

令和 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：31305

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K07379

研究課題名(和文) NRF2依存性がん細胞の代謝物による腫瘍微小環境改変メカニズムの解明

研究課題名(英文) The mechanistic analyses of modulation of Tumor microenvironment by characteristic metabolite released from NRF2-addicted cancer cells

研究代表者

北村 大志 (Kitamura, Hiroshi)

東北医科薬科大学・医学部・助教

研究者番号：20706949

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：肺がんなどで恒常的に活性化している転写因子NRF2は腫瘍形成能の上昇や放射線治療や化学療法に対する治療抵抗性を生み出すことでがんの悪性化に貢献しているが、そのメカニズムなどは不明な点が多い。また、近年NRF2活性化がんは免疫チェックポイント阻害剤に対して抵抗性を示すことが報告されている。本研究ではNRF2活性化がんは免疫抑制物質である代謝物の放出を介して、腫瘍微小環境を改変することでがんの悪性化に寄与するという仮説を検証することとした。マウス肺がんモデルなどを用いた一連の実験から、NRF2活性化がんにおいて特徴的な腫瘍浸潤免疫細胞の特徴を明らかにすることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

NRF2依存性がん細胞は悪性腫瘍をしばしば形成しており、腫瘍微小環境に中において免疫細胞やがん繊維芽細胞の機能を調節しているかといった事については現在までに実験学的には証明されていなかった。近年の解析では、免疫チェックポイント阻害剤などに対しても抵抗性を示していることがヒト肺がんデータベースより明らかになっている。本研究ではこれらのメカニズムについて有用な知見を提供することができる点で、難治がんであるNRF2活性化がんの新たな治療標的の開発に繋がる研究となることが予想され、関連分野に波及するそのインパクトや効果は大きいと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Transcription factor NRF2 is constitutively activated by somatic mutation of KEAP1 or NFE2L2 genes in lung cancer, conferring the resistance against chemotherapy and radiotherapy to cancer cells. In order to clarify the mechanisms how persistent NRF2 activation contributes to cancer malignancy, we test the hypothesis that NRF2-activated cancer cells contribute to cancer malignancy by releasing immunosuppressive metabolite. First, NRF2-activated model cancer cells which is transplantable to C57BL6 mice is successfully established to analyze the immunosuppressive feature of tumor microenvironment. In addition to the result, specific features of NRF2-activated lung cancer patients are analyzed by the public available dataset and was found that certain types of immuno were drastically changed.

研究分野：分子生物学

キーワード：腫瘍免疫 NRF2 KEAP1 代謝物 肺がん

## 1. 研究開始当初の背景

NRF2 は酸化ストレス応答において中心的役割を果たす転写因子である。通常 NRF2 は KEAP1 によりポリユビキチン化されて、プロテアソーム系により分解されている。細胞が酸化ストレスなどに曝されると KEAP1 が失活することで、NRF2 は安定化して核移行し、生体防御遺伝子群を統括的に誘導する。NRF2 は抗酸化機能、解毒機能により DNA やタンパク質の酸化障害や親電子毒物による付加体形成を防ぐことで、細胞のがん化を抑制する。一方、これらの機能はがん化した細胞においては、治療抵抗性の増大をもたらし、がんの悪性化の重要な要因となっている。KEAP1 や NRF2(NFE2L2) 遺伝子の体細胞変異などにより恒常的に NRF2 が安定化したがんは、その細胞増殖・腫瘍形成・治療抵抗性などを NRF2 機能に大きく依存して悪性化している (Kitamura H et al., *Cancer Sci*, 2018)。一方で臨床学的には、肺がんや乳がんなど様々な固形腫瘍をもつ患者において NRF2 の蓄積と患者の予後の間には負の相関性があることから (Inoue D et al., *Cancer Sci*, 2012, Onodera Y et al., *Endocr Relat Cancer*, 2014)、こうした「NRF2 依存性がん」の克服はがんの治療において重要な課題の一つであるものの、明確な治療標的の同定にはいたっていない。NRF2 依存性がんにおける NRF2 の活性化は、抗酸化機能や、薬物解毒機能の上昇、さらには、細胞増殖に必要なヌクレオチド合成系の活性化を介して、細胞自身の生存や増殖を向上させるが (Mitsuishi Y et al., *Cancer Cell* 2012, et al.), その一方で、NRF2 依存性がん細胞が、腫瘍微小環境の中に免疫細胞やがん繊維芽細胞の機能を調節しているかといった事については現在までに実験学的には証明されていない。申請者が所属する研究室では、NRF2 はがん細胞のグルコースやグルタミンの代謝を改変することで、その増殖を促進することを報告している (Mitsuishi et al., *Cancer Cell* 2012)。近年、がん細胞と免疫担当細胞の間における代謝競合 (Metabolic competition) が、抗腫瘍免疫を抑制することが報告されている (Chang et al., *Cell* 2015)。例えば、がん細胞が多量のグルコースを消費すると、腫瘍微小環境中の T 細胞は十分なグルコースを利用できず、抗腫瘍免疫が十分に機能しない。申請者は、NRF2 依存性がん細胞が腫瘍形成時に免疫応答を抑制し、抗腫瘍免疫を回避して腫瘍形成を促進させている可能性を見出した (Kitamura et al., *Oncogene* 2017)。そこで、こうした代謝競合に加えて、がん細胞が特徴的に放出する代謝物があれば、それが腫瘍微小環境を改変し、がんの悪性化を助長する可能性があるのではないかと考えた。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、がん細胞が放出する特徴的な代謝物の腫瘍微小環境への影響を解析し、がん細胞の代謝物による腫瘍微小環境の改変 (Metabolic instruction) ががんの悪性化に果たす役割を解明することである。具体的には、KEAP1 遺伝子変異により NRF2 が異常に活性化している NRF2 依存性がんを対象とし、NRF2 依存性がん細胞に特徴的な腫瘍浸潤免疫細胞のプロファイルを同定するとともに、これらの特徴は NRF2 依存性がん細胞が特異的に産生する代謝物によって形成されるかを検証することであった。さらに研究の将来的な最終目標として、これらの悪性化のメカニズムが NRF2 依存性がん細胞の治療標的としてなりうるかを検討する。そこで以下の仮説について検証することとした。

- (1) がん細胞内で NRF2 がペントースリン酸経路を活性化してプリンヌクレオチド合成を促進することにより、強力な免疫抑制作用を持つアデノシンが腫瘍微小環境中で増加し、抗腫瘍免疫が抑制される。
- (2) がん細胞内で NRF2 がイオウ代謝を促進することで、硫酸化代謝物の放出が増加し、がん宿主の悪液質や抗腫瘍免疫の抑制がおこる。

## 3. 研究の方法

(1) NRF2 依存性肺がんマウスモデルの作成・解析と NRF2 依存性肺がん細胞を用いた同種移植実験系の確立

NRF2 依存性がん細胞の腫瘍浸潤免疫細胞のプロファイルに関する解析が遅れていた理由は、マウスを用いた実験系が確立されていないことが理由の一つとして挙げられる。そこで、以下の実験系を樹立した。肺がんにおいて *KEAP1* と *KRAS* 遺伝子の体細胞変異は高い頻度で共起する。Cre リコンビナーゼにより *KRAS*<sup>G12D</sup> 変異体を誘導的に発現するマウス (*Kras*<sup>LSL-G12D/+</sup> マウス) を、条件付き *Keap1* 欠損マウス (*Keap1*<sup>F/F</sup> マウス) と交配し、*Keap1*<sup>F/F</sup>:*Kras*<sup>LSL-G12D/+</sup> マウス (*Keap1*:*Kras* マウス) を得る。さらに、Cre リコンビナーゼが作用した細胞をマーキングするために、*Rosa*<sup>LSL-tdtomato/+</sup> マウスと交配し、*Keap1*:*Kras*:tdTomato マウスを得る。対照として *Kras*:tdTomato マウスを得る。これらのマウスに Adeno-Cre ウイルスを経気道投与し、肺がんを誘導する。作成したマウス肺がんモデルから、tdTomato 陽性細胞としてがん細胞を分取して、*Keap1*:*Kras*:tdTomato 肺がん細胞 (NRF2 依存性肺がん細胞) と、*Kras*:tdTomato 肺がん細胞 (対照細胞) を株化する。

(2) NRF2 依存性肺がんからのアデノシン・硫酸化代謝物の放出機構とその意義の解明  
アデノシンの放出は、NRF2 によるペントースリン酸経路を介したプリンヌクレオチドの産生増加を反映していると予想される。また、硫酸化代謝物の放出メカニズムは未だ不明である。樹立する NRF2 依存性モデルがん細胞でこれらの性質の責任遺伝子を CRISPR/CAS9 システムで欠損させた細胞を作成し、その腫瘍免疫に対する効果を、マウス同種移植実験を行うことで検証する。

(3) ヒト肺がん患者検体における NRF2 依存性がん細胞の腫瘍免疫プロファイル解析  
ウェブデータベースで公開されているヒト肺がん患者検体の腫瘍免疫プロファイルを解析して、肺がん患者群を NRF2 の標的遺伝子群の発現量に応じて NRF2 が活性化している患者検体とそうでないグループにわけ、腫瘍に浸潤している免疫細胞の特徴を探る。特に腫瘍免疫に關与する免疫細胞群に着目した。

#### **4. 研究成果**

NRF2 依存性がんの腫瘍免疫プロファイルを実験的に解析するために、NRF2 依存性肺がんモデルマウスと同種移植可能な NRF2 依存性モデルがん細胞を樹立した。樹立したモデルマウスやモデルがん細胞は、コントロールマウス・細胞と比較して、NRF2 依存性の腫瘍形成能を示した。NRF2 依存性がん細胞での腫瘍免疫プロファイルを、NRF2 依存性肺がんモデルマウスや同種移植可能な NRF2 依存性モデルがん細胞由来のマウス腫瘍サンプルを用いて組織染色、フローサイトメトリーなどの多様な実験手法により解析し、その一部の結果についてはすでに報告した (Hayashi M et al., Cancer Res. 2020)。また、CBioportal(<https://www.cbioportal.org/>)で公開されているヒト肺がん患者検体群のデータベースを利用した解析では、NRF2 活性化がんの患者検体グループは、マクロファージや T 細胞、さらに樹状細胞などいくつかの腫瘍抑制性の免疫細胞のプロファイルが、コントロール群が有意に異なっていることが示された (Kitamura H et al., FEBS Lett. 2022)。NRF2 依存性がん細胞は免疫チェックポイント阻害剤に対して抵抗性を示すことが示されているが、我々の明らかにしてきた研究結果は、これらの現象を説明するメカニズムとなることが示唆している。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Saeidi S, Kim SJ, Guillen-Quispe YN, Jagadeesh ASV, Han HJ, Kim SH, Zhong X, Piao JY, Kim SJ, Jeong J, Shin YJ, Cha YJ, Lee HB, Han W, Min SH, Tian W, Kitamura H, Surh YJ	4. 巻 36
2. 論文標題 Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase NIMA-interacting 1 directly binds and stabilizes Nrf2 in breast cancer.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 FASEB J	6. 最初と最後の頁 1-16
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1096/fj.202100776RR.	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 該当する
1. 著者名 Saigusa D, Motoike U, Saito S, Zorzi M, Aoki Y, Kitamura H, Suzuki M, Katsuoka F, Ishii H, Kinoshita K, Motohashi H, Yammaoto M.	4. 巻 111
2. 論文標題 Impacts of NRF2 Activation in Non-Small-Cell Lung Cancer Cell Lines on Extracellular Metabolites.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 667-678
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.14278	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 Hayashi M, Kuga A, Suzuki M, Panda Harit, Kitamura H, Motohashi H, Yamamoto M.	4. 巻 80
2. 論文標題 Microenvironmental activation of Nrf2 restricts the progression of Nrf2-activated malignant tumors.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Research	6. 最初と最後の頁 3331-3344
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1158/0008-5472.CAN-19-2888	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 Okazaki K, Anzawa H, Liu Z, Ota N, Kitamura H, Onodera Y, Alam MM, Matsumaru D, Suzuki T, Katsuoka F, Tadaka S, Motoike I, Watanabe M, Hayasaka K, Sakurada A, Okada Y, Yamamoto M, Suzuki T, Kinoshita K, Sekine H, Motohashi H.	4. 巻 11
2. 論文標題 Enhancer remodeling promotes tumor-initiating activity in NRF2-activated non-small cell lung cancers.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Communication	6. 最初と最後の頁 1-19
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-020-19593-0	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 Oishi T, Matsumaru D, Ota N, Kitamura H, Zhang T, Honkura Y, Katori Y, Mootohashi H.	4. 巻 6
2. 論文標題 Activation of the NRF2 pathway in Keap1-knockdown mice attenuates progression of age-related hearing loss.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 NPJ Aging Mech Dis	6. 最初と最後の頁 1-15
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14278	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 Saito T, Kuma A, Sugiura Y, Ichimura Y, Obata M, Kitamura H, Okuda S, Lee HC, Ikeda K, Kanegae Y, Saito I, Auwerx J, Motohashi H, Suematsu M, Soga T, Yokomizo T, Waguri S, Mizushima N, Komatsu M.	4. 巻 10
2. 論文標題 Autophagy regulates lipid metabolism through selective turnover of NCoR1.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Communication	6. 最初と最後の頁 1-16
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-019-08829-3	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 該当する

1. 著者名 Hiroshi Kitamura, Tetsuya Oishi, Shohei Murakami, Tomoe Yamada-Kato, Isao Okunishi, Masayuki Yamamoto, Yukio Katori, Hozumi Motohashi	4. 巻 1934
2. 論文標題 Establishment of Neh2-Cre:tdTomato reporter mouse for monitoring the exposure history to electrophilic stress	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Free Radic Biol Med	6. 最初と最後の頁 610-619
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.freeradbiomed.2022.11.004	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 Kitamura Hiroshi, Takeda Haruna, Motohashi Hozumi	4. 巻 596
2. 論文標題 Genetic, metabolic and immunological features of cancers with NRF2 addiction	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 FEBS Letters	6. 最初と最後の頁 1981 ~ 1993
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/1873-3468.14458	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 -

〔学会発表〕 計21件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 8件）

1. 発表者名 Hiroshi Kitamura, Tetsuya Oishi, Shohei Murakami, Yukio Katori, Hozumi Motohashi.
2. 発表標題 Establishment of a transgenic mouse line for monitoring exposure history to electrophilic stress.
3. 学会等名 第155回東北大学加齢医学研究所 集談会（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 加藤伸史、北村大志、村上昌平、河部剛史、石井直人、亀井尚、本橋ほづみ
2. 発表標題 炎症性腸疾患におけるシスチントランスポーター-xCTの機能解析
3. 学会等名 日本生化学会東北支部第87回例会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 北村大志、大石哲也、村上昌平、香取幸夫、本橋ほづみ
2. 発表標題 親電子性ストレス曝露履歴モニタリングマウスの樹立
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 加藤伸史、北村大志、村上昌平、河部剛史、石井直人、亀井尚、本橋ほづみ
2. 発表標題 炎症性腸疾患におけるシスチントランスポーター-xCTの機能解析
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大石哲也、松丸大輔、北村大志、本蔵陽平、香取幸夫、本橋ほづみ
2. 発表標題 KEAP1の抑制によるNRF2経路の活性化がもたらす加齢性難聴の予防効果の検討
3. 学会等名 日本生化学会東北支部 第86回例会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hiroshi Kitamura, Tetsuya Oishi, Tomoe Kato, Isao Okunishi, Hozumi Motohashi.
2. 発表標題 Establishment of a transgenic mouse line for monitoring exposure history to electrophilic stress
3. 学会等名 AAIC20 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hiroshi Kitamura, Yoshiaki Onodera, Takashi Suzuki, Hozumi Motohashi.
2. 発表標題 Establishment of a transgenic mouse line for monitoring exposure history to electrophilic stress
3. 学会等名 155th IDAC Bi Annual Meeting, (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tetsuya Oishi, Hiroshi Kitamura, Yukio Katori, Hozumi Motohashi.
2. 発表標題 Establishment of a transgenic mouse line for monitoring exposure history to electrophilic stress.
3. 学会等名 The 9th Biennial Meeting of Society for Free Radical Research-Asia (SFRR-Asia). (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岡崎慶斗、安澤隼人、北村大志、小野寺好明、Md. Morshedul Alam、松丸大輔、太田奈緒、桜田晃、岡田克典、勝岡史城、山本雅之、鈴木貴、木下賢吾、関根弘樹、本橋ほづみ
2. 発表標題 非小細胞性肺がんにおけるエンハンサーリモデリングによるNRF2-NOTCH3経路の活性化と幹細胞性への貢献。
3. 学会等名 日本生化学会東北支部 第85回例会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大石哲也、北村大志、香取幸夫、本橋ほづみ。
2. 発表標題 酸化ストレスに対するNRF2活性化履歴モニタリングマウスの作成。
3. 学会等名 本生化学会東北支部 第85回例会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大石哲也、北村大志、香取幸夫、本橋ほづみ
2. 発表標題 酸化ストレスに対するNRF2活性化履歴モニタリングマウスの作成
3. 学会等名 第72回日本酸化ストレス学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tetsuya Oishi, Hiroshi Kitamura, Yukio Katori, Hozumi Motohashi.
2. 発表標題 Establishment of a transgenic mouse line for monitoring exposure history to electrophilic stress.
3. 学会等名 The Environmental Response V (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名	Keito Okazaki, Hayato Anzawa, Hiroshi Kitamura, Yoshiaki Onodera, Md. Morshedul Alam, Daisuke Matsumaru, Takuma Suzuki, Fumiki Katsuoka, Nao Ota, Akira Sakurada, Yoshinori Okada, Masayuki Yamamoto, Takashi Suzuki, Kengo Kinoshita, Hiroki Sekine, Hozumi Motohashi.
2. 発表標題	Enhancer remodeling at the NOTCH3 locus licenses NRF2 for the promotion of a stem-like phenotype in non-small cell lung cancers.
3. 学会等名	The Environmental Response V (国際学会)
4. 発表年	2019年

1. 発表者名	岩城英也, 関根弘樹, 村上昌平, 加藤伸史, 北村大志, 福田真嗣, 曾我朋義, 角田 洋一, 正宗淳, 本橋ほづみ
2. 発表標題	Inhibition of xCT, cystine/glutamate transporter, suppresses chronic inflammation in a mouse. model of inflammatory bowel disease
3. 学会等名	The 12th International Conference on the Biology, Chemistry, and Therapeutic Applications of Nitric Oxide (国際学会)
4. 発表年	2022年

1. 発表者名	生田和史, 矢島美彩子, 北村大志, 神田輝
2. 発表標題	胎盤栄養膜由来microRNA群によるサイトメガロウイルス産生の誘導
3. 学会等名	第46回国際ヘルペスウイルスワークショップ (国際学会)
4. 発表年	2022年

1. 発表者名	北村大志, 神田輝, 本橋ほづみ
2. 発表標題	NRF2依存性がんの脆弱性を生み出す因子の解析
3. 学会等名	第81回日本癌学会学術総会
4. 発表年	2022年

1. 発表者名 生田和史, 矢島美彩子, 北村大志, 神田輝
2. 発表標題 胎盤で高発現するmicroRNA群によるサイトメガロウイルス産生の誘導
3. 学会等名 第74回日本細菌学会東北支部会学術集会・総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 北村大志, 矢島美彩子, 生田和史, 神田輝
2. 発表標題 EB ウイルスゲノムの東アジア地域間の多様性に関する系統解析
3. 学会等名 第31回EBV感染症研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 神田輝, 北村大志, 生田和史, 清野透
2. 発表標題 改変コンディショナルリプログラミング法によるEBウイルス陽性胃がん細胞株化の試み
3. 学会等名 第69回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 生田 和史, 矢島 美彩子, 北村 大志, 神田 輝
2. 発表標題 胎盤栄養膜由来microRNA群によるサイトメガロウイルス産生の誘導
3. 学会等名 第69回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 神田輝, 北村大志
2. 発表標題 EBV複製時におけるhost-shutoffとRNAポリメラーゼIIの機能修飾
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------