

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 9 月 21 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2016

課題番号：16K15228

研究課題名(和文) NRF2依存性難治がんにおける抗腫瘍免疫感受性の増強機構

研究課題名(英文) Enhancement of sensitivity to anti-cancer immunity in NRF2-addicted cancers

研究代表者

本橋 ほづみ (Motohashi, Hozumi)

東北大学・加齢医学研究所・教授

研究者番号：00282351

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：転写因子NRF2は、酸化ストレスからの生体防御に重要な役割を果たしている一方、多くのがん細胞で異常に活性化し、その悪性化をもたらしている。本研究ではNRF2陽性難治性がんの克服を目指し、がんにおけるNRF2活性化が、宿主の抗腫瘍免疫との関係において果たす腫瘍形成能促進のメカニズムの解明に挑んだ。その結果、NRF2活性化は、がん細胞の抗腫瘍免疫回避をもたらすことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：NRF2 is a master transcriptional activator playing a critical role in the defense mechanism against oxidative insults. NRF2 activates genes encoding cytoprotective enzymes and antioxidant proteins in response to electrophiles and reactive oxygen species (ROS), conferring resistance against xenobiotic and oxidative stress. While NRF2 activation is beneficial to our health, NRF2 is responsible for the malignant progression of various human cancers. To develop a new anti-cancer therapy for NRF2-addicted malignant cancers, we examined molecular mechanisms how NRF2 activation influences on the cancer evasion from the anti-cancer immunity. We found that NRF2 in cancer cells reduces expression of MHC class I and other genes involved in the antigen presentation, suggesting that NRF2 promotes the cancer evasion from the anti-cancer immunity.

研究分野：生化学・分子生物学

キーワード：転写因子 がん がん遺伝子 酸化ストレス応答

1. 研究開始当初の背景

転写因子 NRF2 は、生体防御系遺伝子群を統括的に活性化することで、細胞の解毒代謝・酸化ストレス応答における中心的役割を果たしている。一方、NRF2 は多くのがんで異常に活性化してその悪性化をもたらしていることが、申請者を含む複数の研究者から報告されている。このようながん細胞ではいわゆる「NRF2 依存」が成立しており、NRF2 機能を阻害するとがん細胞の増殖は抑制され、化学療法や放射線療法に対する治療効果が高まると期待される。しかし、担がん患者に NRF2 阻害剤を投与すると、解毒機能の低下から薬剤の副作用が増悪する恐れがある。そして、マウスを用いた実験から、担がん宿主の造血細胞で NRF2 機能が抑制されると骨髄由来免疫抑制細胞 (MDSC) が活性化され、がんの転移が促進されてしまうことも報告されている。したがって、がん治療として、NRF2 自体を標的とする NRF2 機能阻害剤を使用することには多くの困難が伴うと予想される。

そこで、申請者はこれまで、NRF2 依存性難治がんの克服を目指して、がん細胞において NRF2 活性化と合成致死性を示す因子を探索してきた。その経過の中で、NRF2 の恒常的な活性化に、RAS 経路の過剰な活性化が伴うと、細胞の増殖能には影響が認められないものの、担がん宿主による抗腫瘍免疫の攻撃を受け易くなり腫瘍が退縮してしまい腫瘍形成に至らないという興味深い現象を見出した。これは、NRF2 がドライバーとして悪性化をもたらしているがん細胞は、RAS シグナルの過剰な活性化により抗腫瘍免疫感受性を獲得し、生体内での腫瘍形成能を失うことを意味している。RAS 経路の活性化によるこうした効果は、NRF2 依存を示さないがん細胞に対しては認められない。したがって、この現象の背後には、NRF2 依存性難治がんに対して特異的に腫瘍形成抑制をもたらす効果的なアプローチにつながる分子メカニズムが潜んでいるといえる。

2. 研究の目的

本研究では、NRF2 依存性難治がん細胞が抗腫瘍免疫に対する抵抗性を有しているかを検討し、抗腫瘍免疫に対する抵抗性を有するならば、そのメカニズムを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) NRF2 陽性がん細胞モデルの作成

近年がん細胞の挙動の理解にはそれを取り巻く微小環境との相互作用を考慮することが重要であることが明らかにされている。そこで、本研究では、がん細胞と微小環境の相互作用が存在する環境においてがん細胞中の NRF2 機能を解析するために、マウスへの同種移植が可能な NRF2 陽性がん細胞

の作成を行った。Keap1 欠損マウスの胎児線維芽細胞を樹立し、SV40 T 抗原と活性化型 HRAS 変異体 (HRAS^{G12V}) を導入し、Keap1^{-/-}-TR MEF を得た。同時に、野生型マウスの胎児線維芽細胞からも同様の処理を行った細胞 WT-TR MEF を得た。これらの細胞を用いて C57BL/6 マウスへの移植実験を行い、がん細胞としての腫瘍形成能や遺伝子発現、宿主の炎症性細胞浸潤を解析した。

(2) NRF2 陽性腫瘍における IL-11 の重要性の検討

遺伝子発現解析から、IL-11 が NRF2 依存性の腫瘍形成に重要であることが予想されたため、CRISPR-Cas9 法を用いて Keap1^{-/-}-TR MEF において *Il11* 遺伝子をノックアウトし、得られた *Il11* 欠損細胞の腫瘍形成能を C57BL/6 マウスと抗腫瘍免疫がほとんど機能しないヌードマウスとに移植して検討した。

(3) ヒト乳がん症例における NRF2-IL-11 協調作用の重要性の検討

マウス線維芽細胞から作成したがん細胞モデルで観察された NRF2-IL11 の協調関係がヒトのがんでも観察されるかどうかを検討するために、NRF2 も IL-11 も予後悪化因子であるという報告がなされていた乳がん症例を調べた。

4. 研究成果

(1) NRF2 陽性がん細胞モデルの作成

まず、Keap1^{-/-}-TR MEF と WT-TR MEF において NRF2 経路の活性化状態を確認した。前者では NRF2 が恒常的に活性化し、その標的遺伝子の発現レベルも顕著に上昇していることが確認された。*In vitro* での培養において WT-TR MEF と Keap1^{-/-}-TR MEF の増殖速度に違いは認められなかった。ところが、これらの細胞を同数 C57BL/6 マウスの皮下に移植すると、WT-TR MEF では腫瘍を形成しかけるも退縮してしまったのに対して、Keap1^{-/-}-TR MEF では腫瘍形成が認められた。抗腫瘍免疫がほとんど機能しないヌードマウスに移植すると、WT-TR MEF も遅いながら腫瘍形成が可能であった。したがって、Keap1^{-/-}-TR MEF は、抗腫瘍免疫に対する抵抗性を有しているものと予想された。

これらの細胞には活性化型 HRAS 変異体を導入しているため、遺伝子変異の蓄積が加速されている可能性がある。そこで、腫瘍形成能の違いが本当に KEAP1 欠損に由来することを確認するため、HA タグ付きの KEAP1 を Keap1^{-/-}-TR MEF へ導入して、腫瘍形成能を調べたところ、WT-TR MEF と同様に腫瘍形成がみとめられなくなった。したがって、Keap1 欠損により腫瘍形成能が獲得されていることがわかった。

さらに、NRF2 の活性化に依存した腫瘍形成促進であることを確認するため、*Keap1^{+/+}*-TR MEF で Nrf2 をノックダウンして、同様に腫瘍形成能を調べた。その結果、腫瘍形成能は顕著に抑制されていることがわかった。以上のことから、*Keap1^{+/+}*-TR MEF は、NRF2 に依存して腫瘍形成が認められる NRF2 陽性がん細胞モデルであると言える。

NRF2 陽性がん細胞モデルにおける遺伝子発現を明らかにするために、WT-TR MEF と *Keap1^{+/+}*-TR MEF を用いてマイクロアレイ解析を行った。*In vitro* での培養では両者に増殖速度の違いを認めないものの、C57BL/6 マウスの皮下における腫瘍形成では顕著な違いが認められたことから、特に腫瘍形成の促進に関わる NRF2 の下流因子を同定したいと考えた。そこで、*in vitro* での培養条件(2D 条件)とマウス皮下での腫瘍形成条件(3D 条件)とで遺伝子発現の違いを検討した。C57BL/6 マウスへの移植では、WT-TR MEF がほとんど腫瘍を形成できないため、レシピエントをヌードマウスに変更し、腫瘍サンプルを得た。

NRF2 の典型的な標的遺伝子である抗酸化遺伝子や解毒系遺伝子などは、2D、3D いずれの条件においても、*Keap1^{+/+}*-TR MEF のほうで発現上昇が認められた。2D 条件と 3D 条件での変化が大きく異なる遺伝子として、*Il11*、*Il6* などのサイトカイン遺伝子、*Ptgs1*、*Ptgs2* などのプロスタグランジン代謝系遺伝子が見出された。一方、*Keap1^{+/+}*-TR MEF の 3D 条件下では、MHC class I や抗原提示に関わる遺伝子発現が顕著に低下しており、NRF2 の活性化状態が抗腫瘍免疫からの回避を促していることが明らかになった。

(2) NRF2 陽性腫瘍における IL-11 の重要性の検討

IL-11 は 2D 条件においては、WT-TR MEF と *Keap1^{+/+}*-TR MEF のいずれにおいてもほとんど発現が認められないが、3D 条件にすると NRF2 依存的に *Keap1^{+/+}*-TR MEF で IL-11 の発現増加が認められた。このことは、がん細胞をとりまく微小環境から何らかのシグナルが NRF2 と協調することにより *Il11* 遺伝子の転写を活性化できるものと考えられる。

そこで、NRF2 陽性がん細胞の腫瘍形成における IL-11 の重要性を検証するために、CRISPR-Cas9 システムによるゲノム編集を行い、*Keap1^{+/+}*-TR MEF で *Il11* 遺伝子を欠失させた。*Il11* 欠失 *Keap1^{+/+}*-TR MEF は、*in vitro* の培養では細胞の増殖速度に変化は認められなかったが、C57BL/6 マウス皮下への移植によりその増殖は顕著に抑制された。以上のことから、NRF2 陽性がん細胞の腫瘍形成は IL-11 に大きく依存していることがわかった。しかし、*Il11* 欠失

Keap1^{+/+}-TR MEF は、ヌードマウスへの移植でも全く腫瘍形成が起こらず、IL-11 の作用としては、抗腫瘍免疫の回避促進というよりも、腫瘍形成自体を促進しているものと考えられた。

(3) ヒト乳がん症例における NRF2-IL-11 協調作用の重要性の検討

乳がん 44 症例を、NRF2 と IL-11 の抗体でそれぞれ染色し、陽性症例の相関を調べた。半数の 22 症例が IL-11 陽性、残りの 22 症例が IL-11 陰性であった。乳がんの他のパラメーターと比較して、IL-11 陽性は NRF2 陽性と特に強い相関を示した。以上の結果から、ヒト乳がんにおいて、NRF2-IL-11 の協調作用がその悪性化をもたらすことが明らかになった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文]

原著論文 すべて査読あり(計 8 件)

1. Alam MM, Okazaki K, Nguyen LTT, Ota N, Kitamura H, Murakami S, Shima H, Igarashi K, Sekine H, **Motohashi H**. Glucocorticoid receptor signaling represses the antioxidant response by inhibiting histone acetylation mediated by the transcriptional activator NRF2. **J Biol Chem** in press. doi: 10.1074/jbc.M116.773960.
2. Jung M, Kasamatsu S, Matsunaga T, Akashi S, Ono K, Nishimura A, Morita M, Abdul Hamid H, Fujii S, Kitamura H, Sawa T, Ida T, **Motohashi H**, Akaike T. Protein polysulfidation-dependent persulfide dioxygenase activity of ethylmalonic encephalopathy protein 1. **Biochem Biophys Res Commun** 2016 Nov 11;480(2):180-186. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.10.022.
3. Irokawa H, Tachibana T, Watanabe T, Matsuyama Y, **Motohashi H**, Ogasawara A, Iwai K, Naganuma A, Kuge S. Redox-dependent Regulation of Gluconeogenesis by a Novel Mechanism Mediated by a Peroxidatic Cysteine of Peroxiredoxin. **Sci Rep**. 2016 Sep 16;6:33536. doi: 10.1038/srep30707.
4. Saigusa D, Okamura Y, Motoike IN, Katoh Y, Kurosawa Y, Saijyo R, Koshiba S, Yasuda J, **Motohashi H**, Sugawara J, Tanabe O, Kinoshita K, Yamamoto M. Establishment of Protocols for Global Metabolomics by LC-MS for Biomarker Discovery. **PLoS One**. 2016 Aug 31;11(8):e0160555. doi: 10.1371/journal.pone.0160555. eCollection 2016. doi: 10.1371/journal.pone.0160555.
5. Koshiba S*, Motoike I, Kojima K, Hasegawa T, Shirota M, Saito T, Saigusa D, Danjoh I,

- Katsuoka F, Ogishima S, Kawai Y, Yamaguchi-Kabata Y, Sakurai M, Hirano S, Nakata J, **Motohashi H**, Hozawa A, Kuriyama S, Minegishi N, Nagasaki M, Takai-Igarashi T, Fuse N, Kiyomoto H, Sugawara J, Suzuki Y, Kure S, Yaegashi N, Tanabe O, Kinoshita K, Yasuda J, Yamamoto M*. The structural origin of metabolic quantitative diversity. **Sci Rep**. 2016 Aug 16;6:31463. doi: 10.1038/srep31463.
6. Mochizuki M, Tamai K, Imai T, Sugawara S, Ogama N, Nakamura M, Matsuura K, Yamaguchi K, Satoh K, Sato I, **Motohashi H**, Sugamura K, Tanaka N. CD271 regulates the proliferation and motility of hypopharyngeal cancer cells. **Sci Rep**. 2016 Jul 29;6:30707. doi: 10.1038/srep30707.
7. Saito T, Ichimura Y, Taguchi K, Suzuki T, Mizushima T, Takagi K, Hirose Y, Nagahashi M, Iso T, Fukutomi T, Ohishi M, Endo K, Uemura T, Nishito Y, Okuda S, Obata M, Kouno T, Imamura R, Tada Y, Obata R, Yasuda D, Takahashi K, Fujimura T, Pi J, Lee M-S, Ueno T, Ohe T, Mashino T, Wakai T, Kojima H, Okabe T, Nagano T, **Motohashi H**, Waguri S, Soga T, Yamamoto M, Tanaka K, and Komatsu M. p62/Sqstm1 promotes malignancy of HCV-positive hepatocellular carcinoma through Nrf2-dependent metabolic reprogramming. **Nat Commun** 7, 12030, 2016. doi: 10.1038/ncomms12030.
8. Kobayashi EH, Suzuki T, Funayama R, Nagashima T, Hayashi M, Sekine H, Tanaka N, Moriguchi T, **Motohashi H**, Nakayama K, Yamamoto M. NRF2 suppresses macrophage inflammatory response by blocking proinflammatory cytokine transcription. **Nat Commun** 7, 11624, 2016. doi: 10.1038/ncomms11624.

総説論文 (計5件)

1. 村上昌平、**本橋ほづみ** 血液・免疫細胞および白血病細胞における KEAP1-NRF2 制御系の役割 臨床血液 (2016) 査読なし
2. Nishida M, Kumagai Y, Ihara H, Fujii S, **Motohashi H**, Akaike T. Redox signaling regulated by electrophiles and reactive sulfur species. *J Clin Biochem Nutr*. 2016 Mar;58(2):91-8. doi: 10.3164/jcbn.15-111. 査読あり
3. Fujii S, Sawa T, Nishida M, Ihara H, Ida T, **Motohashi H**, Akaike T. Redox signaling regulated by an electrophilic cyclic nucleotide and reactive cysteine persulfides. *Arch Biochem Biophys*. 2016 Apr 1;595:140-6. doi: 10.1016/j.abb.2015.11.008. 査読あり
4. 関根弘樹、**本橋ほづみ** 酸化ストレス応答転写因子 NRF2 の転写制御機構 実験医学 (2016)34, 2517-2524. 査読なし
5. Murakami S, **Motohashi H**. Recent

advances in elucidating KEAP1-NRF2 functions in hematopoietic/immune cells and leukemic cells. *Rinsho Ketsueki*. 2016;57(10):1860-1868. 査読なし

〔学会発表〕(計37件)

招待講演のみ記載

1. **本橋ほづみ**, KEAP1-NRF2 system in anti-oxidant response and regulation of cell proliferation and senescence. International Symposium "Redox Signaling in host defense and oxidative stress", 第90回日本細菌学会総会 仙台国際センター 仙台 2017年3月20日
2. **Hozumi Motohashi**, KEAP1-NRF2 system in stress response and cancer malignancy Kumamoto University Advance Research Project A & Program for Advancing Strategic International Networks to Accelerate the Circulation of Talented Researchers, International Symposium Kumamoto University, Kumamoto February 11, 2017.
3. **Hozumi Motohashi**, NRF2 and ROS metabolism. Educational session. ESMO Asia 2016. Suntec Singapore Convention & Exhibition Centre, Singapore. December 16, 2016.
4. **本橋ほづみ**, 酸化ストレス応答機構 KEAP1-NRF2 経路による細胞老化制御 第39回日本分子生物学会年会 シンポジウム「エピゲノム制御: 疾患発症における意義」パシフィコ横浜 横浜 2016年12月1日
5. **Hozumi Motohashi**, KEAP1-NRF2 system as a cysteine-based redox sensor-effector for our defense mechanism. Lecture series, The Jagiellonian University, Krakow, Poland, November 21-25, 2016.
6. **Hozumi Motohashi**, KEAP1-NRF2 system in stress response and cancer malignancy. III International Scientific Conference: Oxygen 2016. The Jagiellonian University, Krakow, Poland, November 18, 2016.
7. **本橋ほづみ**, Antioxidant response and cell senescence regulation by KEAP1-NRF2 system. "Frontiers in aging research toward healthy longevity"丸の内 MY PLAZA ホール 東京 2016年11月17日
8. **本橋ほづみ**, NRF2 による酸化ストレス応答と細胞老化制御 第11回臨床ストレス応答学会大会 シンポジウム 山口大学医学部 宇部 2016年11月11日
9. **本橋ほづみ**, Nrf2 活性化による Nrf2 依存性がんの治療戦略 日本放射線影響学会 第59回大会 JMSアステールプラザ 広島 2016年10月27日
10. **本橋ほづみ**, KEAP1-NRF2 制御系による酸化ストレス応答とその破綻 Marianna Research Council (MRC) 聖マリアンナ医科大学 川崎 2016年10月18日
11. **本橋ほづみ**, NRF2 の活性制御による加

齢疾患の予防と治療の可能性 スマート・エイジングカレッジ in 東京 東京丸の内・東北大学東京分室 東京 2016年10月18日

12. **本橋ほづみ**、造血細胞の分化・増殖における酸化ストレス応答機構の役割 第78回日本血液学会学術集会 教育講演 パシフィコ横浜 横浜 2016年10月14日
13. **本橋ほづみ**、Enhancement mechanisms of NRF2-dependent transcriptional activation in cancer cells がん細胞における NRF2 依存的転写活性の増強メカニズム 第75回日本癌学会学術総会 パシフィコ横浜 横浜 2016年10月7日
14. **本橋ほづみ**、Purification and analysis of endogenous NRF2 complex in the presence and absence of active PI3K-AKT signaling. 第89回日本生化学会大会 シンポジウム「細胞のロバストネスを規定するタンパク質複合体のダイナミクス」仙台国際センター 仙台 2016年9月26日
15. **本橋ほづみ**、KEAP1-NRF2 制御系による酸化ストレス応答と細胞老化制御 第69回日本酸化ストレス学会学術集会 教育講演 仙台国際センター 仙台 2016年8月31日
16. **本橋ほづみ**、がんの悪性化と酸化ストレス応答機構 安田女子大学・薬学部・薬学科 10周年記念学術講演会 広島 2016年8月24日
17. **本橋ほづみ**、NRF2 依存性環境ストレス応答：内耳酸化ストレス障害の軽減に対する NRF2 の貢献 第49回日本毒性学会学術年会 シンポジウム ウィンクあいち（愛知県産業労働センター）名古屋 2016年7月1日

〔その他〕

<http://www2.idac.tohoku.ac.jp/dep/ger/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

本橋 ほづみ (Hozumi Motohashi)

東北大学・加齢医学研究所・教授

研究者番号：00282351