

## 綜 説

## 活性酸素は癌化に寄与しうるか？ —NADPHoxidase ファミリーによる新しい癌化機構—

鎌田 徹\* 満下 淳地  
信州大学医学部分子細胞生化学講座

### Do Reactive Oxygen Species Contribute to Cancer ? — A Novel Mechanism of Cancer Development Mediated by the NADPHoxidase Family —

Tohru KAMATA and Junji MITSUSHITA

*Department of Molecular Biology and Biochemistry, Shinshu University School of Medicine*

**Key words:** reactive oxygen species, NADPHoxidase (Nox) family, cancer, Ras oncogene  
活性酸素, NADPH 酸化酵素 (NOX) ファミリー, 癌, Ras 癌遺伝子

#### I 序 論

分子腫瘍学は、種々の癌遺伝子、癌抑制遺伝子を含めた癌関連遺伝子の同定分離、機能解析により、増殖、浸潤、転移といった発癌の多段階機構の理解に、多大の貢献をなしてきた。しかし、その詳細については、今なお、少なからぬ未解明の課題が残されている。腫瘍形成に与える細胞内の代謝ネットワークは複雑多岐であって、その律速段階を適確に把握することが重要である。その律速因子のひとつとして、細胞内で生じる活性酸素 (Reactive oxygen species: ROS) を本稿では論考したい。ROS としては酸素 ( $O_2$ )、過酸化水素 ( $H_2O_2$ )、スーパーオキシドアニオン ( $\cdot O_2^-$ )、ヒドロキシラジカル ( $OH\cdot$ ) などがある。ROS の発生源としては、細胞内で、ミトコンドリア、ペルオキシゾーム、リポキシジェナーゼ、NADPH-oxidase、チトクローム P450 があり、細胞外では、紫外線、電離放射線があげられる。ROS の量によっては、酸化ストレスや細胞傷害 (蛋白不活化, 蛋白分解, DNA 断片化, 脂質過酸化) をひきおこす。このような ROS の細胞毒性に対する防御機構として、生体は、いわゆる抗酸化剤 superoxide dismutase (SOD), catalase, glutathione peroxidase といった酵素群を進化・発展させてきた。ROS は、長い間、上述した

ように細胞内の DNA, 蛋白質, 脂質を酸化する変異源であり、細胞毒性を示すものと考えられてきた。その典型例は、食細胞が、大量のスーパーオキシドアニオン ( $\cdot O_2^-$ ) と過酸化水素 ( $H_2O_2$ ) を発生し、外界から侵入する病原菌を殺す場合にみられる<sup>1)</sup>。食細胞以外の細胞でも、低濃度の ROS が産生されるが、その生物学的意味は不明で<sup>2)</sup>、ミトコンドリアの電子伝達系酵素の不具合による偶然の副産物とみなされ、例えばそれが蓄積すると老化を促進するものと考えられてきた<sup>3)</sup>。しかし、近年、ROS に対して、より特異的な役割を定義づける研究が現れてきた。細胞増殖因子の PDGF<sup>4)5)</sup> や、EGF<sup>6)</sup>、あるいはサイトカイン<sup>7)</sup> の刺激で  $H_2O_2$  産生が誘導され、mitogen-activated protein kinase / extracellular signal-regulated kinase (MEK) — mitogen-activated protein kinase (MAPK) の活性化やチロシンリン酸化を促進する。また、Ras 癌遺伝子でトランスホームした線維芽細胞では、 $\cdot O_2^-$  のレベルが亢進している<sup>8)</sup>。では、これらの ROS 産生には、いかなる酵素が関与しているのか。食細胞の ROS は、NADPHoxidase という酵素によってつくられることが、詳細に研究されてきたが、非食細胞でも NADPHoxidase と類似した酵素によって調節されるであろうと指摘されてきた。実際、1998年以降、遺伝子クローニングにより、NADPH-oxidase の触媒サブユニット gp91phox のホモログが次々に同定分離されて、ここに NADPHoxidase

\* 別刷請求先: 鎌田 徹 〒390-8621  
松本市旭 3-1-1 信州大学医学部分子細胞生化学

表1 NADPHoxidase (Nox) ファミリー遺伝子

遺伝子名	発現分布	生理機能
Nox1	colon, blood vessel	細胞増殖調節, 血管平滑筋細胞増殖調節, 細胞癌化, Toll-like Receptor5 シグナリングによる炎症
Nox2	phagocyte, neutrophil	病原菌に対する防御
Nox3	fetal kidney, inner ear	内耳による平衡感覚調節
Nox4	kidney, blood vessel	Toll-like Receptor4 シグナリングによる炎症, インスリン作用, 細胞癌化
Nox5	testis, lymphocyte	?
Duox1, Duox2	thyroid	甲状腺ホルモン合成

(Nox) ファミリーの出現をみ、非食細胞系における ROS 研究は、新時代を迎えることになったのである。我々は、発癌における Nox ファミリー遺伝子の機能的役割を解明する研究を行ってきた。本総説では、癌形質の発現を Nox1, Nox4 が媒介するという我々の新知見を中心にして論述する。

## II Nox ファミリーとその調節機構

Noxファミリーは<sup>9)</sup>、7つの構成メンバー、Nox1<sup>10)</sup>、Nox2<sup>11)</sup>、Nox3<sup>12)</sup>、Nox4<sup>13)14)</sup>、Nox5<sup>15)</sup>、Duox1<sup>9)</sup>、Duox2<sup>16)</sup>からなる(表1)。すべてのメンバーが、 $\cdot O_2^-$ を産生し、その分子構造は、ヘム結合領域を含む6回貫通膜ドメイン、FADとNADPH結合部位を含んで細胞質に突き出た触媒ドメインを含む(図1)。これ以外の部分で、アミノ酸配列の多様性がみられ、Nox5, Duox1, Duox2は、EF-hand ( $Ca^{2+}$ イオン結合サイト)をもった $Ca^{2+}$ 依存性のoxidaseとなっている。

**Nox2** 調節機構については、食細胞(マクロファージ, 好中球)に高発現するNox2が最もよく研究されてきた<sup>17)</sup>(図2)。いわゆるgp91phoxとp22phoxから構成される触媒サブユニットと調節サブユニットp47phox, p67phoxからなる。外部刺激により、活性化された低分子量G-蛋白Rac1が、細胞質に存在していたp47phox/p67phoxを細胞膜へ転座させ、触媒サブユニットと会合して酵素活性がスイッチオンとなる。この際、NADPHに依存して、 $O_2$ を還元し、電子1個を余分にもった $\cdot O_2^-$ を形成する(図2)。以下、順次、他のNoxファミリーの諸性質を概説していこう。

**Nox1** Nox2のp47phoxおよびp67phoxと各々、同型の蛋白であるNox1(p41), Nox1(p51)からなる調節サブユニットとRac1により活性が調節される<sup>18)-20)</sup>。腸組織に高発現していて、腸内細菌によ

る炎症作用を抑制すると考えられているが、真の生理的理由は不明である。この点で、Nox1がLPS-Toll like receptor (TLR)系と共役して、サイトカイン合成を調節するという指摘は興味深い<sup>21)</sup>。一方、血管平滑筋細胞では、アンジオテンシンによってNox1が誘導され、産生したROSはNOへと分解して血圧の調節に寄与するであろう。Nox1によって産生されたROSは平滑筋細胞の増殖そのものにも必要とされるので動脈硬化症との関係が注目される<sup>4)</sup>。

**Nox3** 内耳に発現し、平衡感覚の調節に必要であることが、Nox3ノックアウトマウスで示された<sup>22)</sup>。これ以外にも今後、神経組織での他の機能的役割が明らかになるであろう。

**Nox4** 腎臓皮質での高発現が確認されているので、腎臓における酸素濃度センサーとしての機能が推測されているが、これを立証する明確な証拠はない<sup>13)14)</sup>。肥満細胞では、インスリンのシグナル伝達を媒介してグルコースの取込みを調節するので、糖尿病に関与するかもしれない<sup>23)</sup>。調節サブユニットに相当するものがいまだ同定されず、その酵素活性発現は、常にオンになっている可能性がある。

**Nox5** リンパ組織(T-細胞)に高発現しているが、末梢血リンパ球には存在しない<sup>15)</sup>。前述したように $Ca^{2+}$ 依存性にROSを産生するが、機能的役割は全く不明である。

**Duox1, Duox2** 甲状腺組織で高発現している<sup>9)</sup>。Duox2遺伝子が変異欠失している患者で甲状腺機能低下症が発症することから、甲状腺ホルモン合成に関与すると考えられる<sup>24)</sup>。

## III 癌化における機能的役割

さて、本稿の中心テーマにふれたい。序論で述べたように、Ras癌遺伝子で癌化した細胞では、 $\cdot O_2^-$ 産生が亢進し、その細胞増殖に必要であることが報告さ

活性酸素は癌化に寄与しうるか？

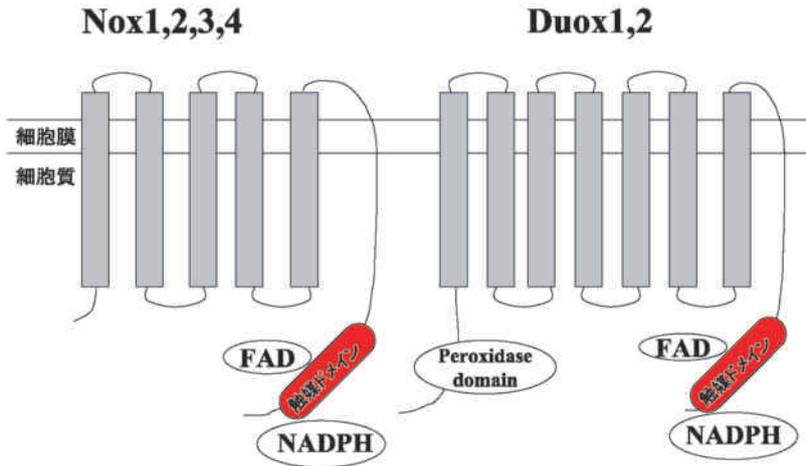


図1 Noxファミリー酵素のトポロジー

Nox 蛋白は、保存された細胞膜貫通ドメインと、FAD、NADPH の結合する細胞質触媒ドメインからなる。Duox は、さらに peroxidase ドメインをN末端にもつ。

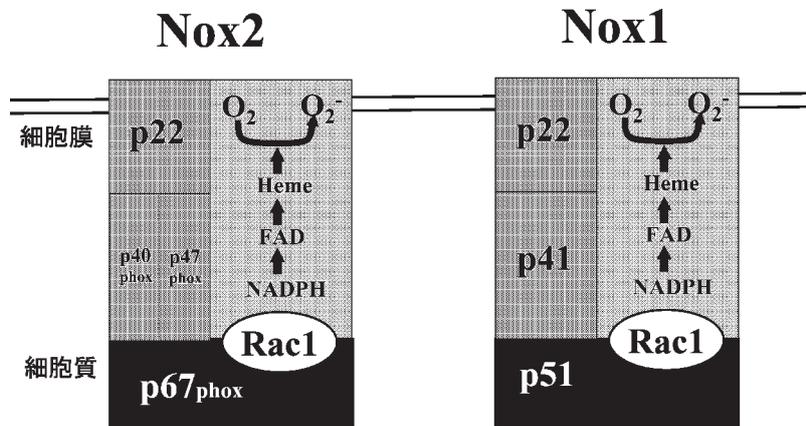


図2 Nox2とNox1の調節

gp91<sup>phox</sup>/Nox2 は、NADPHoxidase の触媒ユニットであり、調節蛋白 p47<sup>phox</sup>、p67<sup>phox</sup>、p40<sup>phox</sup>を必要とする。Rac1 が外部刺激により活性化されると、Rac1・GTPが p67<sup>phox</sup>と結合し、p40<sup>phox</sup>、p47<sup>phox</sup>、p60<sup>phox</sup>複合体が細胞質から細胞膜へ転座し、p47<sup>phox</sup>と p22<sup>phox</sup>が相互作用するようになる。その結果、gp91<sup>phox</sup>/Nox2 が活性化される。Nox1 の場合、活性化された Rac1 が、p67 のホモログ p51 と結合し、p47 のホモログ p41 が p22 と相互作用して、Nox1 を活性化することを除けば p41/p51 複合体が膜へ転座する機構は同様である。

れた<sup>8)</sup>。我々は、いかなる Nox ファミリー遺伝子がこの・O<sub>2</sub><sup>-</sup>産生の源になっているかを検討した。その結果、K-RasVal12で癌化したネズミ腎臓細胞 (K-Ras/NRK) では、正常細胞 (NRK) に比して Nox1 の発現が顕著に亢進していることが判明した<sup>6)</sup>。また、増殖因子 EGF で NRK 細胞を刺激した時も、Nox1 転写が活性化された<sup>9)</sup>。しかも、この発現誘導が、MEK-MAPK キナーゼカスケード経路によって媒介されるので、Nox1 遺伝子プロモーターは、Ras-Raf-MEK-MAPK キナーゼシグナルによって調節される。重要な点は、Nox4 に対する干渉 RNA (small interference RNA: siRNA) ベクターを K-Ras/NRK 細

胞に導入して Nox4 活性を抑制すると、軟寒天培地での細胞増殖が抑制され、細胞形態も、正常 NRK 細胞に近い線維芽状に変化したことである<sup>6)</sup>。さらに、Nox1siRNA を導入した K-Ras/NRK 細胞のヌードマウスにおける造腫瘍能が著しく低下した<sup>6)</sup>。これらの観察は、Ras 癌形質の発現が Nox1 による ROS 産生を必要とすることを証明している (図3, 4)。その後の研究で、Nox1 は Ras 癌細胞のマトリックスメタロプロテアーゼ9産生や運動能にも必要であることが判り、Nox1-generated ROS に依存したシグナル伝達の重要性が浮き彫りになってきた。

では、癌化過程において役割を果たすのは、Nox

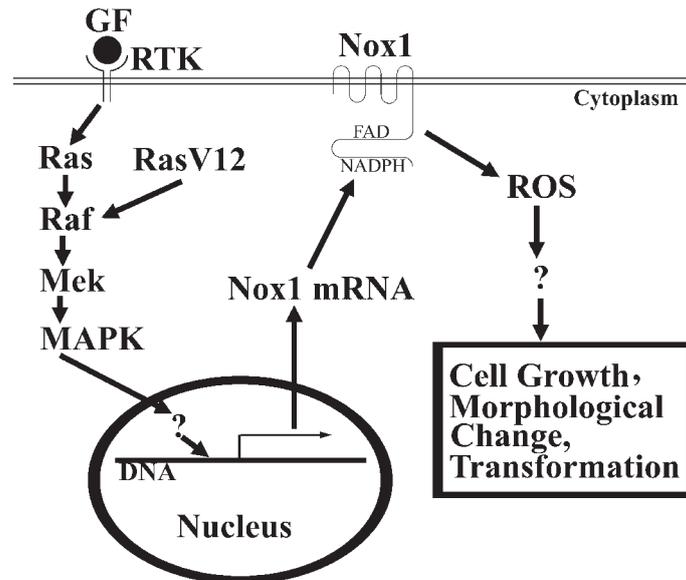


図3 Rasによる細胞癌化におけるNox1の機能

細胞増殖因子 (GF) がチロシンキナーゼ受容体 (RTK) を活性化すると, Ras および Raf-MEK-MAPK キナーゼカスケードシグナリング経路を介して, Nox1 遺伝子発現が誘導される。Nox1 は ROS を産生して, 正常細胞の増殖調節などのシグナル分子として機能する。しかし, Ras が変異の結果, 癌蛋白 (RasVal12) になると, Nox1 遺伝子発現を恒常的に活性化し, ROS の量を増加させ, 増殖, 形態などの調節を攪乱し, 細胞癌化に寄与する。

## Tumor Formation Assay in Nude Mice



K-Ras-NRK/neg-1

K-Ras-NRK/siNox1-N-7

図4 Nox1 は Ras 癌細胞の造腫瘍能に必須である

コントロールベクター (neg-1) に比べて, Nox1RNAi を導入した K-Ras/NRK 細胞のヌードマウスにおける造腫瘍能が, 極度に抑制されている。

ファミリーの中で Nox1 だけなのであろうか。あるいはヒト癌細胞ではどうであろうか。我々は, Nox4 が, メラノーマ細胞や膵臓癌細胞で発現していて, Nox4 活性を除去すると, 細胞増殖が抑制され, アポトーシスを引き起こすことを見出した (投稿中)。また, 同様に, 大腸癌細胞 CaCO-2 で高発現している Nox1 活性を抑制すると, アポトーシスが誘導された (投稿中)。我々の研究とは, 独立に, 前立腺癌<sup>25)</sup>やメラノーマ細胞<sup>26)</sup>や膵臓癌細胞<sup>27)</sup>でもやはり, Nox5, Nox4 が各々その生存, 増殖に必要であるという結果が, 他の研究者によって報告されている。以上のこと

から, Nox ファミリーの産生する ROS は発癌, 癌形質の維持に重要な媒介的役割を果たしているという, かなり一般的な像が浮かびあがってくる。これは, ROS に対する常識をくつがえす見方である。今までの主流の発想は, 癌細胞で産生される ROS は, 遺伝子に障害を与えることによって遺伝的不安定性をもたらす, ひいては癌遺伝子の活性化, 癌抑制遺伝子の不活化を誘起するというものであった。しかし, Nox の研究から, これとは異なる新しい観点, 遺伝子外の変化—ROS による細胞増殖・形態等のシグナル伝達の直接的攪乱によって, 癌形質が発現調節される可能

性が明らかにされたといえる。我々の、仮説を支持する観察として、Mn<sup>2+</sup>依存性 SOD (MnSOD) を高発現して細胞内・O<sub>2</sub><sup>-</sup>を除去すると、膵臓癌の増殖を抑制することが知られている<sup>28)</sup>。

#### IV 今後の展望

では、何故、Nox ファミリー酵素に由来する ROS が、癌化におけるかような特異的役割を果たすのかという間に答えるためには、ROS が一体如何なる蛋白を標的として修飾し、その活性を調節するかを知る必要がある。また、Nox ファミリー蛋白の媒介するシグナル伝達経路の解明も欠かせない重要課題である。ひとつの手がかりは、ペプチド鎖のシステイン残基に含まれる-SH の ROS による酸化で生じる-S-S-結合

の形成であろう。この可逆的な修飾は、蛋白の高次構造や酵素活性を変えうる。我々は、遠大な構想プランのもと、これらのテーマに取り組む研究を開始しており、既に幾つかの実りある結果を得ている。これについては、また別の機会をとらえて、述べてみたい。今後、Nox ファミリー遺伝子が癌治療の新たな分子標的候補となる可能性があり、発癌機構の研究における Nox ファミリーの重要性が高まるものと考えられる。

#### V 謝 辞

本稿で、引用された我々の研究は、科学研究助成金、文部科学省「がん特定領域研究」に基づいて行われた。また、本稿の執筆を手伝って下さった牛山富貴子さんに感謝致します。

#### 文 献

- 1) Babior BM: The respiratory burst oxidase. *Curr Opin Hematol* 2: 55-60, 1995
- 2) Cross AR, Jones OTG: Enzymic mechanisms of superoxide production. *Biochem Biophys Acta* 1057: 281-298, 1991
- 3) Sastre J, Pallardo FV, Garcia de la Asuncoín J, Vina J: Mitochondria oxidative stress and aging. *Free Radic Res* 32: 189-198, 2000
- 4) Lassegue B, Sorescu D, Szocs K, Yin Q, Akers M, Zhang Y, Grant SL, Lambeth D, Griendling KK: Novel gp91phox homologues in vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 88: 888-894, 2001
- 5) Sundaresan M, Yu ZX, Ferrans VJ, Irani K, Finkel T: Requirement for generation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for platelet-derived growth factor signal transduction. *Science* 270: 296-299, 1995
- 6) Mitsushita J, Lambeth JD, Kamata T: The superoxide-generating oxidase Nox1 is functionally required for Ras oncogene transformation. *Cancer Res* 64: 3580-3585, 2004
- 7) Schreck R, Rieber P, Baeuerle PA: Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-Kappa B transcription factor and HIV-1. *EMBO J* 10: 2247-2258, 1991
- 8) Irani K, Xia Y, Zweier JL, Sollott SJ, Der CJ, Fearon ER, Sundaresan M, Finkel T, Goldschmidt-Clermont PJ: Mitogenic signaling mediated by oxidants in Ras-transformed fibroblasts. *Science* 275: 1649-1652, 1997
- 9) Lambeth JD, Cheng G, Arnold RS, Edens WA: Novel homologs of gp91phox. *TIBS* 25: 459-461, 2000
- 10) Suh YA, Arnold RS, Lassegue B, Shi J, Xu X, Sorescu D, Chung AB, Griendling KK, Lambeth D: Cell transformation by the superoxide-generating oxidase Mox1. *Nature* 401: 79-82, 1999
- 11) Vignais PV: The superoxide-generating NADPH oxidase: structural aspects and activation mechanism. *Cell Mol Life Sci* 59: 1428-1459, 2002
- 12) Banfi B, Malgrange B, Knisz J, Steger K, Dubois-Dauphin M, Krause KH: Nox3: A superoxide-generating NADPHoxidase of the inner-ear. *J Biol Chem* 279: 46065-46072, 2004
- 13) Geiszt M, Kopp JB, Vamai P, Leto TL: Identification of renox, an NADPHoxidase in kidney. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 8010-8014, 2000
- 14) Shiose A, Kuroda J, Tsuruya K, Hirai M, Hidakata H, Naito S, Hattori M, Sakaki Y, Sumimoto H: A novel superoxide producing NAD(P)Hoxidase in kidney. *J Biol Chem* 276: 1417-1423, 2001
- 15) Banfi B, Molnar G, Maturana A, Steger K, Hegedus B, Demareux N, Krause KH: A Ca (2<sup>+</sup>)-activated NADPHoxidase in testis, spleen, and lymph nodes. *J Biol Chem* 276: 37594-37601, 2001
- 16) Edens WA, Sharling L, Cheng G, Shapira R, Kinkade JM, Lee T, Edens HA, Tang X, Sullards C, Flaherty DB, Benian GM, Lambeth JD: Tyrosine cross-linking of extracellular matrix is catalyzed by Duox, a multidiom

- oxidase/peroxidase with homology to the phagocyte oxidase subunit gp91 phox. *J Cell Biol* 154 : 879-891, 2001
- 17) Bokoch GM : Regulation of the human neutrophil NADPHoxidase by the Rac GTP-binding proteins. *Curr Opin Cell Biol* 6 : 212-218, 1994
  - 18) Banfi B, Clark RA, Steger K, Krause KH : Two novel proteins activate superoxide generation by the NADPH oxidase Nox1. *J Biol Chem* 278 : 3510-3513, 2003
  - 19) Geiszt M, Lekstrom K, Witta J, Leto TL : Proteins homologous to p47phox and p67phox support superoxide production by NADPH-oxidase 1 in colon epithelial cells. *J Biol Chem* 278 : 20006-20012, 2003
  - 20) Takeya R, Ueno N, Kami K, Taura M, Kohjima M, Izaki T, Nunoi H, Sumimoto H : Novel human homologues of p47phox and p67phox participate in activation of superoxide-producing NADPHoxidases. *J Biol Chem* 278 : 25234-25246, 2003
  - 21) Kawahara T, Kuwano Y, Teshima-Kondo S, Takeya R, Sumimoto H, Kishi K, Tshunawaki S, Hirayama T, Rokutan K : Role of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase1 in oxidative burst response to Toll-Like Receptor5 signaling in large intestinal epithelial cells. *J Immunol* 172 : 3051-3058, 2004
  - 22) Paffenholtz R, Bergstrom RA, Pasutto F, Wabnitz P, Munroe R, Jagla W, Heinzmann U, Marquardt A, Bareiss A, Laufs J : Vestibular defects in head-tilt mice result from mutation in Nox3, encoding an NADPH oxidase. *Genes Dev* 18 : 486-491, 2004
  - 23) Mahadev K, Motoshima H, Wu X, Ruddy JM, Arnold RS, Cgeng G, Lambeth D, Goldstein BJ : The NADPH oxidase homolog Nox4 modulates insulin-stimulated generation of medulates insulin-stimulated generation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and plays an integral role in insulin signal transduction. *Mol Cell Biol* 24 : 1844-1854, 2004
  - 24) Moreno JC, Bikker H, Kemoers MJ, Van Trotsenburg AS, Baas F, de Vijlder JJ, Vulsma T, Ris-Stalpers C : Inactivating mutations in the gene for thyroid oxidase 2 (THOX2) and congenital hypothyroidism. *N Engl J Med* 347 : 95-102, 2002
  - 25) Brar SS, Corbin Z, Kennedy TP, Hemendinger R, Thornton L, Bommarius B, Hoidal JR : Nox5 NAD(P)Hoxidase regulates growth and apoptosis in DU145 prostate cancer cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 285 : C353-C369, 2003
  - 26) Brar SS, Kennedy TP, Sturrock AB, Huecksteadt TP, Quinn MT, Whorton AR, Hoidal JR : An NAD(P)Hoxidase regulates growth and transcription in melanoma cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 282 : C1212-C1224, 2002
  - 27) Vaquero EC, Edderkaoui M, Pandol SJ, Gukovsky I, Gukovskaya AS : Reactive oxygen species produced by NAD(P)Hoxidase inhibit apoptosis in pancreatic cancer cells. *J Biol Chem* 279 : 34643-34654, 2004

(H 17. 5. 26 受稿)