

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 28 日現在

機関番号：32644

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23701113

研究課題名(和文) Nrf2-Keap1を介した癌の新規浸潤調節機序と予防医学的意義の解明

研究課題名(英文) A novel role of Keap1-Nrf2 signaling pathway underlying the regulation of cancer cells invasion.

研究代表者

遠藤 整 (ENDO, Hitoshi)

東海大学・医学部・助教

研究者番号：10550551

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：酸化ストレスセンサーシグナルであるKeap1-Nrf2経路の活性化は、生体防御系遺伝子群を誘導し発がん予防に有効であると考えられている。しかしながら、がん細胞におけるKeap1-Nrf2の活性化は生存の安定性獲得に貢献することが示唆されている。本研究において、Nrf2は癌の浸潤・転移に重要な役割を担うMMP遺伝子のプロモーター領域内に存在するAREを介して、直接転写を活性化することが明らかとなった。同様に、MMP遺伝子の発現誘導は、Keap1のノックダウンやNrf2活性化剤の添加によっても認められ、Keap1-Nrf2の活性化が癌の浸潤転移能を促進するという新たな側面が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Keap1-Nrf2 is a signaling pathway that strongly influences intrinsic resistance to oxidative stresses and controls adaptive responses to various environmental stressors. Whereas activation of Keap1-Nrf2 pathway contributes the strategy for cancer prevention due to induction of antioxidant and detoxication enzymes in normal cells, Nrf2 activation also promotes survival and development in cancer cells. In the current study, the overexpression of Nrf2 in increasing concentrations resulted in significant enhancement of ARE binding sites-mediated MMP promoter activity. Similarly, I have demonstrated using gene knockdown technique of Keap1 that MMP gene was dramatically induced in cancer cells. These results suggested that the activation of Keap1-Nrf2 is not only contributed to cancer cells development but also promotes invasion and metastasis.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・がん疫学・予防

キーワード：浸潤 Nrf2

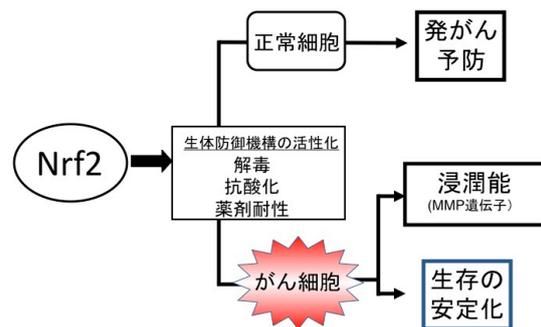
1. 研究開始当初の背景

(1) 人々の健康志向がこれまで以上に高まる中、健康寿命の延長や健康の保持増進を遂行する上で、予防医学の存在は極めて重要である。特に、1981年以來、我が国の死因の第一位である癌を予防する取り組み（疾病の一次予防）は、単に罹患率や死亡率の低下に繋がるだけでなく、医療費軽減を目指す上でも非常に大きな意義を持つ。本研究で取り上げるMMP (Matrix MetalloProteinases)は、癌細胞自らが分泌することで細胞周囲のマトリックス組織の分解に関与するほか、細胞外に存在する数多くのサイトカインや増殖因子を活性化させることで、癌細胞の浸潤・転移・増殖に重要な役割を担う分泌性タンパクである。また、MMPは前癌病変および発癌初期から発現亢進が認められるため、MMPの抑制は発癌予防の標的となる。

(2) 近年、活性酸素種 (ROS: Reactive Oxidative Stress) がDNAやタンパク質に損傷を与え、発癌、炎症性疾患、老化に深く関与することが報告されている。さらにROSは、細胞内のシグナル伝達を介してMMP遺伝子の発現を誘導することが報告されている。そのため、現在の癌の予防および治療にとって「ROSの発生をいかに効率良く除去・抑制出来るか」が、一つのトピックとなっている。細胞は自身の恒常性を保つため、酸化ストレスセンサーシグナルKeap1-Nrf2経路を介して生体防御系遺伝子群を誘導し、外部環境からの化学物質や毒物などの曝露によって発生するROSを除去している。また、機能性食品や抗酸化物質に代表される食物由来の天然成分が、Nrf2の発現を強く誘導することが報告され、機能性食品の摂取が発癌予防の効果的なアプローチになり得るとして大きな注目を集めている。しかしながら、癌組織においてNrf2の発現が亢進していることや、Nrf2抑制因子であるKeap1の発現低下や遺伝子変異がNrf2を恒常的に活性化し、薬剤代謝や解毒に関わる

遺伝子群の発現を強力に誘導するため、薬物療法の効果を妨げている可能性が示唆されている。つまり、Nrf2を誘導することは「正常細胞において発癌予防に働く」が、「癌細胞においては生存の安定性獲得（癌細胞を保護する効果）に貢献してしまう」といった、生体にとっての不利益を引き起こすことが予想される。一方、Nrf2は転写因子であり、プロモーター領域のARE (Antioxidant Responsive Element) 配列に結合し標的となる遺伝子発現を強力に誘導する。申請者は、癌の浸潤を規定するMMP遺伝子のプロモーター領域にもAREが存在するを見いだしており、Nrf2はMMP遺伝子を直接誘導することが予想される。つまり、生体防御に重要な役割を担うNrf2は、発癌予防に貢献する一方で、癌の浸潤能を活性化し進展を促す可能性がある (図1参照)。

図1 がん細胞におけるNrf2の役割



2. 研究の目的

本研究の最大の目的は、「生体防御機構の活性化が癌の進展や浸潤に関与する可能性を解明すること」である。具体的には、生体防御システムとして重要な働きを担うKeap1-Nrf2の活性化を介して、浸潤・転移に関わるMMP (Matrix MetalloProteinases)の遺伝子発現に与える影響を明らかにする。正常細胞におけるKeap1-Nrf2シグナルの活性化は発癌予防に効果的である一方で、既に癌化した細胞では浸潤能を促進させてしまう可能性を示し、癌の予防と治療におけるKeap1-Nrf2シグナルの意義と相違点を明確にする。

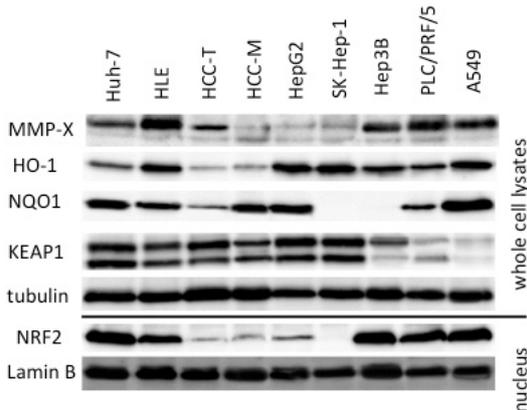
3. 研究の方法

本研究は、特に解毒・代謝を担う肝臓由来癌細胞を用いて、Keap1-Nrf2 と MMP 遺伝子との直接的な相互作用について解析を行った。

4. 研究成果

(1) がん細胞における Nrf2 の発現量の検討
本研究で用いた肝がん細胞株は、HLE, HepG2, Huh-7, SK-Hep-1, Hep3B, PLC/PRF/5, 及び当研究室の渡辺らが樹立した HCC-T, HCC-M である。また、Keap1 に体細胞変異(G333C)を有し Nrf2 が安定化することで恒常的に発現が認められる肺線癌由来細胞株 A549 をポジティブコントロールとした。Nrf2 の核内での発現は、Huh-7, HLE, Hep3B, PLC/PRF/5 細胞において恒常的な発現が認められた(図2)。Nrf2 の安定的発現には、Keap1 もしくは Nrf2 の遺伝子変異が報告されているが、用いた肝癌細胞株においてはいずれの変異も見出すことは出来なかった。Hep3B や PLC/PRF/5 細胞は Keap1 の発現低下を示すことから、Nrf2 が安定的に発現した可能性が考えられる一方、Huh-7 と HLE 細胞は Keap1 の発現レベルの低下は認められなかったため、新たな Nrf2 発現調節機序の存在が示唆された。

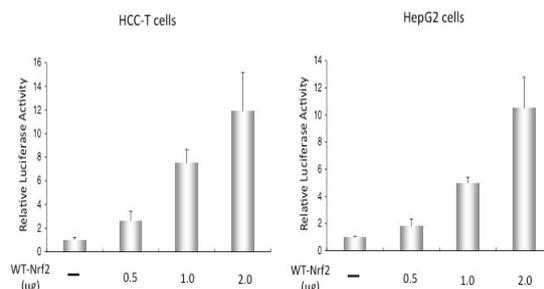
図2 肝癌細胞株におけるkeap1/Nrf2の発現



(2) Nrf2 による MMP 遺伝子の転写調節の検討
Nrf2 は転写因子として働き、Keap1 からの脱抑制制御により細胞質から核内へと移行し、抗酸化遺伝子や解毒酵素遺伝子と言った生

体防御系遺伝子群を中心とする標的遺伝子の転写活性を促進する。Nrf2 は標的遺伝子のプロモーター領域にある ARE 配列に結合することが知られているが、ARE 配列 (TGAG/CTCAGC) は c-Jun/Fos などが結合する AP-1 配列 (TGAG/CTA) と非常に相同性が高い。興味深いことに、癌の浸潤や転移能を規定する MMP 遺伝子群は AP-1 依存的に転写活性化することが知られているため、Nrf2 が MMP 遺伝子の発現調節に関与する可能性が考えられた。そこで、数多くのファミリーが存在する MMP 遺伝子の中で肝癌の進展に特に重要と考えられる MMP 遺伝子群のプロモーター配列を探索したところ、ゼラチンを基質とする MMP 遺伝子群のプロモーター領域の転写開始点近傍に存在する少なくとも2つの AP-1 配列は、ARE 配列と完全一致することが判明した。当該 MMP 遺伝子 (以下 MMP-X とする) のプロモーター配列を含む DNA をルシフェラーゼベクターに連結し、ルシフェラーゼアッセイを行った。プロモーター上流 670 bp を用いて Nrf2 を一過性に強制発現させたところ、ルシフェラーゼ活性は Nrf2 の発現量に依存して高くなることが示された。Nrf2 による MMP の転写活性化は HCC-T および HepG2 細胞において確認されたことから、細胞株の相違には依存していないことが示唆された(図3)。

図3 Nrf2発現によるMMP-X遺伝子のプロモーター活性



(3) Nrf2 による転写調節部位の検討
Nrf2 による MMP-X の転写活性化が認められたため、転写活性化調節部位の検討を行った。

転写因子結合部位の予測により、MMP-X のプロモーター領域上流には、主に1つのNF-κB結合配列と2つのARE配列が存在することが判明した。そこで、各々の転写因子結合部位に変異を導入したルシフェラーゼベクターを構築し、Nrf2強制発現によるプロモーター活性を検討した。その結果、NF-κBの変異はNrf2による転写活性化に影響しないことが明らかとなった。一方、転写開始部位上流の2カ所に認められたARE配列に対し変異を導入することにより、Nrf2による転写活性化は著明に減弱することが示され、2つのARE配列がNrf2によるMMP-X遺伝子の転写活性化に重要であることが明らかとなった。一方で、MMP-1遺伝子プロモーター領域内には完全一致したAREは認められないものの、AP-1配列によって発現調節されていることが知られている。Nrf2強制発現によるMMP-1のルシフェラーゼアッセイを行ったところ、転写の活性化は認められなかったことから、AP-1末端におけるGC配列の有無がNrf2の結合に重要であることが示唆された。

(4) Keap1/Nrf2シグナルによるMMP-Xの発現誘導

Nrf2遺伝子による直接的なMMP-X発現誘導を確認するため、Nrf2の安定発現細胞株の構築を試みた。HCC-T細胞およびHepG2細胞にNrf2を安定的に発現させたところ、Nrf2の標的遺伝子として知られ抗酸化や解毒代謝に関わるHMOX1やNQO1の発現誘導が認められた。さらに、ルシフェラーゼアッセイの結果同様にNrf2の安定発現により、AP-1結合因子であるc-Jun/Fos非依存的にMMP-X遺伝子発現が認められた。次にKeap1/Nrf2経路によるMMP-Xの発現誘導への関与を確認するため、Keap1に対するshRNAを作成し、Keap1の発現を恒常的に抑制させた細胞株を構築した。Nrf2の発現同様、Keap1の発現抑制によってもMMP-Xの発現誘導が認められ、

Keap1/Nrf2経路が直接転写活性に関与することが明らかとなった。さらに、Nrf2の活性化作用を示すtBHQや2-phenylethyl isothiocyanate添加によっても発現が著明に誘導されることが明らかとなった。

今後、本研究によって得られた結果をもとに、生理的通常条件下において腫瘍組織でのNrf2の発現意義を解析することで、Nrf2に焦点を当てた新たな浸潤転移能抑制機序の解明と発がん予防と治療法の展開が期待される。

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1件)

- ① Hitoshi Endo, Maki Niioka, Noriko Kobayashi, Mamoru Tanaka, Tetsu Watanabe. Butyrate-Producing Probiotics Reduce Nonalcoholic Fatty Liver Disease Progression in Rats: New Insight into the Probiotics for the Gut-Liver Axis, PLOS ONE, 査読有、Vol. 8, Issue 5, 2013, e63388. DOI: 10.1371/journal.pone.0063388.
- ② Hitoshi Endo, Maki Niioka, Yoshihiko Sugioka, Johbu Itoh, Kaori Kameyama, Isao Okazaki, Risto Ala-Aho, Veli-Matti Kahari, Tetsu Watanabe. Matrix Metalloproteinase-13 Promotes Recovery from Experimental Liver Cirrhosis in Rats, Pathobiology, 査読有、2011, 78:239-252. DOI:10.1159/000328841

[学会発表] (計1件)

- ① 遠藤 整、新岡 真希、渡辺 哲. プロバイオティクス製剤 MIYAIRI 588 は NASH の進展および肝腫瘍形成を予防する、第72回日本癌学会学術総会、2013. 横浜

[図書] (計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況（計1件）

名称：Nrf2 活性化剤およびその用途
発明者：渡辺 哲、遠藤 整、田中 守
権利者：学校法人東海大学、ミヤリサン製薬株式会社
種類：特許
番号：特許願 2012-100236
出願年月日：平成 24 年 4 月 25 日
国内外の別： 国内

○取得状況（計0件）

〔その他〕

ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

遠藤 整 (ENDO, Hitoshi)
東海大学・医学部・助教
研究者番号：10550551