

酸化ストレス応答転写因子 Nrf2 による代謝制御と細胞増殖

本橋 ほづみ

1. はじめに

Keap1-Nrf2 経路は酸化ストレスに対する生体防御機構として重要な役割を果たしている。近年、肺がんや食道がんなど固形腫瘍の症例において、Nrf2 が恒常的に活性化していることが報告され、それが予後不良因子であることも明らかになった。恒常的に活性化した Nrf2 は、解毒系酵素群や抗酸化タンパク質をコードする遺伝子発現を強力に誘導することで、酸化ストレスや抗がん剤／放射線治療に対する抵抗性を増強する。それに加えて、恒常的に活性化した Nrf2 は、がん細胞においてグルコースやグルタミンの代謝を変化させて、同化反応を促進してがん細胞の増殖に貢献する。本稿では Keap1-Nrf2 経路の生理的な機能と、がん細胞の中で恒常的に活性化した Nrf2 が果たす機能を紹介する。

2. Keap1-Nrf2 制御系による生体防御機構

Keap1-Nrf2 制御系は、生体の酸化ストレス防御機構において中心的役割を果たしている¹⁾。Nrf2 は転写因子として、さまざまな生体防御に関わる遺伝子群を活性化し、Keap1 はその抑制性制御因子として、通常状態において Nrf2 の分解を促進している。Nrf2 は、塩基性領域／ロイシンジッパー構造 (bZip 構造) を有する CNC 転写因子群に属する強力な転写活性化因子である。CNC 転写因子群は、ショウジョウバエの転写因子 Cap'n'collar と同性を有する bZip 型転写因子ファミリーで、後生動物において保存されており、発生や恒常性の維持に重要な機能を果たしている。これらは、いずれも、小 Maf 群因子と呼ばれる、また別の bZip 型転写因子と二量体を形成することで

DNA に結合できるようになり転写因子としての機能を発揮する。Nrf2 の場合も、小 Maf 群因子とヘテロ二量体を形成して抗酸化応答配列 antioxidant responsive element (ARE) に結合し、第Ⅱ相解毒酵素や抗酸化タンパク質、グルタチオン合成酵素、薬剤トランスポーターなどの発現を誘導し、細胞にストレス応答能を賦与する。Nrf2 は生体防御機構の鍵因子であり、Nrf2 欠損マウスは、薬剤や環境異物など外来性のストレスに対して脆弱であり、また、内因性の活性酸素種からの障害も受けやすく、炎症の遷延化や、虚血再還流における組織障害の重篤化などが観察されている。また、Nrf2 遺伝子のプロモーター領域に存在する一塩基多型によって、Nrf2 遺伝子の高発現アリルと低発現アリルが存在することが、ヒトとマウスとで確認されている。Nrf2 低発現アリルを有するマウスは高酸素ストレスに対して脆弱であり²⁾、同様のヒトの場合は、喫煙による肺がんの発症率が有意に高まることが報告されている³⁾。

こうした Nrf2 の機能を、非刺激存在下で抑制しているのが Keap1 である。親電子性物質や活性酸素種など細胞内外からの刺激が加わると、Keap1 が失活することで Nrf2 が活性化される。Keap1 は、Cullin3 (Cul3) を含むユビキチン E3 リガーゼの基質認識に関わるアダプター分子であり、Nrf2 と結合してそのユビキチン化を促進する。その結果、Nrf2 は常にプロテアソームで分解され、その機能は抑制されている。実際、Keap1 の機能欠損状態では、Nrf2 が恒常的に安定化して転写を活性化する。一方、親電子性物質や酸化ストレスへの曝露は、Keap1-Cul3 複合体からなる E3 リガーゼを失活させて、Nrf2 を安定化させる。Keap1 は、システイン残基に富むタンパク質であり、とりわけ反応性が高いシステイン残基を複数有しているため、弱い刺激に対しても反応して失活する。つまり、Keap1 は親電子性物質に対する高感度センサーであり、非刺激時には Nrf2 機能を抑制し、親電子物質を感知すると Nrf2 の活性化をもたらす。誘導的な Nrf2 の活性化が、生体防御機構の重要な柱を担っている。

3. がん細胞におけるヒト NRF2 の役割

一方、恒常的な Nrf2 の安定化は、がんの悪性化に関係

東北大学加齢医学研究所遺伝子発現制御分野 (〒980-8575 仙台市青葉区星陵町 4-1)

Contribution of Nrf2 to stress response and metabolic reprogramming in cell proliferation

Hozumi Motohashi (Department of Gene Expression Regulation, Institute of Development, Aging and Cancer, Tohoku University, 4-1, Seiryō-cho, Aoba-ku, Sendai 980-8575, Japan)

していることが示されている。多くのがん細胞において NRF2 が恒常的に安定化していることが報告され、注目を集めている⁴⁾。NRF2 の恒常的な安定化をもたらすさまざまな原因が報告されているが、いずれにおいても NRF2 の分解が障害されている。これにより、NRF2 は常にさまざまな生体防御に関わる遺伝子を強力に活性化し続けることになる。このようながん細胞は、治療抵抗性を有することが示されており、NRF2 の蓄積が確認されたがん症例では、予後が不良であることが複数の施設から報告されている。

がん細胞で NRF2 の安定化をもたらす原因として最初に報告されたのは、*KEAP1* 遺伝子、もしくは、*NRF2* 遺伝子の体細胞変異である。*KEAP1* 遺伝子の体細胞変異により、アミノ酸置換を伴う変異 KEAP1 が産生され、NRF2 のユビキチン化が障害される。一方、*NRF2* 遺伝子の側に体細胞変異が存在する場合も見いだされており、興味深いことに、これまでに報告されている *NRF2* 遺伝子の点変異はすべて、NRF2 のアミノ末端領域で、KEAP1 との結合に必要な部位に局限している。いずれの場合でも、NRF2 は分解を免れて核内に蓄積して生体防御系遺伝子群を強力に活性化する。*KEAP1* あるいは *NRF2* 遺伝子の変異は、上部消化管や気道上皮、尿路上皮など、外界と接する部位に発症する固形腫瘍において多く認められている⁵⁾。

NRF2 の安定化をもたらすほかの原因としては、KEAP1 と NRF2 との結合を阻害する異常タンパク質の蓄積、*KEAP1* 遺伝子のメチル化亢進による発現の低下、親電子性を有するフマル酸の異常蓄積による KEAP1 のシステイン残基の修飾に起因する KEAP1 の失活などが報告されている⁴⁾。

4. がん細胞における代謝と NRF2

近年、がん細胞における特有の代謝経路を明らかにして、抗がん治療の標的として有効な分子を探索する試みが注目されている。そもそも、活発に増殖している細胞と静止期にある細胞とでは、細胞内の代謝様式が大きく異なっている。静止期にある細胞は、主としてグルコースを消費し、解糖系から TCA 回路を経て NADH や ATP を産生し、細胞特異的な活動を維持している。一方、増殖中の細胞は、細胞の構成因子である核酸、脂質、タンパク質の生合成を活発に行う必要から、活発に同化反応を行っており、グルコースやグルタミンなどの栄養分を大量に消費している。さまざまながん遺伝子の活性化、もしくは、がん抑制遺伝子の機能喪失により、細胞内の代謝が改変され（代謝リプログラミング）、がん細胞では細胞の増殖に有利な代謝様式が実現されている（図 1）⁶⁾。増殖細胞に特徴的な代謝様式として代表的なものでは、好氣的解糖系の亢進や、

グルタミン消費の亢進、ペントースリン酸経路の活性化、脂質合成・核酸合成の亢進が知られている。一部のがん細胞ではセリン合成経路が亢進しており、その細胞増殖がセリン合成経路の活性に大きく依存していることが報告されている^{7,8)}。また、低酸素状態、もしくは、ミトコンドリアの酸化的リン酸化の機能低下状態においては、 α -ケトグルタル酸から TCA 回路を逆行してクエン酸が生成される「還元的炭酸固定（reductive carboxylation）」が起こることが報告されている^{9,10)}。さらに、TCA 回路の酵素であるフマル酸ヒドラターゼの変異を有するがん細胞では、スクシニル CoA からヘム合成・ヘム分解への経路が活性化されており、こうしたがん細胞の増殖は、ヘム分解の鍵因子であるヘムオキシゲナーゼの活性に大きく依存することが報告されている¹¹⁾。このように、がん細胞に特有の代謝経路が次々と明らかにされている。

ペントースリン酸経路は、解糖系の側副路としての側面を有するが、同化反応に必要な還元力の供給源である NADPH の産生と核酸合成に必要なリボース 5-リン酸（R5P）の産生をもたらす、がん細胞の増殖にとって重要である。ペントースリン酸経路には、グルコース 6-リン酸（G6P）から 6-ホスホグルコン酸を経て、NADPH と R5P を生成する酸化的経路と、フルクトース 6-リン酸（F6P）とグリセルアルデヒド 3-リン酸（GAP）から 4 炭糖、7 炭糖を経て、NADPH の生成を伴わずに R5P を生成する非酸化的経路がある。酸化的経路は、NADPH が過剰になると、ネガティブフィードバックによりその反応が抑制されるため、R5P を大量に必要とするがん細胞は、R5P の生成を非酸化的経路に依存する場合が多い。実際、非酸化的経路に関わる酵素群ががん細胞の増殖亢進に貢献していることが報告されている¹²⁾。

近年、NRF2 がペントースリン酸経路の酸化的経路（G6PD、PGD）と非酸化的経路（TKT、TALDO1）を触媒する酵素群をいずれも直接制御して、かつ、R5P から先の核酸合成経路にも作用することで、グルコースからプリンスクレオチドの合成を促進することが明らかになった¹³⁾。また、NRF2 は、ME1 と γ GCL の活性化を通じてグルタミンの代謝（グルタミノリシスとグルタチオン合成）を促進する。すなわち、NRF2 は、プリンスクレオチド合成を促進するとともに、同化反応に必要な還元力である NADPH とグルタチオン合成を促進し、がん細胞の増殖に有利な代謝環境を実現している。

5. 増殖細胞における Nrf2 の機能増強

代謝の改変という Nrf2 の機能は、増殖細胞において特に強調されて観察される。特に、ホスファチジルイノシトール 3-キナーゼ（PI3K）-Akt 経路が通常活性化状態にあ

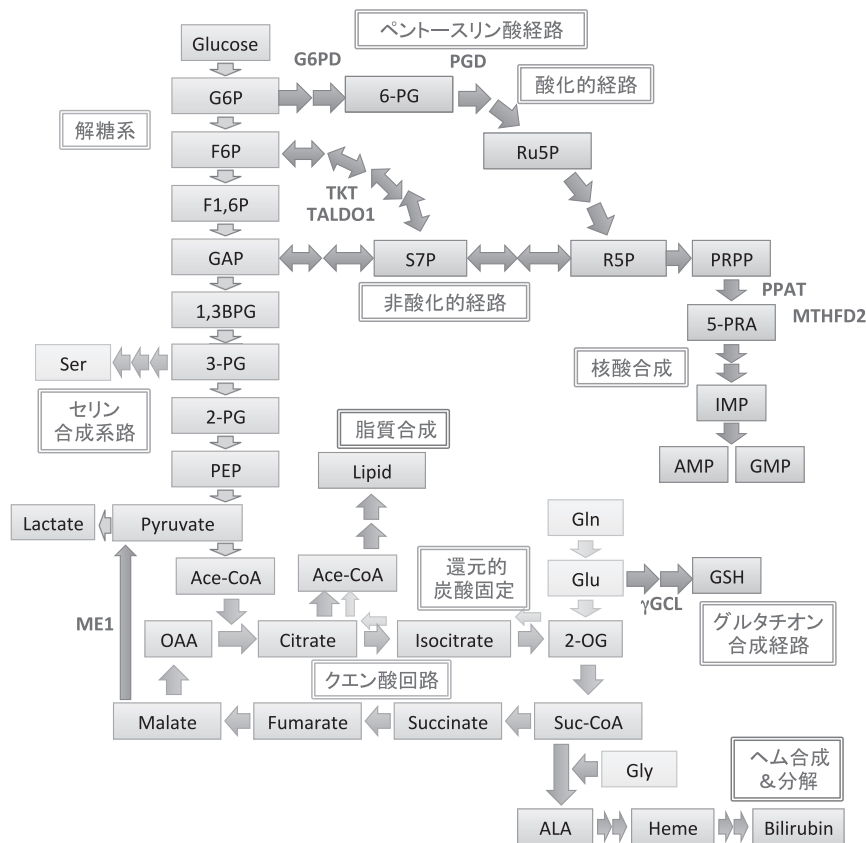


図1 がん細胞に特徴的な代謝

グルコースの代謝経路(解糖系とクエン酸回路)を中心に、がん細胞で特に活性化されていることが報告されている代謝経路を示す。Nrf2の活性化により、ペントースリン酸経路とそれに続く核酸合成、グルタチオン合成が促進される。Nrf2の下流で制御される酵素を赤色の太字で示す。G6P: グルコース 6-リン酸, F6P: フルクトース 6-リン酸, F1,6P: フルクトース 1,6-ビスリン酸, GAP: グリセルアルデヒド 3-リン酸, 1,3BPG: 1,3-ビスホスホグリセリン酸, 3-PG: 3-ホスホグリセリン酸, 2-PG: 2-ホスホグリセリン酸, PEP: ホスホエノールピルビン酸, Ace-CoA: アセチル CoA, OAA: オキサロ酢酸, 2-OG: 2-オキシグルタル酸, Suc-CoA: スクシニル CoA, 6-PG: 6-ホスホグルコン酸, Ru5P: リブロース 5-リン酸, S7P: セドヘプツロース 7-リン酸, R5P: リボース 5-リン酸, PRPP: ホスホリボシルピロリン酸, 5-RPA: 5-ホスホリボシルアミン, ALA: アミノレブリン酸, GSH: グルタチオン, G6PD: グルコース-6-リン酸脱水素酵素, PGD: ホスホグルコン酸脱水素酵素, TKT: トランスクターゼ, TALDO1: トランスアルドラーゼ 1, PPAT: ホスホリボシルピロリン酸アミドトランスフェラーゼ, MTHFD2: メチレンテトラヒドロ葉酸脱水素酵素 2, ME1: リンゴ酸酵素 1, γGCL: γ-グルタミル-システインリガーゼ。

る増殖細胞で構成されるマウスの前胃や小腸では、*Keap1* 遺伝子のノックダウンによる Nrf2 の恒常的な安定化により代謝関連遺伝子群の発現上昇が認められる。一方、通常大半の細胞が静止期にあると考えられる肝臓では、*Keap1* 遺伝子のノックダウンで Nrf2 を安定化させても、生体防御系遺伝子群の発現は上昇するものの、代謝関連遺伝子群の発現はあまり有意な上昇を示さない。しかし、肝臓において *Pten* 遺伝子を同時に欠損させて、PI3K-Akt 経路を強制的に活性化させた状態では、Nrf2 の活性化により代謝系遺伝子群の発現が顕著に上昇することが観察された¹³⁾。

したがって、本来、生体防御系遺伝子群を制御して恒常性維持を担っている Nrf2 は、がん細胞に代表される増殖シグナルが常に活性化している細胞では、酸化ストレス応答機能を増強しつつ、さらに同化反応を促進することで細胞増殖を支えていると推測される。

また、マウスの肝臓の門脈枝を結紮すると、結紮葉の退縮とともに、非結紮葉の肥大が観察されるが、この際、Nrf2 は非結紮葉における肝細胞の増殖を促進することがわかった(白崎他, 印刷中)。門脈枝の結紮に伴う一過性の PI3K-Akt 経路の活性化とそれに伴う Nrf2 の機能増強

が、代謝系遺伝子群の発現上昇と細胞増殖の促進をもたらしたものと解釈される。マウスにおける門脈枝結紮は、ヒトの肝切除術後の残肝容量の増加を目的として、術前に実施される門脈塞栓術に相当するものであり、Nrf2の活性化剤が門脈塞栓後の肝臓の肥大促進に有効である可能性が大きい。

6. おわりに

生体防御機構の鍵因子であるNrf2は、それ単独で細胞増殖を積極的に促進することではなく、増殖シグナルの活性化の存在下において初めて細胞増殖に貢献できると考えられる。したがって、Nrf2は「条件付き細胞増殖促進因子」であるといえる。実際、Nrf2が全身の細胞で恒常的に安定化している*Keap1* 遺伝子欠損マウスでは、上部消化管（舌、食道、前胃）で表皮細胞の過剰な増殖による過形成が観察されており¹⁴⁾、初代培養の巨核球で一過性の細胞増殖亢進が認められている¹⁵⁾。このように、限られた細胞系列でのみ、Nrf2の過剰状態が細胞増殖の促進をもたらすことを考えると、Nrf2が細胞増殖を促進するには、増殖シグナルに加えて必要な要因がほかにも存在することが予想される。そうした要因の解明は、がん細胞におけるNrf2の機能を選択的に阻害することを可能とし、Nrf2が活性化している難治性がんに対する抗がん治療開発への道を拓くものと期待される。

- 1) Uruno, A. & Motohashi, H. (2011) *Nitric Oxide*, 25, 153–160.
- 2) Cho, H.Y., Jedlicka, A.E., Reddy, S.P., Zhang, L.Y., Kensler, T.W., & Kleeberger, S.R. (2002) *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.*, 26, 42–51.
- 3) Suzuki, T., Shibata, T., Takaya, K., Shiraishi, K., Kohno, T., Kunitoh, H., Tsuta, K., Furuta, K., Goto, K., Hosoda, F., Sakamoto, H., Motohashi, H., & Yamamoto, M. (2013) *Mol. Cell. Biol.*, 33, 2402–2412.
- 4) Mitsuishi, Y., Motohashi, H., & Yamamoto, M. (2012) *Front. Oncol.*, 2, 200.
- 5) Kandath, C., McLellan, M.D., Vandin, F., Ye, K., Niu, B., Lu, C., Xie, M., Zhang, Q., McMichael, J.F., Wyczalkowski, M.A., Leiserson, M.D., Miller, C.A., Welch, J.S., Walter, M.J., Wendl, M.C., Ley, T.J., Wilson, R.K., Raphael, B.J., & Ding, L. (2013) *Nature*, 502, 333–339.
- 6) DeBerardinis, R.J., Lum, J.J., Hatzivassiliou, G., & Thompson, C.B. (2008) *Cell Metab.*, 7, 11–20.
- 7) Locasale, J.W., Grassian, A.R., Melman, T., Lyssiotis, C.A., Mattaini, K.R., Bass, A.J., Heffron, G., Metallo, C.M., Muranen, T., Sharfi, H., Sasaki, A.T., Anastasiou, D., Mullarky, E., Vokes, N.I., Sasaki, M., Beroukhi, R., Stephanopoulos, G., Ligon, A.H., Meyerson, M., Richardson, A.L., Chin, L., Wagner, G., Asara, J.M., Brugge, J.S., Cantley, L.C., & Vander Heiden, M.G. (2011) *Nat. Genet.*, 43, 869–874.
- 8) Possemato, R., Marks, K.M., Shaul, Y.D., Pacold, M.E., Kim, D., Birsoy, K., Sethumadhavan, S., Woo, H.K., Jang, H.G., Jha, A.K., Chen, W.W., Barrett, F.G., Stransky, N., Tsun, Z.Y., Cowley, G.S., Barretina, J., Kalaany, N.Y., Hsu, P.P., Ottina, K., Chan, A.M., Yuan, B., Garraway, L.A., Root, D.E., Mino-Kenudson, M., Brachtel, E.F., Driggers, E.M., & Sabatini, D. M. (2011) *Nature*, 476, 346–350.
- 9) Metallo, C.M., Gameiro, P.A., Bell, E.L., Mattaini, K.R., Yang, J., Hiller, K., Jewell, C.M., Johnson, Z.R., Irvine, D.J., Guarante, L., Kelleher, J.K., Vander Heiden, M.G., Iliopoulos, O., & Stephanopoulos, G. (2011) *Nature*, 481, 380–384.
- 10) Mullen, A.R., Wheaton, W.W., Jin, E.S., Chen, P.H., Sullivan, L.B., Cheng, T., Yang, Y., Linehan, W.M., Chandel, N.S., & DeBerardinis, R.J. (2011) *Nature*, 481, 385–388.
- 11) Frezza, C., Zheng, L., Folger, O., Rajagopalan, K.N., MacKenzie, E.D., Jerby, L., Micaroni, M., Chaneton, B., Adam, J., Hedley, A., Kalna, G., Tomlinson, I.P., Pollard, P.J., Watson, D.G., DeBerardinis, R.J., Shlomi, T., Ruppin, E., & Gottlieb, E. (2011) *Nature*, 477, 225–228.
- 12) Liu, H., Huang, D., McArthur, D.L., Boros, L.G., Nissen, N., & Heaney, A.P. (2010) *Cancer Res.*, 70, 6368–6376.
- 13) Mitsuishi, Y., Taguchi, K., Kawatani, Y., Shibata, T., Nukiwa, T., Aburatani, H., Yamamoto, M., & Motohashi, H. (2012) *Cancer Cell*, 22, 66–79.
- 14) Wakabayashi, N., Itoh, K., Wakabayashi, J., Motohashi, H., Noda, S., Takahashi, S., Imakado, S., Kotsuji, T., Otsuka, F., Roop, D.R., Harada, T., Engel, J.D., & Yamamoto, M. (2003) *Nat. Genet.*, 35, 238–245.
- 15) Motohashi, H., Kimura, M., Fujita, R., Inoue, A., Pan, X., Takayama, M., Katsuoka, F., Aburatani, H., Bresnick, E.H., & Yamamoto, M. (2010) *Blood*, 115, 677–686.

著者寸描

●本橋ほづみ（もとはし ほづみ）



東北大学加齢医学研究所遺伝子発現制御分野教授。博士（医学）。

■略歴 1966年鹿児島県に生る。90年東北大学医学部卒業。96年同大学院医学研究科修了。博士（医学）。同年筑波大学先端学際領域研究センター助手。2000年米国ノースウェスタン大学客員研究員。同年

筑波大学先端学際領域研究センター講師。06年東北大学大学院医学系研究科助教授。13年東北大学加齢医学研究所教授。現在に至る。

■研究テーマと抱負 遺伝子発現制御機構の解析を通してがんや炎症など加齢に伴う疾患の分子基盤を理解することをテーマとしています。特に核の中の代謝とストレス応答が遺伝子発現に及ぼす影響を明らかにして、ストレス応答機構と疾患の新しいパラダイムを拓きたいと考えています。

■ホームページ <http://www2.idac.tohoku.ac.jp/dep/ger/>