（報告様式４）

【課題管理番号 16cm0106221h0001】

平成 29 年　5 月 22 日

平 成 28 年 度　委 託 研 究 開 発 成 果 報 告 書

I.　基本情報

事　業　名：　（日本語）次世代がん医療創生研究事業
（英　語）Project for Cancer Research and Therapeutic Evolution

研究開発課題名：　（日本語）低 pH がん微小環境のネットワーク撃滅を実現する標的分子群の同定と治療法の開発
（英　語）Identification of extracellular acidic pH responsive genes and development of a novel anti-cancer treatment

研究開発担当者　（日本語）国立大学法人東京大学　先端科学技術研究センター　特任助教　大澤　毅
所属 役職 氏名：　（英　語）Research Center for Advanced Science and Technology, The University of Tokyo, Assistant Professor, Tsuyoshi Osawa

実　施　期　間：　平成 28 年 9 月 1 日　～　平成 29 年 3 月 31 日

分担研究開発課題名：　（日本語）ネットワーク統合解析と統計・情報解析
（英　語）Bioinformatics and big data integration analysis

研究開発分担者　（日本語）国立大学法人名古屋大学　大学院医学系研究科　特任准教授　島村　徹平
所属 役職 氏名：　（英　語）Graduate School of Medicine, Nagoya University, Associate Professor, Teppei Shimamura

分担研究開発課題名：　（日本語）トランスクリプトーム解析、核内転写制御機構の解析
（英　語）Analysis of Transcriptional Regulations

研究開発分担者　（日本語）国立大学法人東京大学　先端科学技術研究センター　特任教授　田中　十志也
所属 役職 氏名：　（英　語）Research Center for Advanced Science and Technology, The University of Tokyo, Professor, Toshiya Tanaka

分担研究開発課題名：　（日本語）エピゲノム解析とゲノム編集による変異株作成
（英　語）Epigenetic Analysis and Genome Editing

研究開発分担者　（日本語）国立大学法人東京大学　先端科学技術研究センター
特任研究員　野中　綾
所属 役職 氏名：（英　語）Research Center for Advanced Science and Technology, The University of Tokyo, Researcher, Aya Nonaka

II. 成果の概要（総括研究報告）

和文

平成２８年度は、研究計画書に記載した下記の６項目について検討を行った。

１−１．システム生物学的アプローチによるオミクス統合解析

研究開発項目１−１では、島村徹平准教授（名古屋大学大学院医学系研究科）のグループとともに、低 pH 環境で培養したがん細胞株における遺伝子発現、エピゲノムプロファイル（研究開発項目１−２）、メタボロームプロファイルから（研究開発項目１−３）、低 pH 培養における転写制御遺伝子ネットワークを再構築し低 pH の転写制御因子として SREBP2 を同定した。さらに、低 pH 環境で培養したがん細胞株におけるメタボローム解析から低 pH において新しい代謝経路ががん増殖に寄与することを同定した。

１−２．低 pH におけるエピゲノムプロファイルの解析

研究開発項目１−２では、野中綾研究員（東京大学先端科学技術研究センター）とともに、低 pH 環境で培養したがん細胞株から遺伝子発現情報およびエピゲノムプロファイルを取得し、コントロール細胞と比較することで微小環境刺激に伴うエピゲノム変化を同定した。遺伝子発現情報は RNA-seq、活性化型プロモーター型ヒストン修飾（ヒストン H3 リジン 4 トリメチル化）、活性化エンハンサー型ヒストン修飾（ヒストン H3 リジン 27 アセチル化）の ChIP-seq、オープンクロマチン領域は FAIRE-seq によって解析を行った。エピゲノム変化を生じた領域のモチーフ解析から鍵となる転写調節因子候補として SREBP2、HNF、XBP を同定した。

１−３．低pHにおけるメタボロームプロファイルの解析

研究開発項目１−３では、低 pH 環境で培養したがん細胞株における**メタボローム解析**を行い、コントロール細胞と比較することで微小環境刺激に伴う代謝変化の同定を試みた。代謝物情報は（研究開発項目１−２）の発現解析、活性化型ヒストン修飾、活性化エンハンサー型ヒストン修飾、オープンクロマチン領域との統合解析を行い、低 pH がん微小環境の鍵となる代謝経路として**新しい代謝経路**を同定した。

２−１．低 pH 培養法の樹立

腫瘍内ではpH6.8まで低下するという報告をもとに、低pH培養条件としてpH6.8, 通常培養条件としてpH7.4を設定し、**ヘンダーソン・ハッセルバルヒの式**及び**実測値**を用いて、CO_2 5%下、37度で低pHを維持できる培地の調整を試みた。低pH培養培地作成に用いる緩衝剤として、通常培養培地に様々な**緩衝剤**及び**代謝物**①$NaHCO_3$、②HCl、③Lactateの添加量を調節する事で培養培地のpHを6.8に調整し、CO_2インキュベーター内で24〜72時間細胞培養した後のpHを測定し、少なくとも２４時間安定的に低pHを持続することのできる培養系を樹立した。また、**低pHマーカー**として報告のあるVEGFやIL-8のみならず、本研究（研究開発項目２−３）で新たに見出したIDI1,MSMO1の発現を指標として低pHの安定性が確認できた。

２−２．低pHに誘導される転写因子の解明

島村徹平准教授（名古屋大学大学院医学系研究科)、田中十志也教授（東京大学先端科学技術研究センター）のグループとともに、研究開発項目２−1 で樹立した低 pH 培養系を用いて、**低 pH** で誘導される**転写因子**（**pHIF**）の同定を試みた。がん細胞を通常 pH7.4 培養条件、及び、低 pH6.8 培養条件で培養し、RNA-Seq を用いた遺伝子発現解析を行い、**Ingenuity Pathway Analysis**（**IPA**)を用いて解析、さらに、FAIRE-Seq を用いた**転写モチーフ解析**から、低 pH における上流転写因子として **SREBP、HNF、XBP** が予測された。予測された転写因子を siRNA の抑制系を用いて、低 pH で発現上昇する標的因子の発現に影響を確認し、確かに **SREBP2、HNF、XBP** が**低 pH の標的遺伝子群の発現を制御**していることを見出した。

２−３．pHIF の標的遺伝子の同定

野中綾研究員（東京大学先端科学技術研究センター）とともに、低 pH 培養において誘導される転写因子候補(**SREBP2**)をノックダウンし、低 pH 培養条件下のがん悪性化形質獲得に関わる SREBP2 の標的因子の同定を試みた。さらに、低 pH 条件下のがん細胞における**抗 SREBP 抗体を用いた ChIP-seq** に成功し、ゲノム上に存在する SREBP2 の結合領域を同定した。**RNA-seq** のデータと付き合わせ直接の標的遺伝子の同定を時系列の抗 SREBP2 の ChIP-PCR から同定し、**コレステロール合成経路**の酵素群 **IDI1** や **MSMO1** は早期誘導型であり、一方、**酢酸代謝**における酵素 **ACSS２**は後期誘導型であることを見出した。

上記の結果から本研究開発の平成２８年度の研究項目に関して概ね順調に進んでおり、平成２８年度の目標は到達できたと考えている。また、本研究成果の一部は論文報告した（Kondo et al., 2017 Cell Reports)。

英文

In the Year of 2016, we have studies following 6 research topics described in our Research Proposal.

１−１．Systems biological integration of multi-omics analysis

In research topic１−１, systems biological approach using the integration of transcriptome, epigenome (Research Topic 1-2) and metabolome (Research Topic 1-3) profiles obtained from the cancer cells exposed to an extracellular acidic pH. We have successfully reconstructed transcriptional network system under acidic pH, and revealed SREBP2 as a key transcriptional regulator in cancer cells under extracellular acidic pH.

１−２．Epigenetic analysis of cancer cells under acidic pH

In research topic 1-2, we obtained transcriprtome profiles by RNA-Seq, epigenetic profiles of active-promoter histone mark (H3K4me3) and active enhancer mark (H3K27Ac) by ChIP-Seq and open-chromatin regions by FAIRE-Seq analysis in cancer cells exposed to the extracellular acidic pH. We found that transcriptional pathway and motif analysis revealed that SREBP2, HNF and XBP and possible candidates for transcriptional regulators in cancer cells under acidic pH.

１−３．Metabolome analysis of cancer cells under acidic pH

In research topic 1-3, we conducted metabolome analysis of cancer cells under acidic pH. Several metabolic pathways were correlated with the transcriptome, epigenome and open chromatin profiles

obtained in the Research Topic 1-2. We found novel pH specific metabolic pathways in cancer cells under acidic pH.

2－1. Establishment of extracellular acidic pH culture system

We established a simple *in vitro* culture model to maintain an acidic pHe and examine the role of pHe in cancer cells. Using this method, we can maintain an acidic culture medium to a pHe of 6.8 at 37 C containing 5% CO2 using either reduced bicarbonate or increased HCl/lactate concentrations in the culture medium. The medium pH was sustained for at least 24 hr and gradually decreased by 72 hr in cancer cells. We found that mRNA expressions of IDI1 and MSMO1 (Research Topic 2-3) were highly up-regulated in addition to VEGF, IL-8.

2－2. Identification of acidic pH induced transcription factor

Using the acidic pH culture system established in Research Topic 2-1, we investigated the possible acidic pH inducible transcriptional factors (pHIFs). We identified SREBP2, HNF and XBP can be key transcriptional regulators under aicidic pH using Ingenuity Pathway Analysis (IPA), in addition to the motif analysis using open chromatin regions by FAIRE-Seq. We also confirmed up-regulation of down stream genes of SREBP2, HNF and XBP.

2－3. Identification of target genes of pH inducible transcription factors

We identified SREBP2 target acidic pH induced genes by inhibition of SREBP and SREBP2 ChIP-Seq. Integration of ChIP-Seq, RNA-Seq data we found that SREBP2 regulated cholesterol biosynthetic genes, such as MSMO1 and IDI1 in early phase, and also ACSS2 in acetic acid metabolism in late phase in cancer cells following exposure to acidic pH.

Together, our research has been well conduced as planed in our research proposal. We reported part of our achievements in the research paper (Kondo *et al.* Cell Reports, 2017).

III. 成果の外部への発表

（１）学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 0 件、国際誌 3 件）

1. Yamamoto S, Muramatsu M, Azuma E, Ikutani M, Nagai Y, Sagara H, Koo BN, Kita S, O'Donnell E, **Osawa T**, Takahashi H, Takano K, Dohmoto M, Sugimori M, Usui I, Watanabe Y, Hatakeyama N, Iwamoto T, Komuro I, Takatsu K, Tobe K, Niida S, Matsuda N, Shibuya M, Sasahara M. A subset of cerebrovascular pericytes originates from mature macrophages in the very early phase of vascular development in CNS. ***Scientific Reports***. In press.
2. Kanki Y, Nakaki R, Shimamura T, Matsunaga T, Yamamizu K, Katayama S, Suehiro J, **Osawa T**, Aburatani H, Kodama T, Wada Y, Yamashita J and Minami T, Dynamically and epigenetically coordinated GATA/ETS/SOX transcription factor expression is indispensable for endothelial cell differentiation. ***Nucleic Acids Research***. 2017, 45, 4344-58.

3. Kondo A, Yamamoto S, Nakaki R, Shimamura T, Hamakubo T, Sakai J, Kodama T, Yoshida T, Aburatani H* and **Osawa T***. Extracellular Acidic pH Activates the Sterol Regulatory Element-binding Protein 2 to Promote Tumor Progression. ***Cell Reports***. 2017, 18, 2228-42.

（２）学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. がん代謝と血管生物学の融合を目指して、口頭、大澤毅ら、第３回血管生物若手研究会３月３日～４日、国内
2. 栄養飢餓におけるがんのトランスメタボロミクス、口頭、大澤毅、第３９回日本分子生物学会、１１月３０日～１２月２日、国内.
3. Phosphoethanolamine Stimulates Cancer Cell Toerance against Nutrient Starvation through Alteration of PE Biosynthesis, 大澤毅ら、第７５回日本癌学会　２０１６年１０月６日～８日、国内.
4. マルチオミクスが解き明かす腫瘍微小環境とがん代謝、口頭、大澤毅、第８９回日本生化学会大会、2016 年９月２５日～２７日、国内.
5. がん微小環境と代謝エピエノム制御の研究、口頭、大澤毅、第２５回日本がん転移学会、2016 年７月２0 日～２２日、国内.
6. 腫瘍微小環境から捉えたがんの代謝戦略、口頭、大澤毅、第４回がんと代謝研究会、2016 年７月７日～８日、国内.

（３）「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

該当なし

（４）特許出願

該当なし