

181. 増殖細胞特異的に Nrf2 と合成致死を示す因子の探索

本橋 ほづみ

東北大学 加齢医学研究所 遺伝子発現制御分野

Key words : KEAP1, NRF2, 腫瘍形成, IL-11, 乳がん

緒言

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、レドックス恒常性維持機構の中心的役割を果たしている¹⁾。NRF2 は通常 CULLIN3-KEAP1 ユビキチンリガーゼによりユビキチン化されプロテアソームによる分解を受けている。細胞が酸化ストレスや親電子性毒物に曝されると KEAP1 が失活し、それに伴い安定化した NRF2 が核移行して様々な生体防御系遺伝子群を活性化することで、細胞のストレス応答能が増強する。*Nrf2* 遺伝子欠損マウスは、様々な外界からの毒物やストレスに対して脆弱である。一方、NRF2 は様々なヒトがん組織において異常に活性化し、予後の悪性化をもたらしている²⁾。近年急速に蓄積しているがんゲノム情報によれば、NRF2 の恒常的な活性化をもたらす *NRF2* あるいは *KEAP1* 遺伝子の体性変異が、肺がん、頭頸部がん、膀胱がん、子宮がんなど、外界と接する部位に発生する固形腫瘍において、1～3 割という高頻度で見いだされており、固形腫瘍の進展における NRF2 の重要性が示唆されている。そこで、本研究では、NRF2 が活性化した難治性がんの治療戦略の開発を目指し、がんに特徴的な NRF2 機能の探索を行い、がんにおいて NRF2 と合成致死を示す因子の同定を試みた。

方法および結果

1. NRF2 陽性がん細胞モデルの作製

近年がん細胞の挙動の理解にはそれを取り巻く微小環境との相互作用を考慮することが重要であることが明らかにされている³⁾。そこで、本研究では、がん細胞と微小環境の相互作用が存在する環境においてがん細胞中の NRF2 機能を解析するために、マウスへの同種移植が可能な NRF2 陽性がん細胞の作製を行った。*Keap1* 欠損マウスの胎児線維芽細胞を樹立し、SV40 T 抗原と活性化型 HRAS 変異体 (HRASG12V) を導入し、*Keap1*^{-/-}-TR MEF を得た。同時に、野生型マウスの胎児線維芽細胞からも同様の処理を行った細胞 WT-TR MEF を得た。前者では NRF2 が恒常的に活性化し、その標的遺伝子の発現レベルも顕著に上昇していることが確認された。*In vitro* での培養において WT-TR MEF と *Keap1*^{-/-}-TR MEF の増殖速度に違いは認められなかった (図 1A)。ところが、これらの細胞を同数 C57BL/6 マウスの皮下に移植すると、WT-TR MEF では腫瘍を形成しかけるも退縮してしまったのに対して、*Keap1*^{-/-}-TR MEF では腫瘍形成が認められた (図 1B)。

これらの細胞には活性化型 HRAS 変異体を導入しているため、遺伝子変異の蓄積が加速されている可能性がある。そこで、腫瘍形成能の違いが本当に KEAP1 欠損に由来することを確認するため、HA タグ付きの KEAP1 を *Keap1*^{-/-}-TR MEF へ導入して、腫瘍形成能を調べたところ、WT-TR MEF と同様に腫瘍形成がみとめられなくなった (図 1C)。したがって、*Keap1* 欠損により腫瘍形成能が獲得されていることがわかった。

さらに、NRF2 の活性化に依存した腫瘍形成促進であることを確認するため、*Keap1*^{-/-}-TR MEF で *Nrf2* をノックダウンして、同様に腫瘍形成能を調べた。その結果、腫瘍形成能は顕著に抑制されていることがわかった (図 1D)。以上のことから、*Keap1*^{-/-}-TR MEF は、NRF2 に依存して腫瘍形成が認められる NRF2 陽性がん細胞モデルであると言える。

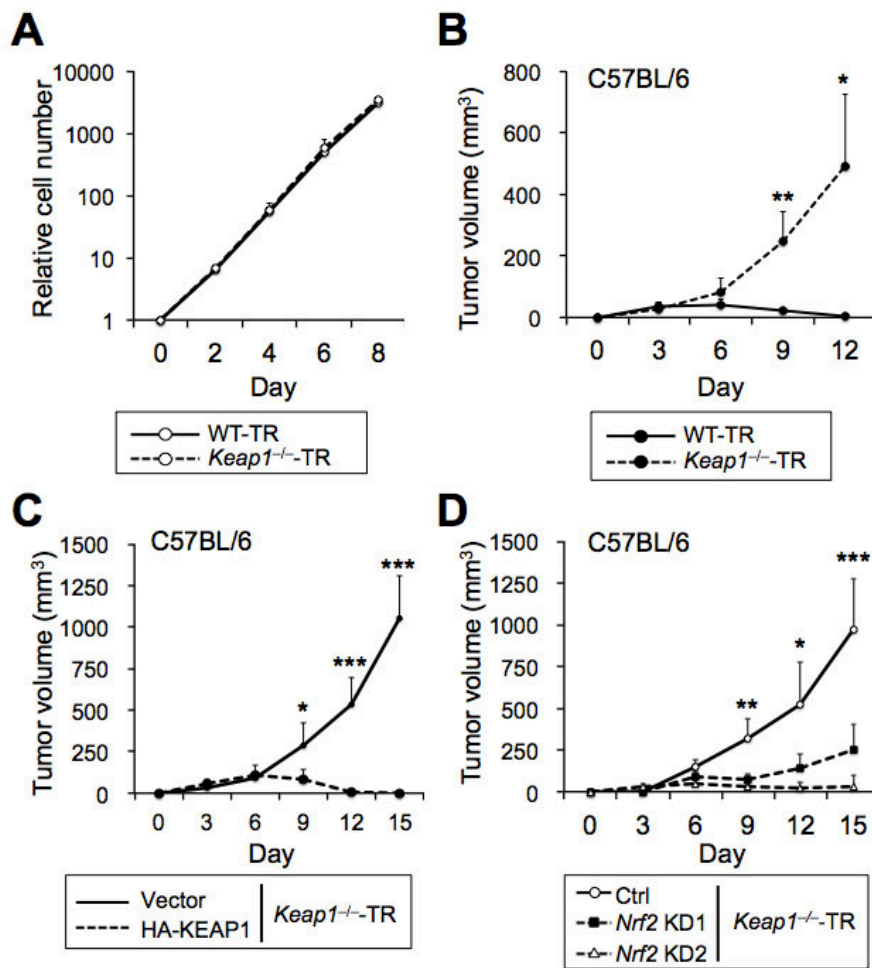


図1. *Keap1*^{-/-}-TR MEF の樹立と NRF2 依存性腫瘍形成の確認

A) *Keap1*^{-/-}-TR MEF と WT-TR-MEF の *in vitro* 培養による増殖速度。

B) *Keap1*^{-/-}-TR MEF と WT-TR-MEF を 5×10^6 個ずつ C57BL/6 マウスの皮下に移植し、腫瘍の大きさを経時的に測定。

C) *Keap1*^{-/-}-TR MEF に HA-KEAP1 を導入した細胞と、ベクターのみを導入した細胞を、 5×10^6 個ずつ C57BL/6 マウスの皮下に移植し、腫瘍の大きさを経時的に測定。

D) *Keap1*^{-/-}-TR MEF において *Nrf2* 遺伝子を異なる 2 種類の shRNA (KD1、KD2) によりノックダウンした細胞と、ベクターのみを導入した細胞をそれぞれ 5×10^6 個ずつ C57BL/6 マウスの皮下に移植し、腫瘍の大きさを経時的に測定。

いずれも 3 回以上の独立の実験結果の平均値と標準偏差を示す。t 検定により有意差を検定した。*P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.005。

2. NRF2 陽性がん細胞モデルにおける遺伝子発現の検討

NRF2 陽性がん細胞モデルにおける遺伝子発現を明らかにするために、WT-TR MEF と *Keap1*^{-/-}-TR MEF を用いてマイクロアレイ解析を行った。*In vitro*での培養では両者に増殖速度の違いを認めないものの、C57BL/6 マウスの皮下における腫瘍形成では顕著な違いが認められたことから、特に腫瘍形成の促進に関わる NRF2 の下流因子を同定したいと考えた。そこで、*in vitro*での培養条件 (2D 条件) とマウス皮下での腫瘍形成条件 (3D 条件) とで遺伝子発現の違いを検討した。C57BL/6 マウスへの移植では、WT-TR MEF がほとんど腫瘍を形成できないため、レシピエントをヌードマウスに変更し、腫瘍サンプルを得た。

NRF2 の典型的な標的遺伝子である抗酸化遺伝子や解毒系遺伝子などは、2D、3D いずれの条件においても、*Keap1*^{-/-}-TR MEF のほうで発現上昇が認められた。2D 条件と 3D 条件での変化が大きく異なる遺伝子として、*Il11*、*Il6* などのサイトカイン遺伝子、*Ptgs1*、*Ptgs2* などのプロスタグランジン代謝系遺伝子が見出された (図 2)。

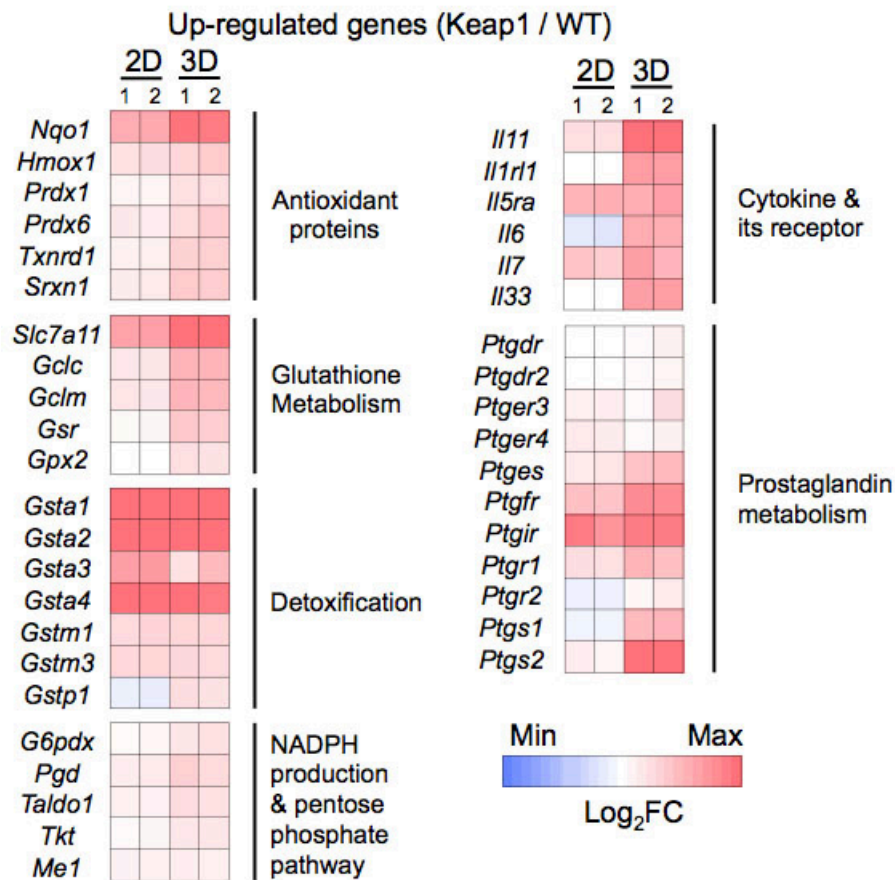


図 2. マイクロアレイ解析による *Keap1*^{-/-}-TR MEF と WT-TR-MEF の遺伝子発現プロファイル。2D 条件と 3D 条件における遺伝子発現を、WT-TR-MEF に対する *Keap1*^{-/-}-TR MEF の相対的発現量を、対数としてヒートマップで表示。独立の 2 回の実験結果を示す。

3. NRF2 陽性腫瘍における IL-11 の重要性の検討

IL-11 は 2 D 条件においては、WT-TR MEF と *Keap1*^{-/-}-TR MEF のいずれにおいてもほとんど発現が認められないが、3D 条件にすると NRF2 依存的に *Keap1*^{-/-}-TR MEF で IL-11 の発現増加が認められた。このことは、がん細胞をとりまく微小環境から何らかのシグナルが NRF2 と協調することにより *Il11* 遺伝子の転写を活性化できるものと考えられる。

そこで、NRF2 陽性がん細胞の腫瘍形成における IL-11 の重要性を検証するために、CRISPR-Cas9 システムによるゲノム編集を行い、*Keap1*^{-/-}-TR MEF で *Il11* 遺伝子を欠失させた。*Il11* 欠失 *Keap1*^{-/-}-TR MEF は、*in vitro* の培養では細胞の増殖速度に変化は認められなかったが、C57BL/6 マウス皮下への移植によりその増殖は顕著に抑制された (図 3)。以上のことから、NRF2 陽性がん細胞の腫瘍形成は IL-11 に大きく依存していることがわかった。

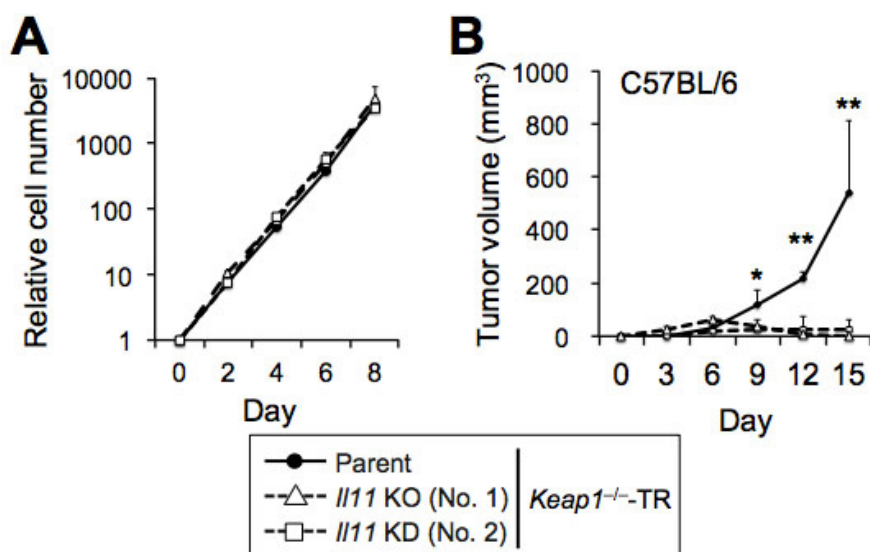


図3. III1 遺伝子欠損 *Keap1*^{-/-}-TR MEF の細胞増殖と腫瘍形成

A) III1 遺伝子欠損 *Keap1*^{-/-}-TR MEF と、親株である *Keap1*^{-/-}-TR MEF の *in vitro* 培養による増殖速度。

B) III1 遺伝子欠損 *Keap1*^{-/-}-TR MEF と、親株である *Keap1*^{-/-}-TR MEF を、 5×10^6 個ずつ C57BL/6 マウスの皮下に移植し、腫瘍の大きさを経時的に測定。

いずれも 3 回以上の独立の実験結果の平均値と標準偏差を示す。t 検定により有意差を検定した。*P < 0.05, **P < 0.01.

4. ヒト乳がん症例における NRF2-IL-11 協調作用の重要性の検討

マウス線維芽細胞から作製したがん細胞モデルで観察された NRF2-IL11 の協調関係がヒトのがんでも観察されるかどうかを検討するために、NRF2 も IL-11 も予後悪性化因子であるという報告⁴⁻⁶⁾ がなされていた乳がん症例を調べた。乳がん 44 症例を、NRF2 と IL-11 の抗体でそれぞれ染色し、陽性症例の相関を調べた。半数の 22 症例が IL-11 陽性、残りの 22 症例が IL-11 陰性であった。乳がんの他のパラメーターに比較して、IL-11 陽性は NRF2 陽性と特に強い相関を示した (表 1)。以上の結果から、ヒト乳がんにおいて、NRF2-IL-11 の協調作用がその悪性化をもたらすことが明らかになった。

表 1. 乳がん 44 症例における IL-11 の免疫染色と臨床病理所見との相関

| | IL11 status | | P value |
|--------------------------------|---------------|---------------|---------------|
| | +(n=22) | -(n=22) | |
| Patient age (years) | 54.3 ± 2.7 | 54.4 ± 2.0 | 0.97 |
| Pathological tumor Factor (pT) | | | |
| 1 | 10 | 12 | 0.55 |
| 2-4 | 12 | 10 | |
| Histological grade | | | |
| 1-2(well-moderate) | 16 | 16 | >0.99 |
| 3 (poor) | 6 | 6 | |
| ER status | | | |
| Positive | 17 | 29 | 0.21 |
| Negative | 5 | 2 | |
| PR status | | | |
| Positive | 14 | 17 | 0.32 |
| Negative | 8 | 5 | |
| HER2 status | | | |
| Positive | 2 | 3 | >0.99 |
| Negative | 20 | 19 | |
| Stage | | | |
| I – II | 14 | 20 | 0.030 |
| III | 8 | 2 | |
| Ki 67 status | | | |
| High | 15 | 8 | 0.033 |
| Low | 7 | 14 | |
| NRF2 status | | | |
| Positive | 14 | 5 | 0.0062 |
| Negative | 8 | 17 | |

患者の年齢は t 検定により、それ以外の指標は χ^2 二乗検定により有意差を検定した。

考 察

NRF2 陽性がん細胞モデルを用いた実験から、がん微小環境からのシグナルと NRF2 の協調作用により IL-11 が誘導され、NRF2 依存的な腫瘍形成が促進されることが明らかになった。予備的な結果として、*Keap1*^{-/-}-TR MEF を足場非依存的な培養条件で培養しスフェロイドを形成させても IL-11 の誘導は認められていない。このことは、*Keap1*^{-/-}-TR MEF が足場非依存的に腫瘍を形成するだけでは IL-11 の発現誘導には十分でなく、なんらかのがん微小環境との相互作用が必要であるといえる。また、野生型マウス由来の MEF に HRAS 変異体を高発現させて得られる細胞は、C57BL/6 マウスの皮下に腫瘍を形成できるが、IL-11 の発現上昇を示さない。したがって、IL-11 の誘導には NRF2 の恒常的な活性化も必要といえる。本研究で作製した NRF2 陽性がん細胞モデルでは、抗腫瘍免疫が機能する C57BL/6 マウスの皮下において、IL-11 抑制によりがん細胞がほぼ完全に駆逐された。また、乳がん症例の検討から NRF2 と IL-11 の発現がよく相関するという結果が得られた。したがって、IL-11 経路の抑制は NRF2 陽性の難治がんの治療に有効な治療標的の一つと考えられる。

共同研究者

本研究の遂行にあたり、東北大学大学院医学系研究科病理検査学分野の鈴木貴教授に多くのご助言と実験のご協力をいただきましたことを深謝いたします。

文 献

- 1) Uruno A, Motohashi H. The Keap1-Nrf2 system as an in vivo sensor for electrophiles. *Nitric Oxide*. 2011 Aug 1;25(2):153-60. doi: 10.1016/j.niox.2011.02.007. PMID: 21385624.
- 2) Mitsuishi Y, Motohashi H, Yamamoto M. The Keap1-Nrf2 system in cancers: stress response and anabolic metabolism. *Front Oncol*. 2012 Dec 26;2:200. doi: 10.3389/fonc.2012.00200. PMID: 23272301.
- 3) Whiteside TL. The tumor microenvironment and its role in promoting tumor growth. *Oncogene*. 2008 Oct 6;27(45):5904-12. doi: 10.1038/onc.2008.271. PMID: 18836471.
- 4) Onodera Y, Motohashi H, Takagi K, Miki Y, Shibahara Y, Watanabe M, Ishida T, Hirakawa H, Sasano H, Yamamoto M, Suzuki T. NRF2 immunolocalization in human breast cancer patients as a prognostic factor. *Endocr Relat Cancer*. 2014 Feb 27;21(2):241-52. doi: 10.1530/ERC-13-0234. PMID: 24302665.
- 5) Hanavadi S, Martin TA, Watkins G, Mansel RE, Jiang WG. Expression of interleukin 11 and its receptor and their prognostic value in human breast cancer. *Ann Surg Oncol*. 2006 Jun;13(6):802-8. PMID: 16614887.
- 6) Bockhorn J, Dalton R, Nwachukwu C, Huang S, Prat A, Yee K, Chang YF, Huo D, Wen Y, Swanson KE, Qiu T, Lu J, Park SY, Dolan ME, Perou CM, Olopade OI, Clarke MF, Greene GL, Liu H. MicroRNA-30c inhibits human breast tumour chemotherapy resistance by regulating TWF1 and IL-11. *Nat Commun*. 2013;4:1393. doi: 10.1038/ncomms2393. PMID: 23340433.