

令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07395

研究課題名(和文) 後天的なNrf2活性化の獲得による食道がんの進展

研究課題名(英文) Development of esophagus cancer acquired Nrf2 activation

研究代表者

田口 恵子 (TAGUCHI, Keiko)

東北大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：20466527

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：食道上皮細胞においてNrf2の発現が後天的に変動するモデルマウスを作製して、化学発がん剤による食道発がんの進展にNrf2がどのように働くかを調べた。食道上皮組織における部分的なKeap1欠失細胞の出現は、Keap1発現細胞にDNA損傷を与え、発がんの促進に寄与した。本研究は、食道扁平上皮がんの約30%を占めると言われているNrf2活性化がんの形成の理解に役立つ成果になると期待できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Nrf2活性化がんは、食道がんのみならず様々な癌腫で見つかっており、がん形成におけるNrf2の貢献は興味深いテーマである。Nrf2活性化を賦与した細胞からはがんは形成されず、むしろ組織から排除される細胞競合が観察された。本研究から、Nrf2の活性化自体は細胞のがん化には寄与しないことが明らかになった。Nrf2の活性化はがん形成の過程で獲得されて、がん細胞の生存に働くことが考えられた。

研究成果の概要(英文)：We examined how Nrf2 plays roles in esophageal cancers developed by a chemical carcinogen, using two model mice that harbor acquired deletion of Nrf2 or Keap1 genes in esophageal epithelium. Partial appearance of Keap1-deleted cells in esophageal epithelium conferred DNA damage to Keap1-expressing cells, resulting in 4NQO-induced tumor promotion. Nrf2-addicted cancers are found approximately 30% of esophageal squamous cell carcinoma. This study is useful to understand development of Nrf2-addicted cancers.

研究分野：生化学

キーワード：Nrf2 食道がん 細胞競合

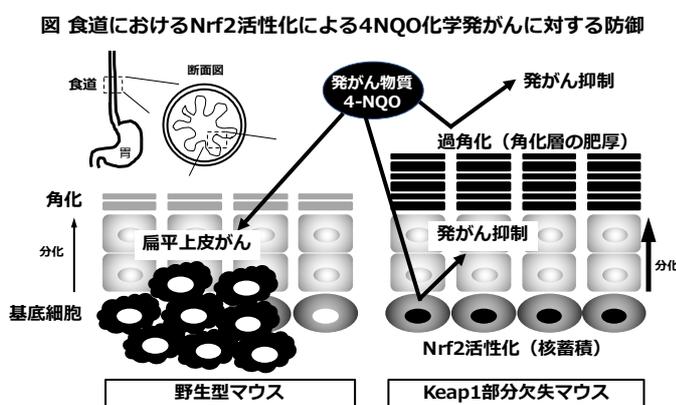
### 1. 研究開始当初の背景

NRF2 は生体防御遺伝子群の発現を制御する転写因子である。通常環境では、NRF2 は KEAP1-CUL3 ユビキチン E3 リガーゼ複合体の基質となり、迅速にタンパク質分解を受ける。一方、活性酸素種 (ROS) や毒物に曝露された細胞では、KEAP1 による NRF2 分解の促進制御が崩壊して、NRF2 は分解を免れて蓄積し、核に移行して転写因子としての機能を発揮する。核に蓄積した NRF2 は抗酸化剤応答配列 (ARE ; CsMBE と総称される DNA 配列) に結合して、下流の標的遺伝子の発現を亢進する。NRF2 の標的遺伝子には抗酸化や解毒代謝に関わる酵素群をコードするものが多く、NRF2 活性化は生体防御に働くことが理解される。

正常細胞からがん細胞に視点を変えると、NRF2 の活性化はがん細胞の悪性化促進に転ずる。実際に、ヒトがん組織では NRF2 の機能亢進を招来する NRF2 や KEAP1 遺伝子の体細胞変異が高頻度に見出される。これらのがん細胞では KEAP1 による精密な NRF2 の分解制御は破綻しており、NRF2 が恒常的に活性化している。

食道がんは扁平上皮がんと腺がんに大別されるが、本邦では食道がんの 90% は扁平上皮がんであり、喫煙や飲酒がリスクファクターとなる。さらに、日本人の扁平上皮がんの約 90% はがん抑制遺伝子 P53 の変異を伴う。また、P53 変異がんは NRF2 の転写活性化能を増強により抗酸化力を高めて、がん細胞の増殖を有利にすることが報告され (Lisek *et al.* Oncotarget, 2018)、がん細胞における P53 と NRF2 の相互作用による標的遺伝子の発現調節は非常に注目されている。

食道扁平上皮がんを惹起する化学発がんモデルとして、申請者の研究室において、4-ニトロキノリン-1-オキサイド (4NQO) 飲水発がんモデルを検討したところ、野生型マウスと比較して Nrf2 欠失マウスは発がんし易いものに対して、Nrf2 が恒常的に活性化している Keap1 部分欠失マウスは発がんし難かった (Ohkoshi *et al.* Cancer Prev Res 2013)。我々はこの結果より、Nrf2 の恒常的な活性化が 4NQO による食道発がんに対して防御に働くことと結論づけた (右図)。



Keap1 部分欠失マウス食道ではケラチン遺伝子群の発現が活性化して上皮が過角化しているため、組織肥厚が物理的な防御となり発がんを妨げているという可能性も否定できない。また、ヒトがん組織でみられる NRF2 遺伝子変異は発がん過程において獲得されるものであり、先天的に Nrf2 や Keap1 を欠失したマウスではヒト発がんを再現するモデルとして相応しくないことも考えられた。これらの課題を解決するためには、食道に過角化を起こさない Nrf2 活性化マウスの構築が必要であった。腫瘍形成の過程で Nrf2 活性化を獲得するがん細胞の特色を考えて、後天的に Nrf2 や Keap1 遺伝子を欠失する食道がんモデルの構築が必須であると考えた。

### 2. 研究の目的

所属研究室で作製した上皮細胞特異的にタモキシフェン誘導的に欠失する Keratin5-CreERT2 (K5-CreERT2) マウスを利用して、後天的に上皮細胞で Nrf2 または Keap1 遺伝子を欠失するモデルマウスを作製して、4NQO による食道発がんの進展に Nrf2 の活性化がどのように働くかを調べる。先天性の上皮細胞特異的 Keap1 欠失 (Keap1:K5-Cre) マウスは、全身性 Keap1 部分欠失マウスと同様に、食道の基底細胞の増殖が亢進して過角化を引き起こすため、発がんモデルを構築できない。Nrf2 はがん細胞の増殖を促進するが、正常細胞における Nrf2 活性化は上皮組織基底細胞で特異的に細胞増殖を引き起こす。申請者ら独自のマウスモデルをツールとして、がん細胞において Nrf2 が果たす役割について本質的な問いの解決に挑む。

### 3. 研究の方法

#### (1) 後天的な上皮特異的 Nrf2 または Keap1 欠失マウスの作製

K5-CreERT2 マウスと Rosa stop TdTomato (Rosa) レポーターマウスの交配から K5-CreERT2::Rosa マウスを得る。タモキシフェン投与により Cre 酵素を発現させた当該マウスの食道を採取して、蛍光顕微鏡にて Keap1 の発現組織特異性を調べた。さらに、Nrf2<sup>fllox</sup> または Keap1<sup>fllox</sup> マウスと K5-CreERT2 マウスを交配させて、上皮特異的 Nrf2 欠失 (K5CreERT2-Nrf2<sup>F/F</sup>)

マウスと上皮特異的 Keap1 欠失 (K5CreERT2-Keap1<sup>F/F</sup>) マウスを得た。

## (2) 後天的な上皮特異的 Nrf2 欠失マウスにおける食道の表現型と腫瘍形成

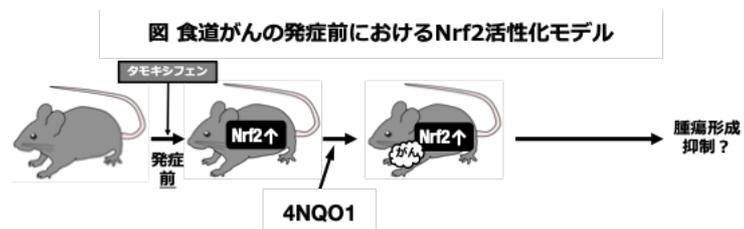
上皮特異的・タモキシフェン誘導的 Nrf2 欠失 (Nrf2<sup>fllox/fllox</sup>::K5-CreERT2) マウスに、タモキシフェン投与により Cre 発現を誘導して、Nrf2 遺伝子の欠失効率と、各遺伝子およびタンパク質の発現量と食道上皮細胞の表現型を調べた。

化学発がん剤 4NQO 飲水投与の順番は、タモキシフェン投与 (遺伝子欠失) →4NQO 投与 (発がん) と、4NQO 投与 (発がん) →タモキシフェン投与 (遺伝子欠失) の 2 パターンを行い、Nrf2 が活性化する時期が腫瘍形成に与える影響を調べた。食道を採取して、ヘマトキシリン-エオジン (HE) 染色から病理診断した。免疫染色および遺伝子発現解析により、腫瘍部における Nrf2 活性化の有無を確認した。RNA より Nrf2 や Nrf2 標的遺伝子の発現をリアルタイム PCR により解析した。

## (3) 後天的な上皮特異的 Keap1 欠失マウスにおける食道の表現型と腫瘍形成

上皮特異的・タモキシフェン誘導的 Keap1 欠失 (Keap1<sup>fllox/fllox</sup>::K5-CreERT2) マウスにタモキシフェン投与により Cre 発現を誘導して、Keap1 遺伝子の欠失効率と、各遺伝子およびタンパク質の発現量と食道上皮細胞の表現型を調べた。

タモキシフェン投与 (Keap1 遺伝子欠失) 後に 4NQO 飲水投与 (発がん) によって食道がんを形成させた。食道を採取して、ヘマトキシリン-エオジン (HE) 染色から病理診断した。免疫染色および遺伝子発現解析により、腫瘍部における Nrf2 活性化の有無を確認した。RNA より Nrf2 や Nrf2 標的遺伝子の発現をリアルタイム PCR により解析した。



## 4. 研究成果

### (1) 後天的な上皮特異的 Nrf2 または Keap1 欠失マウスの作製

Rosa マウスを用いて、タモキシフェン誘導 1 週間および 3 週間後の K5-CreERT2 の発現を調べた。扁平上皮組織である食道をはじめ、舌、前胃、皮膚において K5-CreERT2 の発現が確認できた。そこで、Nrf2<sup>fllox</sup> または Keap1<sup>fllox</sup> マウスと K5-CreERT2 マウスを交配させて、上皮特異的 Nrf2 欠失 (K5CreERT2-Nrf2<sup>F/F</sup>) マウスと上皮特異的 Keap1 欠失 (K5CreERT2-Keap1<sup>F/F</sup>) マウスを得た。

### (2) 後天的な上皮特異的 Nrf2 欠失マウスにおける食道の表現型と腫瘍形成

K5CreERT2-Nrf2<sup>F/F</sup> マウスを用いて食道における Nrf2 DNA 欠失を調べた。タモキシフェン誘導 1 週間および 12 週間後において、対照群である Nrf2<sup>F/F</sup> マウスに比べて、K5CreERT2-Nrf2<sup>F/F</sup> マウスでは約 50%の Nrf2 DNA 欠失が確認できた。Nrf2 DNA 欠失に合わせて、Nrf2 mRNA は約 30%、代表的な Nrf2 標的遺伝子である Nqo1 mRNA は約 50%発現が低下した。通常条件下において Nrf2 タンパク質は常に分解されているため発現していない。食道上皮において、恒常的に発現する Nqo1 タンパク質の発現は、K5CreERT2-Nrf2<sup>F/F</sup> マウスにおいて部分的に欠失した。

タモキシフェンによる Nrf2 欠失誘導 1 週間後から 4NQO を 12 週間飲水投与した。タモキシフェンにより約 50%まで欠失した Nrf2 DNA は 4NQO 投与 12 週間後にはほぼ正常レベルに回復した。同様に、Nrf2 標的遺伝子産物であるキノン酸化還元酵素 1 (Nqo1) の発現は 4NQO 投与 10 日後には約 20%まで減少したが、4NQO 投与 50 日後には約 50%まで回復した。K5CreERT2-Nrf2<sup>F/F</sup> マウスでは、対照群である Nrf2<sup>F/F</sup> マウスに比べて、4NQO 投与 10 日後において、異形成の程度が悪い食道組織が大半を占めた。

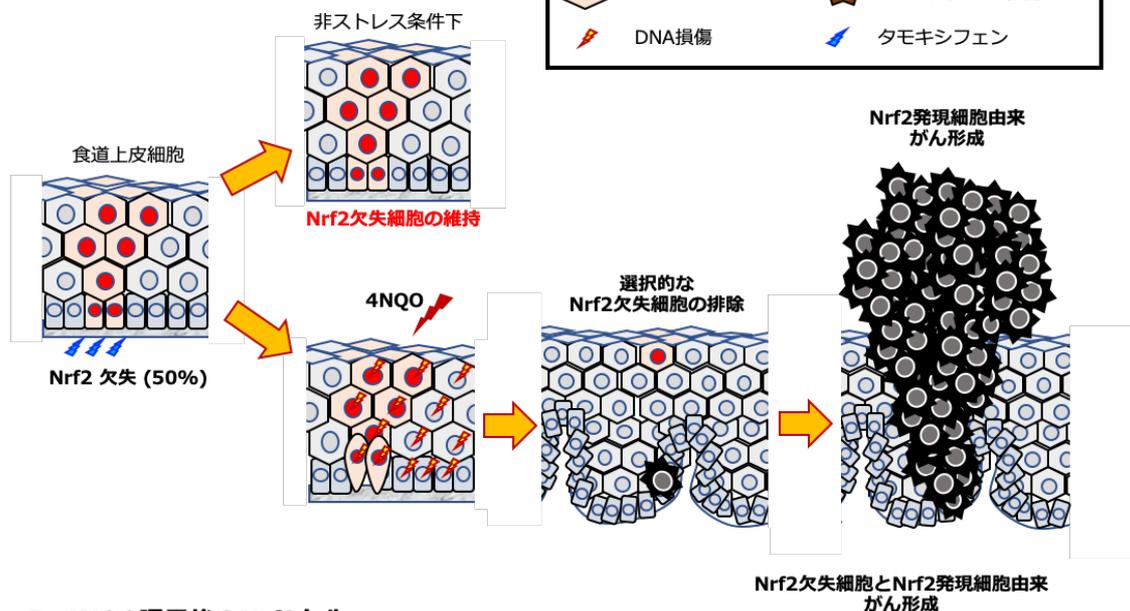
タモキシフェンによる Nrf2 欠失誘導 1 週間後から 4NQO を 12 週間飲水投与した後、通常水に戻してさらに 12 週間観察した。腫瘍の数や大きさは変化しなかった。興味深いことに、Nrf2 を欠失した K5CreERT2-Nrf2<sup>F/F</sup> マウスにおいて、対照群である Nrf2<sup>F/F</sup> マウスと同様に Nqo1 陽性がんが大半を占めた。

一方、4NQO を 12 週間飲水投与した後に、タモキシフェンにより Nrf2 欠失を誘導すると同時に、通常水に変えて 12 週間観察すると、Nrf2 欠失は腫瘍形成には影響しなかったが、Nrf2 欠失がんが形成された。

## Nrf2欠失細胞 vs. Nrf2発現細胞

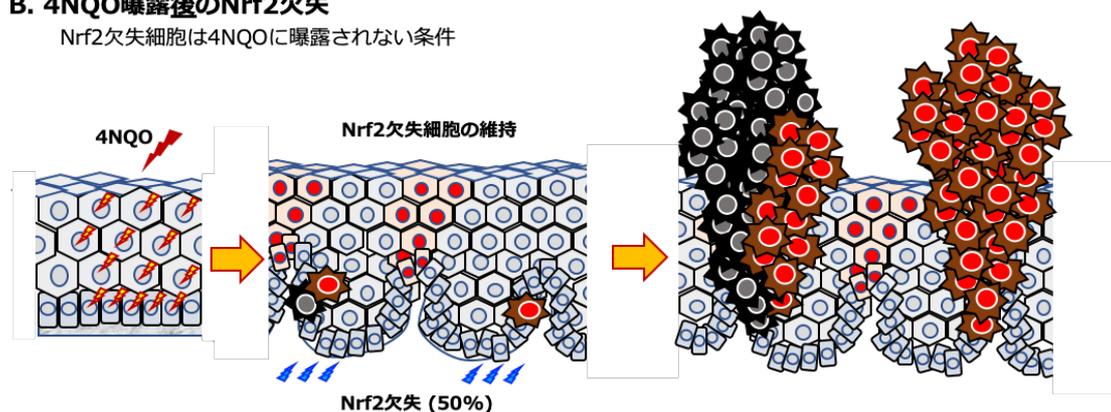
### A. 4NQO投与前のNrf2欠失

Nrf2欠失細胞は4NQOに曝露される条件



### B. 4NQO曝露後のNrf2欠失

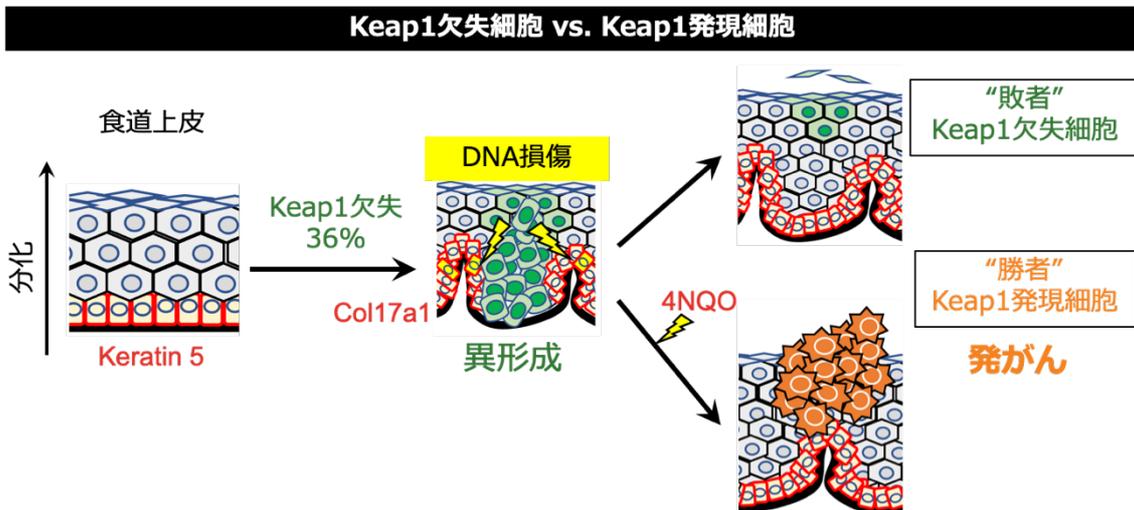
Nrf2欠失細胞は4NQOに曝露されない条件



### (3) 後天的な上皮特異的 Keap1 欠失マウスにおける食道の表現型と腫瘍形成

K5CreERT2-Keap1<sup>FF</sup> マウスを用いて食道における Keap1 DNA 欠失を調べた。タモキシフェン誘導 1 週間後において、対照群である Keap1<sup>FF</sup> マウスに比べて、K5CreERT2-Keap1<sup>FF</sup> マウスでは約 40%の Keap1 DNA 欠失が確認できた。Keap1 欠失マウス食道と同様に、タモキシフェン誘導 1 週間後の食道上皮組織では基底細胞の配列の乱れや過角化が観察された。食道上皮層における Nqo1 の発現は斑らで、4 週間後には Nqo1 の発現は減少し、食道上皮組織の変化も穏やかになった。基底層における Keap1 欠失細胞集団と、Nrf2 の核蓄積と Nqo1 発現はよく相関したので、Nqo1 陽性細胞を Nrf2 活性化細胞とみなした。Nqo1 陽性細胞集団はコラーゲン 17a1 の発現が低下しており、基底膜への接着が減弱して管腔側へ押しやられていた。このデータを強化するため、対照群である Keap1<sup>FF</sup> マウスと K5CreERT2-Keap1<sup>FF</sup> マウスの食道上皮細胞を単離して、Nqo1 高発現細胞と Nqo1 低発現細胞についてシングルセル RNAseq 解析を行った。予想通り、Nqo1 低発現細胞に比べて、Nqo1 高発現細胞では NRF2 経路や ROS 経路に関わる遺伝子群の発現が確認できた。さらに、細胞周期に関わる E2F 標的遺伝子や G2M チェックポイントに関わる遺伝子の変化が見出された。これら 2 つの経路は対照群の細胞と Nqo1 低発現細胞の比較でも見出された。

そこで、タモキシフェンによる Keap1 欠失誘導 1 週間後から 4NQO を 12 週間飲水投与した後、通常水に戻してさらに 12 週間観察した。すると、対照群である Keap1<sup>FF</sup> マウスに比べて K5CreERT2-Keap1<sup>FF</sup> マウスの方が腫瘍形成が促進された。興味深いことに、Keap1 欠失を誘導した K5CreERT2-Keap1<sup>FF</sup> マウスでは、Keap1 欠失細胞は管腔側に排除されて消失しており、Keap1 陽性がんが形成された。つまり、Keap1 欠失細胞は消失するが、Keap1 欠失細胞の出現によって Keap1 発現細胞に DNA 損傷が誘導されて 4NQO による発がんが促進された。



#### 引用文献

Hirose W#, Horiuchi M#, Li D, Motoike IN, Zhang L, Nishi H, Taniyama Y, Kamei T, Kinoshita K, Katsuoka F, **Taguchi K**, Yamamoto M.

Selective elimination of NRF2-activated cells by competition with neighboring cells in the esophageal epithelium. **Cell Mol Gastroent Hepatol**, 2022, in revision

Horiuchi M, **Taguchi K**, Hirose W, Tsuchida K, Suzuki M, Taniyama Y, Kamei T, Yamamoto M. Cellular Nrf2 levels determine cell fate during chemical carcinogenesis in esophageal epithelium. **Mol Cell Biol**, 41(2):e00536-20, 2020

DOI: 10.1128/MCB.00536-20. PMID: 33257504.

Edamitsu T, **Taguchi K**, Okuyama R, Yamamoto M.

AHR and NRF2 in Skin Homeostasis and Atopic Dermatitis. **Antioxidants**, 11(2), 227, 2022

DOI:10.3390/antiox11020227

**Taguchi K**, Kensler TW. Nrf2 in liver toxicology. **Arch Pharmacol Res** 43(3): 337-349, 2020

DOI: 10.1007/s12272-019-01192-3

**Taguchi K**, Yamamoto M.

The KEAP1-NRF2 system as a molecular target of cancer treatment, **Cancers**, 13(1): 46, 2020

DOI: 10.3390/cancers13010046. PMID: 33375248 PMCID: PMC7795874

田口恵子

Keap1-Nrf2 システムによる生体機能制御機構の解明、**東北醫學雑誌**, 132(1),36-38, 2020 年 6 月

田口恵子、山本雅之

環境応答・適応の分子機構、**日本体質医学学会誌**, 83(1), 38-45, 2021 年 2 月

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Horiuchi M, Taguchi K, Hirose W, Tsuchida K, Suzuki M, Taniyama Y, Kamei T, Yamamoto M.	4. 巻 41
2. 論文標題 Cellular Nrf2 levels determine cell fate during chemical carcinogenesis in esophageal epithelium	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Mol Cell Biol	6. 最初と最後の頁 e00536-20
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/MCB.00536-20	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Taguchi K, Yamamoto M	4. 巻 13
2. 論文標題 The KEAP1-NRF2 system as a molecular target of cancer treatment	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 46
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers13010046	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 田口恵子	4. 巻 132
2. 論文標題 Keap1-Nrf2システムによる生体機能制御機構の解明	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 東北医学雑誌	6. 最初と最後の頁 36-38
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 田口恵子、山本雅之	4. 巻 83
2. 論文標題 環境応答・適応の分子機構	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 日本体質医学学会誌	6. 最初と最後の頁 38-45
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Taguchi K, Kensler TW	4. 巻 43
2. 論文標題 Nrf2 in liver toxicology	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Arch Pharmacal Res	6. 最初と最後の頁 337-349
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12272-019-01192-3	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 田口恵子	4. 巻 13
2. 論文標題 Keap1-Nrf2システムによる生体機能制御機構の解明	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 東北醫學雑誌	6. 最初と最後の頁 36-38
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 田口恵子
2. 発表標題 Nrf2-Keap1生体防御システムの機能とその破綻による病態の解明
3. 学会等名 第402回東北医学会例会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Makoto Horiuchi, Keiko Taguchi, Kouhei Tsuchida, Mikiko Suzuki, Takashi Kamei, Masayuki Yamamoto
2. 発表標題 KEAP1-deletion in esophagus and chemical carcinogenesis
3. 学会等名 The Environmental Response V
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 堀内真、田口恵子、山本雅之
2. 発表標題 食道扁平上皮がんにおける後天的Keap1欠失の影響
3. 学会等名 日本生化学会東北支部第85回例会・シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 廣瀬亘、田口恵子、山本雅之
2. 発表標題 食道上皮における Nrf2 活性化細胞の周囲細胞の代償的増殖
3. 学会等名 日本生化学会東北支部第88 回例会・シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 廣瀬亘、田口恵子、堀内真、亀井 尚、山本雅之
2. 発表標題 食道上皮におけるNrf2活性化細胞の排除メカニズム
3. 学会等名 日本生化学会東北支部第87 回例会・シンポジウム
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

東北大学 大学院医学系研究科 医化学分野  
<http://www.dmbc.med.tohoku.ac.jp/official/index.html>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	堀内 真  (Horiuchi Makoto)		
研究協力者	廣瀬 亘  (Hirose Wataru)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------