

氏 名 矢崎 海
学位の種類 博士（医学）
学位記番号 博甲第 10387 号
学位授与年月 令和 4 年 3 月 25 日
学位授与の要件 学位規則第 4 条第 1 項該当
審査研究科 人間総合科学研究科
学位論文題目 TGF- β 1 誘導上皮間葉移行における ROS-Nrf2 経路と Notch シグナルの役割の検討

主査	筑波大学教授	医学博士	野口 雅之
副査	筑波大学准教授	博士（医学）	菊池 慎二
副査	筑波大学講師	博士（医学）	近藤 裕也
副査	筑波大学助教	博士（医学）	小田 ちぐさ

論文の内容の要旨

矢崎 海氏の博士学位論文は、培養細胞を用いることで ROS-Nrf2 経路が肺腺癌の上皮間葉移行に関与していることを明らかにしたものである。その要旨は以下の通りである。

目 的:

上皮間葉移行 (Epithelial Mesenchymal Transition, EMT) は、上皮細胞が形質転換して間葉系細胞の表現型を獲得する細胞プロセスであり、癌の進行、臓器線維症への関与が示されている。肺癌から樹立した細胞である A549 においては、Notch シグナルが *Snail* の直接的な転写活性化を介して TGF- β 1 誘導 EMT を制御している。しかし、TGF- β 1 が Notch シグナルを活性化させる分子メカニズムは明らかになっていない。活性酸素種 (Reactive Oxygen Species, ROS) は、酸化ストレスを誘導するが、近年細胞内シグナル伝達物質としての役割が注目されている。ROS は TGF- β 1 シグナルでもセカンドメッセンジャーとして作用するが、TGF- β 1 誘導 EMT における ROS の役割は明らかでない。著者は、ROS-Nrf2 経路と Notch シグナルのクロストークに着目し、TGF- β 1 により誘導される Notch シグナルの活性化と EMT における ROS-Nrf2 経路の役割を解明することを目的として研究を行った。

対象と方法:

著者は A549 細胞に対し TGF- β 1 処理を行うことで EMT を誘導し、形態学的変化、上皮・間葉マーカー遺伝子発現、ROS レベル、Nrf2 活性化と標的遺伝子発現、Notch 関連分子の発現、Notch シグナリングの活性化、を解析した。さらに ROS スカベンジャーである N-acetylcysteine (NAC) の処理や、Nrf2 に対する small interfering RNA (siRNA) の導入にて、TGF- β 1 誘導 EMT における ROS と Nrf2 の役割を検討した。一方で、著者は TGF- β 1 による *Notch4* の転写活性化のメカニズムを明らかにするため、そのプロモーター領域に着

目し、抗酸化配列 (Antioxidant response element, ARE)の候補を検索し、同定された候補 ARE について点突然変異を導入したレポーターコンストラクトを作成し、ルシフェラーゼアッセイにて機能を検討した。またクロマチン免疫沈降 (Chromatin immunoprecipitation, ChIP) アッセイにより、TGF- β 1 による Nrf2 の候補 ARE への動員の有無を検討している。

結 果:

著者は以下の結果を得ている。TGF- β 1 は ROS を増加させ、Nrf2 の活性化と、その標的遺伝子の発現を誘導した。NAC による ROS レベルの低下または siRNA による Nrf2 のノックダウンは、いずれも Notch シグナルの活性化と EMT を減弱させた。Notch4 プロモーター上には 2 つの候補 ARE (ARE1, ARE2)が存在したが、ARE2 への変異導入は TGF- β 1 による Notch4 プロモーターのルシフェラーゼ活性の増加を有意に低下させた。Nrf2 に対する免疫沈降物において、ARE2 を含む DNA フラグメントは、TGF- β 1 処理により増加した。

考 察:

著者は TGF- β 1 は ROS-Nrf2 経路を活性化させ、これは Notch シグナルの活性化と EMT に必要なプロセスであることを明らかにしている。さらに、TGF- β 1 による Notch4 の転写活性化は、Nrf2 の活性化に依存していることを示している。近年、肝臓や肺の細胞において、ROS-Nrf2 経路による Notch1 の発現誘導が報告されているが、本研究は、Notch4 の転写が Nrf2 によって直接制御されていることを実証した最初の報告になると述べている。

本研究は Nrf2 が TGF- β 1 誘導 EMT に必要であることを明らかにしたが、近年、癌細胞における Nrf2 の活性化が、癌の進行、治療抵抗性の増強、予後の悪化に関与すること、また本研究と同様、EMT を促進させること、を示す報告が増えつつある。著者は、Nrf2 とその関連経路を癌細胞特異的に不活性化することは、EMT と癌に対する新規治療法となる可能性があると考えしている。

Notch4 は主に内皮細胞で発現しており、血管新生の調節因子として機能する。本研究において、A549 細胞における Notch4 の転写レベルは、定常状態では低値であったが、TGF- β 1 にて著明に上昇した。近年、様々な癌細胞において、Notch4 の異常発現と EMT や転移との関連が報告されている。著者は、正常組織での Notch4 の発現が限定的であることから、EMT や転移の新規診断・治療方法を開発する上で、Notch4 は有用な標的となりうると考察している。

結 論:

著者は、ROS-Nrf2 経路が、Notch シグナルの活性化を介して、TGF- β 1 誘導 EMT において重要な役割を担うこと、Nrf2 が Notch4 転写に直接関与することを明らかにした。ROS-Nrf2 経路、Notch4 は、癌や臓器線維症などの進行を抑える新規治療標的となる可能性があり、今後の研究発展、臨床応用が期待されると述べている。

審査の結果の要旨

(批評)

著者は、ROS-Nrf2 経路が、Notch シグナルの活性化を介して、TGF- β 1 誘導 EMT において重要な役割を担うこと、Nrf2 が Notch4 転写に直接関与することを明らかにした。特に ROS-Nrf2 シグナル活性化によって Nrf2 が Notch4 転写に直接関与することを明らかにしたのは評価される。今後 Notch4 が上皮間葉移行の治療標的になる可能性が示され、さらなる研究成果が期待される。

令和 4 年 1 月 5 日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもと論文について説明を求め、関連事項について質疑応答を行い、最終試験を行った。その結果、審査委員全員が合格と判定した。

よって、著者は博士 (医学) の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認める。