

北野 雄希 氏の学位論文審査の要旨

論文題目

Nrf2 promotes oesophageal cancer cell proliferation via metabolic reprogramming and detoxification of reactive oxygen species

(食道癌においてNrf2はグルタチオン代謝への代謝リプログラミングを介して細胞増殖を促進する)

がん細胞は自らの増殖能の維持のために膨大なエネルギーを産生・消費しており、その際に様々な代謝経路へのリプログラミングを活用する。転写因子 Nuclear factor erythroid-2 related factor 2 (Nrf2) 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が、様々ながんにおいてNrf2が恒常的に活性化し、予後不良因子となることが明らかになっている。恒常的に活性化したNrf2は様々な代謝経路を活性化し、がん細胞に有利な代謝環境を実現し、がんの増殖・進展に貢献している。本研究は、食道癌におけるNrf2の発現意義をがん代謝の観点から検討したものである。

申請者は、2005年～2012年に熊本大学消化器外科で切除を行った前治療のない食道癌201例を対象にNrf2の免疫組織染色を行い、臨床病理学的予後との相関を解析した。また3種の食道癌細胞株を用いて *in vitro* 実験 (Growth assay, Apoptosis assay, reactive oxygen species (ROS) detection assay) を行なった。さらに質量分析器を用いて、食道癌細胞株と食道癌切除サンプルの metabolite 測定を行った。

食道癌切除サンプルの免疫組織染色では、非癌部に比べ癌部でNrf2は高発現であり ($P < 0.0001$)、癌部の高発現群が91例、低発現群が110例であった。病理組織学的因子ではNrf2発現量は深達度 ($P = 0.04$)、リンパ節転移陽性率 ($P = 0.002$)、Stage ($P = 0.001$) と相関を認め、無再発生存率 ($HR = 2.9$, $P = 0.0004$)、全生存率 ($HR = 2.6$, $P < 0.0001$) と予後との相関も認めた。食道癌細胞株におけるNrf2発現量を real time PCR 法と Western Blot 法にて確認した。Nrf2高発現株のNrf2をknockdownすると増殖能が著明に低下することを Growth assay で確認し、フローサイトメトリーにて G0/G1 Cell cycle arrest、アポトーシスの増加を認めた。これらの現象はNrf2 knockdownにより細胞内のROSが増加し、その結果 p38MAPK のリン酸化を増加させ CyclinD1 を抑制することで増殖能が低下し、生じていることを確認した。さらに p38MAPK 阻害剤である SB203580 を投与すると、低下した増殖能を再獲得することが示された。食道癌細胞株を用いた質量分析器による網羅的メタボローム解析の結果、Nrf2はグルタチオン代謝を著明に誘導していることが判明、食道癌切除サンプル20例においても、Nrf2高発現症例では有意にグルタチオン含有量が多かった ($P = 0.009$)。さらに Public database を用いた Gene Set Enrichment Analysis においても、Nrf2高発現群がグルタチオン代謝を促進していることを示した。以上の結果より、食道癌においてNrf2がグルタチオン代謝への代謝リプログラミングを促進し、ROS産生を制御することでがんの増殖能を増強させ、癌悪性度や予後不良に寄与している可能性が示された。

審査の過程において、①糖取込み増加にNrf2とHIF-1 α のどちらが寄与するか、②Nrf2発現増加による糖取込み増加の機序、③食道癌におけるNrf2増加の機序、④Nrf2発現の低い細胞でも細胞死が抑制される機序、⑤食道癌サンプルの摘除前の治療の有無やNrf2発現量の定量方法、⑥EGFRやk-Ras経路とNrf2経路の相関、⑦癌細胞でのROS増加の機序や産生部位と他のROS除去薬の効果、⑧keap1 knockdownの効果、⑨扁平上皮癌と腺癌での違い、⑩癌治療法としてNrf2を標的とする意義、⑪Nrf2発現の違いによる治療戦略の在り方、等に関して質疑応答がなされ、申請者からは適切な回答や考察が得られた。

本研究は、食道癌においてNrf2がグルタチオン代謝への代謝リプログラミングを促進し、ROSを制御することで、癌悪性度や予後不良に寄与する可能性とその機序を初めて示した点で評価された。