

研究報告書  
令和3年度：A課題

2023年 7月 7日

公益財団法人 がん研究振興財団

理事長 堀田 知光 殿

研究施設 東北大学大学院医学系研究科

住所 仙台市青葉区星陵町 2-1

研究者氏名 鈴木 隆史

(研究課題)

**転写因子 NRF2 変異による扁平上皮がん悪性化機構の解明**

---

令和4年 4月 1日付助成金交付のあった標記A課題について研究が終了致しましたのでご報告いたします。

## 要旨

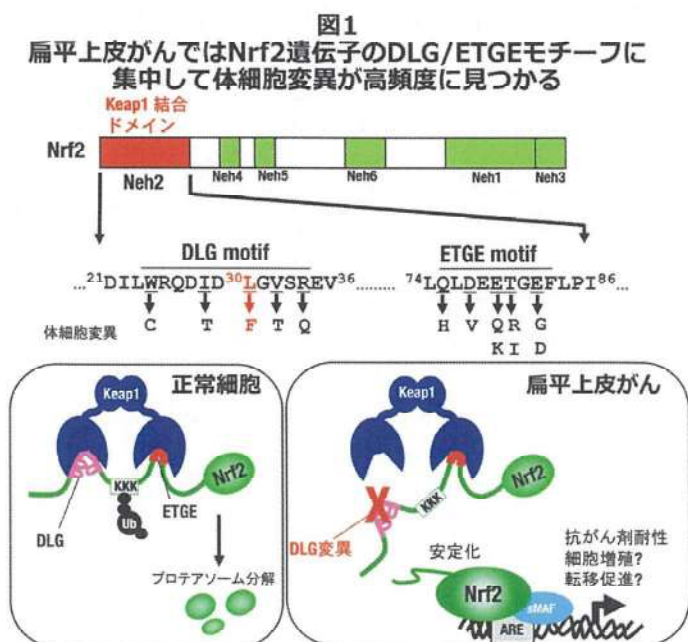
転写因子 Nrf2 が活性化した扁平上皮がんは予後が悪く、有効な治療法開発が喫緊の課題である。本研究では、Nrf2 活性化扁平上皮がんモデルマウスを創出し、がん悪性化メカニズムの解明を目指した。まず、ヒト食道がん由来 Nrf2<sup>L30F</sup> 変異体を誘導的に発現するマウスの作製に成功した。扁平上皮組織における Nrf2<sup>L30F</sup> 変異体の発現によって Nrf2 標的遺伝子群の活性化が確認された。また、Nrf2 の抑制因子である Keap1 の欠失マウスと同様に、食道扁平上皮の過角化が観察された。一方、長期観察の結果、扁平上皮組織における Nrf2<sup>L30F</sup> 変異体の発現による発がんは観察されなかったことから、Nrf2<sup>L30F</sup> 変異体の発現だけではがんの発生を引き起こすことはないと考えられた。そこで、K-Ras 変異および Trp53 変異などがンドライバー遺伝子の変異体を同時に発現させ、Nrf2<sup>L30F</sup> 変異体の発現が扁平上皮がんの発生および悪性化にどのように寄与するのか現在検討を進めている。本研究成果は、Nrf2 活性化が扁平上皮がんの悪性化に働くメカニズム解明および新しい治療法の確立に有益なツールを提供するものである。

## 背景

がん細胞は、多様な遺伝子変異により、増殖シグナルの維持、細胞死への抵抗、ストレス耐性など生存に有利な特性を獲得する。この遺伝子変異を逆手に利用して、腺がんでは、EGFR や ALK などの遺伝子変異を有するがんに対して有効な分子標的薬が開発されている。一方、扁平上皮がんでは、まだ有効な分子標的薬はなく、扁平上皮がんにおける新たな分子標的治療法の開発が望まれている (Kitamura et al, *Int J Mol Sci* 2020)。

Keap1-Nrf2 系の体細胞変異は肺がんや頭頸部・食道がんなどで高頻度に見出されている (Ohta et al, *Cancer Res* 2008; Shibata et al, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008)。Nrf2 は転写因子であり、正常細胞では Keap1 を構成因子とするユビキチン E3 リガーゼ複合体によりユビキチン化され、プロテアソームにより迅速に分解される (Suzuki & Yamamoto, *Free Radic Biol Med* 2015)。この Keap1 による Nrf2 のユビキチン化には、ホモ二量体の Keap1 が 1 分子の Nrf2 に DLG モチーフと ETGE モチーフの 2 箇所の結合部位を介して相互作用する (図 1)。

がん細胞では、Keap1 あるいは Nrf2 に体細胞変異が起こり、Nrf2 が恒常的に安定化する。詳細を見ると、Nrf2 の体細胞変異は、Keap1 と相互作用する DLG モチーフと ETGE モチーフに集中している (図 1)。一方、Keap1 の体細胞変異は Nrf2 と相互作用する C 末端側 DC ドメインに多い。その結果、Keap1 と Nrf2 のいずれに変異が起こっても、Nrf2 と Keap1 のタンパク



質間相互作用が阻害され、Nrf2 は Keap1 によるユビキチン化と分解を免れる。その結果、安定化した Nrf2 が核内に蓄積して、抗酸化剤応答配列に結合し、種々の標的遺伝子の転写を活性化する (Suzuki et al, *Trends Pharmacol Sci* 2013)。Nrf2 の標的遺伝子には、解毒酵素や抗酸化酵素などが多く、Nrf2 活性化は抗がん剤耐性に働く。これに加えて、Nrf2 はがん細胞の増殖や転移の促進にも働き、がん悪性化に寄与する (Suzuki et al, *Cancer Res* 2011; Mitsuishi et al, *Cancer Cell* 2012; Taguchi et al, *Front Oncol* 2017)。実際に、Nrf2 活性化型変異を持つがんの患者は予後不良である (Shibata et al, *Cancer Res* 2010; Inoue et al, *Cancer Sci* 2012)。実際に、私たちは Keap1 変異を有するヒト腺がん細胞株を用いた解析から、同変異ががんの悪性化に大きく寄与することを明らかにしてきた (Shibata et al, *Cancer Res* 2010)。また、トランスジェニックマウスを作製して、ヒト腺がん由来 Keap1 変異体が生体内において Nrf2 活性化を引き起こすことを実証した (Suzuki et al, *Cancer Res* 2011)。さらに、Nrf2 変異を有するヒト扁平上皮がんは増殖が亢進しており、Nrf2 ノックダウンによりその増殖能が低下することを実証した (Shibata et al, *Cancer Res* 2010)。以上のことから、Keap1 および Nrf2 のいずれの体細胞変異も恒常的 Nrf2 活性化を引き起こしががんの悪性化に寄与することが示されている。

Keap1 および Nrf2 の変異はいずれも Nrf2 の恒常的活性化を引き起こすが、詳細に見るとそこには本質的な違いが存在する。実際に、そして、興味深いことに、扁平上皮がんには Nrf2 変異が多く、腺がんでは Keap1 変異が多い (Shibata et al, *Cancer Res* 2010; Ohta et al, *Cancer Res* 2008)。即ち、同じ Nrf2 活性化を引き起こす変異であっても、その影響には違いが存在しており、扁平上皮がんにおいては Nrf2 変異が有利に働き、一方、腺がんにおいては Keap1 変異が発症と悪性化に有利に働く機構が存在すると考えられる。

扁平上皮がんに見られるのは Nrf2 の活性化型変異であり、このタイプのマウスはこ



れまで作製されていない。即ち、ヒト扁平上皮がんで起こっている Nrf2 活性化の影響を模倣するモデルとしては、扁平上皮において Nrf2 活性化型変異体を発現するマウスを作製する必要がある。そこで、本研究では、扁平上皮組織において Nrf2 活性化型変異体を発現するマウスを作製すること、そして、そのマウスの解析をとして、扁平上皮組織における Nrf2 活性化型変異の発現が及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。

## 結果

扁平上皮がん発症モデルにおける Nrf2 活性化型変異体発現の影響を調べる。これまでに私たちは各種の Keap1 欠失マウスを作製してきたが (Yoshida et al, *Genes*

*Cells* 2018; Suzuki et al, *Nature Commun* 2017; Suzuki et al, *Cancer Res* 2011; Taguchi et al, *Mol Cell Biol* 2010; Suzuki et al, *Mol Cell Biol* 2013)、Nrf2 活性化型変異体発現マウスは作製されていない。

ヒト食道がん由来 Nrf2<sup>L30F</sup> 変異体は、DLG モチーフ-Keap1 相互作用を失うものと考えられるので (Shibata et al, *Cancer Res* 2010)、最初に Nrf2 恒常的活性化を引き起こすのか検証する (図2)。ところ

で、Nrf2 活性化型変異体をマウスに発現すると、Keap1 全身欠失マウスのように生後まもなく致死になることが予想される。そこで、成獣において誘導的に Nrf2 活性化型変異体を発現するように、loxP 配列で挟まれた終止コドンカセットを Nr

図2  
ヒト扁平上皮がん由来 Nrf2<sup>L30F</sup> 変異体発現マウスの作製

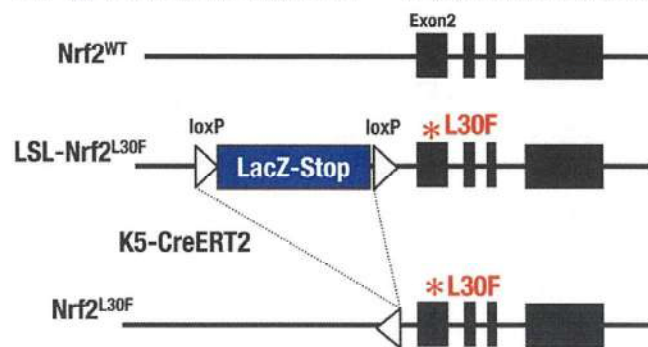
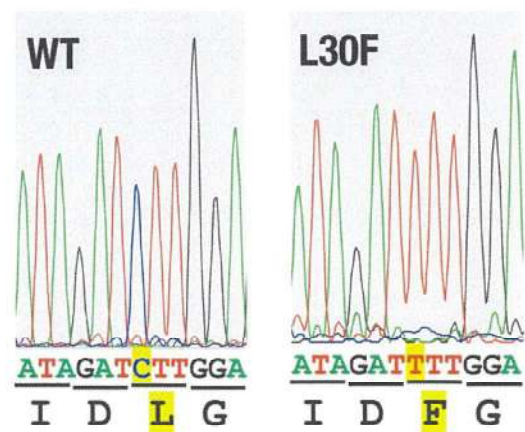


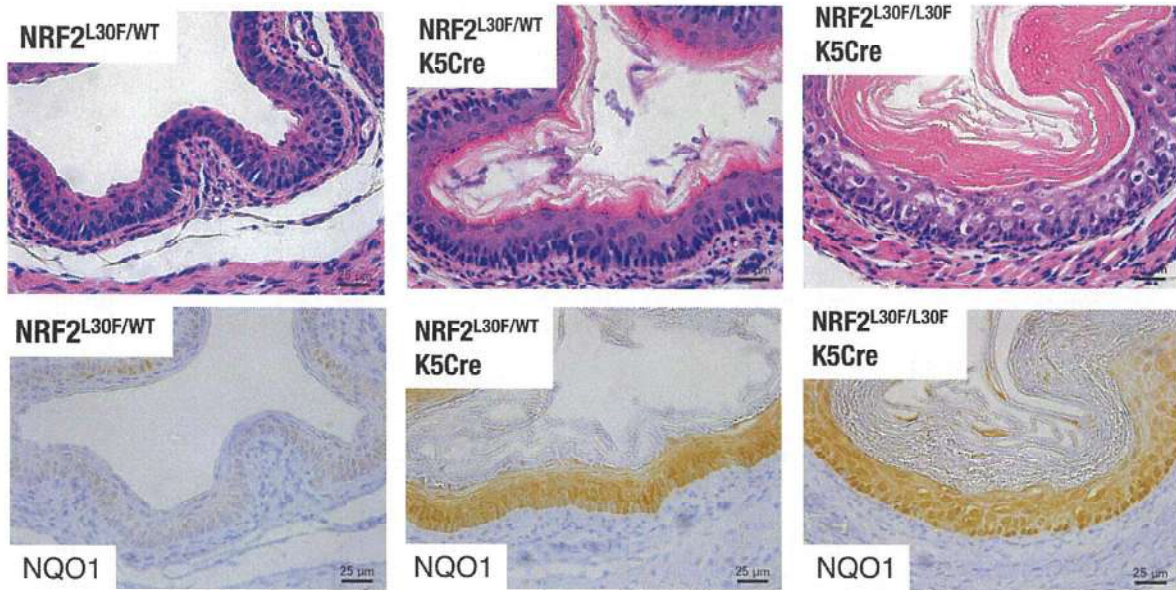
図3  
ゲノムシーケンスによる Nrf2<sup>L30F</sup> 変異の確認



f2 遺伝子座の開始メチオニン直前に挿入し、Cre 組換え酵素の発現により誘導的に Nrf2 活性化型変異体を発現する系を用いた。上記のように作製したターゲティングベクターを ES 細胞に導入後、胚盤胞にインジェクションして得られたキメラマウスを野生型マウスと交配して、生殖系列に伝播した LSL-Nrf2<sup>L30F</sup> アリルを得た。マウスのゲノムシーケンスにより導入した変異を確認した (図 3)。扁平上皮特異的に Cre 酵素を発現する K5Cre マウス (Taguchi et al, *Mol Cell Biol* 2010; Suzuki et al, *Nature Commun* 2017)、および誘導的に扁平上皮特異的に Cre 酵素を発現する K5 CreERT2 (Horiuchi et al, *Mol Cell Biol* 2021) を交配して複合マウスを作製した。

Nrf2<sup>L30F/L30F</sup>:K5Cre、Nrf2<sup>L30F/WT</sup>:K5Cre、および対照マウスについて、生後 7 日目の食道の組織解析を行なったところ、対照マウスに比べて、Nrf2<sup>L30F/L30F</sup>:K5Cre および Nrf2<sup>L30F/WT</sup>:K5Cre マウスにおいて角化層の肥厚化が観察された (図 4)。この角化層の肥厚化の程度は、Nrf2<sup>L30F/WT</sup>:K5Cre マウスに比べて、Nrf2<sup>L30F/L30F</sup>:K5Cre において顕著であった。Nrf2 抑制因子である Keap1 欠失マウスにおいても同様な角化層の肥厚化が観察される (Wakabayashi et al, *Nature Genet* 2003) ことから、Keap1 欠失した場合と同様に、Nrf2<sup>L30F</sup> 発現によって Nrf2 活性化が引き起こされていることが示唆された。さらに、代表的な Nrf2 標的遺伝子である NQO1 の免疫染色を行ったところ、対照マウスに比べて、Nrf2<sup>L30F/L30F</sup>:K5Cre および Nrf2<sup>L30F/WT</sup>:K5Cre マウスにおいて強い NQO1 染色が確認された (図 4)。以上の結果から、扁平上皮特異的 Nrf2<sup>L30F</sup> 変異体発現は Nrf2 活性化を引き起こすことが明らかになった。

図4 扁平上皮特異的Nrf2<sup>L30F</sup>発現マウスの食道において  
Nrf2標的遺伝子NQO1の活性化および角層の肥厚化が観察された



7 days after birth

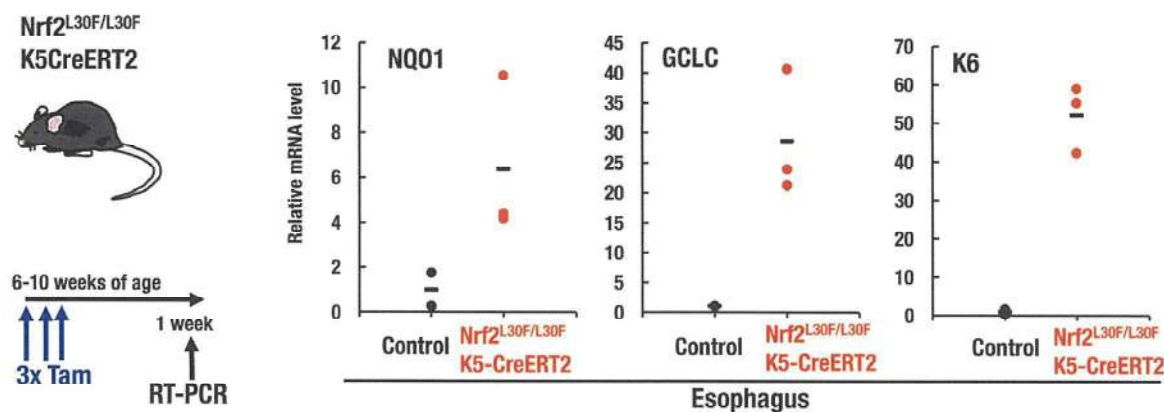
Nrf2<sup>L30F/L30F</sup>:K5Cre マウスは生後 2 週間以内に致死であり、Nrf2<sup>L30F/WT</sup>:K5Cre マウスは生存可能であるものの、体重増加不良が観察された。この表現型は、Keap1 欠失マウス (K0N2) は致死であり、また、Keap1 欠失かつ Nrf2 ヘテロ欠失マウス (K0N1) が生存可能かつ体重増加不良を呈する (Suzuki et al, *Mol Cell Biol* 2013) ことと酷似することから、Nrf2<sup>L30F/L30F</sup>:K5Cre マウスおよび Nrf2<sup>L30F/WT</sup>:K5Cre マウスにおいて Nrf2<sup>L30F</sup> の遺伝子量依存的に Nrf2 活性化が引き起こされていると考えられた。扁平上皮がんにおける Nrf2 変異はほとんどがヘテロ変異であるが (Shibata et al, *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008)、本研究結果は、Nrf2 ヘテロ変異でも十分に Nrf2 活性化を引き起こすことができることを示している。

上記のように、Nrf2<sup>L30F/L30F</sup>:K5Cre マウスは生後間もなく致死であることから、成獣における解析を行うため、誘導的に扁平上皮組織において Nrf2<sup>L30F</sup> 変異体を発現する Nrf2<sup>L30F/L30F</sup>:K5CreERT2 マウスを作製した。タモキシフェン投 (Tam) 与により誘導的に Nrf2<sup>L30F</sup> 変異体を発現させたところ、食道において NQO1 や GCLC など Nrf2 標的遺伝子の発現が活性化することがわかった (図 5)。また、上記の組織学的解析



と一致して、角化肥厚化に寄与するケラチン遺伝子 K6 の遺伝子発現が亢進していた。以上の結果から、成獣においても Nrf2<sup>L30F</sup> 変異体を発現することで食道において Nrf2 活性化が引き起こされることが明らかになった。

図5 誘導的かつ扁平上皮特異的なNrf2<sup>L30F</sup>変異体の発現は食道におけるNrf2活性化を引き起こす



Nrf2<sup>L30F/L30F</sup>:K5CreERT2 マウスは、タモキシフェン投与により Nrf2<sup>L30F</sup> 変異体を発現させても、生存可能である。このマウスの長期観察を行っているが、現在までに食道における発がんは観察されていないことから、Nrf2<sup>L30F</sup> 変異体の発現だけでは効率よく発がんを引き起こすことはないと考えられた。ヒト食道がんではがん抑制遺伝子 p53 などの体細胞変異が生じていることから、ドライバー遺伝子変異と Nrf2 変異の組み合わせが、発がんに寄与すると考えられた。そこで、現在、扁平上皮特異的 Nrf2 活性化型変異体発現マウスと各種のドライバー遺伝子変異マウスとの組み合わせを行い、扁平上皮がんの発生および進展における Nrf2<sup>L30F</sup> 変異体発現の影響を検討している。



## 考察

本研究では、ヒト扁平上皮がんで見つかった体細胞変異を導入した転写因子 Nrf2 を発現するマウスモデルの作出に成功した。正常細胞では Nrf2 は Keap1 によってユビキチン化修飾され分解抑制されているが、がん細胞では Keap1 との相互作用領域 (DLG モチーフおよび ETGE モチーフ) に集中して Nrf2 の体細胞変異が生じ、Nrf2 の恒常的活性化を惹起する。この Nrf2 が活性化した扁平上皮がんは予後が悪く、有効な治療法開発が望まれている。本研究において作製した Nrf2 変異体を発現する扁平上皮がんモデルマウスは、Nrf2 活性化が扁平上皮がんの悪性化に働くメカニズムの解明および、Nrf2 活性化扁平上皮がんの新しい治療法の確立に有益な情報を提供するものと期待される。

Nrf2<sup>L30F</sup> 変異体の発現が扁平上皮がん悪性化に働くメカニズム解明を目指して、網羅的な遺伝子発現解析およびプロテオーム解析等を実施する予定である。また、この検証には、マウスで発生した腫瘍に加えて、腫瘍組織の培養を行い細胞株の樹立を試みる。これにより、細胞自律的なメカニズムなのか、それともがん微小環境と相互作用が重要なのか検証を行う。さらに、がん悪性化に寄与すると予想される因子やシグナル経路などを見出すことに成功した場合は、阻害剤や遺伝子の過剰発現およびノックダウン等の実験により検証を行い、Nrf2 活性化扁平上皮がんに対する有効な治療法の探索に挑戦する。

興味深いことに、扁平上皮がんでは Nrf2 変異が多く、一方、腺がんでは Keap1 変異が多い。これまでに、腺がんにおける Keap1 変異が引き起こす Nrf2 活性化の影響を調べる研究は Keap1 欠失マウスを用いた解析によって行われてきた。しかし、扁平上皮がんにおける Nrf2 変異が引き起こす Nrf2 活性化の影響を調べる研究は、Nrf2 変異マウスが作出されてこなかったため、研究が進んでいなかった。Nrf2 変異と Keap1 変異はいずれも Nrf2 活性化を引き起こすにもかかわらず、がん組織によって Nrf2 と Keap1 の変異の頻度に偏りが生じるのはなぜが未だに謎である。本研究によ

り、Nrf2 変異体発現マウスの作出に成功したことから、今後、Keap1 変異の場合と比較することで、そのがん悪性化に及ぼす影響の貢献の違いを明らかにすることが可能になると期待される。

## 謝辞

本研究は、東北大学大学院医学系研究科医化学分野のメンバーによって実施された。特に、守田匡伸博士、須田博美補佐員、大学院生（高橋洵、佐藤美羽、矢口菜穂子、Anqi Zhang、Wen Huaichun）らの協力を得て実施した。山本雅之教授には多大なご助言を頂いた。

## 引用文献

1. Horiuchi, M., Taguchi, K., Hirose, W., Tsuchida, K., Suzuki, M., Taniyama, Y., Kamei, T., and Yamamoto, M. (2021). Cellular Nrf2 Levels Determine Cell Fate during Chemical Carcinogenesis in Esophageal Epithelium. *Mol Cell Biol* 41. 10.1128/MCB.00536-20.
2. Inoue, D., Suzuki, T., Mitsuishi, Y., Miki, Y., Suzuki, S., Sugawara, S., Watanabe, M., Sakurada, A., Endo, C., Uruno, A., et al. (2012). Accumulation of p62/SQSTM1 is associated with poor prognosis in patients with lung adenocarcinoma. *Cancer Sci* 103, 760-766. 10.1111/j.1349-7006.2012.02216.x.
3. Kitamura, N., Sento, S., Yoshizawa, Y., Sasabe, E., Kudo, Y., and Yamamoto, T. (2020). Current Trends and Future Prospects of Molecular Targeted Therapy in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Int J Mol Sci* 22. 10.3390/ijms22010240.
4. Mitsuishi, Y., Taguchi, K., Kawatani, Y., Shibata, T., Nukiwa, T., Aburatani, H., Yamamoto, M., and Motohashi, H. (2012). Nrf2 redirects glucose and glutamine into anabolic pathways in metabolic reprogramming. *Cancer Cell* 22, 66-79. S1535-6108(12)00215-2. 10.1016/j.ccr.2012.05.016.
5. Ohta, T., Iijima, K., Miyamoto, M., Nakahara, I., Tanaka, H., Ohtsuji, M., Suzuki, T., Kobayashi, A., Yokota, J., Sakiyama, T., et al. (2008). Loss of Keap1 function activates Nrf2 and provides advantages for lung cancer cell growth. *Cancer Res* 68, 1303-1309. 10.1158/0008-5472.CAN-07-5003.
6. Shibata, T., Ohta, T., Tong, K.I., Kokubu, A., Odogawa, R., Tsuta, K., Asamura, H., Yamamoto, M., and Hirohashi, S. (2008). Cancer related mutations in NRF2 impair its recognition by Keap1-Cul3 E3 ligase and promote malignancy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 13568-13573. 10.1073/pnas.0806268105.
7. Shibata, T., Saito, S., Kokubu, A., Suzuki, T., Yamamoto, M., and Hirohashi, S. (2010). Global downstream pathway analysis reveals a dependence of oncogenic NF-E2-related factor 2 mutation on the mTOR growth signaling pathway. *Cancer Res* 70, 9095-9105. 10.1158/0008-5472.CAN-10-0384.
8. Suzuki, T., Maher, J., and Yamamoto, M. (2011). Select heterozygous Keap1 m



- utations have a dominant-negative effect on wild-type Keap1 in vivo. *Cancer Res* 71, 1700-1709. 10.1158/0008-5472.CAN-10-2939.
9. Suzuki, T., Motohashi, H., and Yamamoto, M. (2013). Toward clinical application of the Keap1-Nrf2 pathway. *Trends Pharmacol Sci* 34, 340-346. 10.1016/j.tips.2013.04.005.
  10. Suzuki, T., Seki, S., Hiramoto, K., Naganuma, E., Kobayashi, E.H., Yamaoka, A., Baird, L., Takahashi, N., Sato, H., and Yamamoto, M. (2017). Hyperactivation of Nrf2 in early tubular development induces nephrogenic diabetes insipidus. *Nat Commun* 8, 14577. 10.1038/ncomms14577.
  11. Suzuki, T., Shibata, T., Takaya, K., Shiraishi, K., Kohno, T., Kunitoh, H., Tsutsumi, K., Furuta, K., Goto, K., Hosoda, F., et al. (2013). Regulatory nexus of synthesis and degradation deciphers cellular Nrf2 expression levels. *Mol Cell Biol* 33, 2402-2412. 10.1128/MCB.00065-13.
  12. Suzuki, T., and Yamamoto, M. (2015). Molecular basis of the Keap1-Nrf2 system. *Free Radic Biol Med*. 10.1016/j.freeradbiomed.2015.06.006.
  13. Taguchi, K., Maher, J.M., Suzuki, T., Kawatani, Y., Motohashi, H., and Yamamoto, M. (2010). Genetic analysis of cytoprotective functions supported by graded expression of Keap1. *Mol Cell Biol* 30, 3016-3026. MCB.01591-09. 10.1128/MCB.01591-09.
  14. Taguchi, K., and Yamamoto, M. (2017). The KEAP1-NRF2 System in Cancer. *Front Oncol* 7, 85. 10.3389/fonc.2017.00085.
  15. Wakabayashi, N., Itoh, K., Wakabayashi, J., Motohashi, H., Noda, S., Takahashi, S., Imakado, S., Kotsuji, T., Otsuka, F., Roop, D.R., et al. (2003). Keap1-null mutation leads to postnatal lethality due to constitutive Nrf2 activation. *Nat Genet* 35, 238-245. 10.1038/ng1248.
  16. Yoshida, E., Suzuki, T., Morita, M., Taguchi, K., Tsuchida, K., Motohashi, H., Doita, M., and Yamamoto, M. (2018). Hyperactivation of Nrf2 leads to hypoplasia of bone in vivo. *Genes Cells* 23, 386-392. 10.1111/gtc.12579.