

Graduate School of Advanced Science and Engineering  
Waseda University

博士論文審査報告書  
Doctoral Dissertation Review Report

論文題目  
Dissertation Title

Control of reactive oxygen species (ROS) machinery to maintain the  
cellular homeostasis

活性酸素種による細胞動態恒常性調節機構の解析

申請者  
(Applicant Name)  
Kenly WUPUTRA  
吳念吉

Department of Integrative Bioscience and Biomedical Engineering

February, 2024

酸化ストレスと酸化還元反応の制御機構は、自己幹細胞の増殖分化、細胞死、がん制御、自己再生、恒常性動態調節反応にとって重要である。酸化ストレスと抗酸化の平衡関係維持には、細胞質、特に小胞体、ミトコンドリアで駆動される活性酸素種（ROS）産生に係る芳香族炭化水素受容体（Aryl hydrocarbon receptor（AhR） - AP1/ATF 転写因子 Jun 二量体タンパク質 2（Jun dimerization protein 2, Jdp2） - 核内転写因子赤芽球由来 2 関連因子 2（The nuclear factor erythroid 2-related factor, Nrf2）（AhR-Jdp2-Nrf2）軸が関与する。Jdp2 が関与する酸化還元機構経路と活性酸素種（ROS）生成のバランス機構を分子生物学的に解明することで、細胞の生死、新生、老化にかかわる様々な機能や、細胞の可塑性と細胞運命決定における AhR-Jdp2-Nrf2 遺伝子バッテリー軸の役割についての新しい洞察が与えられると、著者は考えた。

本研究では、第一に、一般的に使用されている極性有機溶媒の硫化ジメチル（DMSO）刺激による AhR-Jdp2 軸の活性化機構研究について、マウス胎児線維芽細胞を用いて行われた。AhR 遺伝子のプロモーターは、第 I 相酵素群系の活性化剤である芳香族炭化水素群のレセプター分子の AhR が、ダイオキシン応答エレメント（DRE）を介して活性化され、これにより AhR タンパク質が産生され、細胞内 ROS 産生が増加し、マウス胎児線維芽細胞の細胞死を誘導することを見出した。その程度は、AhR プロモーターの転写活性化に依存した。さらに、AhR と Jdp2 および第 II 相酵素群依存性転写因子である Nrf2 と小 Maf 塩基性ジッパー転写因子（MafK）が会合し、これらの結合体が AhR プロモーター領域の DRE エレメントにリクルートされることを、免疫共沈降法および染色体免疫沈降法によって検出した。以上より、Jdp2 は第 I 相酵素群転写因子 AhR および第 II 相酵素群転写因子 Nrf2 と複合体を形成し、第 I 相酵素群転写因子が結合する DRE に結合することが判明した。さらに、この複合体は、DMSO に応答した AhR プロモーターの活性化において重要な役割を果たすことも明らかになった。Nrf2 が AhR 結合配列である DRE エレメントに AhR-Jdp2 結合物と共に結合する発見には新規性がある。

AhR-Jdp2-Nrf2 軸間のクロストークをさらに確認するために、第 I 相酵素群活性化剤として著名な薬物 2,3,7,8-テトラクロロジベンゾ-p-ダイオキシン（TCDD）による AhR プロモーターの活性化機構を解析した。AhR プロモーターの重要な転写活性化因子として、第 I 相酵素群活性化転写因子 AhR、第 II 相酵素群活性化転写因子 Nrf2、それらの介在因子 Jdp2 が複合体を形成し、空間的かつ時間的な結合様式で、結合配列依存的に活性化する。時間的には、AhR に結合し、次に AhR が細胞内で崩壊して、Nrf2 に結合し、そして AP1 結合が Jdp2 介在因子を介して駆動される。これらの発見により、ROS 産生の調節、細胞骨格の再構築化、細胞の拡散、移動、および腫瘍の進行の各機能の駆動における AhR-Jdp2-Nrf2 軸の役割が明らかにされた。また、がん抑制遺伝子 Trp53、KRAS 遺伝子変異を有する膵臓腺がんでは、腫瘍増殖が ROS 産生を調節する Jdp2-AhR-Nrf2 遺伝子バッテリー軸によって大きく影響されることも実証できた。

一方、制がん剤レゴラフェニブは、肝細胞がん（HCC）の治療に最も広く使用される多重リン酸化酵素阻害剤のひとつで、抗がん活性のための ROS を生成し、がん化に伴う血管新生を阻害することが知られている。レゴラフェニブは、フォークヘッドボックスタンパク質 M1

(FoxM1) の発現を活性化するので、その薬剤耐性 HepG2 HCC 細胞株である HepG2\_Rego\_R を樹立した。この発現上昇は、レゴラフェニブで治療されたがん細胞の生存にとって重要である。以上より、ROS 制御が、薬剤耐性に深く関わっていることを示した研究成果となった。

これらをまとめた本博士論文は、次の 5 章から構成されている。

第 1 章では、本研究の背景と目的が説明された。毒性薬物で、第 I 相酵素群の活性化剤の TCDD ならびに第 I 相酵素群転写因子の AhR がアレルギー、炎症、免疫、細胞分化、がんの進行などに及ぼす影響を説明した。そして AhR シグナル伝達経路の活性化と薬物代謝酵素 (DME) との関係、ならびに活性酵素種 ROS の発存量変化との関係が示された。さらには AhR-Nrf2 遺伝子バッテリー軸の概念について紹介し、この用語が第 I 相および第 II 相関連の遺伝子プロモーターを制御するための AhR および Nrf2 シグナル伝達経路の連関を表すために使用されていると説明した。査読の結果、審査員からは DRE と抗酸化反応配列 (ARE) のコア配列は何かという指摘を受けたので、それらの説明を加筆した。

第 2 章では、AhR 発現の活性化が低濃度の DMSO の投与によって増強されることを明らかにした。活性化には、AP1/ATF 転写調節因子 Jdp2 が必要であり、本因子は、AhR-Nrf2 応答において二機能性タンパク質として機能し、AhR に作用して ROS を上昇させ、また、その ROS を Nrf2 に作用して低下させる。AhR と Nrf2 の発現量を Jdp2 は内在性 ROS 産生をメルクマールとして、自己決定し、細胞動態恒常性を維持している。生体の DMSO 治療におけるアポトーシス応答をサポートしている可能性があることを示唆した。査読の結果、Nrf2 の発現制御、アポトーシスを介した Jdp2 による AhR 制御について質問を受けたので、それらの説明が加えられた。

第 3 章では、AhR と Nrf2 間のクロストークを転写レベルで明らかにした。Jdp2 は、時空間的に AhR-Jdp2-Nrf2 軸を介して AhR プロモーターの活性化に重要な役割を果たしていることがわかった。この発見は、酸化ストレスの恒常性調節および解毒、炎症、がんの進行における抗酸化反応における Jdp2 の役割についての新たな洞察を提供した。査読の結果、AhR は Jdp2 を介した ROS の蓄積への影響は何か？細胞骨格の立体構造と AhR 経路との関係、AhR の標的遺伝子は何かなどの質問を受けた。それらについての解答と説明が加えられた。

第 4 章では、レゴラフェニブ耐性 HepG2 細胞がん幹細胞クローンを作成した。本クローンは FoxM1 およびがん幹細胞のさまざまなマーカーを過剰発現していることを見出した。肝細胞がん患者も FoxM1 の発現上昇とレゴラフェニブ耐性を示し、これらは生存率の低下とよく関連していた。FoxM1 発現とレゴラフェニブ耐性の間に密接な関係があり、内在性 ROS 再生とも関連し、肝細胞がん患者の生存率と関連していることを見出した。以上より、FOXM1-CD44 シグナル伝達に拮抗する戦略は、これらの患者におけるレゴラフェニブの治療効果を高めることが示唆できた。査読の結果、FoxM1 の転写または核移行はチオストレプトンの影響を受けるのか？レゴラフェニブを実験に選んだ理由は何かな？酸化ストレスの種類を特定することが重要なのはなぜかななどの質問を受け、それらの説明を加えた。

第5章では、本研究の総括が述べられ、さらなる考察が展開された。転写因子 Jdp2 が AhR と Nrf2 バッテリー軸の両方を結び付けるために重要であり、AhR 発現と ROS 恒常性に不可欠であることを証拠が示唆された。そして、第 I 相および第 II 相の解毒反応が、AhR、Jdp2、および Nrf2 を含む同じタンパク質複合体を通じて引き起こされる可能性があることを示唆した。AhR および Nrf2 バッテリー軸による ROS の誘導と制御は、がん治療の治療戦略を提供する可能性がある。チオストレプトン (FoxM1 阻害剤) の抑制と、重度の ROS 誘導を通じてがん細胞を抑制することが知られているレゴラフェニブを組み合わせることで、レゴラフェニブ耐性がん幹細胞の生存率が大幅に低下することが示された。この結果は、がん治療における ROS レベルに対する酸化反応を増感することにより、化学療法抵抗性腫瘍の治療に新たな展望を提供できる可能性があった。査読の結果、AhR-Jdp2-Nrf2 複合体の特定のシス-エレメントと結合する正確なタンパク質についての質問があり、それらの説明を加えた。

以上のように、AhR-Jdp2-Nrf2 遺伝子バッテリー軸に関する本研究は、将来、がんやその他の病態疾患におけるバッテリー軸を標的とした新しい治療法の探索と確立に有益であり、かつ ROS バランス維持のための基礎的理解と応用に関する基本的かつ説得力のある証拠を提供するものであった。

よって、本論文は博士 (理学) の学位論文として相応しいものであると認める。

2024 年 1 月

審査員

(主査) 早稲田大学教授 理学博士 (早稲田大学) 伊藤悦朗

早稲田大学教授 博士 (理学) (早稲田大学) 加藤尚志

早稲田大学教授 博士 (理学) (早稲田大学) 花嶋かりな