

令和元年6月3日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08552

研究課題名（和文）組織線維化に関与する新たな酸化シグナリングの解明と治療戦略への応用

研究課題名（英文）Clarification of new oxidative signaling involved in tissue fibrogenesis and its application to therapeutic strategy

研究代表者

勝山 真人（Katsuyama, Masato）

京都府立医科大学・医学（系）研究科（研究院）・准教授

研究者番号：60315934

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,700,000円

研究成果の概要（和文）：組織線維化に関与するNOX4のノックダウンにより、TGF- $\beta$ 受容体の共役受容体であるエンドグリンの発現が蛋白レベルで減少することを見出した。阻害剤を用いた実験から、NOX4由来活性酸素種（ROS）がatypical PKCの活性調節を介してエンドグリンを安定化・膜表面での機能的発現を維持し、TGF- $\beta$ のシグナリングを増強することが示唆された。

一方、NOX4 mRNAよりわずかに4塩基だけ欠失したmRNAによりコードされるNOX4Aが、NOX4のN末端部分に相当する短い蛋白である可能性、またROSを産生する可能性を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

組織線維化は不可逆的な変化であり、根治可能な薬物療法は現在のところ存在しない。NOX4は活性酸素種（ROS）を産生するNADPHオキシダーゼの触媒サブユニットの一分子種であり、NOX4が産生するROSは組織線維化に重要な役割を果たすが、その分子機構は未解明の点が多い。

本研究では、NOX4由来ROSがTGF- $\beta$ のシグナリングを増強するメカニズムの一端を示唆する結果を得ることができた。またNOX4によるROS産生の一部がスプライスパリアントを介するものである可能性を明らかにした。本研究成果は新たな抗線維化薬の開発のための基礎的知見となるものと考えている。

研究成果の概要（英文）： It is well known that NOX4/NADPH oxidase is involved in fibrogenesis. In human lung fibroblasts transfected with siRNAs against NOX4, levels of endoglin, a co-receptor of TGF- $\beta$ , were reproducibly decreased at protein levels compared with those in control siRNA-transfected cells. Results from experiments using pharmacological inhibitors suggested that NOX4-derived reactive oxygen species (ROS) stabilize endoglin and maintain its functional expression at cell membranes by regulating atypical PKC.

On the other hand, NOX4A mRNA is a splice variant of NOX4 mRNA with only 4-base deletion in the coding region. Exogenous expression of NOX4A suggested that it is a small protein corresponding to the N-terminus of NOX4 and generates ROS.

研究分野：薬理学

キーワード：活性酸素 組織線維化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

組織の線維化は様々な疾患の終末像として見られる組織所見である。間質性肺炎や拡張型心筋症のほか、糖尿病性腎症や種々の肝炎においても病状が進行すると組織の線維化が起こる。線維化は不可逆的な変化であり、根治可能な薬物療法は現在のところ存在しない。我が国においては当時ピルフェニドンのみが特発性肺線維症の進行を抑制する抗線維化薬として臨床使用されていたが、明確な作用機序が不明であるのみならず、高頻度の光線過敏症をはじめとした有害作用も多いため、新たな抗線維化薬の開発が望まれていた。

近年、活性酸素種 (ROS) が組織の線維化に重要な役割を果たすことが明らかとなってきた。細胞内の主要な ROS 産生酵素のひとつは NADPH オキシダーゼであり、その触媒サブユニットである NOX には 5 種類のアイソフォームが存在する。申請者らは NOX1 ノックアウトマウスを作製し、NOX1 が肝星細胞の増殖と線維化に関与することを見出した (引用文献 1)。またアメリカのグループとの共同研究で、肝細胞の NOX4 が脂肪性肝炎における線維化に寄与することも報告した (引用文献 2)。また肺や腎臓などにおいても NOX4 由来 ROS が組織線維化に重要な役割を果たすことが報告され、NOX4 は新たな抗線維化薬の標的分子として注目されている (引用文献 3~5)。しかし組織線維化における NOX4 由来 ROS の下流シグナリングはほとんど解明されていないのが実情であった。

NOX4 は線維化に重要な役割を果たす TGF- $\beta$  の刺激により発現が誘導される。細胞内局在についてはミトコンドリア、ER、核内と諸説あり、未だ確定していない。これは NOX4 に対する特異性と感度の高い抗体が作製しにくいこと、および NOX4 に複数のスプライスバリエントが存在することに起因すると考えられた。

申請者はそれまでデータベース上でしか報告されていなかった、NOX4 mRNA よりわずかに 4 塩基だけ欠失した NOX4A mRNA が TGF- $\beta$  で刺激した肺由来線維芽細胞に発現し、ROS 産生活性を持つ可能性を見出していた。さらに NOX4 由来 ROS により酸化修飾を受けるシステイン残基を網羅的に解析し、NOX4 の発現量に依存して、コラーゲンとエラスチンのクロスリンクに参与するリジロオキシダーゼ (LOX) の mRNA 量が増加すること、また機能未知の新規蛋白 spermatogenesis associated, serine-rich 2-like (SPATS2L) が NOX4 由来 ROS の直接の標的候補のひとつであることを見出していた。

## 2. 研究の目的

本研究は NOX4 が関わる組織線維化シグナリングについて、以下のことを明らかにすることを目的に開始した。

- (1) NOX4 のスプライスバリエント NOX4A の分子構造およびその機能を明らかにする。
- (2) NOX4 由来 ROS により発現が増加する線維化関連酵素 LOX について、主に mRNA の安定化機構に焦点を当て、その発現誘導メカニズムを明らかにする。
- (3) NOX4 由来 ROS により直接酸化修飾を受ける新規蛋白 SPATS2L の線維化に果たす役割を、ゲノム編集により酸化修飾を受けない変異体を作製することにより明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1) 細胞培養

ヒト肺線維芽細胞株 IMR-90 細胞はイーグル培地 (アール塩含有) (1% 非必須アミノ酸と 10% ウシ胎仔血清を添加) で培養した。マウス胚性線維芽細胞株 NIH3T3 細胞はダルベッコ変法イーグル培地 (10% ウシ胎仔血清を添加) で培養した。ヒト TGF- $\beta$  1 (Peprotech 社) は 2  $\mu$ g/ml の濃度になるように 0.1% 牛血清アルブミン溶液 (pH 5.2) に溶解し、培地中に 1000 倍希釈して添加した。

### (2) IMR-90 細胞への siRNA の導入

ヒト NOX4 mRNA に対する siRNA またはコントロール siRNA (サーモフィッシャーサイエンティフィック社: 最終濃度 20 nM) をリポフェクタミン RNAiMAX 試薬 (サーモフィッシャーサイエンティフィック社) を用いて IMR-90 細胞へ導入した。24 時間後に TGF- $\beta$  1 を添加し、さらに 24 時間培養した。

### (3) ICAT 法による酸化システインの網羅的検出

TGF- $\beta$  1 で刺激した IMR-90 細胞からの蛋白抽出に際し、まず還元型のシステイン残基をあらかじめブロックするため、50 mM の N-エチルマレイミドを含む溶解バッファー (8M 尿素、4% CHAPS、50 mM トリス塩酸 pH8.5) に溶解した。次に 20 mM のトリス (2-カルボキシエチル) フォスファインで還元し、生じた還元システイン残基を Cleavable ICAT 試薬 (AB Sciex 社) で標識した。コントロール siRNA を導入した細胞は light 試薬で、NOX4 に対する siRNA を導入した細胞は heavy 試薬で標識した。トリプシン消化したペプチドを陽イオン交換カラムおよびアピジンカラムで精製した。得られたペプチドをナノ流速逆相クロマトグラフィー質量分析装置 (LTQ-Orbitrap Velos または Q-Exactive Orbitrap、サーモフィッシャーサイエンティフィック社) で測定し、質量スペクトルデータを Proteome Discoverer ソフトウェア (サーモフィッシャーサイエンティフィック社) を用いて解析した。

#### (4) 定量 PCR

TGF- $\beta$ 1 (2 ng/ml) 存在下で 24 時間培養した IMR-90 細胞とコントロールの細胞から、QIAGEN 社の RNeasy Plus Mini Kit を用いて total RNA を抽出した。TOYOBO 社の ReverTra Ace qPCR RT Master Mix および KOD SYBR qPCR Mix を用いて逆転写と PCR 反応を行った。反応と解析はサーモフィッシャーサイエンティフィック社の StepOnePlus を用いて行った。段階希釈したプラスミドを対照に絶対定量を行い、ヒポキサンチンホスホリボシルトランスフェラーゼ (HPRT) の発現量を指標に補正を行った。

#### (5) ウェスタンブロット

細胞から総蛋白を抽出し、定法により SDS-PAGE とウェスタンブロットを行った。目的の蛋白を検出した後抗体を除去し、 $\beta$ -actin の検出を行った。

#### (6) DNA マレイミドを用いたウェスタンブロット法

ICAT 法における蛋白の調製と同様に、還元型システイン残基のブロッキングと酸化システインの還元を行い、生じた還元システイン残基を DNA マレイミド (-SulfoBiotics- Protein Redox State Monitoring Kit Plus: 同仁化学) で標識した。標識前の総蛋白と DNA マレイミドで標識した蛋白を用いて定法によりウェスタンブロット法を行った。

#### (7) ルシフェラーゼアッセイ

IMR-90 細胞から LOX mRNA の 3' 非翻訳領域を PCR により単離し、その全長または欠失変異体を miRNA 効果検定用ルシフェラーゼベクター pmirGLO (プロメガ社) に組み込んだ。24 ウェルプレートで培養した IMR-90 細胞に TransIT-X2 試薬 (Mirus 社) を用いてベクターおよび NOX4 に対する siRNA を導入し 24 時間培養した。Dual-Luciferase Assay System (プロメガ社) を用い、細胞抽出液の転写活性を発光測定器で測定した。

#### (8) 活性酸素種 (ROS) の定量

HEK293 細胞にプラスミドベクターまたはレンチウイルスベクターを用い、一過性または安定にヒト NOX4 あるいは NOX4A の cDNA を発現させた。基本的に 96 ウェルプレートに細胞を播種し、以下の測定を行った。

AmplexRed (サーモフィッシャーサイエンティフィック社) による  $H_2O_2$  の測定は、蛍光プレートリーダーを用いて行った。ROS-Glo  $H_2O_2$  アッセイ (プロメガ社) による  $H_2O_2$  の測定は、発光検出器を用いて行った。Peroxy orange-1 (TOCRIS 社) あるいは BES- $H_2O_2$ -Ac (和光純薬) による  $H_2O_2$  の測定は、In Cell Analyzer 2200 (GE ヘルスケア) により行った。 $H_2O_2$  検出用蛍光蛋白 HyPer にミトコンドリアまたは核移行シグナルを連結したプラスミド (evrogen 社) は HEK293 細胞にトランスフェクションを行い、In Cell Analyzer 2200 を用いて  $H_2O_2$  の測定を行った。さらに高感度の HyPer-3 あるいは HyPer-Red を Addgene 社から購入し、ミトコンドリアまたは核移行シグナルを連結して同様の実験を行った。

#### (9) NOX4 がコードする蛋白の分子量の推定

ヒト NOX4 あるいは NOX4A の推定 C 末端に myc タグを連結し、HEK293 細胞に発現させ、抗 myc タグ抗体を用いてウェスタンブロットを行った。また同様に推定 C 末端に HiBiT タグを連結し、HEK293 細胞に発現させ、Nano-Glo HiBiT Blotting System (プロメガ社) を用いて発光検出を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) NOX4 由来 ROS の標的蛋白の再検証

申請者は NOX4 のノックダウンにより、コラーゲンとエラスチンのクロスリンクに関与するリジロキシダーゼ (LOX) が mRNA レベルで減少することを見出していた。ヒト LOX mRNA の 3' 非翻訳領域を単離し、その全長および種々の欠失変異体を miRNA 効果検定用ルシフェラーゼベクターに挿入して肺由来線維芽細胞に導入し、NOX4 に対する siRNA により発光量が減少する領域を同定した。しかし用いた siRNA と一部が完全に相補的な配列だったことから、一連の現象がオフターゲット効果によるものであることが判明した。

申請者が見出した、NOX4 由来 ROS による新規蛋白 SPATS2L の酸化修飾に関する所見についても、NOX4 に対する同じ siRNA を用いることによって得られたものであった。そこで NOX4 由来 ROS の標的蛋白の同定については、NOX4 に対する別の siRNA を用いた網羅的解析を行い、複数の siRNA で再現性が得られる蛋白を新たに探索した。

前回用いた LTQ-Orbitrap Velos (リニアイオントラップによる CID MS/MS) に加え、高精度の Q-Exactive Orbitrap (コリジョンセルによる HCD MS/MS) を用いて検討したが、両装置で測定条件が異なるためか、再現よく検出される候補分子は極めて少なかった。SPATS2L についても今回は候補分子として検出することができなかった。

新たに候補として同定された 4 種類の蛋白について、定量 PCR 法により mRNA 量の変化を確認したところ、いずれも NOX4 に対する RNA 干渉の影響は認められなかった。またウェスタンブロット法では、候補蛋白 A (コラーゲンのクロスリンクに関わるとされる酵素) は抗体の問題か

ら検出が困難であった。候補蛋白 B、C については発現量の変化は認められなかったが、NOX4 の発現抑制による酸化修飾の変化は再現できなかった。最後の候補蛋白は、TGF- $\beta$  受容体の共役受容体であるエンドグリンであった。エンドグリンは NOX4 に対する RNA 干渉で蛋白量自体が減少した。

結果的に NOX4 由来 ROS が直接酸化修飾する標的蛋白は同定できなかった。NOX4 に対するある siRNA によって LOX の発現が抑制されるという現象は、いわゆるオフターゲット効果であった。しかしデータベースをサーチすると、この siRNA の標的配列を認識する miRNA が存在することが判明した。NOX4 と LOX を同時に標的とし得るこの miRNA が、組織線維化を抑制する因子として作用することも考えられ、今後の検討課題である。一方 NOX4 のノックダウンによるエンドグリンの蛋白量の減少は複数の siRNA で確認できたことから、オフターゲット効果を介するものではないと考えられた。TGF- $\beta$  受容体の共役受容体であるエンドグリンの発現が NOX4 の発現と連関することは、ROS が組織線維化のシグナルを増強する可能性を示唆している。そこでエンドグリンの発現に関与する情報伝達系を解析することとした。

#### (2)NOX4 のノックダウンによるエンドグリンの発現低下とそのメカニズム

NOX4 のノックダウンによるエンドグリンの蛋白量の減少は、プロテアソーム阻害剤の MG132 では抑制されなかったが、リソソーム阻害剤のバフィロマイシン A1 で抑制されたことから、ユビキチン-プロテアソーム系ではなくリソソームによる分解を介するものであると考えられた。またこの蛋白量の減少はプロテインキナーゼ  $\alpha$  (PKC) の阻害剤である GF109203X や atypical PKC (aPKC) の偽基質配列ペプチドによっても抑制されたことから、NOX4 由来 ROS が aPKC の活性調節を介してエンドグリンを安定化・膜表面での機能的発現を維持し、TGF- $\beta$  のシグナリングを増強しているものと考えられた。

#### (3)NOX4A mRNA の強制発現による ROS 産生の検証

申請者は NOX4 mRNA よりわずかに 4 塩基だけ欠失したスプライスバリエーション・NOX4A mRNA が肺由来線維芽細胞に発現することを見出した。HEK293 細胞に強制発現させたところ、 $H_2O_2$  を検出する蛍光試薬 Amplex Red では蛍光の増強は認められなかったが、蛍光試薬を用いる ROS-Glo  $H_2O_2$  アッセイでは蛍光の増強が認められた。

そこで  $H_2O_2$  検出用蛍光プローブを用いた顕微鏡観察、さらに  $H_2O_2$  検出用蛍光蛋白誘導体に核、ミトコンドリアへの移行シグナルを連結した発現ベクターと、NOX4A mRNA 発現ベクターを細胞に導入し、蛍光顕微鏡を用いて  $H_2O_2$  産生の可視化を試みたが、NOX4A mRNA 発現による明確な  $H_2O_2$  産生の増強は認められなかった。

用いた蛍光プローブと  $H_2O_2$  検出用蛍光蛋白誘導体の感度の問題もあると考えられるが、これまで NOX4A mRNA 発現による ROS 産生はパーオキシナイトライトとも反応する ROS-Glo  $H_2O_2$  アッセイでしか検出されていない。この現象がパーオキシナイトライトの産生を介する可能性を考え、他の ROS 産生酵素や NO 産生酵素の発現誘導、あるいは ROS 消去系酵素の発現抑制を介するものかどうかを、今後検討する必要がある。

#### (4)NOX4A mRNA がコードする蛋白の分子量の検証

NOX4A mRNA は NOX4 mRNA の coding region の 5' 側に近い部分で 4 塩基だけ欠失しているため、フレームシフトが起こる。そのコードする蛋白は、NOX4 の N 末端が欠失した蛋白か、あるいは N 末端部分だけの短い蛋白ということが予想される。

そこでまず、NOX4A は NOX4 の N 末端が欠失した蛋白だと予想し、想定翻訳開始点から合成される蛋白の C 末端に Myc タグを連結した蛋白を発現するベクターを構築し、培養細胞に発現させて Myc タグに対するウエスタンブロットを行った。しかし抗体の特異性、あるいは融合蛋白へのアクセスの問題のためか、明確な蛋白の検出は認められなかった。

NOX4A mRNA が蛋白をコードしない long non-coding RNA として機能する可能性も考えられたが、N 末端部分だけの短い蛋白をコードする可能性も考え、次に HiBiT タグを用いた蛋白の検出を試みた。

NOX4 と想定蛋白 (NOX4 の N 末端が欠失した蛋白: NOX4A-C、あるいは NOX4 の N 末端部分: NOX4A-N) の C 末端に HiBiT タグを連結した蛋白を発現するベクターを構築し、培養細胞に発現させてプロット・蛍光検出を行った。NOX4A-C を発現させた場合、検出されるバンドの強度は NOX4 を発現させた場合にバックグラウンドとして検出されるバンドの強度と同等であった。一方 NOX4A-N を発現させた場合、10 kDa に満たない大きさのバンドが強く検出された。このことから、NOX4A mRNA は NOX4 の N 末端部分に相当する短い蛋白をコードする可能性が高くなった。

#### <引用文献>

- 1) Cui W et al. Hepatology 54, 949-958, 2011.
- 2) Bettaieb A et al. Gastroenterology 149, 468-480, 2015.
- 3) Hecker L et al. Nat Med 15, 1077-1081, 2009.
- 4) Jiang JX et al. Free Radic Biol Med 53, 289-296, 2012.
- 5) Eid AA et al. Diabetes 62, 2935-2947, 2013.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1件)

Mori K, Uchida T, Yoshie T, Mizote Y, Ishikawa F, Katsuyama M, and Shibamura M. (2019)  
A mitochondrial ROS pathway controls matrix metalloproteinase 9 levels and invasive properties in RAS-activated cancer cells. FEBS J 286, 459-478. 査読有

〔学会発表〕(計 1件)

勝山真人、荒川憲昭、矢部千尋. NOX4/NADPH オキシダーゼによる TGF- $\beta$  共役受容体エンドグリンの発現制御. 第 92 回 日本薬理学会年会. 2019 年 3 月 16 日. 大阪国際会議場 (大阪府大阪市).

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況 (計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号 (8桁)：

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：岩田 和実

ローマ字氏名： IWATA, Kazumi

研究協力者氏名：矢部 (西村) 千尋

ローマ字氏名： YABE-NISHIMURA, Chihiro

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。