

機関番号：24303

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790525

研究課題名 (和文) スーパーオキシド産生酵素の活性調節を介する薬物有害作用発現の分子基盤の解明

研究課題名 (英文) Study on the molecular basis of the exertion of adverse effects of drugs mediated by regulation of NADPH oxidase activities

研究代表者

勝山 真人 (KATSUYAMA MASATO)

京都府立医科大学・医学研究科・准教授

研究者番号：60315934

研究成果の概要 (和文)：種々の細胞に普遍的に発現するスーパーオキシド産生酵素 NOX4 の基本的転写調節機構を解明した。ヒト神経芽細胞腫と腎臓由来の細胞を用いた検討の結果、様々な細胞で構成的に発現する遺伝子の転写に関与することが知られている転写因子 Sp3 が、NOX4 のユビキタスな発現にも関与することが示された。

研究成果の概要 (英文)：NOX is the catalytic subunit of NADPH oxidase, the superoxide-generating enzyme. Among several isoforms of NOX, NOX4 is abundantly expressed in various tissues. The mechanisms of constitutive and ubiquitous expression of NOX4 were clarified using SH-SY5Y and HEK293 cells. Sp3 transcription factor was found to play a key role in the expression of NOX4 in various cell lineages in human.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・応用薬理学

キーワード：NADPH オキシダーゼ、NOX、活性酸素、クリオキノール

1. 研究開始当初の背景

スーパーオキシドや過酸化水素などの活性酸素種は、生体内において感染微生物を死滅させる善玉としての作用と、脂質過酸化などにより生体にダメージを与える悪玉としての作用を持つ。さらに活性酸素種が細胞内シグナル伝達分子としてはたらくことも明らかとなっている。近年スーパーオキシド産生酵素である NADPH オキシダーゼの分子レベルでの解明が進み、複数のサブユニットから構成される複合体であること、またその触媒サブユニット NOX には NOX1 から

NOX5 までの 5 種類が存在することが明らかとなった。

申請者は生理活性脂質のプロスタグランジン (PG) $F_{2\alpha}$ が NOX1 の発現誘導を介して血管平滑筋細胞を肥大させることを見出し、その血管平滑筋特異的な発現誘導機構を明らかにした。NOX1 は種々の刺激により発現が誘導され、その局在も限られている。逆に NOX4 は多くの細胞に構成的に発現することから、NOX4 により産生される活性酸素種は種々の細胞に共通する基本的生命現象に関与すると考えられる。

最近非ステロイド性抗炎症薬 (NSAIDs) の心血管系への有害作用に NOX1、NOX2、NOX4 の発現誘導を介するスーパーオキシド産生の亢進が関与する可能性が報告された。また申請者は神経障害を引き起こすクリオキノール (キノホルム) が NOX4 の発現を抑制することを見出した。これらの事象は薬物の有害作用に NOX 由来の活性酸素種が関与することを示唆している。

2. 研究の目的

本研究は次の二種の薬物に焦点を当て、その有害作用への活性酸素種の関与を追究する。

(1) NSAIDs の有害作用への NOX 由来活性酸素種の関与の解明

最近、プロスタグランジン (PG) 産生抑制作用をもつ NSAIDs がラット大動脈や心臓において NOX1、NOX2、NOX4 のすべての発現を誘導することが報告された。これはこの三者に共通した発現制御機構が存在すること、並びに NSAIDs による心血管リスク上昇に活性酸素種が関与することを示唆している。培養血管平滑筋細胞において PGE₂ が NOX1 と NOX2 の発現誘導を抑制するとの報告がある一方、申請者は PGF_{2α} が NOX1 の発現誘導を引き起こすことを見出している。また NSAIDs の作用には PG 産生抑制以外に NSAID-activated gene (NAG-1) の発現誘導を介するものが存在する。これらの所見から、NSAIDs による NOX 発現誘導には PG 産生抑制が関与しない可能性も考えられる。そこで NSAIDs による各 NOX アイソフォームの発現誘導機構を分子レベルで明らかにすることにより、心血管系に対する有害作用の機序を明らかにする。

(2) クリオキノールの神経毒性への NOX の関与の解明

クリオキノールは昭和 30 年代に腸内殺菌薬として用いられたが、亜急性脊髄視神経障害 (スモン) を引き起こしたことからその発売が中止された。しかし近年アルツハイマー病などの神経変性疾患に対する改善効果が注目され、医薬品としての有用性が見直されている。神経変性には活性酸素種の寄与が考えられるが、クリオキノールによる神経変性改善のメカニズムは未だ不明である。申請者は最近、クリオキノールがヒト神経芽細胞腫において NOX4 の発現を抑制することを見出した。さらにクリオキノールが細胞毒性を示す濃度と NOX4 の発現を抑制する濃度が対応することを見出している。そこでクリオキノールによる NOX4 の発現抑制の分子機構を解明し、細胞毒性との関係を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 細胞培養

培養細胞株 A7r5、SH-SY5Y、HEK293 を定法により培養した。

(2) 細胞毒性の評価

SH-SY5Y 細胞に対する細胞毒性の評価の評価は、MTT アッセイによる比色定量により行った。

(3) 活性酸素 (スーパーオキシド) の定量

SH-SY5Y 細胞をスクロース含有バッファー中でホモジナイズし、100,000 x g の超遠心にかけて、沈殿を粗膜画分として用いた。NADPH 存在下、ルシゲニンの発光を指標にスーパーオキシド産生を測定した。

(4) レポーターアッセイ

SH-SY5Y 細胞のゲノム DNA から PCR 法によりヒト *NOX4* 遺伝子の 5' 上流域約 2 kb を単離した。ルシフェラーゼベクター pGL3-basic に組み込み、リポフェクション法により SH-SY5Y 細胞または HEK293 細胞に導入した。ルミノメーターにより発光を検出し、導入効率は同時に導入した β-ガラクトシダーゼまたはウミシイタケルシフェラーゼの活性により補正した。

(5) ゲルシフトアッセイ (EMSA)

核抽出液は Dignam のバッファーを用いて調製した。GC-box を含む 25 塩基のオリゴヌクレオチドを合成し、相補鎖とアニールさせた後、末端を ³²P で標識した。核抽出液と標識したプローブ、さらに過剰の非標識プローブ、変異非標識プローブ、または Sp 蛋白に対する抗体を混合し、アクリルアミドゲルで電気泳動した。ゲル乾燥後、イメージングアナライザーを用いて泳動パターンを解析した。

(6) クロマチン沈降法 (ChIP アッセイ)

細胞をホルマリン固定した後回収し、酵素法により DNA を断片化した。Sp 蛋白に対する抗体と反応後、沈降した DNA に対して PCR を行い、目的配列への抗体の結合を同定した。

(7) RNA 干渉

Sp1 または Sp3 に対する二本鎖 RNA (shRNA) をデザインし、H1 プロモーターを持つレンチウイルスベクターに挿入した。SH-SY5Y 細胞にウイルスを感染させ、ウエスタンブロット法により Sp1 または Sp3 の発現減少を確認することにより、shRNA の効果を判断した。SH-SY5Y 細胞または HEK293 細胞に NOX4 プロモーターを含むルシフェラーゼベクターと shRNA 発現ベクターを共導入し、ルシフェラーゼの活性に対する shRNA の効果を検討した。

4. 研究成果

(1) NSAIDs が NOX の発現に及ぼす影響の解析

NOX1 と NOX4 が発現するラット血管平滑筋細胞株 A7r5 細胞を用い、NSAIDs が NOX の発現に影響するかどうかを RT-PCR 法により解析した。ジクロフェナク、インドメタシン、アスピリンの効果を検討したが、培地中の血清の有無に関わらず、NOX1、NOX4 とともに、そ

の発現レベルには影響しなかった。

大動脈や心臓で報告されているNSAIDsの効果が認められなかった理由を考察するため、A7r5細胞と初代培養の血管平滑筋細胞で、PG受容体の発現をPCR法により比較した。どちらの細胞においてもFP、TP、IPの各受容体は発現していたが、A7r5細胞にはPGE₂の受容体の一種であるEP₄が発現していなかった。PGE₂がEP₄に作用することによりNOXの発現を制御している可能性が考えられたが、詳細は今後の検討課題である。

(2) クリオキノールによるNOX4の発現抑制機構の解明

申請者は神経障害を引き起こすクリオキノール(キノホルム)がNOX4の発現をmRNAレベルで抑制することを見出した。クリオキノールの有害作用にNOX4由来の活性酸素種の減少が関与することを想定し、その生理的意義を検討した。

MTTアッセイにより細胞増殖に対するクリオキノールの影響を検討したところ、クリオキノールは20μM以上の濃度においてヒト神経芽細胞腫SH-SY5Y細胞の増殖を抑制した。以降の実験は50μMで行った。

クリオキノールはNOX4のみでなくその会合蛋白であるp22phoxとPoldip2の発現もmRNAレベルで抑制した。またクリオキノールは膜画分におけるスーパーオキシドの産生を抑制した。

SH-SY5Y細胞にNOX4を標的とするsiRNAを導入してRNA干渉を行ったところ、NOX4の発現抑制により細胞増殖は抑制された。

以上のことから、NOX4が産生するスーパーオキシドは細胞の増殖に関与しており、クリオキノールの細胞毒性は、NOX4/NADPHオキシダーゼの発現抑制とそれに伴うスーパーオキシドの産生低下を介して引き起こされることが明らかとなった。

次にヒトNOX4遺伝子を単離し、レポーターアッセイを行うことにより、クリオキノールによるNOX4の発現抑制が転写レベルで起こる現象であるのかを解析した。SH-SY5Y細胞にレポーター遺伝子を導入して解析したところ、クリオキノールによる発現抑制に関与する配列は5'非翻訳領域内に存在することが判明した。この部分を最小プロモーター活性を持つルシフェラーゼベクターに挿入して転写活性を測定したが、エンハンサー活性は示さなかった。以上のことから、クリオキノールによるNOX4の発現抑制は、5'非翻訳領域が関与する、mRNAの安定性の低下を介することが示唆された。

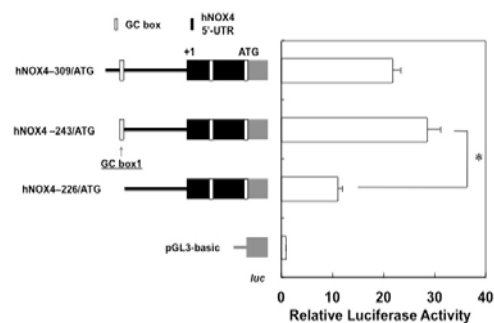
NOX4 mRNAの5'非翻訳領域上のクリオキノール応答領域は、フェリチンmRNA等に見られる鉄応答領域との相同性が認められたが、クリオキノールと鉄の同時添加は細胞に

多大な毒性を与えることから、以降の詳細な検討は不可能であった。

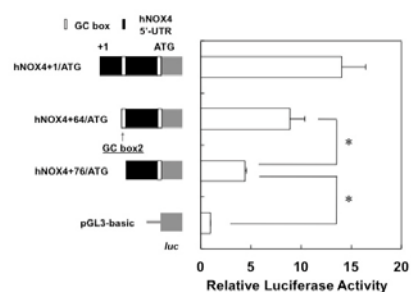
(3) NOX4のユビキタスな発現に関与する転写調節機構の解明

NOX4は種々の細胞に普遍的に発現するため、その基本転写に関与する部位と関与する転写因子の解明を試みた。SH-SY5Y細胞を用いたレポーターアッセイの結果、クリオキノールによる発現抑制に関与する配列とは別の、3か所のGC-boxがNOX4遺伝子の基本転写活性に必須であることが判明した。これらの部位はヒト腎臓由来のHEK293細胞における転写活性にも必須であった。

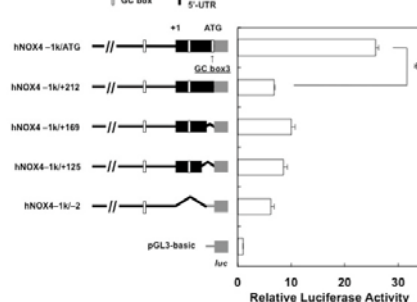
GC-box1の重要性(SH-SY5Y細胞)



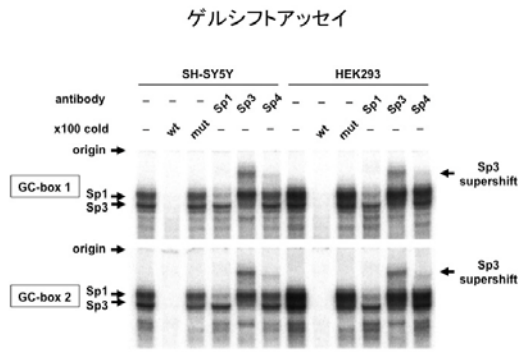
GC-box2の重要性(SH-SY5Y細胞)



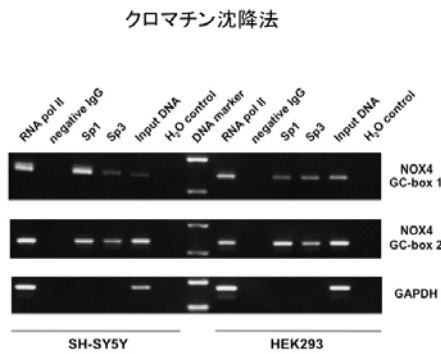
GC-box3の重要性(SH-SY5Y細胞)



ゲルシフトアッセイの結果、3か所のGC-boxのうち、翻訳開始点のすぐ上流のGC-box (GC-box3)には核蛋白質はほとんど結合しなかったことから、この部位は mRNAの安定性に寄与することが示唆された。他の2か所のGC-box (GC-box1, GC-box2)には、転写因子Sp1とSp3が結合し得ることが判明した。

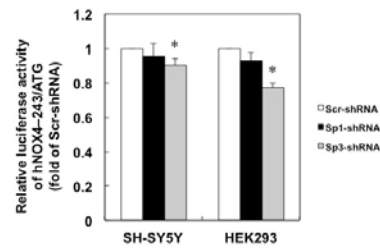


クロマチン沈降法により実際に *NOX4* 遺伝子のGC-box1とGC-box2にSp1とSp3が結合しているのかどうかを解析したところ、どちらの配列にもSp1とSp3が結合していた。



Sp1とSp3が *NOX4* 遺伝子の転写活性に必須であることを証明するため、RNA干渉によりSp1またはSp3の発現を抑制することを試みた。Sp1またはSp3に対する二本鎖RNA (shRNA)を発現するベクターと、*NOX4*プロモーターを含むルシフェラーゼベクターをSH-SY5Y細胞またはHEK293細胞に共導入したところ、Sp3に対するshRNAを導入したときには転写活性が減弱した。このことから、*NOX4*の発現にはSp3が必須であることが明らかとなった。

**Sp3に対するRNA干渉で
*NOX4*のプロモーター活性が低下**



Sp3は様々な細胞で構成的に発現する遺伝子の転写に関与することが知られており、*NOX4*のエピキタスな発現にも関与することが示された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計1件)

Katsuyama M, Hirai H, Iwata K, Ibi M, Matsuno K, Matsumoto M, Yabe-Nishimura C. (2011) Sp3 transcription factor is crucial for transcriptional activation of the human *NOX4* gene. FEBS J 278, 964-972.

[学会発表] (計1件)

勝山真人、矢部千尋. クリオキノールの細胞毒性にNOX4/NADPHオキシダーゼが関与する. 第83回日本薬理学会年会. 2010年3月16日. 大阪.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

勝山 真人 (KATSUYAMA MASATO)

京都府立医科大学・医学研究科・准教授

研究者番号：60315934