

論文審査の結果の要旨

氏名 齊藤 哲也

p62-Keap1-Nrf2 経路の調節不全は、オートファジー欠損マウス肝臓における腫瘍増殖やヒト肝細胞がん（HCC）の悪性化に関与することが報告されてきた。しかし、どのような機構でこの経路がそれらに寄与するのかは未解明のままであった。本論文は、p62-Keap1-Nrf2 経路がグルコースおよびグルタミン代謝を再編成し、その結果として肝細胞がんの悪性化をもたらすことを解明したものである。本論文は、下記 4 項目の実験結果から構成されている。

1. 「肝細胞がん細胞株における代謝プロファイリング」

p62-Keap1-Nrf2 経路が HCC において代謝再編成に関与するのか否かを検討するため、内在性リン酸化 p62 をほとんど持たない HCC 株 Huh7 にこの経路を活性化するリン酸化模倣変異体 p62 (S351E) を発現させた。その結果、転写因子 Nrf2 の安定化、およびペントースリン酸経路 (PPP)、グルタチオン合成、グルタミノリシス、そしてグルクロン酸経路に関わる酵素群の遺伝子発現の上昇が確認された。また、S351E 過剰発現の効果は、内在性に多くの S351 リン酸化 p62 を有する HCC 株 Huh1 においては全く確認されなかった。次に、野生型 p62、S351E、ないしは リン酸化不能変異体 p62 (S351A) を発現させた Huh7 を用い網羅的なメタボローム解析を行った。S351E の発現はグルクロン酸経路の代謝物 UDP-グルコースおよび UDP-グルクロン酸、そして還元型グルタチオン (GSH) の量を増加させた。¹³C₆-グルコースないしは ¹³C₅-グルタミンを利用したトレーサー実験から S351E 変異体の発現は、グルコースからグルクロン酸経路の代謝物 UDP-グルクロン酸の産生を、グルタミンから GSH の産生を顕著に誘導することが判明した。これらの遺伝子発現誘導および代謝変動は、S351A 変異体の発現では確認されなかった。

2. 「肝細胞がん細胞株における薬剤耐性と増殖」

S351E を発現させた Huh7 は、Nrf2 の典型的な標的遺伝子である多剤トランスポーターの遺伝子発現上昇のみならず薬剤抱合に関与する GSH および UDP-グルクロン酸の産生が亢進していることから、抗がん剤耐性になると予想された。実際、リン酸化 p62 低発現型 Huh7 および Hepa1 は、抗がん剤であるシスプラチンやソラフェニブに対して高い感受性を示し、それは 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た。GSH はがん細胞の増殖にも関与することが報告されている。事実、リン酸化 p62 低発現型である Huh7 や Hepa1 などへの S351E の発現は、GSH 産生依存的に HCC 細胞株の増殖を促進させた。

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」

生体内における 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の Nrf2 の動態、そして糖、アミノ酸代謝を調べた。*Atg7* 欠損マウス肝臓において、リン酸化 p62 の蓄積を介した Nrf2 の安定化、そして PPP、グルタチオン合成、そしてグルクロン酸経路に関わる酵素群の遺伝子発現誘導が確認された。メタボローム解析により、*Atg7* の欠損はグルクロン酸経路の中間体だけでなく、PPP 中間体、そしてプリン核酸の最初の産生物 IMP の増加が確認された。また、顕著な GSH の増加も確認された。これらの代謝物の変動は *Nrf2* の同時欠損によりほぼ完全に解消された。このことは、オートファジー不能肝臓では、Nrf2 依存的な GSH 産生亢進に加えて、グルクロン酸経路に続く非酸化型 PPP を介してプリンヌクレオチド合成が亢進されることを示唆する。

4. 「HCV 陽性 HCC におけるリン酸化 p62 の蓄積」

p62 のリン酸化状態を 17 例の肝細胞がん患者の非腫瘍、腫瘍部を用いて解析した。その結果、C 型肝炎ウイルス (HCV) 陽性の腫瘍部特異的にリン酸化 p62 の蓄積およびリン酸化 p62 および Keap1 陽性の凝集体の蓄積が確認された。

以上の結果から、HCC、特に HCV 陽性の HCC において p62-Keap1-Nrf2 経路は活性化し、グルコースおよびグルタミン代謝をそれぞれ UDP-グルクロン酸そして GSH 合成に向け、抗がん剤耐性能、増殖能を獲得させることが判明した。これらの事実は、p62 のリン酸化や p62-Keap1-Nrf2 経路を標的とする低分子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示唆する。

なお、本論文の研究成果は論文提出者が主体となって分析及び検証を行ったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。

したがって、博士(医科学)の学位を授与できると認める。

以上 1998 字