

学位論文題名

Transcription factor Nrf2/MafK regulates rat
placental glutathione S-transferase gene
during hepatocarcinogenesis

(転写因子 Nrf2/MafK はラット肝発癌過程における
胎盤型グルタチオン S-トランスフェラーゼ遺伝子の発現を制御する)

学位論文内容の要旨

GST (グルタチオン S-トランスフェラーゼ) は第 II 相薬物代謝酵素である。哺乳動物の GST には Alpha、Mu、Pi、Shigma、Theta の 5 つのサブクラスが存在する。他のアイソザイムとは異なり、ラット胎盤型 GST (GST-P、Pi クラス GST) は正常肝では発現せず、薬剤により誘導されない。しかし前癌病変や肝癌で非常に特異的に強く発現するため GST-P は腫瘍マーカーとして、また発癌剤の *in vivo* スクリーニングに利用されている。GST-P の発現は主に転写段階で制御されており、発現の特異性から GST-P 発現機構はラットにおいて肝発癌の初期過程と密接な関係があると考えられている。本論文は GST-P 遺伝子の肝発がんに伴う転写調節機構を明らかにしたものである。

GST-P 遺伝子には転写開始点から 2.5 kb 上流に非常に強いエンハンサー、GPE1 (GST-P エンハンサー 1) が存在する。GPE1 が前癌病変や肝癌での GST-P 発現に非常に重要な転写制御領域であることが、村松らのトランスジェニックラットを用いた解析から明らかになっている。GPE1 は TRE (phorbol-12-o-tetradecanoate-13-acetate responsive element、-TGAGTCA-) に似た配列を 2 つ向かい合わせにした構造 (5'-TCAGTCAGTCACTATGATTTCAGCAA-3') を持ち、ARE (antioxidant responsive element、-GTGACTTGGCA-) や MARE (Maf recognition element、-TGCTGACTCAGCT-) とも似た配列をしている。これらの配列の類似性から Jun, Fos, Nrf2 (NF-E2 p45-related factor 2), Maf 等が GPE1 に結合することが示唆された。申請者はこの研究で転写因子 Nrf2/MafK のヘテロ二量体が GPE1 の転写活性化に関与していることを明らかにした。

in vitro ゲルモビリティシフトアッセイ、フットプリンティング分析の結果、Nrf2/MafK 二量体は GPE1 に特異的に結合した。肝癌培養細胞を用いたレポータートランスフェクションアッセイによって Nrf2 が GST-P 遺伝子を強く活性化させることが明らかとなった。部位特異的変異を導入した GPE1 配列には Nrf2/MafK は結合せず、転写も活性化されなかった。さらにノーザンブロット分析による GST-P と Nrf2 mRNA の定量では肝癌の進行に伴う両者の増加が観察された。Nrf2 は細胞質に存在する Nrf2 の抑制因子、Keap1 と結合し不活性化されており、薬剤投与により Keap1-Nrf2 の結合がはずれ、Nrf2 が核に移行することにより薬物代謝酵素の誘導が行われることが知られているが、Keap1 遺伝子は GST-P 遺伝子の転写活性を抑制した。肝癌培養細胞に薬剤を投与すると GST-P mRNA も他の第 II 相薬物代謝酵素同様、薬剤により誘導が見られた。これらの結果は GST-P 遺伝子も Nrf2 によって転写活性化を受けること、薬剤による Keap1-Nrf2 経路の活性化が GST-P 遺伝子の発現にも関わることを示している。即ち、GST-P の発現が完全に抑制されている正常肝では薬物による誘導はかからないが、抑制がはずれて GST-P が発現している肝癌細胞では薬物によって Nrf2 が活性化され GST-P の発現を増強したものと考えられる。

In vivo における Nrf2/MafK の GPE1 への結合をクロマチン免疫沈降法によって解析した結果、GST-P が強く発現している前癌病変や肝癌培養細胞には抗 Nrf2 抗体により GPE1 領域が免疫沈降され、抗 MafK 抗体でも同様の結果が得られた。しかし、GST-P の発現が見られない正常肝では GPE1 領域の免疫沈降は抗 Nrf2、抗 MafK のどちらの抗体でも見られなかった。このことから、肝発がんに伴って Nrf2/MafK が GPE1 に結合することが明らかとなった。

以上の結果から Nrf2/MafK 二量体が前癌病変、肝癌における特異的な GST-P の発現を活性化していることが示めされた。正常肝では GPE1 は何らかの機構で Nrf2/MafK が結合できない状態になっており、GST-P の発現は抑制されているが、化学発癌剤などによって発癌の initiation が起こると、抑制がはずれ、発癌剤の Nrf2 活性化機構が働いて Nrf2/MafK 二量体が GPE1 に結合し、GST-P 遺伝子の強い発現が誘導されるものと考えられる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 田 中 一 馬
副 査 教 授 西 信 三
副 査 教 授 畠 山 鎮 次
副 査 助 教 授 酒 井 正 春

学 位 論 文 題 名

Transcription factor Nrf2/MafK regulates rat placental glutathione S-transferase gene during hepatocarcinogenesis

(転写因子 Nrf2/MafK はラット肝発癌過程における
胎盤型グルタチオン S-トランスフェラーゼ遺伝子の発現を制御する)

第 II 相薬物代謝酵素であるラット GST-P (胎盤型グルタチオン S-トランスフェラーゼ)は正常肝では発現せず、前癌病変や肝癌で特異的に強く出現する。過去の研究から GST-P 遺伝子の活性化には主にエンハンサーGPE1 の関与が示唆されているが、GST-P 遺伝子の肝癌特異的発現については十分に解析されていない。申請者は転写因子 Nrf2/MafK 二量体の肝癌特異的 GST-P 遺伝子発現への関与を検討した。ゲルモビリティシフト分析 (EMSA)、フットプリンティング分析で Nrf2/MafK 二量体は GPE1 に特異的に結合した。レポータートランスフェクション分析では Nrf2 は GST-P 遺伝子を強く活性化させた。さらに GST-P と Nrf2 mRNA に肝癌の進行に伴う増加が観察された (ノーザンプロット分析)。Nrf2 の抑制因子である Keap1 は Nrf2 による GST-P の転写活性を抑制した。GST-P mRNA も他の第 II 相薬物代謝酵素同様、肝癌培養細胞で薬剤により誘導された。クロマチン免疫沈降法による解析から GST-P が強く発現している前癌病変や肝癌培養細胞において抗 Nrf2 抗体と抗 MafK 抗体により GPE1 領域が免疫沈降されたが、正常肝では免疫沈降されてこなかった。以上の結果から Nrf2/MafK 二量体が前癌病変、肝癌における特異的 GST-P の発現を活性化していることが示された。

主査から紹介があった後、申請者はスライドを用いながら約 20 分に渡って学位論文内容の発表を行った。その後副査畠山鎮次教授から細胞抽出液を用

いた EMSA を行ったのか、また抗 Nrf2、抗 MafK 抗体を用いたスーパーシフト実験を行ったのか質問があった。申請者は細胞抽出液を用いて EMSA を行い、そのバンドは抗体によりシフトしたが、細胞抽出液には GPE1 に結合可能な転写因子が多く存在するためにきれいな実験結果は得られなかったと解答した。続いて畠山鎮次教授から実験に用いた F9 細胞での Small Maf の発現について質問があった。申請者は F9 細胞での Small Maf の発現は確認していないが、実験に使用した Small Maf の一つである MafK はマウスでは発現量に多少の違いはあるもののほとんどの臓器で発現していることが報告されていると解答した。さらに畠山鎮次教授から肝細胞における Nrf2 の発現制御や分解メカニズムについて質問があった。申請者は Nrf2 がユビキチン化されることは報告されており、異物非存在下において Nrf2 は細胞質で速やかに分解されるため第 II 相薬物代謝酵素は誘導されないと解答した。次いで主査田中一馬教授から癌化することによって GST-P が Nrf2 により転写制御を受ける原因について質問があった。申請者は詳細は不明だが癌化すると GPE1 に Nrf2 が結合しやすいクロマチン構造をとるのではないかと解答した。続いて田中一馬教授からヒストンアセチルトランスフェラーゼ(HAT)は明らかになっているのか質問があった。申請者は他のグループが CBP/P300 は肝癌での発現は低く、HAT 活性を持つ MOZ (monocytic leukemia zinc finger protein)が肝癌特異的に増加してくることを明らかにしていると解答した。さらに田中一馬教授から Keap1 に働く薬剤について質問があり、申請者はこれまで多くの第 II 相薬物代謝酵素誘導剤が報告され利用されてきたが、その共通点は SH 基の存在で、Keap1 の SH 基とジスルフィド結合することで Keap1 の構造が変化し、Nrf2 が離れると報告されていると解答した。

本研究は、肝発癌過程における GST-P 遺伝子の発現制御機構を明らかにしたものであり、今後肝発癌メカニズムの解明に繋がることが期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院過程における研鑽や取得単位なども併せ、申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。