

筑波大学

博士（医学）学位論文

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

2021

筑波大学大学院博士課程人間総合科学研究科

矢崎 海

目次

| | |
|-------------------------------|----|
| 略語 | 1 |
| 第1章 序論 | 2 |
| 図 | 7 |
| 参考文献 | 14 |
| 第2章 上皮間葉移行における ROS-Nrf2 経路の役割 | 18 |
| 1. 目的 | 18 |
| 2. 方法 | 18 |
| 3. 結果 | 23 |
| 4. 考察 | 28 |
| 図 | 33 |
| 参考文献 | 48 |
| 第3章 総括 | 59 |
| 謝辞 | 60 |
| 出典 | 61 |

略語

本論文において、以下の略語を使用した。

ARE: antioxidant responsive element

ChIP: chromatin immunoprecipitation

DCFDA: 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate

EMT: epithelial-mesenchymal transition

HO-1: heme oxygenase-1

Keap1: kelch-like ECH-associated protein 1

NAC: N-acetylcysteine

NICD: notch intracellular domain

NOX4: NADPH oxidase 4

Nrf2: nuclear factor erythroid-derived 2-related factor 2

ROS: reactive oxygen species

siRNA: small interfering RNA

TGF: tumor growth factor

第1章 序論

1. 上皮間葉移行 (Epithelial Mesenchymal Transition, EMT)

EMT は、上皮細胞が細胞極性と細胞間接着を失い、浸潤性、遊走性といった間葉系細胞の表現型を獲得する細胞プロセスであり (1)、胚発生や創傷治癒などの発生学・生理学的プロセス、ならびに癌や臓器線維症などの病理学的プロセスにおいて重要な役割を果たす (2)(Fig. 1)。様々なサイトカインや成長因子、低酸素環境などが EMT を誘導するが、中でも細胞の分化、増殖、アポトーシスに関与する多機能サイトカインである TGF- β 1 は EMT を強力に誘導する (3)。

TGF- β 1 で誘導される EMT は、Snail、ZEB、および bHLH ファミリーなどの転写因子により媒介される。これらの転写因子は、上皮細胞のマーカー遺伝子の発現を抑制し、逆に間葉系細胞のマーカー遺伝子の発現を増強させる (4)。肺胞上皮細胞では、Snail ファミリーの転写因子である Snai1、Snai2 が、TGF- β 1 誘導 EMT に関与している (3)。これらの転写因子の発現は、特発性肺線維症患者の肺胞上皮細胞でも確認され、Snail を介した EMT の病態への関与が示唆される (3)。また肺腺癌から樹立した細胞である A549 においても、TGF- β 1 にて EMT が誘導され (3, 5)、EMT の確立したモデルとして広く用いられている。

2. Notch シグナルと TGF- β 1 誘導 EMT

Notch シグナルは細胞同士の直接的な接触により活性化されるシグナル経路

である。哺乳類では、4 つの受容体 (Notch 1-4) と 5 つのリガンド (Delta-like ligand 1, 3, 4, および Jagged 1, 2) が存在する (6)。Notch 受容体は膜貫通型タンパク質であり、リガンドと結合した Notch 受容体はプロテアーゼと γ セクレターゼにより切断され、細胞膜から Notch 細胞内ドメイン (Notch intracellular domain, NICD) が遊離する (Fig. 2)。NICD は核内へ移行し、転写制御因子 RBP-J/CSL およびコアクチベーターと複合体を形成し、標的遺伝子の転写を誘導する (Fig. 2)。Notch シグナルの機能は細胞の種類や文脈に依存しており、恒常性維持や細胞の運命決定において重要な役割を担っている (7)。

我々の研究室は、TGF- β 1 誘導 EMT において Notch シグナルが重要な役割を担うことを報告した (8)。A549 細胞において、TGF- β 1 は Jagged1、Notch2、Notch4 の発現を増加させるとともに、Notch シグナルを活性化させ、Snai1 転写の直接的な活性化を通して EMT を誘導していた (Fig. 3A, 3B)。一方、Notch4 は TGF- β 1 未刺激下では発現レベルが低く、TGF- β 1 誘導 EMT において特異的な役割を担う可能性が示唆された (Fig. 3B)。しかし、TGF- β 1 による Notch シグナル活性化の分子メカニズムは不明のままであった。

3. 活性酸素種 (Reactive Oxygen Species, ROS) と Nrf2 による酸化ストレス応答

ROS は、外因性または内因性の供給源に由来する、反応性の高い化学中間体

である。ROS にて誘発された酸化ストレスは、生体分子に損傷を与え、慢性炎症や腫瘍形成を引き起こし得る (11)。Nrf2 (nuclear factor erythroid-derived 2-related factor 2) は、酸化ストレスに対する細胞防御を担う塩基性ロイシンジッパー型転写因子である。通常環境下において、Nrf2 はユビキチン E3 リガーゼのアダプター分子である Keap1 (kelch-like ECH-associated protein 1) と結合して、細胞質内に存在している (Fig. 4)(12)。この状態の Nrf2 はユビキチン化修飾を受け、プロテアソームにより分解される。酸化ストレス下では、Nrf2 は Keap1 から解除されることで分解を免れ、核内へ移行する (13)。活性化した Nrf2 は、標的遺伝子のプロモーター領域にある抗酸化応答配列 (anti-oxidant responsive element, ARE) へ結合し、それらの転写を誘導する (Fig. 4)。標的遺伝子には抗酸化酵素や解毒代謝酵素などが含まれ、その働きによって細胞の恒常性が維持されている。

4. ROS の細胞内シグナル伝達物質としての役割

前述の酸化ストレス誘発とは別に、近年、シグナル伝達物質としての ROS の役割が注目されている (14, 15)。TGF- β シグナル伝達系においても、TGF- β 1 により産生された ROS がセカンドメッセンジャーとして機能することが報告されている。肺胞上皮細胞 (9) や A549 細胞 (10) を含めた様々な細胞において、TGF- β 1 は NADPH オキシダーゼ 4 (NOX4) の発現増加を介して ROS を産生させる。

TGF- β 1 が誘導する線維芽細胞の筋線維芽細胞への分化や細胞外マトリックス産生の亢進において、ROS は TGF- β シグナルで重要な役割を担う Smad の活性化に必要であった (16, 17)。また TGF- β 1 により誘導される肝細胞のアポトーシスでは、ROS はアポトーシスの調節因子であるカスパーゼ 3 を活性化させていた (18)。しかし、TGF- β 1 誘導 EMT における ROS 産生の有無、シグナル伝達物質としてのその役割、は不明である。

近年、Nrf2 と Notch シグナルのクロストークの重要性が、肝臓の組織再生 (19) や 気道基底細胞の恒常性維持 (20) において報告されている。Nrf2 は *Notch1* プロモーター上の ARE を認識し、*Notch1* の転写制御を通して Notch シグナルの活性を調節していた (19)。TGF- β 1 誘導 EMT で重要な役割を担う Notch 関連分子の中では、*Notch4* においてのみ、プロモーターに ARE となりうる配列が確認される。しかし、TGF- β 1 による Nrf2 の活性化の有無、Nrf2 が *Notch4* の転写と Notch シグナルに及ぼす影響は不明である。

5. 小括

EMT は癌や臓器線維化の進展に寄与する。TGF- β 1 で誘導される EMT では、活性化された Notch シグナルが重要な役割を担うが、Notch シグナル活性化の分子メカニズムはまだ明らかになっていない。

TGF- β 1 により産生された ROS はシグナル伝達物質としても機能しうる。ま

た ROS にて活性化された Nrf2 は、Notch シグナルとのクロストークを通して、重要な細胞機能を担う可能性がある。しかし、TGF- β 1 が誘導する A549 細胞の EMT において、TGF- β 1 による ROS-Nrf2 活性化の有無、これが Notch シグナルや EMT へ及ぼす影響については明らかになっていない。

第1章 図

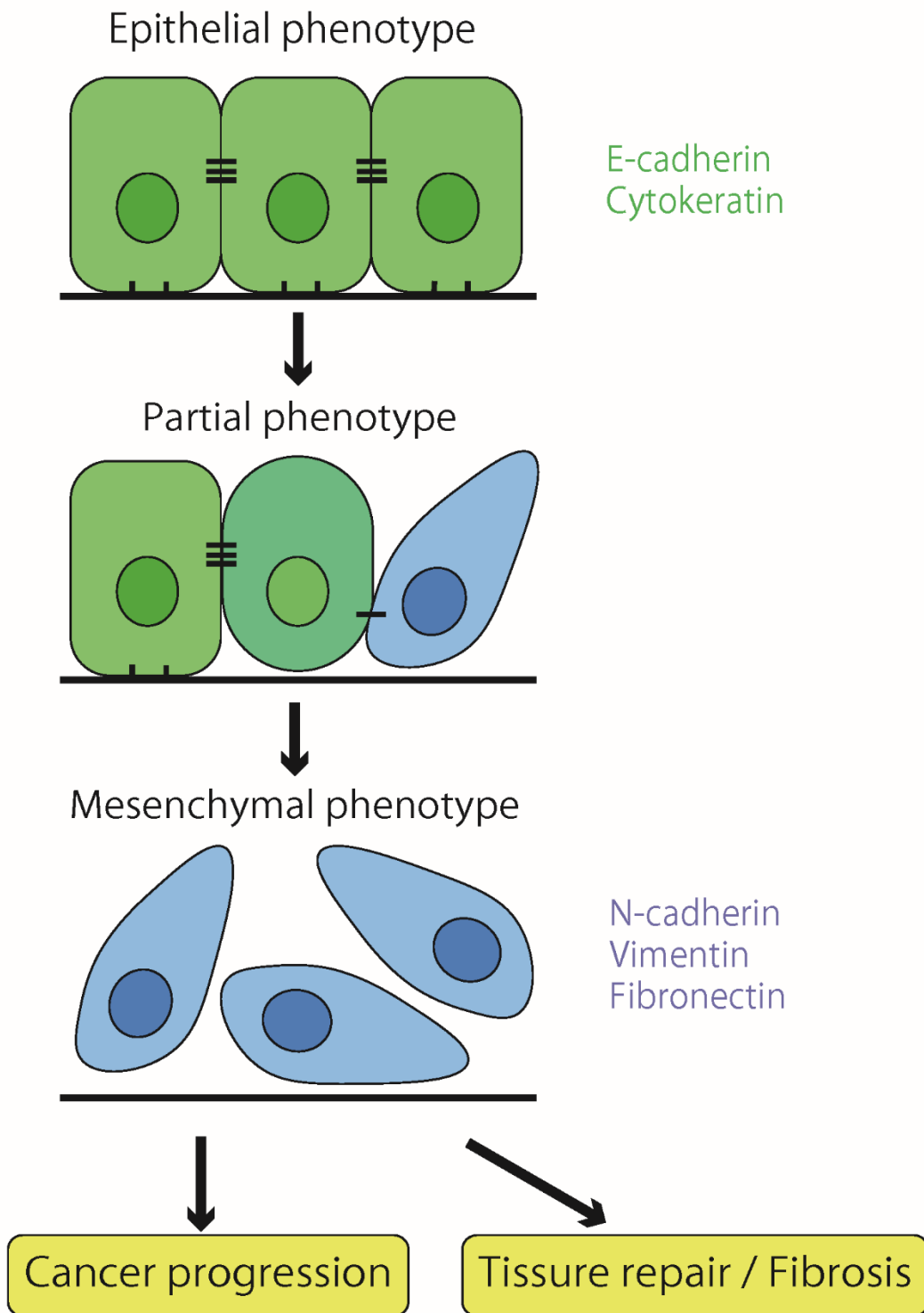


Figure 1. EMT と疾患への関与

EMT は、上皮細胞が細胞極性と細胞間接着を失い、間葉系細胞の表現型を獲得する細胞プロセスである。形態学的には、上皮細胞の敷石状外観から、間葉系細胞を示唆する紡錘形へ変化する。E-cadherin や Cytokeratin などの上皮マーカー遺伝子発現は低下し、N-cadherin、Vimentin などの間葉系マーカー遺伝子発現が上昇する。腫瘍細胞において、EMT は浸潤能、転移能をもたらし、癌の進行に寄与する。また EMT は、創傷治癒、臓器線維症においては、線維芽細胞の重要な起源である。文献 2 より引用、改変。

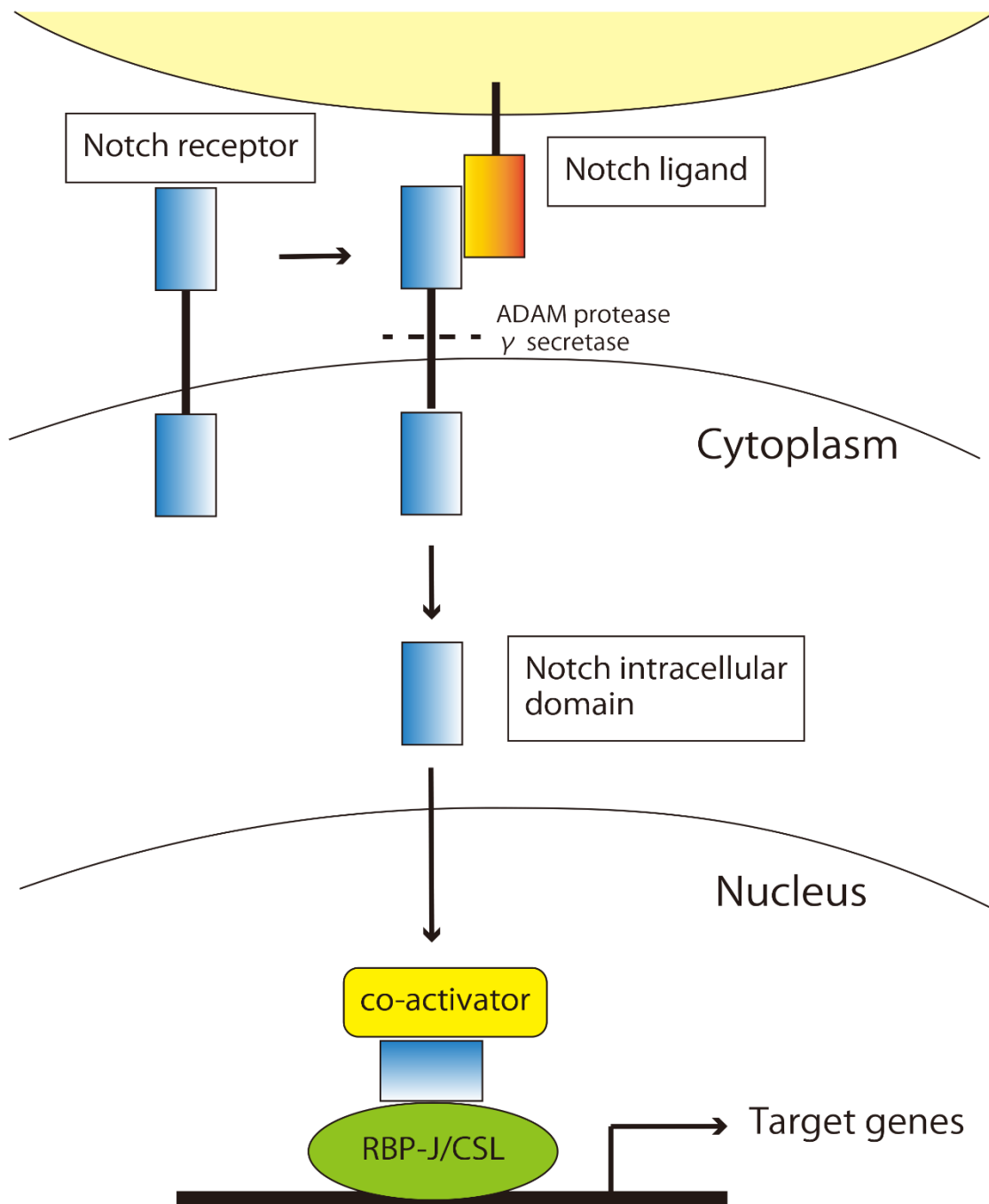


Figure 2. Notch シグナル

隣接する細胞上のリガンドと結合した Notch 受容体は切断され、細胞膜から

Notch 細胞内ドメイン (NICD) が遊離する。NICD は核内へ移行し、転写制御因子 RBP-J/CSL、コアクチベーターと複合体を形成し、標的遺伝子の転写を誘導させる。文献 21 より引用、改変。

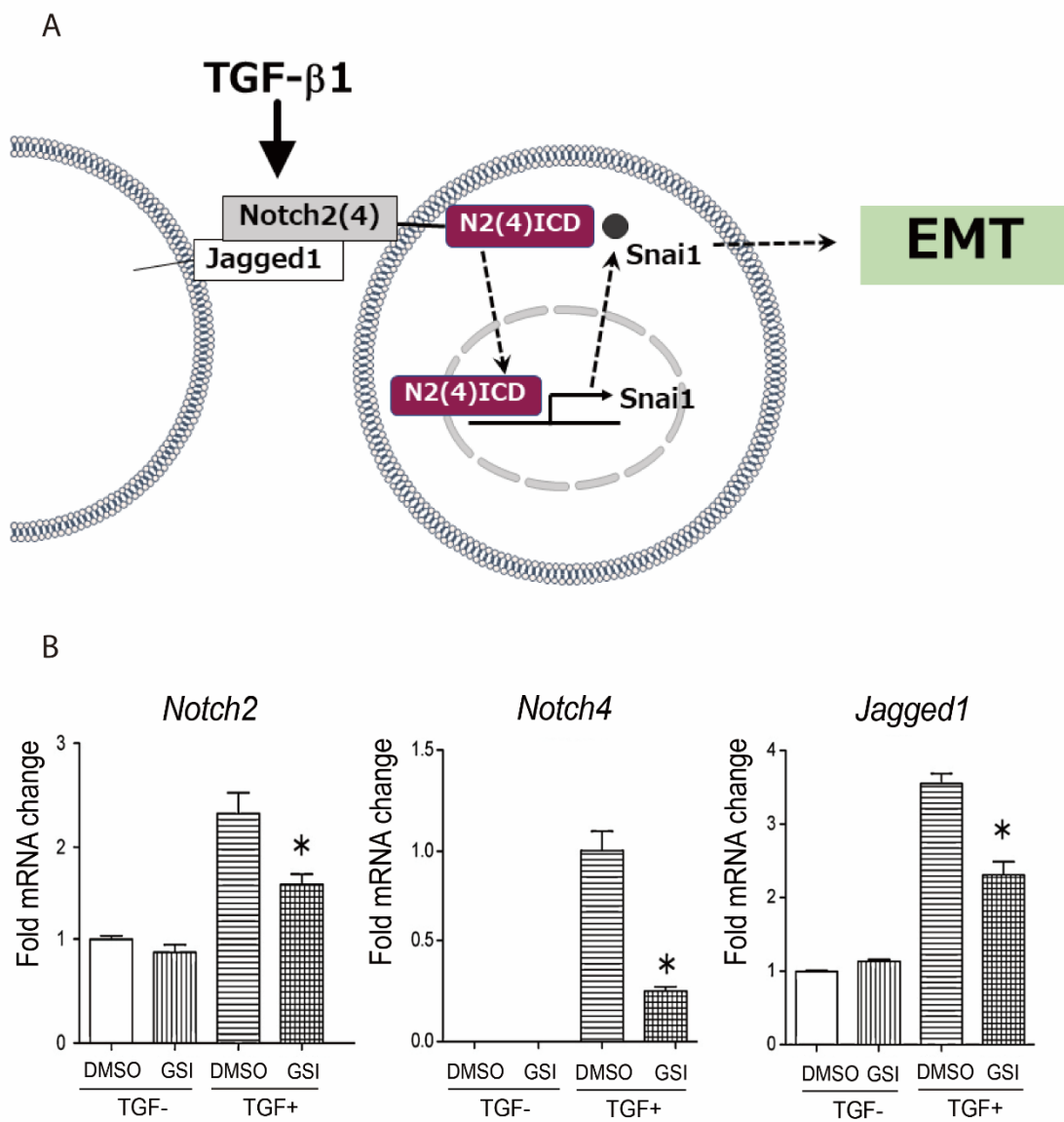


Figure 3. Notch シグナルと TGF-β1 誘導 EMT

(A) TGF-β1 誘導 EMT における Notch シグナルの役割を示した概略図。Notch2、Notch4 は TGF-β1 により活性化され、*Snai1* 転写を活性化し、EMT を誘導する。

(B) リアルタイム RT-PCR にて解析された *Notch2*、*Notch4*、*Jagged1* の mRNA 発現。TGF-β1 刺激にて *Notch2*、*Notch4*、*Jagged1* の発現は上昇し、NICD の切断を

阻害する γ セクレターゼインヒビター (GSI) 処理にていずれの発現も減弱した。

TGF- β 1 未刺激下では *Notch4* mRNA の発現は極めて低いレベルであった。文献

8 より引用、改変。

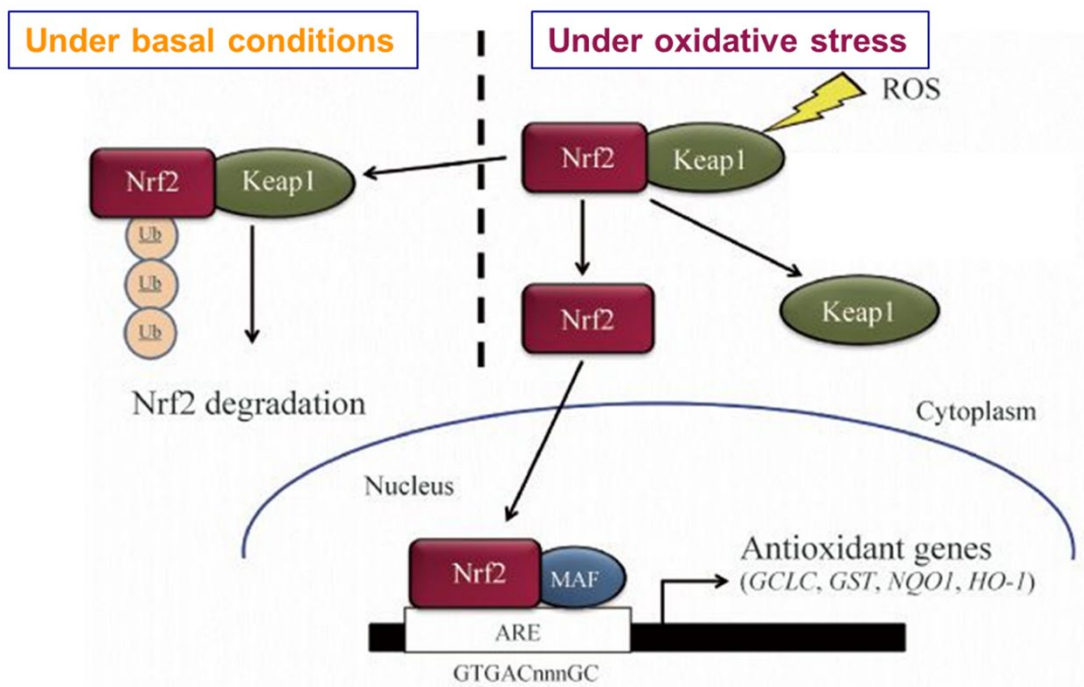


Figure 4. Nrf2-ARE 経路

Nrf2はKeap1と結合して細胞質内に存在しており、ユビキチン化修飾を受け、プロテアソームにより分解される。ROSなどの酸化ストレスはKeap1とNrf2の結合を減弱させ、分解を免れたNrf2が活性化する。活性化したNrf2は核内へ移行し、抗酸化酵素などの標的遺伝子のプロモーター領域にある抗酸化応答配列(ARE)へ結合して転写を誘導する。

第 1 章 参考文献

1. Thiery, J.P., Sleeman, J.P., 2006. Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*
2. Kalluri, R., Weinberg, R.A., 2009. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J. Clin. Invest.*
3. Jayachandran, A., Königshoff, M., Yu, H., Rupniewska, E., Hecker, M., Klepetko, W., Seeger, W., Eickelberg, O., 2009. SNAI transcription factors mediate epithelial-mesenchymal transition in lung fibrosis. *Thorax* 64, 1053–1061.
4. Xu, J., Lamouille, S., Derynck, R., 2009. TGF-beta-induced epithelial to mesenchymal transition. *Cell Res* 19, 156–172.
5. Kasai, H., Allen, J.T., Mason, R.M., Kamimura, T., Zhang, Z., 2005. TGF-beta1 induces human alveolar epithelial to mesenchymal cell transition (EMT). *Respir Res* 6, 56.
6. Kopan, R., Ilagan, M.X.G., 2009. The Canonical Notch Signaling Pathway: Unfolding the Activation Mechanism. *Cell.*
7. Lai, E.C., 2004. Notch signaling: Control of cell communication and cell fate. *Development.*
8. Matsuno, Y., Coelho, A.L., Jarai, G., Westwick, J., Hogaboam, C.M., 2012. Notch

- signaling mediates TGF-beta1-induced epithelial-mesenchymal transition through the induction of Snai1. *Int J Biochem Cell Biol* 44, 776–789.
9. Boudreau, H.E., Casterline, B.W., Burke, D.J., Leto, T.L., 2014. Wild-type and mutant p53 differentially regulate NADPH oxidase 4 in TGF- β -mediated migration of human lung and breast epithelial cells. *Br J Cancer* 110, 2569–2582.
 10. Wang, D., Yan, Z., Bu, L., An, C., Deng, B., Zhang, J., Rao, J., Cheng, L., Zhang, J., Zhang, B., Xie, J., 2019. Protective effect of peptide DR8 on bleomycin-induced pulmonary fibrosis by regulating the TGF- β /MAPK signaling pathway and oxidative stress. *Toxicol Appl Pharmacol* 382, 114703.
 11. Reuter, S., Gupta, S.C., Chaturvedi, M.M., Aggarwal, B.B., 2010. Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked? *Free Radic. Biol. Med.*
 12. Kobayashi, A., Kang, M.I., Okawa, H., Ohtsuji, M., Zenke, Y., Chiba, T., Igarashi, K., Yamamoto, M., 2004. Oxidative stress sensor Keap1 functions as an adaptor for Cul3-based E3 ligase to regulate proteasomal degradation of Nrf2. *Mol Cell Biol* 24, 7130–7139.
 13. Itoh, K., Tong, K.I., Yamamoto, M., 2004. Molecular mechanism activating Nrf2-Keap1 pathway in regulation of adaptive response to electrophiles. *Free Radic Biol Med* 36, 1208–1213.

14. Hamanaka, R.B., Glasauer, A., Hoover, P., Yang, S., Blatt, H., Mullen, A.R., Getsios, S., Gottardi, C.J., DeBerardinis, R.J., Lavker, R.M., Chandel, N.S., 2013. Mitochondrial reactive oxygen species promote epidermal differentiation and hair follicle development. *Sci Signal* 6, ra8.
15. Jain, M., Rivera, S., Monclus, E.A., Synenki, L., Zirk, A., Eisenbart, J., Feghali-Bostwick, C., Mutlu, G.M., Budinger, G.R., Chandel, N.S., 2013. Mitochondrial reactive oxygen species regulate transforming growth factor-beta signaling. *J Biol Chem* 288, 770–777.
16. Hecker, L., Vittal, R., Jones, T., Jagirdar, R., Luckhardt, T.R., Horowitz, J.C., Pennathur, S., Martinez, F.J., Thannickal, V.J., 2009. NADPH oxidase-4 mediates myofibroblast activation and fibrogenic responses to lung injury. *Nat. Med.* 15, 1077–1081.
17. Cucoranu, I., Clempus, R., Dikalova, A., Phelan, P.J., Ariyan, S., Dikalov, S., Sorescu, D., 2005. NAD(P)H oxidase 4 mediates transforming growth factor- β 1-induced differentiation of cardiac fibroblasts into myofibroblasts. *Circ. Res.* 97, 900–907.
18. Carmona-Cuenca, I., Roncero, C., Sancho, P., Caja, L., Fausto, N., Fernández, M., Fabregat, I., 2008. Upregulation of the NADPH oxidase NOX4 by TGF-beta in

- hepatocytes is required for its pro-apoptotic activity. *J. Hepatol.* 49, 965–976.
19. Wakabayashi, N., Shin, S., Slocum, S.L., Agoston, E.S., Wakabayashi, J., Kwak, M.K., Misra, V., Biswal, S., Yamamoto, M., Kensler, T.W., 2010. Regulation of Notch1 signaling by Nrf2: Implications for tissue regeneration. *Sci. Signal.* 3.
 20. Paul, M.K., Bisht, B., Darmawan, D.O., Chiou, R., Ha, V.L., Wallace, W.D., Chon, A.T., Hegab, A.E., Grogan, T., Elashoff, D.A., Alva-Ornelas, J.A., Gomperts, B.N., 2014. Dynamic Changes in Intracellular ROS Levels Regulate Airway Basal Stem Cell Homeostasis through Nrf2-Dependent Notch Signaling. *Cell Stem Cell* 15, 199–214.
 21. Amsen, D., Antov, A., Flavell R.A., 2009. The different faces of Notch in T-helper-cell differentiation. *Nat Rev Immunol* 9, 116–124.

第2章

上皮間葉移行における ROS-Nrf2 経路の役割

1. 目的

本研究は、TGF- β 1 が誘導する A549 細胞の EMT において、ROS-Nrf2 経路の活性化の有無と、これが Notch シグナルや EMT 誘導で担う役割を明らかにすることを目的とする。プロモーターに ARE の候補配列を有する *Notch4* について、Nrf2 による直接的な転写調節の有無を明らかにし、TGF- β 1 による Notch シグナル活性化の分子メカニズムの解明を目指す (Fig. 1)。

2. 方法

細胞培養

American Type Culture Collection (Manassas, VA) よりヒト 2 型肺胞上皮細胞株 A549 を購入し、10% ウシ胎児血清 (FBS) と 1% ペニシリン/ストレプトマイシンを添加した Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) にて維持した。A549 細胞を 12 ウェルプレートに 1 ml/well の培地あたり 4×10^4 cells の濃度で一晩培養し、2 ng/ml の recombinant human TGF- β 1 (R&D systems, Minneapolis, MN) にて 72 時間刺激した。N-アセチルシステイン (NAC) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) 処理では、TGF- β 1 存在下または非存在下で、5 mM の NAC とともに 72 時間培養した。

ROS 産生の測定

細胞内 ROS レベルは 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFDA)-Cellular ROS Assay Kit (Abcam, Cambridge, UK) を用い、添付文書に従い測定した。細胞を 20 mM の DCFDA で 37°C、30 分処理した後、FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA) にて解析した。

Small Interfering RNA (siRNA) 処理

Nrf2 をターゲットとした siRNA とネガティブコントロールは Invitrogen (Carlsbad, CA) より購入した。トランスフェクションのために Lipofectamine RNAiMAX reagent (Invitrogen) を用い、細胞に 20 nM の siRNA を導入し、44 時間培養した。

RNA 抽出とリアルタイム逆転写 PCR (リアルタイム RT-PCR)

Total RNA は TRIzol (Invitrogen) を用いて抽出され、1 μ g の total RNA より cDNA へ変換された。リアルタイム RT-PCR は GeneAmp 7500 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA) を用いて施行された。リアルタイム RT-PCR で使用した全てのプライマーとプローブは、Applied Biosystems より購入した。結果は $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法を用い、GAPDH をリファレンスとした発現量の比で表した。

抗体

Snai1、E-cadherin、N-cadherin に対する一次抗体は Cell Signaling Technology (Danvers, MA) より購入した。抗 Nrf2 抗体、抗 lamin B 抗体、GAPDH 抗体は Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA) より入手した。ホースラディッシュペルオキシダーゼで標識された抗マウス IgG 抗体、抗ウサギ IgG 抗体は Cell Signaling Technology より購入した。クロマチン免疫沈降用の抗 Nrf2 抗体、抗ヒストン H3 抗体は Cell Signaling Technology より購入した。

ウェスタンブロット解析

細胞を PMSF が添加された Cell Lysis Buffer (Cell Signaling Technology) で溶解した。Nrf2 と lamin B においては、Nuclear Extraction Kit (Cayman, Ann Arbor, MI) を用いて抽出された核タンパク質にてタンパク質発現を解析した。タンパク質濃度は Bradford 法にて定量された。SDS サンプルバッファーを細胞溶解物に加え、10 分間煮沸した。全てのタンパク質は、25 mM Tris、192 mM グリシン、0.1% SDS バッファー内の 12% SDS-PAGE で分離された。次に、25 mM Tris、192 mM グリシン、20% メタノールバッファー内のニトロセルロースへタンパク質を転写した。0.1% Tween 中の一次抗体、および TBS 中の 5% ミルクとともにメンブレンを 4°C で一晩インキュベートした。3 回洗浄した後、0.1% Tween TBS で 1 : 2000 に希釈した二次抗体とともにメンブレンを室温で 1

時間インキュベートした。3回洗浄した後、ECL Western blotting reagents (GE Healthcare, Little Chalfont, UK) を用い、タンパク質を視覚化した。各 band の濃度は ImageJ software (National Institutes of Health, USA) を用いて定量化し、対応する GAPDH または lamin B の強度と比較した。

プラスミドと変異導入

A549 細胞から精製したゲノム DNA を使用し、転写開始部位から -2060 – +64 の間に位置する Notch4 プロモーター配列を、5'-ATCTCGAGGTTGCCGTGAGCCCAGGAATTC-3'、5'-ATAAGCTTAGCCACCTCCTCTGCTCCCACTG-3' のプライマーペア(5'および3'末端にそれぞれ XhoI と HindIII 部位を含む) による PCR にて増幅した。プロモーター断片を pGL4.10 luciferase vector (Promega, Madison, WI) の XhoI/HindIII 部位に結合させ、intact ARE (ARE mut-) を含む Notch4 プロモーターのレポーターコンストラクトを生成した。部位特異的変異導入は KOD-Plus-Mutagenesis Kit (TOYOBO, Japan) を用い、添付文書に従って施行された。Notch4 プロモーターのレポーターコンストラクトに含まれる候補 ARE のうち、転写開始部位の上流-1993 から -1985 bp にある ARE では 5'-TGACAGAGC-3'から 5'-AACCAGAGC-3'へ (ARE1 mut+)、また-1872 から-1864 bp にある ARE では 5'-

GCTGGCTCA-3'から 5'-GCTGGCGTA-3'へ (ARE2 mut+), 変異を導入した。コンストラクトの塩基配列は、DNA シークエンシングにて確認した。

ルシフェラーゼアッセイ

A549 細胞を 12 ウェルプレートに 1 ml/well の培地あたり 8×10^4 cells の濃度で 24 時間培養した。候補 ARE 部位に点突然変異のある、または変異のない Notch4 プロモーターのレポーターコンストラクト (ARE1 mut+, ARE2 mut+, または ARE mut-) 0.4 μ g、pGL4.74 (Promega) 0.01 μ g、Lipofectamine LTX reagent (Invitrogen) を 1 ml/well の培地に添加し、トランスフェクションを 8 時間かけて施行した。次に、細胞を TGF- β 1 存在下または非存在下で 24 時間培養し、その後 Dual Luciferase Assay System (Promega) にて firefly と Renilla のルシフェラーゼ活性を測定した。ルシフェラーゼ活性は、トランスフェクションの効率を補正するため、firefly ルシフェラーゼ活性を Renilla ルシフェラーゼ活性で相対化して計算された。

クロマチン免疫沈降 (ChIP) アッセイ

ChIP アッセイは SimpleChIP Plus Sonication ChIP Kit (Cell Signaling Technology) を用い、添付文書に従って施行された。細胞を 1 ml/well の培地あたり 10×10^4 cells の濃度で 24 時間培養し、その後 TGF- β 1 存在下または非存在下で 24 時間

培養した。次に 1% ホルムアルデヒドを用いてタンパク質-DNA 架橋 (クロスリンク) を施行し、kit に付属の lysis buffer で溶解した。クロスリンクされた DNA を超音波処理にて 200–1000 bp の長さに剪断した後、溶解物を希釈した。5 μ g のウサギ抗 Nrf2 抗体、ポジティブコントロールとして抗 Histone H3 抗体、ネガティブコントロールとしてウサギ IgG のいずれかを使用し、等量のクロマチンで免疫沈降を施行した。PCR は 5'-CAGAAAGCAAATTGAGACCC-3'、5'-GCATTTTTGGGCACGAG-3' のプライマーペアを用いて施行し、Notch4 プロモーターの候補 ARE 部位 (-1963 – -1820)を含む DNA を検出した。PCR 産物は 2%アガロースを用いたゲル電気泳動によって分離した。band の濃度を Image J を用いて定量化し、抗 Nrf2 抗体で免疫沈降した DNA の濃度を対応する Input の濃度と比較した。

統計解析

結果は means (\pm SEM) として表記した。データの比較は両側 t 検定、または one-way ANOVA にて施行され、*p* 値が 0.05 未満の場合を統計学的に有意と判断した。

3. 結果

TGF- β 1 は A549 細胞において ROS 産生と Nrf2 活性化を誘導する

TGF- β 1 で処理された A549 細胞における ROS の産生を評価するため、DCFDA

染色にて細胞内 ROS レベルを測定した。2 ng/ml の TGF- β 1 にて 72 時間培養したところ、ROS レベルは有意に増加した (Fig. 2A)。この結果と一致して、肺胞上皮細胞における ROS の主要な供給源である NADPH オキシダーゼ 4 (*NOX4*) (2) の mRNA 発現は、TGF- β 1 処理によって有意に増加した (Fig. 2B)。次に TGF- β 1 処理後の Nrf2 活性化の有無を評価するため、核内の Nrf2 発現レベルをウェスタンブロッティングによって解析した。Nrf2 タンパク質レベルは TGF- β 1 処理により明らかに増加していた (Fig. 2C)。また Nrf2 により誘導される抗酸化酵素ヘムオキシゲナーゼ-1 (*HO-1*) の mRNA 発現は、TGF- β 1 により有意に上昇していた (Fig. 2D)。これらの結果より、A549 細胞において、TGF- β 1 は ROS の産生と Nrf2 の活性化を誘導することが明らかとなった。

NAC は TGF- β 1 で誘導される ROS の産生、Nrf2 と Notch シグナルの活性化、EMT を制御する

EMT における ROS-Nrf2 経路の役割を解明するため、ROS スカベンジャーである NAC 処理の影響を解析した。まず NAC による ROS 産生の低下を確認するため、DCFDA アッセイを施行した。TGF- β 1 刺激下において、NAC 処理細胞では、コントロールと比較し、ROS レベルが有意に低下していた (Fig. 3A)。また TGF- β 1 刺激細胞への NAC 処理は、Nrf2 の核内移行 (Fig. 3B)、および *HO-1* の

転写レベル (Fig. 3C) を減弱させた。これらの結果より、TGF- β 1 による Nrf2 活性化は ROS に依存していることが明らかとなった。

次に、EMT に対する NAC の影響を評価した。形態学的には、過去の報告と同様、TGF- β 1 により、細胞の外観は敷石状から紡錘形に変化した (Fig. 3D) (2)。

NAC は TGF- β 1 未処理細胞の外観を変化させなかったが、TGF- β 1 によって誘導された形態学的変化を減弱させた (Fig. 3D)。さらに、EMT 関連遺伝子の発現を解析した。NAC は、mRNA およびタンパク質レベルで、TGF- β 1 による Snail 発現誘導を有意に減弱させた (Fig. 3E)。それに伴い、NAC は TGF- β 1 によって誘導される N-cadherin の発現を抑制し、E-cadherin の発現を上昇させた (Fig. 3E)。E-cadherin に関しては、NAC は TGF- β 1 未刺激下でもその発現を上昇させた (Fig. 3E)。

Notch シグナル活性化における ROS の役割を解明するため、Notch シグナルの代表的な標的遺伝子である Hey1 の発現、および EMT に関連する Notch 分子の発現に対する NAC 処理の影響を解析した。過去の報告通り、TGF- β 1 は *Hey1*、*Jagged1*、*Notch4* の転写レベルを有意に上昇させたが、NAC はこれらすべての発現を有意に減弱させた (Fig 3F)。以上より、TGF- β 1 によって産生された ROS が、Nrf2 の活性化、Notch 分子の発現誘導と Notch シグナル活性化、そして EMT に必要であることが示唆された。

Nrf2 発現の抑制は、ROS レベルを変化させることなく、TGF- β 1 で誘導される Notch 分子の発現誘導と Notch シグナルの活性化、EMT を抑制する

EMT における Nrf2 活性化の役割を解明するため、siRNA による Nrf2 発現の抑制が EMT に及ぼす影響を検討した。最初に、siRNA による *Nrf2* の抑制を mRNA レベルで確認した (Fig. 4A)。Nrf2 siRNA は、TGF- β 1 による *HO-1* mRNA の発現誘導も抑制しており (Fig. 4A)、Nrf2 の活性化を効率的に抑制したことが示唆された。次に siRNA 処理後の ROS レベルを解析した。Nrf2 siRNA は *HO-1* の発現を低下させたが、TGF- β 1 の有無を問わず、ROS レベルは変化させなかった (Fig. 4B)。続いて Nrf2 の抑制が、EMT と関連した表現型に与える影響を解析した。Nrf2 発現の抑制は、TGF- β 1 で誘導される細胞の形態学的な変化を減弱させ (Fig. 4C)、これと一致して、*Snai1* と N-cadherin の発現を抑制した (Fig. 4D)。一方、Nrf2 siRNA は、TGF- β 1 の有無に関係なく、E-cadherin の発現を上昇させた (Fig. 4D)。次に、Notch シグナル活性化における Nrf2 の役割を検討した。TGF- β 1 で誘導される *Hey1*、*Jagged1*、*Notch4* mRNA の発現は、Nrf2 siRNA により有意に低下していた (Fig. 4E)。これらの結果より、TGF- β 1 による Nrf2 の活性化は、Notch 分子の発現誘導、Notch シグナルの活性化、EMT に必要であることが明らかとなった。

TGF- β 1 は Nrf2/ARE に依存したメカニズムにより Notch4 の転写を活性化する

Notch2、Notch4 を介した Notch シグナルの活性化は、TGF- β 1 誘導 EMT において重要な役割を担う (1)。これらの遺伝子の転写開始部位から 2000 塩基対上流までのプロモーター領域について ARE (TGAC/GnnnGC) となりうる配列を検索したところ、*Notch4* においては転写開始部位の上流-1993 から -1985 塩基対 (ARE1)と、-1872 から -1864 塩基対 (ARE2) の 2 か所に存在が確認された (Fig. 5A)。一方、*Notch2* プロモーターには ARE の存在が確認されなかった。*Notch4* の候補 ARE が実際に機能しているかどうかを検証するためルシフェラーゼアッセイを行った。A549 細胞に、*Notch4* プロモーターのレポーターコンストラクトと Renilla 発現ベクターをトランスフェクションした後、TGF- β 1 処理を行った。ARE 候補の役割を明らかにするため、ARE1 または ARE2 のいずれかに点突然変異を有するレポーターコンストラクト (ARE1 mut+, ARE2 mut+) を調製した (Fig.5A)。ARE 候補に変異のない *Notch4* プロモーター (ARE mut-) の活性は、TGF- β 1 によって有意に上昇した (Fig. 5B)。ARE1 の変異は、TGF- β 1 処理に関係なく、プロモーター活性を変化させなかったが、ARE2 の変異は、TGF- β 1 存在下におけるプロモーター活性を有意に低下させた (Fig. 5B)。これらの結果より、TGF- β 1 による *Notch4* プロモーターの活性化は、ARE2 に依存していることが明らかとなった。次に、TGF- β 1 による Nrf2 の ARE2 への動員の有無を明らかにす

るため ChIP アッセイを行った。精製された DNA を鋳型とし、ARE2 をターゲットにしたプライマーを使用して PCR を施行した (Fig. 6A)。ARE2 を含む DNA フラグメントは、TGF- β 1 未処理細胞より TGF- β 1 処理細胞において、Nrf2 による免疫沈降物の中に濃縮されていた (Fig. 6B)。以上より、Nrf2/ARE2 に依存したプロモーターの活性化が、TGF- β 1 による *Notch4* の転写誘導に必要であることが明らかとなった。

4. 考察

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る。EMT は癌や臓器線維症などの難病の進行に重要な役割を果たしており、その分子メカニズムの解明は、これらの疾患に対する新規の診断・治療戦略を開発する上で急務となっている。Notch シグナルは TGF- β 1 誘導 EMT において重要な役割を担うが (1)、Notch シグナル活性化の分子メカニズムは明らかでなかった。本研究では、ROS-Nrf2 経路と Notch シグナルのクロストークに着目し、TGF- β 1 誘導 EMT におけるその役割を検討した。TGF- β 1 により活性化された ROS-Nrf2 経路は、Notch シグナルの活性化と EMT の誘導に必要であった。また 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た。これらの結果より、ROS-Nrf2 経路が、Notch シグナルとの直接的な相互作用を介して TGF- β 1 誘導 EMT において重要な役割を果たすことが明らかとなった。

TGF- β 1 は NADPH オキシダーゼを誘導することで ROS 産生を増加させ (3)、ある種の細胞では Nrf2 を活性化させる (4)。A549 細胞においては、TGF- β 1 がプロモーターに ARE を有する HO-1 の発現を誘導すること (5)、これが p38 マイトジェン活性化プロテインキナーゼの活性化を介すること (6)、が過去の研究で示されている。p38 は酸化ストレスセンサーとして機能し、ROS による Nrf2 の活性化を仲介する (7)。本研究では、TGF- β 1 により Nrf2 の核内移行が増加し、これが NAC にて抑制された。これらの結果は、A549 細胞において、TGF- β 1 が ROS 依存的に Nrf2 を活性化させることを明示している。

ROS-Nrf2 経路と Notch シグナルの間のクロストークが、様々な細胞プロセスで報告されている。肝臓の再生 (8)、肺癌細胞のアポトーシス (9)、気道基底幹細胞の恒常性維持 (10) では、Nrf2 が誘導する Notch1 発現と Notch シグナルの活性化が重要な役割を担っていた。肝細胞では、活性化した Nrf2 が *Notch1* プロモーターの ARE に結合して転写を活性化させていた (8)。本研究は、TGF- β 1 で誘導される *Notch4* 転写と Notch シグナルの活性化が、ROS-Nrf2 経路に依存することを明らかにした。プロモーター解析を通して、*Notch4* プロモーター上で ARE を新規に特定した。一方、ARE が存在するにも関わらず (8, 10)、TGF- β 1 により Notch1 の発現は誘導されなかった (1)。TGF- β 1 による Notch 分子の発現誘導では、Nrf2/ARE 経路の活性化は必要ではあるものの十分ではないことが示唆され、

その詳細なメカニズムの解明にはさらなる研究が必要と考えられた。

TGF- β 1 と Notch シグナルの間のクロストークについても、すでにいくつかの報告がある (11)。TGF- β 1 シグナルの細胞内トランスデューサーである Smad3 は、Notch1 の細胞内ドメインと直接相互作用して、その標的遺伝子の転写を活性化させた (11)。本研究では、このクロストークの役割は検討していないが、TGF- β 1 存在下で、NAC または Nrf2 siRNA が *Hey1* 転写産物を著しく減少させたことを考慮すると、このクロストークの Notch シグナルの活性化への寄与は比較的限定されたものであると考えられた。

従来、癌の病態において、Nrf2 は酸化ストレスと炎症の制御を通して、発癌に対して抑制的に作用すると考えられてきた (12–14)。しかし近年の報告から、癌細胞における Nrf2 の活性化は、癌の進行、転移 (15, 16)、そして治療抵抗性 (17, 18) を促進させることが明らかになってきている。肺癌の約 30% で、不活性化を起こす *Keap1* 変異または安定化をもたらす *Nrf2* 変異による Nrf2 の恒常的な活性化が認められ、これが予後の悪化と関連していた (19, 20)。EMT は癌細胞に遊走能および浸潤能を付与するため、転移を開始するための重要なプロセスと考えられる。矛盾する結果も存在するが (21, 22)、Nrf2 が EMT を促進させることを示す報告が増えてきている (23–27)。Keap1-Nrf2 経路は、A549 細胞を含む肺癌細胞の運動性を制御していた (24)。また Nrf2 の過剰発現は、EGFR チ

ロシキナーゼ阻害剤に対する耐性を獲得した肺癌細胞において、浸潤能と遊走能を増加させた (25)。さらに近年の研究では、Nrf2 に依存した抗酸化物質によって安定化し、EMT を増強させる転写因子である Bach1 (28, 29) が、肺癌の転移を促進させることが報告された (30, 31)。これらの結果は、Nrf2 が、EMT および癌の転移に促進的に作用することを強く示唆している。したがって、癌細胞特異的に Nrf2 やその下流の経路を不活性化することは、EMT と転移の制御を目指した新規治療戦略となりうると考えられた。

Notch4 は、当初、乳腺のがん原遺伝子として同定された (32)。正常組織では、Notch4 は主に内皮細胞に発現し (33)、血管新生の調節因子として機能する (34)。A549 細胞において定常状態での *Notch4* の転写は、予想通り低いレベルであった。一方、Notch4 の異常発現と EMT や転移との間の関連が、様々な癌で報告されている (35–38)。Notch4 は、細胞の種類や文脈ごとにその機能を明らかにする必要はあるものの、その発現が限定していることから、同定し標的とする上で有用な分子となりうると考えられた。

E-cadherin は、細胞間の接着結合を形成し、上皮組織の機能維持において重要な役割を担う。E-cadherin の喪失は、細胞に浸潤能・遊走能を与えることから (39)、EMT における主要な特徴と考えられている (40)。本研究では、E-cadherin の発現が TGF- β 1 処理に関わらず NAC または Nrf2 siRNA 処理にて上昇しており、

ROS-Nrf2 経路が E-cadherin の発現を抑制することが示唆された。これを支持するものとして、*E-cadherin* プロモーターに、転写活性を低下させる ARE が存在することが示されている (4)。以上の結果から、Nrf2 は ARE 依存性と非依存性の両方のメカニズムを介して、*E-cadherin* の転写を抑制することが示唆された。

結論として、ROS-Nrf2 経路は TGF- β 1 により活性化され、Notch シグナル活性化と EMT のいずれにも必要であった (Fig. 7)。TGF- β 1 による *Notch4* 転写の活性化は、ARE を介して、Nrf2 によって直接制御されていた (Fig. 7)。本研究は A549 細胞のみを対象としていることから、今後他の細胞などを用いさらなる解析が必要であるが、ROS-Nrf2 経路は、癌や臓器線維化の進行を抑えるための、新規の治療標的となりうると考えられた。

第 2 章 図

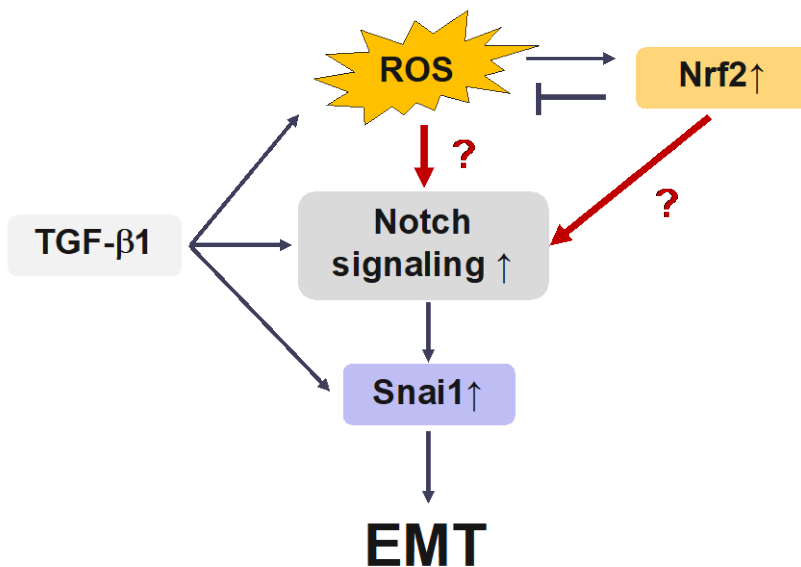
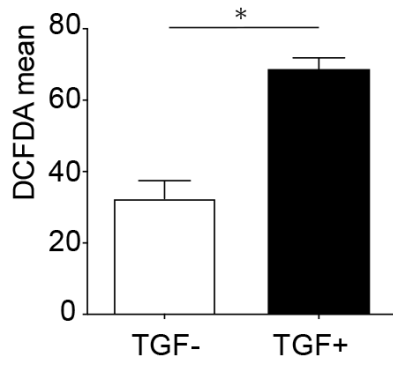


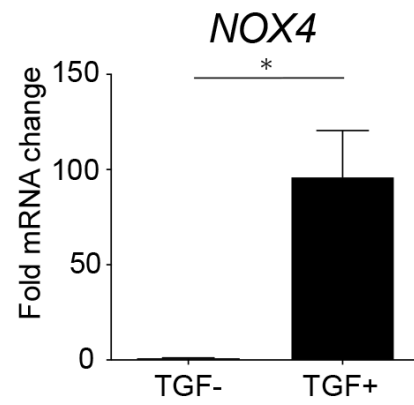
Figure 1. TGF- β 1 で誘導される EMT において ROS-Nrf2 経路が担う役割の仮説

シグナル伝達物質としての ROS に着目し、ROS とこれによる Nrf2 の活性化が、Notch シグナルへの作用を介して EMT の進行に影響を及ぼすとの仮説を立てた。

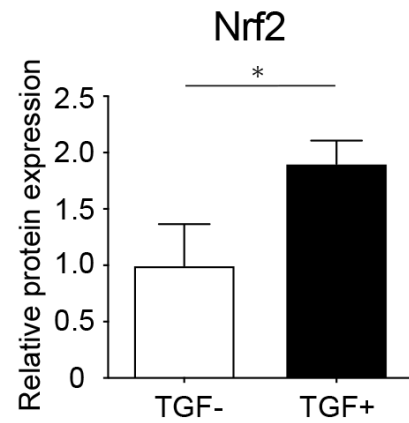
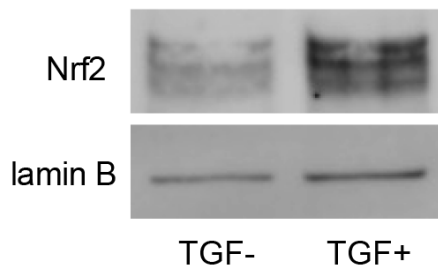
A



B



C



D

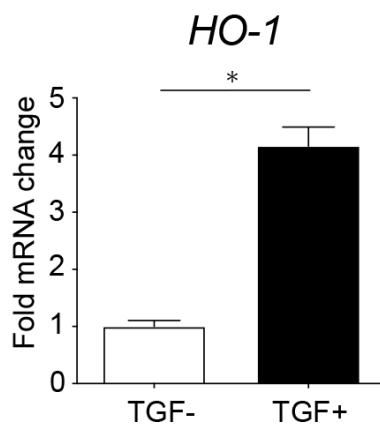
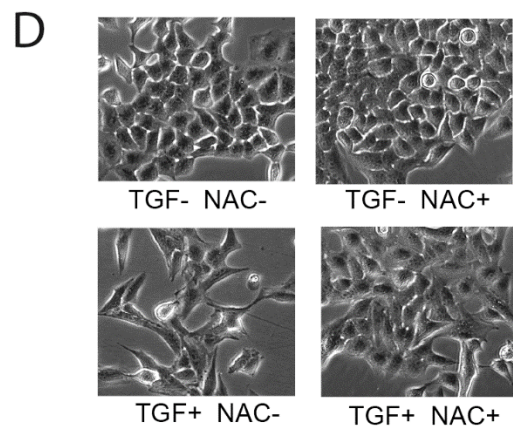
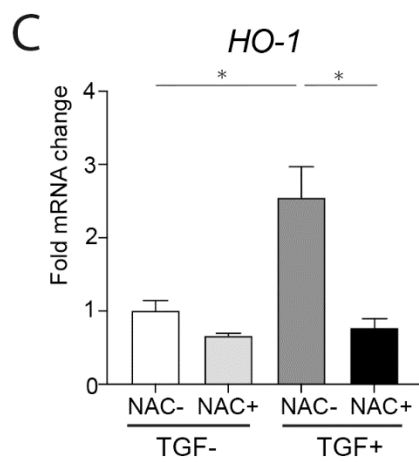
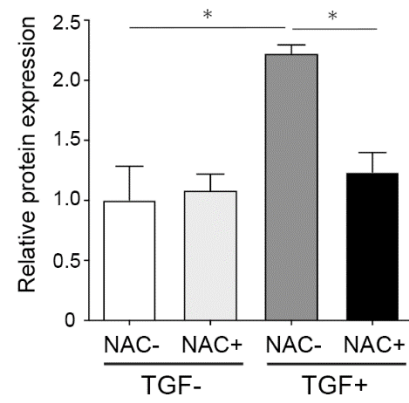
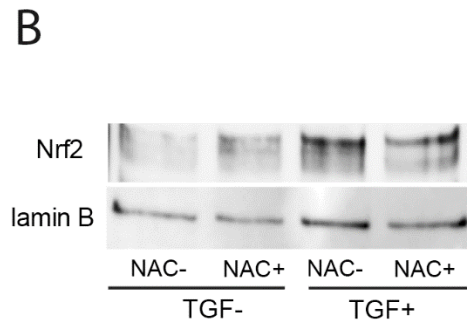
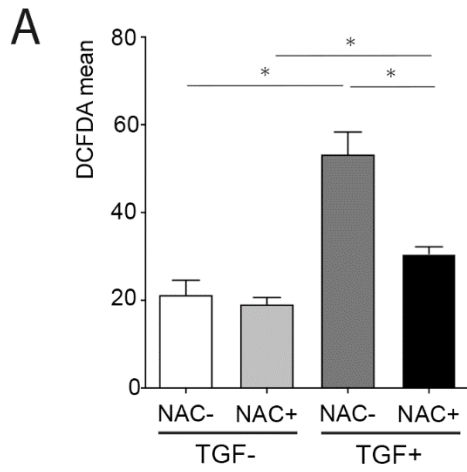


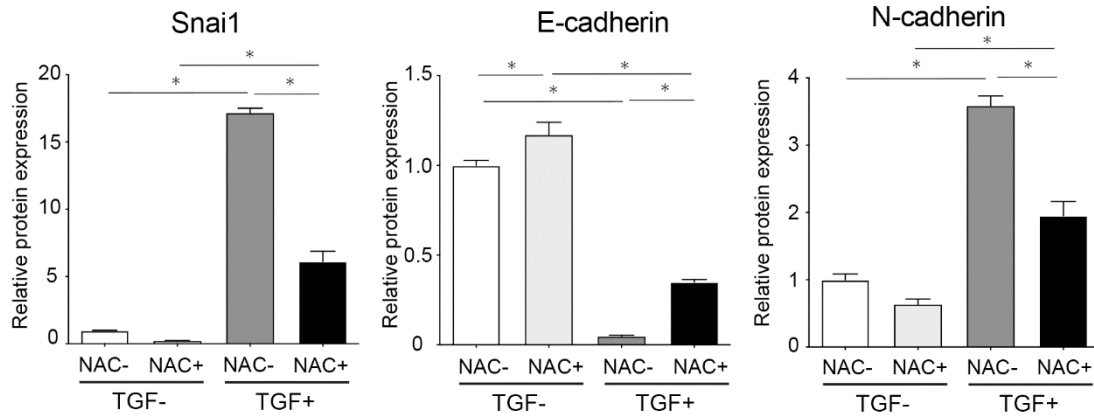
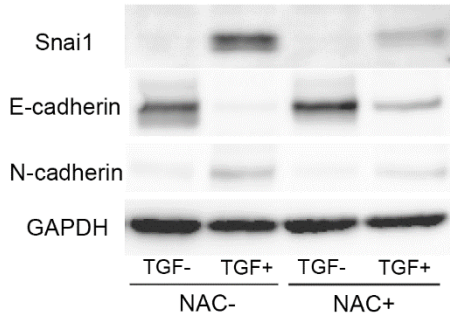
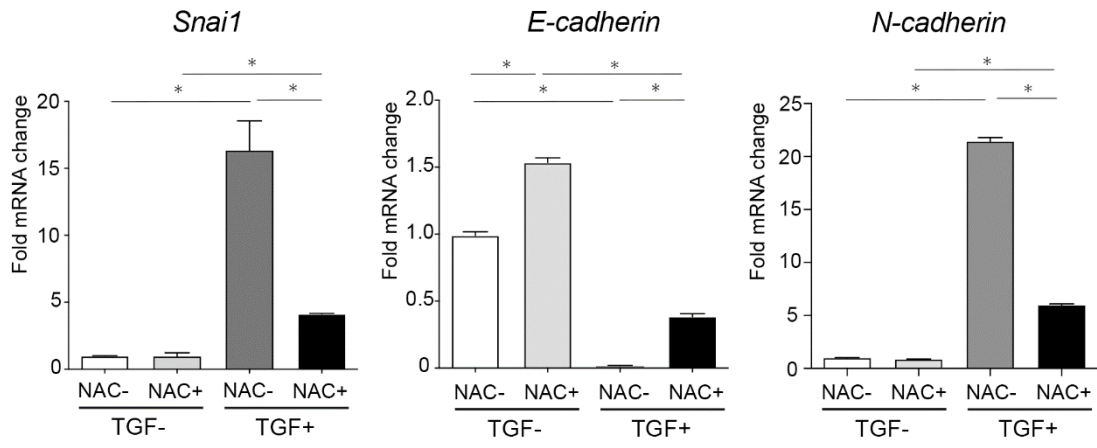
Figure 2. A549 細胞において TGF-β1 は ROS 産生と Nrf2 活性化を誘導する

A549 細胞を TGF-β1 (2 ng/ml) 存在下または非存在下で 72 時間培養した。

(A) DCFDA により測定された細胞内 ROS レベル。(B) リアルタイム RT-PCR によって解析された NADPH オキシダーゼ 4 (NOX4) mRNA 発現。(C) ウェスタンブロッティングによる Nrf2 の核内発現 (左) と濃度測定によるバンドの相対強度 (右)。細胞を TGF-β1 存在下または非存在下で 30 分培養した後、核タンパク質を抽出した。ローディングコントロールとして lamin B を使用した。(D) リアルタイム RT-PCR によって解析されたヘムオキシゲナーゼ-1 (HO-1) の mRNA 発現。(B)、および (D) では、内在性コントロールとして GAPDH を使用した。データは 3 つの独立した実験の代表値であり、mean ± SEM (n = 3) として示した。* $p < 0.05$ 。



E



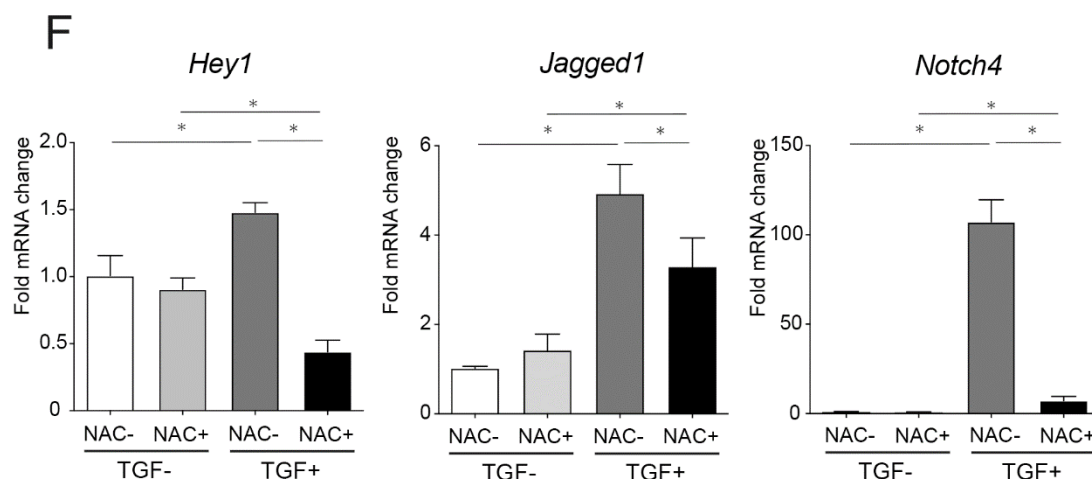
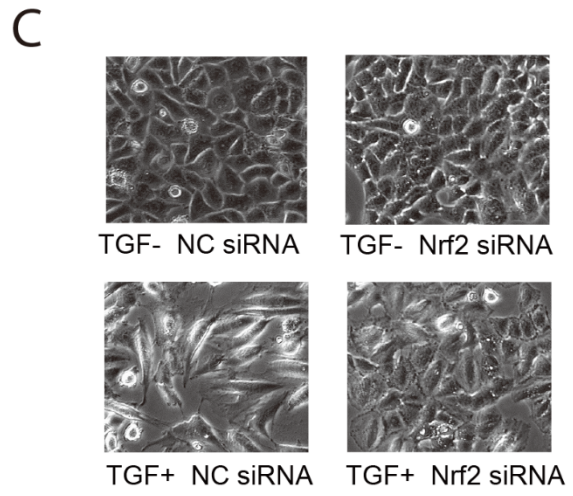
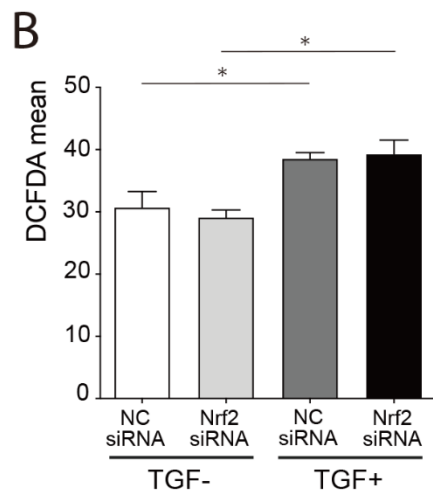
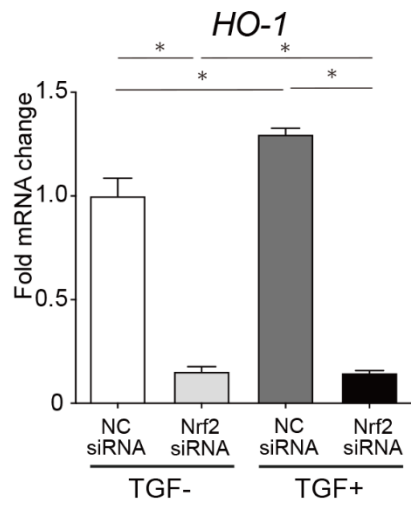
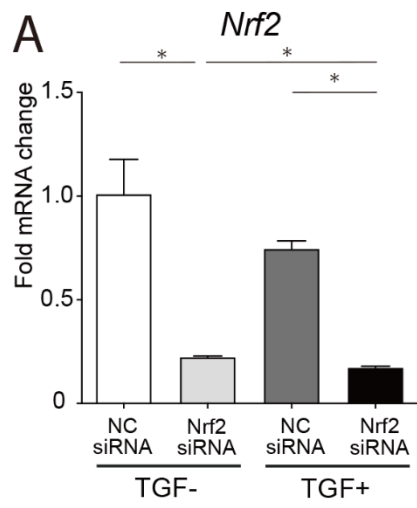


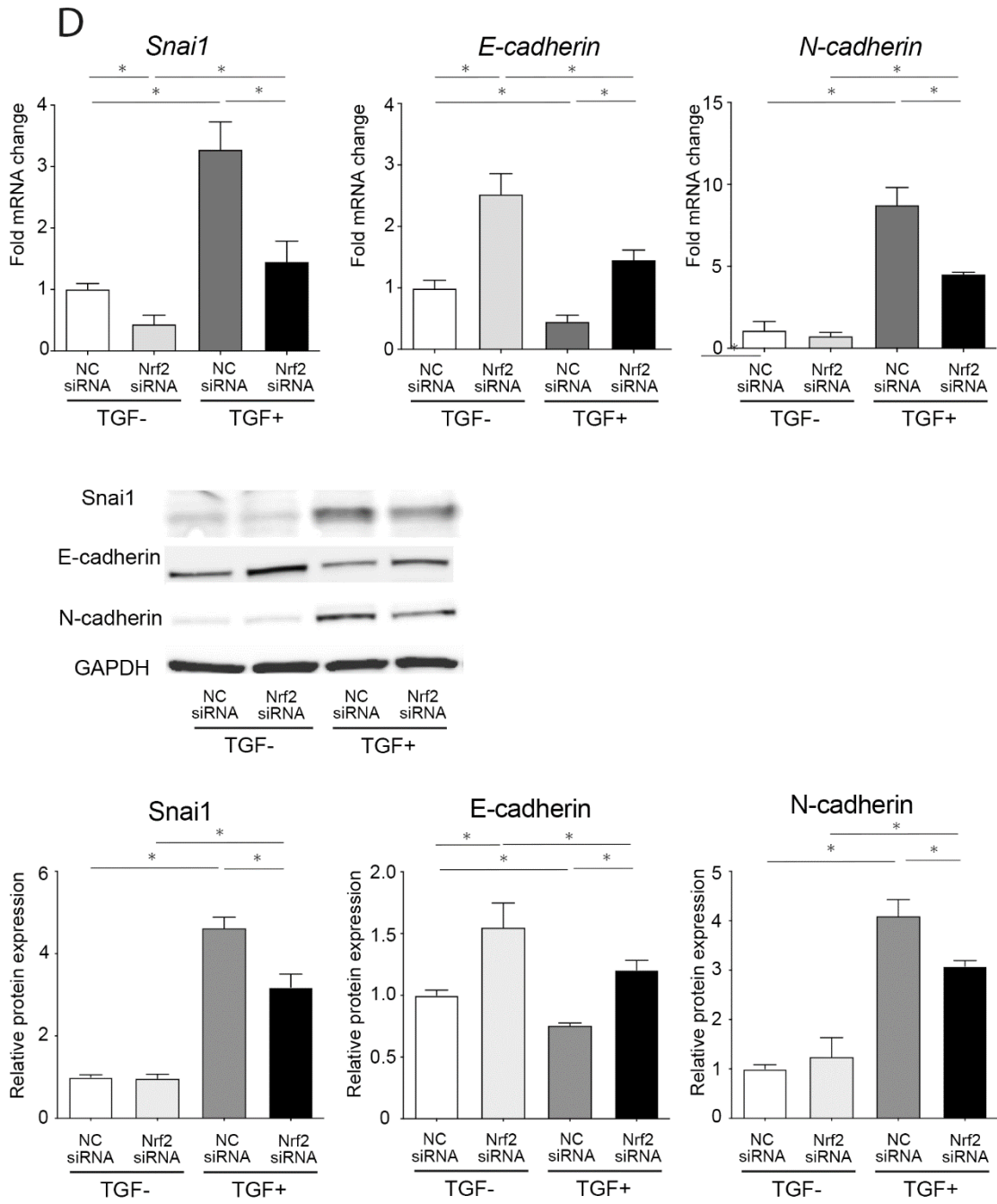
Figure 3. NAC は、TGF- β 1 で誘導される Notch シグナルの活性化と EMT を抑制する

A549 細胞を、TGF- β 1 (2 ng/ml) 存在下または非存在下で、NAC (5 mM) とともに培養した。(A) DCFDA にて測定された、72 時間の培養後の細胞内 ROS レベル。(B) ウェスタンブロッティングにて評価された、30 分間の培養後の Nrf2 の核内発現。ローディングコントロールとして lamin B を用いた。(C) リアルタイム RT-PCR により解析された、72 時間の培養後の *HO-1* の mRNA 発現。(D) TGF- β 1 非存在下 (上) または存在下 (下) で、溶媒 (左) または NAC (5 mM) (右) とともに 72 時間培養した細胞の形態学的解析。位相差顕微鏡を用い、100 倍の倍率にて観察した。(E) リアルタイム RT-PCR およびウェスタンブロッティングで解析された、72 時間の培養後の Snai1、E-cadherin、N-cadherin の mRNA (上) およびタンパク質 (中、下) の発現。(F) リアルタイム RT-PCR によって解析され

た、72 時間の培養後の *Jag1*、*Notch4* および *Hey1* の mRNA 発現。(C)、(E)、(F) では、内在性またはローディングコントロールとして GAPDH を使用した。データは 3 つの独立した実験の代表値であり、mean \pm SEM (n=3) として示した。

* $p < 0.05$ 。





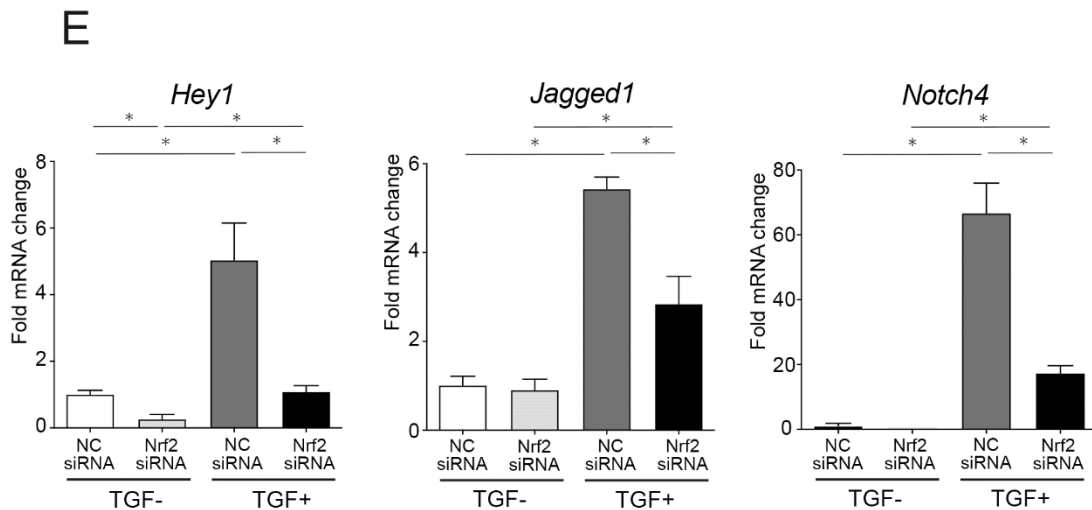


Figure 4. Nrf2 発現の抑制は、TGF- β 1 で誘導される Notch シグナル活性化と EMT を減弱させる

A549 細胞に対し、Nrf2 に対する small interfering RNA (siRNA) またはコントロール siRNA を用い、44 時間かけて一過性のトランスフェクションを行った。続いて TGF- β 1 (2 ng/ml) 存在下または非存在下で 72 時間細胞を培養した。(A) リアルタイム RT-PCR にて解析された *Nrf2* (左) と *HO-1* (右) の mRNA 発現。(B) DCFDA を用いて測定された細胞内 ROS レベル。(C) コントロール siRNA (左) または Nrf2 siRNA (右) のトランスフェクション後、TGF- β 1 非存在下 (上) または存在下 (下) で培養された細胞の形態学的解析。位相差顕微鏡を用い、100 倍の倍率で観察された。(D) リアルタイム RT-PCR およびウェスタンブロッティングで解析された、*Snai1*、E-cadherin、N-cadherin の mRNA (上) およびタンパク質 (中、下) の発現。(E) リアルタイム RT-PCR によって解析された、*Jag1*、

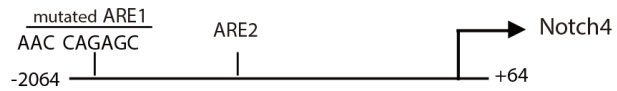
Notch4、*Hey1* の mRNA 発現。(A)、(D)、(E) では、内在性またはローディングコントロールとして GAPDH を使用した。データは 3 つの独立した実験の代表値であり、mean \pm SEM (n = 3) として示した。* $p < 0.05$ 。

A

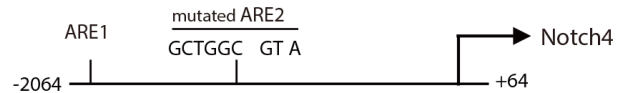
Notch4 promoter containing intact AREs (ARE mut-)



Notch4 promoter containing point mutations in ARE1 (ARE1 mut+)



Notch4 promoter containing point mutations in ARE2 (ARE2 mut+)



B

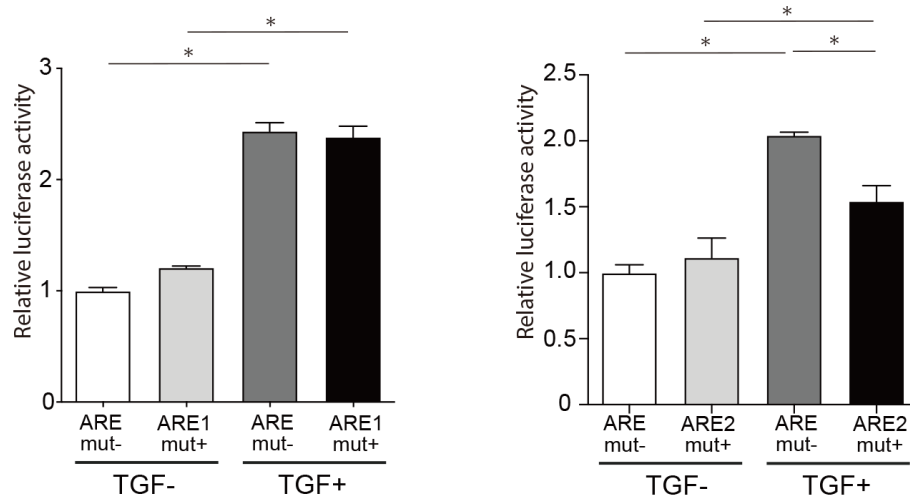


Figure 5. TGF- β 1 は、ARE に依存したメカニズムを介して Notch4 の転写を活性化させる

(A) *Notch4* プロモーターのコンストラクトの概略図。ARE に変異のないもの (ARE mut-、上)、*Notch4* の転写開始部位の上流-1993 から -1985 bp に位置する ARE に変異を有するもの (ARE1 mut+、中央)、または-1872 から -1864 bp

に位置する ARE に変異を有するもの(ARE2 mut+, 下)。(B) ARE mut-, ARE1 mut+, ARE2 mut+のいずれかと pGL4.74 を 8 時間かけてトランスフェクションした後、TGF- β 1 存在下または非存在下で 24 時間培った細胞のルシフェラーゼアッセイ。結果は ARE mut-がトランスフェクションされ、TGF- β 1 非存在下で培養された細胞を基準とし、Renilla ルシフェラーゼ活性で補正されている。データは 3 つの独立した実験の代表値であり、mean \pm SEM (n = 3) として示した。* $p < 0.05$ 。

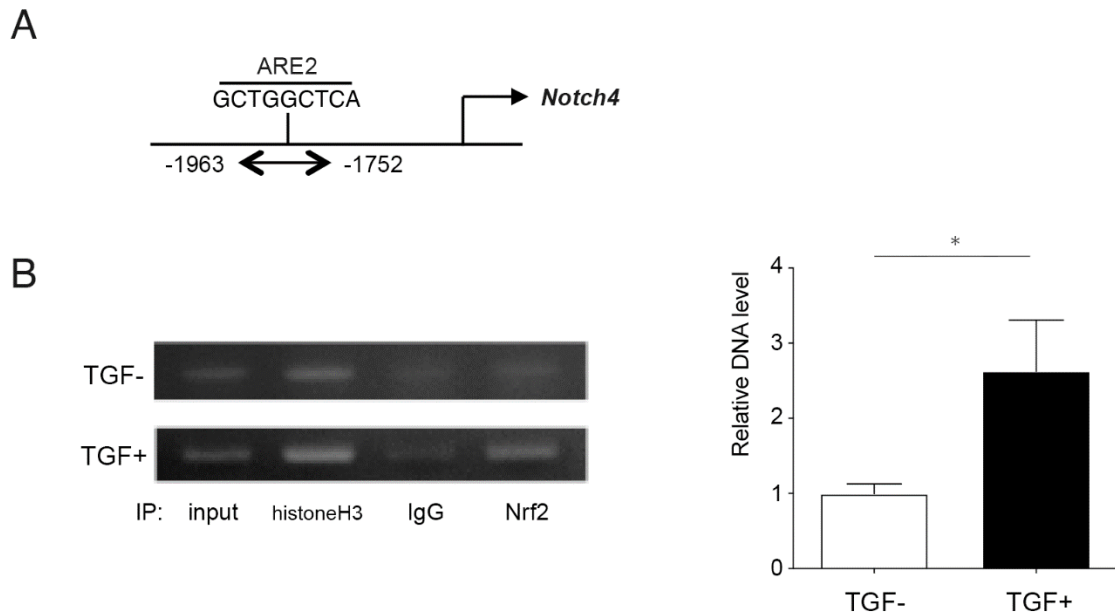


Figure 6. TGF- β 1 は、*Notch4* プロモーター上の ARE への Nrf2 の結合を増強させる

(A) *Notch4* の転写開始部位の上流-1872 から -1864 bp に位置する ARE の候補 (ARE2)、および ChIP アッセイで増幅された DNA 配列 (-1963 – -1752 bp) を示す概略図。(B) TGF- β 1 存在下または非存在下で 24 時間培養後の細胞の ChIP 解析。抗ヒストン H3 抗体 (Histone)、抗 Nrf2 抗体 (Nrf2)、および正常 IgG (IgG) を使用し、タンパク質-DNA 複合体を免疫沈降させた。抽出された DNA を鋳型とし、ARE2 をまたぐプライマーを用い、PCR により DNA 断片を検出した。データは 3 つの独立した実験の代表値であり、mean \pm SEM (n=3) として示した。

* $p < 0.05$ 。

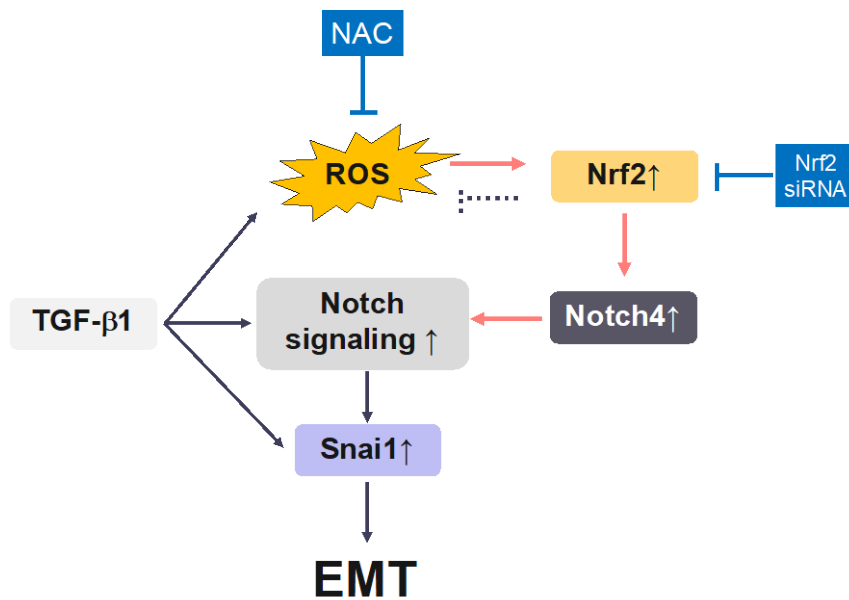


Figure 7. ROS-Nrf2-Notch 経路による TGF-β1 誘導 EMT の制御を示した概略図

TGF-β1 によって活性化された ROS-Nrf2 経路は、直接的な転写活性化により Notch4 の発現を誘導し、Notch シグナリングの活性化を通して EMT に寄与する。

第 2 章 参考文献

1. Matsuno, Y., Coelho, A.L., Jarai, G., Westwick, J., Hogaboam, C.M., 2012. Notch signaling mediates TGF-beta1-induced epithelial-mesenchymal transition through the induction of Snai1. *Int J Biochem Cell Biol* 44, 776–789.
2. Carnesecchi, S., Deffert, C., Donati, Y., Basset, O., Hinz, B., Preynat-Seauve, O., Guichard, C., Arbiser, J.L., Banfi, B., Pache, J.C., Barazzone-Argiroffo, C., Krause, K.H., 2011. A key role for NOX4 in epithelial cell death during development of lung fibrosis. *Antioxidants Redox Signal.* 15, 607–619.
3. Liu, R.M., Desai, L.P., 2015. Reciprocal regulation of TGF- β and reactive oxygen species: A perverse cycle for fibrosis. *Redox Biol.*
4. Arfmann-Knubel, S., Struck, B., Genrich, G., Helm, O., Sipos, B., Sebens, S., Schafer, H., 2015. The Crosstalk between Nrf2 and TGF- β 1 in the Epithelial-Mesenchymal Transition of Pancreatic Duct Epithelial Cells. *PLoS One* 10.
5. Martin, D., Rojo, A.I., Salinas, M., Diaz, R., Gallardo, G., Alam, J., Ruiz De Galarreta, C.M., Cuadrado, A., 2004. Regulation of Heme Oxygenase-1 Expression through the Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt Pathway and the Nrf2 Transcription Factor in Response to the Antioxidant Phytochemical Carnosol. *J. Biol. Chem.* 279, 8919–8929.
6. Ning, W., Song, R., Li, C., Park, E., Mohsenin, A., Choi, A.M., Choi, M.E., 2002.

- TGF-beta1 stimulates HO-1 via the p38 mitogen-activated protein kinase in A549 pulmonary epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 283, L1094-102.
7. Tormos, A.M., Taléns-Visconti, R., Nebreda, A.R., Sastre, J., 2013. P38 MAPK: A dual role in hepatocyte proliferation through reactive oxygen species. *Free Radic. Res.*
 8. Wakabayashi, N., Shin, S., Slocum, S.L., Agoston, E.S., Wakabayashi, J., Kwak, M.K., Misra, V., Biswal, S., Yamamoto, M., Kensler, T.W., 2010. Regulation of Notch1 signaling by Nrf2: Implications for tissue regeneration. *Sci. Signal.* 3.
 9. Zhao, Q., Mao, A., Yan, J., Sun, C., Di, C., Zhou, X., Li, H., Guo, R., Zhang, H., 2016. Downregulation of Nrf2 promotes radiation-induced apoptosis through Nrf2 mediated Notch signaling in non-small cell lung cancer cells. *Int. J. Oncol.* 48, 765–773.
 10. Paul, M.K., Bisht, B., Darmawan, D.O., Chiou, R., Ha, V.L., Wallace, W.D., Chon, A.T., Hegab, A.E., Grogan, T., Elashoff, D.A., Alva-Ornelas, J.A., Gomperts, B.N., 2014. Dynamic Changes in Intracellular ROS Levels Regulate Airway Basal Stem Cell Homeostasis through Nrf2-Dependent Notch Signaling. *Cell Stem Cell* 15, 199–214.
 11. Blokzijl, A., Dahlgvist, C., Reissmann, E., Falk, A., Moliner, A., Lendahl, U., Ibáñez, C.F., 2003. Cross-talk between the Notch and TGF- β signaling pathways mediated by

- interaction of the Notch intracellular domain with Smad3. *J. Cell Biol.* 163, 723–728.
12. Frohlich, D.A., McCabe, M.T., Arnold, R.S., Day, M.L., 2008. The role of Nrf2 in increased reactive oxygen species and DNA damage in prostate tumorigenesis. *Oncogene* 27, 4353–4362.
13. Iskander, K., Paquet, M., Brayton, C., Jaiswal, A.K., 2004. Deficiency of NRH:Quinone oxidoreductase 2 increases susceptibility to 7,12-dimethylbenz(a)anthracene and benzo(a)pyrene-induced skin carcinogenesis. *Cancer Res.* 64, 5925–5928.
14. Long, D.J., Waikel, R.L., Wang, X.J., Roop, D.R., Jaiswal, A.K., 2001. NAD(P)H:Quinone oxidoreductase 1 deficiency and increased susceptibility to 7,12-dimethylbenz[a]-anthracene-induced carcinogenesis in mouse skin. *J. Natl. Cancer Inst.* 93, 1166–1170.
15. Satoh, H., Moriguchi, T., Takai, J., Ebina, M., Yamamoto, M., 2013. Nrf2 prevents initiation but accelerates progression through the kras signaling pathway during lung carcinogenesis. *Cancer Res.* 73, 4158–4168.
16. Wang, H., Liu, X., Long, M., Huang, Y., Zhang, L., Zhang, R., Zheng, Y., Liao, X., Wang, Y., Liao, Q., Li, W., Tang, Z., Tong, Q., Wang, X., Fang, F., De La Vega, M.R., Ouyang, Q., Zhang, D.D., Yu, S., Zheng, H., 2016. NRF2 activation by antioxidant

antidiabetic agents accelerates tumor metastasis. *Sci. Transl. Med.*

17. Ohta, T., Iijima, K., Miyamoto, M., Nakahara, I., Tanaka, H., Ohtsuji, M., Suzuki, T., Kobayashi, A., Yokota, J., Sakiyama, T., Shibata, T., Yamamoto, M., Hirohashi, S., 2008. Loss of Keap1 function activates Nrf2 and provides advantages for lung cancer cell growth. *Cancer Res.* 68, 1303–1309.
18. Wang, Q., Ma, J., Lu, Y., Zhang, S., Huang, J., Chen, J., Bei, J.X., Yang, K., Wu, G., Huang, K., Chen, J., Xu, S., 2017. CDK20 interacts with KEAP1 to activate NRF2 and promotes radiochemoresistance in lung cancer cells. *Oncogene* 36, 5321–5330.
19. Collisson, E.A., Campbell, J.D., Brooks, A.N., Berger, A.H., Lee, W., Chmielecki, J., Beer, D.G., Cope, L., Creighton, C.J., Danilova, L., Ding, L., Getz, G., Hammerman, P.S., Hayes, D.N., Hernandez, B., Herman, J.G., Heymach, J. V., Jurisica, I., Kucherlapati, R., Kwiatkowski, D., Ladanyi, M., Robertson, G., Schultz, N., Shen, R., Sinha, R., Sougnez, C., Tsao, M.S., Travis, W.D., Weinstein, J.N., Wigle, D.A., Wilkerson, M.D., Chu, A., Cherniack, A.D., Hadjipanayis, A., Rosenberg, M., Weisenberger, D.J., Laird, P.W., Radenbaugh, A., Ma, S., Stuart, J.M., Byers, L.A., Baylin, S.B., Govindan, R., Meyerson, M., Gabriel, S.B., Cibulskis, K., Kim, J., Stewart, C., Lichtenstein, L., Lander, E.S., Lawrence, M.S., Getz, E., Fulton, R., Fulton, L.L., McLellan, M.D., Wilson, R.K., Ye, K., Fronick, C.C., Maher, C.A.,

Miller, C.A., Wendl, M.C., Cabanski, C., Mardis, E., Wheeler, D., Balasundaram, M., Butterfield, Y.S.N., Carlsen, R., Chuah, E., Dhalla, N., Guin, R., Hirst, C., Lee, D., Li, H.I., Mayo, M., Moore, R.A., Mungall, A.J., Schein, J.E., Sipahimalani, P., Tam, A., Varhol, R., Robertson, A.G., Wye, N., Thiessen, N., Holt, R.A., Jones, S.J.M., Marra, M.A., Imielinski, M., Onofrio, R.C., Hodis, E., Zack, T., Helman, E., Pedamallu, C.S., Mesirov, J., Saksena, G., Schumacher, S.E., Carter, S.L., Garraway, L., Beroukhim, R., Lee, S., Mahadeshwar, H.S., Pantazi, A., Protopopov, A., Ren, X., Seth, S., Song, X., Tang, J., Yang, Lixing, Zhang, J., Chen, P.C., Parfenov, M., Xu, A.W., Santoso, N., Chin, L., Park, P.J., Hoadley, K.A., Auman, J.T., Meng, S., Shi, Y., Buda, E., Waring, S., Veluvolu, U., Tan, D., Mieczkowski, P.A., Jones, C.D., Simons, J. V., Soloway, M.G., Bodenheimer, T., Jefferys, S.R., Roach, J., Hoyle, A.P., Wu, J., Balu, S., Singh, D., Prins, J.F., Marron, J.S., Parker, J.S., Perou, C.M., Liu, J., Maglinte, D.T., Lai, P.H., Bootwalla, M.S., Van Den Berg, D.J., Triche, T., Cho, J., DiCara, D., Heiman, D., Lin, P., Mallard, W., Voet, D., Zhang, H., Zou, L., Noble, M.S., Gehlenborg, N., Thorvaldsdottir, H., Nazaire, M.D., Robinson, J., Aksoy, B.A., Ciriello, G., Taylor, B.S., Dresdner, G., Gao, J., Gross, B., Seshan, V.E., Reva, B., Sumer, S.O., Weinhold, N., Sander, C., Ng, S., Zhu, J., Benz, C.C., Yau, C., Haussler, D., Spellman, P.T., Kimes, P.K., Broom, B.M., Wang, J., Lu, Y., Ng, P.K.S., Diao, L., Liu, W., Amos, C.I.,

Akbani, R., Mills, G.B., Curley, E., Paulauskis, J., Lau, K., Morris, S., Shelton, T., Mallery, D., Gardner, J., Penny, R., Saller, C., Tarvin, K., Richards, W.G., Cerfolio, R., Bryant, A., Raymond, D.P., Pennell, N.A., Farver, C., Czerwinski, C., Huelsenbeck-Dill, L., Iacocca, M., Petrelli, N., Rabeno, B., Brown, J., Bauer, T., Dolzhanskiy, C.O., Potapova, O., Rotin, D., Voronina, O., Nemirovich-Danchenko, E., Fedosenko, K. V., Gal, A., Behera, M., Ramalingam, S.S., Sica, G., Flieder, D., Boyd, J., Weaver, J.E., Kohl, B., Thinh, D.H.Q., Sandusky, G., Juhl, H., Duhig, E., Illei, P., Gabrielson, E., Shin, J., Lee, B., Rogers, K., Trusty, D., Brock, M. V., Williamson, C., Burks, E., Rieger-Christ, K., Holway, A., Sullivan, T., Asiedu, M.K., Kosari, F., Rekhman, N., Zakowski, M., Rusch, V.W., Zippile, P., Suh, J., Pass, H., Goparaju, C., Owusu-Sarpong, Y., Bartlett, J.M.S., Kodeeswaran, S., Parfitt, J., Sekhon, H., Albert, M., Eckman, J., Myers, J.B., Morrison, C., Gaudio, C., Borgia, J.A., Bonomi, P., Pool, M., Liptay, M.J., Moiseenko, F., Zaytseva, I., Dienemann, H., Meister, M., Schnabel, P.A., Muley, T.R., Peifer, M., Gomez-Fernandez, C., Herbert, L., Egea, S., Huang, M., Thorne, L.B., Boice, L., Salazar, A.H., Funkhouser, W.K., Rathmell, W.K., Dhir, R., Yousem, S.A., Dacic, S., Schneider, F., Siegfried, J.M., Hajek, R., Watson, M.A., McDonald, S., Meyers, B., Clarke, B., Yang, I.A., Fong, K.M., Hunter, L., Windsor, M., Bowman, R. V., Peters, S., Letovanec, I., Khan, K.Z.,

- Jensen, M.A., Snyder, E.E., Srinivasan, D., Kahn, A.B., Baboud, J., Pot, D.A., Shaw, K.R.M., Sheth, M., Davidsen, T., Demchok, J.A., Yang, Liming, Wang, Z., Tarnuzzer, R., Zenklusen, J.C., Ozenberger, B.A., Sofia, H.J., Cheney, R., 2014. Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma: The cancer genome atlas research network. *Nature* 511, 543–550.
20. Qian, Z., Zhou, T., Gurguis, C.I., Xu, X., Wen, Q., Lv, J., Fang, F., Hecker, L., Cress, A.E., Natarajan, V., Jacobson, J.R., Zhang, D.D., Garcia, J.G.N., Wang, T., 2015. Nuclear factor, erythroid 2-like 2-associated molecular signature predicts lung cancer survival. *Sci. Rep.* 5.
21. Shin, D.H., Park, H.M., Jung, K.A., Choi, H.G., Kim, J.A., Kim, D.D., Kim, S.G., Kang, K.W., Ku, S.K., Kensler, T.W., Kwak, M.K., 2010. The NRF2-heme oxygenase-1 system modulates cyclosporin A-induced epithelial-mesenchymal transition and renal fibrosis. *Free Radic. Biol. Med.* 48, 1051–1063.
22. Zhou, W., Mo, X., Cui, W., Zhang, Z., Li, D., Li, L., Xu, L., Yao, H., Gao, J., 2016. Nrf2 inhibits epithelial-mesenchymal transition by suppressing snail expression during pulmonary fibrosis. *Sci. Rep.* 6, 1–10.
23. Wu, Y.S., Chung, I., Wong, W.F., Masamune, A., Sim, M.S., Looi, C.Y., 2017. Paracrine IL-6 signaling mediates the effects of pancreatic stellate cells on epithelial-

- mesenchymal transition via Stat3/Nrf2 pathway in pancreatic cancer cells. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1861, 296–306.
24. Chien, M.H., Lee, W.J., Hsieh, F.K., Li, C.F., Cheng, T.Y., Wang, M.Y., Chen, J.S., Chow, J.M., Jan, Y.H., Hsiao, M., Hua, K.T., Kuo, M.L., 2015. Keap1-Nrf2 Interaction Suppresses Cell Motility in Lung Adenocarcinomas by Targeting the S100P Protein. *Clin Cancer Res* 21, 4719–4732.
25. Park, S.-H., Kim, J.H., Ko, E., Kim, J.-Y., Park, M.-J., Kim, M.J., Seo, H., Li, S., Lee, J.-Y., 2018. Resistance to gefitinib and cross-resistance to irreversible EGFR-TKIs mediated by disruption of the Keap1-Nrf2 pathway in human lung cancer cells. *FASEB J.* 32, 5862–5873.
26. Shen, H., Yang, Y., Xia, S., Rao, B., Zhang, J., Wang, J., 2014. Blockage of Nrf2 suppresses the migration and invasion of esophageal squamous cell carcinoma cells in hypoxic microenvironment. *Dis. Esophagus* 27, 685–692.
27. Pan, S.T., Qin, Y., Zhou, Z.W., He, Z.X., Zhang, X., Yang, T., Yang, Y.X., Wang, D., Zhou, S.F., Qiu, J.X., 2015. Plumbagin suppresses epithelial to mesenchymal transition and stemness via inhibiting Nrf2-mediated signaling pathway in human tongue squamous cell carcinoma cells. *Drug Des. Devel. Ther.* 9, 5511–5551.
28. Han, W., Zhang, Y., Niu, C., Guo, J., Li, J., Wei, X., Jia, M., Zhi, X., Yao, L., Meng,

- D., 2019. BTB and CNC homology 1 (Bach1) promotes human ovarian cancer cell metastasis by HMGA2-mediated epithelial-mesenchymal transition. *Cancer Lett.* 445, 45–56.
29. Sato, M., Matsumoto, M., Saiki, Y., Alam, M., Nishizawa, H., Rokugo, M., Brydun, A., Yamada, S., Kaneko, M.K., Funayama, R., Ito, M., Kato, Y., Nakayama, K., Unno, M., Igarashi, K., 2020. BACH1 promotes pancreatic cancer metastasis by repressing epithelial genes and enhancing epithelial-mesenchymal transition. *Cancer Res.* 80, 1279–1292.
30. Lignitto, L., LeBoeuf, S.E., Homer, H., Jiang, S., Askenazi, M., Karakousi, T.R., Pass, H.I., Bhutkar, A.J., Tsirigos, A., Ueberheide, B., Sayin, V.I., Papagiannakopoulos, T., Pagano, M., 2019. Nrf2 Activation Promotes Lung Cancer Metastasis by Inhibiting the Degradation of Bach1. *Cell* 178, 316-329.e18.
31. Wiel, C., Le Gal, K., Ibrahim, M.X., Sayin, V.I., Bergo, M.O., Jahangir, C.A., Kashif, M., Yao, H., Ziegler, D. V, Xu, X., Ghosh, T., Mondal, T., Kanduri, C., Lindahl, P., 2019. BACH1 Stabilization by Antioxidants Stimulates Lung Cancer Metastasis Article BACH1 Stabilization by Antioxidants Stimulates Lung Cancer Metastasis. *Cell* 178, 330-345.e22.
32. Gallahan, D., Callahan, R., 1987. Mammary tumorigenesis in feral mice:

- identification of a new int locus in mouse mammary tumor virus (Czech II)-induced mammary tumors. *J. Virol.* 61, 66–74.
33. Uyttendaele, H., Marazzi, G., Wu, G., Yan, Q., Sassoon, D., Kitajewski, J., 1996. Notch4/int-3, a mammary proto-oncogene, is an endothelial cell-specific mammalian Notch gene. *Development* 122.
34. Uyttendaele, H., Ho, J., Rossant, J., Kitajewski, J., 2001. Vascular patterning defects associated with expression of activated Notch4 in embryonic endothelium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 5643–5648.
35. Bui, Q.T., Im, J.H., Jeong, S.B., Kim, Y.M., Lim, S.C., Kim, B., Kang, K.W., 2017. Essential role of Notch4/STAT3 signaling in epithelial–mesenchymal transition of tamoxifen-resistant human breast cancer. *Cancer Lett.* 390, 115–125.
36. Fukusumi, T., Guo, T.W., Sakai, A., Ando, M., Ren, S., Haft, S., Liu, C., Amornphimoltham, P., Silvio Gutkind, J., Califano, J.A., 2018. The NOTCH4–HEY1 pathway induces epithelial–mesenchymal transition in head and neck squamous cell carcinoma. *Clin. Cancer Res.* 24, 619–633.
37. Lin, X., Sun, B., Zhu, D., Zhao, X., Sun, R., Zhang, Y., Zhang, D., Dong, X., Gu, Q., Li, Y., Liu, F., 2016. Notch4⁺ cancer stem-like cells promote the metastatic and invasive ability of melanoma. *Cancer Sci.* 107, 1079–1091.

38. Zhang, J., Kuang, Y., Wang, Y., Xu, Q., Ren, Q., 2017. Notch-4 silencing inhibits prostate cancer growth and EMT via the NF- κ B pathway. *Apoptosis* 22, 877–884.
39. Onder, T.T., Gupta, P.B., Mani, S.A., Yang, J., Lander, E.S., Weinberg, R.A., 2008. Loss of E-cadherin promotes metastasis via multiple downstream transcriptional pathways. *Cancer Res.* 68, 3645–3654.
40. Peinado, H., Olmeda, D., Cano, A., 2007. Snail, ZEB and bHLH factors in tumour progression: An alliance against the epithelial phenotype? *Nat. Rev. Cancer.*

第3章 総括

癌の転移、臓器線維症に寄与する EMT は、これまでも様々な研究が行われてきたが、それを標的とした治療薬の実用には至っていない。本研究では、TGF- β 1 誘導 EMT における ROS-Nrf2 経路と Notch シグナルのクロストークに焦点をあて、その分子メカニズムを解明し、新規治療標的としての可能性を検討することを目的とした。その結果、TGF- β 1 により活性化された ROS-Nrf2 経路は Notch シグナル活性化と EMT の誘導に必要であること、そのメカニズムとして Nrf2 が ARE を介して *Notch4* の転写を直接活性化させること、を明らかにした。Notch シグナリングの役割は細胞や環境ごとに評価する必要があるが、ROS-Nrf2 経路や Notch4 は、EMT に対する新規の診断・治療法開発において重要な標的となる可能性があり、さらに研究を進展させることで臨床応用が期待できると考えられた。

謝辞

本研究にあたり終始御懇切なる御指導と御鞭撻を賜りました筑波大学大学院呼吸器内科檜澤伸之教授に深い謝意を表します。

適切な御指導と御示唆をいただきました筑波大学大学院呼吸器内科松野洋輔先生に深く感謝いたします。

研究その他方面にわたり御指導いただきました筑波大学附属病院土浦市地域臨床教育支援ステーション石井幸雄教授に深く感謝いたします。

日々の研究において様々な御協力、御教示をいただきました、坂本透病院教授、森島祐子准教授、際本拓未講師、小川良子講師、増子裕典講師、中澤健介講師、塩澤利博講師、松山政史病院講師、吉田和文病院講師、中嶋真之医学博士、Mingma Sherpa 医学博士、重政理恵医学士に深謝いたします。

最後に、日々の研究を続けていく上で、常に心の支えとなり、温かく励まし続けてくれた家族に感謝したいと思います。

出典

本学位論文では、European Journal of Cell Biology. 100(7-8): 151181, 2021.
(doi.org/10.1016/j.ejcb.2021.151181) に掲載された論文の内容を、Elsevier 社の規定にしたがって再利用している。