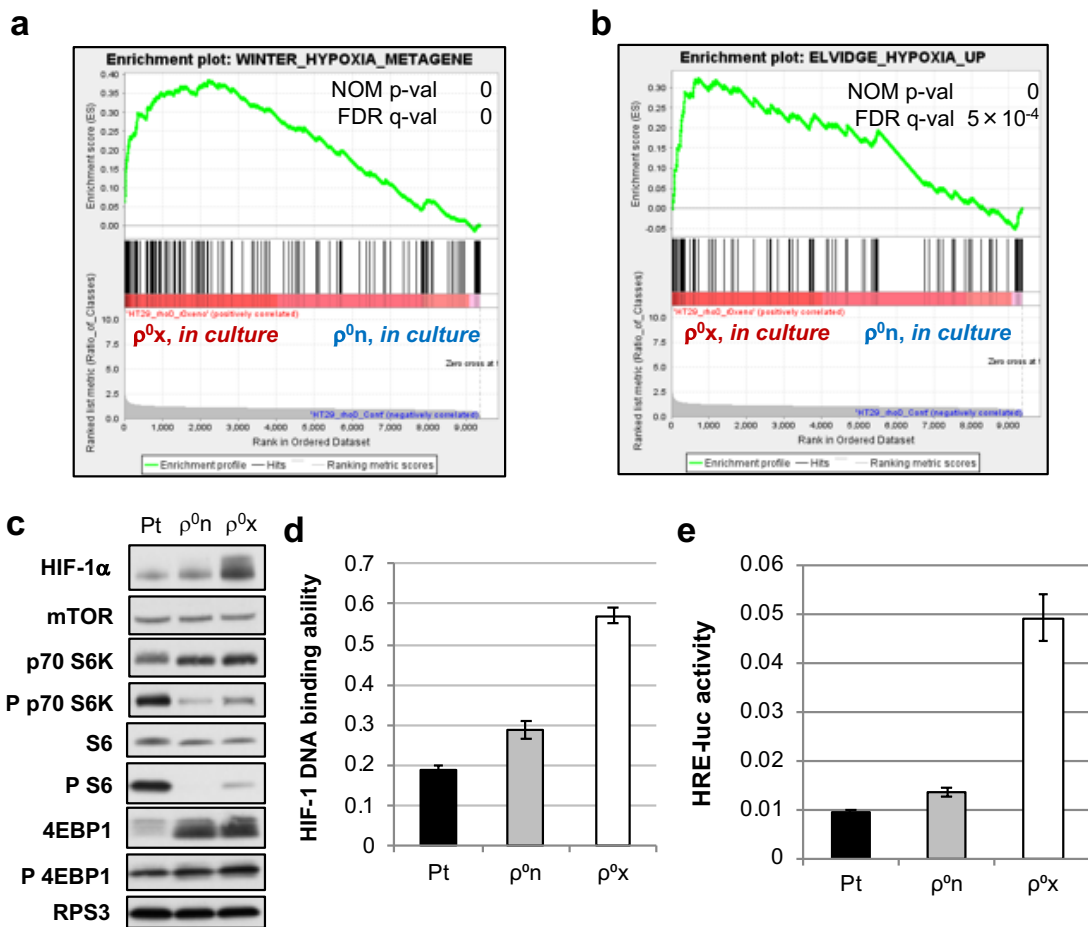


図 8. HT-29 ρ^0x 細胞における低酸素ストレス応答の恒常的活性化

(a,b) エンリッチメントプロット. MSigDB c2 curated collections の winter hypoxia metagene⁶⁴ を(a)に, Elvidge hypoxia up⁶⁵ を(b)に用い, HT-29 ρ^0x 細胞と HT-29 ρ^0n 細胞 (ともに *in vitro* で培養) の遺伝子発現パターンの違いに対して GSEA を実施した. (c) HIF-1 α , および mTOR シグナル伝達経路のリン酸化状態のイムノブロット解析. HT-29 Pt 細胞と HT-29 ρ^0n 細胞, HT-29 ρ^0x 細胞を通常酸素条件下において比較した. RPS3 をローディングコントロールとして用いた. (d, e) HIF-1 DNA-結合活性 (d) と HRE-ルシフェラーゼ活性 (e). 通常酸素条件下における HT-29 Pt 細胞, HT-29 ρ^0n 細胞そして HT-29 ρ^0x 細胞を比較した.

低酸素ストレス下におけるミトコンドリア依存的な HIF-1 転写活性誘導能

HRE レポーターアッセイにより，低酸素ストレス下における HIF-1 転写活性誘導能を調べたところ，HT-29 Pt 細胞では 100 倍以上の活性化が認められたのに対し，HT-29 ρ^0 n 細胞や HT-29 ρ^0 x 細胞では高々 2–3 倍の活性化にとどまった (図 9a)．これと合致して，HT-29 Pt 細胞では低酸素ストレスによって数多くの低酸素応答性遺伝子が発現変動したが，HT-29 ρ^0 n 細胞や HT-29 ρ^0 x 細胞ではそれらは極めて少数であった (図 9b, 9c)．HIF-1 α による転写制御を受ける遺伝子がコードするタンパク，例えば HK2, PDK1²⁸ そして MUC1⁶⁶ について，低酸素ストレスによるタンパク量変化を比較した．HT-29 Pt 細胞では明らかに低酸素ストレス下でそれらのタンパク量が増加したが，HT-29 ρ^0 n 細胞や HT-29 ρ^0 x 細胞ではほとんど増加しなかった (図 9d)．これらの結果は，HT-29 ρ^0 n 細胞や HT-29 ρ^0 x 細胞では，低酸素ストレス下で部分的な HIF-1 転写活性誘導能しか示せないことを意味する．

興味深いことに，HT-29 ρ^0 n 細胞や HT-29 ρ^0 x 細胞における低酸素ストレス下での HIF-1 α タンパクの増加量は，HT-29 Pt 細胞における増加量と同等であった (図 9d)．一方，HIF-1 の異なるアイソフォームである EPAS1/HIF-2 α 量を比較すると，HT-29 ρ^0 x 細胞では低酸素ストレスでタンパク量が増加しなかったが，HT-29 Pt 細胞と HT-29 ρ^0 n 細胞ではそれが増加した (図 9d)．HT-29 Pt 細胞と HT-29 ρ^0 n 細胞，HT-29 ρ^0 x 細胞のいずれにおいても，6 時間あるいは 18 時間の低酸素ストレスを与えた後の核内 HIF-1 α 量とその DNA 結合活性能は同等の水準であった (図 9e, 図 9f)．以上より，低酸素ストレスによって HIF-1 α タンパク

が安定化し、それが核移行した後に、ミトコンドリア活性を介した HIF-1 転写活性誘導能の著しい惹起に至ることが示された。

HT-29 ρ^0 n 細胞と HT-29 ρ^0 x 細胞で観察された HIF-1 転写活性誘導能の減弱化と類似した現象は、プロテアソーム阻害剤である BZM を処理した細胞でも生じることが知られている⁶⁷⁻⁶⁹。BZM は、通常酸素条件下でも HIF-1 α タンパクを安定化させるが、低酸素ストレス下では HIF-1 転写活性の誘導を抑制する⁶⁷⁻⁶⁹。実際、通常酸素条件下で HT-29 Pt 細胞に BZM を処理したところ、低酸素応答性遺伝子を含む数多くの遺伝子の発現量が変化した (図 10a-10d)。興味深いことに、BZM を処理した HT-29 Pt 細胞が示した、低酸素ストレス下での低酸素応答性遺伝子の発現変化パターンは、HT-29 ρ^0 n 細胞や HT-29 ρ^0 x 細胞が示した同発現変化パターンと非常に類似していた (図 9b, 図 9c)。したがって、低酸素ストレス下における HIF-1 転写活性誘導能の阻害機構が、ミトコンドリア欠損細胞と BZM 処理細胞の間で共通していることが示唆された。

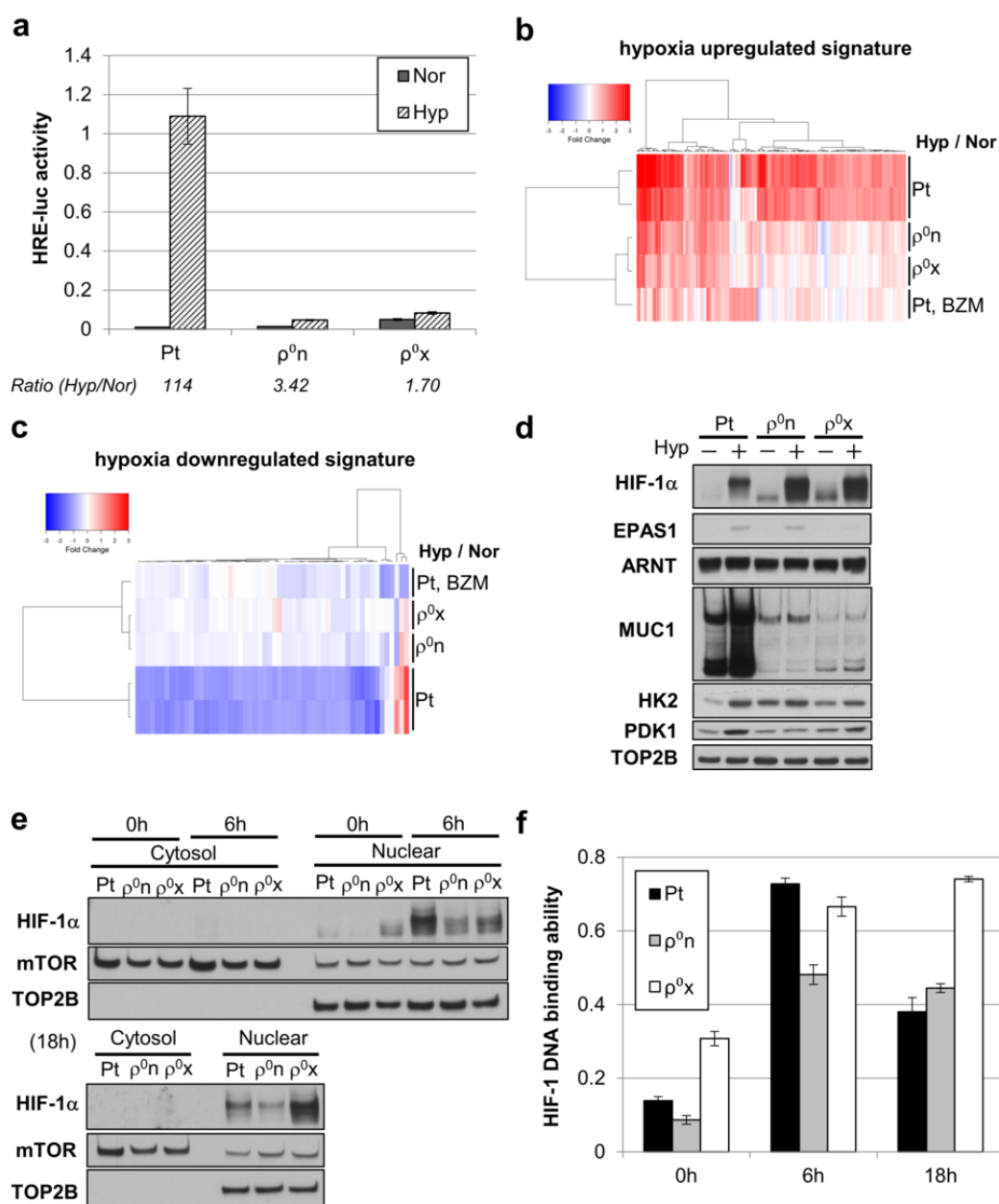


図 9. HIF-1 α の安定化および核移行後の、ミトコンドリア依存的な HIF-1 転写活性誘導能

(a) HRE ルシフェラーゼ活性. HT-29 Pt 細胞, HT-29 ρ^0n 細胞, そして HT-29 ρ^0x 細胞を, 低酸素ストレス下 (hypoxia: Hyp) および通常酸素条件下 (normoxia: Nor) で 18 時間培養した. (b, c) 遺伝子発現のシグナル強度比. HT-29 Pt 細胞, HT-29 ρ^0n 細胞, HT-29 ρ^0x 細胞, そして BZM を処理した HT-29 Pt 細胞を低酸素ストレス下で培養し, 比較した. Hypoxia-upregulated genes を (b) に, hypoxia-downregulated genes を (c) に用いた. (d) HIF-1 α , EPAS1/HIF-2 α , ARNT/HIF-1 β , そして HIF-1 の標的遺伝子から転写・翻訳されるタンパク (MUC1, HK2, PDK1) のイムノブロット解析. 18 時間の低酸素ストレスを処理した. TOP2B をローディングコントロールとして用いた. (次ページに続く)

(e-f) 図中に記載の低酸素ストレスを処理した後の HIF-1 α のイムノブロット解析 (e) と HIF-1 DNA-結合活性 (f). mTOR をローディングコントロールとして用い, TOP2B を核抽出物に対するローディングコントロールとして用いた.

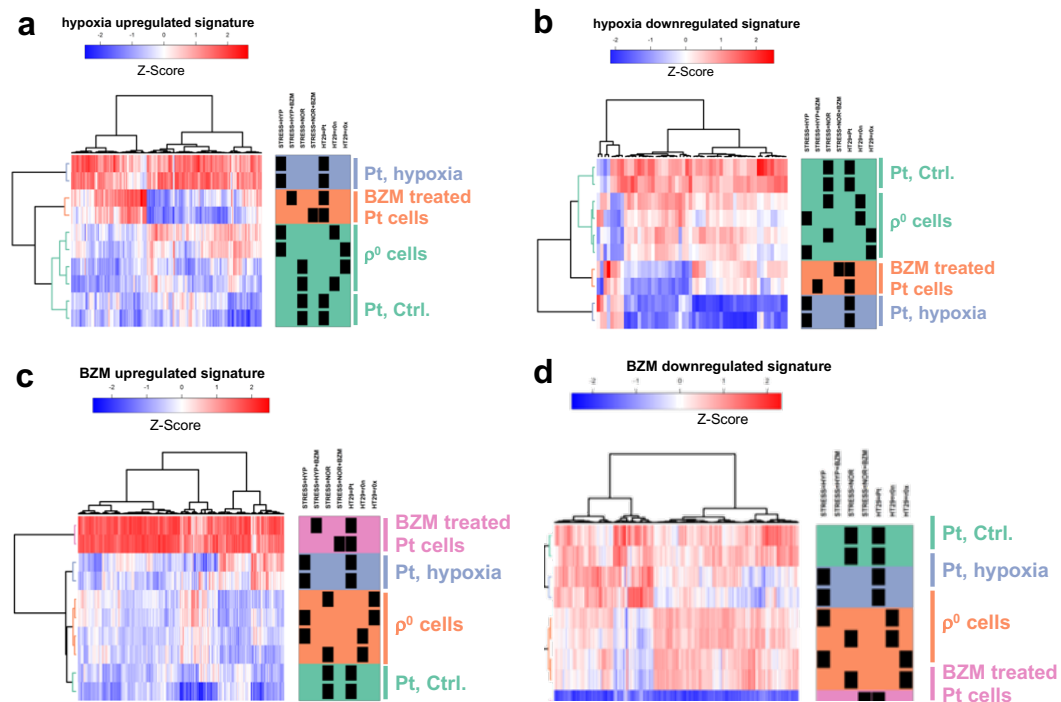


図 10. HT-29 細胞における遺伝子発現量比較

(a-d) 図 9 b および図 9c で用いたサンプルの遺伝子発現比較. プローブごとのシグナル強度の Z スコアを示した. 階層的クラスタリングに用いた遺伝子セットは, (a) hypoxia upregulated signature, (b) hypoxia downregulated signature, (c) BZM upregulated signature, (d) BZM downregulated signature である. HYP, 18 時間の低酸素ストレス; NOR, 18 時間の通常酸素条件下での培養; Pt, HT-29 Pt 細胞; r0n, HT-29 ρ^0 n 細胞; r0x, HT-29 ρ^0 x 細胞.

ミトコンドリア活性の抑制による HIF-1 転写活性誘導能の阻害

低酸素ストレス下で惹起される HIF-1 転写活性誘導能に対してのミトコンドリア機能の寄与を詳細に調べるために、ヒト膵臓がん細胞株 PANC1, ヒト肉腫細胞株 HT1080 およびヒト胎児腎臓細胞株 293T, そして HT-29 Pt 細胞を用いて、化合物処理による酸化的リン酸化経路の活性抑制を行った。RTN (ミトコンドリア複合体 I 阻害剤) や ANT (ミトコンドリア複合体 III 阻害剤), OLG (ミトコンドリア複合体 V 阻害剤) は、酸素消費速度 (OCR) の阻害活性濃度域で、低酸素ストレス下における HIF-1 転写活性誘導能の上昇を抑制した (図 11a-11c および 図 12a-12e)。このとき、化合物処理による細胞内 ATP 量の低下は確認されず (図 13), また、通常酸素濃度条件下では HIF-1 転写活性の阻害はなかった (図 14)。HT-29 ρ^0 n 細胞や HT-29 ρ^0 x 細胞での結果と一致して、HT-29 Pt 細胞の酸化的リン酸化経路の活性を抑制しても、18 時間の低酸素ストレス後にみられる HIF-1 α タンパクの安定化は阻害されなかった (図 12f)。また、6 時間の低酸素ストレス後の HIF-1 α タンパクの安定化は OLG 処理によって抑制されなかったが、RTN および ANT 処理では僅かに阻害された (図 12f)。他方、酸化的リン酸化経路の脱共役剤である FCCP や DNP 処理では、OCR が僅かに増加し (図 11d, 11e および 図 12a), 低酸素ストレス下における HIF-1 転写活性誘導能が阻害されなかった (図 12b-12e)。なお、HT1080 細胞株の ρ^0 細胞においても、親株に対して、低酸素ストレス下での HIF-1 転写活性誘導能が著しく低下していた (図 12e)。

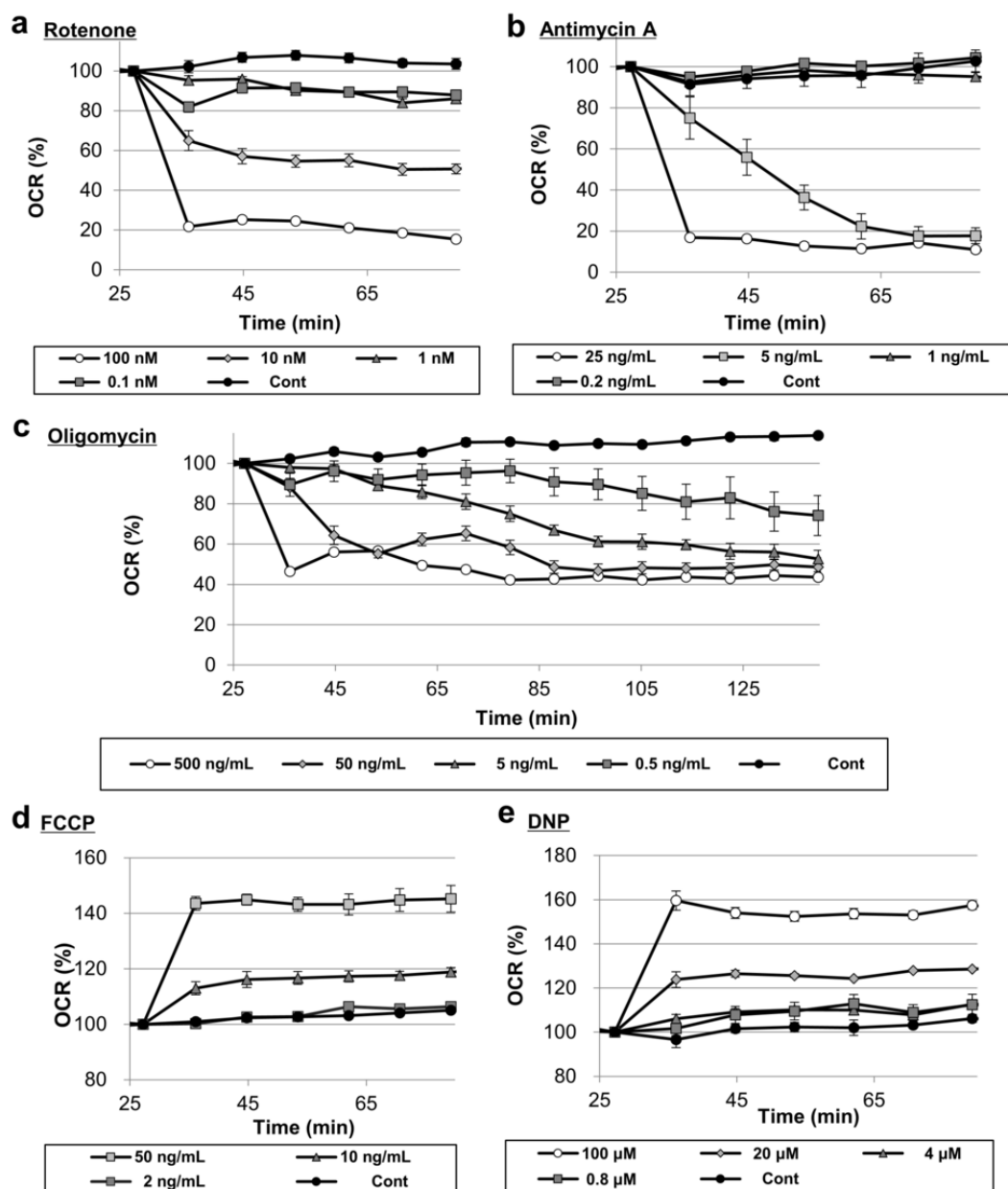


図 11. 各種化合物のミトコンドリア酸化的リン酸化阻害活性

(a-e) 記載の化合物処理条件における HT-29 Pt 細胞における OCR. 化合物未処理条件に対する相対値を記した.

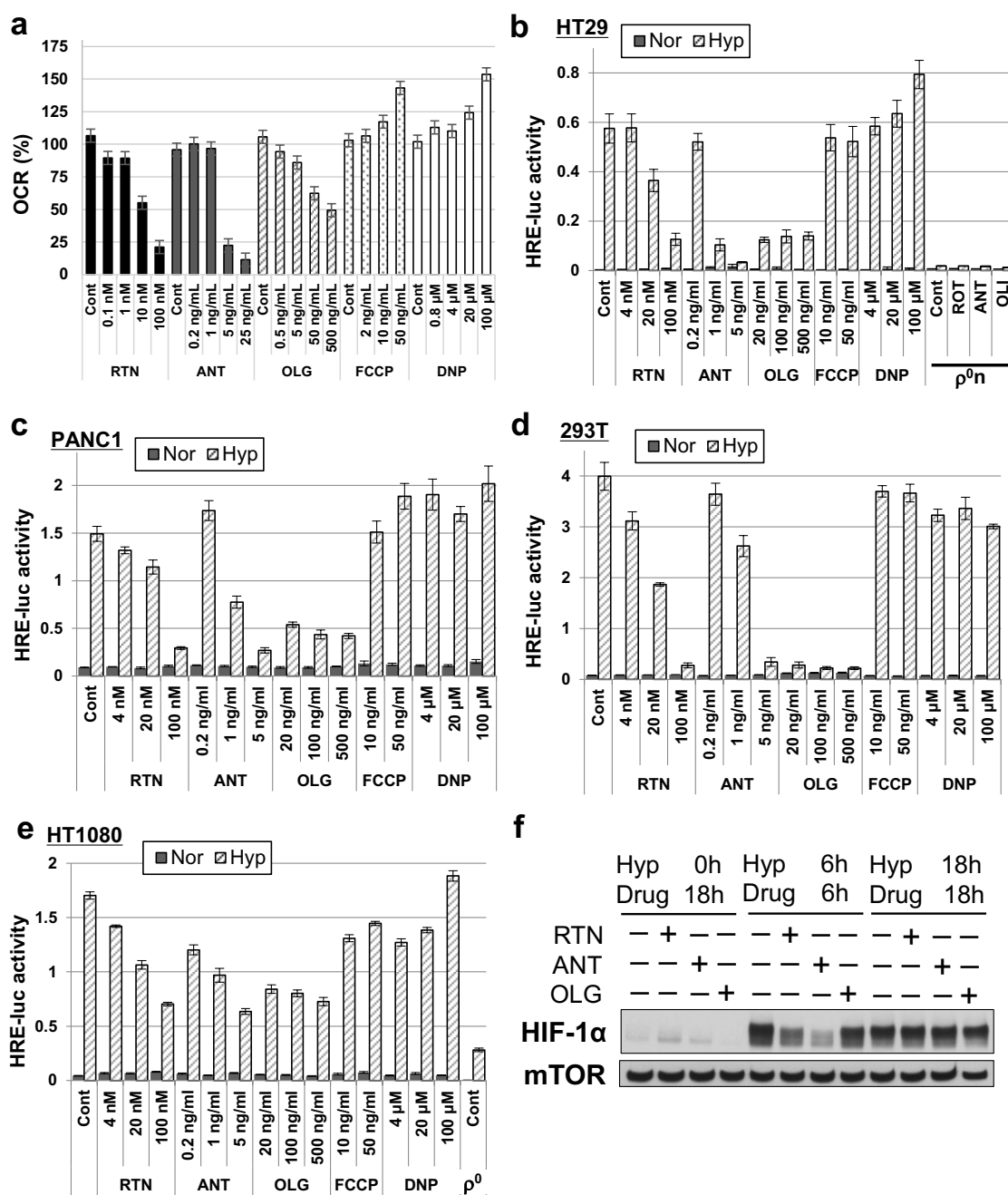


図 12. ミトコンドリア酸化的リン酸化阻害剤による HIF-1 転写活性誘導能の抑制

(a) RTN, ANT, OLG, FCCP, DNP をそれぞれ処理した後の, HT-29 Pt 細胞における OCR. (b-e) 18 時間の低酸素ストレス (hypoxia: HYP) あるいは通常酸素条件下 (normoxia: Nor) での培養後の, HRE-ルシフェラーゼ活性. HT-29 細胞, PANC1 細胞, 293T 細胞, HT1080 細胞を用いた. RTN, ANT, OLG, FCCP, DNP をそれぞれ, 低酸素ストレスと併用し, 処理した. (f) HIF-1α のイムノブロット解析. 低酸素ストレス (hypoxia: Hyp) 環境にて, 未処理 (control, C), RTN (100 nM), ANT (5 ng/ml), OLG (0.5 μg/ml) をそれぞれ, HT-29 Pt 細胞に処理した. mTOR をローディングコントロールとして用いた.

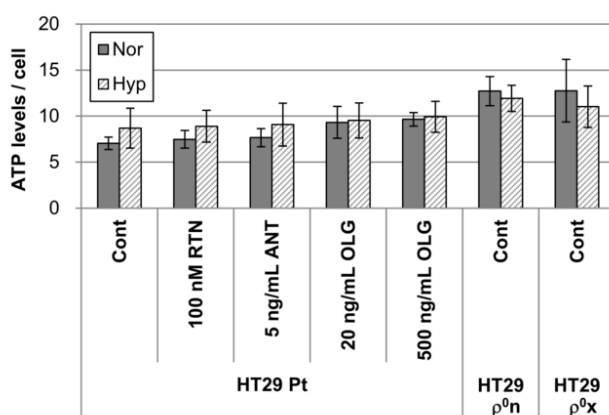


図 13. 低酸素ストレス下かつミトコンドリア阻害条件における細胞内 ATP 量の維持

HT-29 Pt 細胞, ρ^0n 細胞, ρ^0x 細胞における細胞内 ATP 量を測定し, 細胞数で補正した. 細胞を 18 時間の低酸素ストレス(hypoxia, Hyp) あるいは通常酸素条件下(normoxia, Nor)で培養し, 記載の化合物処理を併用した.

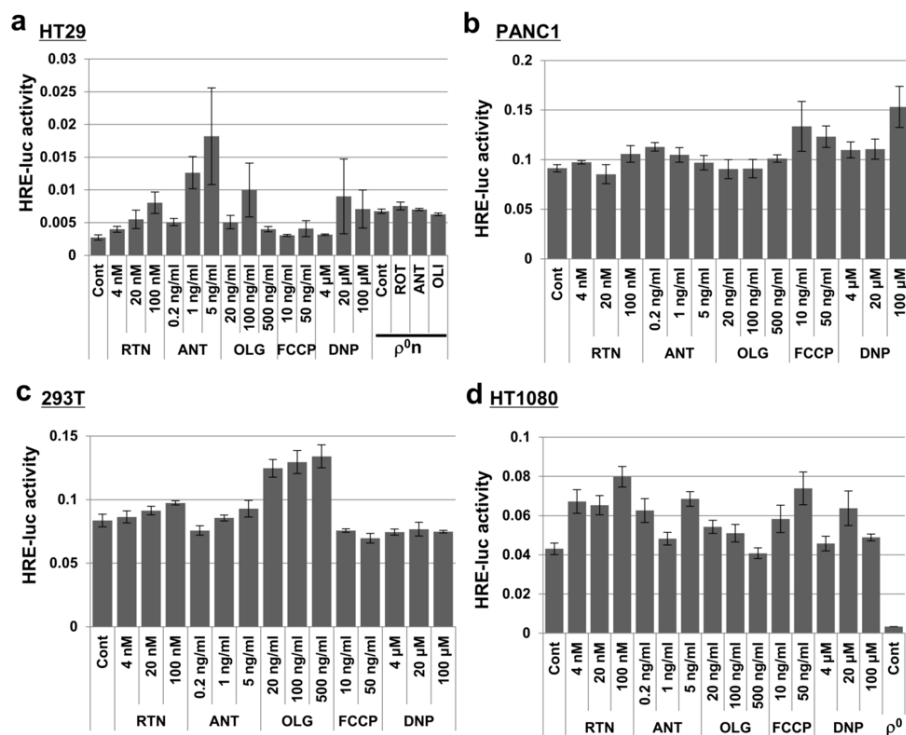


図 14. 通常酸素条件下においてミトコンドリア阻害剤を処理した際の HRE ルシフェラーゼ活性

(a-d) 通常酸素条件下において, 記載の化合物を処理し, HRE ルシフェラーゼ活性を測定した. HT-29 細胞を (a), PANC1 細胞を (b), 293T 細胞を (c) HT1080 細胞を (d)にて用いた.

最後に、開発中の抗がん剤である metformin⁷⁰ および arctigenin (registered on the UMIN clinical trial registry, UMIN000010111) を用いた検討を進めた。これらは、ミトコンドリア複合体 I を阻害することで酸化的リン酸化経路を抑制することが知られている^{30,31}。両化合物をそれぞれ処理することで、確かに HT-29 Pt 細胞の OCR が低下し (図 15a, 15b)、低酸素ストレス下での HIF-1 α の安定化を妨げることなく、HIF-1 転写活性誘導能の上昇が阻害された (図 15c, 15d)。以上より、酸化的リン酸化経路の阻害によって、低酸素ストレス下における HIF-1 転写活性誘導能が抑制されることが示された。

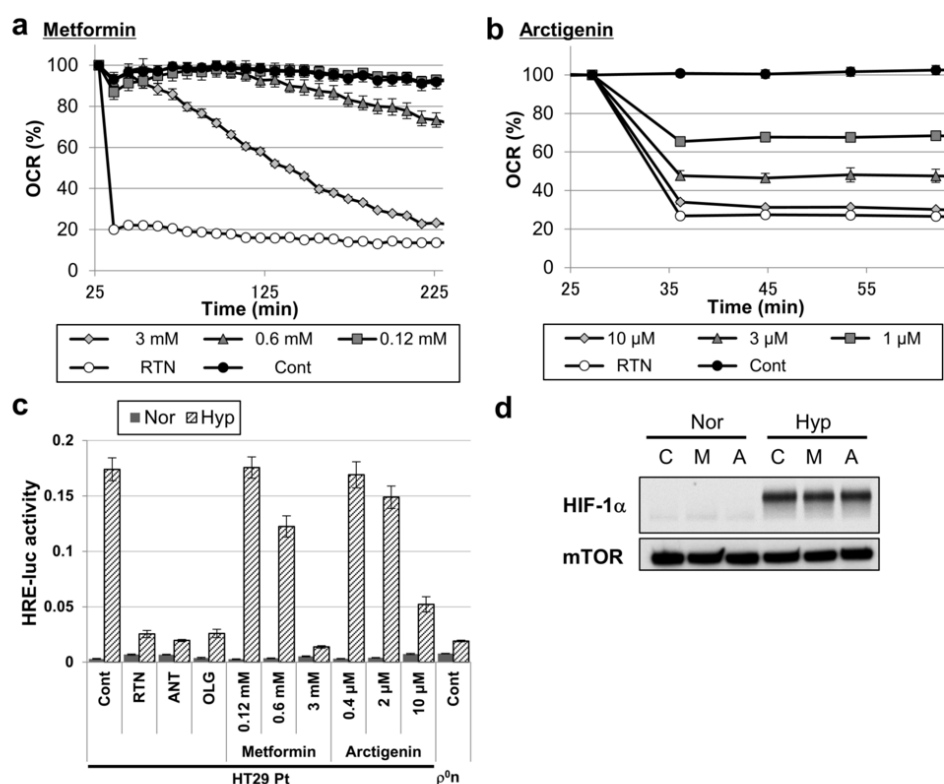


図 15. 抗がん剤処理によるミトコンドリア呼吸鎖阻害と HIF-1 転写活性誘導能阻害

(a, b) Metformin (a) あるいは arctigenin (b) 処理による OCR の阻害活性. HT-29 Pt 細胞を用いた. RTN (200 nM) を OCR 阻害のポジティブコントロールである. (c) Metformin あるいは arctigenin を, 18 時間 の低酸素ストレスあるいは通常培養条件と合わせて処理した HT-29 Pt 細胞中の HRE-ルシフェラーゼ活性. RTN (100 nM), ANT (5 ng/ml), OLG (5 μ g/ml)を処理した HT-29 Pt 細胞, および HT-29 p^0n 細胞はポジティブコントロールである. (d) Metformin (M, 3mM) あるいは arctigenin (A, 10 μ M) を 18 時間の低酸素ストレスあるいは通常酸素条件化で培養した後の, HIF-1 α のイムノブロット解析. mTOR をローディングコントロールとして用いた. Hyp, 18 時間の低酸素ストレス; Nor, 通常培養条件化.

1-5. 考察

本研究によって、急速な腫瘍増殖と HIF-1 転写活性誘導能に、ミトコンドリア機能が重要であることが示された。HIF-1 経路の活性化は、固形がんの形成過程で生じる腫瘍内ストレス環境でしばしば認められる適応機構であり^{4,5}、これは HT-29 細胞の異種移植片でも同様である^{71,72}。こうした既報と一致して、異種移植モデルでの低酸素応答性遺伝子群の発現誘導が mtDNA の有無に依らず同等に認められたが、*in vitro* における検討の結果、HT-29 ρ^0 n 細胞は僅かな HIF-1 転写活性誘導能しか示すことができなかった。このギャップを埋めるのは、HT-29 ρ^0 n 細胞の異種移植片から単離・樹立された HT-29 ρ^0 x 細胞が、恒常的に HIF-1 α を発現し、HIF-1 経路の活性化に至っていたことである。これらの知見は、腫瘍内ストレス環境において HIF-1 経路の活性化が重要であることを強く示唆する。しかしながら、低酸素ストレス下での HIF-1 転写活性誘導能は、HT-29 ρ^0 x 細胞でも依然として未回復であった。そのため、増殖中の腫瘍において絶えず変動する酸素分圧に対して、動的な低酸素ストレス応答の活性化を誘導することは^{4,5}、生着した HT-29 ρ^0 n 細胞でも依然として困難であったといえる。したがって、ミトコンドリア機能に依存した HIF-1 転写活性誘導能の差異に由来する親株と ρ^0 細胞での低酸素ストレス応答能力の違いが、急速な腫瘍増殖を遂げるための決定因子であることが期待される。今後、HIF-1 転写活性誘導能と腫瘍増殖速度との因果を明確に示すための、さらなる研究が必要である。

本研究と合致して、ヒトグリア芽細胞株 DBTRG-O5MG およびヒト乳がん細胞株 MCF-7

を用いたマウス異種移植モデルから、mtDNA 欠損が腫瘍増殖速度の低下に繋がることが報告されている⁴⁵。マウス由来のがん細胞を用いた検討でもやはり、mtDNA 欠損が腫瘍増殖速度の低下に至ったが、腫瘍生着後に宿主から mtDNA を獲得したマウス ρ^0 細胞では、元の ρ^0 細胞よりも腫瘍増殖が速かった⁴⁶。本研究も踏まえ、著しい腫瘍増殖速度を実現するために、ミトコンドリアが重要な役割を果たすことが再認識された。

HT-29 ρ^0 x 細胞における恒常的な HIF-1 の活性化は、マウス体内での腫瘍増殖の過程で獲得された適応機構である。こうした適応応答が生じた理由は、ミトコンドリア機能の損失によって低酸素ストレス下での HIF-1 転写活性誘導能が欠如するためと考えられる。臨床のがん組織においては、淡明細胞型腎細胞がん (clear cell renal cell carcinoma) でミトコンドリア構成タンパクが著しく欠失していることが知られており、ここでは恒常的な HIF- α の安定化に至る *VHL* の体細胞変異がしばしば認められる^{73,74}。すなわち、HIF 経路の活性化とミトコンドリア機能不全は、臨床でも同時に起こりうる。そこで、次に述べるような淡明細胞型腎細胞がんの知見は、本研究結果を解釈するために有用であると思われる。淡明細胞型腎細胞がんにおいて、変異型 pVHL を有する異種移植片の形成には HIF- α 活性が必要であること^{75,76}、そして、HIF-1 経路の活性化によってミトコンドリア生合成が抑制されることが報告されている^{77,78}。これらの所見は、ミトコンドリア活性が低下しても、恒常的に活性化した HIF-1 経路によって腫瘍組織を維持できることを示している。こうした淡明細胞型腎細胞がんの知見から類推するに、HT-29 ρ^0 細胞が異種移植片での生着を維持するために、恒常

的な HIF-1 経路の活性化に至ったと考えられる。

HIF-1 α の安定化におけるミトコンドリアの役割は、酸素濃度域によって異なる。中程度の低酸素ストレス下（1%–1.5% O₂）では、ミトコンドリア機能不全によって HIF-1 α の安定化が阻害されるが、これは本来ミトコンドリアから産生される活性酸素種の損失によるためと考えられている^{23–27}。他方、本研究結果と合致して、顕著な低酸素状態（0–0.1% O₂）においては、ミトコンドリア機能不全の状態でも HIF-1 α が通常通り安定化する^{23,29}。しかしながら、本研究で新たに見出したことは、低酸素環境下において安定化した HIF-1 α タンパクが十分量存在する条件下でも、HIF-1 転写活性を十分誘導するためにはミトコンドリアが必要とされることである。以上の知見を統合すると、低酸素ストレスの程度に応じて、HIF-1 α の安定化から HIF-1 転写活性誘導までの複数段階をミトコンドリアが制御しているため、腫瘍内ストレス環境のあらゆる局面でミトコンドリアに依存した HIF-1 経路の活性化に至っていると考えられる。

網羅的遺伝子発現解析によって、ミトコンドリア欠損細胞とプロテアソーム阻害剤を処理した細胞に共通する、HIF-1 転写活性誘導能の阻害メカニズムが示唆された。近年、HIF-1 には複数のコアクチベーターが存在することが報告されている。例えば、pyruvate kinase isozymes M2⁷⁹や RuvB-like AAA ATPase 1⁸⁰, lysine-specific demethylase 4C⁸¹ などである。さらに、190 種の HIF-1 α 結合タンパク質が存在することも報告されている⁸¹。したがって、未同定の HIF-1 転写活性の調節機構が存在すると期待される。BZM の作用機序、すなわちプ

ロテアソーム阻害活性を考慮すると、本来プロテアソーム依存的に分解されるタンパクに、HIF-1 転写活性誘導能の負の調節因子が存在することが想定される。低酸素ストレス下における、ミトコンドリアやプロテアソームに依存した HIF-1 転写活性誘導能の増強機構を解明するために、今後さらなる研究が必要である。

Metformin および arctigenin は、臨床試験中の抗がん剤であり^{31,82}、酸化リン酸化の阻害を介して UPR を阻害することが知られている^{44,60,83}。これらの化合物は、酸化リン酸化の阻害から期待されたとおり、やはり低酸素ストレス下における HIF-1 転写活性の誘導を阻害した。こうした結果と合致して、結果的にミトコンドリアと HIF-1 経路の両方を阻害する活性を有していた化合物がこれまでに開発されている。例えば、HIF-1 経路阻害活性を標的として、691,200 種の化合物からスクリーニングを進めた結果、低酸素ストレス下でミトコンドリア由来の活性酸素種の生成を阻害する alkyliminophenylacetate 阻害剤の同定に至ったという報告がある⁸⁴。他にも、抗がん剤活性を示す BAY 87-2243 が、低酸素ストレス下で HIF-1 α を安定化し、ミトコンドリア複合体 I の活性も阻害していたことが報告されている^{85,86}。以上より、本研究結果も踏まえて、低酸素ストレス下における HIF-1 転写活性のミトコンドリア依存的な調節機構が、新規がん治療法を開発する上で良い標的となるだろう。

表 1. Hypoxia upregulated signature.

1552799_at	1553538_s_at	1554436_a_at	1555832_s_at	1556123_a_at	1568611_at	200632_s_at
200696_s_at	200737_at	200878_at	200920_s_at	200985_s_at	201008_s_at	201009_s_at
201010_s_at	201105_at	201170_s_at	201242_s_at	201243_s_at	201250_s_at	201313_at
201464_x_at	201465_s_at	201466_s_at	201482_at	201565_s_at	201578_at	201625_s_at
201626_at	201627_s_at	201650_at	201694_s_at	202022_at	202130_at	202131_s_at
202219_at	202336_s_at	202364_at	202388_at	202464_s_at	202489_s_at	202619_s_at
202620_s_at	202668_at	202672_s_at	202733_at	202769_at	202770_s_at	202856_s_at
202859_x_at	202887_s_at	202912_at	202934_at	202973_x_at	203065_s_at	203108_at
203282_at	203509_at	203585_at	203726_s_at	203757_s_at	203851_at	204030_s_at
204194_at	204268_at	204446_s_at	204607_at	204698_at	204790_at	204818_at
204990_s_at	205076_s_at	205128_x_at	205199_at	205398_s_at	205759_s_at	205765_at
205780_at	205807_s_at	205822_s_at	205846_at	206172_at	206969_at	207196_s_at
207543_s_at	207574_s_at	208296_x_at	208483_x_at	208937_s_at	208961_s_at	209125_at
209189_at	209270_at	209373_at	209383_at	209403_at	209546_s_at	209566_at
209608_s_at	210260_s_at	210276_s_at	210512_s_at	210827_s_at	210845_s_at	210854_x_at
211657_at	211719_x_at	211924_s_at	212097_at	212274_at	212276_at	212444_at
212463_at	212496_s_at	212560_at	212689_s_at	212958_x_at	213349_at	213351_s_at
213680_at	213693_s_at	213843_x_at	213953_at	214079_at	214620_x_at	215812_s_at
215813_s_at	216210_x_at	217047_s_at	217356_s_at	217691_x_at	217875_s_at	217997_at
218205_s_at	218484_at	218498_s_at	218559_s_at	218791_s_at	218858_at	219529_at
219634_at	219888_at	220030_at	221478_at	221479_s_at	221577_x_at	221653_x_at
221841_s_at	222108_at	222408_s_at	222449_at	222450_at	222646_s_at	222745_s_at
222847_s_at	223046_at	223193_x_at	223199_at	223447_at	223541_at	224314_s_at
224345_x_at	224565_at	224566_at	224602_at	224604_at	224605_at	224606_at
224657_at	224797_at	225136_at	225239_at	225262_at	225342_at	225544_at
225626_at	225750_at	225898_at	226226_at	226347_at	226348_at	226403_at
226452_at	226535_at	226706_at	227020_at	227068_at	227112_at	227314_at
227337_at	227556_at	227759_at	228188_at	228483_s_at	228499_at	228919_at
229030_at	230250_at	230323_s_at	230710_at	234312_s_at	234725_s_at	235153_at
235419_at	235857_at	238542_at	239202_at	239370_at	242722_at	36711_at
37152_at	91826_at					

表 2. Hypoxia downregulated signature.

1553551_s_at	200894_s_at	200895_s_at	200987_x_at	201516_at	203023_at	203119_at
203622_s_at	204405_x_at	205129_at	205136_s_at	205264_at	205311_at	205767_at
205895_s_at	206755_at	209567_at	209735_at	209853_s_at	210802_s_at	212510_at
212973_at	213320_at	214011_s_at	217106_x_at	217127_at	218512_at	218695_at
218866_s_at	218868_at	218882_s_at	218886_at	218889_at	219006_at	219037_at
219420_s_at	220468_at	222108_at	222883_at	223403_s_at	223414_s_at	224467_s_at
224632_at	224634_at	225291_at	225593_at	225712_at	225748_at	226037_s_at
226410_at	226479_at	226998_at	228050_at	229332_at	242093_at	242260_at

表 3. ρ^0 x upregulated signature.

201311_s_at	201312_s_at	201315_x_at	201426_s_at	201506_at	201939_at	202207_at
202458_at	202686_s_at	203083_at	203139_at	203180_at	203638_s_at	203675_at
203988_s_at	204222_s_at	204235_s_at	204237_at	205780_at	206463_s_at	206560_s_at
206632_s_at	207325_x_at	209276_s_at	209310_s_at	209576_at	209792_s_at	210139_s_at
210538_s_at	211518_s_at	212077_at	212098_at	212203_x_at	212224_at	212509_s_at
214079_at	214085_x_at	214774_x_at	215108_x_at	215913_s_at	216623_x_at	217691_x_at
217995_at	218025_s_at	218633_x_at	218705_s_at	218872_at	218967_s_at	219387_at
220180_at	221577_x_at	222572_at	222697_s_at	222803_at	223551_at	224560_at
224920_x_at	225496_s_at	225673_at	226279_at	227692_at	228489_at	230061_at
231579_s_at	232914_s_at	235696_at	235700_at	238017_at	39248_at	

表 4. ρ^0 x downregulated signature.

1554997_a_at	1569454_a_at	202437_s_at	203065_s_at	203323_at	203324_s_at	203691_at
203963_at	204151_x_at	204446_s_at	204508_s_at	204588_s_at	204607_at	204748_at
205111_s_at	205919_at	206561_s_at	206737_at	207076_s_at	210145_at	212097_at
219508_at	221530_s_at	223204_at	225270_at	226038_at	230250_at	242093_at
41469_at						

表 5. ρ^0 n_vivo upregulated signature.

1553185_at	1553186_x_at	1553611_s_at	1554600_s_at	1555745_a_at	1555832_s_at	1555851_s_at
1557987_at	1569454_a_at	200634_at	200660_at	200771_at	200852_x_at	200859_x_at
200920_s_at	200921_s_at	201010_s_at	201040_at	201162_at	201188_s_at	201194_at
201242_s_at	201243_s_at	201310_s_at	201311_s_at	201312_s_at	201315_x_at	201369_s_at
201426_s_at	201427_s_at	201464_x_at	201564_s_at	201601_x_at	201655_s_at	201694_s_at
201841_s_at	201876_at	201939_at	202102_s_at	202411_at	202761_s_at	202833_s_at
203020_at	203139_at	203186_s_at	203304_at	203394_s_at	203638_s_at	203688_at
203725_at	203752_s_at	203753_at	203799_at	203882_at	203953_s_at	203961_at
204235_s_at	204237_at	204259_at	204272_at	204379_s_at	204415_at	204622_x_at
204713_s_at	204714_s_at	204806_x_at	205137_x_at	205506_at	205513_at	206239_s_at
206560_s_at	206632_s_at	206858_s_at	207011_s_at	207173_x_at	208228_s_at	208436_s_at
208540_x_at	208729_x_at	208960_s_at	208961_s_at	208997_s_at	209173_at	209201_x_at
209212_s_at	209403_at	209417_s_at	209498_at	209504_s_at	209911_x_at	210046_s_at
210105_s_at	210117_at	210230_at	210445_at	210592_s_at	210797_s_at	210830_s_at
211160_x_at	211184_s_at	211429_s_at	211528_x_at	211919_s_at	211950_at	211964_at
212076_at	212077_at	212080_at	212099_at	212151_at	212203_x_at	212224_at
212236_x_at	212263_at	212338_at	212386_at	213142_x_at	213158_at	213605_s_at
213695_at	213746_s_at	214022_s_at	214290_s_at	214459_x_at	214693_x_at	214752_x_at
214774_x_at	215071_s_at	215076_s_at	215108_x_at	215127_s_at	215383_x_at	216405_at
216563_at	216623_x_at	217028_at	218164_at	218309_at	218322_s_at	218831_s_at
218872_at	218962_s_at	219878_s_at	220755_s_at	221004_s_at	221577_x_at	221764_at
221875_x_at	222150_s_at	222408_s_at	222803_at	223103_at	223125_s_at	223218_s_at
223497_at	224159_x_at	224344_at	224428_s_at	224549_x_at	224559_at	224606_at
224741_x_at	224841_x_at	224915_x_at	225033_at	225056_at	225093_at	225239_at
225496_s_at	225628_s_at	225698_at	226123_at	226227_x_at	226275_at	226459_at
226560_at	226575_at	226835_s_at	226844_at	226886_at	227039_at	227384_s_at
227443_at	227527_at	227556_at	227616_at	228051_at	228232_s_at	228912_at
228933_at	229256_at	229435_at	230271_at	231628_s_at	231823_s_at	231832_at
232615_at	232889_at	232914_s_at	234675_x_at	234723_x_at	237475_x_at	238632_at
239911_at	37028_at	39248_at	AFFX-BioB-M_at	AFFX-HSAC07/X00351_5_at	AFFX-HSAC07/X00351_M_at	AFFX-M27830_5_at
AFFX-M27830_M_at	AFFX-r2-Ec-bioB-3_at	AFFX-r2-Ec-bioB-M_at				

表 6. ρ^0 n_vivo downregulated signature.

1552680_a_at	1553613_s_at	1554433_a_at	1554997_a_at	1555274_a_at	1555910_at	1556551_s_at
1558014_s_at	1558093_s_at	1558152_at	201043_s_at	201297_s_at	201299_s_at	201324_at
201325_s_at	201436_at	201476_s_at	201512_s_at	201831_s_at	201872_s_at	202013_s_at
202053_s_at	202069_s_at	202118_s_at	202536_at	202671_s_at	202886_s_at	202912_at
203065_s_at	203105_s_at	203180_at	203209_at	203210_s_at	203225_s_at	203323_at
203324_s_at	203328_x_at	203910_at	203967_at	203968_s_at	203971_at	204025_s_at
204059_s_at	204120_s_at	204493_at	204532_x_at	204716_at	204748_at	205047_s_at
205048_s_at	205194_at	205321_at	205463_s_at	205543_at	206094_x_at	206205_at
206561_s_at	206737_at	207126_x_at	207332_s_at	208209_s_at	208290_s_at	208510_s_at
208596_s_at	208691_at	208708_x_at	208839_s_at	208853_s_at	209513_s_at	209520_s_at
209773_s_at	210076_x_at	211015_s_at	211016_x_at	211212_s_at	212097_at	212107_s_at
212398_at	212529_at	212570_at	212720_at	213286_at	213379_at	213734_at
213899_at	214007_s_at	214205_x_at	214316_x_at	214649_s_at	214697_s_at	214934_at
215125_s_at	215207_x_at	216841_s_at	217127_at	217496_s_at	217834_s_at	217878_s_at
218018_at	218073_s_at	218100_s_at	218392_x_at	218737_at	218772_x_at	218817_at
219014_at	219201_s_at	219320_at	219508_at	220060_s_at	220238_s_at	220239_at
220892_s_at	221027_s_at	221059_s_at	221305_s_at	221521_s_at	221987_s_at	222037_at
222499_at	222519_s_at	222600_s_at	222646_s_at	222654_at	222781_s_at	223062_s_at
223308_s_at	223839_s_at	224461_s_at	224744_at	225366_at	225686_at	225688_s_at
225736_at	226661_at	226826_at	226907_at	227211_at	227741_at	228204_at
228868_x_at	228986_at	229083_at	229181_s_at	229795_at	230250_at	230265_at
230306_at	231837_at	231995_at	233208_x_at	233827_s_at	234304_s_at	234915_s_at
235134_at	235694_at	236957_at	238034_at	238419_at	238623_at	242787_at

表 9. xenograft upregulated signature.

1552621_at	1553185_at	1553186_x_at	1553538_s_at	1553551_s_at	1553567_s_at	1553569_at	1553570_x_at	1553575_at
1553611_s_at	1554600_s_at	1555653_at	1555730_a_at	1555745_a_at	1555832_s_at	1555851_s_at	1557987_at	1558678_s_at
1566887_x_at	1569454_a_at	200001_at	200601_at	200606_at	200632_s_at	200634_at	200645_at	200660_at
200696_s_at	200742_s_at	200771_at	200852_x_at	200859_x_at	200887_s_at	200904_at	200905_x_at	200920_s_at
200921_s_at	200923_at	200964_at	201008_s_at	201009_s_at	201010_s_at	201040_at	201041_s_at	201105_at
201162_at	201188_s_at	201194_at	201234_at	201236_s_at	201242_s_at	201243_s_at	201310_s_at	201311_s_at
201312_s_at	201313_at	201315_x_at	201369_s_at	201416_at	201418_s_at	201426_s_at	201427_s_at	201464_x_at
201465_s_at	201506_at	201564_s_at	201601_x_at	201641_at	201655_s_at	201666_at	201669_s_at	201670_s_at
201694_s_at	201841_s_at	201850_at	201876_at	201884_at	201908_at	201939_at	202074_s_at	202102_s_at
202237_at	202238_s_at	202411_at	202430_s_at	202446_s_at	202489_s_at	202672_s_at	202761_s_at	202826_at
202833_s_at	202859_x_at	202869_at	203020_at	203080_s_at	203139_at	203153_at	203186_s_at	203304_at
203394_s_at	203455_s_at	203595_s_at	203638_s_at	203640_at	203688_at	203691_at	203725_at	203726_s_at
203752_s_at	203753_at	203799_at	203882_at	203911_at	203939_at	203953_s_at	203954_x_at	203961_at
204070_at	204073_s_at	204235_s_at	204237_at	204259_at	204272_at	204306_s_at	204379_s_at	204415_at
204538_x_at	204622_x_at	204713_s_at	204714_s_at	204805_s_at	204806_x_at	204972_at	204990_s_at	205044_at
205137_x_at	205157_s_at	205483_s_at	205506_at	205513_at	205552_s_at	205559_s_at	205660_at	205927_s_at
205969_at	206239_s_at	206323_x_at	206560_s_at	206632_s_at	206858_s_at	207011_s_at	207173_x_at	207214_at
207365_x_at	207435_s_at	207436_x_at	207730_x_at	207808_s_at	207847_s_at	208082_x_at	208228_s_at	208246_x_at
208436_s_at	208540_s_at	208637_x_at	208723_at	208729_x_at	208798_x_at	208749_x_at	208798_x_at	208812_x_at
208829_at	208960_s_at	208961_s_at	208997_s_at	209140_x_at	209173_at	209189_at	209201_x_at	209212_s_at
209216_at	209270_at	209386_at	209387_s_at	209403_at	209417_s_at	209498_at	209504_s_at	209546_s_at
209641_s_at	209761_s_at	209911_x_at	209969_s_at	210046_s_at	210105_s_at	210117_at	210218_s_at	210230_at
210445_at	210512_s_at	210514_x_at	210592_s_at	210679_x_at	210797_s_at	210827_s_at	210830_s_at	210978_s_at
211074_at	211160_x_at	211184_s_at	211429_s_at	211528_x_at	211529_x_at	211530_x_at	211600_at	211799_x_at
211911_x_at	211919_s_at	211934_x_at	211950_at	211964_at	211986_at	211996_s_at	212076_at	212077_at
212080_at	212099_at	212151_at	212203_x_at	212224_at	212236_x_at	212254_s_at	212263_at	212338_at
212386_at	212472_at	213142_x_at	213158_at	213294_at	213359_at	213397_x_at	213517_at	213605_s_at
213668_s_at	213693_s_at	213695_at	213746_s_at	213932_x_at	213988_s_at	214022_s_at	214035_x_at	214041_x_at
214218_s_at	214234_s_at	214290_s_at	214453_s_at	214459_x_at	214594_x_at	214693_x_at	214707_x_at	214715_x_at
214722_at	214752_x_at	214774_x_at	214870_x_at	214902_x_at	214989_x_at	215016_x_at	215034_s_at	215071_s_at
215076_s_at	215108_x_at	215127_s_at	215179_x_at	215313_x_at	215383_x_at	215504_x_at	215553_x_at	215588_x_at
215600_x_at	215978_x_at	216032_s_at	216153_x_at	216187_x_at	216231_s_at	216405_at	216524_x_at	216526_x_at
216563_at	216565_x_at	216623_x_at	216836_s_at	217028_at	217436_x_at	217456_x_at	217523_at	217586_x_at
217673_x_at	217683_at	217703_x_at	217715_x_at	217783_s_at	217867_x_at	218084_x_at	218164_at	218309_at
218322_s_at	218400_at	218471_s_at	218831_s_at	218858_at	218872_at	218962_s_at	218986_s_at	219209_at
219352_at	219630_at	219878_s_at	220755_s_at	220796_x_at	221004_s_at	221501_x_at	221577_x_at	221728_x_at
221748_s_at	221764_at	221768_at	221816_s_at	221875_x_at	221899_at	222067_x_at	222150_s_at	222175_s_at
222408_s_at	222728_s_at	222803_at	222986_s_at	223044_at	223103_at	223125_s_at	223218_s_at	223220_s_at
223251_s_at	223451_s_at	223494_at	223497_at	223662_x_at	223939_at	223940_x_at	224159_x_at	224344_at
224372_at	224373_s_at	224428_s_at	224549_x_at	224558_s_at	224559_at	224565_at	224566_at	224567_x_at
224588_at	224606_at	224667_x_at	224701_at	224741_x_at	224841_x_at	224915_x_at	224917_at	224992_s_at
225033_at	225056_at	225093_at	225105_at	225155_at	225239_at	225368_at	225415_at	225496_s_at
225628_s_at	225636_at	225698_at	225786_at	225899_x_at	225929_s_at	226123_at	226145_s_at	226158_at
226227_x_at	226275_at	226403_at	226446_at	226459_at	226535_at	226560_at	226575_at	226663_at
226675_s_at	226757_at	226835_s_at	226844_at	226886_at	227020_at	227039_at	227129_x_at	227223_at
227383_at	227384_s_at	227443_at	227527_at	227556_at	227616_at	227667_at	227671_at	227891_s_at
227996_at	228051_at	228157_at	228232_s_at	228531_at	228912_at	228933_at	228999_at	229030_at
229256_at	229434_at	229435_at	229450_at	229553_at	229765_at	229966_at	230271_at	231579_s_at
231628_s_at	231735_s_at	231770_x_at	231823_s_at	231825_x_at	231832_at	232174_at	232266_x_at	232597_x_at
232615_at	232683_s_at	232689_at	232914_s_at	233296_x_at	233319_x_at	233702_x_at	233775_x_at	234675_x_at
234723_x_at	234725_s_at	234762_x_at	234788_x_at	234987_at	234989_at	235028_at	235060_at	235419_at
235529_x_at	235716_at	235763_at	235879_at	235964_x_at	237475_x_at	237768_x_at	238199_x_at	238558_at
238632_at	238701_x_at	239332_at	239748_x_at	239911_at	241681_at	241993_x_at	242121_at	242235_x_at
242669_at	242961_x_at	244197_x_at	32837_at	36564_at	36994_at	37028_at	39248_at	41469_at
53720_at	AFFX-BioB-M_at	AFFX-HSAC07/X00351_5_at	AFFX-HSAC07/X00351_M_at	AFFX-HUMISGF3AM97935_3_at	AFFX-M27830_5_at	AFFX-M27830_M_at	AFFX-r2-Ec-bioB-3_at	AFFX-r2-Ec-bioB-5_at
AFFX-r2-Ec-bioB-M_at								

表 10. xenograft downregulated signature.

1552680_a_at	1553528_a_at	1553613_s_at	1554101_a_at	1554390_s_at	1554414_a_at	1554433_a_at
1554997_a_at	1555058_a_at	1555225_at	1555274_a_at	1555334_s_at	1555383_a_at	1555910_at
1556551_s_at	1558014_s_at	1558093_s_at	1558152_at	1560916_a_at	200727_s_at	200841_s_at
201043_s_at	201211_s_at	201297_s_at	201299_s_at	201324_at	201325_s_at	201436_at
201476_s_at	201512_s_at	201562_s_at	201569_s_at	201626_at	201627_s_at	201661_s_at
201831_s_at	201872_s_at	201963_at	202013_s_at	202053_s_at	202054_s_at	202069_s_at
202118_s_at	202170_s_at	202435_s_at	202436_s_at	202437_s_at	202536_at	202671_s_at
202886_s_at	202912_at	203032_s_at	203033_x_at	203065_s_at	203105_s_at	203180_at
203209_at	203210_s_at	203211_s_at	203225_s_at	203283_s_at	203323_at	203324_s_at
203328_x_at	203339_at	203343_at	203418_at	203474_at	203899_s_at	203910_at
203967_at	203968_s_at	203971_at	204025_s_at	204058_at	204059_s_at	204120_s_at
204127_at	204128_s_at	204493_at	204532_x_at	204603_at	204615_x_at	204716_at
204748_at	204822_at	205047_s_at	205048_s_at	205194_at	205321_at	205401_at
205463_s_at	205543_at	205763_s_at	205822_s_at	205909_at	206094_x_at	206205_at
206500_s_at	206561_s_at	206653_at	206737_at	207126_x_at	207275_s_at	207332_s_at
207469_s_at	207891_s_at	208079_s_at	208097_s_at	208209_s_at	208290_s_at	208309_s_at
208447_s_at	208510_s_at	208596_s_at	208624_s_at	208691_at	208708_x_at	208839_s_at
208840_s_at	208853_s_at	208881_x_at	209513_s_at	209520_s_at	209608_s_at	209616_s_at
209735_at	209773_s_at	209838_at	210076_x_at	210544_s_at	210567_s_at	210596_at
210868_s_at	211015_s_at	211016_x_at	211212_s_at	212030_at	212097_at	212106_at
212107_s_at	212190_at	212220_at	212274_at	212398_at	212529_at	212570_at
212650_at	212720_at	213286_at	213334_x_at	213379_at	213427_at	213449_at
213470_s_at	213562_s_at	213734_at	213880_at	213899_at	213913_s_at	213971_s_at
214007_s_at	214205_x_at	214316_x_at	214331_at	214358_at	214649_s_at	214697_s_at
214895_s_at	214934_at	215125_s_at	215207_x_at	216266_s_at	216521_s_at	216607_s_at
216841_s_at	217127_at	217457_s_at	217496_s_at	217834_s_at	217878_s_at	218018_at
218073_s_at	218100_s_at	218156_s_at	218349_s_at	218392_x_at	218512_at	218716_x_at
218737_at	218772_x_at	218817_at	218868_at	218888_s_at	219014_at	219201_s_at
219212_at	219307_at	219311_at	219320_at	219399_at	219459_at	219508_at
219558_at	219756_s_at	219850_s_at	219990_at	220060_s_at	220238_s_at	220239_at
220892_s_at	221027_s_at	221059_s_at	221305_s_at	221521_s_at	221727_at	221987_s_at
222037_at	222393_s_at	222499_at	222519_s_at	222600_s_at	222646_s_at	222654_at
222736_s_at	222781_s_at	223062_s_at	223230_at	223308_s_at	223320_s_at	223542_at
223570_at	223839_s_at	223879_s_at	223888_s_at	224209_s_at	224311_s_at	224352_s_at
224461_s_at	224480_s_at	224509_s_at	224582_s_at	224634_at	224744_at	225161_at
225366_at	225686_at	225688_s_at	225736_at	225943_at	226438_at	226661_at
226826_at	226907_at	227211_at	227741_at	227977_at	227993_at	228050_at
228168_at	228204_at	228291_s_at	228485_s_at	228810_at	228868_x_at	228986_at
229083_at	229181_s_at	229426_at	229644_at	229676_at	229795_at	229908_s_at
230250_at	230265_at	230306_at	231837_at	231995_at	233208_x_at	233665_x_at
233819_s_at	233827_s_at	234304_s_at	234915_s_at	234992_x_at	235134_at	235244_at
235545_at	235644_at	235694_at	235783_at	236957_at	238010_at	238034_at
238419_at	238623_at	238677_at	238778_at	239143_x_at	240110_at	241937_s_at
242787_at	44065_at					

第 2 章：TGF- β 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

2-1. 本章の要旨

Prostate transmembrane protein, androgen induced 1 (*PMEPA1*)は，様々な固形がん組織で高発現する遺伝子であり，transforming growth factor- β (TGF- β)シグナル伝達経路の制御下にあることが報告されている．本章では，固形がん組織における腫瘍内ストレスの一種である低酸素ストレスが，*PMEPA1* の発現と密接な関わりをもつことを示す．まず，TGF- β シグナル伝達および HIF-1 経路の両方に依存して，低酸素ストレス下で *PMEPA1* が発現誘導されることを見出した．また，*PMEPA1* の過剰発現およびノックダウン実験から，*PMEPA1* が HIF-1 の転写活性を増強することを明らかにした．さらに，TGF- β や低酸素ストレス，並びにこれら両シグナル経路に関連した血管新生や上皮-間葉移行などの遺伝子セットが，臨床がん組織で *PMEPA1* 発現量と相関して発現する遺伝子群にエンリッチメントしていた．興味深いことに，この傾向はほぼ全ての固形がんのがん種で確認された．以上より，*PMEPA1* が固形がん組織における TGF- β と低酸素シグナルの遺伝子発現制御ネットワークに関与し，腫瘍の悪性化に繋がりうることを示された．

2-2. 序文

Prostate transmembrane protein, androgen induced 1 (PMEPA1) は、白血病やリンパ腫では正常組織程度の発現量を示す一方³³、前立腺がん³⁴、乳がん³⁵、腎臓がん、胃がん、大腸がん³³などの多くのがん種では高発現することが知られている。こうした固形がん特異的な発現パターンから、PMEPA1 は solid tumor associated gene 1 (STAG1)としても知られている。これまでの研究から、PMEPA1 の異なる 2 つの発現機構が、がん細胞において報告されている。前立腺がん細胞では、androgen receptor (AR) シグナル伝達経路によって *PMEPA1* の発現が増加し、増加した PMEPA1 タンパクは AR のユビキチン化を促進し、AR シグナル伝達経路の活性を低下させる⁸⁷。他のがん種由来のがん細胞では AR 非依存的な発現様式を示し、TGF- β が *PMEPA1* の主要な発現調節因子であることが知られている³⁶。TGF- β シグナル伝達経路が活性化されると、SMAD3/4 複合体を介して *PMEPA1* の発現が増強されるのである⁸⁸。さらに、PMEPA1 は SMAD2/3 複合体に結合することで SMAD2/3 のリン酸化を阻害し、結果として TGF- β シグナル伝達経路の抑制につながる³⁷。

TGF- β シグナル伝達経路は、ある種の細胞においてはがん抑制の役割を果たすが、多くの腫瘍においては腫瘍の悪性化に寄与する⁸⁹。特に腫瘍形成時において、TGF- β シグナル伝達経路は、HIF と協調的に働き、腫瘍形成に関わる各種経路を活性化することが知られている^{38,39}。低酸素ストレス下では、HIF- α サブユニットの安定化によって HIF 経路の活性化に至り、低酸素ストレス環境への適応に必要な遺伝子が数百種誘導され

^{28,43}, 腫瘍の増殖と悪性化へと繋がる⁴¹. そして, HIF-1 によって惹起される特定の低酸素誘導性遺伝子群は, TGF- β シグナル伝達経路によっても調節される. 例えば, がん細胞の浸潤および転移における重要なプロセスである上皮間葉移行 EMT⁹⁰を活性化する転写因子 TWIST は低酸素ストレスによる発現誘導を受けるが⁹¹, TWIST は TGF- β シグナル経路依存的にも E-cadherin の抑制を介した活性化を受ける⁹⁰. 血管新生は, がん細胞が宿主とする組織から栄養と酸素を獲得するためのメカニズムであり, TGF- β と HIF-1 の両シグナル経路によって制御されている^{28,92}. したがって, TGF- β シグナル伝達経路と低酸素応答シグナル伝達経路の協調的作用は, 腫瘍の悪性化を増強し, 腫瘍内微小環境の再構築を容易にして, がん細胞の生存や増殖を促進すると考えられる.

本章では, PMEPA1 が *ex vivo* HT-29 p⁰細胞で高発現するようになったことから (図 16), PMEPA1 と恒常的な低酸素ストレス応答の活性化に関連があると仮説を立てた. まず, TGF- β シグナル依存的に, 低酸素ストレスによって PMEPA1 の発現が誘導されることを見出した. 低酸素ストレス下で培養したがん細胞のみならず, 固形がん組織のトランスクリプトームデータベースも用いて, PMEPA1 の発現に関する生物学的意義と臨床上の役割を検討した.

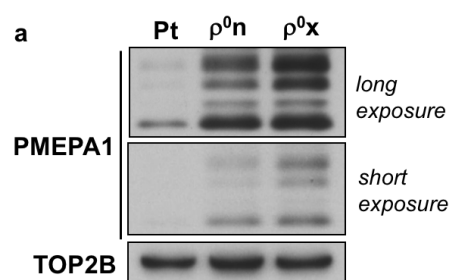


図 16. HT-29 ρ^0 x 細胞における PMEPA1 の恒常的高発現化

(a) PMEPA1 のイムノブロット解析. TOP2B をローディングコントロールとして用いた. Pt: HT-29 細胞親株, ρ^0 n: HT-29 ρ^0 細胞, ρ^0 x: ex vivo HT-29 ρ^0 細胞.

2-3. 材料および方法

細胞培養

ヒト結腸がん細胞株 HT-29⁴⁴, ヒト膵がん細胞株 PANC-1⁴⁴ およびヒト線維肉腫細胞株 HT-1080 細胞⁵⁶ を, PRMI-1640 (Wako, Osaka, Japan) に 10% FBS (熱処理により非働化) および 100 µg/mL のカナマイシンを添加し, 培養した. HT-29 細胞の培養時には, 培地にさらに, 50 µg/mL uridine (Sigma, St. Louis, MO, USA) および 1 mM sodium pyruvate (Sigma) を添加した. TGF-β1 (Sigma) を滅菌蒸留水で溶解し, 2 ng/mL–10 ng/mL の濃度で培地に添加した. SB-431542 (Sigma) を DMSO (Wako) で溶解し, 1 µg/mL で培地中に添加した. AnaeroPack-Kenki 5% (Mitsubishi Gas Chemical, Tokyo, Japan) および 2.5-L AnaeroPack-Rectangular Jar (Mitsubishi Gas Chemical) を用いて, 低酸素ストレス下での培養をした.

イムノブロット解析

第 1 章と同様である. 本章で用いた抗体は以下のとおりである. anti-PMEPA1 (Proteintech, Chicago, IL); anti-TOP2B (Abcam, Cambridge, MA, USA); anti-ACTB (Sigma); anti-HIF-1α (BD Transduction, San Jose, CA, USA); anti-EPAS1, anti-mTOR, anti-SMAD2, anti-phospho-SMAD2, anti-SMAD3, anti-phospho-SMAD3 (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA).

siRNA トランスフェクション

ON-TARGETplus SMART プール siRNA (Dharmacon, Lafayette, CO, USA) を用いて, *PMEPA1* をノックダウンした. 細胞を 1.2×10^5 cells/well (HT-29 細胞) あるいは 3×10^5 cells /well (PANC-1 細胞) で 6-well プレートに播種し, 24 時間培養した. 標準プロトコルに従って, 20 nM siRNA を Opti-MEM (Gibco) と lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen) を 6 時間処理した.

shRNA の形質導入

MISSION Lentiviral Transduction Particles (Sigma) を用いて, *HIF1A* をノックダウンした. *HIF1A* を標的とした配列は, TCRN0000003808 (#1), TCRN0000003809 (#2), TCRN0000003810 (#3), TCRN0000003811 (#4) および TCRN0000010819 (#5) であった. MISSION TRC-Hs 1.0 (Sigma) をコントロール shRNA の形質導入に用いた. 標準プロトコルに従って, shRNA を安定し発現する HT-29 細胞を樹立し, $1 \mu\text{g/mL}$ puromycin (Sigma)を用いてセレクションをかけた.

HRE レポーターアッセイ

第1章と同様である。 *PMEPA1* を標的とした siRNA を用いてノックダウンする際、 siRNA トランスフェクション後 24 時間培養した後で 5×HRE レポーターベクターをトランスフェクションした。

PMEPA1 の過剰発現

pFlag-CMV-5c 発現ベクター (Sigma) 中の Hind III/ Not I 部位に、 *PMEPA1* の各アイソフォームの全長配列を挿入し、 *PMEPA1* 発現ベクターを構築した。 cDNA 増幅のために用いた共通のリバースプライマー(5'-

ATAAGAATGCGGCCGCAGAGAGGGTGTCTTTCTGTTTATCCTTCTC-3') に対して、次のフォワードプライマーを用いた: *PMEPA1* isoform a, 5'-

CCCAAGCTTGCCACCATGCACCGCTTGATGGGGGTCAACAGC-3'; *PMEPA1* isoform b, 5'-

CCCAAGCTTGCCACCATGGCGGAGCTGGAGTTTGTTCAGATC-3'; *PMEPA1* isoform c, 5'-

CCCAAGCTTGCCACCATGATGGTGATGGTGGTGGTGATCACG-3'; *PMEPA1* isoform d, 5'-

CCCAAGCTTGCCACCATGCCTGCAATTCCAGCACATG-3.

Lipofectamine 2000 (Invitrogen)の標準プロトコルを用いて、 *PMEPA1* 発現ベクターを細胞内へトランスフェクションした。

リアルタイム定量 PCR

SuperScript III Platinum SYBR Green One-Step qRT-PCR Kit (Invitrogen) の標準プロトコルに従った. qPCR Reference Total RNA, Human (Stratagene, La, Jolla, CA, USA)を検量線作成のための RNA として用いた. Chromo4 real-time PCR thermocycler (Bio-Rad, Richmond, CA, USA) を次のプロトコルで使い, 相対的 RNA 量 ($\text{mean} \pm \text{SEM}$, $N=3$) を定量した: (1) 50°C, 3 分 (cDNA synthesis), (2) 95°C, 5 分 (denature), (3) 95°C, 15 秒 (denature) と 60°C, 30 秒 (annealing, extension)を 44 サイクル, (4) 40°C, 1 分, (5) 溶解曲線解析 (65°C から 95°C にかけて, 0.5°C 刻みで 5 秒保持). *PMEPA1* の発現量は, *ACTB* の発現量に対する比で表し, 標準化した. プライマー配列は以下の通りである:

PMEPA1 (Forward), 5'-GAGGCCCTCTTTTCCAGTAG-3';

PMEPA1 (Reverse), 5'-TCTCTGAACCAGGATGGAAC-3';

ACTB (Forward), 5'-TCAAGATCATTGCTCCTCCT-3';

ACTB (Reverse), 5'-TTCTGCGCAAGTTAGGTTTT-3'.

臨床腫瘍検体におけるトランスクリプトームデータの取得

TCGA から, 前処理かつ正規化済みの RNA シーケンスデータ (Level 3, Broad GDAC Firehose pipeline) を入手した (Broad Institute TCGA Genome Data Analysis Center (2015): Firehose stddata__2015_11_01 run. Broad Institute of MIT and Harvard.

doi:10.7908/C1571BB1).

遺伝子 – 遺伝子間の共発現ネットワークにおけるエンリッチメント解析

Guilt-by-association, すなわち機能的関連のある遺伝子は共発現する関係にあるというありふれた仮説の下で^{93,94}, 臨床がん組織中の *PMEPAI* の役割を調べた. 検体を原発性固形がん限定し, *PMEPAI* の発現量と他の全ての遺伝子の発現量との間の Spearman 相関係数を臓器別に算出した. 全遺伝子を相関係数の降順に並べ, MSigDB (v5.0) の Hallmark signature⁹⁵ を用いて GSEA を実施した. GSEA ソフトウェア (Broad Institute)^{17,18} の prerank mode のデフォルト設定に基本的に従ったが, 正確な P 値を計算するために 1×10^5 回の反復計算を実施した. *PMEPAI* と共発現する遺伝子への濃縮 (エンリッチメント) を評価するために, 遺伝子セットに対する FDR を常用対数変換し, ユークリッド距離と Ward の連結法を用いた階層的クラスタリング解析を実施した. *PMEPAI* の発現量と正の相関を示さない遺伝子セットについては, FDR を 1 に設定した. 反復計算の結果, P 値が 1×10^{-5} を下回る場合には $\text{FDR} = 0$ が GSEA ソフトウェアから設定されるが, この場合は各 GSEA から算出される二番目に小さい P 値に由来する FDR を設定した. ここでは, 統計解析ソフト R (version 3.1.3) を用いた.

2-4. 結果

PMEPA1 は低酸素応答性の遺伝子である

ヒト大腸がん HT-29 細胞を低酸素ストレス下で 18 時間培養することで、PMEPA1 の mRNA 量およびタンパク量の両方が増加した (図 17a, 図 17b). 低酸素ストレスによる PMEPA1 発現量の増加は、ヒト膵臓がん PANC-1 細胞においても同様にみられた (図 17c). 選択的スプライシングによって複数の *PMEPA1* のアイソフォーム (a, b, c, および d) が産生されうるが、これに合致して、PMEPA1 の複数のバンドがイムノブロット解析で検出された (図 17b, 図 17c). これらの複数のバンドは、HT-29 細胞と PANC-1 細胞との間で発現パターンが異なっていたが、低酸素ストレスによる PMEPA1 の発現増加自体は両細胞で確認された (図 17b, 図 17c). 低酸素応答の主要な制御因子である転写因子 HIF-1 α ^{28,38} の発現量変化と比較すると、低酸素ストレス下における PMEPA1 の発現増加は遅れて誘導された. 実際、8 時間の低酸素ストレス後には PMEPA1 がほとんど増加していなかったが、リン酸化および非リン酸化 HIF-1 α ⁹⁶ の発現増加がその時点で明らかに認められた (図 17b, 図 17c). 次に、HIF-1 α 依存的に PMEPA1 発現が制御されるか調べるために、*HIF1A* を恒常的にノックダウンした HT-29 細胞を樹立した (図 17d). 高いノックダウン効率を有する 2 つのクローンを選択したところ、*HIF1A* ノックダウン細胞において、低酸素ストレス下で発現増加した PMEPA1 の発現量と、恒常的な PMEPA1 発現量の両方が減少した (図 17e, 図 17f).

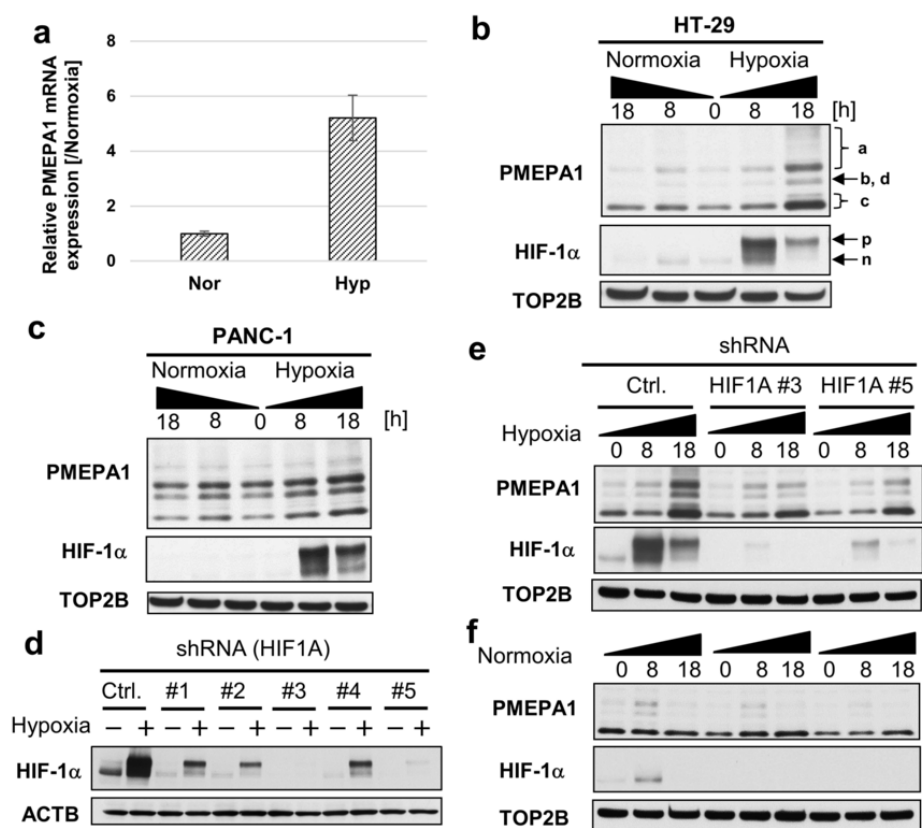


図 17. 低酸素ストレス下での HIF-1 経路依存的な PMEPA1 の発現上昇

(a) PMEPA1 の mRNA 発現量に関するリアルタイム定量 PCR 解析. 低酸素ストレス条件下 (hypoxia, hyp) または通常酸素条件下 (normoxia, nor) での, HT-29 細胞における PMEPA1 の発現量を *ACTB* 発現量に対して正規化し, 発現変化量 (hyp/nor) を計算した. (b, c) PMEPA1 および HIF-1 α タンパクのイムノブロット解析. 表記した時間の通常酸素または低酸素ストレス下で培養された HT-29 細胞 (b) と PANC-1 細胞 (c) における発現量を調べた. TOP2B はローディングコントロールである. (d) HIF-1 α のイムノブロット解析. HIF-1 α を標的とした shRNA で形質導入された HT-29 細胞クローンを, 通常酸素または低酸素ストレス下で 18 時間培養し, 発現量を調べた. ACTB はローディングコントロールである. (e, f) PMEPA1 および HIF-1 α のイムノブロット解析. 表記した時間の通常酸素または低酸素ストレス下で培養された HT-29 細胞の HIF-1 α ノックダウンクローン (HIF1A#3 および #5) における発現量を調べた. TOP2B はローディングコントロールである. Ctrl, コントロール.

TGF- β シグナル経路依存的な、低酸素ストレス下での PMEPA1 の発現誘導

低酸素ストレス下で誘導される PMEPA1 の発現機構における、TGF- β シグナル伝達経路の役割を調べた。培地中に TGF- β 1 の組換えタンパクを添加すると、通常酸素条件下でも PMEPA1 の発現が誘導されたが、評価した濃度域（2 ng/mL – 10 ng/mL）においては TGF- β 1 の用量依存性は認められなかった（図 18a）。興味深いことに、TGF- β 1 の添加と低酸素ストレス処理を併用することで、各々単独で処理した時よりも PMEPA1 の発現量は増加した（図 18a）。一方で、TGF- β superfamily type I activin receptor-like kinase（ALK）受容体である ALK4,5,7 の低分子阻害剤 SB-431542⁹⁷ 処理によって、TGF- β 1 処理と低酸素ストレス、あるいはその併用時の PMEPA1 発現量が抑制され、それは SMAD2/3 のリン酸化抑制と同時に観察された（図 18b）。以上より、TGF- β シグナル伝達経路が、低酸素ストレス下における PMEPA1 の発現量増加に必須の役割を果たすことが示された。

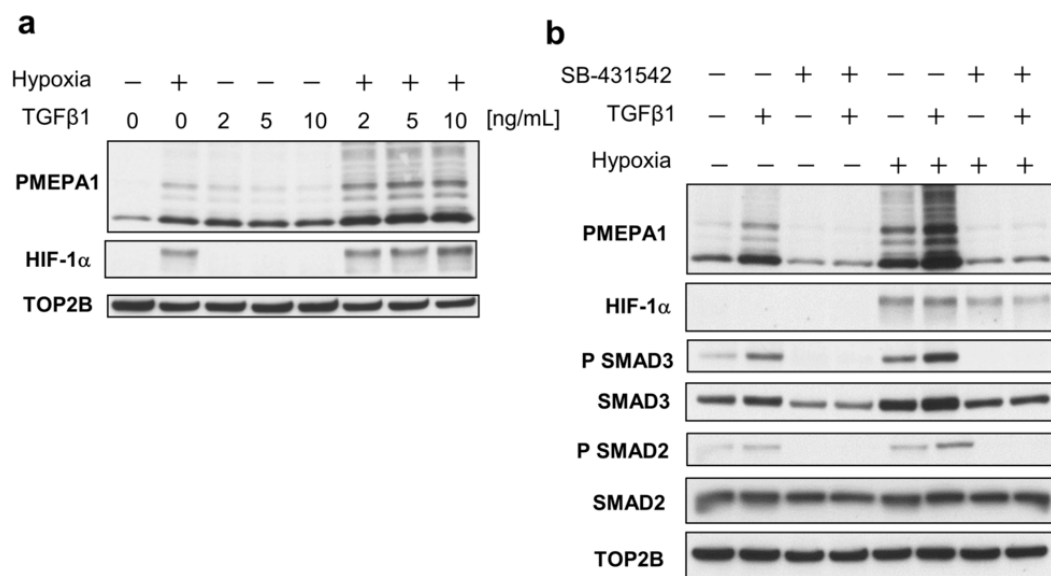


図 18. TGF-β 依存的な，低酸素ストレス下における PMEPA1 の誘導

(a) PMEPA1 および HIF-1α タンパクのイムノブロット解析. 記載濃度の TGF-β1 と低酸素ストレス (Hypoxia) を 18 時間, HT-29 細胞に対して処理した. (b) PMEPA1, HIF-1α および SMAD2/3 タンパクのイムノブロット解析. TGF-β1 (2 ng / mL) と TGF-β シグナル伝達阻害剤 SB-431542 (1 μg / μL) を 18 時間, 記載の条件で処理した. TOP2B をローディングコントロールとして用いた.

PMEPA1 は HIF-1 転写活性誘導能を増強する

4 種の *PMEPA1* アイソフォーム (図 19a) の発現プラスミドを構築し, *PMEPA1* 発現量の増加による HIF-1 転写活性への影響を, レポーターアッセイ系⁵⁹ で調べた. まず, HT-29 細胞内にトランスフェクションした *PMEPA1* アイソフォーム a (最長のアイソフォーム) のプラスミド量に依存し, 通常酸素条件および低酸素ストレス下の両方で, HIF-1 転写活性が増強された (図 19b). *PMEPA1* アイソフォーム b および d (*PMEPA1* アイソフォーム a 同様, 完全なトランスメンブレンドメインを持つ) も, *PMEPA1* アイソフォーム a と同様の活性を示した (図 19c, 図 19d). *PMEPA1* アイソフォーム c (トランスメンブレンドメインが不完全) については, トランスフェクションしたプラスミド量あたりの発現量が他のアイソフォームより低く (図 19a), やはり他のアイソフォームよりも HIF-1 転写活性誘導能の増加が限定的であった (図 19c, 図 19d). 次に, HT-29 細胞および PANC-1 細胞において, RNA 干渉による *PMEPA1* のノックダウン実験を行った. その結果, *PMEPA1* を標的としたノックダウンによって, HIF-1 α および EPAS1 / HIF-2 α の遺伝子発現レベルを変化させることなく, 通常酸素および低酸素ストレス下の両方で HIF-1 転写活性が減弱した (図 19e, 図 19f). 以上より, *PMEPA1* が, HIF-1 α サブユニットおよび HIF-2 α サブユニットの発現量に影響を与えずに, HIF-1 転写活性を増強し得ることが示された.

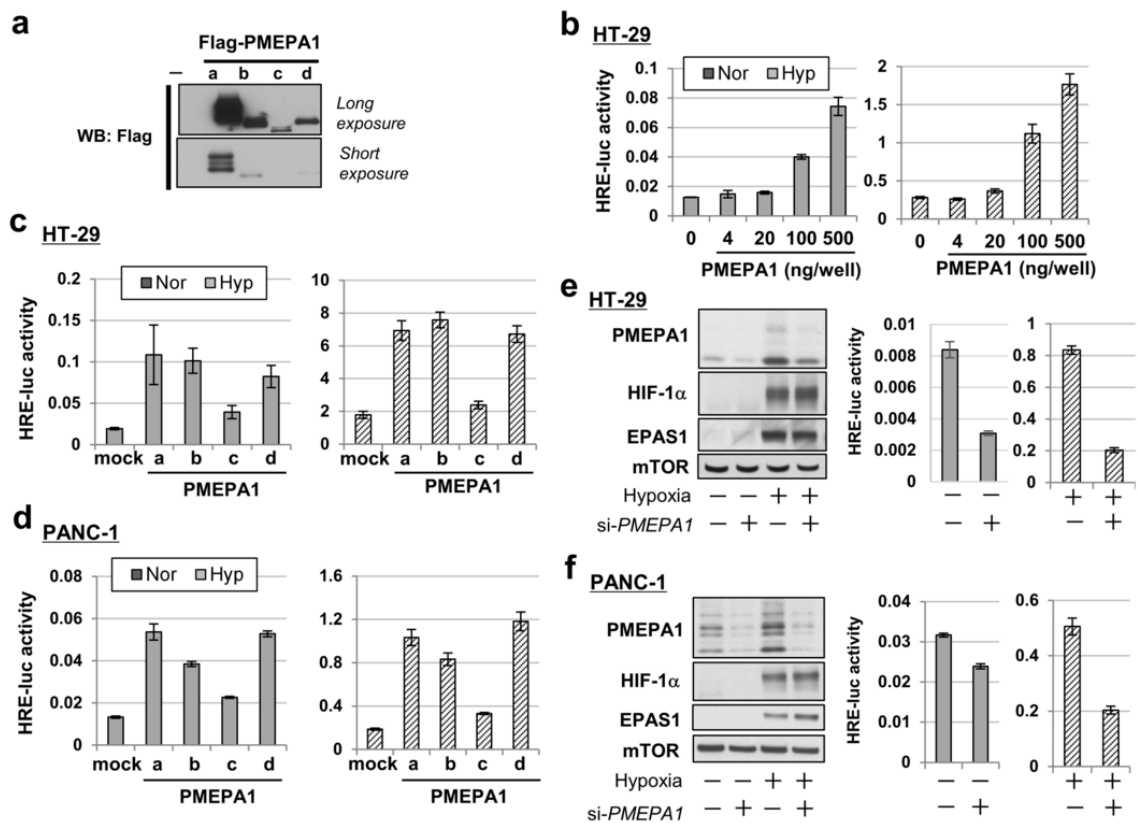


図 19. PMEPA1 依存的な, HIF-1 転写活性の制御機構

(a) PMEPA1 アイソフォーム (a, b, c および d) のイムノブロット解析. HT-1080 細胞を用い, PMEPA1 タンパクを anti-Flag 抗体で検出した. (b) PMEPA1 (アイソフォーム a) プラスミドのトランスフェクションによる HRE レポーターアッセイ. 通常酸素 (左) および低酸素ストレス下 (右) で 18 時間, HT-29 細胞を培養した. 記載されたプラスミド量を 12-well プレート上にトランスフェクトした. (c, d) HRE レポーターアッセイ. HT-29 細胞 (c) と PANC-1 細胞 (d) に, 記載のアイソフォームの PMEPA1 プラスミド (500 ng/well, 12-well プレート) をトランスフェクションし, 通常酸素条件下 (左) と低酸素条件下 (右) で 18 時間培養した. (e, f) PMEPA1, HIF-1 α , EPAS1/HIF-2 α のイムノブロット解析 (左) と HRE レポーターアッセイ (右) を, HT-29 細胞 (e) と PANC-1 細胞 (f) に対して実施した. mTOR をローディングコントロールとして用いた. si-PMEPA1, PMEPA1 を標的とした siRNA; Hypoxia, siRNA トランスフェクション後に 18 時間の低酸素ストレス下で培養した条件.

臨床のがん組織における *PMEPA1* 共発現ネットワークでの、TGF- β および低酸素関

連遺伝子セットのエンリッチメント

TCGA から固形がん組織の RNA シーケンスによるトランスクリプトームデータを得て、臨床の固形がん組織において、*PMEPA1* と共発現する遺伝子が属するパスウェイを調べた。GSEA の結果、*PMEPA1* と共発現する遺伝子に “TGF- β signaling” (TGF- β 1 処理によって発現増加する遺伝子セット) や “hypoxia” (低酸素ストレスに応答して発現増加する遺伝子セット) などのホールマーク遺伝子セット⁹⁵ がエンリッチメントしていた。この傾向は、ほぼ全てのがん種で確認されたが、前立腺がん組織においては確認されなかった (図 20a-20c)。さらに、“angiogenesis” (血管新生に伴って発現増加する遺伝子セット) や EMT (傷害修復や線維化、転移などの EMT 過程で増加する遺伝子セット) といったホールマーク遺伝子セットは、低酸素ストレスと TGF- β シグナル経路の両方で活性化されることが知られているが⁹⁸⁻¹⁰¹、両方共にほぼ全てのがん種で強くエンリッチメントしていた (図 20c)。これに対して、前立腺がん組織では “androgen response” (アンドロゲン応答性遺伝子) が *PMEPA1* と正の相関を示す遺伝子群に特徴的な遺伝子セットであった (図 20b, 20c)。以上より、前立腺がん以外のがん種横断的に、低酸素と TGF- β シグナル伝達経路の遺伝子制御ネットワークにおいて *PMEPA1* が重要な役割を果たすことが示された。

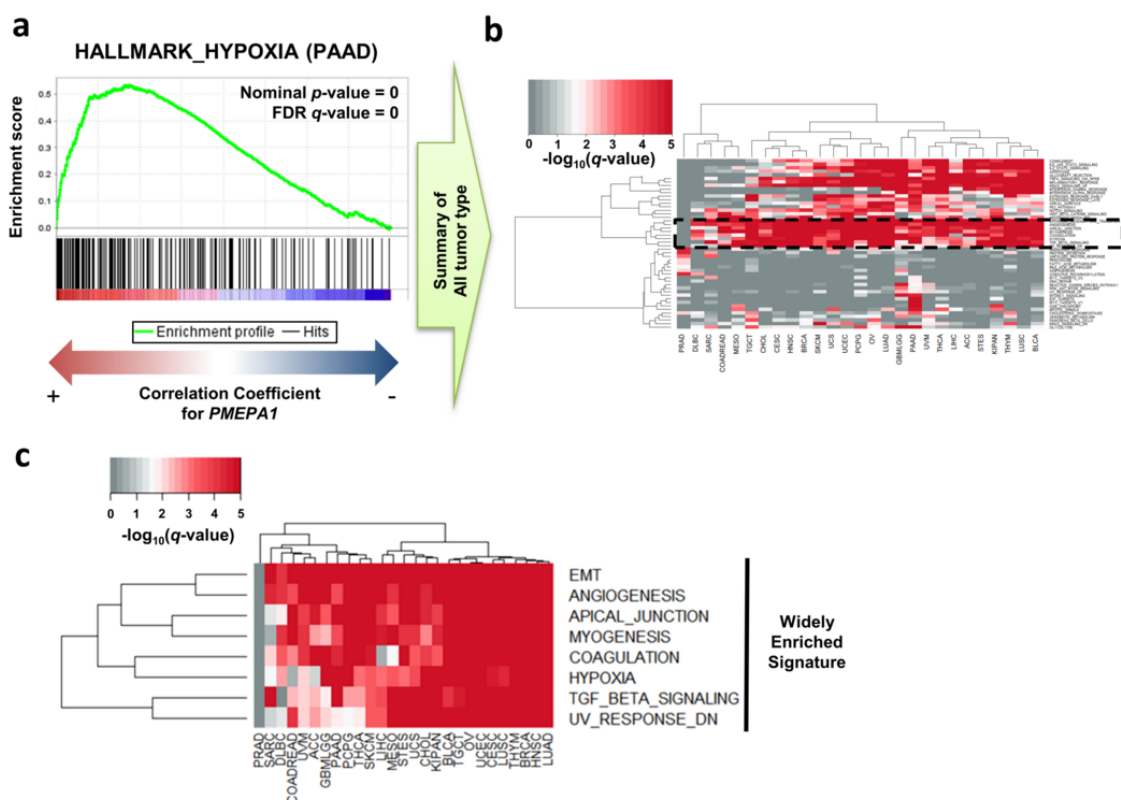


図 20. 臨床がん組織における *PMEPA1* の共発現遺伝子ネットワーク中の GSEA

(a) MSigDB v5 に収録されている低酸素 (hypoxia) ホールマーク遺伝子セットを用いたエンリッチメントプロット¹⁸ の例. 膵がんのトランスクリプトームデータを例として用いた. 上部の緑曲線はエンリッチメントスコアを意味し, 統計量は *PMEPA1* 発現量との相関係数に基づき計算されたものである. (b) GSEA から算出された q 値のサマリー. (c) (b) の破線で囲まれた領域を拡大した. (b, c) のカラーキーは q 値を常用対数変換したものである. 略称は TCGA に従った.

2-5. 考察

PMEPA1 が、TGF- β シグナル伝達経路に依存した新規の低酸素誘導性遺伝子であることが明らかとなった。そして、低酸素ストレスに対する正のフィードバック調節機構の構成要素として PMEPA1 が働くことも示された。血管形成不全によって、固形がんでは低酸素ストレスがしばしば認められるため⁴、本結果は「PMEPA1 がなぜ固形がんを高発現するのか」という科学的疑問³³⁻³⁵に対して、新たな解釈を提供したといえよう。事実、臨床のがん組織においても、低酸素ストレスや TGF- β シグナル伝達経路の活性化と PMEPA1 の発現量が関連していた。さらには両シグナルの活性化が起因する EMT や血管新生といった、腫瘍に共通して重要な生物学的プロセス^{28,90-92,102}とも PMEPA1 の発現量が強く関連していた。これらの知見を統合すると、腫瘍増殖や悪性化の際の、低酸素ストレスや TGF- β シグナル伝達経路の協調的活性を PMEPA1 が調整していることが示唆される。

PMEPA1 の過剰発現およびノックダウン実験により、PMEPA1 が HIF-1 経路の活性化に関与することを示した。本検討では、*PMEPA1* を標的とする siRNA 処理によって、HIF-1 転写活性が低下したが、HIF-1 α および HIF-2 α タンパクは低下しなかった（図 19e, 19f）。しかし、過去の報告では、PMEPA1 を恒常的にノックダウンしたヒト乳がん細胞のマウス異種移植モデルにおいて、HIF-1 α ならびに HIF-1 経路の主要な標的遺伝子 vascular endothelial growth factor のタンパク量減少が示されている¹⁰³。PMEPA1 と HIF-1 経路との

相互作用機構が細胞状況 (cellular context) によって異なる可能性がある一方で、本研究と既報を合わせると、複数の HIF-1 経路の活性化過程で *PMEPA1* が関与しているとも考えられる。 *PMEPA1* を介した HIF-1 経路の活性増強機構の解明には、さらなる検討が必要である。

臨床の固形がん組織解析の結果、前立腺がんにおいては、低酸素ストレスや TGF- β シグナル伝達経路の遺伝子セットと *PMEPA1* が遺伝子発現上の相関関係になかったが、アンドロゲン応答性遺伝子群と *PMEPA1* は正の相関を示していた (図 20b, 20c)。これは、前立腺がん細胞における *PMEPA1* の発現が AR シグナル伝達経路の制御下にあるためと考えられる⁸⁷。実際、一部のアンドロゲン感受性前立腺がん細胞では、*PMEPA1* の発現が主として AR シグナル伝達の調節下にあり¹⁰⁴、*PMEPA1* の発現量は TGF- β 処理¹⁰⁵ にも低酸素ストレス¹⁰⁴ にも増強されなかったと報告されている。したがって、前立腺がんにおける *PMEPA1* 発現調節機構は、低酸素ストレスや TGF- β シグナル伝達経路よりも AR シグナル経路が支配的であると期待される。

前立腺がんにおける結果とは対照的に、他の固形がんにおいては、低酸素ストレス下での *PMEPA1* の発現誘導の上流因子が、TGF- β シグナル伝達経路であると考えられる。実際、TGF- β と低酸素ストレスが *PMEPA1* を相乗的に発現誘導するが、TGF- β シグナル経路の阻害によって、低酸素ストレス下での *PMEPA1* の発現誘導は阻害された。特に、がん抑制遺伝子として機能する *SMAD4*¹⁰⁶ を欠損した HT-29 細胞^{107,108} で、TGF- β シグナ

ル伝達および HIF-1 α 依存的な、低酸素ストレス下での PMEPA1 発現誘導が確認されたことは興味深い。なぜならば、SMAD4 の欠損によって、TGF- β シグナル伝達経路と HIF-1 α 下流のシグナル伝達経路の両方が、がんの悪性化に有利な形質を導くと考えられているためである¹⁰⁹。したがって、低酸素ストレス下での PMEPA1 の発現誘導は、TGF- β のがん遺伝子としての役割に関連すると期待される。この仮説と合致して、患者由来の固形がん組織における低酸素ストレス応答性遺伝子と TGF- β シグナル伝達経路下流の遺伝子の両方が *PMEPA1* の発現量と正の相関を示すことが本研究から示された。既報でも、TGF- β によって誘導される細胞増殖能や運動性¹⁰³、EMT¹¹⁰ を PMEPA1 が制御すると報告されている。

以上をまとめると、固形がん組織において、PMEPA1 は、低酸素ストレス応答と TGF- β シグナル伝達経路が協調的に働く現象の有望なバイオマーカーである。そして、その分子基盤を更に解明することで、低酸素ストレス応答と TGF- β シグナル伝達経路の協調的活性を破綻させ、がん微小環境の形成を標的とした新規がん治療法の開発が進むと期待される。

第3章：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

本章は、いまだ出版契約に至らないものの、近い将来において雑誌掲載等の形で、刊行される期待がある。そこで、本章の内容（本章の要旨、序文、材料および方法、結果、考察）を除外し、公開することとした。

本章の内容は学位授与日から5年以内に出版予定である。

総括

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。特に、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 α 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（第1章）。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。臨床がん組織中の血管新生や上皮-間葉移行関連遺伝子群と *PMEPA1* 発現量との間にも強い正の関連が、がん種横断的に見られた。したがって、*PMEPA1* が、低酸素ストレス応答や TGF- β 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（第2章）。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。実際、第1章で得られ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（第3章）。これら実験科学と情報科学を駆使した研究成果（図 35）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。

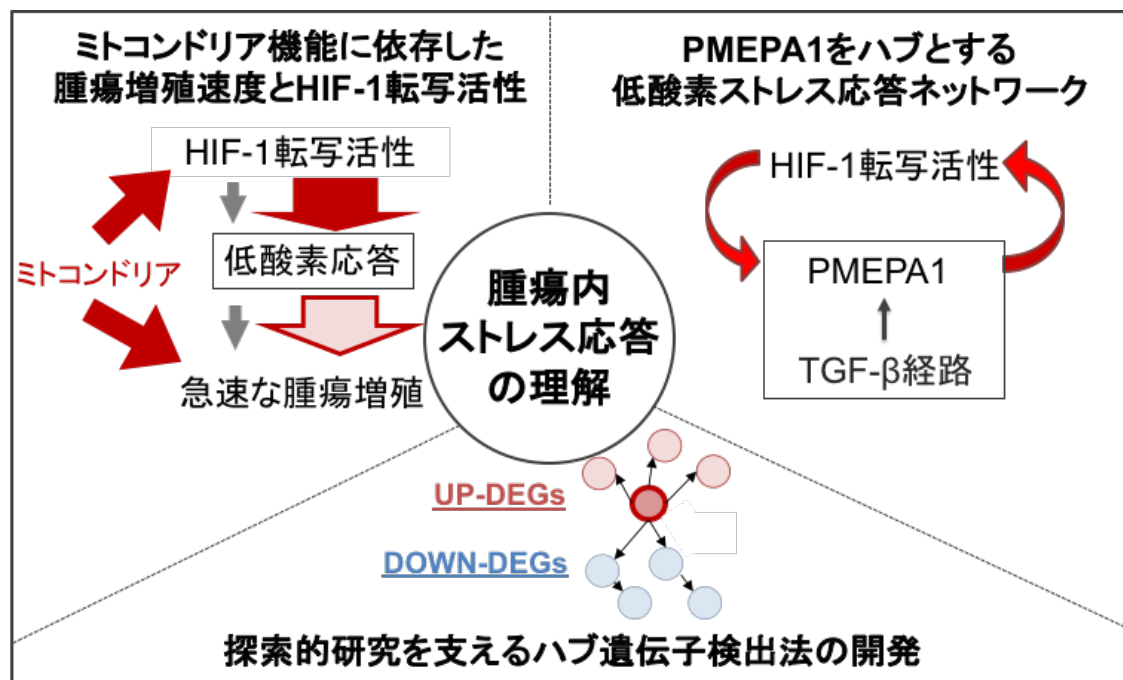


図 35. 腫瘍内ストレス応答の理解を目指した本博士論文の結論

論文目錄

原著論文

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. et al. *PMEPAI*, a TGF- β - and hypoxia-inducible gene that participates in hypoxic gene expression networks in solid tumors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **479**, 615–621 (2016).

参考文献

1. 国立がん研究センターがん情報サービス. がん登録・統計. 2017年12月08日更新 (2017).
Available at: https://ganjoho.jp/reg_stat/statistics/stat/summary.html. (Accessed: 20th January 2018)
2. Torre, L. A. *et al.* Global cancer statistics, 2012. *CA. Cancer J. Clin.* **65**, 87–108 (2015).
3. Ke, X. & Shen, L. Molecular targeted therapy of cancer: The progress and future prospect. *Front. Lab. Med.* **1**, 69–75 (2017).
4. Vaupel, P., Kallinowski, F. & Okunieff, P. Blood flow, oxygen and nutrient supply, and metabolic microenvironment of human tumors: a review. *Cancer Res.* **49**, 6449–65 (1989).
5. Gatenby, R. A. & Gillies, R. J. Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nat. Rev. Cancer* **4**, 891–9 (2004).
6. Vaupel, P., Schlenger, K., Knoop, C. & Höckel, M. Oxygenation of human tumors: evaluation of tissue oxygen distribution in breast cancers by computerized O₂ tension measurements. *Cancer Res.* **51**, 3316–22 (1991).
7. Hirayama, A. *et al.* Quantitative metabolome profiling of colon and stomach cancer microenvironment by capillary electrophoresis time-of-flight mass spectrometry. *Cancer Res.* **69**, 4918–25 (2009).
8. Cairns, R. A., Harris, I. S. & Mak, T. W. Regulation of cancer cell metabolism. *Nat. Rev. Cancer* **11**, 85–95 (2011).
9. Kroemer, G. & Pouyssegur, J. Tumor Cell Metabolism: Cancer’s Achilles’ Heel. *Cancer Cell* **13**, 472–482 (2008).
10. Bui, T. & Thompson, C. B. Cancer’s sweet tooth. *Cancer Cell* **9**, 419–420 (2006).

11. Pfeiffer, T., Schuster, S. & Bonhoeffer, S. Cooperation and Competition in the Evolution of ATP-Producing Pathways. *Science* (80-.). **292**, 504–507 (2001).
12. Bui, T. & Thompson, C. B. Cancer's sweet tooth. *Cancer Cell* **9**, 419–420 (2006).
13. Cuvuto, P. & Fenech, M. F. A review of methionine dependency and the role of methionine restriction in cancer growth control and life-span extension. *Cancer Treat. Rev.* **38**, 726–36 (2012).
14. Qiu, F. *et al.* Arginine starvation impairs mitochondrial respiratory function in ASS1-deficient breast cancer cells. *Sci. Signal.* **7**, ra31 (2014).
15. Morris, C. R., Hamilton-Reeves, J., Martindale, R. G., Sarav, M. & Ochoa Gautier, J. B. Acquired Amino Acid Deficiencies: A Focus on Arginine and Glutamine. *Nutr. Clin. Pract.* **32**, 30S–47S (2017).
16. Bertino, J. R. Nutrients, vitamins and minerals as therapy. *Cancer* **43**, 2137–42 (1979).
17. Mootha, V. K. *et al.* PGC-1alpha-responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes. *Nat. Genet.* **34**, 267–73 (2003).
18. Subramanian, A. *et al.* Gene set enrichment analysis : A knowledge-based approach for interpreting genome-wide. *Proc Natl Acad Sci US A* **102**, 15545–50 (2005).
19. Lamb, J. *et al.* The Connectivity Map: Using Gene-Expression Signatures to Connect Small Molecules, Genes, and Disease. *Science* (80-.). **313**, 1929–1935 (2006).
20. Lamb, J. The Connectivity Map: a new tool for biomedical research. *Nat. Rev. Cancer* **7**, 54–60 (2007).
21. Chen, E. Y. *et al.* Enrichr: interactive and collaborative HTML5 gene list enrichment analysis tool. *BMC Bioinformatics* **14**, 128 (2013).
22. Weinberg, S. E. & Chandel, N. S. Targeting mitochondria metabolism for cancer therapy. *Nat. Chem.*

- Biol.* **11**, 9–15 (2015).
23. Schroedl, C., McClintock, D. S., Budinger, G. R. S. & Chandel, N. S. Hypoxic but not anoxic stabilization of HIF-1alpha requires mitochondrial reactive oxygen species. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **283**, L922-31 (2002).
 24. Guzy, R. D. *et al.* Mitochondrial complex III is required for hypoxia-induced ROS production and cellular oxygen sensing. *Cell Metab.* **1**, 401–8 (2005).
 25. Mansfield, K. D. *et al.* Mitochondrial dysfunction resulting from loss of cytochrome c impairs cellular oxygen sensing and hypoxic HIF-alpha activation. *Cell Metab.* **1**, 393–9 (2005).
 26. Brunelle, J. K. *et al.* Oxygen sensing requires mitochondrial ROS but not oxidative phosphorylation. *Cell Metab.* **1**, 409–14 (2005).
 27. Klimova, T. & Chandel, N. S. Mitochondrial complex III regulates hypoxic activation of HIF. *Cell Death Differ.* **15**, 660–6 (2008).
 28. Greer, S. N., Metcalf, J. L., Wang, Y. & Ohh, M. The updated biology of hypoxia-inducible factor. *EMBO J.* **31**, 2448–60 (2012).
 29. Vaux, E. C., Metzen, E., Yeates, K. M. & Ratcliffe, P. J. Regulation of hypoxia-inducible factor is preserved in the absence of a functioning mitochondrial respiratory chain. *Blood* **98**, 296–302 (2001).
 30. Owen, M. R., Doran, E. & Halestrap, A. P. Evidence that metformin exerts its anti-diabetic effects through inhibition of complex 1 of the mitochondrial respiratory chain. *Biochem. J.* **348 Pt 3**, 607–14 (2000).
 31. Huang, S.-L. *et al.* Arctigenin, a natural compound, activates AMP-activated protein kinase via inhibition of mitochondria complex I and ameliorates metabolic disorders in ob/ob mice. *Diabetologia* **55**, 1469–81 (2012).

32. Koido, M. *et al.* Mitochondrial deficiency impairs hypoxic induction of HIF-1 transcriptional activity and retards tumor growth. *Oncotarget* **8**, 11841–11854 (2017).
33. Rae, F. K., Hooper, J. D., Nicol, D. L. & Clements, J. A. Characterization of a novel gene, STAG1/PMEPA1, upregulated in renal cell carcinoma and other solid tumors. *Mol. Carcinog.* **32**, 44–53 (2001).
34. Xu, L. L. *et al.* A novel androgen-regulated gene, PMEPA1, located on chromosome 20q13 exhibits high level expression in prostate. *Genomics* **66**, 257–63 (2000).
35. Giannini, G. *et al.* EGF- and cell-cycle-regulated STAG1/PMEPA1/ERG1.2 belongs to a conserved gene family and is overexpressed and amplified in breast and ovarian cancer. *Mol. Carcinog.* **38**, 188–200 (2003).
36. Brunschwig, E. B. *et al.* PMEPA1, a transforming growth factor-beta-induced marker of terminal colonocyte differentiation whose expression is maintained in primary and metastatic colon cancer. *Cancer Res.* **63**, 1568–75 (2003).
37. Watanabe, Y. *et al.* TMEPAI, a transmembrane TGF-beta-inducible protein, sequesters Smad proteins from active participation in TGF-beta signaling. *Mol. Cell* **37**, 123–34 (2010).
38. Neuzillet, C. *et al.* Perspectives of TGF- β inhibition in pancreatic and hepatocellular carcinomas. *Oncotarget* **5**, 78–94 (2014).
39. Pawlus, M. R. & Hu, C.-J. Enhanceosomes as integrators of hypoxia inducible factor (HIF) and other transcription factors in the hypoxic transcriptional response. *Cell. Signal.* **25**, 1895–903 (2013).
40. Koido, M., Sakurai, J., Tsukahara, S., Tani, Y. & Tomida, A. PMEPA1, a TGF- β - and hypoxia-inducible gene that participates in hypoxic gene expression networks in solid tumors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **479**, 615–621 (2016).

41. Keith, B., Johnson, R. S. & Simon, M. C. HIF1 α and HIF2 α : sibling rivalry in hypoxic tumour growth and progression. *Nat. Rev. Cancer* **12**, 9–22 (2012).
42. Wang, G. L., Jiang, B. H., Rue, E. A. & Semenza, G. L. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, 5510–4 (1995).
43. Mole, D. R. *et al.* Genome-wide Association of Hypoxia-inducible Factor (HIF)-1 and HIF-2 DNA Binding with Expression Profiling of Hypoxia-inducible Transcripts. *J. Biol. Chem.* **284**, 16767–16775 (2009).
44. Haga, N. *et al.* Mitochondria regulate the unfolded protein response leading to cancer cell survival under glucose deprivation conditions. *Cancer Sci.* **101**, 1125–1132 (2010).
45. Cavalli, R., Varella-García, M. & Liang, C. Diminished Tumorigenic of Mitochondrial Phenotype after Depletion. *Cell Growth Differ* **8**, 1189–1198 (1997).
46. Tan, A. S. *et al.* Mitochondrial genome acquisition restores respiratory function and tumorigenic potential of cancer cells without mitochondrial DNA. *Cell Metab.* **21**, 81–94 (2015).
47. Bai, Y. *et al.* Single nucleotide polymorphisms in the D-loop region of mitochondrial DNA is associated with renal cell carcinoma outcome. *Mitochondrial DNA* **26**, 224–6 (2015).
48. Navaglia, F. *et al.* Mitochondrial DNA D-loop in pancreatic cancer: somatic mutations are epiphenomena while the germline 16519 T variant worsens metabolism and outcome. *Am. J. Clin. Pathol.* **126**, 593–601 (2006).
49. Brandon, M., Baldi, P. & Wallace, D. C. Mitochondrial mutations in cancer. *Oncogene* **25**, 4647–62 (2006).
50. Chatterjee, A., Mambo, E. & Sidransky, D. Mitochondrial DNA mutations in human cancer. *Oncogene* **25**, 4663–74 (2006).

51. Carew, J. S. & Huang, P. Mitochondrial defects in cancer. *Mol. Cancer* **1**, 9 (2002).
52. Shapovalov, Y., Hoffman, D., Zuch, D., de Mesy Bentley, K. L. & Eliseev, R. A. Mitochondrial dysfunction in cancer cells due to aberrant mitochondrial replication. *J. Biol. Chem.* **286**, 22331–8 (2011).
53. Wallace, D. C. Mitochondria and cancer. *Nat. Rev. Cancer* **12**, 685–98 (2012).
54. Kassauei, K. *et al.* Mitochondrial DNA mutations in pancreatic cancer. *Int. J. Gastrointest. Cancer* **37**, 57–64 (2006).
55. Simonnet, H. *et al.* Low mitochondrial respiratory chain content correlates with tumor aggressiveness in renal cell carcinoma. *Carcinogenesis* **23**, 759–68 (2002).
56. Saito, S. *et al.* Compound C Prevents the Unfolded Protein Response during Glucose Deprivation through a Mechanism Independent of AMPK and BMP Signaling. *PLoS One* **7**, 1–12 (2012).
57. Tsukumo, Y. *et al.* Nucleobindin 1 controls the unfolded protein response by inhibiting ATF6 activation. *J. Biol. Chem.* **282**, 29264–72 (2007).
58. Matsuo, J. *et al.* Hyperactivation of 4E-binding protein 1 as a mediator of biguanide-induced cytotoxicity during glucose deprivation. *Mol. Cancer Ther.* **11**, 1082–91 (2012).
59. Shibata, T., Giaccia, A. J. & Brown, J. M. Development of a hypoxia-responsive vector for tumor-specific gene therapy. *Gene Ther.* **7**, 493–8 (2000).
60. Saito, S. *et al.* Chemical genomics identifies the unfolded protein response as a target for selective cancer cell killing during glucose deprivation. *Cancer Res.* **69**, 4225–34 (2009).
61. McCall, M. N., Bolstad, B. M. & Irizarry, R. A. Frozen robust multiarray analysis (fRMA). *Biostatistics* **11**, 242–253 (2010).
62. Düvel, K. *et al.* Activation of a metabolic gene regulatory network downstream of mTOR complex

1. *Mol. Cell* **39**, 171–83 (2010).
63. Tandon, P. *et al.* Requirement for ribosomal protein S6 kinase 1 to mediate glycolysis and apoptosis resistance induced by Pten deficiency. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 2361–5 (2011).
64. Winter, S. C. *et al.* Relation of a hypoxia metagene derived from head and neck cancer to prognosis of multiple cancers. *Cancer Res.* **67**, 3441–9 (2007).
65. Elvidge, G. P. *et al.* Concordant regulation of gene expression by hypoxia and 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase inhibition: the role of HIF-1alpha, HIF-2alpha, and other pathways. *J. Biol. Chem.* **281**, 15215–26 (2006).
66. Aubert, S. *et al.* MUC1, a new hypoxia inducible factor target gene, is an actor in clear renal cell carcinoma tumor progression. *Cancer Res.* **69**, 5707–15 (2009).
67. Shin, D. H., Chun, Y. S., Lee, D. S., Huang, L. E. & Park, J. W. Bortezomib inhibits tumor adaptation to hypoxia by stimulating the FIH-mediated repression of hypoxia-inducible factor-1. *Blood* **111**, 3131–3136 (2008).
68. Birle, D. C. & Hedley, D. W. Suppression of the hypoxia-inducible factor-1 response in cervical carcinoma xenografts by proteasome inhibitors. *Cancer Res.* **67**, 1735–43 (2007).
69. Kaluz, S., Kaluzová, M. & Stanbridge, E. J. Proteasomal inhibition attenuates transcriptional activity of hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) via specific effect on the HIF-1alpha C-terminal activation domain. *Mol. Cell. Biol.* **26**, 5895–5907 (2006).
70. Kordes, S. *et al.* Metformin in patients with advanced pancreatic cancer: a double-blind, randomised, placebo-controlled phase 2 trial. *Lancet. Oncol.* **16**, 839–47 (2015).
71. Welsh, S., Williams, R., Kirkpatrick, L., Paine-Murrieta, G. & Powis, G. Antitumor activity and pharmacodynamic properties of PX-478, an inhibitor of hypoxia-inducible factor-1alpha. *Mol. Cancer Ther.* **3**, 233–44 (2004).

72. Kim, T.-H. *et al.* NRF2 blockade suppresses colon tumor angiogenesis by inhibiting hypoxia-induced activation of HIF-1 α . *Cancer Res.* **71**, 2260–75 (2011).
73. Brauch, H. *et al.* VHL alterations in human clear cell renal cell carcinoma: association with advanced tumor stage and a novel hot spot mutation. *Cancer Res.* **60**, 1942–8 (2000).
74. Maxwell, P. H. *et al.* The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature* **399**, 271–5 (1999).
75. Kondo, K., Klco, J., Nakamura, E., Lechpammer, M. & Kaelin, W. G. Inhibition of HIF is necessary for tumor suppression by the von Hippel-Lindau protein. *Cancer Cell* **1**, 237–46 (2002).
76. Maranchie, J. K. *et al.* The contribution of VHL substrate binding and HIF1- α to the phenotype of VHL loss in renal cell carcinoma. *Cancer Cell* **1**, 247–55 (2002).
77. Zhang, H. *et al.* HIF-1 inhibits mitochondrial biogenesis and cellular respiration in VHL-deficient renal cell carcinoma by repression of C-MYC activity. *Cancer Cell* **11**, 407–20 (2007).
78. Gordan, J. D. *et al.* HIF- α effects on c-Myc distinguish two subtypes of sporadic VHL-deficient clear cell renal carcinoma. *Cancer Cell* **14**, 435–46 (2008).
79. Luo, W. *et al.* Pyruvate kinase M2 is a PHD3-stimulated coactivator for hypoxia-inducible factor 1. *Cell* **145**, 732–44 (2011).
80. Lee, J. S. *et al.* Hypoxia-induced methylation of a pontin chromatin remodeling factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 13510–5 (2011).
81. Luo, W., Chang, R., Zhong, J., Pandey, A. & Semenza, G. L. Histone demethylase JMJD2C is a coactivator for hypoxia-inducible factor 1 that is required for breast cancer progression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, E3367-76 (2012).
82. Pollak, M. Potential applications for biguanides in oncology. *J. Clin. Invest.* **123**, 3693–700 (2013).

83. Sun, S. *et al.* Arctigenin suppresses unfolded protein response and sensitizes glucose deprivation-mediated cytotoxicity of cancer cells. *Planta Med.* **77**, 141–5 (2011).
84. Lin, X. *et al.* A chemical genomics screen highlights the essential role of mitochondria in HIF-1 regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 174–9 (2008).
85. Chang, E. *et al.* 18F-FAZA PET imaging response tracks the reoxygenation of tumors in mice upon treatment with the mitochondrial complex I inhibitor BAY 87-2243. *Clin. Cancer Res.* **21**, 335–46 (2015).
86. Ellinghaus, P. *et al.* BAY 87-2243, a highly potent and selective inhibitor of hypoxia-induced gene activation has antitumor activities by inhibition of mitochondrial complex I. *Cancer Med.* **2**, 611–24 (2013).
87. Li, H. *et al.* A feedback loop between the androgen receptor and a NEDD4-binding protein, PMEPA1, in prostate cancer cells. *J. Biol. Chem.* **283**, 28988–95 (2008).
88. Nakano, N. *et al.* Requirement of TCF7L2 for TGF-beta-dependent transcriptional activation of the TMEPAI gene. *J. Biol. Chem.* **285**, 38023–33 (2010).
89. Ikushima, H. & Miyazono, K. Cellular context-dependent “colors” of transforming growth factor-beta signaling. *Cancer Sci.* **101**, 306–12 (2010).
90. Thiery, J. P. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat. Rev. Cancer* **2**, 442–54 (2002).
91. Yang, M.-H. *et al.* Direct regulation of TWIST by HIF-1alpha promotes metastasis. *Nat. Cell Biol.* **10**, 295–305 (2008).
92. Sánchez-Elsner, T. *et al.* Synergistic cooperation between hypoxia and transforming growth factor-beta pathways on human vascular endothelial growth factor gene expression. *J. Biol. Chem.* **276**, 38527–35 (2001).

93. Walker, M. G., Volkmuth, W., Sprinzak, E., Hodgson, D. & Klingler, T. Prediction of gene function by genome-scale expression analysis: prostate cancer-associated genes. *Genome Res.* **9**, 1198–203 (1999).
94. Fehrmann, R. S. N. *et al.* Gene expression analysis identifies global gene dosage sensitivity in cancer. *Nat. Genet.* **47**, 115–125 (2015).
95. Liberzon, A. *et al.* The Molecular Signatures Database (MSigDB) hallmark gene set collection. *Cell Syst.* **1**, 417–425 (2015).
96. Suzuki, H., Tomida, a & Tsuruo, T. Dephosphorylated hypoxia-inducible factor 1alpha as a mediator of p53-dependent apoptosis during hypoxia. *Oncogene* **20**, 5779–5788 (2001).
97. Inman, G. J. *et al.* SB-431542 is a potent and specific inhibitor of transforming growth factor-beta superfamily type I activin receptor-like kinase (ALK) receptors ALK4, ALK5, and ALK7. *Mol. Pharmacol.* **62**, 65–74 (2002).
98. López-Novoa, J. M. & Nieto, M. A. Inflammation and EMT: an alliance towards organ fibrosis and cancer progression. *EMBO Mol. Med.* **1**, 303–14 (2009).
99. Semenza, G. L. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* **3**, 721–32 (2003).
100. Bierie, B. & Moses, H. L. Tumour microenvironment: TGFbeta: the molecular Jekyll and Hyde of cancer. *Nat. Rev. Cancer* **6**, 506–20 (2006).
101. Pardali, E., Goumans, M.-J. & ten Dijke, P. Signaling by members of the TGF-beta family in vascular morphogenesis and disease. *Trends Cell Biol.* **20**, 556–67 (2010).
102. Lindsey, S. & Langhans, S. A. Crosstalk of Oncogenic Signaling Pathways during Epithelial-Mesenchymal Transition. *Front. Oncol.* **4**, 358 (2014).
103. Singha, P. K., Yeh, I.-T., Venkatachalam, M. A. & Saikumar, P. Transforming growth factor-beta

- (TGF-beta)-inducible gene TMEPAI converts TGF-beta from a tumor suppressor to a tumor promoter in breast cancer. *Cancer Res.* **70**, 6377–83 (2010).
104. Horii, K. *et al.* Androgen-dependent gene expression of prostate-specific antigen is enhanced synergistically by hypoxia in human prostate cancer cells. *Mol. Cancer Res.* **5**, 383–91 (2007).
 105. Fournier, P. G. J. *et al.* The TGF- β Signaling Regulator PMEPA1 Suppresses Prostate Cancer Metastases to Bone. *Cancer Cell* **27**, 809–821 (2015).
 106. Yang, G. & Yang, X. Smad4-mediated TGF-beta signaling in tumorigenesis. *Int. J. Biol. Sci.* **6**, 1–8 (2010).
 107. Pholnukulkit, P., Sonoyama, K. & Kawabata, J. Activin A induces phosphorylation of Smad2 but not complex formation of Smad2 with Smad4 in human colon cancer cell line HT-29. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **67**, 2042–4 (2003).
 108. Woodford-Richens, K. L. *et al.* SMAD4 mutations in colorectal cancer probably occur before chromosomal instability, but after divergence of the microsatellite instability pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 9719–23 (2001).
 109. Papageorgis, P. *et al.* Smad4 inactivation promotes malignancy and drug resistance of colon cancer. *Cancer Res.* **71**, 998–1008 (2011).
 110. Hu, Y. *et al.* TMEPAI regulates EMT in lung cancer cells by modulating the ROS and IRS-1 signaling pathways. *Carcinogenesis* **34**, 1764–72 (2013).
 111. Kanehisa, M. & Goto, S. KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Res.* **28**, 27–30 (2000).
 112. Ashburner, M. *et al.* Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nat. Genet.* **25**, 25–9 (2000).

113. Ushijima, M. *et al.* Development of a gene expression database and related analysis programs for evaluation of anticancer compounds. *Cancer Sci.* **104**, 360–368 (2013).
114. Mashima, T. *et al.* Comprehensive transcriptomic analysis of molecularly targeted drugs in cancer for target pathway evaluation. *Cancer Sci.* **106**, 909–920 (2015).
115. Duan, Q. *et al.* LINCS Canvas Browser: interactive web app to query, browse and interrogate LINCS L1000 gene expression signatures. *Nucleic Acids Res.* **42**, W449–W460 (2014).
116. Subramanian, A. *et al.* A Next Generation Connectivity Map: L1000 Platform and the First 1,000,000 Profiles. *Cell* **171**, 1437–1452.e17 (2017).
117. Xing, L. *et al.* LTMap: a web server for assessing the potential liver toxicity by genome-wide transcriptional expression data. *J. Appl. Toxicol.* **34**, 805–9 (2014).
118. Toyoshiba, H., Sawada, H., Naeshiro, I. & Horinouchi, A. Similar compounds searching system by using the gene expression microarray database. *Toxicol. Lett.* **186**, 52–7 (2009).
119. Stockwell, S. R. *et al.* Mechanism-Based Screen for G1/S Checkpoint Activators Identifies a Selective Activator of EIF2AK3/PERK Signalling. *PLoS One* **7**, e28568 (2012).
120. Gautier, L., Cope, L., Bolstad, B. M. & Irizarry, R. A. affy--analysis of Affymetrix GeneChip data at the probe level. *Bioinformatics* **20**, 307–15 (2004).
121. Robin, X. *et al.* pROC: an open-source package for R and S+ to analyze and compare ROC curves. *BMC Bioinformatics* **12**, 77 (2011).
122. Youden, W. J. Index for rating diagnostic tests. *Cancer* **3**, 32–35 (1950).
123. Kleinberg, J. M. & M., J. Authoritative sources in a hyperlinked environment. *J. ACM* **46**, 604–632 (1999).
124. Csardi, G. & Nepusz, T. The igraph software package for complex network research. *InterJournal*

Complex Sy, 1695 (2006).

125. Harrell, F. E., Califf, R. M., Pryor, D. B., Lee, K. L. & Rosati, R. A. Evaluating the yield of medical tests. *JAMA* **247**, 2543–6 (1982).
126. Saada, A. *et al.* C6ORF66 Is an Assembly Factor of Mitochondrial Complex I. *Am. J. Hum. Genet.* **82**, 32–38 (2008).
127. Yeung, K. Y. *et al.* Construction of regulatory networks using expression time-series data of a genotyped population. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108**, 19436–19441 (2011).
128. Venkatesan, A. *et al.* Finding gene regulatory network candidates using the gene expression knowledge base. *BMC Bioinformatics* **15**, 386 (2014).
129. Li, G. *et al.* miRTex: A Text Mining System for miRNA-Gene Relation Extraction. *PLOS Comput. Biol.* **11**, e1004391 (2015).
130. Jensen, L. J., Saric, J. & Bork, P. Literature mining for the biologist: from information retrieval to biological discovery. *Nat. Rev. Genet.* **7**, 119–129 (2006).
131. Woo, J. H. *et al.* Elucidating Compound Mechanism of Action by Network Perturbation Analysis. *Cell* **162**, 441–451 (2015).
132. Chen, Y., Li, Y., Narayan, R., Subramanian, A. & Xie, X. Gene expression inference with deep learning. *Bioinformatics* **32**, 1832–9 (2016).
133. Arbiser, J. L., Arbiser, Z. K. & Majzoub, J. A. Regulation of gene expression in choriocarcinoma by methotrexate and hydroxyurea. *Endocrinology* **128**, 972–8 (1991).
134. Gong, H.-T., Sun, L., Ren, X.-J., Liu, L. & Han, X.-F. [Influence of gemcitabine on expression of C-myc gene and its apoptosis-inducing effect on HL-60 cells]. *Zhongguo shi yan xue ye xue za zhi* **18**, 317–20 (2010).

135. Liu, S.-Q., Yu, J.-P., Yu, H.-G., Lv, P. & Chen, H. Activation of Akt and ERK signalling pathways induced by etoposide confer chemoresistance in gastric cancer cells. *Dig. Liver Dis.* **38**, 310–8 (2006).
136. Dong, J., Naito, M. & Tsuruo, T. c-Myc plays a role in cellular susceptibility to death receptor-mediated and chemotherapy-induced apoptosis in human monocytic leukemia U937 cells. *Oncogene* **15**, 639–47 (1997).
137. Horiguchi-Yamada, J. *et al.* DNA topoisomerase II inhibitor, etoposide, induces p21WAF1/CIP1 through down-regulation of c-Myc in K562 cells. *Anticancer Res.* **22**, 3827–32
138. Zhang, X., Ge, Y.-L. & Tian, R.-H. The knockdown of c-myc expression by RNAi inhibits cell proliferation in human colon cancer HT-29 cells in vitro and in vivo. *Cell. Mol. Biol. Lett.* **14**, 305–18 (2009).
139. Baertling, F. *et al.* NDUFAF4 variants are associated with Leigh syndrome and cause a specific mitochondrial complex I assembly defect. *Eur. J. Hum. Genet.* **25**, 1273–1277 (2017).
140. Karp, C. M., Shukla, M. N., Buckley, D. J. & Buckley, A. R. HRPAP20: a novel calmodulin-binding protein that increases breast cancer cell invasion. *Oncogene* **26**, 1780–8 (2007).

謝辞

本研究は全て、(公財)がん研究会 がん化学療法センター ゲノム研究部の富田章弘部長(東京大学大学院新領域創成科学研究科 客員教授)の下で御指導・御鞭撻を賜り、遂行されました。現在の研究者としての私があるのも、先生のおかげです。この場を借りて、深く感謝の意を表します。

東京大学大学院 新領域創成科学研究科の伊藤耕一先生におかれましては、本審査をうけるにあたり専攻への紹介や各種手続きの面で非常にお世話になりました。心より感謝申し上げます。

東京大学大学院 新領域創成科学研究科の菅野純夫先生、松田浩一先生、古川洋一先生、ならびに東京大学大学院工学系研究科の宮田完二郎先生におかれましては、本論文執筆にあたり、審査委員として貴重なアドバイスを頂きました。深く御礼申し上げます。

出版済みの投稿論文の共著者である、(公財)がん研究会 がん化学療法センター ゲノム研究部の櫻井純子様、塚原里美様、谷優理様、同 基礎研究部の佐藤重男様、同 ゲノム研究部 元職員の芳賀直実様、古野亜紀様のご支援なしには、本論文の完成には至ることができませんでした。長きにわたってご協力いただき、心より感謝申し上げます。

第3章の実験的評価においては、(公財)がん研究会 がん化学療法センター ゲノム研究部の岡本有加様のご協力もいただき、進めることができました。深く感謝いたします。

最後に、長年にわたって様々な面で支えて下さった家族の皆に、心よりの感謝を申し上げます。