

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26253019

研究課題名(和文)オートファジーが司る転写因子群による代謝制御機構

研究課題名(英文)Autophagy and metabolic regulation by multiple transcription factors

研究代表者

小松 雅明 (KOMATSU, Masaaki)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号：90356254

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 31,900,000円

研究成果の概要(和文)：オートファジーにより選択的に分解されるp62がユビキチンリガーゼアダプタータンパク質Keap1を不活性化し、Keap1の標的であるストレス応答性転写因子Nrf2を活性化すること機序を明らかにしてきた。このp62-Keap1-Nrf2経路がC型肝炎ウイルス陽性の肝細胞がん(HCC)において活性化し、グルクロン酸経路およびグルタチオン合成を亢進させ、HCCの増殖、抗がん剤耐性に寄与していることを見出した。さらに、p62-Keap1-Nrf2経路を標的にした抗がん剤スクリーニングを実施し、ヒット化合物を得た。このヒット化合物は、HCCの増殖、抗がん剤耐性を抑制することを確認した。

研究成果の概要(英文)：In this research project, we reveal the molecular mechanism of p62/Sqstm1-dependent malignant progression, and suggest that molecular targeting of p62/Sqstm1 represents a potential chemotherapeutic approach against hepatocellular carcinoma (HCC). Phosphorylation of p62/Sqstm1 at Ser349 directs glucose to the glucuronate pathway, and glutamine toward glutathione synthesis through activation of the transcription factor Nrf2. These changes provide HCC cells with tolerance to anti-cancer drugs and proliferation potency. Phosphorylated p62/Sqstm1 accumulates in tumor regions positive for hepatitis C virus (HCV). An inhibitor of phosphorylated p62-dependent Nrf2 activation suppresses the proliferation and anticancer agent tolerance of HCC. Our data indicate that this Nrf2 inhibitor could be used to make cancer cells less resistant to anticancer drugs, especially in HCV-positive HCC patients.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：タンパク質分解 オートファジー p62 Nbr1 Metabolism

1. 研究開始当初の背景

オートファジーは細胞質中に出現した隔離膜が細胞質成分を取り囲んだオートファゴソームが形成される過程と、オートファゴソームがリソソームと融合し細胞質成分を分解する過程からなる複雑な膜動態を伴うタンパク質分解経路である。この分解系は、平均的な大きさのタンパク質であれば100万個のタンパク質を一度に取り囲めるオートファゴソームがリソソームと融合することにより分解が完了するため、基質選択性の低い分解系と定義されてきた。しかし、1990年代前半 大隅らによる酵母オートファジー必須遺伝子 (AuTophagy-related genes: ATGs) の同定を契機 (ポスト Atg 時代突入後) (Tsukada & Ohsumi, *FEBS Letters*, 1993)に、Klionsky や Subramani らのグループはそれぞれアミノペプチダーゼ複合体やペルオキシソームがオートファジーの分子機構依存的且つ選択的に液胞に輸送されることを明らかにした (Harding et al., *J. Cell Biol.*, 1995, Sakai et al., *J. Cell Biol.*, 1998)。2004年には、吉森らにより細胞内に侵入した A 型連鎖球菌が選択的にオートファゴソームにより取り込まれ殺菌されることが報告された (Nakagawa et al., *Science*, 2004)。2005年には、Johansen らによりアダプター分子 p62 を介したオートファジーによるユビキチン陽性凝集体排除機構が提唱された (Bjorkoy et al., *J. Cell Biol.*, 2005)。時期を同じくして、オートファジー欠損マウス組織の共通の特徴として、p62 が著しく蓄積し、ユビキチン-p62 陽性の凝集体が形成されることが判明した (Komatsu et al., *Cell*, 2007)。また、2009年には、大隅および Klionsky らにより酵母ミトコンドリアの選択的オートファジーに必須な分子 Atg32 が発見された (Okamoto et al., *Dev. Cell* 2009, Kanki et al., *Dev. Cell* 2009)。さらに、Youle らのグループは、若年性パーキンソン病原因遺伝子産物であるユビキチンリガーゼ Parkin によるミトコンドリア外膜タンパク質のユビキチン化がオートファジーによる変性ミトコンドリアの除去を惹起することを報告した (Narendra et al., *J. Cell Biol.*, 2008)。この数年の間に選択的オートファジーの異常が、神経変性疾患、感染症やがんと密接に関与することが明らかになりつつあった (Mizushima N & Komatsu M, *Cell* 2011 より)。

2. 研究の目的

我々は、臓器特異的オートファジー欠損マウスの解析からオートファジーの破綻がユビキチン陽性の凝集体形成を伴った神経変性、肝障害、肝腫瘍形成、代謝性疾患を引き起こすこと (Komatsu et al., *J Cell Biol* 2005, Komatsu et al., *Nature* 2006, Komatsu et al., *PNAS* 2007, Ebato et al., *Cell Metab* 2008, Jung et al., *Cell Metab* 2008, Masiero

et al., *Cell Metab* 2009 and Takamura et al., *Gene Dev* 2011,) それら病態発症の背景にはオートファジーによって選択的に代謝されるべき特異的なユビキチン結合タンパク質 p62 および Nbr1 の蓄積が存在することを明らかにしてきた (Komatsu et al., *Cell* 2007, Kirkin et al., *Mol. Cell* 2009, Komatsu et al., *Nat Cell Biol* 2010, Inami et al., *J Cell Biol* 2011)。さらに、ごく最近、応募者らはオートファジー選択的基質群の翻訳後修飾や過剰蓄積により、糖、脂質代謝を司る転写因子の活性化ないしは不活性化が起こることを発見した (Ichimura et al., *Mol. Cell* 2013, Saito et al., *Nat. Commun.* 2016)。我々の一連の解析結果は、オートファジーの破綻による代謝性疾患や腫瘍形成はオートファジー選択的基質群による代謝関連遺伝子マスター転写因子の制御異常に起因することを意味する。しかし、その分子メカニズムおよび全身代謝における生理的意義は不明であり、オートファジー選択的基質に関わる研究を分子から個体レベルまで包括的に推進する必要があった。本研究課題では、オートファジー選択的基質であり複合体を形成する p62 および Nbr1 を構造生物学、生化学、細胞生物学を駆使して解析し、その選択的オートファジーの分子機構に迫る。また、個体レベルの解析としては作出済みの臓器特異的オートファジー欠損マウスや条件付き p62 ないしは Nbr1 欠損マウスを利用し、基質タンパク質群の変動、その結果として起こる代謝産物の変化や遺伝子発現変化をメタボローム解析およびトランスクリプトーム解析により明らかにする。本研究課題から、個体における選択的オートファジーの生理機能と共に、オートファジー選択的基質群による転写制御機構の生理的意義、さらにその異常が関与する代謝疾患やがんの病態発症機構の解明できる。

3. 研究の方法

リン酸化を介した p62 による主要なストレス応答システム Keap1-Nrf2 システムの活性化機構を生化学、細胞生物学にて検証する。リン酸化 p62 の蓄積により恒常的に転写因子 Nrf2 を活性化している肝細胞がんの Nrf2 依存的なストレス抵抗性そして糖代謝再編成を網羅的メタボローム解析 (慶應義塾大学 曾我朋義教授との共同研究) および遺伝子発現解析にて検証する。

Nrf2-Keap1 の結合阻害剤のスクリーニング方法として、FITC 等を標識した Nrf2 ETGE を含む 9mer peptide と精製 Keap1 Kelch ドメインを用いた蛍光偏光法が報告されている。この方法をリン酸化 p62 に応用した Keap1 との結合阻害剤のスクリーニング方法を確立した。東京大学創薬機構の岡部隆義教授、長野哲雄教授らとの共同研究で同センターが保有するコンパウンドを用いた蛍光偏光法によるハイスループットスクリー

ニング行う。

作成済みである肝特異的オートファジー必須遺伝子 *Atg7*, *p62* ないしは *Nbr1* 欠損マウス、それらの多重欠損マウスを用いた網羅的な代謝物解析および遺伝子発現解析を行い糖代謝、脂質代謝におけるオートファジー抑制の影響を検証する。

4. 研究成果

(1) ユビキチン-プロテアソームは細胞内のタンパク質恒常性に決定的であり、その障害は非機能的で潜在的に毒性を有する変性タンパク質、そしてユビキチン陽性タンパク質凝集体の蓄積を引き起こす。このような異常タンパク質や凝集体は *p62* などのユビキチン結合能を有するアダプタータンパク質を介して選択的オートファジーによって排除される。しかし、アダプタータンパク質の生体内における意義は十分に解析されていない。一方、我々は、*p62* がユビキチン陽性凝集体に集積し、351 番のセリン残基がリン酸化を受けると転写因子 *Nrf2* の分解因子 *Keap1* が不活化され、*Nrf2* が安定化、一連の生体防御遺伝子の発現が誘導されることを明らかにしてきた。つまり、選択的オートファジーと *Keap1-Nrf2* 経路が連動していることを意味する。しかし、その連動機構の *in vivo* における意義は不明なままであった。これらの問題点を明らかにするため、J. Mayer らのグループと共同でプロテアソーム機能が減弱したマウスを作成した。肝実質細胞特異的にプロテアソーム機能を減弱させたマウスは、ユビキチンおよび *p62* 陽性のタンパク質凝集体形成を伴った肝障害を呈した。それら凝集体は選択的にオートファジーにより排除されており、プロテアソーム減弱マウス肝細胞においてオートファジー必須遺伝子 *Atg7* を同時欠損させると、肝障害は劇的に増悪した。さらに、プロテアソーム変異マウス肝臓において *p62* は S351 がリン酸化されており、*Nrf2* の活性化が確認された。*Nrf2* の同時欠損は、肝臓プロテアソーム変異マウスの病態を著しく悪化させたことから、選択的オートファジー発動時の *Nrf2* 活性が生体防御に働くことが初めて明らかになった。これらの *in vivo* の結果は、細胞はタンパク質恒常性の破綻に応答して複数の細胞防御機構を発揮できることを意味する。

(2) *p62* は様々なシグナル伝達経路のハブ分子、そして選択的オートファジーのアダプター分子として機能する。したがって、その機能不全はシグナル伝達経路の異常やタンパク質恒常性の破綻を引き起こし、様々な疾患の要因となることが報告されている。また、*p62* はオートファゴソームに局在し、オートファジー依存的に分解されることから、オートファジーマーカーとして利用されている。一方、環境ストレスは、*p62* の遺伝子発現やオートファジーによる *p62* 分解を誘導し、

p62 のタンパク質レベルを顕著に変動させるだけでなく、*p62* の細胞内局在をも変化させる。これらの *p62* の特性は、内因性 *p62* 分子の細胞内動態や役割を評価することを難しくしてきた。この問題を解決するため、我々は C 末端に GFP を融合させた *p62-GFP* を発現するノックインマウス (*p62-GFP KI*) を作成した。このノックインマウスを利用して、生細胞における「内因性 *p62*」の動態を初めて解析し、以下のことを明らかにした。

栄養飢餓に応じて、*p62* は主にオートファゴソーム内膜に対応する LC3 陽性構造体の限局した領域に局在化した。

飢餓に応じて出現する *p62* 陽性の構造体 (オートファゴソーム) の lifespan は、LC3 陽性オートファゴソームとほぼ同じ 9.49 ± 6.46 min であった。

亜硫酸処理 (環境ストレス) は *p62-GFP* の遺伝子発現を誘導した。その結果、*p62-GFP* タンパク質は細胞内に著しく蓄積し、亜硫酸処理後 6 時間で

p62-GFP および LC3 陽性の凝集体形成が出現し、その数、大きさは時間依存的に増加した (直径 5 μ M 程度の凝集体となる)。 *Atg7* 欠損バックグラウンドでは、亜硫酸処理後 2 時間で凝集体が出現した。

亜硫酸を除去すると、巨大な構造体は小さな凝集体に分裂し、カップ状構造となり、消失した。免疫電子顕微鏡観察から、少なくとも一部の *GFP-p62* 陽性凝集体は隔離膜上に局在した。 *Atg7* 欠損バックグラウンドでは、凝集体の断片化、消失は起こらなかった。

p62-GFP KI マウス肝臓においてオートファジーを抑制すると、*p62-GFP KI* マウスは肝臓において *p62-GFP* を蓄積し、凝集体の形成を伴った肝障害を引き起こした。

これらの結果は、*p62-GFP KI* マウスが生細胞、個体における *p62* 研究 (*p62* が関与するがん代謝) やオートファジー研究 (どのようにして *p62* がオートファゴソーム形成部位に集積するか? など) の強力なツールになることを意味する。

(3) *p62-Keap1-Nrf2* 経路は、正常細胞では選択的オートファジー起動時に一過的に活性化するのに対し、肝臓がんでは恒常的に活性化しており、それが腫瘍の増殖に寄与する。しかし、如何にして腫瘍増殖に寄与するのかは不明のままであった。2012 年に、PI3K-Akt 経路が活性化されている肺がん細胞において、恒常的な *Nrf2* の活性化がグルコースおよびグルタミン代謝に関わる律速酵素の遺伝子発現を正に制御し、プリンヌクレオチドやグルタチオンの合成経路、そしてグルタミノリシスを亢進させることが明らかになった (Mitsuishi et al., *Cancer Cell* 2012)。我々は、ヒト肝臓がん株、リン酸

化 p62 を蓄積し肝腫瘍を形成する肝臓特異的 *Atg7* 欠損マウス、そして肝細胞がん患者検体を用いた解析により以下のことを明らかにした。

肝細胞がん細胞におけるリン酸化 p62 を介した Nrf2 の活性化は、グルコースから UDP-グルクロン酸の合成、およびグルタミンからグルタチオン合成を促進させた。

薬剤抱合に關与する UDP-グルクロン酸およびグルタチオンの産生亢進により、リン酸化 p62 を持つ肝細胞がん細胞は抗がん剤耐性能を獲得した。グルタチオンの産生亢進は、腫瘍の増殖を促進させた。

肝臓特異的 *Atg7* 欠損マウス肝臓において、腫瘍形成以前にプリンヌクレオチド合成やグルタチオン合成促進などの代謝変化が確認され、それは Nrf2 の同時欠損により完全に戻った。

C 型肝炎ウイルス陽性の HCC 患者において、顕著なリン酸化 p62 の蓄積が認められた。

リン酸化 p62 による Nrf2 活性化を防ぐ新規化合物 K67 を同定し、K67 が肝細胞がん細胞の増殖を抑制するとともに、既存の抗がん剤の薬効を高めることを確認した。

近年、膵臓がんをはじめとした難治性のがんに対して抗がん剤とオートファジー阻害剤（正確にはクロロキニンないしはヒドロキシクロロキニンなどのリソソーム酸性化阻害剤）の併用による臨床試験が進められている。しかし、オートファジーの抑制による抗がん作用は複雑である。実際、マウスの膵管腺がんモデルにおいては、*p53* の欠失（ヒト膵管腺がんでは一般的）によりオートファジーの抑制が腫瘍増殖を促進することが報告されている（Rosenfeldt et al., *Nature* 2013）。これは *p53* 欠失およびオートファジー抑制を介した Nrf2 活性化による同化経路の促進により説明ができるかもしれない。このことは、オートファジー抑制を基盤とした抗がん剤治療の臨床試験において、*p53* や Nrf2 シグナルなどががん代謝に関わる遺伝子変異について考慮する必要性を意味する。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

Ueno T, Komatsu M. Autophagy in the liver: functions in health and disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2017 Mar;14(3):170-184. 査読有り

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 MS, Ueno T, Ohe T, Mashino T, Wakai T, Kojima H, Okabe T, Nagano T, Motohashi H, Waguri S. Soga T, Yamamoto M, Tanaka K, Komatsu M. p62/Sqstm1 promotes malignancy of HCV-positive hepatocellular carcinoma through Nrf2-dependent metabolic reprogramming. *Nat Commun.* 2016 Jun 27;7:12030. 査読有り
Eino A, Kageyama S, Uemura T, Annoh H, Saito T, Narita I, Waguri S. Komatsu M. Sqstm1-GFP knock-in mice reveal dynamic actions of Sqstm1 during autophagy and under stress conditions in living cells. *J Cell Sci.* 2015 Dec 1;128(23):4453-61. 査読有り
Kageyama S, Sou YS, Uemura T, Kametaka S, Saito T, Ishimura R, Kouno T, Bedford L, Mayer RJ, Lee MS, Yamamoto M, Waguri S. Tanaka K, Komatsu M. Proteasome dysfunction activates autophagy and the Keap1-Nrf2 pathway. *J Biol Chem.* 2014 Sep 5;289(36):24944-55. 査読有り

〔学会発表〕(計 5 件)

Komatsu M., “p62/Sqstm1 regulates glucose and glutamine metabolisms through a transcription-factor NRF2”, Keystone Symposium on Autophagy: Molecular and Physiological Mechanism, Whistler British Columbia

Canada, 口頭, 2016 年 6 月 5-9 日

Komatsu M., “Autophagy defect and tumor development in mouse livers”, Cold Spring Harbor Asia Ubiquitin Family Autophagy and Diseases, Suzhou China, 口頭, 2016 年 4 月 18-22 日

小松雅明, “Metabolic reprogramming in human hepatocellular carcinoma by p62/SQSTM1”, BMB2015 シンポジウム Molecular Basis of

Oxidative-Electrophilic Stress Response, 神戸ポートアイランド, 口頭, 2015 年 11 月 30-12 月 4 日

Komatsu M., “Metabolic reprogramming in human hepatocellular carcinoma by p62/SQSTM1”, American Association for the study of Liver Diseases (AALD) Basic Science Symposium: *Autophagy in the Liver*, Moscone West Convention Center San

Francisco, 口頭, 2015 年 11 月 14 日
Komatsu M., "Metabolic
reprogramming in human
hepatocellular carcinoma by
p62/SQSTM1", The 7th International
Symposium on Autophagy 2015,
Smoky Willow, Huangshan, China, 口
頭, 2015 年 3 月 19-23 日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.niigata-u.ac.jp/bc1/welcome.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小松 雅明 (KOMATSU, Masaaki)
新潟大学・医歯学系・教授
研究者番号：90356254

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

和栗 聡 (WAGURI, Satoshi)
福島県立医科大学・医学部・教授
研究者番号：30244908

(4) 研究協力者

水島 恒裕 (MIZUSHIMA, Tsunehiro)
曽我 朋義 (SOGA, Tomoyoshi)
岡部 隆義 (OKABE, Takayoshi)
長野 哲雄 (NAGANO Tetsuo)