

論文内容の要旨

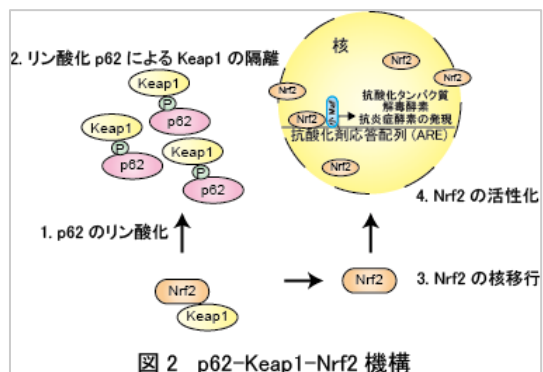
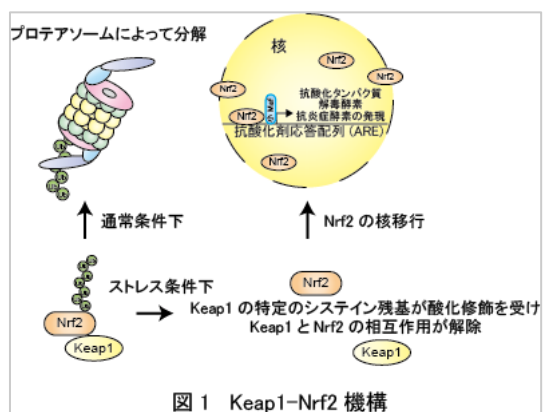
論文題目 p62/Sqstm1 は Nrf2 依存的代謝再編成により肝細胞がんの悪性化をもたらす

氏名 齊藤 哲也

【研究の背景】

p62/Sqstm1（以降、p62 とする）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。事実、p62 はユビキチン陽性の変性タンパク質凝集体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、それらは p62 と共にオートファジーにより分解される。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。

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、様々な生体防御遺伝子の発現を増強する。通常条件下においては、Nrf2 はユビキチンリガー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。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。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 1)。この標準的な Keap1-Nrf2 機構の一方、申請者らは p62 の Keap1 相互作用領域に



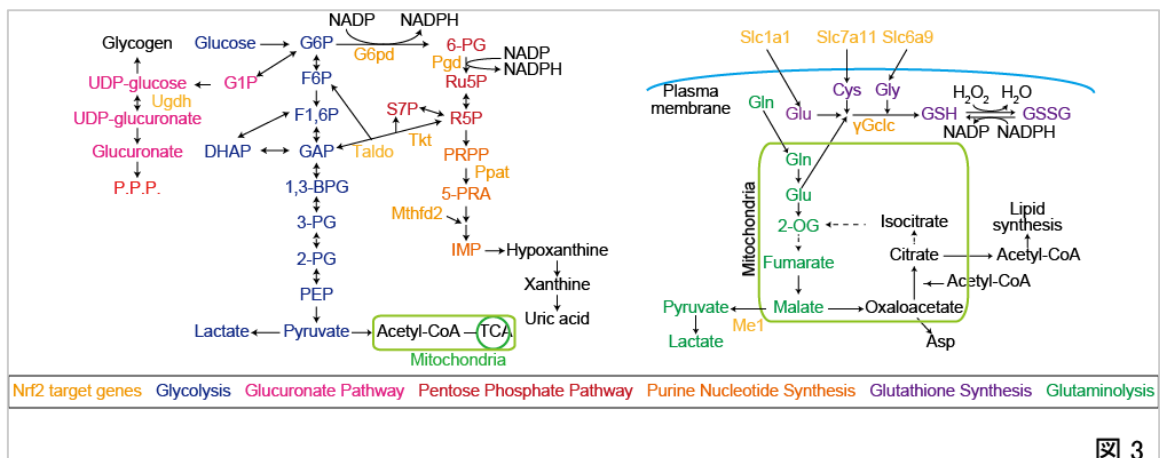
位置する 351 番目のセリン残基がリン酸化されると、リン酸化 p62 が Keap1 と Nrf2 との相互作用を競合的に阻害し、Nrf2 を活性化する新しい Nrf2 活性化機構を発見した(図 2)。このリン酸化 p62 に依存した Nrf2 の活性化は、選択的オートファジー発動時に起こっていた。つまり、主要な生体防御経路であるオートファジーと Keap1-Nrf2 経路がリン酸化 p62 により連結していることが判明した。

【従来の研究の問題点】

申請者らが見出した 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観察された。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。重要なことに、申請者らは、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。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。一方、最近、最近、腎細胞がん患者の 5%に p62 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。即ち、p62 はがん遺伝子であることが判明した。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、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ことが報告されている。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。

【申請者が明らかにしたこと】

最近、PI3K-Akt 経路が活性化している肺がん細胞において、Nrf2 が PPP(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、そしてグルタミノリシスの律速酵素群の遺伝子発現を誘導し、がん増殖に有利な代謝再編成を起こすことが報告された。そこで、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した(図 3)。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 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 において Nrf2 の活性化が確認された。S351E 発現 Huh7 は、抗酸化タンパク質群のみならず、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。さらに、S351E 変異体の発現によりグルクロン酸経路の酵素 Ugdh(UDP-グルコース脱水素酵素)をコードする Ugdh の遺伝子発現誘導が確認された。しかし、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。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



においても認められた一方、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。

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(図 3)。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。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。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。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。

$^{13}\text{C}_6$ -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の産生の増加を起こすことを明らかにした。また、このトレーサー実験は、Huh7 においてグルコースから 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。 $^{13}\text{C}_5$ -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。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。これらのことは、肝細胞がん細胞においてリン酸化 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。

申請書の結果から、リン酸化 p62 を持つ肝細胞がん細胞は抗酸化タンパク質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。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

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。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。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、Huh1 を除く調べた全てのヒト肝細胞がん細胞株 Huh7、Hepa1、JHH-1、HepG2 の細胞増殖を促進させた。S351A を発現させた場合には、この効果は認められなかった。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。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、特に HCV 陽性の肝細胞がんに対する抗がん剤耐性、増殖亢進を付与することを意味する (Saito *et al.*, *Nat. Commun.*, under revision)。

【結論】

- ・ 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。(図 4)
- ・ 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。(図 4)

