

令和 4 年 6 月 6 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07326

研究課題名（和文）NOX4由来活性酸素種による組織線維化増悪メカニズムの解明

研究課題名（英文）Study on mechanisms of exacerbation of tissue fibrogenesis by NOX4-derived reactive oxygen species

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） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：組織線維化に関与するNOX4の発現抑制により、TGF- $\beta$  受容体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。TGF- $\beta$  刺激によるSmad結合配列依存的な転写活性化がNOX4の発現抑制により抑制されたことから、TGF- $\beta$  で発現が誘導されるNOX4と、NOX4により機能的発現が維持されると考えられるエンドグリンの間には、線維化を増悪させるfeedforward regulationが存在することが示唆された。

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「TGF- $\beta$  NOX4の発現誘導 エンドグリンの機能的発現維持 TGF- $\beta$  シグナルの増強」という線維化増悪サイクルの存在が示唆された。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 induced at mRNA levels by TGF- $\beta$  and is involved in fibrogenesis. In human lung fibroblasts transfected with siRNAs against NOX4, levels of endoglin, a co-receptor of TGF- $\beta$  receptor, were decreased at protein levels compared with those in control siRNA-transfected cells. Smad binding element-dependent transcriptional activation by TGF- $\beta$  was suppressed by RNA interference against NOX4. These results suggest that feedforward regulations to exacerbate tissue fibrogenesis exist between NOX4 and endoglin of which functional expression seems to be maintained by NOX4-derived reactive oxygen species.

研究分野：薬理学、分子生物学

キーワード：活性酸素種 NADPHオキシダーゼ 組織線維化

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

組織の線維化は間質性肺炎や肝硬変といった様々な疾患の終末像として見られる組織所見である。特発性肺線維症に対して二種類の薬物が臨床使用されているが、両者とも線維化の進行は抑制するものの既に線維化した組織を修復することはできず、また副作用が強いため、新たな抗線維化薬の開発が望まれている。

近年、活性酸素種 (ROS) が組織線維化の重要なメディエーターであることが明らかとなってきた。ROS 産生酵素である NADPH オキシダーゼの触媒サブユニット・NOX には 5 種類のアイソフォームが存在する。申請者は国外共同研究により、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を報告した (Bettaieb et al., 2015)。肺においても線維芽細胞の筋線維芽細胞への分化を誘導することから (Hecker et al., 2009) 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。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。

申請者は TGF- $\beta$  刺激による NOX4 の発現誘導機構を解析するとともに、NOX4 由来 ROS により酸化修飾を受ける蛋白のシステイン残基を網羅的に解析し、以下の事象を発見していた。

- 1) 肺由来線維芽細胞において、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蛋白量が減少することを見出した。この蛋白量の減少はリソソーム阻害剤、あるいは atypical protein kinase C (aPKC) 阻害剤により抑制された。このことから、NOX4 由来 ROS が aPKC の活性を抑制し、エンドグリンの分解を抑制することにより TGF- $\beta$  のシグナルを増強する可能性が考えられた。
- 2) データベース上でしか報告のない、NOX4 mRNA が 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することを見出した。NOX4A mRNA を強制発現させた細胞では ROS 産生が亢進した。またその翻訳産物は NOX4 の N 末端約 50 アミノ酸に相当する構造であったことから、NOX4A は直接 ROS を産生するのではなく ROS 産生を増強するのではないか、という仮説に至った。

### 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目的で開始した。

- 1) TGF- $\beta$  受容体共役受容体であるエンドグリンの安定化を介して線維化シグナルを増幅すると考えられる「NOX4 による aPKC の活性抑制機構」を明らかにする。
- 2) 申請者が新たに見出し、組織線維化に關与する ROS の供給源のひとつと考えられる「NOX4 の N 末端スプライスバリエント NOX4A」の ROS 産生亢進機構を明らかにする。

### 3. 研究の方法

#### (1) 細胞培養

ヒト肺線維芽細胞株 IMR-90 細胞および TIG-3 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。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) 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) 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) を用いて細胞へ導入した。24 時間後に各種阻害剤を添加し、さらに 24 時間培養した。

#### (3) 定量 PCR

TGF- $\beta$  1 存在下で 24 時間培養した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。

#### (4) 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、 $\alpha$ -actin の検出を行った。

#### (5) ルシフェラーゼアッセイ

最少プロモーターあるいは Smad binding element (SBE) を連結したルシフェラーゼベクター

pGL4.27[luc2P/minP/Hygro]およびpGL4.48[luc2P/SBE/Hygro]、および導入効率補正用ベクターpGL4.74[hRluc/TK]をプロメガ社から購入した。24 ウェルプレートで培養した TIG-3 細胞に TransIT-2020 試薬 (Mirus 社) を用いてルシフェラーゼベクター、導入効率補正用ベクター、および NOX4 に対する siRNA を導入し、48 時間培養した。血清不含培地で 2 時間培養した後、TGF- $\beta$ 1 で 3 時間刺激した。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。

#### (6) NOX4A の細胞内局在の解析

ヒト NOX4 あるいは NOX4A の C 末端に HiBiT タグを連結し、HEK293 細胞に発現させた。細胞分画用キット (Merck 社製 ProteoExtract Subcellular Proteome Extraction Kit および ATTO 社製 EzSubcell Fraction) を用いて細胞分画を行った。各画分を SDS-PAGE で分離後 PVDF 膜に転写し、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 のノックダウンによるエンドグリンの発現低下メカニズム

NOX4 のノックダウンによるエンドグリンの蛋白量の減少がリソソームによる分解を介するものであること、また atypical protein kinase C (aPKC) が関与することがこれまでに明らかとなっていた。aPKC には PKC  $\alpha$  と PKC  $\zeta$  が存在するが、IMR-90 細胞には PKC  $\zeta$  しか発現しておらず PKC  $\alpha$  の関与が考えられた。また NOX4 に対する siRNA を導入した細胞では、ウエスタンブロットで若干高分子側にシフトしたバンドが検出されたことから、NOX4 の発現抑制により PKC  $\zeta$  が何らかの修飾・活性化を受けることが考えられた。aPKC がセラミドにより活性化されるとの報告があることから、膜からセラミドを切り出す中性スフィンゴミエリナーゼ (nSMase) の阻害剤である GW4869 を用いたところ、NOX4 のノックダウンによるエンドグリンの発現低下は抑制された。3 種類の nSMase のうち IMR-90 細胞に発現する nSMase3 に対する RNA 干渉により、NOX4 のノックダウンによるエンドグリンの発現低下は抑制された。

NOX4 由来 ROS による nSMase3 の酸化還元状態の変化をウエスタンブロット法により確認しようと試みたが、明確な変化は観察されなかった。また NOX4 に対する RNA 干渉の nSMase 活性に及ぼす影響を、nSMase 活性測定キットを用いて解析しようと試みたが、nSMase3 を含む画分の調製の困難さ (Moylan et al., 2014) もあり、データを取得できなかった。一方膜透過性のセラミド誘導体である C6 セラミドがエンドグリン蛋白量を減少させたことから、エンドグリンの発現はセラミドにより調節されることが示唆された。

細胞内のセラミド濃度は、SMase を介するスフィンゴミエリンの分解あるいはセラミドシンターゼによる de novo のセラミド合成と、セラミダーゼによる分解により調節されている。そこで酸性セラミダーゼ阻害薬の ARN14988、アルカリセラミダーゼ ACER2 および ACER3 に対する siRNA、セラミドシンターゼを阻害する Fumonisin B1 の効果を確認したが、エンドグリン蛋白量に対する明確な効果は確認できなかった。

以上のことから、NOX4 由来 ROS が nSMase3 の活性を抑制し、セラミドにより活性化される PKC  $\zeta$  の活性抑制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する可能性が示唆された。nSMase3 は小胞体に局在することが報告されており (Corcoran et al., 2008) 小胞体膜に局在するとの報告がある NOX4 と局在部位が一致する。NOX4 由来 ROS による nSMase3 の活性抑制機構については直接的なものであるのか、あるいは他の分子を介する間接的なものであるのかも含め、さらなる検討が必要である。

#### (2) NOX4 のノックダウンによる TGF- $\beta$ シグナリングの低下

NOX4 のノックダウンによりエンドグリンの発現が低下すると、受容体を介する TGF- $\beta$  のシグナル伝達も抑制されると考えられる。TGF- $\beta$  の古典的なシグナル伝達経路は転写因子 Smad2/3/4 を介する転写活性化である。そこでレポーターアッセイにより、TGF- $\beta$  の Smad を介する転写活性化に対して NOX4 のノックダウンが与える影響を解析した。

IMR-90 細胞は増殖が遅く扱いが困難なため、同じくヒト肺由来線維芽細胞である TIG-3 細胞を用いて解析した。まず NOX4 に対する RNA 干渉によりエンドグリンの発現が蛋白レベルで減少することを確認した。TIG-3 細胞に Smad binding element (SBE) を連結したルシフェラーゼベクターと NOX4 に対する siRNA を導入し、TGF- $\beta$  で刺激した際の転写活性化を比較したところ、SBE 依存的な転写活性化は NOX4 に対する RNA 干渉で有意に抑制された。TGF- $\beta$  で発現が誘導される NOX4 と、NOX4 により機能的発現が維持されると考えられるエンドグリンの間には、組織線維化を増悪させる feedforward regulation が存在することが示唆された。

#### (3) NOX4A の細胞内局在

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 末端約 50 アミノ酸に相当する構造であることがこれまでに明らかとなっていた。

NOX4 と NOX4A の細胞内局在について、細胞分画による解析を試みた。NOX4 と NOX4A 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、HEK293 細胞に発現させて細胞分画を行い、SDS-PAGE、ブロット、発光検出を行った。

まず Merck 社の ProteoExtract Subcellular Proteome Extraction Kit を用いて細胞分画を行ったところ、NOX4 は 細胞質、膜・オルガネラ（ミトコンドリア、ミクロソーム）、核、細胞骨格、の全ての画分でバンドが強く検出されたが、での発現が最も高かった。NOX4A もでの発現が最も高かったが、他の画分での発現は比較的低かった。

一方 ATTO 社の EzSubcell Fraction を用いて細胞分画を行ったところ、①核、②ミトコンドリア、③ミクロソーム、④細胞質、のうち、NOX4、NOX4A とともに④以外の画分でバンドが検出された。NOX4 は②で最もバンドが強く検出されたが、NOX4A は①と②で同等に強く検出された。

これまで NOX4 の細胞内局在については、ミトコンドリア、小胞体、核と、報告によって異なっていた。しかし近年発表された論文 (Beretta et al., 2020) では、NOX4 がミトコンドリアそのものではなくミトコンドリア関連小胞体膜 (MAM) に局在することが示され、検出系によってはミトコンドリアや核にも NOX4 が局在するという解釈になり得ることが判明した。申請者が用いた 2 つの細胞分画用キットから得られた結果については、強制発現系であることによる人為的結果である可能性と、両キットの分画原理の違いによる結果の相違と分画過程で不可避の画分同士のコンタミネーションの影響が排除できないが、NOX4 が MAM に局在しているという報告とは乖離するものではない。NOX4A についても MAM に局在するものと考えられるが、①と②で同等に強く検出されたという結果は、核膜の外膜が小胞体膜とつながっているということ を考慮すると、NOX4 に比して核に近い小胞体膜にも局在している可能性も考えられる。NOX4A の細胞内局在については、さらなる詳細な検討を要する。

#### < 引用文献 >

- 1) Bettaieb A et al. Gastroenterology 149, 468-480, 2015.
- 2) Hecker L et al. Nat Med 15, 1077-1081, 2009.
- 3) Moylan JS et al. Redox Biol 2, 910-920, 2014.
- 4) Corcoran CA et al. Mol Cancer Res 6, 795-807, 2008.
- 5) Beretta M et al. EMBO J 39, e103530, 2020.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 勝山真人
2. 発表標題 NOX研究の歴史と阻害薬開発の動向
3. 学会等名 第95回 日本薬理学会年会
4. 発表年 2022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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------