

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年8月30日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15591

研究課題名(和文) 恒常的なNRF2の活性化がもたらす細胞老化誘導の意義とその分子機構の解明

研究課題名(英文) Verification of the significance and the molecular mechanism of cellular senescence induced by constitutive NRF2 activation

研究代表者

北村 大志 (Kitamura, Hiroshi)

東北大学・スマート・エイジング学際重点研究センター・助教

研究者番号：20706949

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：正常細胞において、発がん抑制機能を担っているNRF2が、どの時点からがんの悪性化に加担し、難治性のNRF2依存性がんの成立に至るのかは不明であった。本研究では、その分子機構を解明することにより悪性度の高いNRF2依存性がんの発生機構を解析した。本研究により、NRF2の恒常的な活性化によるがんの成立を阻止する細胞老化誘導機構の破綻が、NRF2依存性がんの発生母地につながることを示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

悪性度の高いNRF2依存性がんは、その発生機構が不明であった。しかし、本研究によりCdkn2aなど細胞の老化誘導機構の破綻が、「正常細胞においては発がんシグナルに対して防御的に働き、がん細胞では悪性化に貢献する」といったユニークなNRF2の機能変化を説明可能な一因子である可能性が示された。本研究で示唆されたこのようなメカニズムが、将来的に、NRF2依存性がんの治療標的になりうる可能性が示されたことも、本研究の重要な成果である。

研究成果の概要(英文)：NRF2-addicted cancer cells are malignant solid tumors and NRF2 accumulation is a prognostic marker. However, it remains to be elucidated how NRF2-addicted cancer cells are established. In order to analyze the molecular mechanisms how NRF2-addiction was established, we performed this research, using murine lung cancer model. From our analyses, it is implied that NRF2 activation in normal cells induces cellular senescence and protect the cells from carcinogenesis, which was not observed after carcinogenesis. Our data implied that recovering the cellular senescence mechanisms in NRF2 addicted cancer cells could cause the regression of NRF2-addicted cancer cell, which might be the therapeutic target for the malignant solid tumors.

研究分野：分子生物学 生化学 腫瘍生物学

キーワード：NRF2依存性がん Cdkn2a 細胞老化 恒常的NRF2活性化

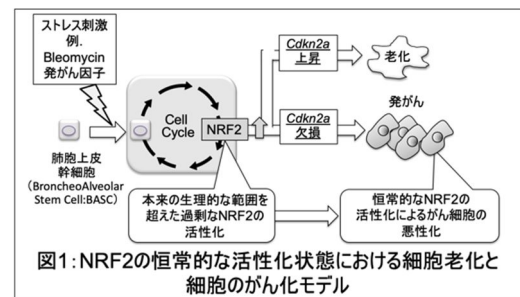
様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

NRF2は酸化ストレス応答において中心的役割を果たす転写因子である。通常NRF2はKEAP1によりポリユビキチン化されて、プロテアソーム系により分解されている。細胞が酸化ストレスなどに曝されるとKEAP1が失活することで、NRF2は安定化して核移行し、生体防御遺伝子群を統括的に誘導する。NRF2は抗酸化機能、解毒機能によりDNAやタンパク質の酸化障害や親電子毒物による付加体形成を防ぐことで、細胞のがん化を抑制する。一方、これらの機能はがん化した細胞においては、治療抵抗性の増大をもたらし、がんの悪性化の重要な要因となっている。恒常的にNRF2が安定化したがんは、その細胞増殖・腫瘍形成・治療抵抗性などをNRF2機能に大きく依存して悪性化している。肺がんや乳がん症例では、腫瘍組織におけるNRF2の高発現は独立の予後不良因子であることから、こうした「NRF2依存性がん」の克服はがんの治療において重要な課題の一つである。興味深いことに、正常細胞でNRF2を恒常的に活性化しただけでは、細胞のがん化は起こらない。「NRF2依存性がん」の発がん過程において、当初発がん抑制機能を担っているNRF2の活性化が、どの時点からがんの悪性化に加担し、難治性のNRF2依存性がんの成立に至るかを説明できる分子メカニズムは不明であり、解明が期待されてきた。

2. 研究の目的

申請者はヒトがんゲノムデータベース(TCGA)の検索から、NRF2が活性化している肺がん患者において、老化マーカーである*Cdkn2a*や*Cdkn2b*の遺伝子が共起して欠損していることを見出していたが、この理由は不明であった。しかし、我々のグループはマウス造血幹細胞において恒常的なNRF2の活性化が、細胞老化マーカーである*p16^{INK4a}* (*Cdkn2a*遺伝子)の発現を誘導することで細胞老化を促進する局面がある可能性を明らかにした。そこで本研究ではこれらの研究結果に基づき以下の仮説を立て、「NRF2依存性がん」がどのように発生するかを検証する。発がんシグナルに対して、正常細胞においてNRF2の恒常的な活性化は*p16^{INK4a}*の発現を誘導し細胞老化をもたらすことで発がん抑制機構として機能するが、*Cdkn2a*遺伝子の欠損などにより、NRF2依存的な細胞老化誘導機構の破綻が起きることが、悪性度の高いNRF2依存性がん成立の母地となっていると考えた(右図参照)。既存の研究はNRF2依存性がんの治療標的を、NRF2が活性化しているがん細胞をNRF2が活性化していない細胞と比較して、解析することで、見出そうとする方法が多く取られている。それらの研究に比べて本研究は、自らの研究結果に基づき、NRF2依存性がん細胞がどのように発生するかに焦点を当て、新規の治療標的の同定や生物学的な理解を行うとするアプローチが独創性のある点である。



3. 研究の方法

本研究ではNRF2の恒常的な活性化が*p16^{INK4a}*の発現誘導による細胞老化により発がんを抑制する一方、このNRF2活性化による細胞老化誘導の破綻がNRF2依存性がんを成立させるという仮説を以下の2つに分け、検証する。

恒常的なNRF2活性化による細胞老化誘導の一般性の検証

造血幹細胞で観察されたNRF2活性化による細胞老化誘導が、他の細胞系列においても観察される一般的な現象であるかを、マウスの肺胞上皮幹細胞や胎児線維芽細胞などを使用して検討する。それぞれの細胞系列で、*Keap1* 遺伝子欠損による恒常的NRF2活性化が細胞老化を誘導するかを調べる。さらに、生体における他の細胞系列にも着目して検討しNRF2活性化による細胞老化誘導機構の一般性を検証する。

恒常的なNRF2活性化がもたらす細胞老化の発がん抑制における貢献の検討

Adeno-Cre ウイルスの接種によりがん遺伝子*KRAS^{G12D}*の発現を誘導して肺がんを発症させるマウスモデル (*LSL-KRAS^{G12D}*)と*Cdkn2a^{-/-}* (KCマウス) *Keap1^{Flox/Flox}* (KKマウス)、*Keap1^{Flox/Flox}* ; *Cdkn2a^{+/-}* (KCKマウス)、野生型(Kマウス)のマウス4種類の複合変異マウスを作製する。*Keap1*;*Cdkn2a* 二重欠損が*Keap1* 単独欠損と比較して、死亡率や肺がんの形成率に影響を及ぼすかを検討する。さらに、体重の変化もモニタリングする。またNRF2依存性がんが、腫瘍微小環境に与える影響について凍結切片やパラフィン切片の組織染色また、フローサイトメトリー

(FACS) により腫瘍に浸潤してくる免疫細胞の数や構成細胞についても比較、検討する。

4. 研究成果

恒常的なNRF2活性化による細胞老化誘導の一般性の検証

野生型と*Keap1*欠損型のマウス繊維芽細胞(MEF)を取得して、細胞の増殖を比較したところ、*Keap1*の欠損により、培養の初期段階では、野生型と比較して、細胞の増殖が亢進していた。しかし、継代を経るごとに、増殖能は減少し、野生型より、早期に増殖が停止し、老化細胞が多く検出された。これらの結果から繊維芽細胞においてもNRF2の恒常的な活性化が細胞老化を引き起こすことがわかった。また、初代培養細胞においてNRF2の恒常的な活性化が細胞増殖の亢進をもたらすことから、*Keap1*の不活化による細胞老化の誘導は、過剰な増殖亢進シグナルによるストレス応答の一環である可能性も示唆された。

恒常的なNRF2活性化がもたらす細胞老化の発がん抑制における貢献の検討

作製した複合変異マウスに 1×10^5 pfuのAdeno-Creウイルスにより発がんさせた後、一定期間後に開胸して、肺がんの形成率や死亡率などを比較した。まずKマウスとKKマウスの肺がん形成を比較したところ、Kマウスと比較してKKマウスで腫瘍形成能が増強したことから、KKマウスがNRF2依存性モデル肺がん細胞を生じるモデルマウスであると判断した。さらにKKCマウスの肺がんは、KKマウスと比較して、おいて腫瘍面積がさらに上昇している傾向が見出された。一方で、KKCマウスはKKマウスと比較して早期に死亡する個体が多かった。このことはNRF2依存性肺がんのモデルマウスであるKKマウスにおける*Cdkn2a*の欠損が、がんの悪性化を引き起こしていることを示唆している。また、凍結組織切片を用いて、腫瘍に浸潤している免疫細胞(マーカーCD45)の数、またはその構成細胞の変化をT細胞(マーカーCD8)、マクロファージ(マーカーCD68)などに着目して、比較、検討を行ったが、肺がん形成後の後期過程において、明確な差は観察されなかった。*Cdkn2a*の欠損が腫瘍微小環境に与える影響については、肺がん形成後の初期段階のサンプルを用いて、組織染色およびフローサイトメトリーの両方の方法を用いて検討する必要がある。一方で肺がん形成の後期過程に、腫瘍もしくはその周辺部における老化細胞の分布や数をSA- β -galactosidase染色により比較したが、老化細胞の数や分布について遺伝子型ごとに大きな差異は検出されなかった。この結果から、NRF2-p16^{INK4A}経路に依存した細胞の老化は発がんの初期に起こるイベントである可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計6件)全て査読あり

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 292(18), 7519-7530, 2017.

doi: 10.1074/jbc.M116.773960.

Kitamura H, Onodera Y, Murakami S, Suzuki T, Motohashi H.

IL-11 contribution to tumorigenesis in an NRF2 addiction cancer model.

Oncogene 36, 6315-6324, 2017.

doi: 10.1038/onc.2017.236.

Kitamura H, Motohashi H.

NRF2 addiction in cancer cells.

Cancer Sci 109, 900-911, 2018.

doi: 10.1111/cas.13537.

Inouye S, Hatori Y, Kubo T, Saito S, **Kitamura H**, Akagi R.

NRF2 and HSF1 coordinately regulate heme oxygenase-1 expression.

Biochem Biophys Res Commun 506, 7-11, 2018

doi: 10.1016/j.bbrc.2018.10.030.

Dodo M, **Kitamura H**, Shima H, Saigusa D, Wati SM, Ota N, Katsuoka F, Chiba H, Okae H, Arima T, Igarashi K, Koseki T, Sekine H, Motohashi H.

Lactate dehydrogenase C is required for the protein expression of a sperm-specific isoform of lactate dehydrogenase A.

J Biochem, 165(4):323-334, 2019

doi: 10.1093/jb/mvy108.

Saito T, Kuma A, Sugiura Y, Ichimura Y, Obata M, **Kitamura H**, Okuda S, Lee HC, Ikeda K, Kanegae Y, Saito I, Auwerx J, Motohashi H, Suematsu M, Soga T, Yokomizo T, Waguri S, Mizushima N, Komatsu M
Autophagy regulates lipid metabolism through selective turnover of NCoR1

Nat Commun 2019, in press

〔学会発表〕(計7件)うち招待講演2件

Md. Morshedul Alam, Keito Okazaki, Nao Ota, **Hiroshi Kitamura**, Hiroki Shima, Kazuhiko

Igarashi, Hiroki Sekine, Hozumi Motohashi.

Glucocorticoid receptor signaling represses antioxidant response by inhibiting NRF2-dependent histone acetylation.

日本生化学会東北支部会第83回例会 東北大学さくらホール 仙台 2017.5.27.

Hiroshi Kitamura

KEPA1-NRF2 system in oxidative stress response and aging related disease

3rd Symposium of the Smart-Aging Research Center

International Conference Room, Center for Smart Ageing Research 1F, IDAC, Tohoku university Sendai, Oct.20. 2017

Hiroshi Kitamura, Yoshiaki Onodera ,

Takashi Suzuki, Hozumi Motohashi .

IL-11 contributes to tumorigenesis in an NRF2 addiction cancer model .

SfRBM 24th Annual Meeting , Hilton Baltimore , Baltimore , Maryland , USA . Nov 29-Dec 2, 2017.

Hozumi Motohashi, Tomoaki Ida, Md.Morshedul

Alam, **Hiroshi Kitamura**, Takaaki Akaike.

Bright and dark sides of KEAP1-NRF2 system in

carcinogenesis. SFRRI 2018, Lisbon Congress Centre, Lisbon, Portugal. June 4-7, 2018.

北村 大志 .

NRF2 依存性がんにおける IL11 の貢献

創生応用医学研究センター

第1回若手研究者交流会 星陵オーデトリウム 東北大学 仙台 2018.3.21.

北村 大志、小野寺好明、村上昌平、鈴木貴、本橋ほづみ .

NRF2 依存性モデルがん細胞における IL-11 の貢献 .

日本生化学会東北支部第84回例会・シンポジウム .

岩手医科大学矢巾キャンパス 盛岡 2018.5.19.

Hozumi Motohashi, Tomoaki Ida, Md.Morshedul

Alam, **Hiroshi Kitamura**, Takaaki Akaike.

Electrophilic response and sulfur metabolism regulated by KEAP1-NRF2 system.

第91回日本生化学会大会

国立京都国際会館 京都 2018.9.24-26.

〔図書〕(計1件)

北村大志、本橋ほづみ

NRF2 依存性難治がんの成立機構とその特性

実験医学 (2018) 36 No.5, 809-814.

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ

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

6. 研究組織

(1)研究代表者

研究分担者氏名：北村大志

ローマ字氏名： Kitamura Hiroshi

所属研究機関名：東北大学

部局名：加齢医学研究所

職名：助教

研究者番号(8桁): 20706949

(2)研究協力者

なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。