

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月10日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22300328

研究課題名（和文） 活性酸素産生遺伝子 Nox1 による発がんの制御機構の研究

研究課題名（英文） Functional study on the regulatory role of reactive oxygen species-generating oxidase Nox1 in cancer development

研究代表者

鎌田 徹 (KAMATA TOHRU)

信州大学・医学部・教授

研究者番号：40056304

研究成果の概要（和文）：ヒト発癌における活性酸素(ROS)産生遺伝子 Nox ファミリーの機能的役割を解明すべく研究を展開した。Nox1,4 はセネセンス、大腸上皮組織の潰瘍と癌における Wnt-β-catenin シグナルとホメオスタシスの維持、TGF-β による EMT、脳腫瘍のシグナルを Nox5 は HTLV-1 ウィルスによる細胞癌化を媒介することを発見した。Nox に由来する ROS は発癌と炎症過程に重要な役割を果たし、Nox は癌治療の分子標的となりうる。

研究成果の概要（英文）：Research effort has been made to investigate the functional role of ROS-generating Nox family enzymes in cancer development. We have found that Nox1 and Nox4 mediate cellular senescence, both Wnt-β-catenin signaling in colon cancer and recovery of inflammation in the colon epithelium, and that Nox5 is required for adult T-cell leukemia virus-induced transformation. These results further support that Nox-derived ROS play an essential role in carcinogenesis and inflammation and underscore importance of Nox enzymes as therapeutic targets in cancer prevention.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	5,800,000	1,740,000	7,540,000
2011年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
2012年度	3,000,000	900,000	3,900,000
年度			
年度			
総計	13,100,000	3,930,000	17,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：腫瘍学・腫瘍生物学

キーワード：Nox4, Ras, Wnt, 活性酸素, EMT, HTLV-1

## 1. 研究開始当初の背景

細胞内活性酸素(ROS)の蓄積は発癌の原因の一つとして考えられてきたが、その分子機構は十分解明されていない。一方、細胞内 ROS の主要発生源である NADPH oxidase (Nox) ファミリー Nox1~5, Duox1,2 の発癌過程への寄与は十分理解されていなかった。我々は、他に先行して Nox1 が Ras 発癌過程を媒介し (Cancer Res. 2004; Cancer Sci. 2009.

Review) Nox4 がヒト膀胱癌細胞の生存 (Oncogene, 2006) やメラノーマの増殖 (Cancer Res. 2009) に関与することを明らかにしてきた。この発見は、Nox の産生する ROS が情報伝達分子として発癌機構を調節することを示唆する。本研究では癌予防・治療法の開発を目指して、さらに Nox ファミリーのヒト発癌における機能的役割を解明することを旨とした。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は Nox ファミリーによるヒト発癌の制御機構及びその生理機能についてさらに理解を深め、将来の疾患の治療予防に役立てようとするところにある。次の3点を骨子とした。

(1) 大腸組織幹細胞の増殖と分化を調節しその破綻が発癌と炎症に寄与する Wnt シグナル経路における Nox1 の調節的役割の解明。

(2) Nox4 の脳腫瘍細胞でのシグナル伝達及び膵臓癌の Epithelial-Mesenchymal transition (EMT)における役割の解明。

(3) Nox5 の成人性 T細胞白血病(ATL)発症への関与の解明。

## 3. 研究の方法

(1) Nox1, Nox4 の senescence への関与の解析 H-RasV12-transfected 初代胎児線維芽細胞において、siRNA を用い、 $\beta$ -gal, tumor suppressor の発現を指標に Nox1, Nox4 の関与を検討した。

(2) Nox1 による Wnt signal 調節の解析

Wnt3a ligand を大腸癌細胞株に処理し、Nox1 による ROS 産生を Luminol アッセイで測定。Nox1siRNA, NRX の 5'-IAF 標識、共焦点レーザー顕微鏡、TCF レポーターアッセイ、IB 等を用いて Nox1 の Wnt signal 経路への関与を検討する。

(3) 炎症修復過程における Nox1 の機能 wt と Nox1KO マウスに DSS 投与して大腸炎を引き起こしてから回復期における大腸上皮粘膜組織の修復を colonal, Goblet cells の増殖・分化を指標として比較検討する。病理染色、IHC, IB, real time RT-PCR を用いる。

(4) 脳腫瘍細胞シグナル伝達、TGF- $\beta$  による EMT における Nox4 の役割 glioblastoma 細胞から、PTP1B の基質 trapping mutant の pull-down アッセイ、MS 解析で Nox4 の下流標的蛋白を同定する。膵癌細胞株において、TGF- $\beta$  による EMT 誘導への Nox4 の関与を EMT マーカーの発現を指標として検討する。

(5) HTLV-1 transformation 過程での Nox5 の機能 Nox5 siRNA を用いて HTLV-1 トランスホーム T細胞の増殖、生存、浸潤、造腫瘍能に Nox5 が関与するかを生化学・分子生物学的手法、動物実験を用いて解析する。

## 4. 研究成果

(1) Nox1 と Nox4 から産生される ROS( $H_2O_2$ ) は、Ras 発がん遺伝子による senescence (不可逆的細胞増殖停止) の誘導を媒介することを明らかにした。(図1)

(2) Nox1 に由来する ROS が、レドックス蛋白 nucleoredoxin (NRX) を酸化して、Wnt- $\beta$ -catenin-TCF シグナル経路を活性化して cyclinD1/c-myc を誘導し、大腸癌細胞の増殖に寄与することを明らかにした。(図2)

(3) さらに、Nox1KO マウスを用いて、潰瘍性大腸炎の回復期において Nox1 が腸上皮組織の修復、炎症からの回復に必須的役割を果たすという新事実を見出した。Nox1 に由来する ROS が、大腸上皮幹細胞の増殖・分化を司る Wnt3a シグナルを媒介することによって修復過程に寄与することを示した(投稿中)。

(4) 悪性脳腫瘍(glioblastoma)の増殖、浸潤を Nox4 が媒介し、さらにそのシグナル伝達を検討した結果、Nox4-PTP1B-新規チロシンリン酸蛋白 colonin 1C のシグナル伝達経路を発見した(投稿中)。

(5) Nox4 は TGF- $\beta$  による膵癌細胞の EMT の誘導を媒介することを見出した。患者検体で、TGF- $\beta$ 、EMT マーカー(N-cadherin), Nox4 の発現の亢進が膵癌組織で相関することを突き止めた。このことは Nox4 レドックスシグナルが TGF- $\beta$  による EMT の調節に重要な役割を果たすことを示唆する(投稿中)。(図3)

(6) HTLV-1 で癌化した T細胞では、Jak-STAT3 経路によって発現亢進が誘導された Nox5 が、細胞増殖、浸潤を媒介すること、実際の ATL 患者末梢血 T細胞で Nox5 の過剰発現を発見した。Nox ファミリーが白血病の発症においても重要な寄与をしていることを示す(投稿中)。

これら一連の成果は Nox ファミリー oxidase に由来する ROS が発癌・炎症の様々な過程(増殖、浸潤、転移、上皮組織のホメオスタシス)に重要な媒介的役割を果たしていることを解明した点で大きな意義がある。今後、この細胞株レベルの結果を in vivo (動物) レベルで検証する必要がある。Nox 阻害剤の開発は癌や他の疾患の治療薬開発のため重要になると考えられる。

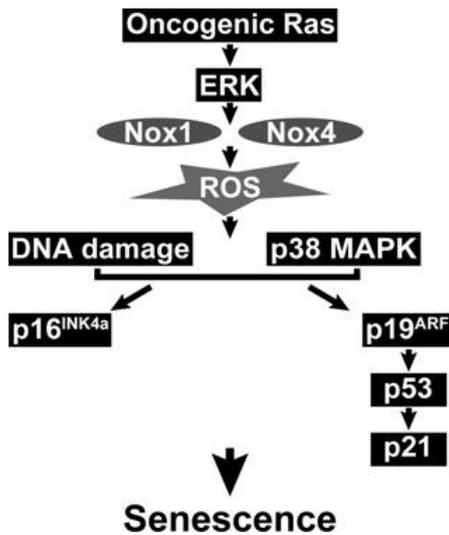


図 1.

Model for Ras-induced senescence controlled by Nox1 and Nox4. Oncogenic Ras up-regulates the expression of Nox1 in primary rodent fibroblasts or the expression of Nox4 in primary human embryonic lung cells through MEK/ERK. Increased Nox1- or Nox4-mediated ROS generation induces DNA damage or p38MAPK activation, which in turn activates both the p19Arf-p53-p21 pathway and the p16 pathway, thereby leading to senescence.

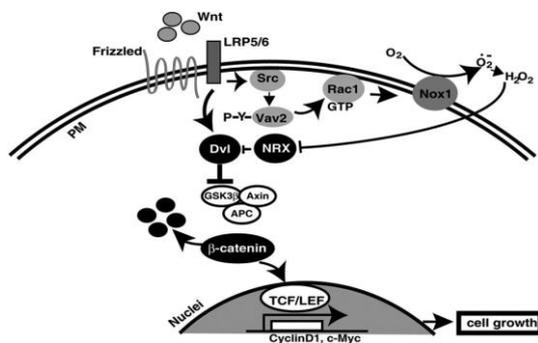


図 2.

Schematic model for Nox1 regulation of the canonical Wnt pathway. Wnt ligand binding to its receptor complexes Frizzled and LRP5/6 recruits Dvl and transmits activation signals to the destruction complexes Axin, APC, and GSK3 $\beta$ . The ligand-receptor complexes concurrently trigger sequential activation of Src kinase, the Rac1-GEF Vav2 through Src-dependent tyrosine phosphorylation, and Rac1. Activated Rac1 induces the generation of Nox1-derived ROS, which, in turn, oxidizes NRX and dissociates NRX from Dvl. Liberated Dvl stabilizes  $\beta$ -catenin by suppressing the destruction complexes, and  $\beta$ -catenin activates transcription of TCF-target growth controlling genes, such as cyclin D1 and c-Myc, contributing to cell proliferation. Under basal conditions, NRX binds to Dvl, thereby suppressing Wnt signaling.

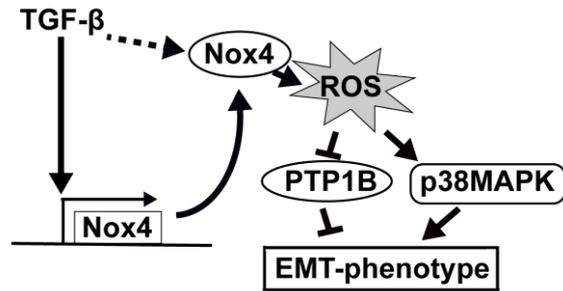


図 3.

Schematic model for Nox4 regulation of TGF- $\beta$ -induced EMT signaling. TGF- $\beta$  induces elevated production of Nox4-derived ROS through *de novo* transcription of Nox4. Direct activation of Nox4 by TGF- $\beta$  signaling may also lead to an increase in ROS generation. Nox4-derived ROS oxidize PTP1B, thereby antagonizing its negative regulatory effect on TGF- $\beta$ -induced E-cadherin expression. Alternatively, Nox4 mediates TGF- $\beta$ -induced p38MAPK activation, which upregulates Snail and represses E-cadherin expression. Nox4 may contribute to TGF- $\beta$ -promoted EMT signaling, at least in part, through these two pathways.

## 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 3 件)

- ① Kodama R, Kato M, Furuta S, Ueno S, Zhang Y, Matsuno K, Yabe-Nishimura C, Tanaka E, Kamata T. ROS-generating oxidases Nox1 and Nox4 contribute to oncogenic Ras-induced premature senescence. *Genes to Cells*.18, 32-41, 2013. 査読有  
DOI: 10.1111/gtc.12015.
- ② Kajla S, Mondol AS, Nagasawa A, Zhang Y, Kato M, Matsuno K, Yabe-Nishimura C, Kamata T. A crucial role for Nox 1 in redox-dependent regulation of Wnt- $\beta$ -catenin signaling. *FASEB J*. 26:2049-2059, 2012. 査読有  
DOI: 10.1096/fj.11-196360.
- ③ Shinohara M, Adachi Y, Mitsushita J, Kuwabara M, Nagasawa A, Harada S, Furuta S, Zhang Y, Seheli K, Miyazaki H, Kamata T. Reactive oxygen generated by NADPH oxidase 1 (Nox1) contributes to cell invasion by regulating matrix metalloproteinase-9 production and cell migration. *J Biol Chem*. 285: 4481-4488, 2010. 査読有  
DOI: 10.1074/jbc.M109.071779.

〔学会発表〕(計11件)

- ① 平賀理佐子、鎌田徹 膝がんにおける TGF- $\beta$  依存性 EMT の新しい誘導機構 Nox4 を介したレドックス制御、第 71 回日本癌学会、2012.9.19,札幌市、ロイトン札幌
- ② Kamata T., Kajla S, Abdus M, Nagasawa A, Zhang Y, Kato M. A crucial role of for Nox1 in redox-dependent regulation of canonical Wnt- $\beta$ -catenin signaling, Mechanisms & Models of Cancer, 2012.8.15, Cold Spring Harbor Laboratory, NY, USA.
- ③ 重村倫成、塩原正明、藤井雅寛、田中勇悦、古田秀一、鎌田徹 HTLV-1 トランスフォーメーションにおけるスーパーオキシド産生遺伝子 Nox5 の媒介的役割、第 70 回日本癌学会、2011.10.3, 名古屋国際会議場
- ④ モンドールアブドウス、鎌田徹 Rac1 依存性 NADPH oxidase1 によって産生される活性酸素は Wnt- $\beta$ -catenin シグナルを調節する、第 70 回日本癌学会、2011.10.3,名古屋国際会議場
- ⑤ 鎌田徹、モンドールアブドウス NADPH oxidase (Nox)1 による Wnt- $\beta$ -catenin シグナリングの調節と発癌における意義、第 70 回日本癌学会、2011.10.3,名古屋国際会議場
- ⑥ 鎌田徹、重村倫成、塩原正明、藤井雅寛、田中勇悦、古田秀一 活性酸素産生遺伝子 Nox5 は HTLV-1 トランスホーム細胞の増殖を媒介する、第 84 回日本生化学会、2011. 9. 22, 京都国際会議場
- ⑦ 安達喜文、鎌田徹 Regulatory mechanism of Ras-ERK signaling responsive transcription factor GATA-6 that medistes the expression of NADPH oxidase (Nox)1,第 83 回日本生化学会、2010.12.9,神戸ポータランド
- ⑧ 古田秀一、児玉亮、加藤真良、鎌田徹 A novel mediating role of superoxide-generating Nox4 in Ras oncogene-induced premature senescence,第 83 回日本生化学会、2010.12.9,神戸ポータランド
- ⑨ 児玉亮、加藤真良、古田秀一、鎌田徹 Ras 発癌遺伝子により誘導されるセネセンスの新機構: Nox4 レドックスシグナリングの関与、第 69 回日本癌学会、2010.9.23,大阪国際会議場
- ⑩ 安達喜文、鎌田徹 Ras/ERK シグナルによる GATA-6 リン酸化と NADPH オキシターゼ 1(Nox1)遺伝子発現の制御機構、第 69 回日本癌学会、2010.9.23,

大阪国際会議場

- ⑪ 塩原正明、重村倫成、藤井雅寛、田中勇悦、鎌田徹 HTLV-1 感染 T 細胞の増殖・生存における活性酸素産生酵素 NOX5 の新たな機能的役割、第 69 回日本癌学会、2010.9.23,大阪国際会議場

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.shinshu-u.ac.jp/graduate/>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

鎌田 徹 (KAMATA TOHRU)

信州大学・医学部・教授

研究者番号: 40056304

### (2)研究分担者

安達 喜文 (ADACHI YOSHIFUMI)

信州大学・医学部・准教授

研究者番号: 50201893

古田 秀一 (FURITA SYUICHI)

信州大学・医学部・助教

研究者番号: 80126705

加藤 真良 (KATOH MASAYOSHI)

信州大学・医学部・助教

研究者番号: 70402104

### (3)連携研究者

若林 雄一 (WAKABAYASI YUICHI)

新潟大学・医歯学系・准教授

研究者番号: 40303119