

令和元年6月7日現在

機関番号：11301

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化）

研究期間：2016～2018

課題番号：15KK0325

研究課題名（和文）オートファジーの機能破綻による肝がん転写因子Nrf2の活性化（国際共同研究強化）

研究課題名（英文）Hepatic tumor and Nrf2 activation by impaired autophagy(Fostering Joint International Research)

研究代表者

田口 恵子 (Taguchi, Keiko)

東北大学・医学系研究科・講師

研究者番号：20466527

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 11,200,000円

渡航期間： 6ヶ月

研究成果の概要（和文）：3つの化学肝発がんモデルをNrf2欠失ラットに適用して、発がんにおける転写因子Nrf2の貢献を調べた。部分肝切除法やレーザーマイクロダイセクションによる組織切片からのDNA解析手法はイタリア・カリアリ大学で習得した。スペイン・マドリード自治大学のAntonio Cuadrado教授とは、Keap1非依存的なNrf2活性化の分子メカニズムについて議論した。アメリカ・ジョンズホプキンス大学のThomas Kensler教授とは、アフラトキシンB1による肝がんモデルにおけるNrf2活性化の評価を議論した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アメリカ・イタリア・スペインの3カ国において、最新のNrf2研究に携わる研究者と共に、3年にわたって本研究を遂行できたことは大変意義深い。古くから実験モデルとして確立している化学肝発がんモデルをNrf2欠失ラットに適用することで、Nrf2がいかに毒物に対する防御系に寄与しているかを示すことができた。また、発がんにはNrf2の体性変異を獲得した細胞が生存して増殖することが示唆され、ヒトがんにおけるNrf2の活性化を治療標的とする今後の研究が期待される。

研究成果の概要（英文）：Nrf2 knockout rats were used to examine contribution of a transcription factor Nrf2 in three kinds of chemical hepatocarcinogenesis models. Partial hepatectomy and DNA extraction from tissue sections by laser capture microdissection were learned from Professor Amedeo Columbano in University of Cagliari, Italy. Keap1-independent Nrf2 activation was discussed with Professor Antonio Cuadrado in Autonomous University of Madrid in Madrid, Spain. Nrf2 activation in Aflatoxin B1-induced liver tumor models was discussed with Professor Thomas Kensler in Johns Hopkins University in Baltimore, USA.

研究分野：生化学

キーワード：Nrf2 肝臓 化学発がん

1. 研究開始当初の背景

Nrf2 は生体防御に関わる遺伝子の発現を制御する転写因子である。Nrf2 の活性は Keap1 によるユビキチン化を介したタンパク質分解によって通常は抑制されている。しかし、多くのがん細胞では、Keap1 と Nrf2 の結合阻害により、Nrf2 が分解を免れて異常に活性化している。その要因として、Keap1 や Nrf2 遺伝子の体性変異、蓄積したがん代謝物による Keap1 の機能不全、p62 タンパク質の異常蓄積などが報告され、がん細胞における異常な Nrf2 の活性化が臨床医学でも非常に注目を浴びている。

実験動物を用いた腫瘍研究でよく用いられるのは、様々な臓器を対象とした化学発がんモデルである。Nrf2 は多くの抗酸化酵素や解毒代謝に関わる酵素の発現を誘導するため、Nrf2 欠失マウスは化学発がん剤に対して脆弱性を示し、Nrf2 は化学発がん物質の解毒代謝を促進して発がんを抑制すると理解されてきた。Columbano 教授らは、Solt-Farber 肝発がんモデルにおいて、前がん病変から肝臓がんに至るまでに高頻度の Nrf2 遺伝子変異が起こることを報告した (Zavattari et al. Hepatology 2015)。それならば、Solt-Farber モデルでは Nrf2 欠失ラットは肝臓がんの発症が抑制されるという仮説が成立する。つまり、Nrf2 が化学発がん剤の解毒代謝を促進することにより発がんを抑制するのではなく、Nrf2 が発がんの促進に働くか否かを化学発がんモデルで証明する。

我々は、ゲノム編集技術を利用して Nrf2 欠失ラットを作製し (Taguchi et al. Toxicol Sci 2016)、この Nrf2 欠失ラットを用いて食品中に含まれるカビ毒であるアフラトキシン B1 による肝臓がんに関する研究に着手していた。Solt-Farber モデルやアフラトキシン B1 による肝臓がんはマウスには再現できず、実験動物としてラットの使用が必須である。

2. 研究の目的

Nrf2 欠失ラットを用いて、3つの肝発がんモデル (Solt-Farber モデル・DEN+CMD モデル・アフラトキシン B1) を用いて、Nrf2 が腫瘍形成に果たす役割を明らかにする。

本研究の遂行にあたり、3名の Nrf2 研究者と共同研究を行った。主となる派遣先である Thomas Kensler 教授 (アメリカ・ジョージア工科大学) は、30年にわたって中国を研究フィールドとしてヒトを対象とした Nrf2 活性化剤による毒性軽減に関する介入研究を行っている。ヒトと動物実験の双方を解析対象とできる Nrf2 研究の第一人者である。アフラトキシン B1 による肝臓がんに関しては、Nrf2 は解毒代謝の促進に寄与して、アフラトキシン B1 は Nrf2 変異を起こさないという説を支持している。そこで、Solt-Farber モデルを利用して化学発がんによる Nrf2 変異の誘導を提唱した Amedeo Columbano 教授 (イタリア・カリアリ大学) とも連携して、彼らが先の論文で発表した、レーザーマイクロダイセクション顕微鏡を用いた腫瘍からの DNA 解析方法を習得する。Solt-Farber モデルに加え、ジエチルニトロサミン (DEN)、コリン不足/メチオニン欠乏食 (CMD) モデルを用いる。Antonio Cuadrado 教授 (スペイン・マドリッド自治大学) からは、Keap1 に依存しない Nrf2 活性化に関する分子メカニズムの観点から最近の知見を得る。

3. 研究の方法

化学肝発がんモデルとして以下3つを用いた。

(1) Solt-Farber モデル

Solt-Farber モデルは、発がん物質 DEN 投与によるイニシエーション後、増殖抑制物質 2-アセチルアミノフルオレン (2-AAF) 混餌を与え、部分肝切除により増殖を促進することで肝臓がんを形成する。

(2) DEN+CMD モデル

DEN によるイニシエーション後に脂肪肝を惹起する CMD を投与すると肝臓がんを形成する。

(3) アフラトキシン B1 モデル

アフラトキシン B1 を反復投与して、肝臓がんを形成する。

4. 研究成果

(1) Solt-Farber モデル

Solt-Farber モデルの早期前がん病変において Nrf2 遺伝子変異が見出されている。そこで、Nrf2 欠失ラットに Solt-Farber モデルを適用し、肝臓がんにおける Nrf2 の必要性を示すことにした。しかし予想に反して、Nrf2 欠失ラットは DEN 投与後の 2-AAF 投与によって死亡したため、Nrf2 欠失ラットで肝臓がんを誘導することができなかつたため、実験打ち切りとした。Nrf2 は 2-AAF の解毒代謝に関わる酵素群の発現を制御するため、Nrf2 の欠失により 2-AAF の毒性が顕著に現れたと考察する。

(2) DEN+CMD モデル

DEN+CMD 投与した野生型では肝臓がんを形成する。前がん病変は、古くからよく用いられ

るマーカーである、グルタチオン S-転移酵素 (GSTP) やグルコース 6-リン酸デヒドロゲナーゼ (G6PD) 陽性の領域として検出される。これらの遺伝子は Nrf2 の標的遺伝子であることが報告されている。DEN+CMD を投与した野生型ラット肝臓の GSTP 陽性の前癌病変には、Solt-Farber モデルと同様に、Nrf2 の変異が 66% 認められた (Orrù et al. *J Hepatology* 2018)。DEN+CMD を投与した Nrf2 欠失ラットでは、発がんのイニシエーションは影響なかったが、前がん病変の形成が抑制された。DEN+CMD を投与した Nrf2 欠失ラットでは、慢性的・代償的な肝細胞の再生が顕著であった。ヒトの非アルコール性肝疾患を素地とする肝臓がんモデルとして、Nrf2 は発がん段階の初期で活性化されること、DEN によるイニシエーション後の細胞のクローナルな増生に Nrf2 が必須であることを示し、肝臓がんの発生における Nrf2 の重要性を示すことができた。よって、肝臓がんにおいて Nrf2 阻害剤が有効であると考えられた。

(3) アフラトキシン B1 モデル

Nrf2 欠失ラットはアフラトキシン B1 による肝傷害に対して非常に感受性が高いことを示した (Taguchi et al. *Toxicol Sci* 2016)。そこで、重篤な肝傷害による致死を避けるため、比較的低容量のアフラトキシン B1 を慢性的に曝露したモデルを作成した。それでもなお、Nrf2 欠失ラットはアフラトキシン B1 の肝傷害に非常に高い感受性を示し、大半が死亡した。野生型ラットでは病態が顕在化しないアフラトキシン B1 の投与量であるが、Nrf2 欠失ラットでは線維化を伴う肝硬変様の病態を示した。アフラトキシン B1 の解毒代謝には、Nrf2 の標的遺伝子群が関与している。よって、Nrf2 が欠失した肝細胞では、アフラトキシン B1 を解毒代謝できずに死滅し、線維化が蔓延したと考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者は下線)

[雑誌論文] (計 7 件) *co-first author、すべて査読あり

1. Taguchi K, Kensler TW. Nrf2 in liver toxicology. *Arch Pharmacol Res* 2019, in press
2. Taguchi K, Masui S, Itoh T, Miyajima A, Yamamoto M. Nrf2 activation ameliorates hepatotoxicity induced by a heme synthesis inhibitor. *Toxicol Sci* 167(1):227-238, 2019
DOI: 10.1093/toxsci/kfy233.
3. Orrù C*, Szydłowska M*, Taguchi K*, Zavattari P, Perra A, Yamamoto M, Columbano A. Genetic inactivation of Nrf2 prevents clonal expansion of initiated cells in a nutritional model of rat hepatocarcinogenesis. *J Hepatol* 69(3):635-643, 2018
DOI: 10.1016/j.jhep.2018.05.010.
4. Taguchi K, Yamamoto M. The KEAP1-NRF2 system in cancer. *Front Oncol* 7:85, 2017
DOI: 10.3389/fonc.2017.00085
5. 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. *Nature Commun* 7: 12030, 2016
DOI: 10.1038/ncomms12030.
6. Shinkai Y, Kimura T, Itagaki A, Yamamoto C, Taguchi K, Yamamoto M, Kumagai Y, Kaji T. Partial contribution of the Keap1-Nrf2 system to cadmium-mediated metallothionein expression in vascular endothelial cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 295: 37-46, 2016
DOI: 10.1016/j.taap.2016.01.020.
7. Taguchi K, Takaku M, Egnér PA, Morita M, Kaneko T, Mashimo T, Kensler TW, Yamamoto M. Generation of a new model rat: Nrf2 knockout rats are sensitive to aflatoxin B1 toxicity. *Toxicol Sci* 152(1): 40-52, 2016
DOI: 10.1093/toxsci/kfw065.

[学会発表] (計 14 件)

1. Keiko Taguchi, Nanae Osanai, Eriko Naganuma, Thomas W. Kensler, Masayuki Yamamoto. Aflatoxin B1 induces fibrosis and cirrhosis in Nrf2 knockout rats. 58th Annual Meeting of Society of Toxicology, Baltimore, USA, Mar 10-13, 2019
2. 田口恵子, 小山内七重, 佐藤由莉, 宮坂佳樹, 真下知士, 山本雅之. Keap1 欠失ラットは転写因子 Nrf2 の活性化により重篤な肝障害を引き起こす、平成 30 年度先端モデル動物支援プラットフォーム成果発表会、琵琶湖ホテル (大津)、2019 年 1 月 30-31 日
3. Keiko Taguchi. Keap1-Nrf2 system: Findings using animal models. National Institute on

Aging/National Institute of Health (NIA/NIH), Baltimore, USA. Nov 19, 2018

4. **Keiko Taguchi**, Risa Ichinohe, Masayuki Yamamoto. Nrf2 activation acquired in a transition from steatosis to liver cancer. 2017 International Congress Obesity and Metabolic Syndrome (ICOMES2017), Conrad Hotel, Seoul, South Korea, Aug 31-Sep 3, 2017
5. **田口恵子**、一戸理沙、山本雅之. Pten 欠失肝臓がんにおける Nrf2 活性獲得の意義. 第 5 回がんと代謝研究会、北海道大学医学部フラテ (札幌) 2017 年 7 月 13 日
6. **田口恵子**. オートファジーと Keap1-Nrf2 システム. 第 44 回日本毒性学会学術年会、パシフィコ横浜 (横浜) 2017 年 7 月 12 日
7. **田口恵子**. 毒性学における転写因子 Nrf2 の貢献. 第 44 回日本毒性学会学術年会、パシフィコ横浜 (横浜) 2017 年 7 月 11 日
8. **Keiko Taguchi**, Misaki Takaku, Patricia A. Egner, Thomas W. Kensler, Masayuki Yamamoto. The Nrf2 knockout rat as a toxicological tool. 56th Annual Meeting of Society of Toxicology, Baltimore, USA, Mar 12-16, 2017
9. **Keiko Taguchi**. Nrf2 activation-acquired Liver cancer. Closed seminar in University of Pittsburgh, USA, Mar 7, 2017
10. **田口恵子**、山本雅之. 毒性学における Nrf2 欠失ラットの貢献. 第 10 回ラットリソースリサーチ研究会、京都大学芝蘭会館 (京都) 2017 年 2 月 3 日
11. **田口恵子**、小松雅明、山本雅之. オートファジーの破綻による肝腫瘍と Keap1-Nrf2 システム、第 89 回日本生化学会大会、仙台国際センター、2016 年 9 月 25-27 日
12. **Keiko Taguchi**, Masaaki Komatsu, Masayuki Yamamoto. Nrf2 is a critical factor for hepatocellular adenoma in impaired autophagy. 41st NAITO Conference: Cancer Heterogeneity and Plasticity: Relevance to Therapeutic Resistance. CHÂTERAISÉ Gateaux Kingdom SAPPORO, Jul 5-8, 2016
13. **田口恵子**、増井紗帆、山本雅之. Nrf2 の恒常的活性化はヘム合成阻害剤による肝毒性を軽減する. 第 43 回日本毒性学会学術年会、ウインクあいち (名古屋) 2016 年 6 月 29 日-7 月 1 日
14. **Keiko Taguchi**, Masayuki Yamamoto. Nrf2 activation in liver cancer model mice. Closed seminar in University of Cagliari, Italy, Jun 13, 2016

〔図書〕(計 1 件)

1. **田口恵子**. 生体防御機構 Keap1-Nrf2 システムの視点から、特集 / 慢性炎症から肝胆膵癌にいたるランドスケープ、肝胆膵、77(3): 579-584、2018

〔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.dmbc.med.tohoku.ac.jp/official/index.html>

6 . 研究組織

研究協力者

〔主たる渡航先の主たる海外共同研究者〕

研究協力者氏名：トーマス・W・ケンズラー

ローマ字氏名：Thomas W. Kensler

所属研究機関名：ジョンズホプキンス大学

部局名：Environmental Health Science

職名：名誉教授

研究協力者氏名：アメデオ・コロンバーノ

ローマ字氏名：Amedeo Columbano

所属研究機関名：カリアリ大学

部局名：Scienze Biomediche

職名：教授

研究協力者氏名：アントニオ・クアドラド

ローマ字氏名：Antonio Cuadrado

所属研究機関名：マドリード自治大学

部局名：Bioquímica

職名：教授

〔その他の研究協力者〕

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

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。