

- 2094.
- 3) Serizawa, S., Miyamichi, K., & Sakano, H. (2004) *Trends Genet.*, **20**, 648-653.
 - 4) Mombaerts, P., Wang, F., Dulac, C., Chao, S.K., Nemes, A., Mendelsohn, M., Edmondson, J., & Axel, R. (1996) *Cell*, **87**, 675-686.
 - 5) Imai, T. & Sakano, H. (2007) *Curr. Opin. Neurobiol.*, **17**, 507-515.
 - 6) Malnic, B., Hirono, J., Sato, T., & Buck, L.B. (1999) *Cell*, **96**, 713-723.
 - 7) Mori, K., Takahashi, Y.K., Igarashi, K.M., & Yamaguchi, M. (2006) *Physiol. Rev.*, **86**, 409-433.
 - 8) Kobayakawa, K., Kobayakawa, R., Matsumoto, H., Oka, Y., Imai, T., Ikawa, M., Okabe, M., Ikeda, T., Itoharu, S., Kikusui, T., Mori, K., & Sakano, H. (2007) *Nature*, **450**, 503-508.
 - 9) Matsumoto, H., Kobayakawa, K., Kobayakawa, R., Tashiro, T., Mori, K., Sakano, H., & Mori, K. (2010) *J. Neurophysiol.*, **103**, 3490-3500.
 - 10) Fendt, M. & Endres, T. (2008) *Neurosci. Biobehav. Rev.*, **32**, 1259-1266.

小早川 高, 小早川 令子
(大阪バイオサイエンス研究所)

Identification of the neuronal circuits to control odor-evoked innate fear behaviors

Ko Kobayakawa and Reiko Kobayakawa (Osaka Bioscience Institute, 6-2-4 Furue-dai, Suita-si, Osaka 565-0874, Japan)

腫瘍進展を抑える内在性低酸素応答抑制因子 HIF-3 α

1. はじめに

がん細胞が異常増殖すると、血管新生が増殖に見合わず、腫瘍組織内部には酸素が届きにくくなり、低酸素領域が生じる。また、血管新生が起こった際もその血管網は無秩序で、脆弱であり、腫瘍内部の細胞は低酸素となりやすい。がん細胞はこの低酸素という劣悪な環境下で生存しさらに成育するために、様々な遺伝子発現のスイッチをオンとし、低酸素状態からの脱出あるいは低酸素状態への適応を試みようとする。ホスホグリセリン酸キナーゼ1 (PGK1) などの解糖系酵素やグルコースの取り込みを担うグルコーストランスポーター (GLUT) の発現誘導により、酸化的リン酸化による ATP 産生に代わり、解糖によるエネルギー産生を上昇させたり、血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) を発現し血管新生を促したりするのである。さらに、低酸素に曝されたがん細胞内では、死から逃れるた

めに、アポトーシスからの回避や遺伝子変異を誘導する遺伝子の発現もうながされることが知られている¹⁾。

がん細胞内で低酸素に反応しこれらの遺伝子を発現誘導する転写因子が、低酸素応答性転写因子 HIF (hypoxia-inducible factor) である。本レビューでは、がんの増殖・進展と HIF との関連について紹介した後、私たちが内在性 HIF 抑制因子として機能することを見出した HIF のアイソフォームの一つ、HIF-3 α の性状および機能について概説したい。

2. がんの増殖・進展と HIF の活性化

HIF は、いずれも bHLH (basic helix-loop-helix)-PAS (Per-ARNT-Sim) ファミリーに属する α および β サブユニットからなるヘテロ二量体である。この二つのサブユニットのうち、 β サブユニット (HIF-1 β) はダイオキシシン受容体 (AhR) とヘテロ二量体を形成する AhR nuclear translocator (ARNT) と同一分子であり、一方、 α サブユニットとしてはこれまで HIF-1 α と HIF-2 α の二つのアイソフォームが知られている (後述するように、HIF-3 α は HIF-1 α と HIF-2 α とはかなり性質が異なる)。ARNT は酸素濃度によらず構成的に核内に存在するが、正常細胞では α サブユニットは通常酸素濃度下、プロテアソーム依存的に分解されほとんど細胞内に存在しない。酸素濃度の低下に伴い α サブユニットの分解が抑制され核内に移行し、ARNT とヘテロ二量体を形成した後、標的遺伝子の低酸素応答配列 (HRE) 5'-RCGTG-3' に結合し、HIF は転写因子として機能する。通常酸素濃度下では、 α サブユニットの oxygen-dependent degradation domain (ODD) に含まれる 2 個のプロリン残基が PHD (prolyl hydroxylase domain) と呼ばれるプロリン水酸化酵素により水酸化されており、この水酸化プロリンを von Hippel-Lindau (VHL) がん抑制遺伝子産物の E3 ユビキチンリガーゼが認識することで、 α サブユニットは速やかにユビキチン化され、プロテアソームによって分解される。また、C 末端近傍の転写活性化ドメイン (CAD: C-terminal transactivation domain) にあるアスパラギン残基が FIH-1 (factor inhibiting HIF-1) と呼ばれる酵素により水酸化され、核内における転写共役因子 CBP/p300 との複合体形成が抑えられることで転写活性が抑制されている。低酸素下ではこの二つの制御がいずれも解除されることで、HIF はその転写活性を示すことが可能となるのである (図 1 には、HIF の活性化機構の概略を示す)。

低酸素に曝されたがん細胞では、この HIF- α サブユニットの安定化が持続しており、標的配列 HRE をもつ

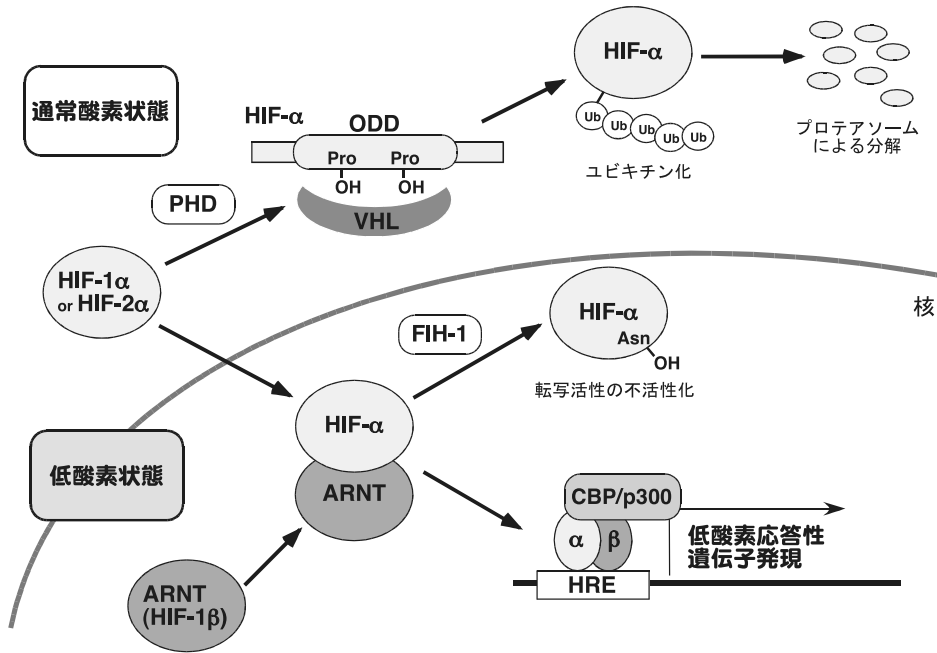


図1 HIFの活性化機構の概略
詳細は本文参照.

種々の遺伝子の転写が絶えず亢進していると考えられる。実際、多くのヒト腫瘍組織で、HIF-1αとHIF-2αが高いレベルで発現していることが報告されている。さらに私たちは、培養がん細胞にHIF-1αを高発現させた後ヌードマウスに移植すると、腫瘍形成能が増加することを明らかにしている²⁾。また、がん細胞では、この低酸素によるHIF-αサブユニットの安定化以外の経路によってもHIF-αサブユニットの高発現が引き起こされることが示されている。HER2などの受容体にリガンドが結合するとPI3キナーゼ-Akt経路やMAPキナーゼ経路が活性化され、mTOR(mammalian target of rapamycin)を介しHIF-1αの翻訳が促進される。さらに、VHL遺伝子などのがん抑制遺伝子の変異やがんウィルスの感染が生じると、通常酸素下においてもαサブユニットの安定化や生合成の上昇がうながされ、HIF-1αとHIF-2αの蓄積に拍車がかかることが明らかとなっている。

がん細胞に高蓄積したHIFは、標的配列HREに結合し種々の腫瘍関連遺伝子の転写を上昇させるのみならず、他の転写因子の活性にも影響を及ぼし、その結果としてもがんの増殖や進展に関わることが示されている。例えば、HIF-1αはMycのSp1との相互作用を抑えることで、DNA修復酵素の発現を低下させ、遺伝子の不安定性を増加させ

ることが報告されている。一方、私たちは、アンドロゲン依存性の前立腺がん細胞では、HIF-1αがアンドロゲン受容体と複合体を形成することで、腫瘍の浸潤に関わるアンドロゲン依存性のPSA(prostate-specific antigen)遺伝子の発現を上昇させることを明らかにしている³⁾。

3. 内在性HIF抑制因子としてのHIF-3αおよびそのスプライスバリエーション

HIF-3αはHIF-2αよりもさらに遅れて発見されたαサブユニットの第3のアイソフォームである⁴⁾。HIF-3αも、HIF-1αやHIF-2α同様に、ARNT(HIF-1β)とヘテロダイマーを形成し、DNA上のHREに結合することによって種々の遺伝子の転写を活性化する。このため、当初はHIF-1αやHIF-2αの機能を補う因子であると考えられていたが、私たちはHIF-3αがHIF-1αやHIF-2αの転写活性抑制因子として働く可能性を見出した⁵⁾。HIF-1αやHIF-2αの分子内にはCADとNAD(N-terminal transactivation domain)と呼ばれる転写活性化ドメインが二つ存在するが、HIF-3αにはNADしか存在しない(図2)。このため、HIF-3αとARNTからなるヘテロダイマーは転写活性が弱く、ARNTが十分に存在しない条件下では、HIF-1αやHIF-2αとARNTを奪い合い、結果としてHIF-1αやHIF-2αを介

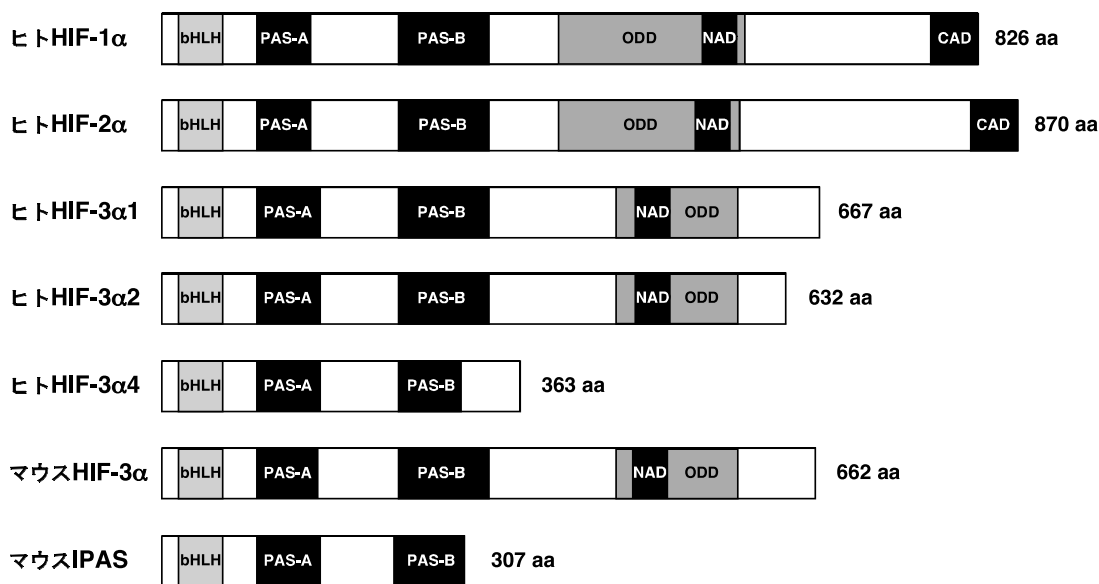


図2 HIF- α サブユニットの一次構造の模式図

図にはヒト HIF-1 α 、-2 α ならびにヒトおよびマウスの主な HIF-3 α バリエントの一次構造の模式図を示した。それぞれのカラムの右端の数字は各々の α サブユニットの構成アミノ酸数を示す。HIF- α サブユニットはいずれも bHLH (basic helix-loop-helix) と PAS (Per-ARNT-Sim) ドメイン (A ドメインと B ドメインから成る) を有し、これらのドメインを介し ARNT (HIF-1 β) とヘテロ二量体を形成し DNA に結合する。HIF-1 α と -2 α には、NAD (N-terminal transactivation domain) と CAD (C-terminal transactivation domain) の二つの転写活性化ドメインが存在するが、HIF-3 α とそのバリエントには NAD しか存在しないか、あるいはいずれも存在しない。ODD (oxygen-dependent degradation domain) を有する α サブユニットは酸素濃度依存的に分解される。

した遺伝子発現を抑制する作用を示す。

その後、マウス HIF-3 α のスプライスバリエントとして IPAS (inhibitory PAS domain protein) が発見された^{6,7)}。IPAS には NAD もなく、それ自体転写活性を示さない。IPAS は HIF-1 α との相互作用により DNA への結合を阻害し、HIF-1 の機能を抑制することが報告された。一方、私たちは、データベース検索により、ヒト HIF-3 α にも多くのスプライスバリエントが存在することを見出した⁸⁾。そこで、最初にクローン化したヒト HIF-3 α を HIF-3 α 1 と名付け、その他のバリエントを HIF-3 α 2~6 と名付けた (最近の報告では、さらに HIF-3 α 7~10 の存在が示唆されている⁹⁾)。これらのバリエントのうち、HIF-3 α 4 には NAD がなく、マウスの IPAS とスプライシングのされ方 (エキソンの使われ方) は異なるものの、最も IPAS に構造が類似している¹⁰⁾ (図2)。私たちはヒト腎臓および小脳より、それぞれ HIF-3 α 2、HIF-3 α 4 をクローン化し、これら二つのバリエントが HIF-3 α 1 同様、低酸素下における HRE を介する転写を抑制することを見出した (図3)。

4. HIF-3 α およびそのスプライスバリエントの発現と発現制御

通常酸素濃度においては、マウス HIF-3 α のスプライスバリエントである IPAS の発現はほとんどの組織で認められず、その発現は眼や小脳といった一部の組織に限られている。しかし、低酸素に曝されたマウスでは、心臓や肺においてその発現が誘導されることが示された^{6,7)}。さらに、IPAS 遺伝子のプロモーター解析により、IPAS 遺伝子プロモーター領域には HIF-1 が結合する HRE があり、この HRE を介し低酸素によりそのプロモーター活性が上昇することが報告された¹¹⁾。マウスにおいて、HIF-3 α とそのスプライスバリエントである IPAS は異なる第1エキソンより転写が開始され、遺伝子のプロモーター領域が異なる。私たちはマウス HIF-3 α についてそのプロモーター解析を行い、HIF-3 α 遺伝子のプロモーター活性も IPAS 遺伝子のプロモーター活性に比べると弱いものの低酸素により活性化されることを見出している¹²⁾。

さらに最近になり、ヒト HIF-3 α 2 および HIF-3 α 4 の発

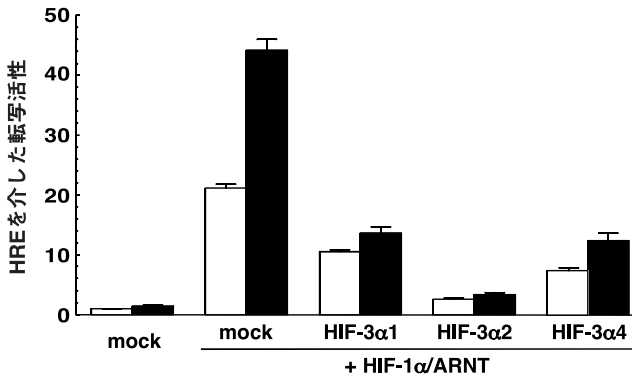


図3 HIF-3αの過剰発現による低酸素応答配列 (HRE) を介した遺伝子発現の抑制

HREを6個タンデムに結合したルシフェラーゼレポーター遺伝子、HIF-1αとARNTの発現ベクターとともに、COS-7細胞にHIF-3α1、-3α2、-3α4の各々の発現ベクターを導入した際のルシフェラーゼ活性を示した。レポーター遺伝子と空のベクター (mock) のみを導入した際の通常酸素濃度 (21%O₂) 下におけるルシフェラーゼ活性を1とし、白カラムは通常酸素濃度、黒カラムは低酸素濃度 (1%O₂) で細胞を培養した際の活性である。詳細な方法は文献5参照。

現も低酸素により誘導されることが明らかとなった^{9,13}。ヒトHIF-3α遺伝子の発現制御領域にも、HIF-1が結合するHREが存在し、このHREを介し低酸素に応答しHIF-3α遺伝子の転写が活性化される¹³。

5. HIF-3αを介した低酸素応答性遺伝子発現のネガティブフィードバック機構とその破綻

HIF-1およびHIF-2を介した低酸素応答性遺伝子発現を抑制する機能をもつHIF-3αの遺伝子発現が低酸素で誘導されることから、HIF-3αは低酸素応答性遺伝子発現のネガティブフィードバック機構を担うと考えられる。実際、HIF-3αの発現をノックアウトしたりノックダウンしたりすると、低酸素応答性遺伝子の発現が上昇することが最近になって見出された^{10,13,14}。図4には予想される低酸素応答性遺伝子発現のネガティブフィードバック機構を示した。

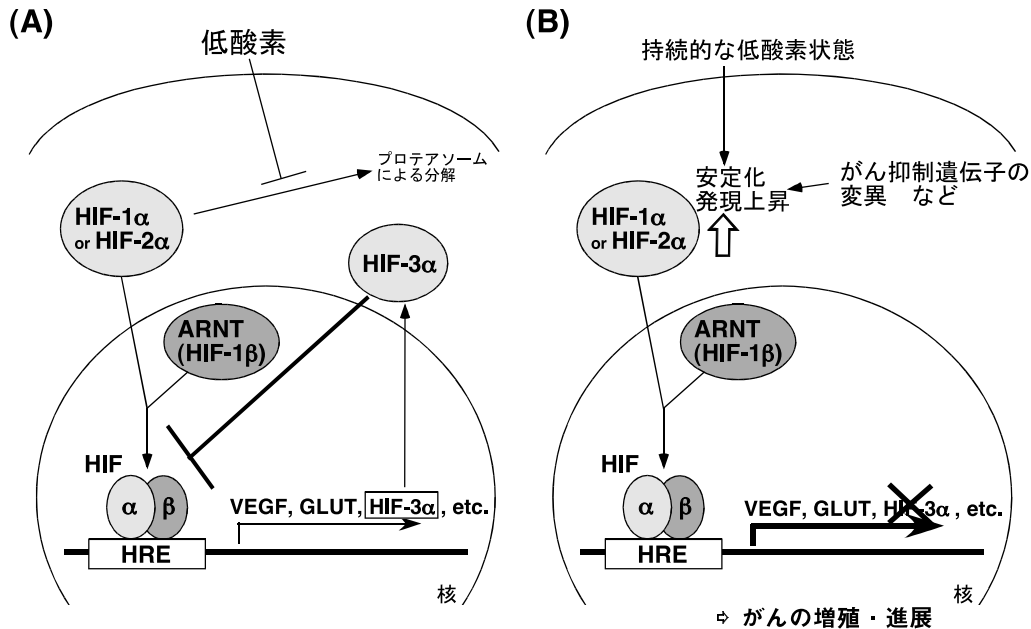


図4 HIF-3αを介した低酸素応答性遺伝子発現のネガティブフィードバック機構(A)とがん細胞におけるその破綻(B)

(A) 低酸素により安定化されたHIF-1αあるいは-2αは核内へ移行した後、ARNT (HIF-1β) とHIFヘテロ二量体を形成し、HREをもつ遺伝子の転写を活性化する。この際、HIFヘテロ二量体を介し、HIF-3αの発現誘導も促す。産生されたHIF-3αはHIFによる転写活性化を抑制することで、低酸素応答性遺伝子発現を収束させる。

(B) がん細胞ではHIF-1αあるいは-2αタンパク質の発現が亢進している上、本来HIFヘテロ二量体により発現誘導されるHIF-3αの発現が抑えられている。このため、ネガティブフィードバック機構が破綻しており、がんの増殖・進展に関わる低酸素応答性遺伝子の発現が高レベルに保たれている。逆に、このような細胞にHIF-3αを高発現する系が構築できれば、がんの増殖・悪性化の抑制につながる事が期待できる。

HIFを介した低酸素応答性遺伝子発現の亢進は、がんの増殖・進展につながるが、私たちは、一部の腎細胞がんでは内在性HIF抑制因子であるHIF-3 α 4の発現が低下していることを見出した¹⁰⁾。HIF-3 α 4の発現低下はVEGFなどの発現を上昇させ、がんの悪性化に関与すると予想される。がん細胞におけるHIF-3 α の発現低下の機構は不明であるが、Pasanenらは、HIF-3 α の発現が低いがん細胞の遺伝子を脱メチル化すると、HIF-3 α の発現が上昇することを報告している。遺伝子のメチル化がHIF-3 α の発現低下を生み、がんの増殖・進展に関与している可能性が考えられる(図4)。

さらに、私たちは、HIF-3 α を腫瘍内部に高発現すると、がんの増殖が抑えられることを明らかにした。腎細胞がん由来のVMRC細胞をヌードマウスに移植し、異種移植腫瘍(xenograft)を形成した後、形成された腫瘍内にセンダイウイルスの発現系を用いHIF-3 α 2遺伝子を導入すると、腫瘍増殖の著しい減少が観察された(投稿準備中)。私たちの共同研究者のMaynardらも同様に、ヌードマウスに786-O細胞を移植した際に形成される腫瘍の増殖が、HIF-3 α 4の過剰発現により抑えられることを見出している¹⁵⁾。HIF-3 α を腫瘍内部に高発現する系が構築できれば、新たな抗腫瘍療法の開発につながることを期待できる。

6. おわりに

HIF-3 α のノックアウトマウスでは、低酸素応答性遺伝子発現の亢進に加え、胎生期や新生児期における心臓や肺の発達に異常が見られた¹⁴⁾。心臓細胞やII型肺胞細胞の分化の過程で、HIF-3 α の発現誘導が観察されるという報告もある。一方、私たちは、HIF-3 α が脂肪細胞の分化の過程で発現誘導され、分化の調節因子として機能することを見出している¹²⁾。HIF-3 α のこれら細胞の分化における機能が、低酸素応答性遺伝子発現の抑制を介するものなのか否かは現時点では不明であるが、HIF-3 α は生体内で多機能分子として働いている可能性も考えられる。

HIF-3 α の多くのスプライスバリエーションの発現は通常酸素濃度ではほとんど見られない上に、低酸素によって誘導された後もその発現レベルは低く、その生体内機能の解析を困難にしている。また、最近になり、マウスおよびヒトの組織におけるスプライスバリエーションごとの発現についても徐々に明らかになりつつある^{9,13,14)}が、スプライシングの意義、その制御機構については不明のままである。低酸素は腫瘍だけでなく、虚血性心疾患など多くの疾患に関わることから、今後、内在性低酸素応答抑制因子HIF-3 α の解

析が進み、様々な疾病の新たな予防や治療につながることを期待される。

謝辞

本研究の多くは、北里大学・井村伸正名誉教授ならびに日本医科大学・秋元成太名誉教授のご指導のもと、北里大学薬学部公衆衛生学教室に配属された大学院生、卒業研究生とともに行われたものです。さらに本研究は、筆者の原が昭和大学に異動した後、故工藤一郎教授の暖かいご支援のもと、昭和大学薬学部衛生化学教室にて継続して行われました。関係した方々に深く感謝致します。

- 1) Semenza, G.L. (2010) *Oncogene*, 29, 625-634.
- 2) Kondo, Y., Hamada, J., Kobayashi, C., Nakamura, R., Suzuki, Y., Kimata, R., Nishimura, T., Kitagawa, T., Kunimoto, M., Imura, N., & Hara, S. (2005) *J. Urol.*, 173, 1762-1766.
- 3) Horii, K., Suzuki, Y., Kondo, Y., Akimoto, M., Nishimura, T., Yamabe, Y., Sakaue, M., Sano, T., Kitagawa, T., Himeno, S., Imura, N., & Hara, S. (2007) *Mol. Cancer Res.*, 5, 383-391.
- 4) Gu, Y.Z., Moran, S.M., Hogenesch, J.B., Wartman, L., & Bradfield, C.A. (1998) *Gene Expression*, 7, 205-213.
- 5) Hara, S., Hamada, J., Kobayashi, C., Kondo, Y., & Imura, N. (2001) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 287, 808-813.
- 6) Makino, Y., Cao, R., Svensson, K., Bertilsson, G., Asman, M., Tanaka, H., Cao, Y., Berkenstam, A., & Poellinger, L. (2001) *Nature*, 414, 550-554.
- 7) Makino, Y., Kanopka, A., Wilson, W.J., Tanaka, H., & Poellinger, L. (2002) *J. Biol. Chem.*, 277, 32405-32408.
- 8) Maynard, M. A., Qi, H., Chung, J., Lee, E. H. L., Kondo, Y., Hara, S., Conaway, R. C., Conaway, J. W., & Ohh, M. (2003) *J. Biol. Chem.*, 278, 11032-11040.
- 9) Pasanen, A., Heikkilä, M., Rautavuoma, K., Hirsilä, M., Kivirikko, K.I., & Myllyharju, J. (2010) *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 42, 1189-1200.
- 10) Maynard, M.A., Evans, A.J., Hosomi, T., Hara, S., Jewett, M. A. S., & Ohh, M. (2005) *FASEB J.*, 19, 1396-1406.
- 11) Makino, Y., Uenishi, R., Okamoto, K., Isoe, T., Hosono, O., Tanaka, H., Kanopka, A., Poellinger, L., Haneda, M., & Morimoto, C. (2007) *J. Biol. Chem.*, 282, 14073-14082.
- 12) Hatanaka, M., Shimba, S., Sakaue, M., Kondo, Y., Kagechika, H., Kokame, K., Miyata, T., & Hara, S. (2009) *Biol. Pharm. Bull.*, 32, 1166-1172.
- 13) Tanaka, T., Wiesener, M., Bernhardt, W., Eckardt, K.-U., & Warnecke, C. (2009) *Biochem. J.*, 424, 143-151.
- 14) Yamashita, T., Ohneda, O., Nagano, M., Iemitsu, M., Makino, Y., Tanaka, H., Miyauchi, T., Goto, K., Ohneda, K., Fujii-Kuriyama, Y., Poellinger, L., & Yamamoto, M. (2008) *Mol. Cell Biol.*, 28, 1285-1297.
- 15) Maynard, M.A., Evans, A.J., Shi, W., Kim, W.Y., Liu, F.-F., & Ohh, M. (2007) *Cell Cycle*, 6, 2810-2816.



原 俊太郎¹⁾, 近藤 幸尋²⁾
(¹⁾昭和大学薬学部, ²⁾日本医科大学)

Shuntaro Hara¹⁾ and Yukihiro Kondo²⁾ (¹⁾School of Pharmacy, Showa University, 1-5-8 Hatanodai, Shinagawa-ku, Tokyo 142-8555, Japan; ²⁾Nippon Medical School, 1-1-5 Sendagi, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8603, Japan)

Hypoxia-inducible factor-3 α as a negative regulator of tumorigenesis

