

令和元年6月19日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08628

研究課題名(和文) HTLV-1細胞癌化を媒介する活性酸素産生遺伝子Nox5 のシグナル伝達機構

研究課題名(英文) The study on the regulatory mechanism of NADPH oxidase (Nox) 5alpha and 4 redox signaling involved in cancer development

研究代表者

鎌田 徹 (Kamata, Tohru)

宮崎大学・フロンティア科学実験総合センター・客員研究員

研究者番号：40056304

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト発がんにおけるNADPH oxidase(Nox)ファミリーの産生する活性酸素(ROS)によるシグナル伝達経路を追究した。その結果、Nox5alphaはhuman T-cell leukemia virus-type 1 (HTLV-1)癌化T-細胞において、protein tyrosine phosphatase PTP-1Bを標的とし、好気性グルコース、グルタミン代謝を調節してがん細胞の維持に寄与することを発見した。Nox4もすい臓がん細胞の同様な代謝調節を亢進してその増殖に寄与することを見出した。この成果はこれらのNox isoformががん治療の分子標的となる考えをさらに強化する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

正常細胞ではNADPH oxidase酵素(Nox5alpha, Nox4)から産生される活性酸素はシグナル分子として機能している。本研究で、Nox5alphaの活性酸素はリン酸化調節蛋白にシグナルを送ることを見出した。また、これらの活性酸素がHTLV-1感染白血病やすい臓がん細胞で過剰に産生されると情報伝達を攪乱し、グルコースやグルタミン代謝の代謝調節を亢進してがん細胞の異常増殖に寄与することを明らかにした。この発見には、がん化の情報伝達の調節機構のさらなる解明と、この酵素を分子標的とした新たながん治療薬の開発につながるという意義がある。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to investigate the signaling mechanism of NADPH oxidases (Noxs)-derived reactive oxygen species (ROS) that mediates cancer development. Our study revealed that Nox5alpha-generated H₂O₂ transmits signals to protein tyrosine phosphatase-1B through oxidation. Nox5alpha also promotes reprogramming of aerobic glycolysis and glutaminolysis in human T-cell leukemia virus type 1-transformed T-cells, thereby contributing to their growth. Similar results were obtained with Nox4, in which Nox4, coupled to oncogenic K-Ras, induced elevated aerobic glycolysis in pancreatic cancer cells, giving a growth advantage to the cells. Thus, these results support the notion that Nox-derived ROS play an important role in carcinogenesis and further strengthen the possibility of Nox5alpha and Nox4 as molecular targets in cancer treatment.

研究分野：分子腫瘍学

キーワード：NADPH oxidase(Nox) 分子腫瘍学 活性酸素 HTLV-1 すい臓がん

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞内 ROS (reactive oxygen species) の主要産生源である NADPH oxidase (Nox) ファミリー Nox1-5, Duox1,2 が発がん過程に寄与する知見が国際的に蓄積しつつある。我々は Nox1, Nox4, Nox5 の発現が大腸がん、すい臓がん、脳腫瘍、白血病、メラノーマを含む種々のヒトがん細胞で亢進しており、がん細胞の増殖、生存、浸潤に必須的役割を果たすことを明らかにしてきた (ref.1,2,3,4)。しかし、Nox ファミリーの ROS がセカンドメッセンジャーとして如何なるシグナル伝達経路を標的とするのかまだ不明な点が多い。さらに、がん細胞の生存・増殖には細胞内 ROS 濃度の低い還元的環境が重要であるという知見があり、高発現した Nox シグナルの役割はこれとどう調和するのかがもう一つの課題であった。

2. 研究の目的

当初、human T-cell leukemia virus-1 (HTLV-1) で癌化した T 細胞における Nox5 のシグナル伝達を研究対象として出発したが、その後、研究領域が拡大発展することになり、本研究では、HTLV-1/T 細胞だけでなく他の臓器がんにおける Nox ファミリーによる新たなシグナル伝達経路の解明もめざした。また、Noxs の産生した ROS によるシグナル伝達と細胞内抗酸化システムが排他的でなく共役的に発がん過程に寄与することを立証しようとした。以下の二点を骨子とした。

- (1) HTLV-1 ウイルスによる T 細胞の癌化を媒介する Nox5 のシグナル伝達機構を解明する。
- (2) すい臓がん細胞の増殖を支持する Nox4 の機能とその K-Ras 発がん遺伝子及びグルコース代謝・抗酸化システムとの関係を解明する。

3. 研究の方法

(1) Nox5 の下流シグナル伝達機構の解析

Nox5 siRNA を導入した HTLV-1 トランスフォーム T 細胞において PTP1B を 5' - IAF 標識法により、PTP1B の酸化レベルを調べ、グルコース代謝経路の代謝産物、制御酵素の活性と転写因子のレベルの変動を cDNA microarray を含む生化学的手法で解析する。

(2) すい臓がん細胞における Nox4 のシグナル伝達と K-Ras 発がん遺伝子による制御の解析

すい臓癌細胞に K-Ras shRNA を導入して K-Ras による Nox4 の発現調節を調べる。また、Nox4 shRNA を恒常的に発現した Nox4 silencing 細胞株を樹立し、グルコース代謝経路の代謝産物、調節酵素の活性と転写因子のレベルの変動を cDNA microarray を含む生化学的手法で解析する。

4. 研究成果

- (1) HTLV-1 で T-細胞 (HTLV-1/T) では、Jak-STAT3 経路 Nox5 が細胞増殖の亢進を媒介することを既に我々は報告した (2)。本研究で、Nox5 の産生した ROS (H_2O_2) は、protein tyrosine phosphatase PTP1-B の Cys-SH 残基を酸化修飾し、不活化することを見出した。それゆえ、Nox5 は PTP1-B を介してシグナル伝達を行うと考えられる。

さらに、HTLV-1/T 細胞の増殖は強いグルコース、グルタミン依存性を示し、しかも乳酸の生成を触媒する lactate dehydrogenase A (LDHA) の発現を Nox5 が誘導することを明らかにした。また、グルタミン代謝の調節酵素の発現も誘導することがわかった。この結果から Nox5 は aerobic glucose 代謝、glutamine 代謝の re-programming を促進して、癌細胞の維持に寄与することが示唆された (投稿準備中、図 1)。

(2) すい臓がん細胞の維持に Nox4 の過剰発現が必要とされることを既に我々は報告している (ref.4)。本研究で、さらに Nox4 の発現が、driver gene--- K-Ras 発がん遺伝子(K-Ras oncogene)によって誘導されることを見出した。さらに、K-Ras oncogene と同様に、Nox4 もグルコース代謝経路の LDHA の発現を維持し、乳酸の生成を促して代謝率をあげること、また細胞増殖の維持に寄与する証拠を得た (投稿準備中、図2)。

最近、K-Ras oncogene の誘導する Nrf2 を介した抗酸化システムや、aerobic glucose 代謝・glutamine 代謝から生成された抗酸化物質による ROS の除去が、すい臓がん細胞の増殖に重要であり、したがって Nox 由来 ROS の癌化過程への寄与を否定する報告が Tuveson らによって出版された(ref.5)。しかし、本研究の成果はこれに反論をくわえるものであり、Nox4 がすい臓がんの維持に必要であることをさらに明らかにした点で極めて重要である。Nox4 由来 ROS のシグナル伝達は、Nrf2 の抗酸化システムと協調して K-Ras 発癌化過程に寄与するという新たな仮説を立てるに至った (投稿準備中、図3)。

以上、結論として、本研究では NADPH oxidase ファミリー酵素 (Nox4, Nox5) に由来する ROS のシグナル伝達が aerobic glycolysis, glutaminolysis の亢進と再編成に重要な役割を果たし、これを介してがん細胞の異常増殖に寄与することを明らかにした。この発見には、がん化の情報伝達の調節機構のさらなる解明と、これらの酵素を分子標的とした新たながん治療薬の開発につながるという意義がある。

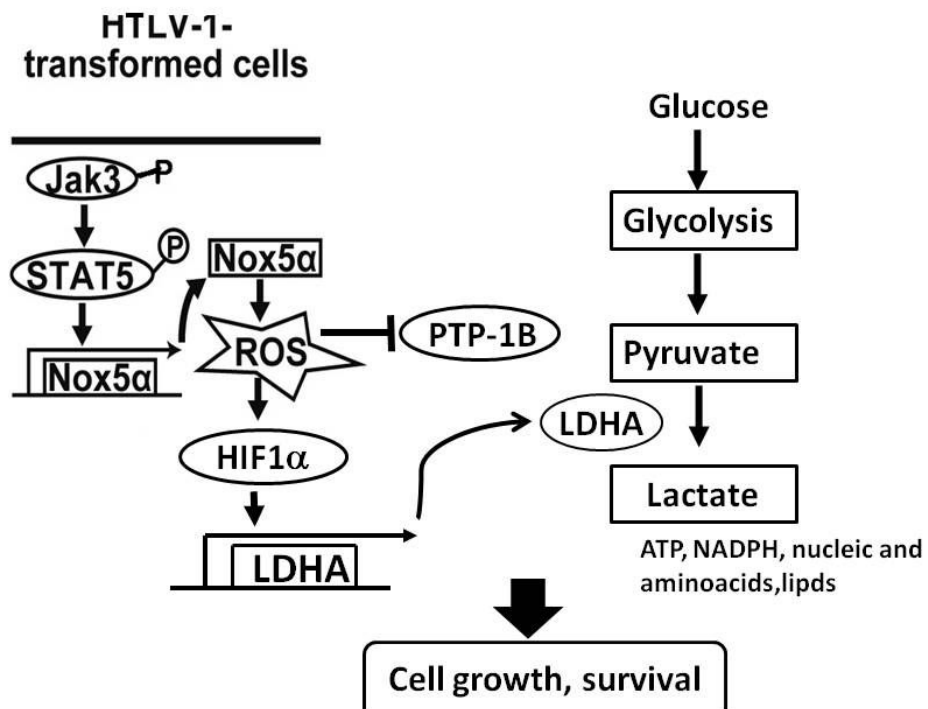


Fig.1 The functional role of Nox5 in HTLV-1-transformed T-cells.

Expression of Nox5 is induced by constitutive activation of Jak3-Stat5 axis in HTLV-1-transformed T-cells (HTLV-1/T), which leads to activation of Nox5-derived ROS signaling. Nox5-derived H₂O₂ transmits signals through oxidative inactivation of PTP-1B. Alternatively, Nox5 induces LDHA, a key enzyme to convert pyruvate into lactate and contributes to elevated aerobic glycolysis in HTLV-1/T cells, that supports their augmented growth and survival.

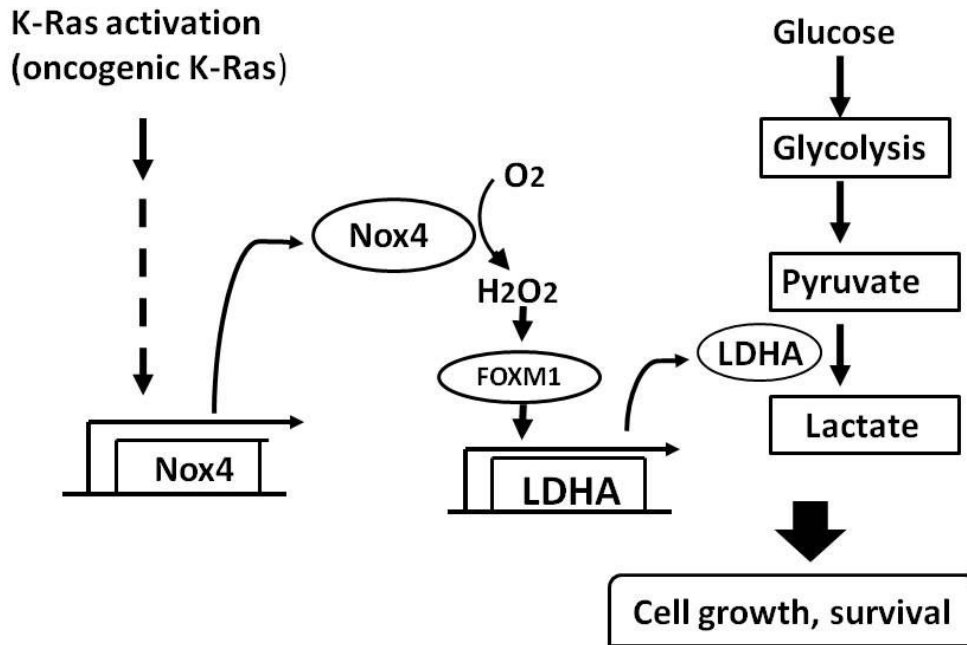


Fig.2 . Oncogenic K-Ras-induced Nox4 promotes glycolysis, contributing growth and survival of pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC). Oncogenic K-Ras up-regulates the expression of Nox4 in PDAC cells, which in turn increases Nox4-generated H_2O_2 as a signaling molecule. Then, Nox4-derived H_2O_2 promotes aerobic glycolysis by inducing LDHA expression possibly through FOXM1. Overall, Nox4 causes a high rate of glycolysis in PDAC cells under normoxic condition, which confers robust growth and survival.

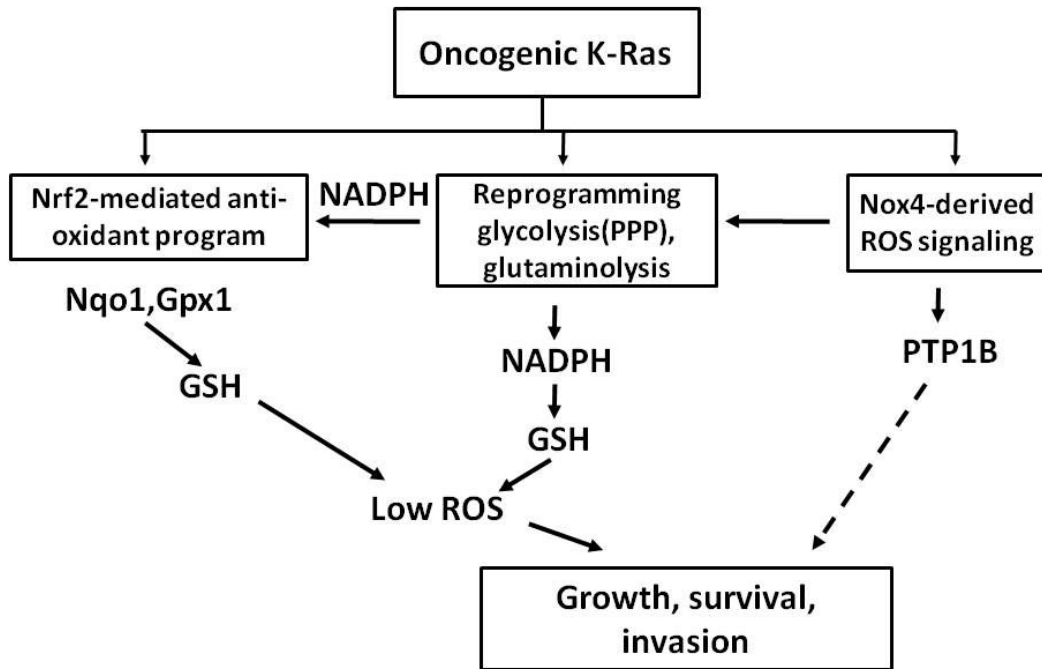


Fig.3. Nox4-mediated ROS signaling and Nrf2-mediated anti-oxidant program co-operate in maintaining cell growth and survival of oncogenic K-Ras-induced pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC).

Oncogenic K-Ras maintains cellular redox state by generating NDPH through reprogramming glycolysis and glutaminolysis in PDAC cells. Oncogenic K-Ras-induced Nox4 in part supports promotion of glycolysis through activation of LDHA. Oncogenic K-Ras also up-regulates Nrf2 expression, and Nrf2 increase GSH production with anti-oxidant program utilizing NADPH. Thus, Nox4 signaling and Nrf2 -detoxifying program in concert contribute to realization of low ROS intracellular environment, that supports cancer cell growth and survival. Nox4-mediated ROS signaling could also contribute to cancer progression via other signaling molecules including PTP1B.

引用文献：

1. Kamata,T. Roles of Nox1 and other Nox isoforms in cancer development.*Cancer Sci.* 100:1382-1388, 2008.
2. Shigemura, T., Shiohara, M., Kato, M., Furuta, S., Kaneda, K., Morishita, K., Hasegawa, H.,Fujii, M., Goriach, A., Koike, K., and Kamata, T.: Superoxide-generating Nox5a is functionally required for the human T-cell leukemia virus type 1-induced cell transformation phenotype. *J. Virology.* 89: 9080- 9089, 2015.
3. Kajla, S., Mondol, A.S., Nagasawa, A., Zhang, Y., Kato, M., Matsuno, K., Yabe-Nishimura, C. and Kamata, T. : A crucial role for Nox 1 in redox-dependent regulation of Wnt-β-catenin signaling. *FASEB J.*, 26: 2049-2059, 2012.
4. Mochizuki, T., Furuta, S., Mitsushita, J., Shang, W.H., Yamaura, M., Ishizone, S., Nakayama, J., Konagai, A., Hirose, K., Kiyosawa, K. and Kamata, T. : Inhibition of NADPH

oxidase 4 activates apoptosis via the AKT/apoptosis signal-regulating kinase 1 pathway in pancreatic cancer PANC-1 cells. *Oncogene*, 25: 3699-3707, 2006.

5. deNicola, G.M., Karreth, F.A., Humpton, T.J., Gopinathan, A., Wei, C., Frese, K., et al. Oncogene-induced Nrf2 transcription promotes ROS detoxification and tumorigenesis. *Nature*, 475: 106-109, 2011.

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 2件)

Yamamoto T, Nakano H, Shiomi K, Wanibuchi K, Masui H, Takahashi T, Urano Y, **Kamata T.** Identification and characterization of a novel NADPH oxidase 1 (Nox1) inhibitor that suppresses proliferation of colon and stomach cancer cells. *Biol.pharam.Bull.* 41: 419-426, 2018. 査読有

Kato M, Marumo M, Nakayama J, Masumoto M, Yabe-Nishimura C, **Kamata T.** The ROS-generating oxidase Nox1 is required for epithelial restitution following colitis. *Exp.Anim.* 65: 197-205, 2016. 査読有

[学会発表](計 1件)

Shigemura T, Shiohara M, Kato M, Kaneda K, Morishita K. Hasegawa H, Fujii M, Gorch A, Koike K, **Kamata T.** Superoxide-generating Nox5alpha contributes to malignancy of human T-cell leukemia virus type1-transformed cells through redox regulation. Cold Spring harbor Asia Conferences, Cancer Metabolism. 2016.9.19. World Hotel Grand Dushulake Suzhoh, 蘇州市(中国)

[産業財産権]

出願状況(計 1件)

名称: IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF NOS31, A NOVEL SELECTIVE NOX1 INHIBITOR

発明者: 山本剛、中野洋文、鎌田徹、塩見和朗

権利者: 同上

種類: 特許権

番号: 62/640037

出願年: 2018年3月1日

国内外の別: 国外

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名: 森下和弘

ローマ字氏名: Morishita Kazuhiro

所属機関名: 宮崎大学

部局名: 医学部

職名: 教授

研究者番号: 80260321

研究分担者氏名: 中畑新吾

ローマ字氏名: Nakahata Shingo

所属機関名: 宮崎大学

部局名: 医学部

職名: 准教授

研究者番号: 80437938