

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K16350

研究課題名（和文）がんの悪性化をもたらす遺伝子発現ドミノ効果の検証と意義の解明

研究課題名（英文）Research for unveiled molecular mechanism underlying cancer malignancy

研究代表者

岡崎 慶斗（Okazaki, Keito）

東北大学・加齢医学研究所・助教

研究者番号：70826289

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）：私達は、転写因子NRF2が恒常的に活性化している予後不良なNRF2活性化がんにおいて、NRF2が、一時的な活性化では生じない特徴的なエンハンサーを形成して、NRF2活性化がん特異的な標的遺伝子群を活性化していることを明らかにした。その中で、NOTCH3を制御するエンハンサーは、腫瘍幹細胞性の維持に重要であることを明らかにした。私達はさらに研究を進め、NRF2はCEBPBと協調的に作用することで、NOTCH3を制御するエンハンサーに加えて、薬剤耐性に関わる遺伝子群のエンハンサーを制御し、がんの悪性化をもたらすことを証明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

私達は、NRF2活性化がんの特徴的なNRF2の働きを明らかにすることで、がん幹細胞性に必須なゲノム領域を同定した。そして、その領域の働きにより産生されるNOTCH3タンパク質が、NRF2活性化がんという難治性がんに対する新しい治療標的として有効であることを見出した。NRF2活性化がんは、がんの遺伝子変異の解析から診断可能であることから、本研究成果は、がんの遺伝子診断に基づいたオーダーメイドがん治療のさきがけとなることが期待される。

研究成果の概要（英文）：We found that persistently activated NRF2 in non-small cell lung cancer generates enhancers at gene loci that are not normally regulated by transiently activated NRF2 under physiological conditions. These enhancers regulate NRF2-activated cancer specific target genes. Elevated accumulation of CEBPB in NRF2-activated NSCLCs is found to be one of the prerequisites for establishment of the unique NRF2-dependent enhancers, among which the NOTCH3 enhancer is shown to be critical for promotion of tumor-initiating activity. Enhancer remodeling mediated by NRF2-CEBPB cooperativity promotes not only tumor-initiating activity but also drug resistance and drives malignancy of NRF2-activated NSCLCs.

研究分野：肺がんの基礎研究

キーワード：NRF2 NOTCH3 CEBPB

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

転写因子 NRF2 は、活性酸素種や親電子性毒物などの刺激により一過性に活性化され、抗酸化タンパク質や解毒酵素を誘導し、生体防御機構における中心的役割を果たしている。一方、非小細胞性肺がんや頭頸部がんなどでは NRF2 が恒常的に活性化し、がんの悪性化をもたらしている。このような NRF2 活性化がんは、その高い悪性度を NRF2 に大きく依存しており、NRF2 の阻害が顕著な抗腫瘍効果をもたらす。しかしながら、生体防御における NRF2 が担う重要な役割を鑑みれば、担がん患者に NRF2 阻害剤を投与することには様々なリスクが伴うと予想される。そこで、私達は複数の NRF2 活性化がん細胞株と NRF2 非活性化がん細胞株を用いて、NRF2 活性化がんの特異的な標的遺伝子を複数同定した。次に私達は、腫瘍幹細胞性を支える分子に着目して解析を行い、NRF2 活性化がん特異的な標的遺伝子の中で、NOTCH3 が幹細胞性の維持に大きく貢献し、悪性化を支えていることを明らかにした。さらに、NOTCH3 を制御するエンハンサー領域 (NOTCH3 エンハンサー) を同定し、もう一つの転写因子である CEBPB が NRF2 と協調的に働くことが、NOTCH3 エンハンサーの活性化に重要であることを見出した。

2. 研究の目的

私達は NOTCH3 を含む NRF2 活性化がんの特異的な NRF2 標的遺伝子群を同定したが、本研究では、その詳細な分子基盤を明らかにすること、NRF2 活性化がんにおける NOTCH3 エンハンサーの生物学的意義を検証することを目的とした。また、NOTCH3 エンハンサーの制御機構として明らかにした NRF2-CEBPB 連携の、ゲノムワイドな転写活性化への貢献を調べることを目的とした。

3. 研究の方法

NRF2 活性化がん細胞である A549 細胞を用いて、NRF2 をノックダウンしてヒストン H3K27ac アセチル化 (H3K27ac) 抗体によるクロマチン免疫沈降シーケンス (ChIP シーケンス) を行い、NRF2 活性化がんにおける、NRF2 依存的なエンハンサーの形成について検証した。続いて、3 種類の NRF2 活性化がん細胞株を使用し、NOTCH3 エンハンサーのゲノム配列を CRISPR-CAS9 システムにより改変した細胞 (N3E 細胞) を作成し、異種移植実験モデルなどを用いて、その生物学的重要性を検証した。また、A549 細胞を用いて、CEBPB をノックダウンして H3K27ac 抗体による ChIP シーケンスと RNA シーケンスを行うなどして、NRF2 活性化がんにおける NRF2 と CEBPB による協調的な転写活性化機構について、ゲノムワイドに解析した。

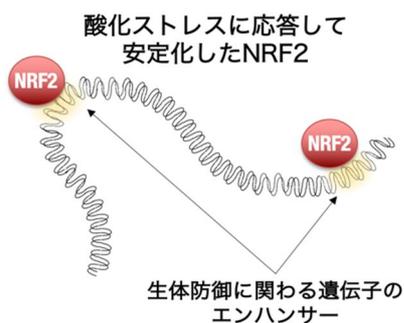
4. 研究成果

私達はChIP シーケンスを用いた一連の解析を行い、NRF2 活性化がん細胞では NRF2 非活性化がん細胞には存在しない特徴的なエンハンサーが形成されることで、NRF2 活性化がん特異的な標的遺伝子群を活性化していることを明らかにした。そして、その多くの領域において CEBPB が結合し、転写活性化に寄与していることを明らかにした。次に、NRF2 活性化がん細胞に特徴的なエンハンサーの

一つである *NOTCH3* エンハンサーを改変した N3E 細胞を使用し、腫瘍幹細胞を濃縮する特殊な培養方法やマウスへの異種移植実験、連続移植実験などを行い、NRF2 活性化がんで *NOTCH3* エンハンサーが、その腫瘍幹細胞性を担う重要なエンハンサーであることを証明した(図1)。一方、NRF2-CEBPB 連携のゲノムワイドな検証では、CEBPB は NRF2 の標的遺伝子であり、ゲノム上複数の箇所で NRF2 と CEBPB が非常に近接していること、同部位においてお互いが協調して結合することによりエンハンサーを制御していることを証明した。また、ChIP シーケンスと RNA シーケンスを用いた解析から、NRF2 活性化がんでは、NRF2 と CEBPB は *NOTCH3* を介した腫瘍幹細胞性の維持のみならず、*AKR1C1* を含む多くの薬剤耐性遺伝子の制御を協調して担っていることを明らかにした(図2)。

私達は以上の研究成果をまとめ、2020年に Nature communications 誌に、また 2022年に The Journal of Biochemistry 誌に論文を投稿し、受理されている。

正常細胞・普通のがん細胞



NRF2活性化がん細胞

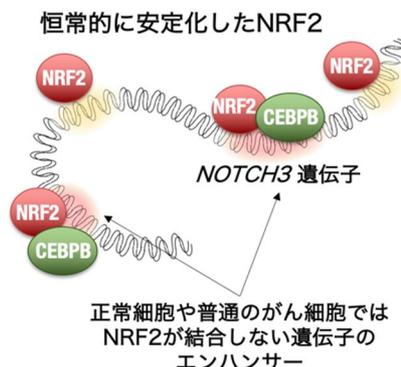


図1 ゲノム上での NRF2 の結合部位を調べると、NRF2 活性化がん細胞では、正常細胞や通常のがん細胞とは異なる部位に NRF2 の結合が認められる。NRF2 は、もう一つの転写因子 CEBPB と協調的に働くことにより、NRF2 活性化がんに特徴的な遺伝子座に作用できるようになる。その一つが *NOTCH3* 遺伝子座であり、NRF2 が結合することでエンハンサーが形成されて *NOTCH3* 遺伝子の発現が強力に活性化されている。*NOTCH3* は、NRF2 活性化がん細胞の幹細胞性を増強し、悪性化に寄与する。

NRF2活性化がん細胞

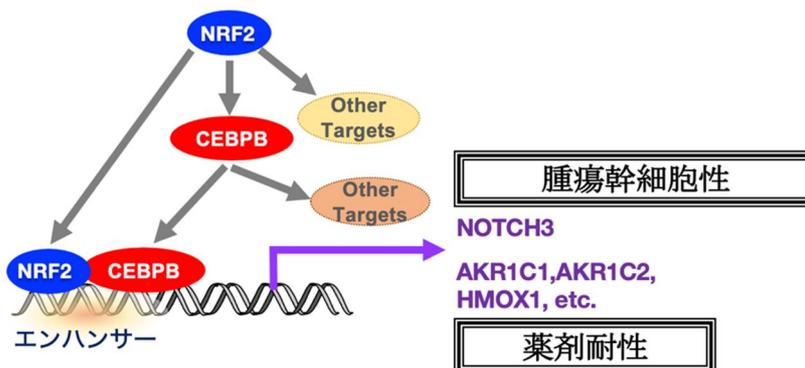


図2 NRF2 活性化がんにおいて、NRF2 は CEBPB を標的遺伝子として活性化し、両者がゲノム上で協調的に働くことで、*NOTCH3* のみならず、*AKR1C1* や *AKR1C2*、*HMOX1* など薬剤耐性に働く遺伝子群を活性化し、NRF2 活性化がんの悪性化に貢献する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Okazaki Keito, Anzawa Hayato, Liu Zun, Suzuki Takashi, Kinoshita Kengo, Sekine Hiroki, Motohashi Hozumi	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 Communications	6. 最初と最後の頁 -
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 Okazaki Keito, Papagiannakopoulos Thales, Motohashi Hozumi	4. 巻 12
2. 論文標題 Metabolic features of cancer cells in NRF2 addiction status	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biophysical Reviews	6. 最初と最後の頁 435 ~ 441
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12551-020-00659-8	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 Okazaki Keito, Anzawa Hayato, Katsuoka Fumiki, Kinoshita Kengo, Sekine Hiroki, Motohashi Hozumi	4. 巻 171
2. 論文標題 CEBPB is required for NRF2-mediated drug resistance in NRF2-activated non-small cell lung cancer cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 567 ~ 578
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jb/mvac013	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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 岡崎慶斗、本橋ほづみ
2. 発表標題 NRF2活性化がんの悪性化をもたらすエンハンサー・リモデリング
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 岡崎慶斗、本橋ほづみ	4. 発行年 2020年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 7ページ
3. 書名 がん微小環境と標的治療	

〔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
---------	---------