

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 4 月 23 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659166

研究課題名（和文）発がん応答性メチル化促進エレメントの探索

研究課題名（英文）Investigation for the methylation-promoting element in response to carcinogenesis

研究代表者

本橋 ほづみ (MOTOHASHI HOZUMI)

東北大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：00282351

研究成果の概要（和文）：

本研究では、発がんの過程で、特定の遺伝子座に局限したメチル化異常をもたらすエピジェネティック制御の特異性形成機構を明らかにすることを目的とした。脳腫瘍における KEAP1 遺伝子あるいは NRF2 遺伝子のエピジェネティックな変化に着目した解析を実施した。IDH1 変異腫瘍では予後が良好で、かつ、NRF2 遺伝子の発現低下が観察された。NRF2 遺伝子発現の低下は、エピゲノムの変化に起因することが推測された。

研究成果の概要（英文）：

The goal of this project was to clarify the molecular mechanisms underlying the selective DNA methylation during carcinogenesis. We examined glioma patients and found that expression levels of NRF2 target genes in *IDH1*-mutated glioma are significantly lower than *IDH1* WT glioma. When we overexpress *IDH1* mutant into T98 cells, one of the cell lines derived from glioma patients. *IDH1*-mutant cells exhibited lower expression of NRF2 target genes, decreased accumulation of NRF2 in the nucleus, and reduced expression of *NRF2* gene. This study has suggested a possibility that *NRF2* gene might be epigenetically silenced during the development glioma.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,700,000

研究分野：

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：分子腫瘍学、エピゲノム、がん、予後、DNA メチル化

1. 研究開始当初の背景

Keap1/Nrf2 制御系は、酸化ストレスに対する生体防御の中核を担っている。酸化ストレスへの曝露により、転写因子 Nrf2 は Keap1 による抑制から免れ、生体防御系遺伝子群を統一的に活性化する。近年、がん細胞で高頻度な Nrf2 の恒常的安定化が報告された。安定化した Nrf2 は、酸化ストレス抵抗性をも

たらし、がん細胞に growth advantage を賦与する。Nrf2 の恒常的安定化の原因の一つは、Keap1 あるいは Nrf2 の遺伝子変異によるアミノ酸置換から、Keap1 が Nrf2 を抑制できなくなることである。

最近、申請者らを含む複数の研究者は、*KEAP1* 遺伝子のメチル化による発現低下が、*NRF2* の恒常的安定化を促進することを見い

でした。肺腺癌由来の A549 細胞では、*KEAP1* 遺伝子の変異により *KEAP1* が *NRF2* の抑制能を喪失し、*NRF2* が恒常的に安定化しているが、同時に *KEAP1* 遺伝子がメチル化を受け、その発現が著減していることを見いだした。これは、*KEAP1* 遺伝子のメチル化が、*NRF2* の安定化による growth advantage に依存しないメカニズムでメチル化されている可能性を示唆する。

がん化に伴いゲノム全体は低メチル化状態になるといわれている。しかし、特定の遺伝子座ではメチル化の亢進が観察される。こうしたメチル化異常をもたらす分子機構は未だほとんど解明されていないのが現状であった。

2. 研究の目的

そこで、本研究では、特定の遺伝子座に限局したメチル化異常をもたらされるエピジェネティック制御の特異性形成機構を明らかにするために、細胞のがん化に伴い *Keap1* 遺伝子のメチル化が亢進するメカニズムを、遺伝子制御領域の解析から明らかにすることを目的とした。すなわち、*Keap1* 遺伝子をモデル系として、がん細胞におけるメチル化異常に共通する基本原理を探索し、その新規メカニズムの解明に挑むことを目指した。

3. 研究の方法

(1) マウス発がんモデルにおける *Keap1* 遺伝子メチル化の検討

マウスの発がんモデルとして、ウレタン投与による肺の化学発がんを採用した。ウレタン投与により、マウスの肺には腺腫様の病変を経て腺癌が発症するので、それぞれの段階における *Keap1* 遺伝子発現を調べた。

また、*p53* 欠損マウスと *Pten* 欠損マウスにおける自然発がんにおける *Keap1* 遺伝子

発現についても検討を行った。

(2) 脳腫瘍における *KEAP1* あるいは *NRF2* 遺伝子発現の変化の検討

マウスを用いた発がん実験では、*Keap1* 遺伝子の発現低下は起こり難いと推測されたため、実験系を当初の予定から変更することにした。がん化に伴う *KEAP1* あるいは *NRF2* 遺伝子のエピジェネティックな変化を解析するための実験系として、脳腫瘍に着目した。

脳腫瘍では、*IDH1* 遺伝子に変異がはいることにより、DNA やヒストンのメチル化が亢進することが報告されている。そこで、臨床検体を約 100 症例用いて *KEAP1* 遺伝子発現と *NRF2* の標的遺伝子の発現を検討したところ、*KEAP1* 遺伝子の発現に変化はなかったが、*NRF2* の標的遺伝子の発現が有意に低下していることがわかった。*IDH1* 変異を有する脳腫瘍の患者の生命予後は良好であることが報告されており、この結果から、*NRF2* の機能低下がその原因であると推測される。

そこで、脳腫瘍由来の T98 細胞を用いて野生型 *IDH1*、あるいは、変異型 *IDH1* (*IDH1* R132H) の発現ベクターを導入して、安定発現細胞株を樹立した。これらの細胞を用いて、*NRF2* の標的遺伝子の発現レベル、*NRF2* の核内蓄積、*NRF2* 遺伝子の発現レベルを検討した。さらに、メタボローム解析により代謝物の変化を検討した。

4. 研究成果

(1) マウス発がんモデルにおける *Keap1* 遺伝子メチル化の検討

マウスの発がんモデルとして、ウレタン投与による肺の化学発がんを採用した。ウレタン投与により、マウスの肺には腺腫様の病変を経て腺癌が発症するので、それぞれの段階における *Keap1* 遺伝子発現を調べた。しかし、

この実験系では、腫瘍組織における *Keap1* 遺伝子発現の低下は観察されなかった。

ウレタン発がんモデルが好ましくないことがわかったので、*p53* 欠損マウスと *Pten* 欠損マウスにおける自然発がんを検討した。こちらの発がんモデルにおいても *Keap1* 遺伝子の発現低下は明確ではなかった。

(2) 脳腫瘍における KEAP1 あるいは NRF2 遺伝子発現の変化の検討

マウスを用いた発がん実験では、*Keap1* 遺伝子の発現低下は起こり難いと推測されたため、実験系を当初の予定から変更し、脳腫瘍由来の T98 細胞を用いて検討を行った。T98 細胞では、通常状態において NRF2 の核蓄積が認められ、NRF2 の標的遺伝子がある程度高いレベルで発現している。T98 細胞に野生型 IDH1、あるいは、変異型 IDH1 (IDH1 R132H) の発現ベクターを導入して、安定発現細胞株を樹立した。IDH1 変異体発現 T98 細胞は、IDH1 野生型発現 T98 細胞に比較して、増殖速度が極めて遅かった。また、これらの細胞を用いて、NRF2 の標的遺伝子、*NQO1*, *GCLC*, *GCLM* の発現を調べたところ、いずれも、IDH1 変異体発現 T98 細胞のほうで、有意に低下していることがわかった。また、NRF2 の核内蓄積量を調べたところ、IDH1 変異体発現 T98 細胞で減少していた。さらに、*NRF2* 遺伝子の発現レベルを調べたところ、やはり、IDH1 変異体発現 T98 細胞でのほうで低下していることがわかった。*NRF2* 遺伝子のプロモーター領域のメチル化については、今後解析予定である。

IDH1 変異体は、2 オキシグルタル酸を酸化してコハク酸に変換するという本来の機能ではなく、2 オキシグルタル酸を還元して 2 ヒドロキシグルタル酸に変換することが知られており、IDH1 変異を有する脳腫瘍で

は、腫瘍内、血清中、いずれにおいても、2 ヒドロキシグルタル酸が異常に高値を示す事が知られている。我々が樹立した IDH1 変異体を発現する T98 細胞でも 2 ヒドロキシグルタル酸レベルが高く、一方、グルタチオンが顕著に減少していた。これは、グルタミンから産生される 2 オキシグルタル酸が、グルタミン産生に利用されずに、2 ヒドロキシグルタル酸に変換されてしまっているためと推測される。

IDH1 変異体では、2 オキシグルタル酸が本来の代謝経路をとらず、2 ヒドロキシグルタル酸になってしまうため、本来の代謝を維持するためには、より多くの 2 オキシグルタル酸産生が必要であると推測される。NRF2 の活性が高い細胞では、グルタミン酸の多くがグルタチオン合成に利用されるため、IDH1 変異細胞で NRF2 が活性化すると、グルタミン酸からの 2 オキシグルタル酸の産生が十分に確保できないことになるものと推測される。したがって、IDH1 変異により、NRF2 の活性が高い細胞は不利になり、低い細胞が選択されると考えられる。ここで選択される NRF2 の発現が低い細胞においてその DNA メチル化が関与するかどうかはまだわからないが、今回の結果は、がん細胞における DNA メチル化パターンの変化の原因の一つを意味しているのかもしれない。

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] (計 12 件)

原著論文 (全て査読あり)

1. Taguchi K, Fujikawa N, Komatsu M, Ishii T, Unno M, Akaike T, Motohashi H and Yamamoto M. *Keap1* degradation by autophagy for the maintenance of redox homeostasis. **Proc Natl Acad Sci USA** 109, 13561-13566, 2012.
doi: 10.1073/pnas.1121572109.

2. Takaya K, Suzuki T, Motohashi H, Onodera K, Satomi S, Kensler TW and Yamamoto M. Validation of the multiple sensor mechanism of the Keap1-Nrf2 system. **Free Rad Biol Med** 53, 817-827, 2012. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2012.06.023.

3. Nishida M, Sawa T, Kitajima N, Ono K, Inoue H, Ihara H, Motohashi H, Yamamoto M, Suematsu M, Kurose H, van der Vliet A, Freeman B, Shibata T, Ucnida K, Kumagai Y and Akaike T. Hydrogen sulfide anion regulates redox signaling via electrophile sulfation. **Nat Chem Biol** 8, 714-724, 2012. doi: 10.1038/nchembio.1018.

4. Mitsuishi Y, Taguchi K, Kawatani Y, Shibata T, Nukiwa T, Aburatani H, Yamamoto M*, and Motohashi H*. Nrf2 redirects glucose and glutamine into anabolic pathways in metabolic reprogramming. **Cancer Cell** 22, 66-79, 2012. (* corresponding authors) doi: 10.1016/j.ccr.2012.05.016.

5. Inoue D, Suzuki T, Mitsuishi Y, Miki Y, Suzuki S, Sugawara S, Watanabe M, Sakudara A, Endo C, Uruno A, Sasano H, Nakagawa T, Satoh K, Tanaka N, Kubo H, Motohashi H*, and Yamamoto M*. Accumulation of p62/SQSTM1 is associated with poor prognosis in patients with lung adenocarcinoma. **Cancer Sci** 103, 760-766, 2012. (* corresponding authors) doi: 10.1111/j.1349-7006.2012.02216.x.

総説論文

6. 藤田理恵, 本橋ほづみ, 山本雅之. 巨核球分化・血小板産生制御に貢献する転写調節機構. **日本血栓止血学会誌** 23, 539-543, 2012 (査読なし)

7. Mitsuishi Y, Motohashi H*, and Yamamoto M*. The Keap1-Nrf2 system in cancers: Stress response and anabolic metabolism. **Front. Oncol.** 2, Article 200, 2012. (* corresponding authors) (査読あり) doi: 10.3389/fonc.2012.00200.

8. 田口恵子, 本橋ほづみ. 代謝リプログラミングにおける酸化ストレス応答機構の役割. **実験医学** 30, 2814-2821, 2012 (査読なし)

9. 光石陽一郎, 田口恵子, 本橋ほづみ. 転写因子 Nrf2 はグルコースとグルタミンの代謝を変化させて代謝リプログラミングを促進する. **ライフサイエンス新着論文レビュー**, 2012年7月19日. (査読なし) URL: <http://first.lifesciencedb.jp/archives/5262>

10. 光石陽一郎, 本橋ほづみ. がん細胞における Keap1-Nrf2 システムの破綻. **実験医学** 30, 2437-2442, 2012. (査読なし)

11. 村上昌平, 本橋ほづみ. 酸化ストレスシグナルと Keap1-Nrf2 システムの役割. **細胞工学** 31, 144-149, 2012. (査読なし)

12. Uruno A and Motohashi H*. The Keap1-Nrf2 system as an in vivo sensor for electrophiles. **Nitric Oxide** 25, 153-160, 2011. (* corresponding author) (査読あり)

doi: 10.1016/j.niox.2011.02.007.

[学会発表] (計 26 件)
(一般演題)

1. Hozumi Motohashi, Tsuyoshi Higa, Keiko Taguchi, Yoichiro Mitsuishi, Masayuki Yamamoto. Functional expansion of Nrf2 under the sustained activation of proliferative signals. Keystone Symposium on Nutrition, Epigenetics and Human Diseases. Hilton Santa Fe Historic Plaza Hotel, Santa Fe, New Mexico, USA. February 19-24, 2013.

2. 光石陽一郎, 田口恵子, 山本雅之, 本橋ほづみ. がん細胞における酸化ストレス応答機構の役割と代謝リプログラミングへの貢献. 第85回日本生化学会大会. 福岡国際会議場・マリンメッセ福岡 2012年12月14-16日 (シンポジウム)

3. 田口恵子, 本橋ほづみ, 山本雅之. 肝臓における2つの Nrf2 活性制御機構と胆管形成. 第85回日本生化学会大会. 福岡国際会議場・マリンメッセ福岡 2012年12月14-16日

4. 藤田理恵, 辻本昌理子, 藤井聡, 皿井明倫, 油谷浩幸, 本橋ほづみ, 山本雅之. 転写因子 NF-E2 p45 による血小板機能調節遺伝子の転写活性化. 第85回日本生化学会大会. 福岡国際会議場・マリンメッセ福岡 2012年12月14-16日

5. 村上昌平, 本橋ほづみ, 山本雅之. 造血

幹細胞・前駆細胞における Keap1-Nrf2 制御系の役割の解明。第 35 回日本分子生物学会年会。福岡国際会議場・マリンメッセ福岡 2012 年 12 月 11-14 日

6. 本橋ほづみ Keap1-Nrf2 制御系による酸化ストレス応答機構 第 55 回放射線影響学会 仙台 東北大学川内北キャンパス 2012 年 9 月 6-8 日 (ワークショップ)

7. Yoichiro Mitsuishi, Keiko Taguchi, Hiroyuki Aburatani, Masayuki Yamamoto, and Hozumi Motohashi. Nrf2 activates the pentose phosphate pathway and glutamine consumption in metabolic reprogramming. Keystone Symposium on Cancer and Metabolism. Fairmont Banff Spring, Banff, Canada. February 12-17, 2012.

8. Yoichiro Mitsuishi, Keiko Taguchi, Hozumi Motohashi and Masayuki Yamamoto. Transcription factor Nrf2 drives the pentose phosphate pathway and glutamine consumption in proliferating cells. Discovery on Target; Cancer Cell Metabolism as Drug Target. Park Plaza Hotel & Towers, Boston, MA, USA. November 2-3, 2011.

9. Nanako Fujikawa, Keiko Taguchi, Hozumi Motohashi and Masayuki Yamamoto. Keap1 degradation by autophagy for the maintenance of redox homeostasis. 16th World Congress on Advances in Oncology and 14th International Symposium on Molecular Medicine. Hotel Rodos Palace, Rhodes Island, Greece. October 6-8, 2011.

10. Yoichiro Mitsuishi, Keiko Taguchi, Masayuki Yamamoto, and Hozumi Motohashi. Nrf2 activates the pentose phosphate pathway and glutamine consumption in proliferating cells. 16th World Congress on Advances in Oncology and 14th International Symposium on Molecular Medicine. Hotel Rodos Palace, Rhodes Island, Greece. October 6-8, 2011. (oral presentation)

11. 藤田理恵、辻本昌理子、油谷浩幸、本橋ほづみ、山本雅之 転写因子 NF-E2 p45 による血小板機能制御メカニズムの解明 第 84 回日本生化学会大会、国立京都国際会館、2011 年 9 月 21-24 日

12. 光石陽一郎、田口恵子、油谷浩幸、貫和敏博、本橋ほづみ、山本雅之 転写因子

Nrf2 はペントースリン酸経路とグルタミン代謝を制御して細胞増殖に貢献する 第 84 回日本生化学会大会、国立京都国際会館、2011 年 9 月 21-24 日

(招待講演)

13. 本橋ほづみ、がん細胞における Keap1-Nrf2 制御系の役割 がん代謝メタボロミクスセミナー 国立がん研究センター研究所 東京 2013 年 3 月 13 日

14. 本橋ほづみ、がん細胞におけるストレス応答と代謝リプログラミング がん代謝シンポジウム 慶應義塾大学医学部信濃町キャンパス 東京 2013 年 1 月 17-18 日

15. Hozumi Motohashi. Keap1-Nrf2 system in metabolic reprogramming of cancer cells. 新学術領域研究「活性酸素シグナル」公開国際シンポジウム 九州大学福岡 2012 年 12 月 17 日

16. 本橋ほづみ、がん細胞における Keap1-Nrf2 制御系の役割 第 29 回臨床フリーラジカル会議 里山の休日 京都・畑河 2012 年 12 月 7-8 日

17. 本橋ほづみ、がん細胞における酸化ストレス応答と代謝リプログラミング 日本医科大学医学会特別講演会 日本医科大学東京 2012 年 11 月 28 日

18. 本橋ほづみ、がん細胞における酸化ストレス応答と代謝制御 第 7 回メタボロームシンポジウム ランチョンセミナー (ヒューマンメタボロームテクノロジー株式会社) 慶應義塾大学先端生命科学研究所 鶴岡 2012 年 10 月 12 日

19. 本橋ほづみ、がん細胞における酸化ストレス応答と代謝リプログラミング 京都大学放生研セミナー. 京都大学放射線生物研究センター. 京都. 2012 年 9 月 14 日

20. Hozumi Motohashi. Cross-regulation of redox homeostasis and anabolic metabolism by the Keap1-Nrf2 pathway. The 33rd NAITO Conference on "Oxygen Biology: Hypoxia, Oxidative Stress and Diseases.", Chateraise Gateaux Kingdom SAPPORO, Sapporo, June 26-29, 2012.

21. Hozumi Motohashi. MafG C-terminal region contains a nuclear matrix targeting signal and confers competence for transcriptional regulation in megakaryocytes. The 27th RBC-NIRS

International symposium “Chromatin dynamics and epigenetic memory in DNA damage response”, Co-op Inn Kyoto, Kyoto, December 9-10, 2011

22. 本橋ほづみ、がん細胞における酸化ストレス応答と代謝リプログラミング 第12回 WAKO つくばフォーラム 転写と代謝のクロストーク：病態バイオロジーの新展開 筑波和光ホール つくば 2011年11月29日

23. 本橋ほづみ、環境応答の分子機構とその破綻による炎症性病態形成 日本耳科学会聴覚生理研究会特別講演 沖縄コンベンションセンター 宜野湾市 2011年11月26日

24. 本橋ほづみ、細胞増殖における酸化ストレス応答機構の役割 千里ライフサイエンスセミナー「ストレス応答の分子メカニズム」 千里ライフサイエンスセンタービル 大阪 2011年11月14日

25. 本橋ほづみ、増殖細胞におけるストレス応答と代謝制御のクロストーク 「転写代謝システム」キックオフミーティング 大手町サンケイプラザ 東京 2011年10月19日

26. Hozumi Motohashi. Nrf2 activates the pentose phosphate pathway and glutamine consumption in proliferating cells. 第11回日本N0学会学術集会 シンポジウム 昭和薬科大学、町田、2011年5月13-14日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

本橋 ほづみ (MOTOHASHI HOZUMI)

東北大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：00282351

(2) 研究分担者 なし

()

研究者番号：

(3) 連携研究者 なし

()

研究者番号：