

令和 2 年 6 月 22 日現在

機関番号：23701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10248

研究課題名(和文) 色素細胞特異的な白斑誘導物質の細胞障害性評価系の確立と障害メカニズムの解明

研究課題名(英文) Establishment of a cytotoxicity evaluation system for pigment cell-specific vitiligo-inducing substances and elucidation of the mechanism of damage

研究代表者

井上 紳太郎 (Inoue, Shintaro)

岐阜薬科大学・薬学部・特任教授

研究者番号：00793853

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：NRF2は、ロドデンドロール(RD)によるメラノサイト(MC)の細胞障害性の再現性良い評価の妨げとなる。そこで、白斑リスク物質のMC障害性をNRF2ノックアウト(KO)ヒトメラノーマ(MN)細胞で評価した。遺伝子配列の異なる2種のNRF2-KOクローンを得てRD細胞障害性を調べたが予想に反しNRF2+株と差がなかった。NRF2-KO株のGPNMB(尋常性白斑表皮での発現消失を確認済み)をノックダウンすると、RD細胞障害性が増加しrGPNMB添加で回復した。GPNMBはNRF2-KO株での白斑リスク化合物評価を妨げるが、酸化ストレス誘発性疾患での細胞障害をNRF2非依存的に防御する可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ロドデノール(RD)は尋常性白斑類似の色素脱失症を誘発する。正常メラノサイトでは、再現良いRD障害性リスク評価がNRF2系により妨げられたため、NRF2欠損メラノーマ株作出による高再現性評価系の確立、および酸化ストレス抵抗性メカニズム解明による診断・予防・治療への応用を目指した。本研究で、酸化ストレス誘導細胞障害性に対するGPNMBのNRF2非依存的抵抗性を明らかにした学術的意義は高い。我々は、尋常性白斑病変部の表皮GPNMB発現の消失と、IFN γ /IL-17による発現抑制を見い出しており(Biswas et al., 2020)、白斑発症や維持におけるGPNMB関与解明の端緒となる。

研究成果の概要(英文)：NRF2 system disturbs the reproducible evaluation of rhododendrol (RD)-induced melanocyte cytotoxicity. So, we clarified whether human melanoma cells carrying NRF2-KO gene are available for evaluation of vitiligo risk compounds. We obtained two NRF2-KO clones with different deletion mutations were established, however, the cytotoxicity of risk compounds in both NRF2-KO cells was unexpectedly comparable with that of NRF2(+) clones. Knocked down of GPNMB in NRF2-KO cells, which has been shown to disappeared in vitiligo epidermis by our study, showed an increased RD cytotoxicity, but it was rescued by the addition of recombinant GPNMB. These findings indicated that NRF2-KO melanoma cells were unavailable for evaluation of vitiligo risk compounds due to the compensatory action of anti-oxidative GPNMB with the NRF2-independent manner. GPNMB might be involved in cellular anti-oxidative activity in normal and oxidative stress-induced disease cells.

研究分野：皮膚科学

キーワード：ロドデノール メラノーマ 化学白斑 酸化ストレス NRF2 GPNMB

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

医薬部外品有効成分ロドデノール (RD: rhododendrol) を含有した美白化粧品使用者に、尋常性白斑と類似した色素脱失症が出現した。申請者は、RD がチロシナーゼ (TYR) 活性依存的にメラノサイト特異的な細胞障害を惹起すること、NRF2 酸化ストレス応答系がグルタチオンの産生を介して細胞障害を防御することを見出し、両者のバランス破綻が色素脱失症の要因である可能性を示した。RD 以外の環境中や産業上使用される化合物のメラノサイト細胞障害性を評価し、白斑リスクを予測することが望まれるが、正常メラノサイトでは障害性に関わる複数の背景因子の違いにより RD 障害性が不安定になる問題点があった。

2. 研究の目的

本研究は、RD などの白斑発症リスク化合物を安定評価でき、かつ細胞障害に影響を与える未知の要因の探索ができる遺伝子改変 (NRF2 ノックアウト) メラノーマ株を作成する。本細胞株を用いた汎用性の高い細胞障害性評価系を確立するとともに、白斑発症におけるメラノサイト障害メカニズム解明により診断・予防・治療法を提案することを目的とする。

3. 研究の方法

どの研究機関でも用いることができるヒトメラノーマ株から、細胞増殖性、RD 感受性、TYR 遺伝子発現量などを指標にゲノム編集に供するメラノーマ細胞株を選択し、CRISPR-Cas9 システムにより NRF2 遺伝子を改変する。細胞生存性は CCK-8 を用い、mRNA およびタンパク質発現量の評価は、リアルタイム PCR、ウエスタン・ブロット法をそれぞれ用いた。各遺伝子のノックダウンは siRNA を用いた。

4. 研究成果

(1) ヒトメラノーマ細胞株からの NRF2 遺伝子ノックアウトクローン株の作製

細胞接着性と増殖能を基準に選んだメラノーマ細胞 6 株の中から RD 細胞障害性 (IC50 値: 3.1 ~ 10 mM) と TYR mRNA 発現量を考慮してゲノム編集用として A2058 株を選択し NRF2 のノックアウト (KO) クローン株を作成した。NRF2 タンパク質の消失を確認し、遺伝子内で TT G 置換および GATT 欠損した 2 種の株 (クローン #12 および #23 株) を得た。クローン #34 および #38 株は、NRF2 活性化剤の t-ブチルヒドロキノン (tBHQ) の添加により、プロテオソーム阻害剤 MG132 の存在下で陽性バンドが 2 本出現し、そのバンドは NRF2 siRNA 処理で消失した (図 1)。一方、クローン #12 および #23 株では、tBHQ 処理しても NRF2 のバンドは全く認められなかった (図 1)。また、NRF2 の遺伝子配列解析により、#12 株は遺伝子内で TT G 置換、#23 株は GATT 欠損しており、異なる変異に基づく NRF2-KO クローンであることが分かった。以上の結果から、クローン #12 および #23 を NRF2-KO 株とし、クローン #34 および #38 は NRF2+ 対照株とした。

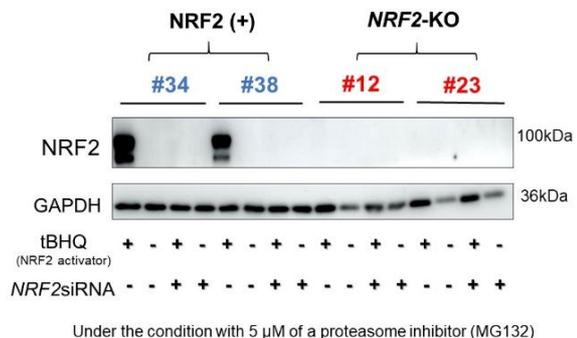


図 1. NRF2-KO クローン株の NRF2 タンパク質の発現解析

(2) NRF2-KO 株の RD および H₂O₂ 感受性評価

NRF2-KO 株では NRF2 が存在しないので、RD や H₂O₂ に対する細胞障害感受性が高まることが期待されるが、予想に反し NRF2-KO 株の RD および H₂O₂ に対する感受性 NRF2 陽性対照株と比べて差がなかった (図 2)。そこで、NRF2-KO 株 (クローン #12 および #23) で NRF2 支配下の抗酸化遺伝子群が誘導されていないことを確認するために、tBHQ を添加したところ、予想に反し、NRF2 の KO 株にも関わらず用量依存的に NRF2 標的遺伝子群 (HO-1, GCLC, NQO-1) が誘導された (図 3)。したがって本 KO 株では RD や酸化ストレスによる細胞障害性に対する防御に NRF2 は関与せず、未知の転写因子誘導による抗酸化酵素群が寄与している可能性が示された。

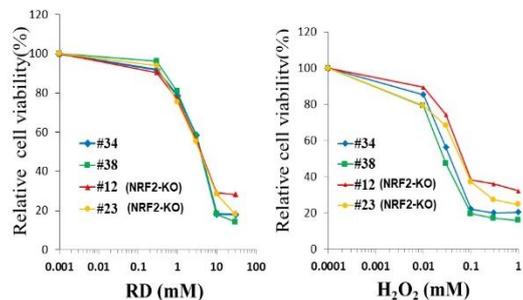
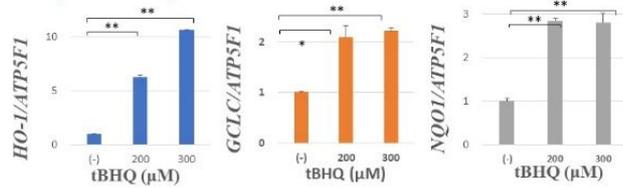


図 2. NRF2-KO 株の RD および H₂O₂ に対する細胞障害感受性

上記 4 クローンは A2058 株に比べ TYR mRNA を高発現したが、TYR mRNA のノックダウンによっても RD 感受性に大差なく、他のメラノーマ株でも同様の結果が得られた。残存する TYR 活性により生じた RD キノンが細胞障害性の引鉄を引いた可能性は除外できないが、メラノーマにおける RD 細胞障害性は正常メラノサイトとは異なる酸化ストレスの関与したメカニズムで誘導されている可能性がある。

#12 (NRF2-KO)



#23 (NRF2-KO)

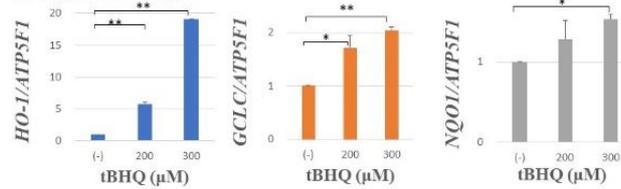


図3. tBHQによるNRF2-KO株の抗酸化酵素誘導

(3) NRF2 に依存しない抗酸化因子の解明

NRF2 に依存しない抗酸化因子の候補として、細胞保護タンパク質として知られている糖タンパク質非転移性黒色腫タンパク質 B (GPNMB) に着目した。なぜなら、我々は、GPNMP が尋常性白斑病変部表皮から消失すること、培養ヒト表皮細胞で白斑の病態形成に参与すると考えられている IFN- α および IL-17 により GPNMB 発現が抑制されることを別途見出ししていたからである (Biswas KB *et al.* (2020) *Sci Rep.* 10(1):4930. doi: 10.1038/s41598-020-61931-1.)。

NRF2-KO(#23) および NRF2+ 細胞(#34)で GPNMB をノックダウンすると、両細胞株ともに RD および H₂O₂ による細胞障害性がともに増加したことから (図4) 本メラノーマ細胞株には、NRF2 の有無に関わらず GPNMB が RD や H₂O₂ に対する細胞障害性に対し防御的にはたらいている可能性が示唆された。

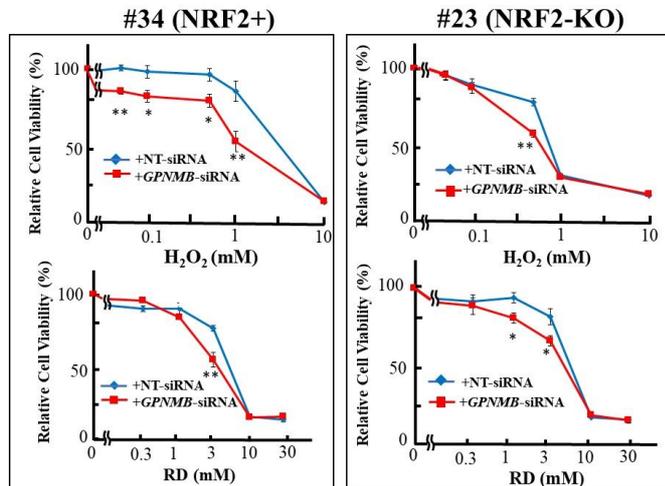


図4. GPNMBノックダウンによる細胞障害感受性の増大

そこで、NRF2-KO(#23)および NRF2+細胞(#34)の GPNMB をノックダウンし、0.5 mM H₂O₂ を添加して細胞障害を与えた (図5、細胞生存率約 80%)。このとき、GPNMB の細胞外ドメイン (組換え体 GPNMB) の添加により用量依存的に細胞生存率が増加した (図5)。

以上の結果は、NRF2 の存在の有無に関わらず、GPNMB の細胞外ドメインは酸化ストレスに対する防御因子であることが示唆された。一方、NRF2 を有する正常なヒト表皮細胞における GPNMB のノックダウンも H₂O₂ に対する細胞障害性を増加させ、組換え体 GPNMB の添加により回復した。

これらの結果から、以下の点が明らかになった。

1) ヒトメラノーマ A2058 株由来の NRF2+ および NRF2-KO クローン株は、NRF2 に依存しない抗酸化システムとして GPNMB が存在し、RD や H₂O₂ に対する細胞障害性に防御的にはたらく。

2) NRF2 を KO しても、メラノーマ細胞株は RD に対する感受性が上がり、RD 細胞性障害メカニズムは TYR 非依存的で、正常メラノサイトと異なる (白斑リスク物質の評価系に NRF2-KO メラノーマ細胞株は適さない)。

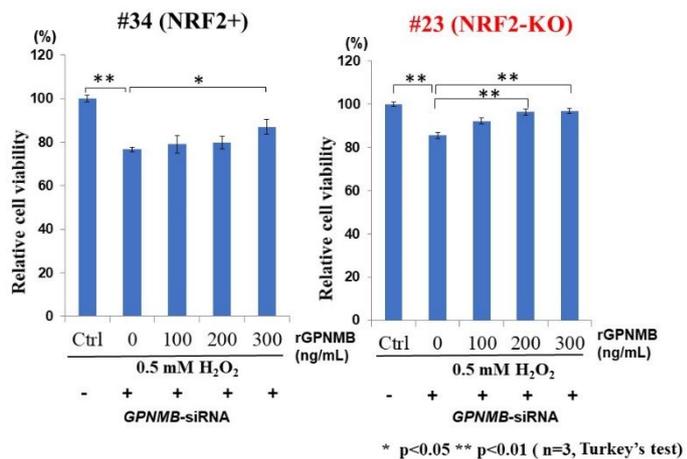


図5. rGPNMBによる用量依存的な細胞障害性回復効果

* p<0.05 ** p<0.01 (n=3, Turkey's test)

GPMB は、正常および酸化ストレス誘発性疾患細胞の細胞抗酸化活性に関与している可能性がある。今後は、白斑リスク物質の再現性および汎用性の高い評価系に確立には、メラノサイトへの分化誘導可能な幹細胞あるいは不死化メラノサイトなど他の細胞で評価に適切な細胞株を樹立するための検討が必要である。

さらに、GPMB がどのようなメカニズムでメラノーマの酸化ストレス抵抗性に関わるのか？、酸化ストレスが関わる化学白斑や尋常性白斑の発症や維持における GPMB 役割についてさらなる検討が望まれる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Nishida N, Ishitsuka A, Mizutani Y, Nakayama H, Higashiyama S, Inoue S.
2. 発表標題 Compensatory action of anti-oxidative GPNMB in NRF2-deficient human melanoma clones to evaluate vitiligo-risk compounds.
3. 学会等名 The 24th International Pigment Cell Conference (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Inoue S.
2. 発表標題 Keratinocyte GPNMB is involved in the development of chemical vitiligo?
3. 学会等名 The 24th International Pigment Cell Conference (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Nishida N, Ishitsuka A, Nakayama H, Higashiyama S, Inoue S.
2. 発表標題 Evaluation of vitiligo risk compounds against in vitro cytotoxicity using NRF2-KO clones obtained from human melanoma cells.
3. 学会等名 The 2nd Meeting of The Japanese Society of Vitiligo
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Inoue S.
2. 発表標題 Expression and regulation of Glycoprotein Non-melanoma B/Osteoactivin (GPNMB) in normal human epidermal keratinocytes and vitiligo skins.
3. 学会等名 The 5th Meeting of The Society of Vitiligo・Leukoderma. (招待講演)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	水谷 有紀子 (Mizutani Yukiko) (30396296)	岐阜薬科大学・薬学部・特任准教授 (23701)	
研究 分担者	石塚 麻子 (Ishituka Asako) (50727203)	岐阜薬科大学・薬学部・研究補佐員 (23701)	
連携 研究者	東山 繁樹 (Higashiyama Shigeki) (60202272)	愛媛大学・プロテオサイエンスセンター・教授 (16301)	
連携 研究者	中山 寛尚 (Nakayama Hironao) (40512132)	愛媛大学・プロテオサイエンスセンター・助教 (16301)	現職；広島国際大学，保健医療学部，講師