

博士学位論文審査要旨

2023年1月13日

論文題目： NRF3 はアルギニンによる mTORC1 活性化を介して腫瘍を増大させる

学位申請者： 廣瀬 修平

審査委員：

主査： 生命医科学研究科 教授 小林 聡

副査： 生命医科学研究科 教授 西川 喜代孝

副査： 生命医科学研究科 教授 西川 恵三

要 旨：

がん細胞は増殖を維持するために多量の栄養素を必要とし、低栄養環境に適応するように細胞内代謝を変化させている。そのような栄養状態の感知や代謝変動を担う細胞内シグナルとして mechanistic/mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) シグナルが知られている。mTORC1 はロイシンやアルギニン等のアミノ酸の刺激により活性化し、様々な因子をリン酸化することでタンパク質・核酸・脂質といった細胞の構成要素の生合成や細胞増殖を促進する。この mTORC1 活性化機構の実態は、mTORC1 のリソソームへの動員にあることも解明されている。しかし、mTORC1 活性化メカニズムを構成因子の遺伝子発現という視点から解析された研究は少ない。

本研究では、がんの増大・進展に寄与することが明らかになりつつある転写因子 NRF3 (NRF3) のがん細胞における役割を詳細に調べることを目的とした。まず NRF3 の標的遺伝子を探索するトランスクリプトーム解析を行い、mTORC1 シグナルに関連する遺伝子群の発現を制御する可能性を見出した。詳細に解析した結果、NRF3 はアルギニンの欠乏によって活性化すること、そして SLC38A9 ないし RagC の転写誘導を介してアルギニン依存的な mTORC1 活性化をもたらすことを発見した。さらに NRF3 はマクロピノサイトーシスによる細胞外からのアルギニン取り込みを促進することで mTORC1 活性化すること、その結果ミトコンドリアの機能を維持することでがん細胞の生存・増殖に寄与することを明らかにした。以上の *in vitro* における知見を *in vivo* で検証するために、免疫不全マウスへの移植実験を行い、NRF3 依存的な腫瘍増大はラパマイシンによって劇的に抑制されることを明らかにした。以上まとめると、NRF3-mTORC1 経路は腫瘍微小環境の低栄養状態に対するがん細胞の生存システムの1つであると推察できる。近年、がん細胞はアルギニン要求性が高いことが報告されており、本研究の知見はがん細胞におけるアルギニン代謝の理解に繋がることが期待された。

よって本論文は、博士(理学)(同志社大学)の学位を授与するにふさわしいものであると認められる。

総合試験結果の要旨

2023年1月13日

論文題目： NRF3 はアルギニンによる mTORC1 活性化を介して腫瘍を増大させる

学位申請者： 廣瀬 修平

審査委員：

主査： 生命医科学研究科 教授 小林 聡

副査： 生命医科学研究科 教授 西川 喜代孝

副査： 生命医科学研究科 教授 西川 恵三

要 旨：

総合試験は、2023年1月12日(木)午後4時から午後5時30分まで京田辺校地 医心館 輪講室 SA で行った。数十名の参加者のもと、博士論文に関する口頭発表40分、発表に対する質疑応答30分、その後、主査と副査のみでの口頭試問を30分行った。

口頭発表では博士論文の内容について詳細に説明した。さらに本研究の知見からの考察を俯瞰的かつ概念的に論述した。質疑応答では、アルギニン欠乏による mTORC1 活性化メカニズムないし NRF3 の活性化メカニズムの詳細についての本質的かつ建設的な指摘がなされ、それに対して申請者は的確に回答した。一方、本研究は免疫不全マウスへの移植実験で検証しているものの、がん細胞を用いた解析をメインとしているため、in vivo におけるさらなる検証の必要性が指摘された。その問題について申請者は大いに理解していること、傍証とはなるが幾つかのデータを用いて考察した。口頭試問では、さらに詳細な問題点について議論を行った。以上の口頭発表・質疑応答・口頭試問から、申請者は博士として備えるべきである能力を十分有していると判断した。また本成果について、内外の学会において発表していること、さらに学術雑誌 *The Tohoku Journal of Experimental Medicine* ないし *iScience* (accepted in principle) に受理されていることから、その価値は対外的にも評価されている。なお申請者は本研究科修了に必要な所定の単位を修得し、英語の語学試験も合格しているため博士としての十分な語学能力を有している。

よって、総合試験の結果は合格であると認める。

博士學位論文要旨

Abstract of Doctoral Dissertation

論文題目：NRF3 はアルギニンによる mTORC1 活性化を介して腫瘍を増大させる
Title of Doctoral Dissertation

氏名： 廣瀬 修平
Name

要旨：
Abstract

がん細胞は増殖を維持するために多量の栄養素を必要とし、低栄養環境に適応するために細胞内代謝を変化させている。そのような栄養状態の感知や代謝変動を担う細胞内シグナルとして mechanistic/mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) シグナルが知られており、その阻害剤であるラパマイシンはがん進展を抑制することが報告されている。活性化した mTORC1 はリン酸化を介してタンパク質・核酸・脂質といった細胞の構成要素の生合成や細胞増殖を促進する一方で、オートファジーによる分解を抑制する。mTORC1 の活性化は、アミノ酸を介した mTORC1 のリソソームへの誘導とインスリンなどの成長因子によるキナーゼ活性の付与の2段階に分けられる。特にロイシン・アルギニンを分子シグナルとした mTORC1 活性化がよく研究されている。しかし、mTORC1 シグナルを構成するタンパク質の発現が必要に応じて調節されるメカニズムは知られていない。

NFE2L3 (NRF3) は cap'n'collar ファミリーに属する転写因子である。通常 NRF3 は小胞体に局在しており、プロテアソーム阻害などのストレスを受けると DNA damage-inducible 1 homolog 2 (DDI2) によって切断され小胞体から解離し核移行する。そして、small MAF (sMAF) と二量体を形成して標的遺伝子の antioxidant response elements (ARE) に結合して転写を活性化する。これまでに NRF3 はがんの増大・進展に寄与することが明らかになりつつあるものの、その詳細な機能は不明な点が多く残されている。そこで本研究では、がん細胞における NRF3 の役割を詳細に調べることを目的とし、NRF3 はアルギニン欠乏によって活性化すること、そして NRF3 は転写誘導を介してアルギニンによる mTORC1 活性化をもたらし、腫瘍増大に寄与することを発見した。

まず、NRF3 の標的遺伝子を探索するためにトランスクリプトーム解析を行い、mTORC1 シグナルに関連する遺伝子群の発現を制御する可能性を見出した。そこで、HCT116 大腸がん細胞株において mTORC1 活性を ribosomal protein S6 kinase B1 (S6K) のリン酸化 (pS6K) またはオートファジー (オートリソソーム) 活性を指標に調べ、NRF3 は mTORC1 活性化に寄与することを明らかにした。次に mTORC1 活性化経路としてアミノ酸に着目した。アミノ酸のみを欠乏させた後、再刺激したときの pS6K および mTORC1 のリソソーム膜上へのリクルートについて調べた。その結果、興味深いことに、NRF3 はアミノ酸依存的な mTORC1 活性化に重要であることが示された。同様な結果は他のがん細胞株でも確認した。mTORC1 活性化に特に重要なアミノ酸としてロイシンとアルギニンが報告されている。ロイシンは Sestrin2-gap activity toward rags 2 (GATOR2) 複合体を解離させることで mTORC1 を活性化させる。そこで、共免疫沈降法 (co-IP) でロイシンあるいはアミノ酸刺激時の Sestrin2 と GATOR2 の結合を調べたところ、予想外に NRF3 は関与しなかった。一方、アルギニンによる pS6K の増加と mTORC1 のリソソームへのリクルートは NRF3 依存的であることを見出した。

これまでの結果は、NRF3 はアミノ酸欠乏・再刺激時に応答して機能している、言い換えると、

NRF3 はアミノ酸欠乏によって活性化することを示唆していると考えられた。そこで、アミノ酸欠乏時の NRF3 タンパク質の切断と核移行をウエスタンブロットおよび免疫染色法で調べ、NRF3 はアミノ酸欠乏によって切断が進み、核移行も促進されることを見出した。さらにそれは NRF3 切断酵素である DDI2 によって制御された。DDI2 はホモ二量体で活性を持つことが報告されているので、アミノ酸欠乏によって DDI2 の二量体化が亢進すると仮説を立てた。FLAG-DDI2 と HA-DDI2 を発現させた細胞で co-IP 実験を行い、アミノ酸欠乏によって二量体化が促進することを見出した。これは融合蛍光タンパク質 Venus を使った Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) 解析からも同様の結果を得ている。以上の結果から NRF3 はアミノ酸 (アルギニン) 欠乏に応答して、アルギニン供給とそれによる mTORC1 活性化を調節していることが示唆される。

アルギニンによる mTORC1 活性化には solute carrier family 38A9 (SLC38A9) と Rag small GTPase ファミリー (RagA/B/C/D) が関連しているという報告がある。そこで、NRF3 はアミノ酸刺激時にこれら遺伝子の発現を制御することで mTORC1 活性化に寄与していると仮説を立てた。解析した結果、SLC38A9 と RagC の mRNA およびタンパク質発現が NRF3 依存的であることを見出した。加えて、それら遺伝子が NRF3 によって直接的に転写制御されているかをクロマチン免疫沈降 (ChIP) 法で調べた。その結果、RagC は直接的だったが、SLC38A9 は間接的であることが分かった。さらに、NRF3 が RagC および SLC38A9 の発現を制御することで mTORC1 活性化に寄与することを確かめるために、発現プラスミドによる回復実験を行なった。その結果、NRF3 ノックダウンによって減少した pS6K は RagC と SLC38A9 の同時発現によって回復した。以上から NRF3 は RagC および SLC38A9 の発現制御によってアルギニン依存的な mTORC1 活性化を制御することを明らかにした。

当研究室での以前の研究で NRF3 は RAB5 の発現制御を介したマクロピノサイトーシスによる細胞外からの脂質の取り込みを活性化することを報告している。さらに、マクロピノサイトーシスによるアミノ酸取り込みによって mTORC1 が活性化する報告もある。そこで、NRF3 は細胞外からのアルギニン取り込みを促進することでも mTORC1 を活性化していると仮説を立てた。まず、マクロピノサイトーシスによって細胞内に取り込まれる蛍光タンパク質 FITC-BSA を用いて、マクロピノサイトーシスが NRF3 依存的に起こることを確認し、アミノ酸および FBS 欠乏後の BSA またはアミノ酸による再刺激で pS6K が増加することを確認した。興味深いことにその増加は NRF3 ノックダウンや RAB5 ノックダウンによって抑制され、一方で NRF3 過剰発現によって増強され、それはマクロピノサイトーシスの阻害剤である 5-(N-ethyl-N-isopropyl)-Amiloride (EIPA) によって消失した。また、細胞外からのアミノ酸取り込みの別経路として選択的なアミノ酸トランスポーターによる経路も考えられた。そこで、細胞外からアルギニンを取り込むトランスポーター SLC7A1 に着目し、それは NRF3 依存的に誘導されることを見出し、そのプロモーター領域に NRF3 が結合することも ChIP 解析から明らかにした。さらに SLC7A1 ノックダウンによる mTORC1 活性化への影響を調べたところ、予想通り NRF3 ノックダウンと同様に pS6K が減少した。以上から、NRF3 は細胞外からのアルギニン取り込みを促進することで mTORC1 活性化に寄与することを明らかにした。

mTORC1 は細胞内代謝を変動させることが報告されている。そこで NRF3-mTORC1 軸が細胞内代謝に及ぼす影響をメタボローム解析で調べたところ、糖代謝を中心とした代謝物の量が増加していた。mTORC1 はミトコンドリア形態・機能の維持に重要であるという報告がある。それと一致して、アミノ酸再刺激時の ATP 量、ミトコンドリア膜電位が NRF3 ノックダウンによって減少し、ミトコンドリアの断片化が誘導されていた。ミトコンドリアはアポトーシスの起点となる細胞小器官であり、その機能障害はアポトーシスに直結する。実際、NRF3 ノックダウンによってアポトーシスが誘導された。以上から NRF3-mTORC1 軸はがん細胞の生存・増殖に非常に重要

であることが示唆される。そこで、これまでの知見を *in vivo* で解析するために、免疫不全マウスへの移植実験を行い、NRF3 依存的な腫瘍増大はラバマイシンによって劇的に抑制されることを明らかにした。

腫瘍微小環境におけるがん細胞の mTORC1 活性化は、腫瘍免疫による排除からの回避をもたらす。そこで Nrf3 の腫瘍微小環境における役割を調べるために、Nrf3 およびコントロールを安定的にノックダウンしたマウス腎がん RenCa 細胞を樹立し、野生型マウスへの同系移植を行った。Nrf3 ノックダウンによって腫瘍は退縮し、腫瘍サンプルを用いた GSEA から Nrf3 は免疫逃避を促進する可能性を明らかにした。

以上をまとめると、本研究では NRF3 はアルギニン依存的な mTORC1 活性化によってミトコンドリア機能を維持することでがん細胞の生存・増殖に寄与することを明らかにした。さらに、NRF3 はアルギニン欠乏によって活性化する転写因子である可能性を見出し、これは腫瘍微小環境のような低栄養環境におけるがん細胞の生存戦略の一つであると推察できる。近年、がん細胞はアルギニン要求性が高いことが報告されており、本研究もがん細胞におけるアルギニン代謝の理解に繋がると期待できる。