

令和 6 年 5 月 9 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19450

研究課題名（和文）がん微小環境構成要素としての前がん細胞の役割

研究課題名（英文）Role of precancerous cells as components of the tumor microenvironment

研究代表者

山本 雅之（Yamamoto, Masayuki）

東北大学・東北メディカル・メガバンク機構・教授

研究者番号：50166823

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：がん細胞の多くは、長い年月をかけてDNA変異を蓄積することで形成される。この過程では、様々な前がん細胞が生み出される。従来、前がん細胞は、がん細胞形成の単なる途中経過としか捉えられておらず、それ以外の役割は考慮されてこなかった。本研究では、多くのがんにおいて悪性化に関与することが知られているKEAP1-NRF2系に注目して解析したところ、NRF2活性化を伴う悪性腫瘍についても、周囲の正常細胞でのNRF2を活性化させることで腫瘍を抑制できることを明らかにした。また、KEAP1遺伝子変異を持つ扁平上皮細胞は消失するのに対し、NRF2遺伝子変異を持つ扁平上皮細胞は長く生存が可能であることを発見した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果は、前がん細胞からがん細胞の形成過程において、KEAP1-NRF2系の変異が重要な役割を担うことを明らかにした。この知見は、悪性度の高いNRF2活性化がんの治療法の開発に有益な情報を与えるものである。また、本研究では、NRF2が活性化したがんモデルマウスの作出にも成功した。今後、同モデルマウスの新規治療薬開発へ向けた応用が進むものと期待される。

研究成果の概要（英文）：Many cancer cells are formed by accumulating DNA mutations over a long period of time. During this process, various pre-cancerous cells are produced. Pre-cancerous cells have been regarded as merely an intermediate stage in the formation of cancer cells, and their other roles have not been considered. In this study, we focused on the KEAP1-NRF2 system, which is known to be involved in the malignant transformation of many cancers, and revealed that even in malignant tumors accompanied by NRF2 activation, tumors can be suppressed by activating NRF2 in surrounding normal cells. We also discovered that squamous epithelial cells with KEAP1 gene mutations disappear, whereas squamous epithelial cells with NRF2 gene mutations can survive for a long time.

研究分野：分子医化学

キーワード：がん悪性化

## 1. 研究開始当初の背景

がん細胞の多くは、長い年月をかけて DNA 変異を蓄積することで形成される。この過程では、様々なクローン(前がん細胞)が生み出される。従来、前がん細胞は、がん細胞形成の単なる途中経過としか捉えられておらず、それ以外の役割は考慮されてこなかった。

そこで、本研究では、多くのがんにおいてがん悪性化に関与することが知られている KEAP1-NRF2 系に注目した。食道がんや肺がんの約 20-30%には、転写因子 NRF2 が常に活性化するような遺伝子変異が生じており、これによりがん細胞は抗がん剤治療や放射線治療に対する抵抗性を獲得することが知られている。このような NRF2 活性化を伴う悪性腫瘍に対して、がん細胞における NRF2 を抑制する治療法が検討されている。しかし、NRF2 はストレスから正常細胞を守る役割もあるため、NRF2 の抑制は副作用の懸念があり、実用化されていない。一方で、免疫細胞などの正常細胞で NRF2 を活性化すると、腫瘍の進行を抑制できることが報告されている。NRF2 活性化を伴う悪性腫瘍についても、周囲の正常細胞での NRF2 を活性化させることで、腫瘍を抑制できるかは、これまで検討されていなかった。

また、食道扁平上皮がんでは NRF2 の異常な活性化を誘導する遺伝子変異が高い頻度で発生し悪性化しやすいため、NRF2 が活性化した食道扁平上皮がんに対する有効な治療法の開発が望まれている。しかし、これまで NRF2 が活性化した食道扁平上皮がんのモデルマウスは作製されていなかった。

## 2. 研究の目的

本研究では、いくつかのがんモデルマウスを用いて、前がん細胞が周囲の細胞(正常細胞およびがん細胞)に与える影響を検証することを目的とした。また、ヒトの食道扁平上皮がんでは、KEAP1 遺伝子変異よりも NRF2 遺伝子変異の頻度が高いことが知られているが、そのメカニズムを明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

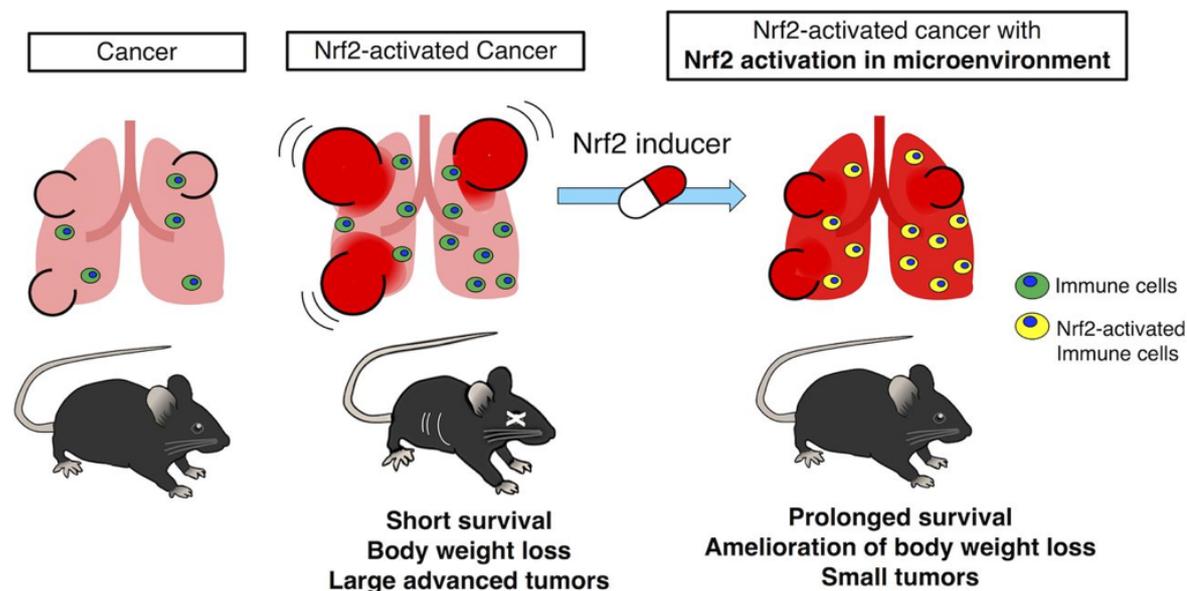
- 1) NRF2 活性化を伴う悪性腫瘍についても、周囲の正常細胞での NRF2 を活性化させることで、腫瘍を抑制できるか検討した。
- 2) NRF2 活性化を伴う食道がんの形成機構を明らかにする目的で、食道上皮全体の細胞および上皮の一部の細胞で、NRF2 タンパク質を分解する KEAP1 を欠失させることで、NRF2 を活性化したマウスを作製し、その食道扁平上皮の細胞運命を調べた。
- 3) ヒト食道がん由来 NRF2-L30F 変異体を誘導的に発現するマウス系統を作製し、KEAP1 欠失した場合の NRF2 活性化の影響との比較を行った。

## 4. 研究成果

### 微小環境での NRF2 活性化は、NRF2 活性化を伴う悪性腫瘍の進行を制限する

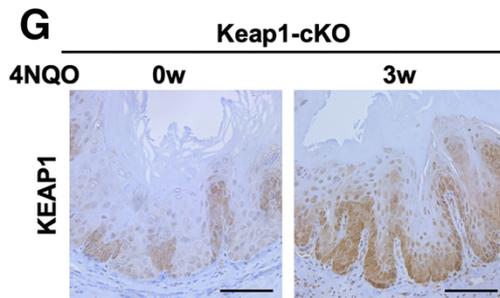
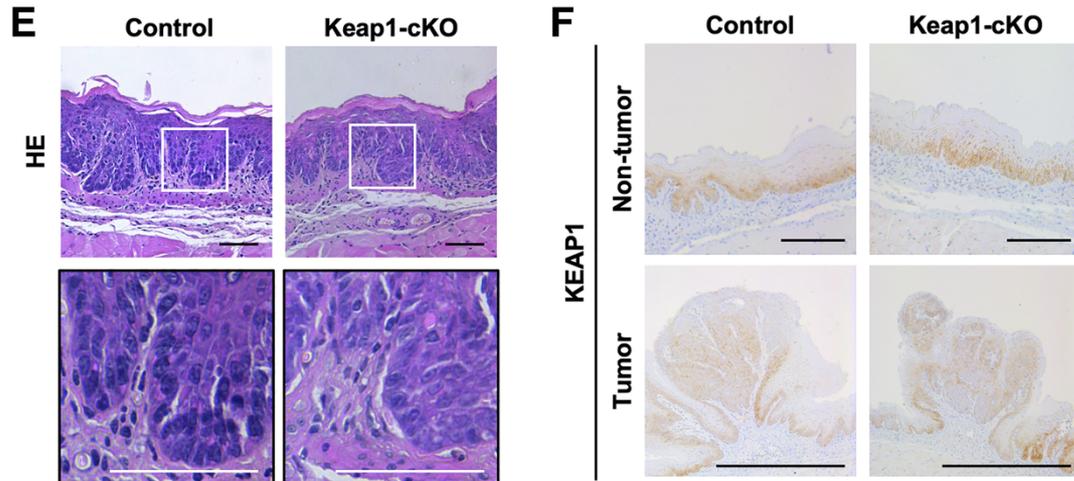
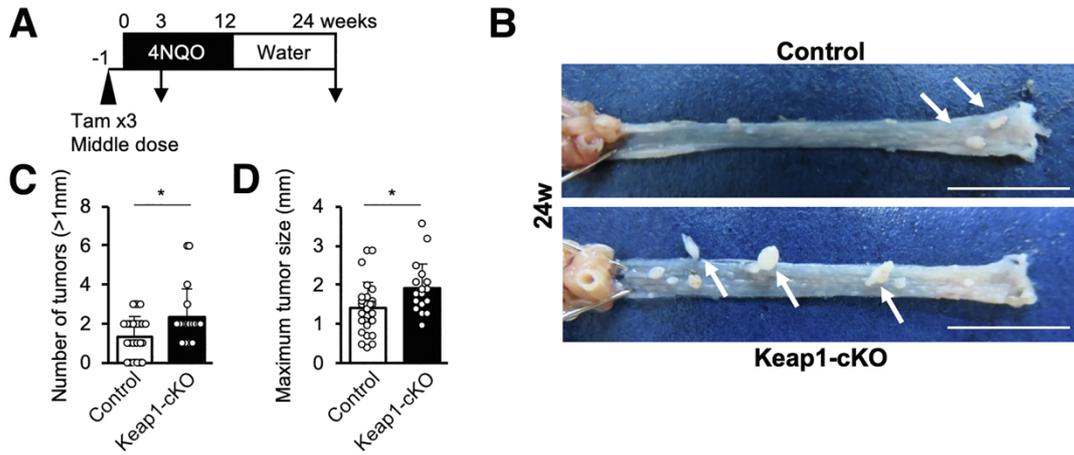
NRF2 は、細胞が毒物や酸化ストレスに曝された際に活性化し、これらのストレスから細胞を防御する役割をもつ転写因子である。肺がんの約 20-30%には、NRF2 が常に活性化するような遺伝子変異が生じており、これによりがん細胞は抗がん剤治療や放射線治療に対する抵抗性を獲得することが知られている。このような NRF2 活性化を伴う悪性腫瘍に対して、がん細胞における NRF2 を抑制する治療法が検討されている。しかし、NRF2 はストレスから正常細胞を守る役割もあるため、NRF2 の抑制は副作用の懸念があり、実用化されていない。一方で、免疫細胞などの正常細胞で NRF2 を活性化すると、腫瘍の進行を抑制できることが報告されている (*Cancer Prev Res* 2014)。そこで本研究では、NRF2 活性化を伴う悪性腫瘍についても、周囲の正常細胞での NRF2 を活性化させることで、腫瘍を抑制できるか検討した。KEAP1 タンパク

質の量を減らすことで NRF2 を全身で活性化させたマウスと、対照となる野生型のマウスに、NRF2 活性化肺がんを作らせ、がんの進行を観察しました。野生型マウスと比べて、全身で NRF2 を活性化したマウスは、腫瘍の大きさが減少し、生存率が上昇した。さらに、全身で NRF2 を活性化したマウスにおいて、血液細胞（免疫細胞）でのみ NRF2 を活性化しないようにすると、腫瘍抑制効果が弱まったことから、特に免疫細胞における NRF2 活性化が腫瘍抑制に重要であることがわかった。NRF2 は正常細胞をストレスから保護する役割をもつため、NRF2 を抑制する治療法に比べて、この治療法では副作用が少なくなると考えられた。この研究成果は、予後不良のがんに対する新しい治療法の開発に結びつくものと期待される。



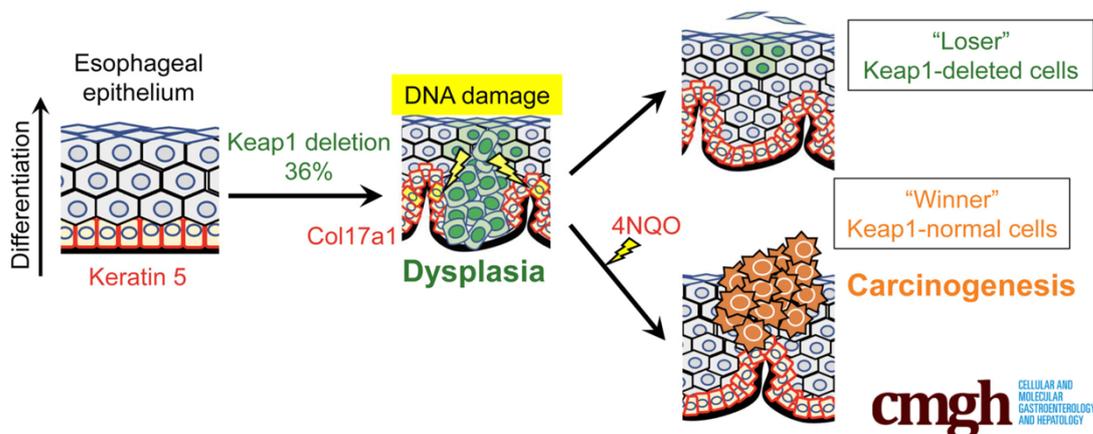
### 細胞内 NRF2 発現量が化学発がんにおける食道上皮細胞の運命を決定する

NRF2 は、生体防御酵素群の発現を誘導して、発がん物質に対する細胞保護効果を強める働きをする。一方、NRF2 欠失マウスでは種々の発がん物質に対する感受性が高まっており、化学発がんが起りやすいことが知られている。しかし、従来のモデルでは NRF2 を全身性に欠失した状態のマウスでの化学発がんを検討しており、正常細胞と NRF2 欠失細胞が混在する条件での化学発がんは調べられていなかった。本研究では、食道上皮において NRF2 欠失細胞と正常細胞がほぼ同等に混在するマウスを作成し、同マウスに発がん物質 4-ニトロキノリン-1-オキサイド (4NQO) を投与して、同上皮における正常細胞と NRF2 欠失細胞の挙動を検討した。本マウスの食道上皮においては、通常環境では NRF2 欠失細胞と正常細胞が混在した。しかし、4NQO を曝露した際には NRF2 欠失細胞が選択的に排除され、存在しなくなっていた。4NQO が誘導した腫瘍の大半は NRF2 欠失細胞由来ではなく、NRF2 発現細胞由来であった。これらの結果から、従来の予想に反して、化学発がん剤は NRF2 欠失細胞ではなく、発現細胞をがんに導くこと、また、NRF2 欠失細胞が食道上皮に出現しても、その組織環境から、直ぐに発がんする運命をたどる可能性は低いことが理解される。



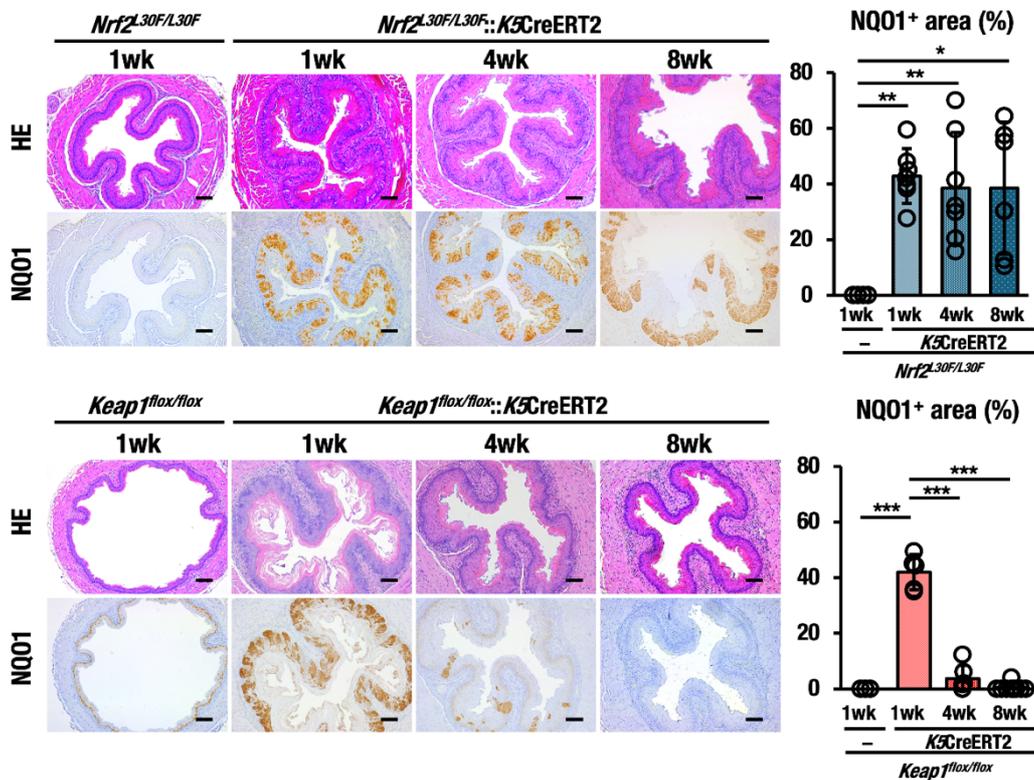
**H**

Tumor type	n	KEAP1	
		Positive	Negative
Control	19	19 (100%)	0 (0%)
Keap1-cKO	27	26 (96%)	1 (4%)

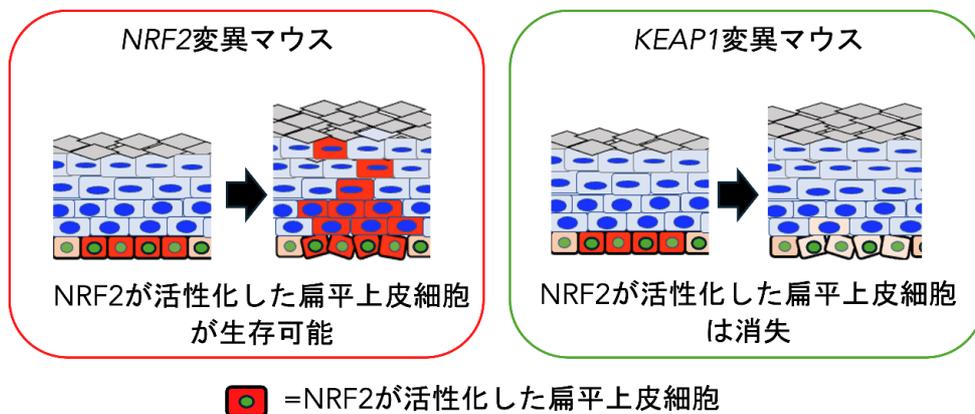


**NRF2 変異は食道扁平上皮細胞の生存に、より有利である**

ヒトの食道扁平上皮がんでは、KEAP1 遺伝子変異よりも NRF2 遺伝子変異の頻度が高いことに注目した。NRF2 の遺伝子変異を導入したマウスを新たに作製して、NRF2 変異体マウスと KEAP1 変異体マウスの食道組織を比較すると、どちらのモデルマウスでも同等に NRF2 の活性化を誘導されているにもかかわらず、KEAP1 遺伝子変異を持つ扁平上皮細胞は周囲の細胞との競合に負けて消失してしまうのに対し、NRF2 遺伝子変異を持つ扁平上皮細胞は長く生存が可能であることを発見しました。



さらに、NRF2 遺伝子変異とがん抑制遺伝子である Trp53 遺伝子変異をマウスの扁平上皮細胞に同時に発生させると、食道扁平上皮がん類似した形態を持つ異型細胞が発生することがわかりました。一方、この変化は KEAP1 遺伝子変異と Trp53 遺伝子変異を同時に発生させた場合では確認されませんでした。これらの結果から、KEAP1 遺伝子変異と NRF2 遺伝子変異は NRF2 を活性化する点では似た性質を持っていますが、扁平上皮細胞では NRF2 遺伝子変異発生すると、特にがん化に寄与しやすいことが示されました。すなわち、これがヒト食道扁平上皮がんで NRF2 遺伝子変異が多い理由と理解されます。



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Kuga Ayumi, Tsuchida Kouhei, Panda Harit, Horiuchi Makoto, Otsuki Akihito, Taguchi Keiko, Katsuoka Fumiki, Suzuki Mikiko, Yamamoto Masayuki	4. 巻 42
2. 論文標題 The <i> </i>-TrCP-Mediated Pathway Cooperates with the Keap1-Mediated Pathway in Nrf2 Degradation <i>In Vivo</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Molecular and Cellular Biology	6. 最初と最後の頁 e0056321
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/mcb.00563-21	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 Hirose Wataru, Horiuchi Makoto, Li Donghan, Motoike Ikuko N., Zhang Lin, Nishi Hafumi, Taniyama Yusuke, Kamei Takashi, Suzuki Mikiko, Kinoshita Kengo, Katsuoka Fumiki, Taguchi Keiko, Yamamoto Masayuki	4. 巻 15
2. 論文標題 Selective Elimination of NRF2-Activated Cells by Competition With Neighboring Cells in the Esophageal Epithelium	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology	6. 最初と最後の頁 153 ~ 178
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jcmgh.2022.09.004	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 Hirose Wataru, Oshikiri Hiroyuki, Taguchi Keiko, Yamamoto Masayuki	4. 巻 14
2. 論文標題 The KEAP1-NRF2 System and Esophageal Cancer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 4702 ~ 4702
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cancers14194702	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 Takahashi Jun, Suzuki Takafumi, Sato Miu, Nitta Shuji, Yaguchi Nahoko, Muta Tatsuki, Tsuchida Kouhei, Suda Hiromi, Morita Masanobu, Hamada Shin, Masamune Atsushi, Takahashi Satoru, Kamei Takashi, Yamamoto Masayuki	4. 巻 43
2. 論文標題 Differential squamous cell fates elicited by NRF2 gain of function versus KEAP1 loss of function	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 114104 ~ 114104
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.celrep.2024.114104	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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 廣瀬亘、田口恵子、山本雅之
2. 発表標題 食道上皮におけるNrf2活性化細胞の周囲細胞の代償的増殖
3. 学会等名 日本生化学会東北支部第88回例会・シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 廣瀬亘、堀内真、田口恵子、谷山祐亮、山本雅之、亀井尚
2. 発表標題 細胞競合によるNRF2活性化細胞の排除機構
3. 学会等名 第76回日本食道学会学術集会
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
研究分担者	鈴木 未来子  (Suzuki Mikiko)  (80508309)	東北大学・医学系研究科・准教授    (11301)	

	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
研究協力者	鈴木 隆史  (Suzuki Takafumi)  (70508308)	東北大学・医学系研究科・准教授    (11301)	

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