

博士論文

p62/Sqstm1 は Nrf2 依存的代謝再編成により
肝細胞がんの悪性化をもたらす

齊藤 哲也

はじめに

本論文は、2013 年 4 月から 2016 年 3 月の期間、東京大学大学院新領域創成科学研究科にて博士論文研究として行った研究をまとめたものである。

目次

| | |
|--------------------------------------|----|
| 要旨 | 1 |
| | |
| 第 1 章. 緒言 | 2 |
| 1. p62/Sqstm1 について..... | 2 |
| 2. p62-keap1-Nrf2 経路について..... | 4 |
| 3. p62 と腫瘍の関連性について..... | 7 |
| 4. 本研究の目的..... | 7 |
| | |
| 第 2 章. 実験材料と方法 | 8 |
| 1. 細胞培養および細胞生物学的解析..... | 8 |
| 2. 遺伝子改変マウス..... | 9 |
| 3. 蛋白質抽出およびウエスタンブロッティング..... | 9 |
| 4. 抗体..... | 10 |
| 5. 定量 PCR..... | 11 |
| 6. メタボローム解析..... | 14 |
| 7. 組織学的解析..... | 16 |
| 8. マイクロアレイ解析..... | 17 |
| 9. 統計学的解析..... | 17 |
| | |
| 第 3 章. 結果..... | 18 |
| 1. 肝細胞がん細胞株における代謝プロファイリング..... | 18 |
| 2. 肝細胞がん細胞株における薬剤耐性と増殖..... | 28 |
| 3. オートファジー欠損マウス肝臓における代謝プロファイリング..... | 38 |
| 4. HCV 陽性 HCC におけるリン酸化 p62 の蓄積..... | 44 |
| | |
| 第 4 章. 考察..... | 49 |

| | |
|--|--------|
| 1. がん細胞における p62-keap1-Nrf2 経路活性化の機序..... | 50 |
| 2. p62-keap1-Nrf2 経路を介した肝細胞がん悪性化の機序..... | 51 |
| 3. がん細胞とオートファジーの関係..... | 53 |
| 4. 結語 | 56 |
| 第 5 章 謝辞..... | 56 |
| 第 6 章 引用文献..... | 57 |

図表一覧

- 図 1 p62/Sqstm1 および p62 介在性選択的オートファジー
- 図 2 p62 による新しいストレス応答システム
- 図 3 オートファジーと keap1-Nrf2 経路の連動機構
- 図 4 Nrf2 に制御されている代謝酵素群
- 図 5 肝細胞がん細胞株におけるリン酸化模倣変異体 p62 による Nrf2 活性化
- 図 6 肝細胞がん細胞株におけるリン酸化模倣変異体 p62 による Nrf2 標的遺伝子の発現誘導
- 図 7 メタボローム解析 -Huh7 細胞-
- 図 8 メタボローム解析 -Huh7 細胞- 及び[U-¹³C₆] グルコーストレーサー実験-
- 図 9 メタボローム解析 -Huh7 細胞- 及び[U-¹³C₅] グルタミントレーサー実験-
- 図 10 肝細胞がん細胞株の抗がん剤耐性に対するリン酸化 p62 による影響
- 図 11 *Mrps* ノックダウンが肝細胞がん細胞株抗がん剤耐性に与える影響
- 図 12 肝細胞がん細胞株の増殖に対するリン酸化 p62 による影響
- 図 13 肝細胞がん細胞株を用いた異種移植実験
- 図 14 BSO 処理による Nrf2 活性化への影響
- 図 15 BSO 処理有/無の条件下における肝細胞がん細胞株のグルタチオン量
- 図 16 BSO 処理有/無に条件下における肝細胞がん細胞株の増殖
- 図 17 オートファジー欠損肝臓におけるリン酸化 p62 を介した Nrf2 活性化

- 図 18 オートファジー欠損マウス肝臓におけるリン酸化 p62 および Keap1 陽性の凝集体形成
- 図 19 オートファジー欠損マウス肝臓における Nrf2 標的遺伝子発現
- 図 20 オートファジーマウス肝臓を用いたメタボローム解析
- 図 21 HCV 陽性ヒト肝細胞がん患者検体におけるリン酸化 p62 の蓄積
- 図 22 ヒト肝細胞がん患者検体における免疫組織化学解析
- 図 23 HCV 陽性ヒト肝細胞がん患者検体におけるリン酸化 p62 および Keap1 陽性の凝集体形成
- 図 24 本研究により明らかになった p62 の発現亢進による肝細胞がんの発症機構モデル
- 表 1 p62、リン酸化 p62 および keap1 の発現に伴う病因
- 表 2 肝細胞がん細胞株 Huh7 を用いた網羅的解析結果の相関性
- 表 3 オートファジー欠損肝臓を用いた網羅的解析結果の相関性

略記一覽

| | |
|--------|---|
| ATG | Autophagy-related gene |
| BSO | Buthionine sulfoximine |
| DTT | Dithiothreitol |
| GAPDH | Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase |
| GCLC | Glutamate-cysteine ligase catalytic subunit |
| Gusb | β -glucuronidase |
| G1P | Glucose-1-phosphate |
| G6P | Glucose-6-phosphate |
| G6PD | Glucose-6-phosphate dehydrogenase |
| HCC | Human hepatocellular carcinoma |
| HBV | Hepatitis B virus |
| HCV | Hepatitis C virus |
| HEPES | 2-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethanesulfonic acid |
| IMP | Inosine monophosphate |
| KEAP1 | Kelch-like ECH-associated protein 1 |
| ME1 | Malic enzyme 1 |
| MOI | Multiplicity of infection |
| MTORC1 | Mammalian target of rapamycin complex 1 |
| MRP | Multidrug resistance-associated proteins |
| MTHFD2 | Methylenetetrahydrofolate dehydrogenase 2 |

| | |
|---------|---|
| NQO1 | NAD(P)H dehydrogenase quinone 1 |
| NRF2 | Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 |
| PDAC | Pancreatic ductal adenocarcinoma |
| PGD | Phosphogluconate dehydrogenase |
| PI3K | Phosphatidylinositol 3-kinase |
| PPAT | Phosphoribosyl pyrophosphate amidotransferase |
| PPP | Pentose phosphate pathway |
| PRPP | Phosphoribosyl pyrophosphate |
| PVDF | Polyvinylidene difluoride |
| RU5P | Ribulose-5-phosphate |
| SLC7A11 | Solute carrier family 7, member 11 |
| SPF | Specific pathogen-free |
| S7P | Sedoheptulose-7-phosphate |
| TALDO1 | Transaldolase 1 |
| TCA | Tricarboxylic acid |
| TKT | Transketolase |
| TRAF6 | TNF receptor associated factor 6 |
| UGDH | UDP-glucose dehydrogenase |
| UGT1A1 | UDP-glucuronosyltransferase 1a1 |
| 2AB | L-2-aminobutyrate |
| 2-OG | 2-Oxoglutarate |

要旨

p62/SQSTM1 は、細胞生存、細胞増殖、そして細胞死に関与する多機能タンパク質であり、オートファジーによりその量的制御を受けている。これまでに p62 遺伝子の重複、p62 タンパク質の蓄積、翻訳後修飾が腫瘍増殖に関与することが報告されてきた。また、主要な生体防御経路である Keap1-Nrf2 経路の非標準経路として p62-Keap1-Nrf2 経路が同定された。この経路ではリン酸化 p62 が Keap1 と Nrf2 の相互作用を競合的に阻害することにより転写因子 Nrf2 が安定化・活性化される。p62-Keap1-Nrf2 経路は選択的オートファジー起動時に一過的に駆動し生体防御遺伝子発現を誘導すること、肝細胞がんでは恒常的に本経路が活性化されておりそれが腫瘍の増殖に寄与することが報告されている。今回、p62 が Nrf2 依存的代謝再編成(リプログラミング)により肝細胞がんの悪性化をもたらす機構について示す。p62 の 349 番目のセリン残基のリン酸化は、転写因子 Nrf2 を活性化し、それによりグルコース、グルタミン代謝をそれぞれグルクロン酸合成、グルタチオン合成経路に向けた。その結果、肝細胞がん細胞は、抗がん剤耐性能や強力な増殖能を獲得した。興味深いことに 349 番目のセリン残基がリン酸化された p62 は、C 型肝炎ウイルス陽性の肝細胞がん患者の腫瘍部位に顕著に蓄積していた。この結果は、p62 が代謝の再編成を介してがんの増殖および抗がん剤耐性機構に関与することを示唆している。

第1章 緒言

1. 選択的オートファジーと p62/Sqstm1 について

オートファジーは、真核生物が持つ細胞内タンパク質を分解するための仕組みの一つであり、栄養飢餓時にその誘導を高めることで、生存に必要なアミノ酸やエネルギーの供給に働いている。オートファジーはこれまで非選択的な分解系と考えられてきた。しかし、アダプタータンパクを介した特異的分解が存在することが発見され、“選択的オートファジー”という新しい概念が生まれた。さらに近年、選択的オートファジーの異常が、神経変性疾患、感染症、がんなどの重篤疾患の発症に関与することが明らかとなってきた¹⁻⁴。特に肝臓では、非アルコール性脂肪肝炎 (NASH)、ウイルス性肝炎、肝臓がんの発症、ないしは悪性化因子として注目を浴びている。

p62/Sqstm1（以下 p62 と記す）は、オートファゴソーム局在（膜結合型）タンパク質 LC3（酵母のオートファジー必須遺伝子 Atg8 のヒトホモログ）、そしてユビキチン鎖と結合できることから、ユビキチン化カーゴを分解処理する選択的オートファジーのアダプター分子であると提唱されている（図 1）¹。事実、p62 はユビキチン陽性の変性タンパク質凝集体²や脱分極しユビキチン化されたミトコンドリアに局在し³、それらは p62 と共にオートファジーにより分解される（図 1）⁴。したがって、p62 はオートファジー欠損組織において顕著に蓄積する。最近、この p62 介在性選択的オートファジーと主要な酸化（環境）ストレス応答システム Keap1-Nrf2 経路との相互関連が明らかになってきた⁵⁻¹⁰。

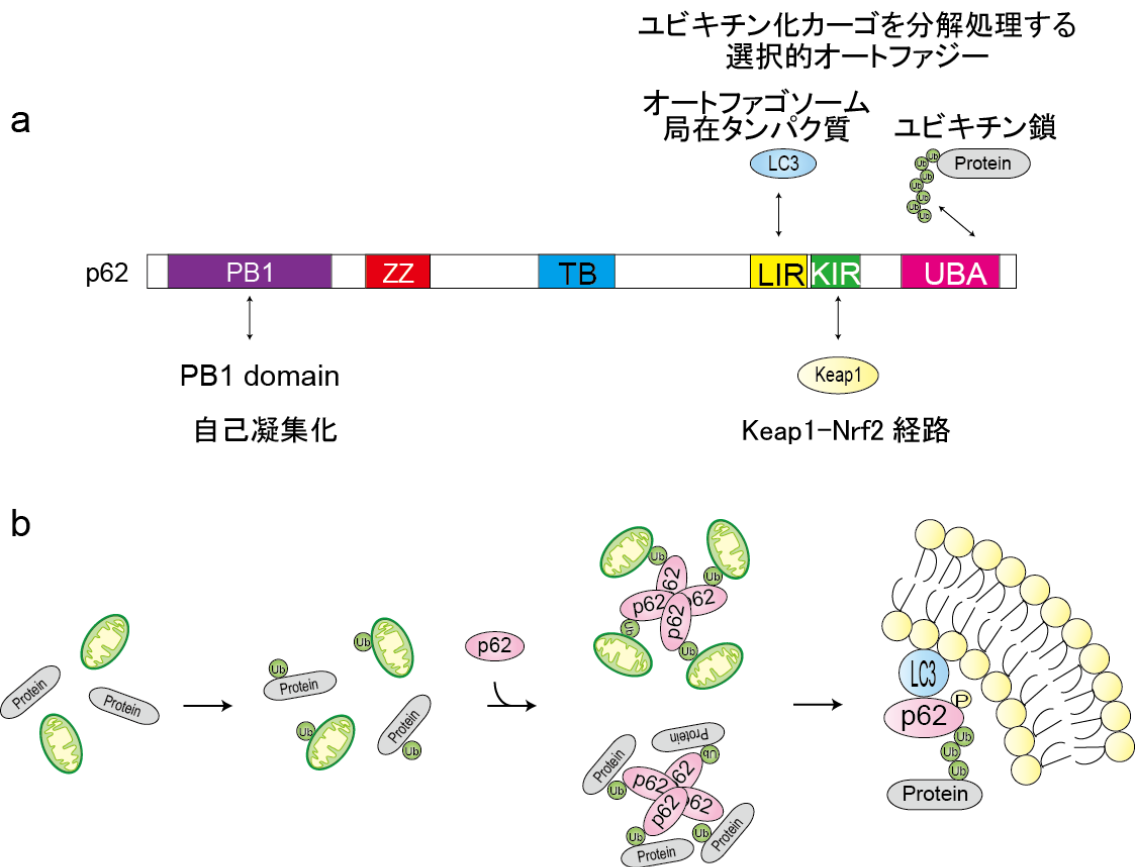


図1 p62/Sqstm1 および p62 介在性選択的オートファジー

a. p62/Sqstm1 は PB1ドメイン (PB1)、ジンクフィンガードメイン (ZZ)、TRAF6 結合ドメイン (TB)、LC3 認識配列 (LIR) や Keap1 結合領域 (KIR) を持つ。LIR ないしは KIR を介して LC3、Keap1 タンパク質と相互作用する。また、N 末端側の PB1ドメインを介して、PB1 を持つ他のタンパク質とヘテロオリゴマーもしくはホモオリゴマーを形成し、C 末端側のユビキチン会合ドメインを介してユビキチン化タンパク質と結合する。

b. p62 を介した選択的オートファジーの代謝過程

2. p62-Keap1-Nrf2 経路について

転写因子 Nrf2 は親電子性物質、活性酸素種および活性窒素種などにより活性化され、様々な生体防御系遺伝子の発現を増強する^{11,12}。通常条件下においては、Nrf2 はユビキチンリガーゼ複合体のアダプタータンパク質 Keap1 によって認識され、ユビキチン化を受け、プロテアソームにより分解される(図 2)^{11,12}。一方、細胞がストレスに暴露されると、Keap1 の特定のシステイン残基が酸化修飾されることにより Keap1 と Nrf2 の相互作用が解除される(図 2)^{11,12}。その結果、Nrf2 は分解から免れて安定化し、核内に移行、小 Maf 群因子とともに一連の抗酸化タンパク質などの標的遺伝子の発現を誘導する(図 2)^{11,12}。この標準的な Keap1-Nrf2 機構の一方、申請者らのグループは p62 の Keap1 相互作用領域に位置する 351 番目(マウス)(ヒトにおける 349 番目)のセリン残基がリン酸化されると、リン酸化 p62 が Keap1 と Nrf2 との相互作用を競合的に阻害し、Nrf2 を活性化する新しい Nrf2 活性化機構を発見した⁵⁻¹⁰。このリン酸化 p62 に依存した Nrf2 の活性化は、選択的オートファジー発動時に起こっていた(図 3)⁵⁻¹⁰。つまり、主要な生体防御経路であるオートファジーと Keap1-Nrf2 経路がリン酸化 p62 により連結していることが判明した(図 3)⁵⁻¹⁰。

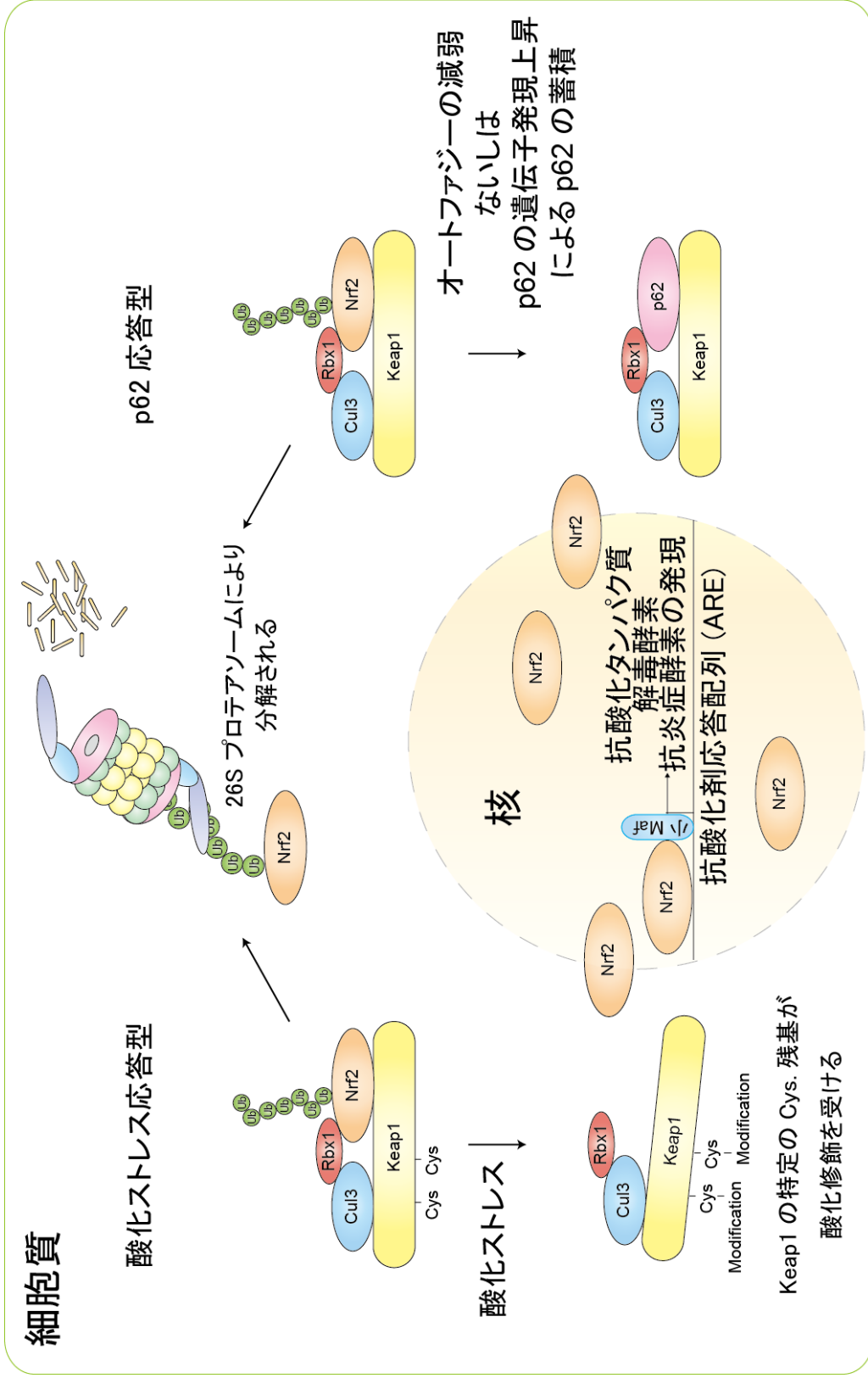


図 2 p62 による新しいストレス応答システム

酸化ストレス応答型に応答した Keap1-Nrf2 経路および p62 を介した p62-Keap1-Nrf2 経路。

1. ユビキチン化カージゴ上に p62 が局在する。
2. KIR ドメインに含まれる 349 番目のセリンがリン酸化を受ける。
5. オートファジーによる細胞毒性カージゴの除去
(第二の生体防御機構)

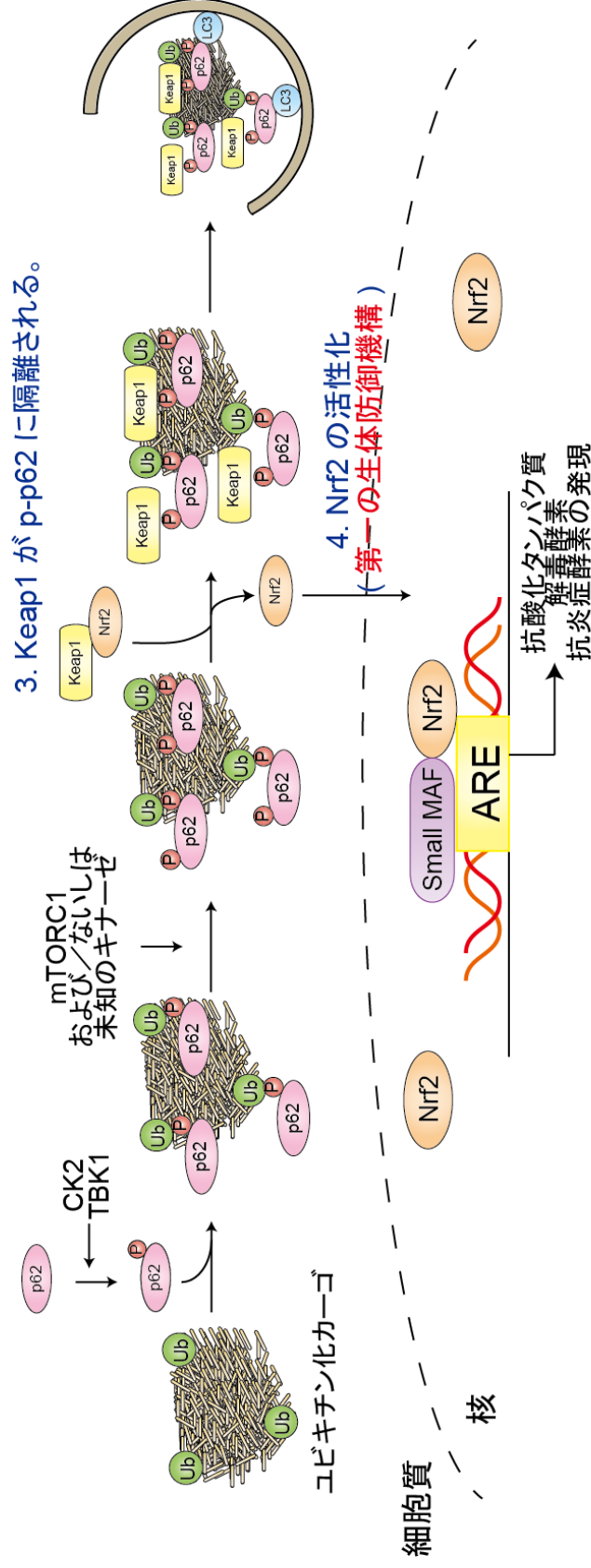


図 3 オートファジーと Keap1-Nrf2 経路の連動機構

主要な生体防御経路であるオートファジーと Keap1-Nrf2 経路がリン酸化 p62 を介して連結していることを示す。

3. p62 と腫瘍の関連性について

p62-Keap1-Nrf2 経路の調節不全は、腫瘍形成や腫瘍増殖に関係があると考えられる。事実、S351 リン酸化 p62 を蓄積し、恒常的に Nrf2 を活性化するオートファジー不全マウスの肝臓において、自発的な腫瘍形成が 7 か月齢から観察され加齢とともに主要の増加・増大が見られた^{13,14}。このマウスの表現型として、重篤な肝肥大および肝機能障害が観察された⁴。この腫瘍形成は、p62 ないしは Nrf2 を同時に欠損させることにより顕著に抑制された^{14,15}。重要なことに、私たちは、約 50% のヒト肝細胞がん患者の組織においてリン酸化 p62 の蓄積やリン酸化 p62 および Keap1 陽性の凝集体形成が起こっていることを見出した^{6,16}。さらに、リン酸化 p62 を蓄積する肝細胞がん細胞株において p62 を欠損させると、*in vitro*、*in vivo* ともにその増殖が抑制されることを確認した⁶。一方、最近、腎細胞がん患者の 5% に p62 を含む領域が遺伝子重複していること、p62 の発現上昇が腫瘍形成と相関することが報告された¹⁷。即ち、p62 はがん遺伝子であることが提唱された。この報告と矛盾なく、p62 遺伝子の欠失が Ras 誘導性の肺腺がん形成を抑制することや¹⁸、恒常的な Kras 活性化による p62 発現亢進が膵管腺がんの発達に関与する¹⁹ ことが報告されている。

4. 本研究の目的

緒言 3 項で述べたように、最近、p62 の発現上昇が腫瘍形成と相関することが明らかに解析が進んでいる。しかしながら、増加した p62 あるいはリン酸化 p62 がどのように腫瘍増殖に貢献するかは未解明のままであった。そこで本研究は、肝細胞がん細胞における p62-Keap1-Nrf2 経路活性化が代謝再編成を引き起こすか否かを検討することを目的とした。

第2章 材料と方法

1. 細胞培養および細胞生物学的解析

細胞培養に用いる培地 (DMEM) は Life Technologies より購入した。HCC 細胞株はヒューマンサイエンス研究資源バンクより提供を受けた。HCC 細胞株は 10%FBS (GIBCO) 添加培地で 37°C、5%CO₂ インキュベーターの条件下で培養した。マウス由来の野生型 p62 および変異体 p62 アデノウイルス (S351E および S351A) は Adenovirus Dual Expression Kit (Takara) を用いて作製した。外因性 p62 およびその変異体 p62 タンパク質を HCC 細胞株に発現させるために、HCC 細胞株は細胞生物学的解析に 6 ウェルプレート、メタボローム解析に 15 cm デッシュを用いて播種した。播種 24 時間後、50 MOI のアデノウイルスを含む新しい培地に変えた。グルコーストレース実験において、HCC 細胞株は、アデノウイルス 48 時間感染後に PBS で洗浄し、10 mM [U-¹³C₆] グルコース (Cambridge Isotope Laboratories, Tewksbury, MA, USA) を添加したグルコース不含の RPMI1640 培地(GIBCO)を用いて 1 時間培養した。グルタミントレース実験において、HCC 細胞株は、アデノウイルス 48 時間感染後に PBS で洗浄し、4mM [U-¹³C₅] glutamine (Cambridge Isotope Laboratories) を添加したグルタミン不含の RPMI1640 培地(GIBCO)を用いて 6 時間培養した。細胞増殖および細胞毒性解析は Cell Counting Kit-8 (Dojindo) を用いて測定した。薬剤耐性実験に用いた Sorafenib および Cisplatin はフナコシより購入した。*Mrps* ノックダウン実験は、DharmaFECT トランスフェクション試薬(Thermo Scientific) を使用して 25 nM の siRNA を Huh7 細胞に導入した。siRNA の標的は *Mrp1*(M-007308-01)、*Mrp2* (M-004225-01)、*Mrp5* (M-007314-02)である。HCC 細胞内のグルタチオン量測定には、

GSH-Glo™ グルタチオンアッセイ (Promega)を用いた。GSH 産生酵素の律速酵素である γ -グルタミルシステイン合成酵素を阻害する BSO は Sigma より購入した。異種移植実験は、Huh7 細胞に GFP、S351E 変異体 p62 および S351A 変異体 p62 のアデノウイルスを 48 時間感染後、PBS で洗浄、トリプシン処理後に PBS で懸濁し 2×10^7 cells の細胞懸濁液を調製した²⁰。麻酔下で、懸濁液 0.1ml(2×10^6 cells)を免疫不全ヌードマウス(BALB/C-nu/nu、6 週齢、オス、日本 SLC)の背部皮下に各細胞株を 10 匹ずつに移植した²⁰。腫瘍増殖は移植 20 日後から 5 日ごとに腫瘍体積(近似値)を測定し 35 日目まで経過観察し、実験に用いた。

2. 遺伝子改変マウス

以前に当研究室で報告したオートファジー必須遺伝子 *Atg7* の肝細胞特異的欠損マウス(*Atg7^{fl/fl}; Alb-Cre*)および *p62^{fl/fl}* マウスないしは *Nrf2^{fl/fl}* と *Atg7^{fl/fl}; Alb-Cre* を交配させた *Atg7^{fl/fl}; p62^{fl/fl}; Alb-Cre* および *Atg7^{fl/fl}; Nrf2^{fl/fl}; Alb-Cre* マウスを用いた^{4,21,22}。*p62^{fl/fl}* マウスは、筑波大学蔵栄治博士および柳川徹博士から *Nrf2^{fl/fl}* マウスは東北大学山本雅之博士および本橋ほづみ博士よりご供与頂いた。マウスは SPF 施設で飼育し、マウス実験に関しては東京都医学総合研究所、新潟大学、東北大学における研究倫理会のプロトコールに従った。

3. 蛋白質抽出およびウエスタンブロッティング

マウス肝臓を、0.25 M sucrose、pH 7.4 の 10 mM HEPES、1 mM DTT を含んだ緩衝液でホモジナイズしたものを全抽出物とする。また、HCC 細胞株は PBS で洗浄後、TNE Buffer(10mM Tris-HCl PH7.5、150mM NaCl、1mM EDTA pH8.0、protease

inhibitor (Roche)、1%NP-40、1% Triton X-100)により細胞を溶解し、遠心分離 (15,000rpm、4℃、10 分間)を行い、上清を細胞全抽出液として回収した。マウス肝臓 および HCC 細胞の核画分は、NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents (Thermo scientific)の方法に従って抽出した。抽出液は、BCA 法を用いてタンパク質 濃度を定量した後に、4xLDS sample Buffer を添加した。サンプルは 98℃で 5 分間 煮沸を行い、Nu-PAGE に用いた。12%および 4-12% Bis-Tris gels を用いて NuPAGE system (Invitrogen) により MOPS-SDS 緩衝液で分離し、PVDF 膜へ転写した。転写 膜をブロックエース(雪印)溶解液ないしは 5%スキムミルク(Becton, Dickinson and Company))/TBST(Tris、Nacl、Tween20、PH を 8.0 に調整)に室温で 45 分侵してブ ロッキングを行った。その後、TBST で 500~1000 倍希釈した 1 次抗体に一夜 4℃で 侵した。一夜 4℃で侵した転写膜を TBST で 3 回/15 分洗浄後、2 次抗体液(TBST で 10000 倍希釈)に侵して、室温で 30 分浸透した。TBST で 3 回/5 分洗浄後、Western Lightning Plus-ECL (PerkinElmer, Inc)を発光試薬とし LAS-4000(Fuji Film)を用い て検出した。

4. 抗体

1 次抗体として Pgd 抗体 (Abcam, Inc., ab96225、希釈比 1:500)、抗g-Gclc 抗体 (Abcam, Inc., ab41463、希釈比 1:500)、抗 p62 抗体 (Progen Biotechnik, GP62-C、希 釈比 1:1000)、抗 Nqo1 抗体 (Abcam, Inc., ab34173、希釈比 1:1000)、抗 Nrf2 抗体 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., H-300、希釈比 1:200)、抗 LC3B 抗体(Cell Signaling Technology, #2775、希釈比 1:500)、抗 Ugdh 抗体 (ab155005, Abcam、希釈比 1:500)、 抗 Keap1 抗体(10503-2-AP, Proteintech Group、希釈比 1:500)、抗 Slc7a11/xCT 抗

体(ab175186, Abcam、希釈比 1:500)、抗 ubiquitin 抗体 (D058-3, Medical & Biological Laboratories、希釈比 1:500)、抗 Atg7 抗体 (Wako Pure Chemical Industries, 013-22831、希釈比 1:1000)、抗 Actin 抗体 (Chemicon International, Inc., MAB1501R、希釈比 1:1000)、抗 Lamin B 抗体(Santa Cruz Biotechnology, Inc., M-20、希釈比 1:200) は示した製造元より購入した。抗リン酸化 p62 ポリクローナル抗体(希釈比 1:500)は抗原としてペプチド Cys+KEVDP(pS)TGELQSL を用いてウサギより得た⁶。

2 次抗体として抗マウス抗体(Jackson ImmunoResearch)、抗ラビット抗体(Jackson ImmunoResearch)、抗モルモット抗体(Jackson ImmunoResearch)、抗ヤギ抗体 (Jackson ImmunoResearch) (各々希釈比 1:10,000)を使用した。

5. 定量 PCR

TRIzol (Invitrogen) のプロトコルに従い調製した 1 μ g の RNA から Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche Applied Science, Indianapolis, IN)を用いて cDNA を合成した。LightCycler[®] 480 Probes Master (Roche Applied Science) を使用し LightCycler[®] 480 (Roche Applied Science)によって定量 PCR を行った。ヒトサンプルの値は *GAPDH*、マウスサンプルの値は *Gusb*(β -glucuronidase)を用いて標準化した。ヒト細胞株に用いたプライマーの配列は、

Nqo1 Left, ATCCTGCCGAGTCTGTTCTG;

Nqo1 Right, AGGGACTCCAAACCACTGC;

Mrp1 Left, CCATGTGGGAAAACACATCTT;

Mrp1 Right, CTGTGCGTGACCAAGATCC;

Mrp2 Left, AGTGAATGACATCTTCACGTTTG;

Mrp2 Right, CTTGCAAAGGAGATCAGCAA;

Mrp5 Left, CAGATTCCCCCAGCCTATG;

Mrp5 Right, ACTGGAACAGCCCCGTTA;

Ugdh Left, GTAGCTCGTTATTGGCAGCA;

Ugdh Right, ATCTATGATCCGGGAAGCAA;

Ugt1a1 Left, ATATGGTTTTTGTGTTGGTGGAATC

Ugt1a1 Right, AAGCATTAATGTAGGCTTCAAATTC

G6pd Left, CTGCAGATGCTGTGTCTGGT;

G6pd Right, TGCATTTCAACACCTTGACC;

Pgd Left, CGGGTACAGACATGAGATGC;

Pgd Right, GTGTGAGCCCCGAAGTAATC;

Taldo Left, AGCTGGTGCCTGTGCTCT;

Taldo Right, GCAACCAACGGAAAGACTTC;

Tkt Left, GGATGACCAGGTGACCGTTA;

Tkt Right, CGCGGATGTTGATCTTTTCT;

Me1 Left, GCAGCTCTTCGAATAACCAAG;

Me1 Right, CAATCAGGTGTGCAATCCCTA;

Slc7a11 Left, CCATGAACGGTGGTGTGTT;

Slc7a11 Right, GACCCTCTCGAGACGCAAC;

Gclc Left, GGATGATGCTAATGAGTCTGACC;

Gclc Right, TCTACTCTCCATCCAATGTCTGAG;

Gapdh Left, AGCCACATCGCTCAGACAC;

Gapdh Right, GCCCAATACGACCAATCC.

マウス肝臓およびマウス細胞株の解析に用いたプライマーの配列は、

Nqo1 Left, AGCGTTCGGTATTACGATCC;

Nqo1 Right, AGTACAATCAGGGCTCTTCTCG;

Mrp1 Left, GGACAAGGTGGAGGGACAT;

Mrp1 Right, CGGAGAGAGTCATTCTGAATCC;

Mrp2 Left, GTGACAGAGGGC GGTGAC;

Mrp2 Right, GGCCCTACCCAGGCATAG;

Mrp4 Left, CCTCATTTGCCAATCTGAGAAA;

Mrp4 Right, GCCATGTTCATCCCTCTGA;

Mrp5 Left, CACCATCCATGCCTACAACA;

Mrp5 Right, AGGGAGCCTGGTTGTCATC;

Mrp9 Left, GACGACTGCATCAGCAAGTT;

Mrp9 Right, GCGCGCAGTTGAAGTACAG;

Ugdh Left, CTGAATCTGCCCCGAAGTAGC;

Ugdh Right, GCAAACCTCCTCCTCTGGTA;

Ugt1a1 Left, AAAGTGTCAACAACAAGAGCTA

Ugt1a1 Right, GCCAGGTCCAGAGGCTCTAT

G6pd Left, CCAGCCCATCCCCTATGTAT;

G6pd Right, AGCCCACTCTCTTCATCAGC;

Pgd Left, AAAGATCCGGGACAGTGCT;

Pgd Right, CACCGAGCAAAGACAGCTT;

Tkt Left, CACCGTGGAGGACCACTACT;
Tkt Right, TCCAGGTTCACCCCTACTAG;
Taldo Left, ACACGGGTGATTTCAATGC;
Taldo Right, TGGTAGGCAGGCATCTGG;
Ppat Left, GCATACACCCCTCCTCAAGA;
Ppat Right, GGGCGCTTCTTTCATTAAGTT;
Mthfd2 Left, TCCAAATCTGATCACAGCTGAC;
Mthfd2 Right, AACCAGCTTTCTTCTTGACTCC;
Me1 Left, GCAGCTCTTCTGAATAACCAAG;
Me1 Right, AAGTGAGCAATCCCCAAGG;
Gcl Left, GTGGACGAGTGCAGCAAG;
Gcl Right, GTCCAGGAAATACCCCTTCC;
Slc7a11 Left, CCCAGATATGCATCGTCCTT;
Slc7a11 Right, CGAGTAAAGAGAGAGGACAACCA;
Gus Left, GATGTGGTCTGTGGCCAAT;
Gus Right, TGTGGGTGATCAGCGTCTT.

6. メタボローム解析

液体窒素で瞬間凍結したマウス肝臓試料(約 60 mg)に 50 μ M の内部標準物質液 1 (Solution ID:H3304-1002, Human Metabolome Technologies, Tsuruoka, Japan)を 500 μ L 含んだメタノールを加え、氷冷した。その後、卓上型破砕機を用いて 1,500 rpm、120 秒で 3 回ホモジナイズすることで肝臓試料中の酵素を不活化した。その後、200 μ L

の Milli-Q と 500 μL のクロロホルムを加え、良く攪拌し、4°C、4,600 $\times g$ で 15 分間遠心分離した。上層の水層 400 μL を Millipore 5-kDa の限外ろ過チューブに移し、遠心 (9,100 $\times g$ 5 時間) することでタンパク質を除去した。得られたろ過溶液を凍結乾燥し、50 μL の Milli-Q (200 μM の 3-aminopyrrolidine (Sigma-Aldrich)、trimesate (Wako) を含む) で溶解したものを CE-TOFMS によって解析した。また、HCC を用いた解析には HCC 細胞(1×10^7 cells)を 10%マンニトール洗浄後、内部標準物質液 1(Methionine sulfone (Wako)、2-(n-morpholino) ethanesulfonic acid (Dojindo)、および D-camphor-10-sulfonic acid (Wako) 各 25 μM)を含む 1ml MeOH を加え、10 分間後、スクレーパーを用いて回収した。その後、400 μL のサンプル液に対して 200 μL の Milli-Q と 400 μL のクロロホルムを加え、良く攪拌し、4°C、10,000 $\times g$ で 3 分間遠心分離した。上層の水層 400 μL を Millipore 5-KDa 限外ろ過チューブに移し、遠心 (9,100 $\times g$ 3 時間) することでタンパク質を除去した。得られたろ過溶液を凍結乾燥し、25 μL の Milli-Q (200 μM の 3-aminopyrrolidine (Sigma-Aldrich)、trimesate (Wako) を含む) で溶解したものを CE-TOFMS によって解析した。CE-TOFMS は G3250AA LC/MSD TOF mass spectrometer と Agilent 1100 isocratic HPLC pump、Agilent G1603A CE-MS adapter kit および Agilent G1607A CE-ESI-MS sprayer kit (Agilent Technologies) を搭載した Agilent CE Capillary Electrophoresis System (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany)を用いた。このシステムの制御には Agilent G2201AA ChemStation software version B.03.01 for CE (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany)を利用した。陽イオン性代謝物の解析には、電解液であるカチオン電気泳動緩衝液 (Solution ID: H3301-1001, Human Metabolome Technologies) と融解シリカキャピラリー (50 μm i.d. \times 100 cm total length) を用いた²³。その後、

サンプルを 50 mbar/3 秒の圧（約 3 nL）で注入し、印加電圧は 30 kV に設定した。エレクトロスプレーイオン化質量分析法（ESI-MS）は、陽イオンモードにキャピラリー電圧は 4 kV に設定した。今回の質量分析法は、50 m/z から 1,000 m/z まで読み取り、他の条件はカチオン解析とした。陰イオン性代謝物の解析には、電解液であるアニオン電気泳動緩衝液（Solution ID: H3302-1021, Human Metabolome Technologies）と共に融解シリカキャピラリー（50 μ m i.d. \times 80 cm total length）を用いた^{24,25}。その後、サンプルは 50 mbar/3 秒（約 3 nL）の圧で注入し、印加電圧は 30 kV に設定した。ESI-MS は、陰イオンモードに、キャピラリー電圧は、4 kV に設定した。この質量分析法では、50 m/z から 1,000 m/z までを読み取り、他の条件はアニオン解析とした²³。この CE-TOFMS によって得られた生データを、メタボローム解析用ソフトウェア MasterHands を使用し既知の代謝物の同位体異性体、付加イオン、そして他のイオンに当たるシグナルピークを除いた^{26,27}。その後、標準物質に当たる全てのシグナルピークを排除し、泳動時間（MT）は、内部標準を用いて標準化した。続いて、ピークのアラインメントを m/z 値と MT 値に従って行った。最後に、内部標準としてカチオンでは MetSul を、アニオンでは CSA を用いてそれぞれに対してそれぞれ標準化し、さらにその面積値をサンプル量で標準化した。

7. 組織学的解析

マウス肝臓を迅速に切除し、ブロックに切り分け、pH7.4 の 4% パラホルムアルデヒド 4% スクロース を含む 0.1 M リン酸塩緩衝液(PB)により浸透固定した。固定したブロックを洗浄し、示した抗体を用いて染色用のパラフィンに包埋した。また、ヒト患者肝臓検体については手術的に切除した病巣を 10%ホルマリン固定し、段階的に脱

水後、パラフィンに包埋した。サンプルは新潟大学消化器外科より譲渡頂いた

8. マイクロアレイ解析

マウス肝臓から TRIzol reagent (Life Technologies)を用いて RNA を分離し、RNeasy mini kit (Qiagen)を使用して精製した。RNA の品質は、Bioanalyzer (Agilent Technologies)を用いて検定した。全 RNA から相補 RNA を合成し、Agilent Technologies 社の方法に従って SurePrint G3 mouse GE マイクロアレイとハイブリダイズさせた。このアレイスライドを、Agilent SureScan マイクロアレイスキャナで読み取り、その蛍光強度を Feature Extraction ソフトウェア (Agilent Technologies)によって数値化した。この得られたシグナルを、GeneSpring ソフトウェア version 12.1 (Agilent Technology)の標準正規化アルゴリズムにより正規化した。2 サンプル間で転写の差を示す遺伝子群は、独立 t 検定 (Benjamini-Hochberg FDR multiple testing correction ($P < 0.05$))を用いて、予め抽出した遺伝子群から同定し、さらに GeneSpring を用いて pathway 解析を行った。 GEO データベースにオートファジー必須遺伝子 *Atg7* の肝細胞特異的欠損マウス (*Atg7^{fl/fl}; Alb-Cre*)および *Nrf2^{fl/fl}* と *Atg7^{fl/fl}; Alb-Cre* を交配させた *Atg7^{fl/fl}; p62^{fl/fl}; Alb-Cre* および *Atg7^{fl/fl}; Nrf2^{fl/fl}; Alb-Cre* マウスを用いたマイクロアレイ解析の結果を示す。 Accession number は GSE65174。

9. 統計学的解析

グラフ中に示した値は、平均値±標準誤差である。統計学的解析は、独立 t 検定 (Welch test) に基づいて行った。0.05 以下の p 値は、統計学的有意性を意味する。これらのデータ処理を行うために Microsoft office の Excel を用いた。

第3章 結果

1. 肝細胞がん細胞株における代謝プロファイリング

転写因子 Nrf2 は恒常的に安定化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し、さらに積極的に細胞増殖を促進することが報告されている。また最近、がん細胞の中で Nrf2 がグルコースとグルタミンの代謝経路に作用して、細胞の構成成分を合成する同化経路を進めていることが明らかになってきた²⁸。Nrf2 は核酸の新規合成経路である PPP(ペントースリン酸経路)の主要酵素(G6PD、PGD、TKT、TALDO)を直接制御するとともに、その先の合成経路に作用することでプリンヌクレオチドの合成を促進している²⁸。また、律速酵素群である ME1 と γ -GCLC の遺伝子発現を正に調節することでグルタミン代謝(グルタミノリシスおよびグルタチオン合成)を進めている(図 4)²⁸。これらの酵素の制御を通じて、Nrf2 はがん細胞に核酸と NADPH を絶えず供給することで細胞増殖を促進していると考えられる²⁸。これらは、特に PI3K-Akt 経路が活性化している肺がん細胞において見られ、がん増殖に有利な代謝再編成を起こすことがこれまでに報告されている²⁸。これらのことから分化した静止期にある細胞でレドックスの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環境下では、元来の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ものと推測する。

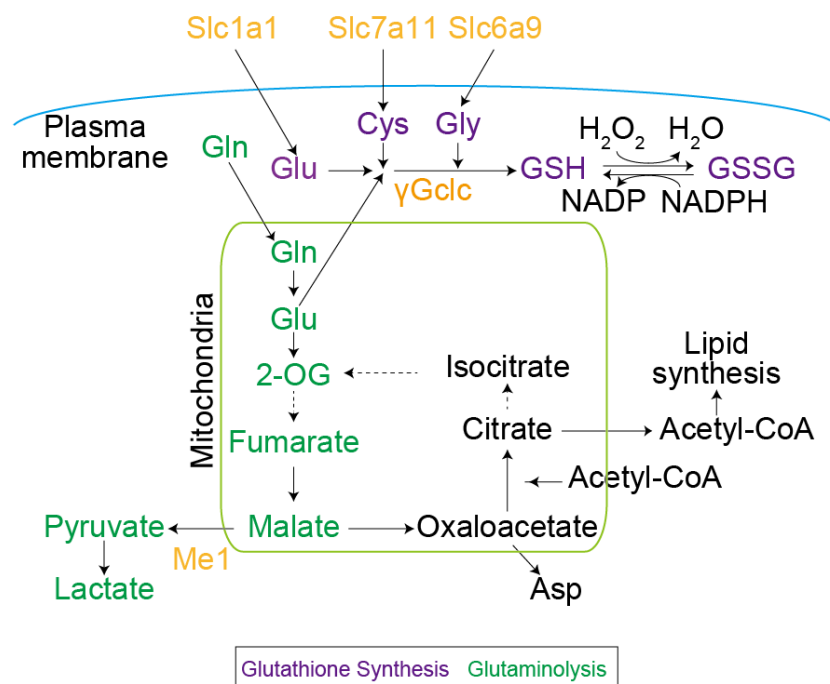
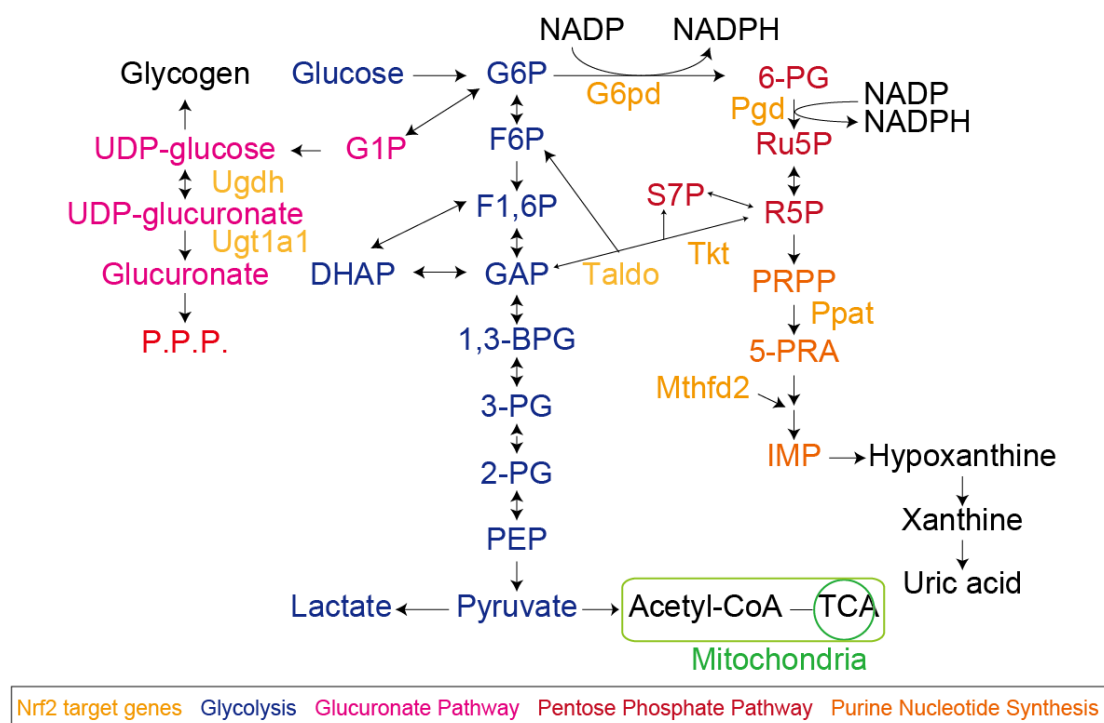


図 4 Nrf2 に制御されている代謝酵素群

Nrf2 に制御されているグルコースおよびグルタミン代謝に含まれる酵素群を代謝経路と共に示した。

そこで増加した p62 あるいはリン酸化 p62 が p62-Keap1-Nrf2 経路を介して Nrf2 を恒常的に活性化させることから、リン酸化 p62 を介した Nrf2 の恒常的な活性化が、がん細胞において代謝再編成に関与するのかどうか肝細胞がん細胞株を用いて検証した。内在性リン酸化 p62 をほとんど持たないヒト肝細胞がん細胞株 Huh7、JHH1、HepG2 およびマウス肝細胞がん株 Hepa1 に野生型 p62、リン酸化模倣変異体 p62(S351E)、ないしはリン酸化不能変異体 p62(S351A)を発現させた結果、S351E を発現させた Huh7、JHH1、HepG2 および Hepa1 において Nrf2 の活性化(核内安定化)が確認された(図 5)。

S351E 発現 Huh7 は、*Nqo1* などの抗酸化タンパク質群のみならず、*Mrps*、*Slc7a11/xCT*、PPP、グルタチオン合成、およびグルタミノリシスに関わる酵素の遺伝子発現の上昇も示した(図 6)。さらに、S351E 変異体の発現によりグルクロン酸経路に関わる酵素をコードする *Ugdh* および *Ugh1a1* の遺伝子発現誘導が確認された(図 6)。これらは、ヒアルルナン、コンドロイチン硫酸、そしてヘパラン硫酸などのグリコサミノグリカン合成および薬剤のグルクロン酸抱合に関与する。予想に反して、S351E 変異体の発現はプリンヌクレオチド合成に関わる酵素群の遺伝子発現を誘導しなかった。さらに、S351E を発現させた Huh7 において *Pgd*、*Gclc*、そして *Nqo1* タンパク質量の増加も確認された(図 5)。この S351E による影響は、内在性リン酸化 p62 をほとんど持たない他の肝細胞がん細胞株 Hepa1、JHH1 および HepG2 においても認められた一方、Keap1 に体細胞変異を有する報告があり²⁹ 内因性に S351 リン酸化 p62 を蓄積する Huh1 においては全く観察されなかった(図 5 および図 6)。

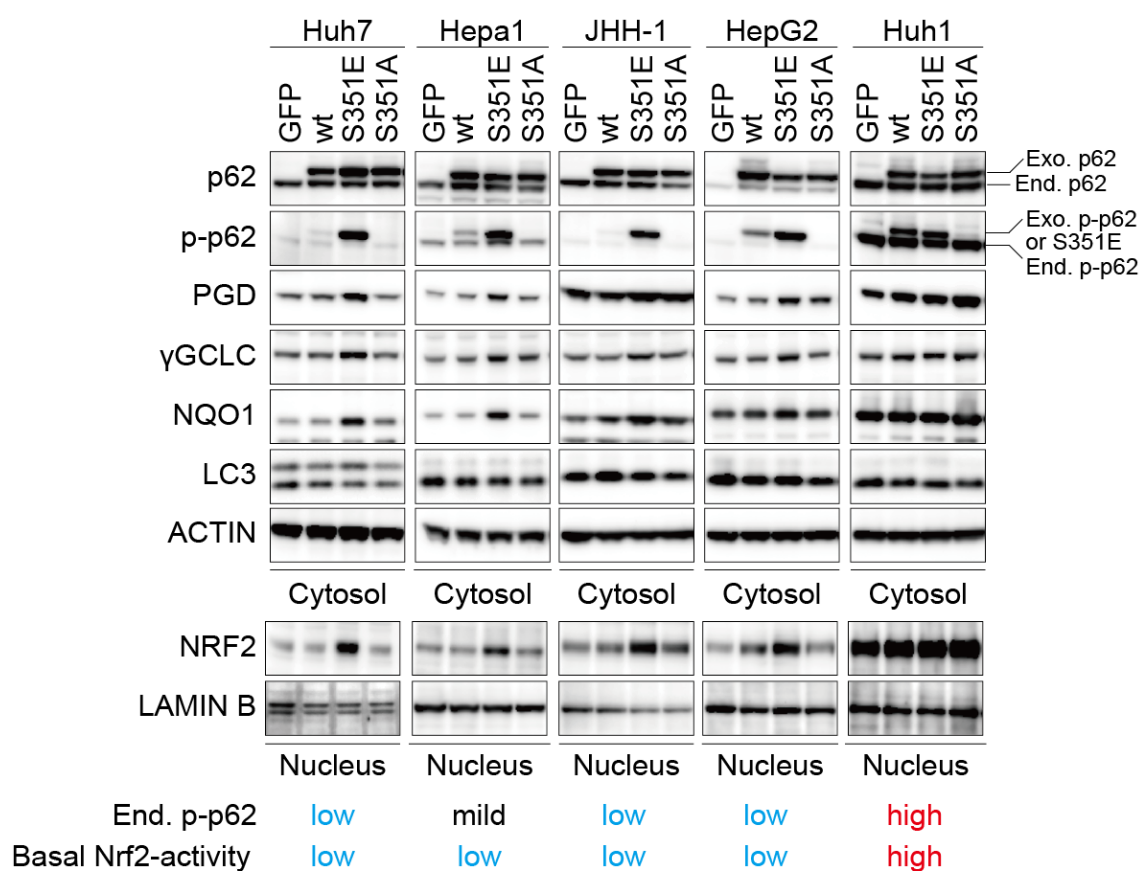


図 5 肝細胞がん細胞におけるリン酸化模倣変異体 p62 による Nrf2 活性化

アデノウイルスを用いて FLAG タグ野生型 p62 およびその変異体を過剰発現させた。

48 時間感染後、調製した細胞質分画および核分画を NuPAGE し、各抗体を用いて

ウエスタンブロットを行った。データは 3 回の独立した実験から得た。

LaminB および Actin はローディングコントロール。

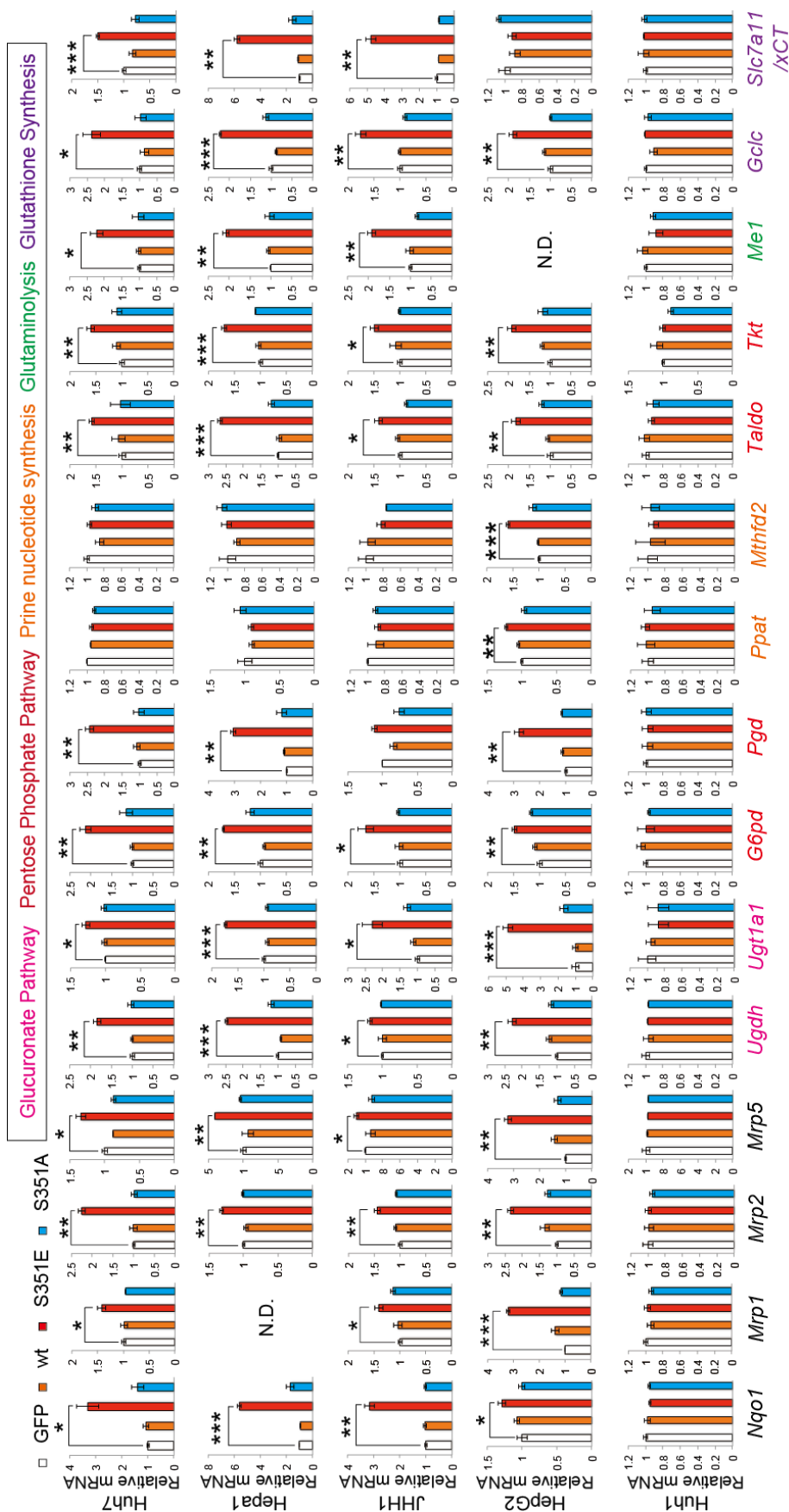


図 6 肝細胞がん細胞株におけるリン酸化模倣変異体 p62 による Nrf2 標的遺伝子の発現誘導

肝細胞がん細胞に GFP、野生型、S351E 変異体および S351A 変異体 p62 アデノウイルスを用いて発現させ、48 時間後に RNA の調製および cDNA を合成し定量 PCR を行った。数値は、GFP を発現させた HCC 細胞の mRNA 量によって標準化している。データは 3 回行った実験の平均値と標準誤差を示す。*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001。

次に、野生型、S351E、ないしは S351A 変異体 p62 を発現させた Huh7 を用いて代謝物の網羅的な測定を行った。S351E 変異体の発現はグルクロン酸経路の代謝物である UDP-グルコースおよび UDP-グルクロン酸の量を上昇させた(図 7)。予想外に、S351E 変異体を発現させた Huh7 において、PPP 代謝物質に顕著な影響は確認されなかった(図 7)。また、S351E は、GSH(還元型グルタチオン)量の増加も引き起こした(図 7)。加えて、システインを基質とする GSH と同様に 2AB を基質とする Ophthalmate の産生量も増加した³⁰。これらの代謝物の変化は、野生型および S351A 変異体の発現では認められなかった(図 7)。

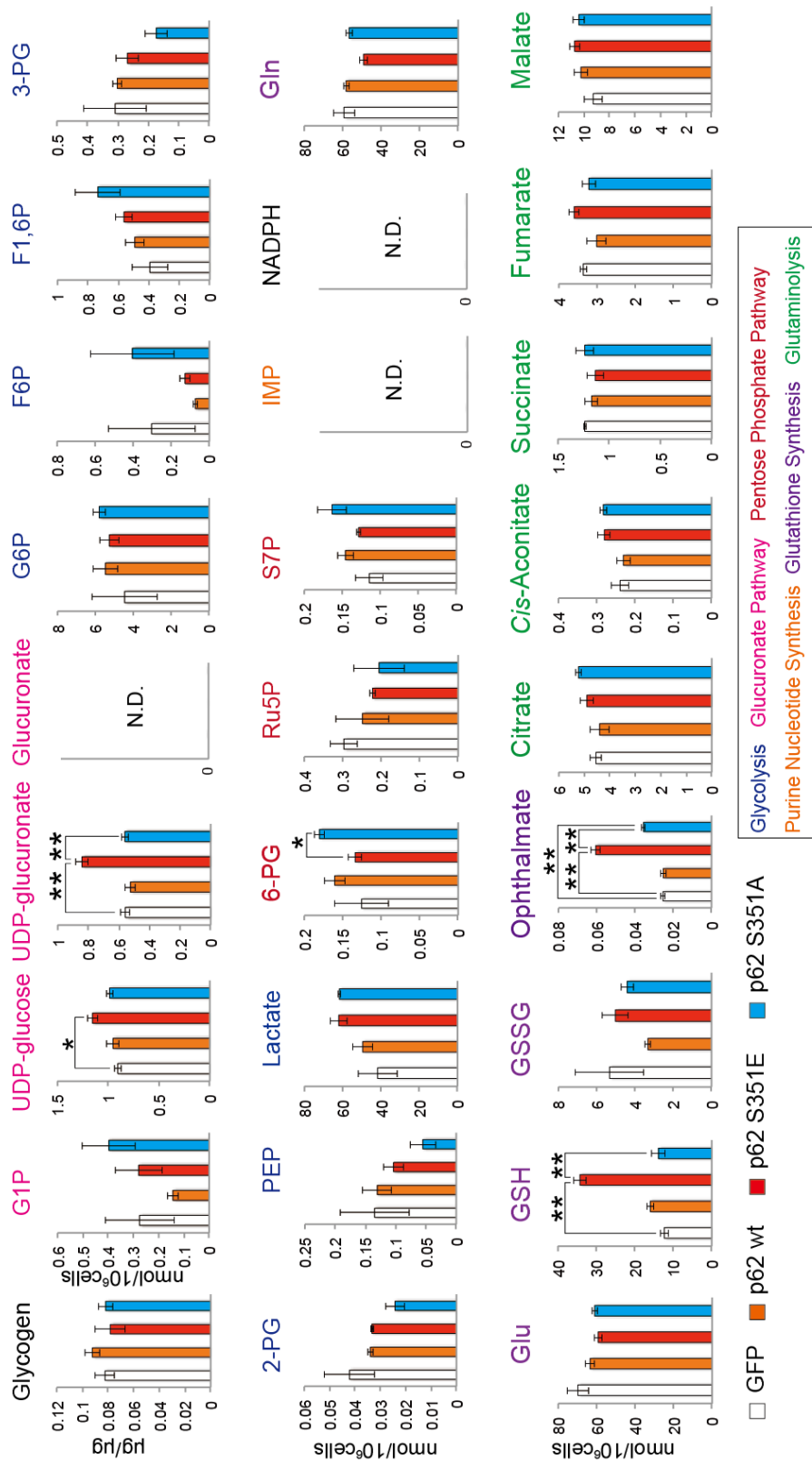


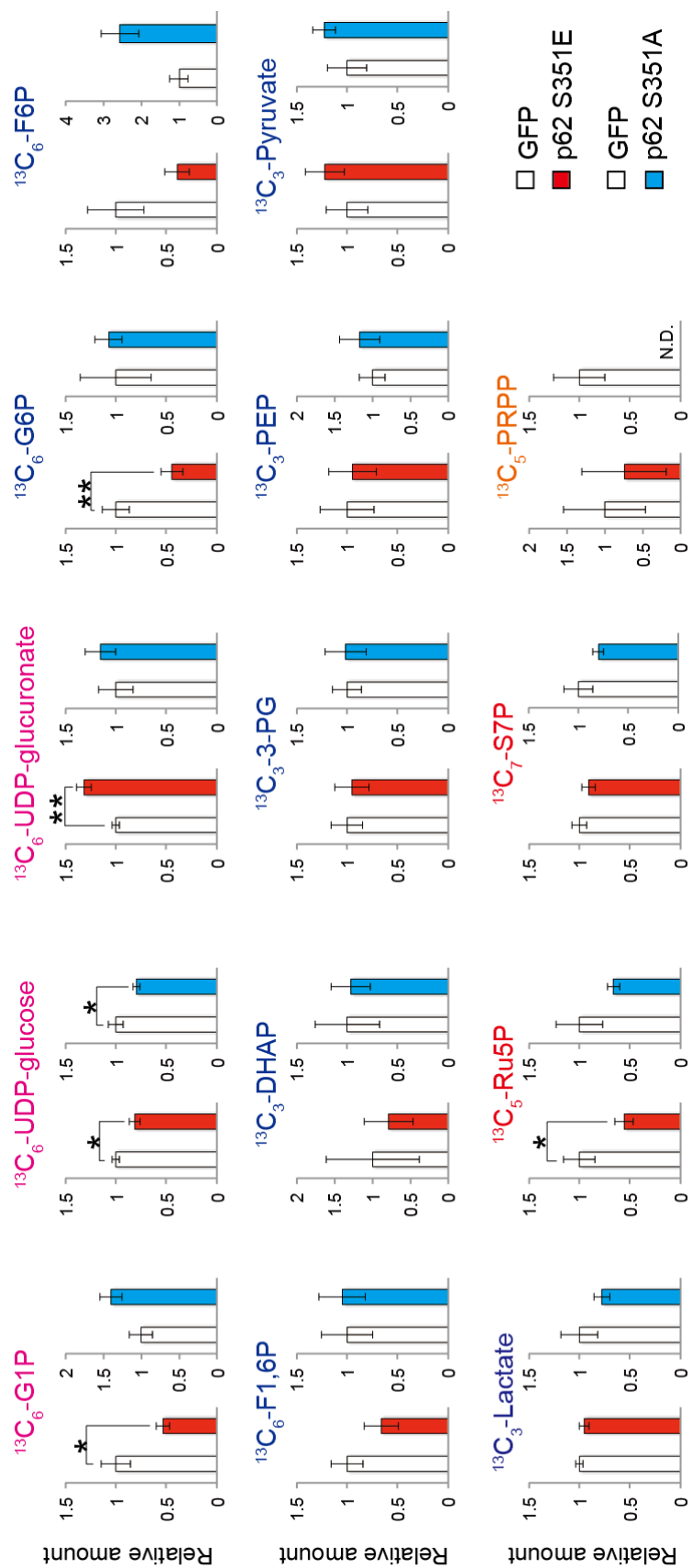
図 7 メタボローム解析 -Huh7 細胞 -

GFP、野生型、S351E および S351A 変異体 p62 を発現させた Huh7 細胞における解糖系、グルクロン酸経路、ペントースリン酸経路、プリンヌクレオチド合成、グルタチオン合成、TCA 回路の中間体代謝物絶対量を示す (n=3)。数値は細胞 10⁶Cells あたりの mol 数 (nmol/10⁶cells)。

*P<0.05, **P<0.01。

$^{13}\text{C}_6$ -グルコースを利用したトレーサー実験は、S351E 変異体の発現が $^{13}\text{C}_6$ -G6P および $^{13}\text{C}_6$ -G1P などの解糖系の中間代謝産物の量を減少させる一方、グルコースからグルクロン酸経路の代謝物 $^{13}\text{C}_6$ -UDP グルクロン酸の産生の増加を起こすことを明らかにした(図 8)。また、このトレーサー実験は、Huh7 においてグルコースから $^{13}\text{C}_5$ -Ru5P、 $^{13}\text{C}_7$ -S7P、そして $^{13}\text{C}_5$ -PRPP などの PPP およびプリンヌクレオチド合成の中間代謝物が産生されることを示したが、S351E 変異体の発現はそれらの産生量に影響を与えなかった(図 8)。 $^{13}\text{C}_5$ -グルタミンを用いたトレーサー実験では、S351E 変異体の発現により、グルタミンから GSH の産生が顕著に増加することが分かった(図 9)。S351E の発現で確認されたグルクロン酸経路中間代謝物および GSH の産生増加は、S351A 変異体の発現では確認されなかった(図 8、図 9)。

これらのことは、肝細胞がん細胞においてリン酸 p62 を介した Nrf2 の活性化が、グルクロン酸経路、グルタチオン合成を促進させることを意味する。



Glycolysis Gluconate Pathway Pentose Phosphate Pathway Purine Nucleotide Synthesis

図 8 メタボローム解析 -Huh7 細胞 - 及び [U-13C6] グルコーストレース - 実験

GFP、S351E および S351A 変異体 p62(各 n=10) を発現させた Huh7 を 1 時間 [U-13C6] グルコースで培養し、CE-TOFMS を用いて解析を行った。解糖系、グルクロン酸経路、ペントースリン酸経路、プリンヌクレオチド合成の中間代謝物相対量を示す。

数値は GFP を発現させた代謝物量によって標準化している。*P<0.05、**P<0.01、***P<0.001。

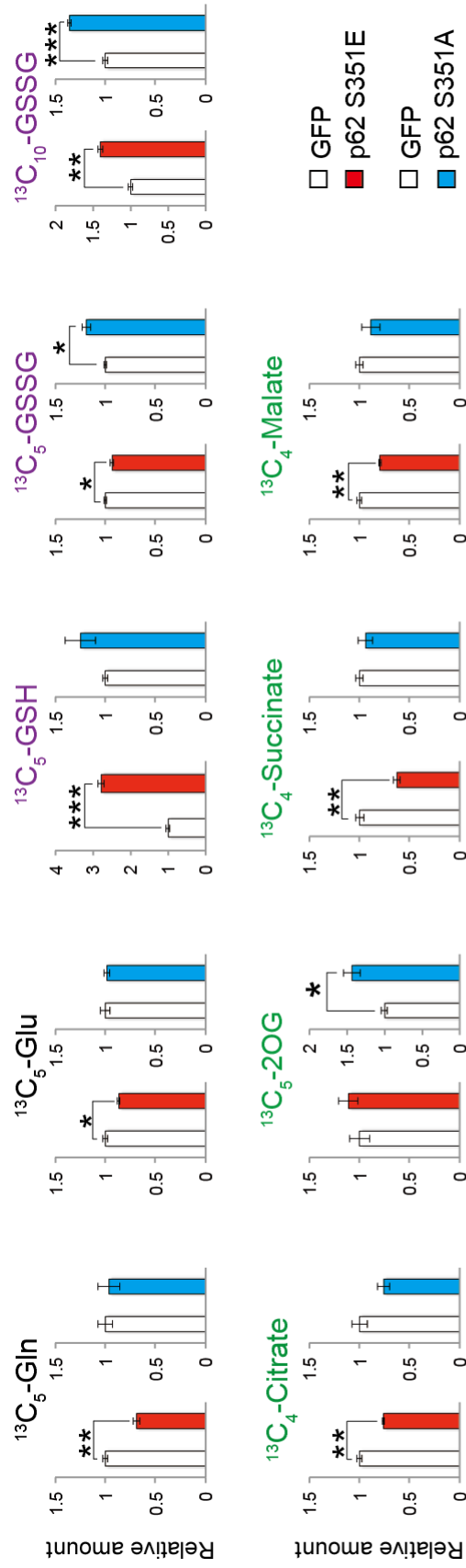


図9 メタボローム解析 -Huh7 細胞 - 及び [U-13C5] グルタミントレーサー実験

GFP、S351E および S351A 変異体 p62(各 n=3) を発現させた Huh7 を 6 時間 [U-13C5] グルタミンで培養し、CE-TOFMS を用いて解析を行った。グルタチオン合成、TCA 回路の中間体代謝物相対量を示す。値は GFP を発現させた代謝物量によって標準化している。
*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001。

2. 肝細胞がん細胞株における薬剤耐性と増殖

リン酸化 p62 を持つ肝細胞がん細胞は *Mrps*、*Slc7a11/xCT*、抗酸化に関わる遺伝子発現の増加のみならず薬剤抱合に関与する GSH および UDP-グルクロン酸産生が亢進していることが分かった(図 5、図 6、図 7、図 8、および図 9)。この事実は、リン酸化 p62 蓄積型肝細胞がん細胞は、抗がん剤耐性となっていることを示唆する。そこで、リン酸化 p62 非蓄積型 Huh7、Hepa1 およびリン酸化 p62 蓄積型 Huh1 を用い、腎がんや肝細胞がんに対して用いられる分子標的治療薬であるソラフェニブ³¹および様々な固形がんに対する抗がん剤であるシスプラチン^{32,33}に対する感受性を調べた。予想した通り、リン酸化 p62 非蓄積型 Huh7 と Hepa1 は、いずれの抗がん剤に対しても高い感受性を示し、その薬効は S351E の発現により緩和された(図 10)。*Mrps* の遺伝子抑制は S351E の分子標的治療薬や抗がん剤に対する耐性を著しく打ち消した (図 11)。対照的に、リン酸化 p62 蓄積型 Huh1 は、抗がん剤に対して抵抗性を示し、それは S351E の発現により影響を受けなかった(図 10)。

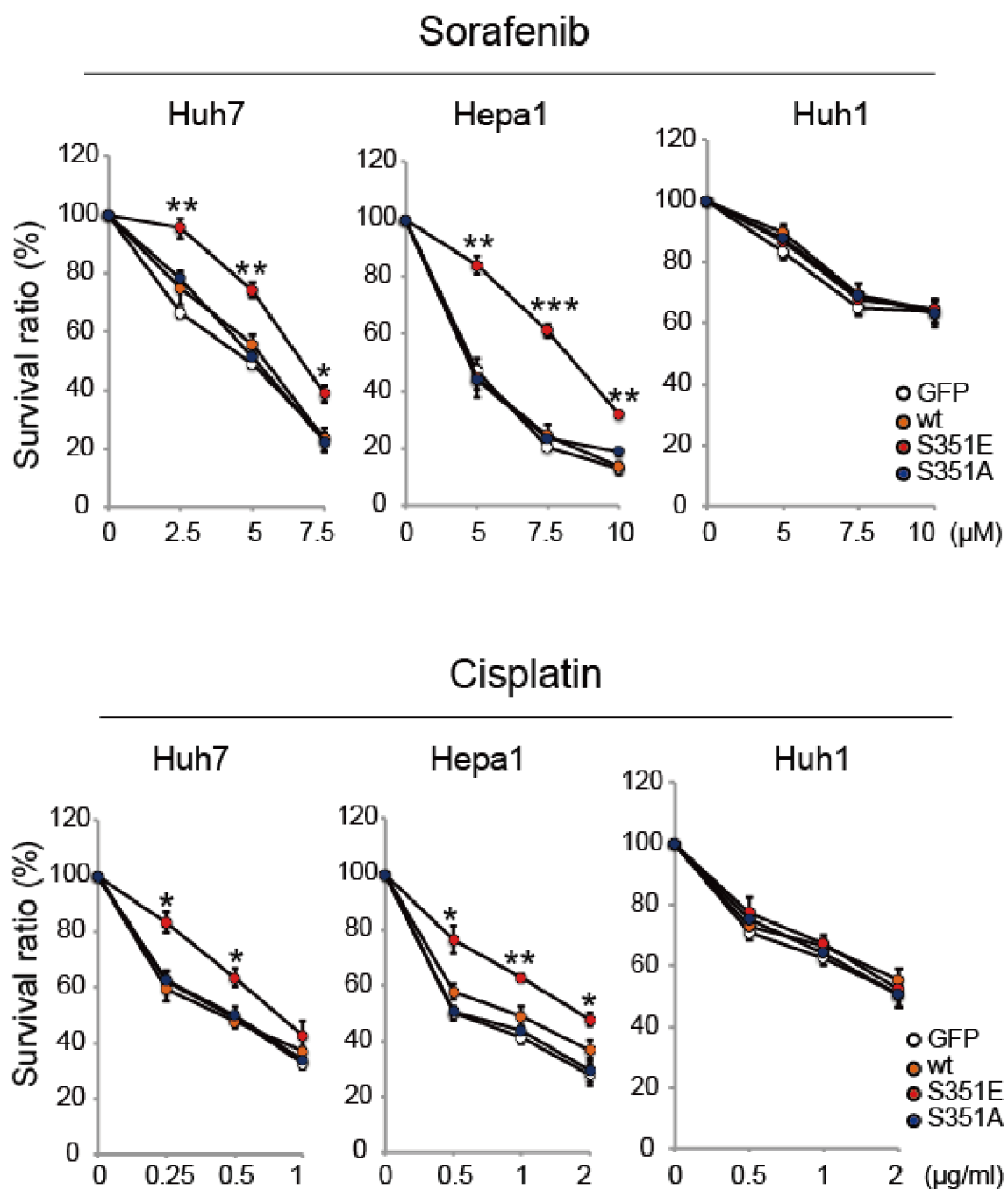


図 10 肝細胞がん細胞株の抗がん剤耐性に対するリン酸化 p62 による影響

各肝細胞がん細胞株に GFP、野生型 p62 およびその変異体のアデノウイルスを用いて 60 時間感染させた。

その後、示した濃度のソラフェニブおよびシスプラチンを 48 時間処理し、生存比を調べた (n=3)。

数値は、平均値と標準誤差を示す。*P<0.05、**P<0.01、***P<0.001。

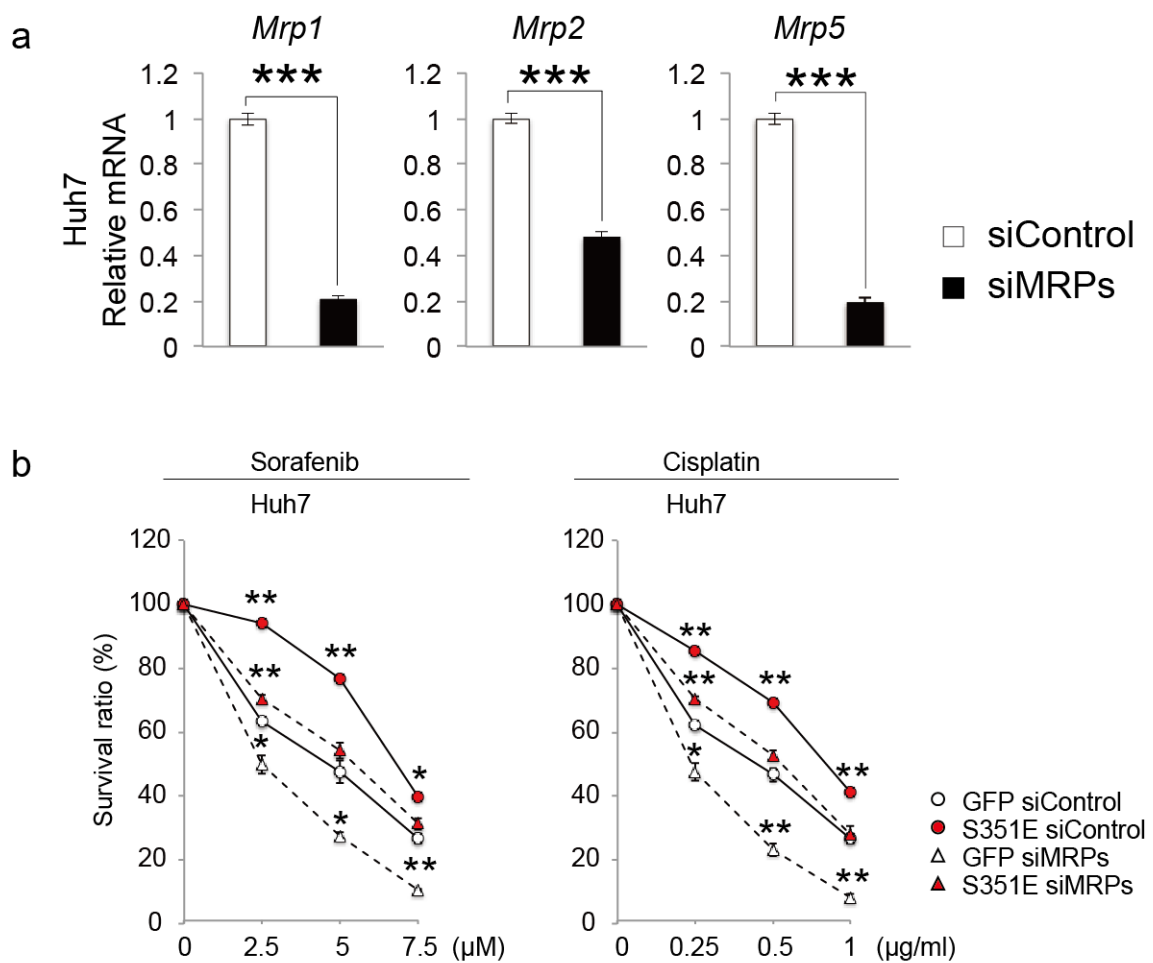


図 11 Mrps ノックダウン肝細胞がん細胞株抗がん剤耐性に与える影響

a. Mrps ノックダウンの効果。Huh7 にコントロールおよび *Mrps* (*Mrp1*、2、そして 5) siRNA を発現させ、48 時間後に RNA の調製 cDNA を合成し定量 PCR を行った。

数値はコントロール siRNA を発現させた細胞の mRNA 量によって標準化している。

データは 3 回行った実験の平均値と標準誤差を示す。*** $P < 0.001$ 。

b. GFP および p62 S351E を発現させた Huh7 にコントロールおよび *Mrps* (*Mrp1*、2、そして 5) siRNA 処理を行い、72 時間後に示した濃度のソラフェニブおよびシスプラチンを 48 時間処理し、生存比を調べた ($n=4$)。データは実験の平均値と標準誤差を示す。* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 。

次に、GSH の産生増加が細胞増殖に寄与することが報告されている^{34,35}ことから、ヒト肝細胞がん細胞の増殖における S351E の影響を調べた。S351E の発現は、内在性のリン酸化 p62 が蓄積している Huh1 を除く調べた全てのヒト肝細胞がん細胞株 Huh7、Heap1、JHH-1、HepG2 の細胞増殖を促進させた(図 12)。一方、S351A を発現させた場合には、この効果は認められなかった(図 12)。さらに、ヌードマウスを用いた異種移植実験において、Huh7 の腫瘍形成能が S351E の発現により著しく亢進されることが確認された(図 13)。

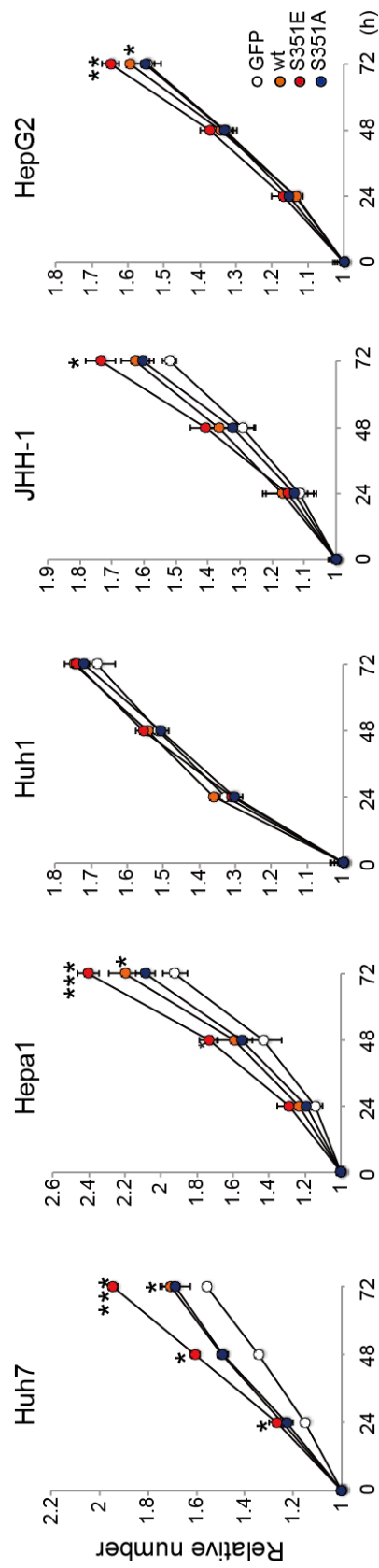


図 12 肝細胞がん細胞株の増殖に対するリン酸化 p62 による影響

各肝細胞がん細胞株に GFP、野生型 p62 およびその変異体のアデノウイルスを用いて感染させた。感染後 60 時間から増殖を測定した (n=3)。初め (0 h) の細胞数を 1 とする。数値は、平均値と標準誤差を示す。*P<0.05、**P<0.01、***P<0.001。

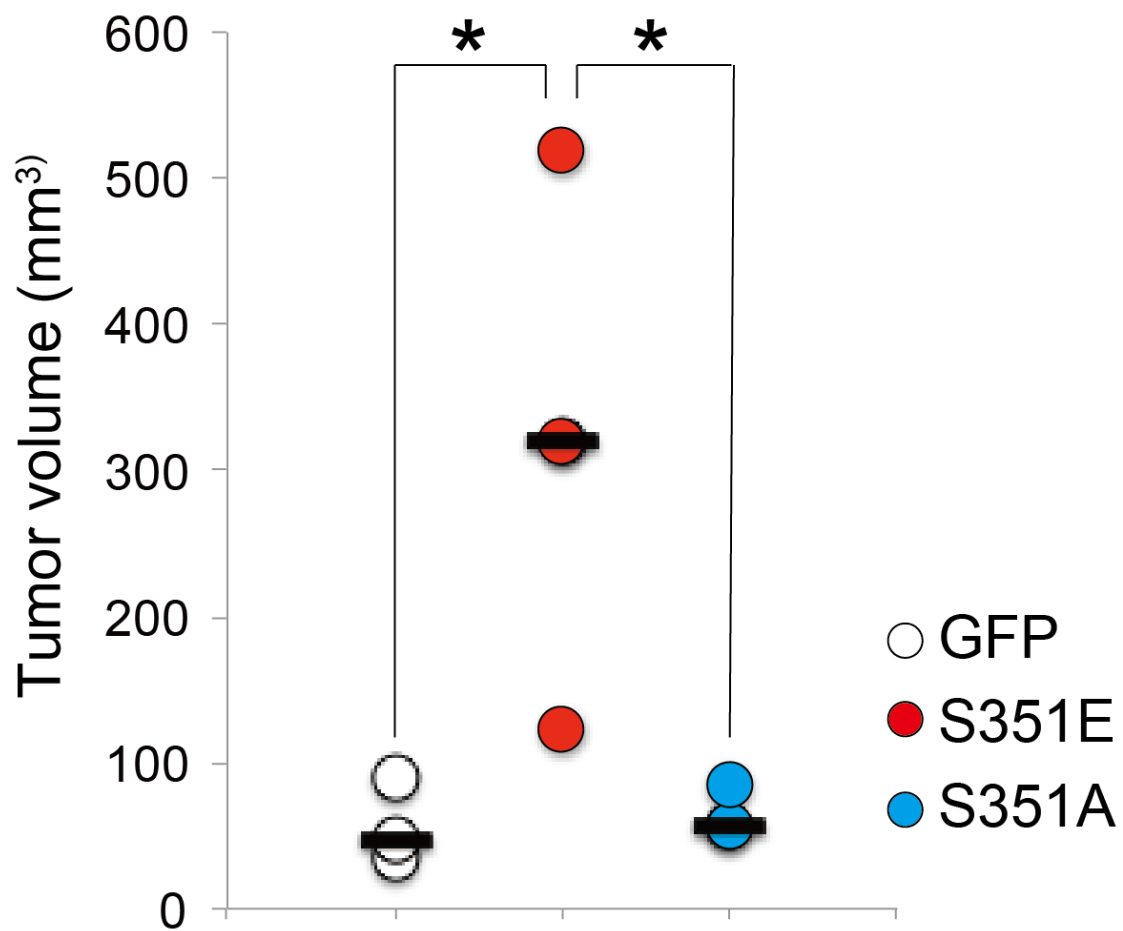


図 14 肝細胞がん細胞株を用いた異種移植実験

ヌードマウスに GFP、S351E 変異体 p62、および S351A 変異体 p62 を発現させた Huh7 を皮下に注入した。各 10 匹ずつ異種移植実験を行い、GFP(3 匹)、S351E 変異体 p62(4 匹)、および S351A 変異体 p62(3 匹)において腫瘍形成が見られた。数値は 35 日目の腫瘍体積の平均値と標準誤差を示す。*P < 0.05.

この細胞増殖能の獲得が真に GSH 産生増加によるものか否か検証するために、GSH 産生酵素の律速酵素である γ -グルタミルシステイン合成酵素を阻害する BSO(ブチオニンスルホキシミン)を利用した³⁶。BSO 処理は S351E 変異体による Nrf2 の活性化や標的のタンパク質量に影響を与えなかった(図 14)が、GSH の増加を抑制し(図 15)、増殖促進も有意に抑制した(図 16)。これらの結果は、p62-Keap1-Nrf2 経路の活性化がグルコース、グルタミンの代謝再編成を介して肝細胞がん抗がん剤耐性、増殖亢進を付与することを意味する。

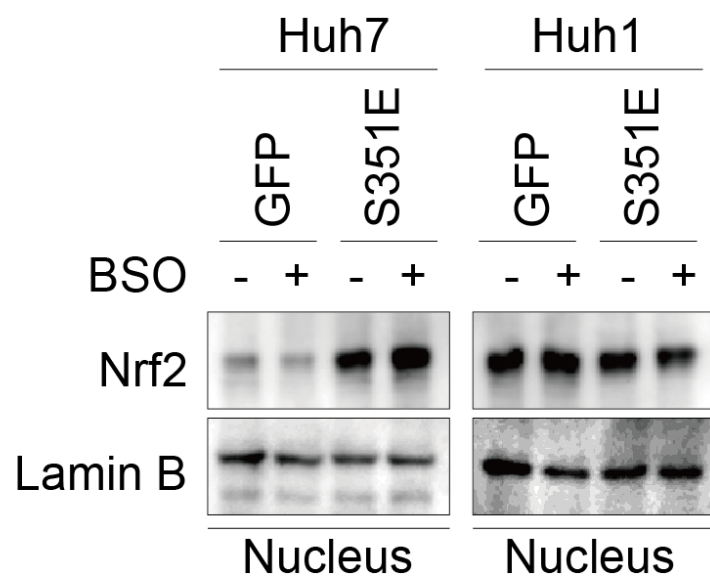


図 14 BSO 処理による Nrf2 活性化への影響

Huh7 に GFP、野生型 p62 wt およびその変異体を過剰発現させた。48 時間観戦後、BSO 10 μ M を処理し 72 時間後、調製した細胞質分画および核分画を NuPAGE し、各抗体を用いてウエスタンブロットを行った。LaminB および Actin はローディングコントロール。

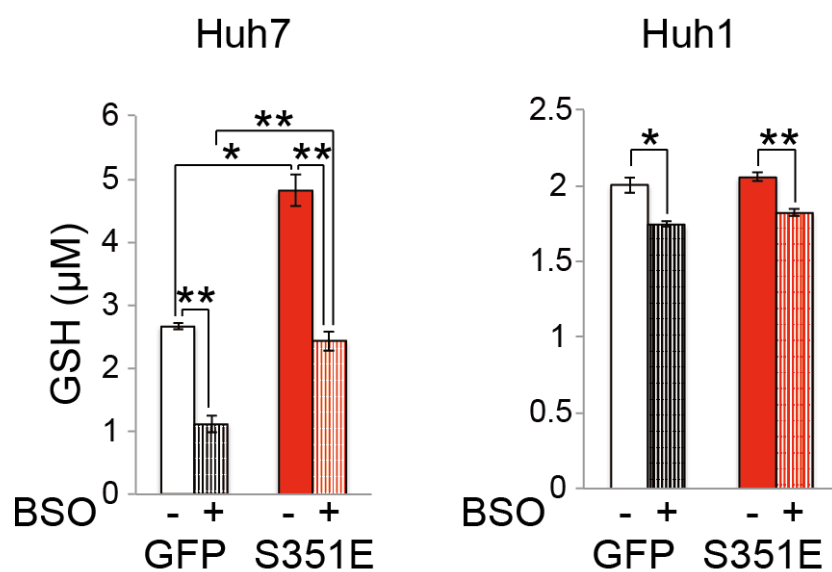


図 15 BSO 処理有 / 無の条件下における肝細胞がん細胞株の
グルタチオン量

アデノウイルスを用いて GFP および S351E 変異体 p62 を肝細胞がん細胞株に感染させた。
60 時間感染後、BSO 処理群とコントロール群に分け 72 時間培養し、グルタチオン量を調べた
(n=3)。数値は、平均値と標準誤差を示す。*P<0.05、**P<0.01、***P<0.001。

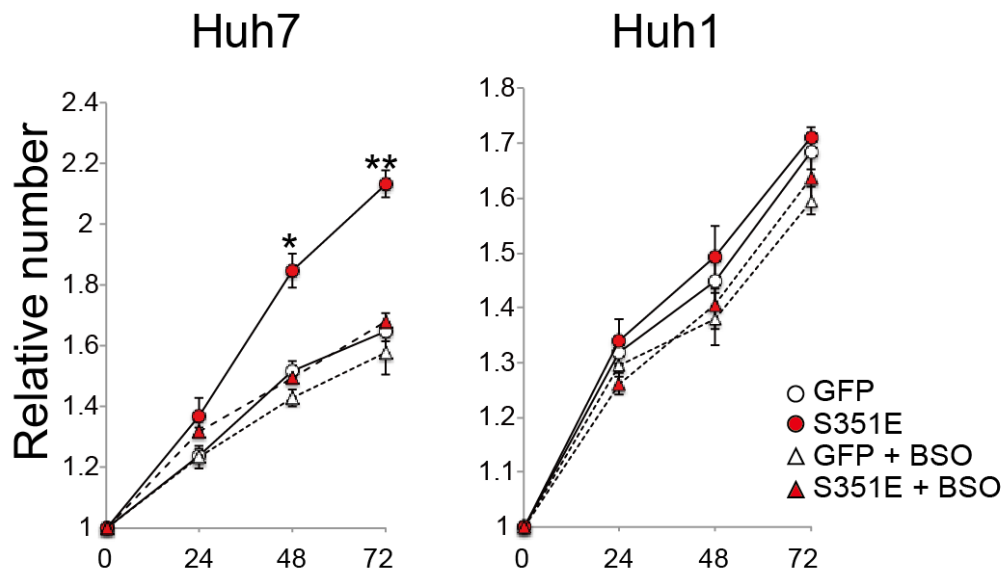


図 16 BSO 処理有 / 無条件下における肝細胞がん細胞株の増殖

アデノウイルスを用いて GFP および S351E 変異体 p62 を肝細胞がん細胞株に感染させた。
60 時間感染後、BSO 処理群とコントロール群に分け示した時間培養し、増殖を調べた (n=3)。

初め (0 h) の細胞数を 1 とする。数値は、平均値と標準誤差を示す。

*P<0.05、**P<0.01、***P<0.001。

3. オートファジー欠損マウス肝臓における代謝プロファイリング

in vivo における p62-Keap1-Nrf2 経路の意義を明らかにするために、肝細胞特異的オートファジー必須遺伝子 *Atg7* 欠損および *Atg7;Nrf2* 二重欠損マウス肝臓を調べた^{4,21}。*Atg7* 欠損および *Atg7;Nrf2* 二重欠損マウス肝臓において、著しいリン酸化 p62 の蓄積(図 17)^{4,6,37} やリン酸化 p62 および Keap1 陽性の凝集体形成(図 18)が起っていたこと^{4,6,37} から Keap1 の不活化が示唆された。実際に、*Atg7* 欠損マウス肝臓において核内の Nrf2 の著しい蓄積が見られた(図 17)。この蓄積は *Atg7;Nrf2* 二重欠損マウス肝臓において消失した(図 17)。*Atg7* 欠損マウス肝臓において、Gclc および Ugdh など Nrf2 依存的に増加したタンパク質を確認した(図 18)。

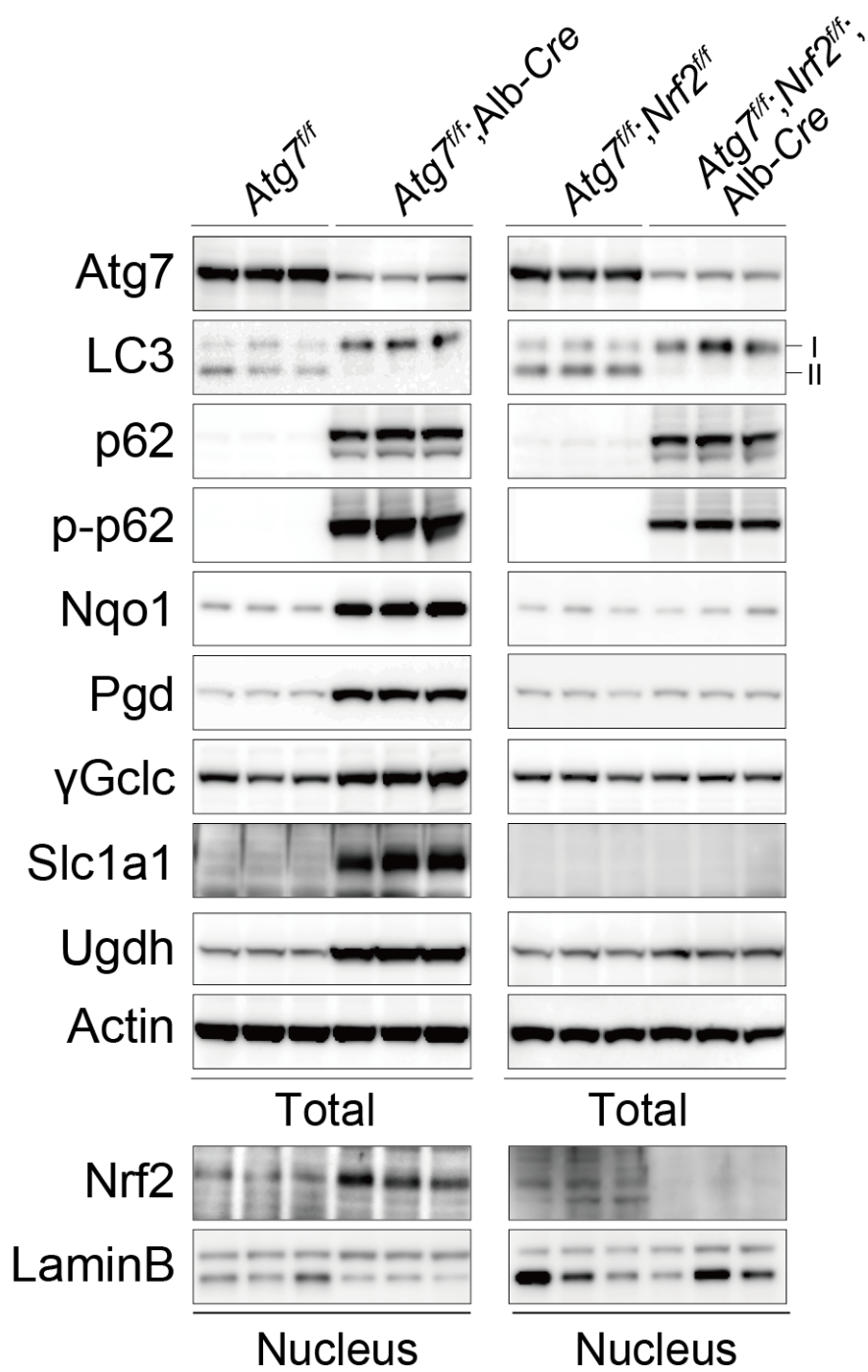


図 17 オートファジー欠損肝臓におけるリン酸化 p62 を介した Nrf2 活性化
 5 週齢の Atg7^{f/f}、Atg7^{f/f}; Alb-Cre、Atg7^{f/f}; Nrf2^{f/f}、Atg7^{f/f}; Nrf2^{f/f}; Alb-Cre マウス肝臓より
 抽出した全抽出物 (Total) および核画分 (Nucleus) を NuPAGE し、各抗体を用いて
 ウェスタンブロットを行った。LaminB および Actin はローディングコントロール。

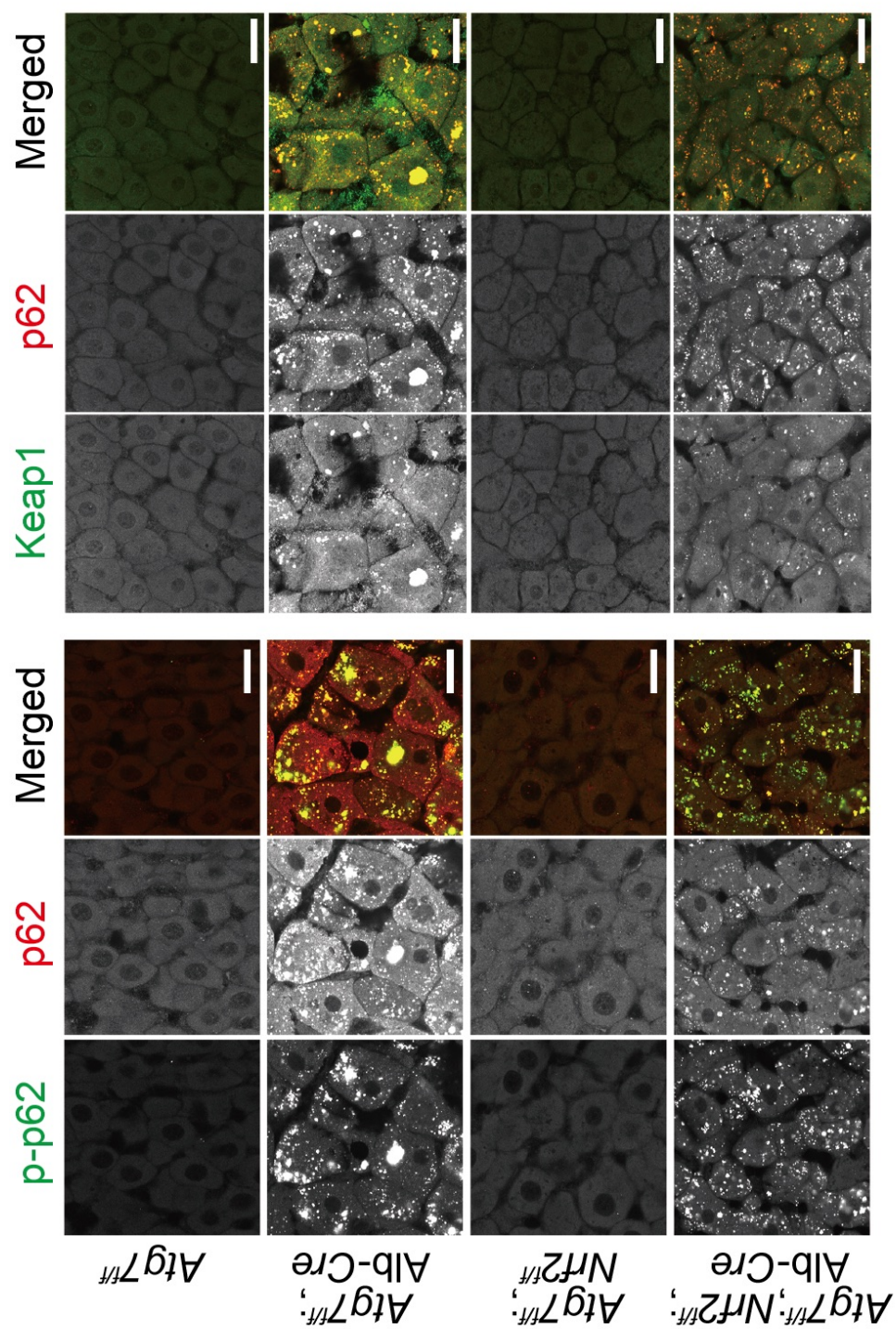


図 18 オートファジー欠損マウス肝臓におけるリン酸化 p62 および Keap1 陽性の凝集体形成

図 18 で示したマウス肝臓の切片を用いて抗リン酸化 p62 抗体 (緑色) および抗 p62 抗体 (赤色) ないしは抗 Keap1 抗体 (緑色) および抗 p62 抗体 (赤色) の組み合わせで二重免疫染色を行った。スケールバー：20μm。

網羅的な遺伝子発現解析は、*Atg7* 欠損肝臓における多くの Nrf2 標的遺伝子の発現誘導を明らかにした(図 19)。予想通り、グルクロン酸経路、PPP、プリンヌクレオチド合成やグルタチオン合成に関与する酵素群の遺伝子発現が *Atg7* 欠損肝臓において上昇していた(図 19)。これらの変動は、*Atg7;Nrf2* 二重欠損肝臓において解消されていた(図 19)。網羅的なメタボローム解析は、*Atg7* 欠損肝臓において非酸化型 PPP の中間体である S7P やプリンヌクレオチド合成の最初の代謝物である IMP 量の増加を示した(図 20)。*Atg7* 欠損のグリコゲン量がコントロールに比して減少しているが、グルクロン酸経路の中間体(G1P、UDP-グルコース、グルクロン酸)の量は増加している(図 20)。NADPH 量も *Atg7* 欠損肝臓においてコントロールと変わりはない(図 20)。つまり、オートファジーの抑制は解糖系からグルクロン酸経路、それに続く非酸化型ペントースリン酸化経路およびプリンヌクレオチド合成を亢進することを意味する。さらに、*Atg7* 欠損肝臓において GSH の著しい増加が確認された(図 20)。重要なことに、*Atg7* 欠損肝臓で見られた多くの代謝変動は、*Atg7;Nrf2* 二重欠損肝臓において消失した。これらの結果から、S351 リン酸化 p62 を介した Nrf2 の活性化は *in vivo* マウス肝臓において代謝再編成を引き起こすことを見いだした。

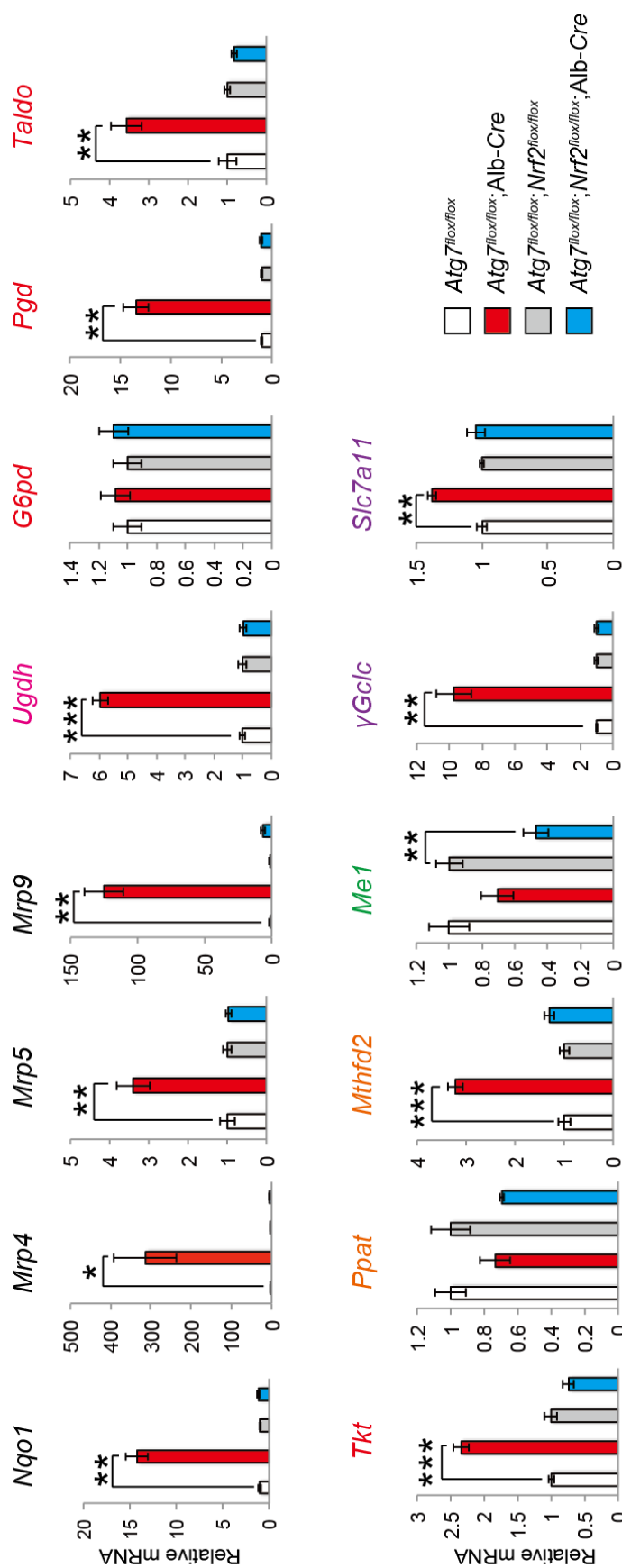


図 19 オートファジー欠損マウス肝臓における Nrf2 標的遺伝子発現

5 週齢の *Atg7^{f/f}* (n=4)、*Atg7^{f/f}; Alb-Cre* (n=4)、*Atg7^{f/f};Nrf2^{f/f}* (n=4)、*Atg7^{f/f};Nrf2^{f/f}; Alb-Cre* (n=4) マウス肝臓より RNA を調製し、遺伝子発現をリアルタイム PCR 法により検討した (各 n=4)。数値は *Atg7^{f/f}* ないしは *Atg7^{f/f};Nrf2^{f/f}* マウス肝臓の mRNA 量を用いて標準化した。データは、平均値と標準誤差を示す。* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 、*** $P < 0.001$ 。

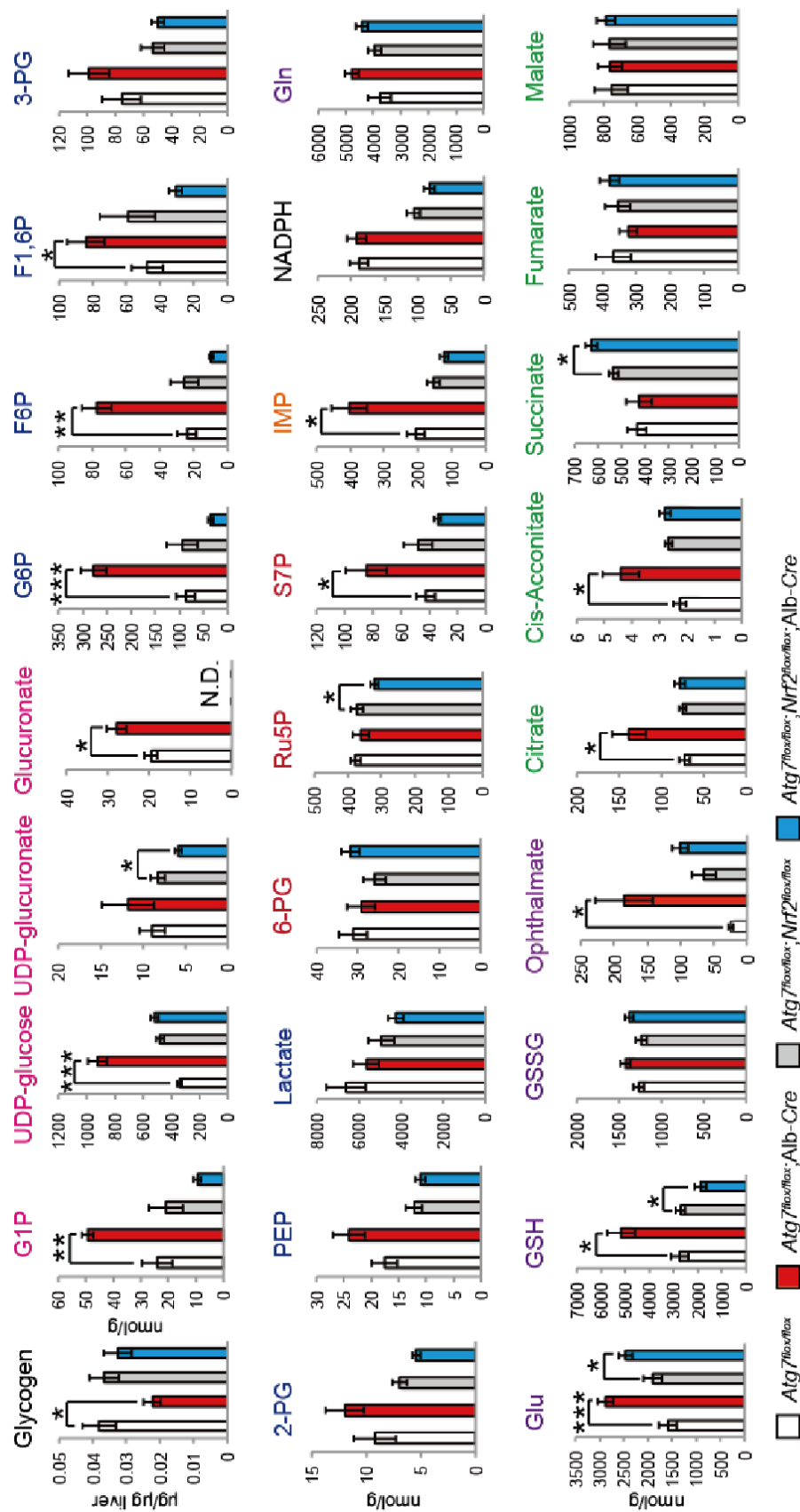


図 20 オートファジーマウス肝臓を用いたメタボローム解析

5 週齢の *Atg7^{f/f}* (*n*=5)、*Atg7^{f/f}; Alb-Cre* (*n*=5)、*Atg7^{f/f}; Nrf2^{f/f}* (*n*=10)、*Atg7^{f/f}; Nrf2^{f/f}; Alb-Cre* (*n*=13)

マウス肝臓におけるグルコースおよびグルタミン代謝の中間体代謝物絶対量を示す。グリコゲンの量も定量した。

P*<0.05, *P*<0.01, ****P*<0.001。

4. HCV 陽性 HCC におけるリン酸化 p62 の蓄積

最後に、ヒト肝細胞がん患者におけるリン酸化 p62 の機能を明らかにするために肝細胞がん 17 検体を用いて実験を行った。その結果、驚いたことに HCVs 陽性肝細胞がんの腫瘍部 4 検体(4/4)と非腫瘍部 1 検体(1/4)において著しい S349 リン酸化 p62(マウスにおける S351)の蓄積および Keap1 の増加が見られた(図 21)。また、アルコール性 HCC (No.16)、非アルコール性 HCC(No.15)および肝細胞と胆嚢がんの合併した検体の非腫瘍においてもリン酸化 p62 が検出されたが、その量は HCV 陽性 HCC 検体に比べて低いレベルであった(図 21)。一方、HBV 陽性肝細胞がんの腫瘍部および非腫瘍部においてリン酸化 p62 の蓄積は全く確認されなかった(図 21)。Keap1 のタンパク質量も HCV 陽性 HCC 検体で増加していた(図 21)。抗 p62 抗体を用いた免疫組織化学解析は、HCV 陽性 HCC において p62 の蓄積と p62 陽性凝集体形成を明らかにした(図 22)。同じく、S349 リン酸化 p62 および Keap1 陽性の凝集体形成も確認した(図 22)。一方、HCC 隣接組織において S349 リン酸化 p62 陽性凝集体は全く確認されなかった(図 22)。さらに、予想通り抗 p62 抗体(赤色)および抗リン酸化 p62 抗体(緑色)ないしは抗 p62 抗体(赤色)および抗 Keap1 抗体(緑色)の組み合わせで行った二重免疫蛍光染色は、HCV 陽性 HCC の腫瘍部において p62 陽性凝集体の中に、S349 リン酸化 p62 および Keap1 が共局在していることを明らかにした(図 23)。

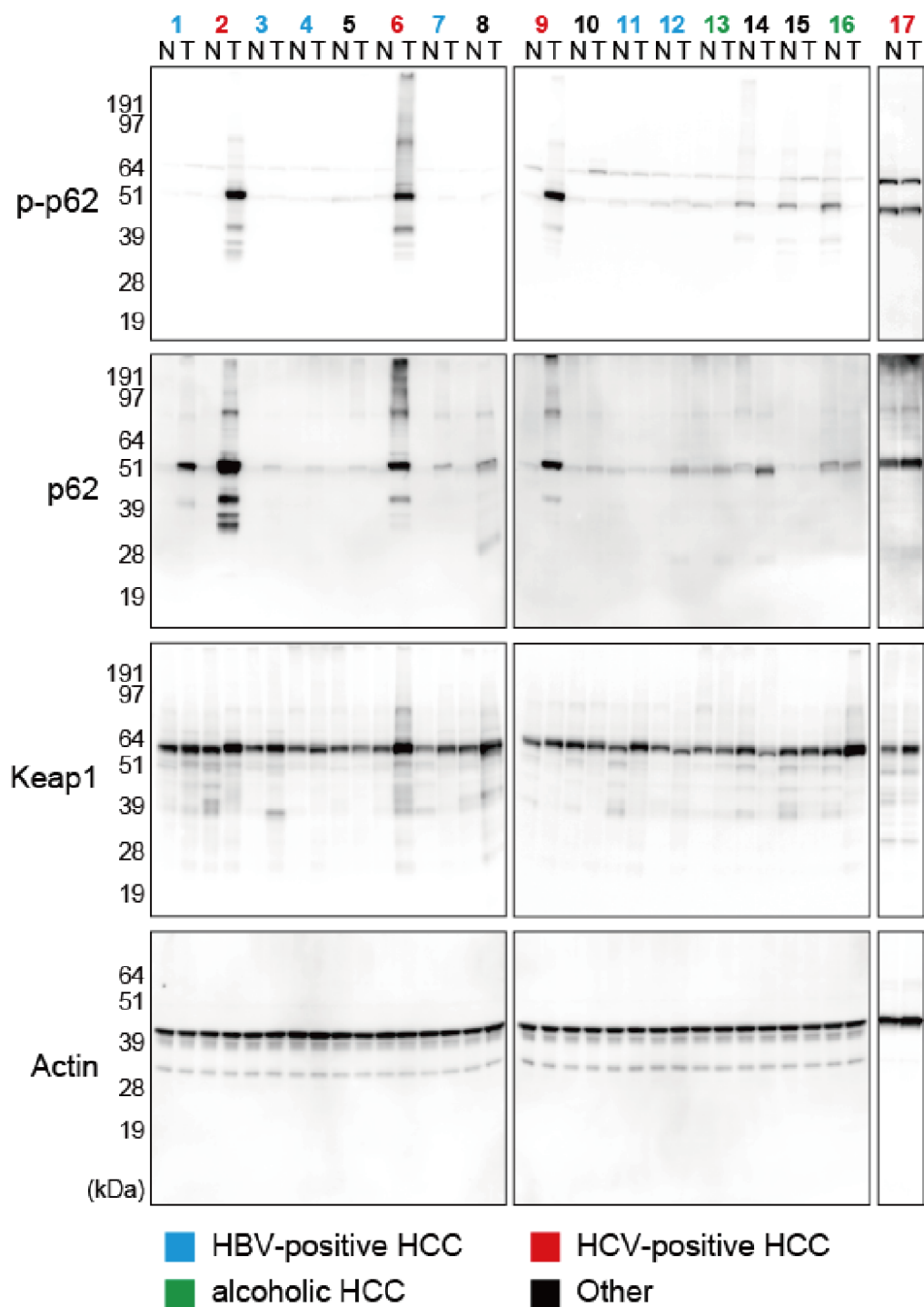


図 21 HCV 陽性ヒト肝細胞がん患者検体におけるリン酸化 p62 の蓄積

ヒト肝細胞がん検体の全抽出物を NUPAGE し、各抗体を用いてウエスタンブロットした。示した HCC の種類の他に 4 検体は非アルコール性肝細胞がん (No.5、8、10、および 15)、1 検体が肝細胞と胆管がんの合併 (No.14) である。N: 非腫瘍部 ; T: 腫瘍部

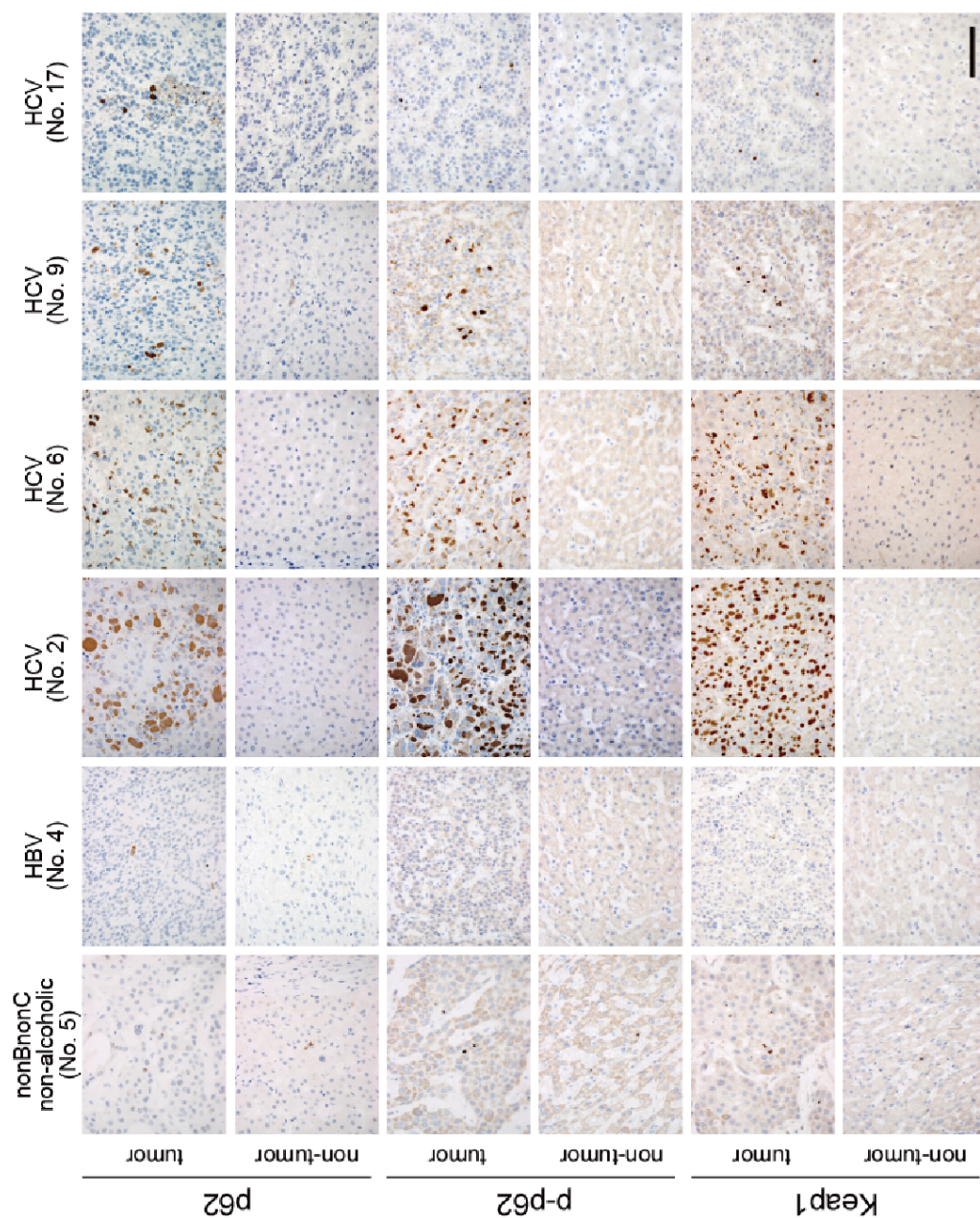


図 22 ヒト肝細胞がん患者検体における免疫組織化学解析

ヒト肝細胞がん患者検体のパラフィン切片を抗 p62、抗リン酸化 p62、および抗 Keap1 抗体を用いて染色した。スケールバー:100μm。

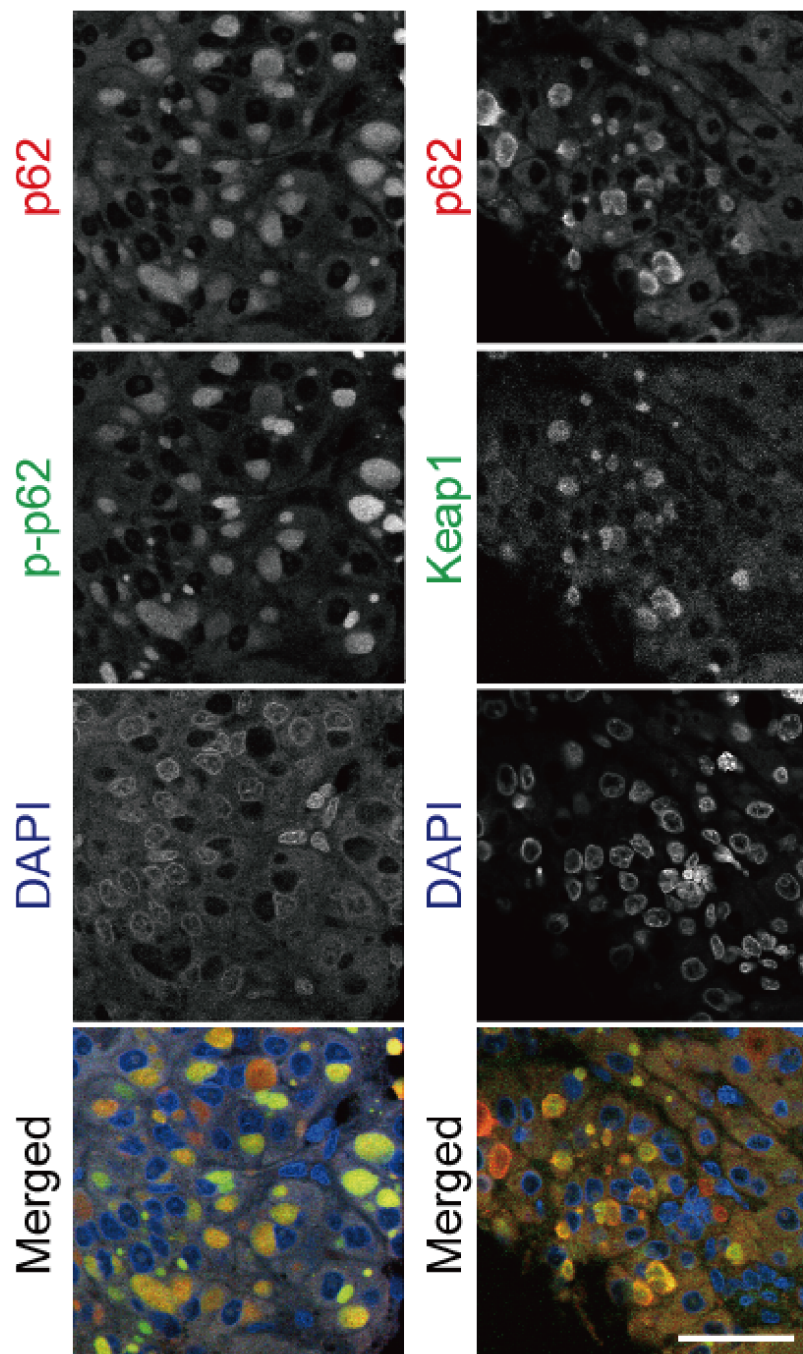


図 23 HCV 陽性ヒト肝細胞がん患者検体におけるリン酸化 p62 および Keap1 陽性の凝集体形成

HCV 陽性ヒト肝細胞がん患者検体を用いて抗 p62 抗体 (赤色) および抗リン酸化 p62 抗体 (緑色) ないしは抗 p62 抗体 (赤色) および抗 Keap1 抗体 (緑色) の組み合わせで二重免疫染色を行った。スケールバー :50 μ m 。

他の種類の HCC 腫瘍部および非腫瘍においても p62 陽性凝集体は見られたが、HCV 陽性 HCC に比べて小さく少なかった(図 22 および表 1)。それら凝集体は、S349 リン酸化 p62 および Keap1 を含んでいた(表 1)。

| | 非 B 非 C (n=6) | | HBV (n=6) | | HCV (n=4) | |
|-------|---------------|-----|-----------|-----|-----------|-----|
| | 非腫瘍部 | 腫瘍部 | 非腫瘍部 | 腫瘍部 | 非腫瘍部 | 腫瘍部 |
| p62 | | | | | | |
| 陰性 | 4 | 1 | 6 | 2 | 4 | 0 |
| 陽性 | 2 | 5 | 0 | 4 | 0 | 4 |
| p-p62 | | | | | | |
| 陰性 | 4 | 1 | 6 | 2 | 4 | 0 |
| 陽性 | 2 | 5 | 0 | 4 | 0 | 4 |
| Keap1 | | | | | | |
| 陰性 | 4 | 1 | 6 | 2 | 4 | 0 |
| 陽性 | 2 | 5 | 0 | 4 | 0 | 4 |

表 1 p62、リン酸化 p62 および keap1 の発現に伴う病因

ヒト肝細胞がん患者検体(非 B 非 CV 肝細胞がん 6 検体、HBVs 陽性肝細胞がん 6 検体、および HCVs 陽性肝細胞がん 4 検体)における p62、リン酸化 p62、および Keap1 の発現を示した。

第4章 考察

本研究は、HCC 細胞における増殖および薬剤耐性に寄与する p62-Keap1-Nrf2 経路を介した代謝リプログラミングの新しいメカニズムを明らかにした(図 24)。

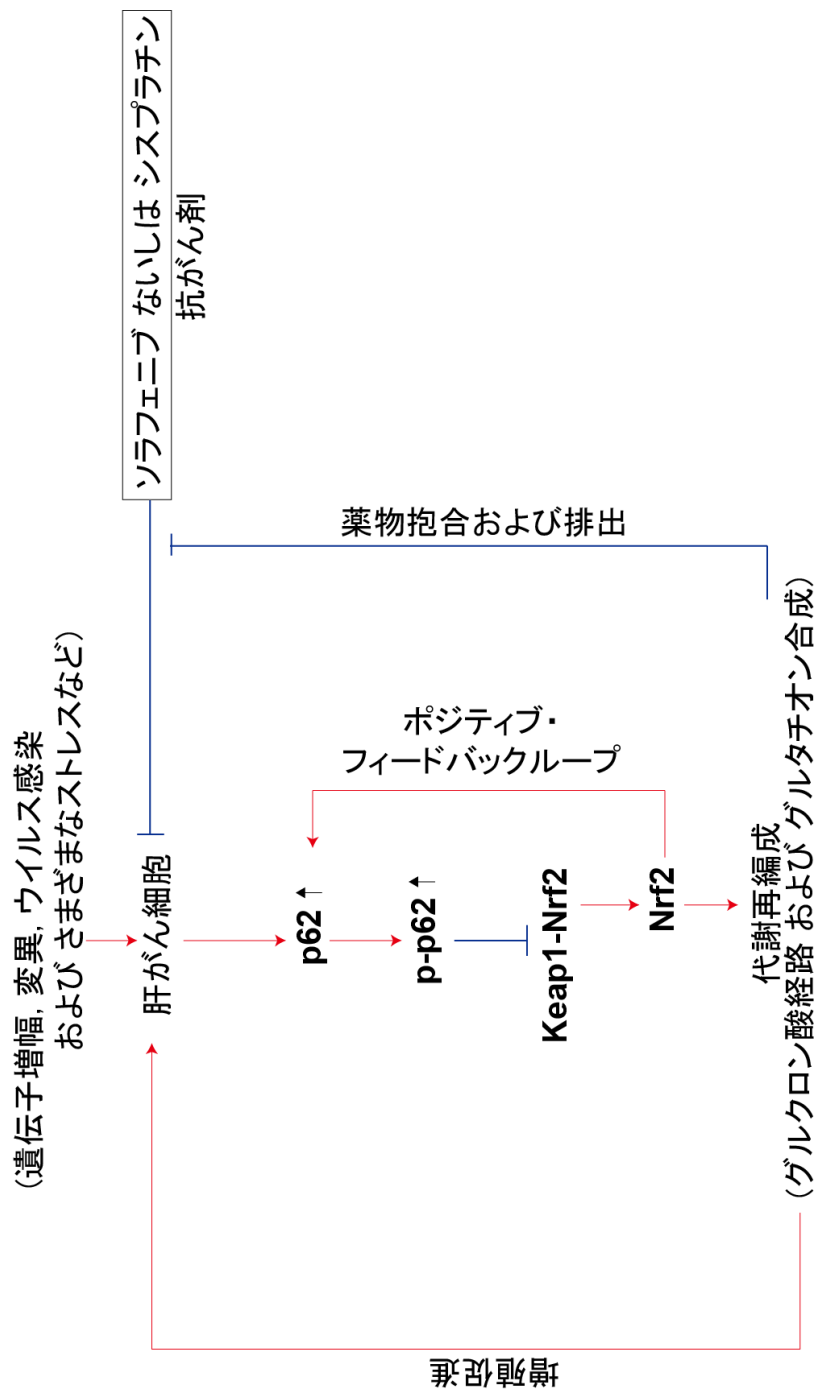


図 24 本研究により明らかになった p62 の発現亢進による肝細胞がんの発症機構モデル
ヒト肝細胞がん細胞の p62-Keap1-Nrf2 経路の活性化は、グルコース、グルタミン代謝を再編成する。
この p62-Keap1-Nrf2 経路依存的代謝再編成を介して、ヒト肝細胞がんは薬剤耐性、増殖能を獲得すると考えられる。

1. がん細胞における p62-keap1-Nrf2 経路活性化の機序

図 21 に示したリン酸化 p62 および Keap1 陽性凝集体は、HCV 陽性 HCC 患者の腫瘍部において確認された。このことは HCV 陽性 HCC 患者の腫瘍部において Nrf2 が恒常的に活性化していることを意味する。HCV および HBV による感染は、オートファゴソーム形成を誘導するが、同時にオートファゴソーム上やそのまわりにウイルス複製を促進するため、オートファゴソームとリソソームの融合が抑制される^{38,39}。さらに、p62 は Nrf2 によって発現が調節されるストレス誘導性タンパク質である⁷。p62 の過剰生産は、Keap1 を不活化するための p62 リン酸化に十分であり、Nrf2 活性化を加速する正のフィードバックループをもたらす⁶。それゆえ、HCV 感染患者における慢性炎症ならびに HCV 感染 HCC におけるオートファゴソームの成熟障害は、S349 リン酸化 p62 を介した Nrf2 の活性化に至ると考えられる。同様に、内皮細胞におけるカポジ肉腫関連ヘルペスウイルス不顕性感染において、p62 の S349 は恒常的にリン酸化され、それが Nrf2 の活性化およびカポジ肉腫発病の促進をもたらす⁴⁰。mTORC1 は負にオートファジーを調節し⁴¹、p62 に依存した Nrf2 活性化の律速段階である p62 のリン酸化にキナーゼの 1 つとして働いていることから⁶、*Tsc1*、*Tsc2*、そして *PTEN* などの PI3K/Akt/mTORC1 カスケードを含むがんドライバー遺伝子の変異も p62 を介した Nrf2 の活性化に関係すると推定される。この考えと一貫して、肝細胞特異的 *Pten* および *Tsc1* 欠損マウスは、Nrf2 活性化に伴う肝腫瘍を形成する^{42,43}。Nrf2 ないしは Keap1 どちらかの体細胞変異が、肺がん、頭頸部がん、そして胆嚢がんの患者で見つかっており、両遺伝子はがん遺伝子と認識されている⁴⁴⁻⁴⁶。この体細胞突然変異は、総じて Keap1-Nrf2 の相互作用を阻害し、恒常的な Nrf2 の活性化を生じさせ、酸化ストレスや抗がん剤に対して抵抗性をがん細胞に与える⁴⁴。Nrf2 は体細胞変異がないある種の

がん細胞においても活性化されることが知られている。例えば、フマル酸ヒドラターゼに変異を有する乳頭状腎細胞がんタイプ 2 は、フマル酸の異常蓄積によって Keap1 を隔離し、結果、Nrf2 を活性化する^{47,48}。p62 は Nrf2 の標的遺伝子である⁷ことから、Nrf2 または Keap1 どちらかに変異があるがん細胞やフマル酸の異常蓄積により Keap1 が失活している腎細胞がんにおいて、p62 タンパク質は蓄積しリン酸化されていると考えられる。その結果、p62 は変異をもたない keap1 対立遺伝子から合成される正常な Keap1 タンパク質を不活化し、がん細胞における Nrf2 活性化の悪循環をもたらす。従って、p62 を介した Nrf2 の活性化は HCV 陽性 HCC を含むさまざまな種類のがん細胞で起こると考えられる。

2. p62-keap1-Nrf2 経路を介した肝細胞がん悪性化の機序

これまでに報告されている研究²⁸と一貫して、リン酸化 p62 を発現させた HCC 細胞株において PPP、グルタチオン合成、そしてグルタミノリシスに関わる酵素群の遺伝子発現誘導が確認された(図 6)。しかしながら、網羅的なメタボローム解析は、HCC 細胞株における p62 を介した Nrf2 の活性化が、グルクロン酸経路およびグルタチオン合成を亢進させる一方、PPP、プリンヌクレオチド合成そしてグルタミノリシスに顕著な影響を与えないことを明らかにした(図 7、図 8、図 9、および表 2)。この結果は Nrf2 による代謝調節はがん細胞によって異なることを示唆する。UDP-グルクロン酸およびグルタチオン合成の増加に加えて、グルタチオン抱合や恒常性の調節に関わる *Mrps* および *Slc7a11/xCT* の発現が、HCC 細胞株において著しく誘導された(図 6)。それゆえ、S351 リン酸化を持つ HCC 細胞において、抗がん剤は、容易に GSH およびグルクロン酸と結合し抱合反応を受け、その後 *Mrps* を介して細胞外へ排出され、抗がん剤耐性を

獲得すると考えられる。さらに、GSH は、酸化還元バランスおよび抱合反応だけではなく細胞増殖も促進する^{34,35}。実際に、肝細胞がん細胞株に対するグルタチオン合成の薬理的阻害剤処理は、増殖を顕著に抑制した(図 16)。これらの結果から、p62-keap1-nrf2 経路を介した代謝再編成(特に GSH および UDP-グルクロン酸の産生増加)が肝細胞がん細胞に薬剤耐性および増殖能を獲得させることが考えられる。

| | Huh7 | | | | |
|-------------|-----------------|----------|---------------|----------|-----|
| | メタボローム解析 | VS S351E | qRT-PCR解析 | VS S351E | 相関性 |
| グルクロン酸経路 | UDP-Glucose | 増加 | UGDH | 増加 | あり |
| | UDP-Glucuronate | 増加 | UGT1A1 | 増加 | |
| ペントースリン酸経路 | 6-PG | 差なし | G6PD | 増加 | なし |
| | Ru5P | 差なし | PGD | 増加 | |
| | S7P | 差なし | TKT、TALDO | 増加 | |
| プリンヌクレオチド合成 | IMP | N.D. | PPAT、MTHFD2 | 差なし | あり |
| グルタチオン合成 | GSH、Ophthalmate | 増加 | γ GCLC | 増加 | あり |

| | Huh7 | | | | |
|-------------|-----------------|----------|---------------|----------|-----|
| | メタボローム解析 | VS S351A | qRT-PCR解析 | VS S351A | 相関性 |
| グルクロン酸経路 | UDP-Glucose | 差なし | UGDH | 差なし | あり |
| | UDP-Glucuronate | 差なし | UGT1A1 | 差なし | |
| ペントースリン酸経路 | 6-PG | 差なし | G6PD | 差なし | あり |
| | Ru5P | 差なし | PGD | 差なし | |
| | S7P | 差なし | TKT、TALDO | 差なし | |
| プリンヌクレオチド合成 | IMP | N.D. | PPAT、MTHFD2 | 差なし | あり |
| グルタチオン合成 | GSH | 差なし | γ GCLC | 差なし | あり |
| | Ophthalmate | 増加 | | | なし |

表 2 肝細胞がん細胞株 Huh7 を用いた網羅的解析結果の相関性

メタボローム解析および qRT-PCR 解析結果の相関性を示した。上の表は GFP を発現させた細胞と S351E を発現させた細胞の結果を比較し、下の表は GFP を発現させた細胞と S351A を発現させた細胞の結果を比較した。

3. がん細胞とオートファジーの関係

低栄養・低酸素にさらされているがん細胞の増殖はオートファジーに依存していると考えられる。なぜならこのタンパク質分解経路は、代謝ストレスに応じて誘導され細胞にアミノ酸、脂肪酸や糖質を供給する一方、恒常的オートファジーはミトコンドリア等の細胞小器官の量的、質的管理を担うからである⁴⁹。実際に、非小細胞肺がんのマウスモデルにおいて **K-Ras** 誘発性の腫瘍化は、オートファジーを欠損させることによって抑制される^{50,51}。これらの報告を踏まえて、様々ながんに対して抗がん剤とオートファジー阻害剤(クロロキンおよびヒドロキシクロロキンなど)の併用による臨床試験が進められている^{52,53}。しかしながら、PDAC の遺伝子改変マウスモデルにおいて、腫瘍形成に対するオートファジーの機能は、**p53** の状態に依存する⁵⁴。*Trp53* が無傷状態の脾特異的活性型 **K-Ras** を発現するマウスにおいて、オートファジーの抑制は PDAC の進展を抑制した⁵⁴。しかし驚いたことに、*Trp53* を欠損しがん遺伝子 **K-Ras** を発現するマウスにおいて、オートファジーの欠失は、もはや腫瘍進行を抑えるのではなく、むしろ腫瘍形成を加速させる⁵⁴。一つの考えられる説明としては、**Trp53** の欠失はグルコースの供給を増大させ、がん増殖に貢献できる同化経路を促進させることが推定される⁵⁵。これに付随して、オートファジー欠損腫瘍やクロロキンないしはヒドロキシクロロキンを服用している患者の腫瘍において、**p62** が蓄積することから、がん細胞における **Nrf2** は恒常的に活性化し、代謝を変化させがんの増殖に都合の良い同化経路を促進すると考えられる。実際に、肝細胞特異的 *Atg7*、*p62*、*Nrf2*、*Atg7 p62*、*Atg7 Nrf2* 欠損マウス肝臓における網羅的メタボロームおよび遺伝子発現解析によって、オートファジー欠損肝臓における腫瘍形成に寄与する^{14,15}**p62-keap1-Nrf2** 経路を介した代謝リプログラミングが確認された(表 3)。このリプログラミングは、オートファジー欠損肝臓に

おける腫瘍形成に影響を与えられ。それゆえ、オートファジー阻害は、腫瘍を抑制するというよりむしろ、p53 欠損ないしは Nrf2 活性化に伴う同化経路を相乗的に促進させ、腫瘍増殖の促進そしてオートファジーの機能を消失させる可能性がある。これらのことから、オートファジー抑制を基盤とした抗がん剤治療の臨床試験において、がん代謝に関わる遺伝子変異(Trp53 の状態など)について考えることが不可欠である。

| | コントロールおよびAtg7 欠損肝臓 | | | | |
|-------------|--------------------|------------|---------------|------------|-----|
| | メタボローム解析 | VS Atg7 KO | qRT-PCR | VS Atg7 KO | 相関性 |
| グルクロン酸経路 | UDP-Glucose | 増加 | UGDH | 増加 | あり |
| | UDP-Glucuronate | 増加 | | | |
| | Glucronate | 増加 | | | |
| ペントースリン酸経路 | 6-PG | 差なし | G6PD | 増加 | あり |
| | Ru5P | 差なし | PGD | 増加 | |
| | S7P | 増加 | TKT、TALDO | 増加 | |
| プリンヌクレオチド合成 | IMP | 増加 | Ppat | 差なし | あり |
| | | | Mthfd2 | 増加 | |
| グルタチオン合成 | GSH、Ophthalmate | 増加 | γ GCLC | 増加 | あり |

| | コントロールおよびAtg7 Nrf2 二重欠損肝臓 | | | | |
|-------------|---------------------------|--------|---------------|--------|-----|
| | メタボローム解析 | VS DKO | qRT-PCR | VS DKO | 相関性 |
| グルクロン酸経路 | UDP-Glucose | 差なし | UGDH | 差なし | あり |
| | UDP-Glucuronate | 減少 | | | |
| | Glucronate | N.D. | | | |
| ペントースリン酸経路 | 6-PG | 差なし | G6PD | 増加 | あり |
| | Ru5P | 減少 | PGD | 増加 | |
| | S7P | 差なし | TKT、TALDO | 増加 | |
| プリンヌクレオチド合成 | IMP | 差なし | Ppat | 差なし | あり |
| | | | Mthfd2 | 差なし | |
| グルタチオン合成 | GSH | 減少 | γ GCLC | 差なし | あり |
| | Ophthalmate | 差なし | | | |

表 3 オートファジー欠損肝臓を用いた網羅的解析結果の相関性

メタボローム解析および qRT-PCR 解析結果の相関性を示した。上の表はコントロールおよび肝細胞特異的 *Atg7* 欠損マウス肝臓の結果を比較し、下の表はコントロールおよび肝細胞特異的 *Atg7 Nrf2* 二重欠損マウス肝臓の結果を比較した。

4. 結語

本研究では、ヒト肝細胞がん細胞の p62-Keap1-Nrf2 経路の活性化は、グルコース、グルタミン代謝を再編成することを明らかにした。さらに、ヒト肝細胞がんは、p62-Keap1-Nrf2 経路依存的代謝再編成を介して薬剤耐性、増殖能を獲得するも見いだした。これらの事実は、p62 のリン酸化や p62-keap1-Nrf2 経路を阻害する化合物が肝細胞がんの新しい創薬候補になり得ることを意味する。

第 5 章 謝辞

本研究は、私が東京大学大学院新領域創成科学研究科後期博士課程在学中に、公益財団法人東京都医学総合研究所田中啓二所長(東京大学客員教授兼任)の指導のもとに行ったものである。この研究を遂行するにあたり、研究の場を与えて下さった田中啓二所長、終止熱心にご指導を頂いた新潟大学の小松雅明教授、メタボローム解析をして頂いた慶応義塾大学の曾我明義教授、形態学解析をして頂いた福島県立医科大学の和栗聡教授、Keap1-Nrf2 解析について大変貴重なご意見をご享受くださった東北大学の山本雅之教授、本橋ほづみ准教授、ヒト肝細胞がん患者検体を譲渡頂いた新潟大学の若井俊文教授をはじめ多くの先生方にこの場をかりて感謝の意を表します。

第 6 章 引用文献

1. Rogov, V., Dotsch, V., Johansen, T. & Kirkin, V. Interactions between autophagy receptors and ubiquitin-like proteins form the molecular basis for selective autophagy. *Mol Cell* **53**, 167-178 (2014).
2. Bjorkoy, G. *et al.* p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death. *J Cell Biol* **171**, 603-614 (2005).
3. Geisler, S. *et al.* PINK1/Parkin-mediated mitophagy is dependent on VDAC1 and p62/SQSTM1. *Nat Cell Biol* **12**, 119-131 (2010).
4. Komatsu, M. *et al.* Homeostatic levels of p62 control cytoplasmic inclusion body formation in autophagy-deficient mice. *Cell* **131**, 1149-1163 (2007).
5. Bae, S.H. *et al.* Sestrins activate Nrf2 by promoting p62-dependent autophagic degradation of Keap1 and prevent oxidative liver damage. *Cell Metab* **17**, 73-84 (2013).
6. Ichimura, Y. *et al.* Phosphorylation of p62 activates the Keap1-Nrf2 pathway during selective autophagy. *Mol Cell* **51**, 618-631 (2013).
7. Jain, A. *et al.* p62/SQSTM1 is a target gene for transcription factor NRF2 and creates a positive feedback loop by inducing antioxidant response element-driven gene transcription. *J Biol Chem* **285**, 22576-22591 (2010).
8. Komatsu, M. *et al.* The selective autophagy substrate p62 activates the stress responsive transcription factor Nrf2 through inactivation of Keap1. *Nat Cell*

- Biol* **12**, 213-223 (2010).
9. Lau, A. *et al.* A noncanonical mechanism of Nrf2 activation by autophagy deficiency: direct interaction between Keap1 and p62. *Mol Cell Biol* **30**, 3275-3285 (2010).
 10. Taguchi, K. *et al.* Keap1 degradation by autophagy for the maintenance of redox homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 13561-13566 (2012).
 11. Taguchi, K., Motohashi, H. & Yamamoto, M. Molecular mechanisms of the Keap1-Nrf2 pathway in stress response and cancer evolution. *Genes Cells* **16**, 123-140 (2011).
 12. Jaramillo, M.C. & Zhang, D.D. The emerging role of the Nrf2-Keap1 signaling pathway in cancer. *Genes Dev* **27**, 2179-2191 (2013).
 13. Inami, Y. *et al.* Persistent activation of Nrf2 through p62 in hepatocellular carcinoma cells. *J Cell Biol* **193**, 275-284 (2011).
 14. Takamura, A. *et al.* Autophagy-deficient mice develop multiple liver tumors. *Genes Dev* **25**, 795-800 (2011).
 15. Ni, H.M. *et al.* Nrf2 promotes the development of fibrosis and tumorigenesis in mice with defective hepatic autophagy. *J Hepatol* **61**, 617-625 (2014).
 16. Zatloukal, K. *et al.* p62 Is a common component of cytoplasmic inclusions in protein aggregation diseases. *Am J Pathol* **160**, 255-263 (2002).
 17. Marcotte, D. *et al.* Small molecules inhibit the interaction of Nrf2 and the Keap1 Kelch domain through a non-covalent mechanism. *Bioorg Med Chem* **21**, 4011-4019 (2013).

18. Duran, A. *et al.* The signaling adaptor p62 is an important NF-kappaB mediator in tumorigenesis. *Cancer Cell* **13**, 343-354 (2008).
19. Ling, J. *et al.* KrasG12D-induced IKK2/beta/NF-kappaB activation by IL-1alpha and p62 feedforward loops is required for development of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Cell* **21**, 105-120 (2012).
20. Kamei, D. *et al.* Microsomal prostaglandin E synthase-1 in both cancer cells and hosts contributes to tumour growth, invasion and metastasis. *Biochem J* **425**, 361-371 (2010).
21. Xue, P. *et al.* Adipose deficiency of Nrf2 in ob/ob mice results in severe metabolic syndrome. *Diabetes* **62**, 845-854 (2013).
22. Harada, H. *et al.* Deficiency of p62/Sequestosome 1 causes hyperphagia due to leptin resistance in the brain. *J Neurosci* **33**, 14767-14777 (2013).
23. Soga, T. *et al.* Metabolomic profiling of anionic metabolites by capillary electrophoresis mass spectrometry. *Anal Chem* **81**, 6165-6174 (2009).
24. Soga, T. & Heiger, D.N. Amino acid analysis by capillary electrophoresis electrospray ionization mass spectrometry. *Anal Chem* **72**, 1236-1241 (2000).
25. Soga, T. *et al.* Quantitative metabolome analysis using capillary electrophoresis mass spectrometry. *J Proteome Res* **2**, 488-494 (2003).
26. Soga, T. *et al.* Simultaneous determination of anionic intermediates for *Bacillus subtilis* metabolic pathways by capillary electrophoresis electrospray ionization mass spectrometry. *Anal Chem* **74**, 2233-2239 (2002).
27. Sugimoto, M., Wong, D.T., Hirayama, A., Soga, T. & Tomita, M. Capillary

- electrophoresis mass spectrometry-based saliva metabolomics identified oral, breast and pancreatic cancer-specific profiles. *Metabolomics* **6**, 78-95 (2010).
28. Mitsuishi, Y. *et al.* Nrf2 redirects glucose and glutamine into anabolic pathways in metabolic reprogramming. *Cancer Cell* **22**, 66-79 (2012).
 29. Schulze, K. *et al.* Exome sequencing of hepatocellular carcinomas identifies new mutational signatures and potential therapeutic targets. *Nat Genet* **47**, 505-511 (2015).
 30. Soga, T. *et al.* Differential metabolomics reveals ophthalmic acid as an oxidative stress biomarker indicating hepatic glutathione consumption. *J Biol Chem* **281**, 16768-16776 (2006).
 31. Llovet, J.M. *et al.* Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* **359**, 378-390 (2008).
 32. Prestayko, A.W., D'Aoust, J.C., Issell, B.F. & Crooke, S.T. Cisplatin (cis-diamminedichloroplatinum II). *Cancer Treat Rev* **6**, 17-39 (1979).
 33. Siddik, Z.H. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene* **22**, 7265-7279 (2003).
 34. Reddy, N.M. *et al.* Genetic disruption of the Nrf2 compromises cell-cycle progression by impairing GSH-induced redox signaling. *Oncogene* **27**, 5821-5832 (2008).
 35. Reddy, N.M. *et al.* Deficiency in Nrf2-GSH signaling impairs type II cell growth and enhances sensitivity to oxidants. *Am J Respir Cell Mol Biol* **37**, 3-8 (2007).
 36. Griffith, O.W. & Meister, A. Potent and specific inhibition of glutathione

- synthesis by buthionine sulfoximine (S-n-butyl homocysteine sulfoximine). *J Biol Chem* **254**, 7558-7560 (1979).
37. Komatsu, M. *et al.* Impairment of starvation-induced and constitutive autophagy in Atg7-deficient mice. *J Cell Biol* **169**, 425-434 (2005).
 38. Mizui, T. *et al.* Inhibition of hepatitis C virus replication by chloroquine targeting virus-associated autophagy. *J Gastroenterol* **45**, 195-203 (2010).
 39. Sir, D. *et al.* Induction of incomplete autophagic response by hepatitis C virus via the unfolded protein response. *Hepatology* **48**, 1054-1061 (2008).
 40. Gjyshi, O. *et al.* Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus induces Nrf2 activation in latently infected endothelial cells through SQSTM1 phosphorylation and interaction with polyubiquitinated Keap1. *J Virol* **89**, 2268-2286 (2015).
 41. Russell, R.C., Yuan, H.X. & Guan, K.L. Autophagy regulation by nutrient signaling. *Cell Res* **24**, 42-57 (2014).
 42. Kenerson, H.L., Subramanian, S., McIntyre, R., Kazami, M. & Yeung, R.S. Livers with constitutive mTORC1 activity resist steatosis independent of feedback suppression of Akt. *PLoS One* **10**, e0117000 (2015).
 43. Kenerson, H.L. *et al.* Akt and mTORC1 have different roles during liver tumorigenesis in mice. *Gastroenterology* **144**, 1055-1065 (2013).
 44. Sporn, M.B. & Liby, K.T. NRF2 and cancer: the good, the bad and the importance of context. *Nat Rev Cancer* **12**, 564-571 (2012).
 45. Cancer Genome Atlas Research, N. Comprehensive genomic characterization of

- squamous cell lung cancers. *Nature* **489**, 519-525 (2012).
46. Totoki, Y. *et al.* Trans-ancestry mutational landscape of hepatocellular carcinoma genomes. *Nat Genet* **46**, 1267-1273 (2014).
 47. Adam, J. *et al.* Renal cyst formation in Fh1-deficient mice is independent of the Hif/Phd pathway: roles for fumarate in KEAP1 succination and Nrf2 signaling. *Cancer Cell* **20**, 524-537 (2011).
 48. Ooi, A. *et al.* An antioxidant response phenotype shared between hereditary and sporadic type 2 papillary renal cell carcinoma. *Cancer Cell* **20**, 511-523 (2011).
 49. White, E. The role for autophagy in cancer. *J Clin Invest* **125**, 42-46 (2015).
 50. Guo, J.Y. *et al.* Autophagy suppresses progression of K-ras-induced lung tumors to oncocytomas and maintains lipid homeostasis. *Genes Dev* **27**, 1447-1461 (2013).
 51. Rao, S. *et al.* A dual role for autophagy in a murine model of lung cancer. *Nat Commun* **5**, 3056 (2014).
 52. Jiang, P. & Mizushima, N. Autophagy and human diseases. *Cell Res* **24**, 69-79 (2014).
 53. Zhi, X. & Zhong, Q. Autophagy in cancer. *F1000Prime Rep* **7**, 18 (2015).
 54. Rosenfeldt, M.T. *et al.* p53 status determines the role of autophagy in pancreatic tumour development. *Nature* **504**, 296-300 (2013).
 55. Berkers, C.R., Maddocks, O.D., Cheung, E.C., Mor, I. & Vousden, K.H. Metabolic regulation by p53 family members. *Cell Metab* **18**, 617-633 (2013).