

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 10 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670150

研究課題名(和文) Nrf2依存性細胞増殖の分子機構解明とその特異的遮断方法の探索

研究課題名(英文) Molecular mechanism supporting NRF2-addicted cancers

研究代表者

本橋 ほづみ (Motohashi, Hozumi)

東北大学・加齢医学研究所・教授

研究者番号：00282351

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：NRF2は酸化ストレス応答、解毒代謝の鍵因子であるが、一部のがん細胞の悪性化をになっていることが明らかにされている。NRF2の抑制は、がん細胞の増殖を抑制し抗がん剤感受性を高めるものの、正常組織においては、抗がん剤の副作用の増悪など様々な不利益をもたらすと予想される。したがって、がん細胞特異的にNRF2活性化の効果を解消する戦略が必要である。本研究ではNRF2と合成致死性をしめす因子を探索するためのスクリーニング系の構築を行った。

研究成果の概要(英文)：NRF2 is a master transcriptional activator playing a critical role in the defense mechanism against oxidative insults. NRF2 activates genes encoding cytoprotective enzymes and antioxidant proteins in response to electrophiles and reactive oxygen species (ROS), conferring resistance against xenobiotic and oxidative stress. While NRF2 activation is beneficial to our health, NRF2 is responsible for the malignant progression of various human cancers. Inhibition of NRF2 activity is considered to be effective for the regression of tumors, but it also gives disadvantage to cancer-bearing hosts by reducing the anti-cancer immunity and stress response ability. In this study, we have established a screening system for the exploration of synthetic lethal factors with NRF2 in cancer cells.

研究分野：生化学・分子生物学

キーワード：転写因子 がん がん遺伝子 酸化ストレス応答

1. 研究開始当初の背景

転写因子 Nrf2 は、様々な生体防御系遺伝子群を統括的に活性化することにより、レドックス維持機構の中心的役割を果たしている。一方、様々なヒトがん組織において Nrf2 は異常に活性化して、予後悪化因子となっている。がん細胞での Nrf2 機能抑制は有効な抗がん治療になると予想されるものの、Nrf2 は正常細胞において恒常性維持を担う重要な因子であり、担がん患者へ Nrf2 阻害剤を投与することは、薬剤の副作用を増悪させ、がん免疫の抑制効果によりその転移を促進させる恐れがある。したがって、がん治療として、Nrf2 自体を標的とする Nrf2 機能阻害剤を使用することには多くの困難が伴うと予想される。そこで我々は、がん細胞における NRF2 活性化状態を抑制しなくても、NRF2 と合成致死を示す因子を明らかにすることができれば、それを治療標的として NRF2 依存性の悪性度が高いがんを克服できると考えた。

2. 研究の目的

本研究では、静止期の細胞における Nrf2 機能には影響せず、増殖の盛んな細胞で機能が增強している Nrf2 と合成致死性を示す因子を探索して、その有効性を評価することを目的とした。

3. 研究の方法

我々はこれまでに、Nrf2 ががん細胞の悪性化に寄与する分子メカニズムの解明に挑み、Nrf2 が、グルコースやグルタミンの代謝に関わる酵素群を制御することで、細胞の代謝リプログラミングに貢献してがん細胞の増殖を促進することを明らかにした。そして、PI3K-Akt 経路の活性化状態において Nrf2 の機能が增強し、機能増強した Nrf2 はさらに PI3K-Akt 経路の活性化を亢進させる、というポジティブフィードバックの存在を見いだした。このポジティブフィードバックががんの悪性化を推進する駆動力になっている可能性が大きいと考え、Nrf2 と PI3K-Akt 経路のポジティブフィードバックと合成致死性を示す因子の探索を試みることにした。

具体的には、Nrf2 活性化状態で細胞増殖が促進されている細胞に、shRNA レンチウイルスライブラリーを導入し、一定期間の後、shRNA レンチウイルスのプロファイルの変化を次世代シーケンサーで検出することにより、NRF2 と合成致死性を示す因子を同定することを目指し、予備実験を実施した。

(1) マウス個体へのウイルス導入条件の検討

まず、生後2日目のマウス肝臓への遺伝子導入法の確立を試みた。

生後2日目のマウスに、GFPを発現するレンチウイルスを腹腔内接種して10日後の肝臓における GFP 発現を調べた。

同様に、生後2日目のマウスに、GFPを発現する AAV ウイルスを腹腔内接種して10日後の肝臓における GFP 発現を調べた。

(2) Pten:Keap1 2 重欠損マウスのレスキュー実験

AAV ウイルスによる肝臓への遺伝子導入で良好な効率が得られたので、Pten:Keap1 2 重欠損マウスに対して、Nrf2 shRNA を発現する AAV ウイルス、Pdpk1 shRNA を発現する AAV ウイルスをそれぞれ腹腔内接種して、Pten:Keap1 2 重欠損マウスにおける肝臓の肥大、生後3週間での致死性が回避されるかどうかを調べた。

肝臓におけるノックダウンが不十分であったことから、同様の系で、恒常的活性化型 Gsk3beta (Gsk3beta S9A) を AAV により導入し、Pten:Keap1 2 重欠損マウスの表現型がレスキューされるかどうかを調べた。

(3) マウス胎児線維芽細胞を用いた NRF2 依存性がん細胞の樹立

マウス個体へのウイルス接種による遺伝子導入効率が、スクリーニングに耐えるほど高くはないことがわかってきた。そこで、腫瘍細胞の移植のシステムを利用してスクリーニングを実施することとし、マウスへ移植可能な NRF2 依存性がん細胞の樹立を行った。

4. 研究成果

(1) マウス個体へのウイルス導入条件の検討

生後2日目のマウスにレンチウイルスを接種するも、ほとんど肉眼的に GFP を観察することができなかった。同様にして肝臓への感染効率が低いとされる AAV8 を用いて GFP cDNA の導入を行ったところ、良好な導入効率が得られた。しかし、AAV8 はゲノムへの挿入がないため、細胞が増殖するにつれて、1細胞あたりの GFP cDNA 導入量が減少し GFP 蛍光が弱くなることもわかった。

(2) Pten:Keap1 2 重欠損マウスのレスキュー実験

Nrf2 shRNA を発現する AAV ウイルス、Pdpk1 shRNA を発現する AAV ウイルスを、それぞれ生後2日目の Pten:Keap1 2 重欠損マウスに接種したが、Nrf2 や Pdpk1 の遺伝子ノックダウン効率が半分にも満たないことがわかり、実際、Pten:Keap1 2 重欠損マウスの表現型のレスキューもみとめられなかった。

そこで、Pten 欠失により失活する Gsk3beta に対して、恒常的活性化型変異体である Gsk3beta S9A を過剰発現することで、Pten:Keap1 2 重欠損マウスの表現型のレスキューをこころみた。その結果、NRF2 のタンパク質量の軽度な減少と NRF2 標的遺伝子の発現の軽度な抑制が観察されたものの、肝臓の大きさに顕著な変化はみとめられなかった。やはり、Gsk3beta S9A の発現量が不足し

ているものと考えられた。特に、ゲノムに組み込まれない AAV8 は、日数の経過にともなって発現量が低下してしまうことが原因と思われた。

(3) マウス胎児線維芽細胞を用いた NRF2 依存性がん細胞の樹立

これらの結果から、Pten:Keap1 2 重欠損マウスの肝臓の表現型を指標にしたスクリーニングは困難であると判断し、腫瘍細胞の移植を用いたスクリーニング系を構築することにした。

マウス胎児線維芽細胞 (MEF) を、Keap1 欠損マウスと野生型マウスから樹立した。得られた MEF を T 抗原の導入により不死化し、さらに、KRAS 変異体を導入した。これらはマウスの皮下移植により腫瘍を形成した。Keap1 欠損マウス由来の MEF に、Keap1 を戻すと、高発現していた NRF2 標的遺伝子の発現が低下し、かつ、マウスへの皮下移植での腫瘍形成がみとめられなかった。このことから、Keap1 欠損マウス由来の MEF から、NRF2 依存性のがん細胞が樹立できたといえる。今後は、同細胞に対して shRNA ライブラリーを導入し、培養皿での培養では変化がないが、皮下移植し腫瘍を形成させた場合にのみ変化がみられる shRNA を探索する。そして、それが、NRF2 に依存しない野生型 MEF から樹立した腫瘍に対しては効果が小さいことを証明する。

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] すべて査読あり (計 19 件)

原著論文

1. Honkura Y, Matsuo H*, Murakami S, Sakiyama M, Mizutari K, Shiotani A, Yamamoto M, Morita I, Shinomiya N, Kawase T, Katori Y, and **Motohashi H***. NRF2 is a key target for prevention of noise-induced hearing loss by reducing oxidative damage of cochlea. *Sci Rep* 6, 10329, 2016. doi: 10.1038/srep19329.
2. 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, 1826-1840, 2016. doi: 10.1074/jbc.M115.661702.
3. Ito A, Shimazu T, Maeda S, Shah AA, Tsunoda T, Iemura S, Natsume T, Suzuki T, **Motohashi H**, Yamamoto M, Yoshida M. The subcellular localization and activity of cortactin is regulated by acetylation and interaction with Keap1. *Sci Signal* 8(404), ra120, 2015. doi: 10.1126/scisignal.aad0667.
4. Sekine H, Okazaki K, Ota N, Shima H, Katoh Y, Suzuki N, Igarashi K, Ito M, **Motohashi H***, Yamamoto M*. The Mediator subunit MED16 transduces NRF2-activating signals into antioxidant gene expression. *Mol Cell Biol* 36, 407-420, 2016. doi: 10.1128/MCB.00785-15.
5. Santoso A, Kikuchi T, Tode N, Hirano T, Komatsu R, Damayanti T, **Motohashi H**, Yamamoto M, Kojima T, Uede T, Nukiwa T, Ichinose M. Syndecan 4 mediates Nrf2-dependent expansion of bronchiolar progenitors that protect against lung inflammation. *Mol Therapy* 24, 41-52, 2016. doi: 10.1038/mt.2015.153.
6. Hayashi M, Takai J, Yu L, **Motohashi H**, Moriguchi T, Yamamoto M. Whole-body in vivo monitoring of inflammatory diseases exploiting human interleukin 6-luciferase transgenic mice. *Mol Cell Biol* 35, 3590-3601, 2015. doi: 10.1128/MCB.00506-15.
7. Ota C, Yamada M, Fujino N, **Motohashi H**, Tando Y, Takei Y, Suzuki T, Takahashi T, Kamata S, Makiguchi T, Yamaya M, Kubo H. Histone deacetylase inhibitor restores surfactant protein-C expression in alveolar-epithelial type II cells and attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in vivo. *Exp Lung Res* 41, 422-434, 2015. doi: 10.3109/01902148.2015.
8. Agrawal SA, Anand D, Siddam AD, Kakrana A, Dash S, Scheiblin DA, Dang CA, Terrell AM, Waters SM, Singh A, **Motohashi H**, Yamamoto M, Lachke SA. Compound mouse mutants of bZIP transcription factors Mafg and Mafk reveal a regulatory network of non-crystallin genes associated with cataract. *Hum Genet* 134, 717-735, 2015. doi: 10.1007/s00439-015-1554-5.
9. Goto M, Kitamura H, Alam MM, Ota N, Haseba T, Akimoto T, Shimizu A, Takano-Yamamoto T, Yamamoto M and **Motohashi H***. Alcohol dehydrogenase 3 contributes to the protection of liver from nonalcoholic steatoph hepatitis. *Genes Cells* 20, 464-480, 2015. doi: 10.1111/gtc.12237.
10. de Aguiar Vallim TQ, Tarling EJ, Ahn H, Hagey LR, Romanoski CE, Lee RG, Graham MJ, **Motohashi H**, Yamamoto M, Edwards PA. MAFG Is a Transcriptional Repressor of Bile Acid Synthesis and Metabolism. *Cell Metab* 21, 298-310, 2015. doi: 10.1016/j.cmet.2015.01.007.
11. 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***, and Tominaga T. Activation of the NRF2 pathway and its impact on the prognosis of anaplastic glioma patients. *Neuro Oncol* 17, 555-565, 2015. doi:

- 10.1093/neuonc/nou282.
12. Hirotsu Y, Higashi C, Fukutomi T, Katsuoka F, Tsujita T, Yagishita Y, Matsuyama Y, **Motohashi H**, Uruno A, and Yamamoto M. Transcription factor NF-E2-related factor 1 impairs glucose metabolism in mice. *Mol Cell Biol* 19, 650-665, 2014. doi: 10.1111/gtc.12165.
 13. Ida T, Sawa T, Ihara H, Tsuchiya Y, Watanabe Y, Kumagai Y, Suematsu M, **Motohashi H**, Fujii S, Matsunaga T, Yamamoto M, Ono K, Devarie-Baez NO, Xian M, Fukuto JM and Akaike T. Reactive cysteine persulfides and S-polythiolation regulate oxidative stress and redox signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 111, 7606-7611, 2014. doi:10.1073/pnas.1321232111.
 14. Shirasaki K, Taguchi K, Unno M, **Motohashi H***, and Yamamoto M*. Nrf2 promotes compensatory liver hypertrophy after portal vein branch ligation in mice. *Hepatology* 59, 2371-2382, 2014. doi: 10.1002/hep.27020.
 15. Taguchi K, Hirano I, Itoh T, Tanaka M, Miyajima A, Suzuki A, **Motohashi H***, and Yamamoto M*. Nrf2 enhances cholangiocyte expansion in Pten-deficient livers. *Mol Cell Biol* 34, 900-913, 2014. doi: 10.1128/MCB.01384-13.
 16. Onodera Y, **Motohashi H**, Takagi K, Miki Y, Shibahara Y, Watanabe M, Ishida T, Hirakawa H, Sasano H, Yamamoto M, and Suzuki T. NRF2 immunolocalization in human breast cancer patients as a prognostic factor. *Endocr Relat Cancer* 21, 241-252, 2014. doi: 10.1530/ERC-13-0234.
 17. Murakami S, Shimizu R, Romeo P-H, Yamamoto M*, and **Motohashi H***. Keap1-Nrf2 system regulates cell fate determination of hematopoietic stem cells. *Genes Cells* 19, 239-253, 2014. doi: 10.1111/gtc.12126.
 18. Murakami S, Yamamoto M*, and **Motohashi H***. Hematopoietic stem and progenitor cell activation during chronic dermatitis provoked by constitutively active aryl-hydrocarbon receptor driven by Keratin14 promoter. *Toxicol Sci* 138, 47-58, 2014. doi: 10.1093/toxsci/kft273.

総説論文

1. Murakami S and **Motohashi H***. Roles of NRF2 in cell proliferation and differentiation. *Free Rad Biol Med* 88, 168-178, 2015. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2015.06.030.

〔学会発表〕(計 63 件)

招待講演のみ記載

1. **Hozumi Motohashi**, KEAP1-NRF2 system in stress response and cancer malignancy, The special seminar at Joslin Diabetes Center,

March 18, 2016, Boston(USA)

2. **Hozumi Motohashi**, Crosstalk between regulation of redox balance and cell proliferation by NRF2, The Society of Toxicology, 55th Annual Meeting and ToxExpo, March 13-17, 2016, New Orleans (USA)
3. **本橋ほづみ**, KEAP1-NRF2 system in malignant progression of cancers, 京都大学生命科学研究科 大学院博士課程「先端生命科学」講義、2016年1月12日、京都大学(京都)
4. **本橋ほづみ**, がんの悪性化における KEAP1-NRF2 制御系の貢献, 第1回東北呼吸器外科ベーシックセミナー、2015年12月4日、東北大学(仙台)
5. **Hozumi Motohashi**, Cytoprotection and metabolic reprogramming governed by KEAP1-NRF2 system. The 46th International Symposium of The Princess Takamatsu Cancer Research Fund, November 17-19, 2015, Palace Hotel Tokyo (Tokyo)
6. **本橋ほづみ**, 細胞のがん化と老化における酸化ストレス応答機構の役割, 2015年9月27日、仙台国際センター(仙台)
7. **本橋ほづみ**, NRF2 による代謝制御と細胞増殖, 第10回レドックス・ライフイノベーション第170委員会、2015年8月20-21日、慶應義塾大学先端生命科学研究所 メタボロームキャンパスレクチャーホール(鶴岡)
8. **本橋ほづみ**, アルコール脱水素酵素 III (ADH5)による生体防御機構と代謝制御, 第15回日本蛋白質科学会年会 ワークショップ 酵素リモデリング・レドックスシグナルとタンパク質修飾の新たな潮流、2015年6月25日、あわぎんホール(徳島)
9. **本橋ほづみ**, KEAP1-NRF2 制御系によるストレス応答と代謝制御, 山口大学大学院医学系研究科 大学院セミナー、2015年6月22日、山口大学(宇部)
10. **本橋ほづみ**, 酸化ストレス応答と代謝制御のクロストーク, 第88回日本内分泌学会学術総会 シンポジウム エネルギー代謝のエピジェネティクス、2015年4月25日、ホテルニューオータニ(東京)
11. **本橋ほづみ**, IDH1 遺伝子変異による NRF2 機能抑制と代謝リプログラミング, 国際高等研究所研究プロジェクト クロマチンデコーディング研究会、2015年3月21日、国際高等研究所(京都)
12. **Hozumi Motohashi**, Functional nexus between Keap1-Nrf2 system and cellular metabolism, Joint International Symposium on TGF- Family and Cancer: Signaling Network in Tumor Microenvironment, January 13, 2015, EPOCHAL TSUKUBA(Tsukuba)
13. **本橋ほづみ**, Adh3 と Keap1-Nrf2 制御系の協調作用による酸化ストレス防御機構, 基盤 S 公開シンポジウム「親電子物質のレ

- ドックス制御」、2014年10月27日、つくば国際会議場（つくば）
14. **本橋ほづみ**、Megakaryocyte differentiation and platelet production regulated by CNC transcription factor family, 第87回日本生化学会大会 シンポジウム、2014年10月15日、国立京都国際会館（京都）
 15. **本橋ほづみ**、Keap1-Nrf2 system for redox regulation and metabolic reprogramming in cancers, 第73回日本癌学会学術総会 コアシンポジウム “Cancer cell metabolism and cellular senescence”, 2014年9月27日、パシフィコ横浜（横浜）
 16. **本橋ほづみ**、Keap1-Nrf2 制御系によるストレス応答と細胞増殖制御、第157回日本獣医学会学術集会 日本比較薬理学・毒性学会シンポジウム「細胞保護機構の多面性」、2014年9月10日、北海道大学高等教育推進機構（札幌）
 17. **本橋ほづみ**、新たな治療標的としての Nrf2 によるストレス応答と代謝制御、第19回日本がん分子標的治療学会 シンポジウム、2014年6月26日、仙台市情報・産業プラザ（仙台）
 18. **本橋ほづみ**、Contribution of a transcription factor NF-E2 to megakaryocyte differentiation and platelet production、第36回日本血栓止血学会 SPC シンポジウム 2014、2014年5月29日、大阪国際交流センター（大阪）
 19. **Hozumi Motohashi**、Transcriptional regulation driving megakaryocyte maturation and platelet production, IIAS Research Conference 2014 and IIAS Lecture 2014 “Chromatin Decoding”, May 12-15, 2014, International Institute for Advanced Studies (Kyoto)

〔その他〕

<http://www2.idac.tohoku.ac.jp/dep/ger/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

本橋 ほづみ (Hozumi Motohashi)

東北大学・加齢医学研究所・教授

研究者番号：00282351