

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 24 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460384

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

研究課題名(英文)Hepatic tumor and Nrf2 activation by impaired autophagy

研究代表者

田口 恵子 (Taguchi, Keiko)

東北大学・医学系研究科・助教

研究者番号：20466527

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：オートファジーは細胞内のタンパク質の品質管理を担う機構として注目されている。オートファジーの機能破綻は、p62タンパク質の異常蓄積を介して転写因子Nrf2を活性化する。オートファジーの機能破綻マウスは肝腫瘍を形成するが、本研究において、オートファジーの機能破綻により活性化したNrf2が肝腫瘍の発症に関与することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Autophagy is a mechanism to maintain protein quality in cells. impaired autophagy leads to Nrf2 activation through aberrant accumulation of p62 protein. Autophagy-impaired mice develop hepatic tumors. In this study, Nrf2 activation contributes to tumor formations.

研究分野：生化学

キーワード：Nrf2 オートファジー 肝腫瘍

1. 研究開始当初の背景

Nrf2 は、内因性および外因性の酸化ストレスに対して生体防御に働く転写因子である。通常、Nrf2 はユビキチンリガーゼアダプターである Keap1 と結合しており、ユビキチン化されてプロテアソームにより分解される。酸化ストレスによる Keap1 タンパク質の修飾や、Keap1 や Nrf2 の発現低下などにより、Keap1-Nrf2 結合が破綻すると、Nrf2 はユビキチン化を免れて安定化し、核に蓄積（活性化）する。Nrf2 の下流遺伝子群には、異物代謝や抗酸化など、生体防御に貢献する遺伝子産物が多く含まれている。さらに最近、申請者らは、マイクロアレイ、ChIP シークエンス、およびメタボロームの網羅的解析により、Nrf2 の新規標的遺伝子として、がん細胞の増殖促進に働く遺伝子群を新たに同定した (Mitsuishi & Taguchi et al. 2012)。この発見により、恒常的に活性化した Nrf2 は、がん細胞の増殖を促進する、負の作用を示すことが分かってきた。

オートファジーはタンパク質の品質管理を担う機構として注目されている。申請者らは、小松雅明教授（新潟大学）との共同研究により、オートファジーが機能破綻したときに異常蓄積する p62 が Keap1-Nrf2 の結合を阻害して、Nrf2 を活性化することを明らかとした (Komatsu et al. 2010)。オートファジーに必須の Atg7 遺伝子を肝臓特異的に欠損させたマウス (Atg7-Alb マウス) の肝臓では、オートファジー不全により p62 が異常蓄積する。この Atg7-Alb マウスは肝傷害を呈するが、その原因は p62 の蓄積そのものではなく、p62 の蓄積が引き起こす Nrf2 の活性化であることを、申請者らは報告した (Taguchi et al. 2012)。p62 の異常蓄積は、古くから組織学的な解析により、肝がんなど肝臓疾患でよくみられる現象として知られていた。Atg7-Alb マウスは 1 年齢で肝良性腫瘍を発症する。この Atg7-Alb マウスにおける腫瘍形成は、p62 を欠損することにより抑制されることから、オートファジー不全により蓄積する p62 が肝がんの原因であることが分かった (Takamura et al., 2011)。それでは、p62 の蓄積により活性化する Nrf2 は Atg7-Alb マウスにおける腫瘍形成に寄与するのだろうか？これまでに、Atg7-Alb マウスにおける肝腫瘍に Nrf2 の寄与があるか否かは申請時には解析されていなかった。

2. 研究の目的

オートファジーはタンパク質分解機構として生体の恒常性を維持している。その機能破綻は、タンパク質の異常蓄積をもたらして、細胞に傷害を与える。オートファジー不全マウスを長期的に観察すると肝腫瘍を発症する。これまでに申請者らは、オートファジー不全により異常蓄積する p62 タンパク質が転

写因子 Nrf2 を恒常的に活性化する分子メカニズムを明らかとした。一方で、多くのがん細胞では、Nrf2 の恒常的な活性化ががん細胞の生存を有利にしている。本研究では、オートファジーの機能破綻による肝腫瘍に Nrf2 が関与するか否かを調べることを目的として、マウス個体レベルにおける病態変化と、分子レベルにおける Nrf2 の活性化を解析する。

3. 研究の方法

Nrf2 はオートファジーの機能不全がもたらす肝腫瘍形成に関与するか、関与がある場合に Nrf2 の寄与はどこにあるのかを調べるために、1 年齢のオートファジー不全マウスと Nrf2 欠損マウスの二重欠損 (Atg7-Alb::Nrf2^{-/-}) マウスの肝臓を解析する。個体レベルにおいて Atg7-Alb マウスが発症する肝腫瘍の病態解析から、分子レベルにおける遺伝子・タンパク質発現解析を行い、オートファジーの機能破綻が引き起こす肝腫瘍形成における Nrf2 の役割を明らかとする。

【オートファジー不全マウスと Nrf2 の二重欠損マウスの作製】

肝臓特異的 Albumin-Cre (Alb) トランスジェニックマウス、オートファジー不全 (Atg7-Alb) マウス、Nrf2 欠損 (Nrf2^{-/-}) マウスを交配して、Atg7::Nrf2 二重欠損 (Atg7-Alb::Nrf2^{-/-}) マウスを作製した。これまでの解析から、この二重欠損マウスは若齢において Atg7-Alb マウスにおける肝傷害を軽減するので、Nrf2 の恒常的活性化が肝臓に傷害を与えることが明らかとなっている。そこで Atg7-Alb::Nrf2^{-/-}マウスを、肝良性腫瘍を発症する Atg7-Alb マウスと同様に 1 年齢まで経過観察した。

【オートファジー不全マウスの肝腫瘍における Nrf2 の寄与】

1 年齢の Atg7-Alb および Atg7-Alb::Nrf2^{-/-}マウスの肝臓を解析した。組織学的解析により、肝病態を観察して、病理学者による診断を受けた。さらに、免疫染色およびリアルタイム PCR により、Atg7-Alb マウス肝臓で蓄積する p62 の組織内分布や発現を調べた。Nrf2 の活性は、核画分における Nrf2 の蓄積としてウェスタンブロットにて評価した。

4. 研究成果

Atg7-Alb マウスは、既報通りに 1 年齢において肝良性腫瘍を発症し、1 年齢以降で死亡例がみられた。一方、Atg7-Alb::Nrf2^{-/-}マウスは肝良性腫瘍の形成は著しく抑制され、死亡率も減少した。Atg7-Alb マウスにおいて、オ

オートファジーの不全により蓄積する p62 は肝細胞に蓄積するが、興味深いことに、Atg7-Alb::Nrf2^{-/-}マウスでは肝細胞ではなく胆管細胞に p62 の蓄積が観察された。Atg7-Alb::Nrf2^{-/-}マウスに発生する腫瘍部は p62 陽性であり、肝細胞ではなく胆管細胞に由来する可能性が考えられた。Atg7-Alb マウスは、p62 の異常蓄積により Nrf2 を活性化させるが、Atg7-Alb::Nrf2^{-/-}マウスは Nrf2 が欠失しているために Nrf2 の活性化はみられなかった。

オートファジー関連遺伝子 (18 種) が Nrf2 の標的遺伝子である可能性を考えて、Nrf2 活性化剤ジエチルマレイミド (DEM) 処理した Hepa1 細胞におけるクロマチン免疫沈降 シークエンス (ChIP) データ (Hirotzu et al. 2012) と、Nrf2 が活性化した Keap1-Alb マウスや Atg7-Alb マウス (若齢) におけるマイクロアレイ解析データを用いて、オートファジー関連遺伝子における Nrf2 と MafG の結合と遺伝子発現を網羅的に解析した。マイクロアレイにおいて、オートファジー関連遺伝子の発現変化はみられなかったが、Atg7 遺伝子と Atg10 遺伝子内には Nrf2 と MafG が重複して結合すると考えられる抗酸化剤応答配列 (ARE) がいくつか見出された。

Atg7^{flox} マウスではなく Atg5^{flox} マウスにより作出した Atg5-Alb::Nrf2^{-/-}マウスにおいて腫瘍形成が著しく抑制されることは報告されたが (Ni et al. J Hepatol 2014)、詳細な解析はなされていなかった。本研究の解析により、Atg7-Alb::Nrf2^{-/-}マウスにおいて Nrf2 を欠失することによりオートファジー機能破綻による腫瘍形成が抑制されること、また、本マウスでは p62 発現が胆管細胞に局限されることなど新たなデータが得られた。さらに、小松雅明教授 (新潟大学) との共同研究により、全身性 Nrf2 欠損マウスではなく、条件付 Nrf2^{flox} マウスを用いて作出した肝臓特異的 Atg7:Nrf2 (Atg7:Nrf2-Alb) 欠損マウスの肝臓をメタボローム解析に提供した。p62 が蓄積した肝臓がん細胞株を用いた解析において、p62 が Nrf2 依存的な代謝プログラミングを介して肝腫瘍の悪性化に寄与することを明らかとした (Saito et al. 2016)。

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 10 件)

すべて査読あり

1. Taguchi K, Yamamoto M. The KEAP1-NRF2 system in cancer. *Front Oncol* 7: 85. DOI: 10.3389/fonc.2017.00085

2. 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.
3. Taguchi K, Takaku M, Egner 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.
4. 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.
5. Kanamori M, Higa T, Sonoda Y, Murakami S, Dodo M, Kitamura H, Taguchi K, Shibata T, Watanabe M, Suzuki H, Shibahara I, Saito R, Yamashita Y, Kumabe T, Yamamoto M, Motohashi H, Tominaga T. Activation of the NRF2 pathway and its impact on the prognosis of anaplastic glioma patients. *Neuro Oncol* 17(4): 555-565, 2015 DOI: 10.1093/neuonc/nou282.
6. Ando R, Shima H, Tamahara T, Sato Y, Watanabe-Matsui M, Kato H, Sax N, Motohashi H, Taguchi K, Yamamoto M, Nio M, Maeda T, Ochiai K, Muto A, Igarashi K. The transcription factor Bach2 is phosphorylated at multiple sites in murine B cells but a single site prevents its nuclear localization. *J Biol Chem* 291(4): 1826-1840, 2015 DOI: pii: jbc.M115.661702.
7. Miyazaki Y, Shimizu A, Pastan I, Taguchi K, Naganuma E, Suzuki T, Hosoya T, Yokoo T, Saito A, Miyata T, Yamamoto M, Matsusaka T. Keap1 inhibition attenuates glomerulosclerosis. *Nephrol Dial Transplant* 29(4): 783-791, 2014 DOI: 10.1093/ndt/gfu002

8. **Taguchi K**, Hirano I, Itoh T, Tanaka M, Miyajima A, Suzuki A, Motohashi H, Yamamoto M. Nrf2 enhances cholangiocyte expansion in Pten-deficient livers. *Mol Cell Biol* 34(5): 900-913, 2014
DOI: 10.1128/MCB.01384-13
9. Shirasaki K*, **Taguchi K***, Unno M, Motohashi H, Yamamoto M. NF-E2-related factor 2 promotes compensatory liver hypertrophy after portal vein branch ligation in mice. *Hepatology* 59(6): 2371-2382, 2014
DOI: 10.1002/hep.27020
10. Pekovic-Vaughan V, Gibbs J, Yoshitane H, Yang N, Pathiranjana D, Guo B, Sagami A, **Taguchi K**, Bechtold D, Loudon A, Yamamoto M, Chan J, van der Horst GT, Fukada Y, and Meng AJ. The circadian clock regulates rhythmic activation of the NRF2/glutathione-mediated antioxidant defense pathway to modulate pulmonary fibrosis. *Genes Dev* 28(6): 548-560, 2014
DOI: 10.1101/gad.237081.113

[学会発表](計24件)

1. **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、京都大学芝蘭会館稲盛ホール(京都) 2017年2月3日
2. **田口恵子**, 鈴木隆史, 山本雅之 オートファジー破綻がもたらす病態の Nrf2 を標的とした治療戦略 第10回オートファジー研究会・第4回新学術「オートファジー」班会議、NASPA ニューオータニ(越後湯沢) 2016年11月13-15日
3. **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(ポスター3P-025) 2016年9月25-27日
4. **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(札幌), Jul 5-8, 2016 (Poster PS[II]-38)
5. **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) 0-46, 2016年6月29日-7月1日
6. **Keiko Taguchi**, Masayuki Yamamoto. Nrf2 activation in liver cancer model mice. Closed seminar at Prof. Amedeo Columbano laboratory in University of Cagliari, Italy, Jun 13, 2016
7. **Keiko Taguchi**, Masaaki Komatsu, Masayuki Yamamoto. Nrf2 is a critical factor for hepatocellular adenoma in impaired autophagy. Tenth AACR-JCA Joint Conference on Breakthroughs in Cancer Research: From Biology to Therapeutics. Hyatt Regency Maui, Hawaii, USA, Feb 16-20, 2016 (Poster A073)
8. **田口恵子**, 一戸理沙, 山本雅之 Nrf2 は Pten 欠失による脂肪肝炎から肝臓がんの移行を促進する 第88回日本生化学会/第38回日本分子生物学会合同大会、神戸国際会議場(神戸) FJ3175(3P1082) 2015年12月4日
9. **田口恵子** 2つのタンパク質分解系による統合的な Nrf2 の制御メカニズム 第88回日本生化学会大会、平成27年度日本生化学会 神戸国際会場(神戸) 2015年12月3日
10. **田口恵子**, 一戸理沙, 山本雅之 Nrf2 は Pten 欠失による脂肪肝炎から肝がんへの移行を促進する 第3回がん代謝研究会・金沢大学がん進展制御研究所共同利用・共同研究拠点シンポジウム、石川県立音楽堂交流ホール(金沢) 2015年7月16-17日
11. **田口恵子**, 高久美咲, Thomas W. Kensler, 山本雅之 Nrf2 欠失ラットはアフラトキシン B1 による肝毒性に対して脆弱である 第42回日本毒性学会学術年会、石川県立音楽堂, 金沢市アートホール、ホテル日航金沢(金沢) 0-12, 2015年6月29日-7月1日
12. **Keiko Taguchi**, Misaki Takaku, Masayuki Yamamoto. A new tool for toxicology: Nrf2 knockout rat. The 7th International Congress of Asian Society of Toxicology (Jeju, Korea), Jun 23-26, 2015
13. **Keiko Taguchi**, Misaki Takaku, Patricia A. Egner, Thomas W. Kensler, Masayuki Yamamoto. Nrf2 knockout rat is sensitive to aflatoxin B1 hepatotoxicity. University of Pittsburgh Cancer Institute Scientific Retreat, Soldiers & Sailors Memorial Hall & Museum (Pittsburgh, USA), Jun 18-19, 2015 (Poster 83)
14. **Keiko Taguchi**, Misaki Takaku, Masayuki Yamamoto. Closed seminar at Profs. Bruce Freeman & Thomas Kensler's laboratories in University of Pittsburgh, USA. Jun 17, 2015

15. **田口恵子**、本橋ほづみ、山本雅之 タンパク質分解による Nrf2 活性制御メカニズム 日本薬学会第 135 年会、神戸学院大学 (神戸) 2015 年 3 月 27 日
16. **Keiko Taguchi**, Misaki Takaku, Masanobu Morita, Masayuki Yamamoto. Establishment and characterization of Nrf2 knockout rats. 2nd International Symposium on Protein Modifications in Pathogenic Dysregulation of Signaling, 東京大学医科学研究所 (白金台) Jan 23-24, 2015 (Poster P-13)
17. **Keiko Taguchi**, Misaki Takaku, Masanobu Morita, Masayuki Yamamoto. Establishment and characterization of Nrf2 knockout rats. Biochemical Society-The Keap1/Nrf2 Pathway in Health and Disease. Robinson College (Cambridge, UK), Jan 6-8, 2015 (Poster P032, Oral)
18. **田口恵子** Nrf2 の活性制御破綻がもたらす肝病態 第 87 回日本生化学会大会、国立京都国際会館 (京都) 1S02p-1、2014 年 10 月 15 日
19. **Keiko Taguchi**, Hozumi Motohashi, Masayuki Yamamoto. Liver diseases caused by perturbation of Nrf2 regulation. 第 73 回日本癌学会学術総会、S2-5、パシフィコ横浜 (横浜) 2014 年 9 月 25-27 日
20. **Keiko Taguchi**, Hozumi Motohashi, Masayuki Yamamoto. Multi-step regulation of Nrf2 activity in the liver. Japan/Korea Joint Symposium on Pharmaceutical Health Science and Environmental Toxicology, つくば国際会議場 (つくば) S-3、2014 年 9 月 19-20 日
21. **田口恵子**、本橋ほづみ、山本雅之 転写因子 Nrf2 の活性制御メカニズムと病態若手放射線生物学研究会勉強会、京都大学原子炉実験所 (大阪) 2014 年 8 月 8-10 日
22. **Keiko Taguchi**, Hozumi Motohashi, Masayuki Yamamoto. Molecular Mechanisms and Functions of Keap1-Nrf2 system. 2014 International Symposium and Annual Meeting of The Korean Society for Applied Biological Chemistry, IS1-5, Haeundae Grand Hotel (Busan, Korea) Jun 20, 2014
23. **Keiko Taguchi**, Hozumi Motohashi, Masayuki Yamamoto. Molecular Mechanisms and Functions of Keap1-Nrf2 system. Gyeonggi Institute of Science & Technology Promotion (Suwon, Korea) Jun 19, 2014
24. **田口恵子**、本橋ほづみ、山本雅之 肝

毒性物質に応答した肝保護にはたらく Nrf2 の役割、日本生化学会東北支部第 80 回例会・シンポジウム、アキタパークホテル (秋田) P-3、2014 年 5 月 10 日

〔図書〕(計 3 件)

1. **Taguchi K**, Yamamoto M. Part 4: Keap1-Nrf2 regulatory system and cancer. Protein modifications in pathogenic dysregulation of signaling, Springer, 269-285, 2015
2. **田口恵子** 第 2 章 3 節 Keap1-Nrf2 システムと毒物の解毒・排泄「毒性の科学—分子・細胞から人間集団まで」28-33, 東京大学出版会 28-33, 2014
3. **田口恵子**、山本雅之 第 1 章基礎編 7 節 Keap1-Nrf2 システムによる酸化ストレス・親電子性物質応答機構「酸化ストレスの医学改訂第 2 版」53-59, 吉川敏一監修、内藤裕二・豊國伸哉編集、診断と治療社、2014

〔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

(1) 研究代表者

田口 恵子 (TAGUCHI, Keiko)
東北大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号: 20466527

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし