

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K16838

研究課題名（和文）NRF2持続活性化による還元ストレスがもたらす小胞体ストレスと感音難聴の病態解明

研究課題名（英文）The research of the association between the pathogenesis of sensorineural hearing loss and endoplasmic reticulum stress caused by reductive stress induced by sustained activation of NRF2.

研究代表者

岸野 明洋（Kishino, Akihiro）

東北大学・加齢医学研究所・分野研究員

研究者番号：80825307

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：本研究の目的はNRF2のミトコンドリア機能活性化の分子機構を解明することである。細胞外からグルタチオンパースルフィドを添加すると、細胞内のシステインパースルフィドが増加し、ミトコンドリア膜電位の増強と酸素消費の増加が観察された。NRF2の活性化でも同様の結果が観察された。NRF2の活性化と同時にNRF2の標的遺伝子であるシスチントランスポーターxCTの発現抑制またはCARS2阻害のいずれもミトコンドリア膜電位の増強と酸素消費の増加がキャンセルされた。故に、NRF2はxCTの発現増加によって細胞のシスチン取り込みを増加し、システインパースルフィドの生成を増加させてミトコンドリア機能を活性化する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ミトコンドリアの生理学的に重要な細胞小器官であり、ミトコンドリアの機能不全は老化や様々な疾患と関連している。本研究では、NRF2がxCTを介してシスチンの取り込みを促進し、ミトコンドリアにおける活性硫黄種の産生と代謝を促進することによりその機能を増強することが明らかになった。NRF2のミトコンドリア機能の活性化の分子機構を明らかにすることによって、今後様々な疾患の病態解明に貢献し得る。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to elucidate the molecular mechanism by which NRF2 activates mitochondrial function. Extracellular addition of glutathione persulfide increased intracellular cysteine persulfide, and enhanced mitochondrial membrane potential and increased oxygen consumption were observed. Activation of NRF2 similarly enhanced mitochondrial membrane potential and increased oxygen consumption. Simultaneous with NRF2 activation, either suppression of the expression of the NRF2 target gene cystine transporter xCT or inhibition of CARS2 canceled the enhancement of mitochondrial membrane potential and oxygen consumption. Thus, NRF2 increases cellular cystine uptake through increased expression of xCT and increases cysteine persulfide production to activate mitochondrial function.

研究分野：耳鼻咽喉科

キーワード：NRF2 硫黄代謝 ミトコンドリア膜電位 シスチン シスチンパースルフィド

## 1. 研究開始当初の背景

感音難聴は世界で最も頻度の高い身体障害の一つであり、患者の Quality of life を大きく低下させる。しかし、その病態は依然として不明点が多く、明白なエビデンスのある治療法は確立されていない。我が国は間もなく超高齢社会へ突入すると考えられ、加齢による感音難聴患者の増加が予測される。感音難聴に対する有効な新規治療法の確立の為に病態生理の解明が求められる。

小胞体ストレスが、高次構造の異常な折りたたみ不全タンパク質が小胞体内に蓄積することによって引き起こされる細胞内ストレスとして、近年、蝸牛有毛細胞やラセン神経節細胞における細胞死を誘導し、薬剤や加齢、遺伝子異常による感音難聴の病態に関与することが明らかになってきた(Oishi N, et al. Cell Death Dis. 2015)。細胞内主要分解機構であるオートファジーの機能障害も加齢性、遺伝性感音難聴の病態に関与することが報告されている。(Pang J, et al. Neurobiol Aging. 2019)。そして、申請者は、内耳感覚細胞においてオートファジーの機能障害が小胞体ストレスに対する脆弱性を増大させ細胞死を促進することを世界に先駆けて解明した(Kishino A, et al. Sci Rep. 2017)。この成果を基盤として、本研究の提案時には、オートファジー機能障害がどのような分子メカニズムで小胞体ストレスに対する脆弱性を引き起こすのかを解明することによって、臨床的には感音難聴を含む内耳疾患の病態解明と新規治療法の開発へとつなげたいと考えた。

## 2. 研究の目的

オートファジーの機能障害は、酸化ストレスに対する生体防御機構として中心的な役割を担う NRF2 の持続活性化を誘導し、還元ストレスによって生体障害を引き起こすことが示唆されたことから、オートファジー機能障害は、NRF2 の活性化がもたらす還元ストレスを介して小胞体ストレスを惹起すると考え、その分子機構の解明を目的とした。そして、その成果により、臨床的には感音難聴を中心とする内耳疾患の病態解明や新規治療法の開発へ発展応用を目指した。実験をすすめてみると、NRF2 の活性化は、硫黄代謝を促進し、ミトコンドリア機能を改善することを見出した。そこで、当初の仮説を変更して、NRF2 の活性化がもたらすミトコンドリア機能の改善を、硫黄代謝の制御から解明することを目的とした。

## 3. 研究の方法

ヒト培養細胞として、HeLa 細胞、H1650 細胞、マウス培養細胞として、RAW 細胞、Hepa1 細胞を使用した。ミトコンドリアの機能評価方法には、JC-10 染色によるミトコンドリア膜電位の評価、フラックスアナライザーによる酸素消費の測定を採用した。NRF2 経路の重要性を調べるために、siRNA を用いた NRF2 のノックダウン、また、NRF2 の抑制性因子である KEAP1 のノックダウンを行い、それぞれ、NRF2 の抑制、NRF2 の活性化を行った。ミトコンドリアにおける硫黄代謝の重要性を検討するために、ミトコンドリアの硫黄代謝酵素として、CARS2, SQOR, ETHE1, SUOX の siRNA によるノックダウンを行った。さらに、細胞内の硫黄代謝物として活性硫黄種を評価するために、傾向プローブ SSP4 を使用した。

#### 4 . 研究成果

まず、近年、活性硫黄種がミトコンドリア機能に重要であることが報告された(Akaike et al., Nat Commun 2017)ことを受けて、培地中のシスチンを減らして細胞の硫黄利用を制限することによるミトコンドリア機能への影響を検討した。通常 200  $\mu$ M の濃度で培地に添加されているシスチンを、20  $\mu$ M に低下させると、12 時間後までに細胞内の活性硫黄種の減少と、ミトコンドリア膜電位の低下が観察され、ATP 産生も抑制された。

活性硫黄種の増加がミトコンドリア機能を促進することを確認するために、活性硫黄種ドナーとして、グルタチオントリスルフィド(GSSSG)を培地中に添加した。その結果、GSSSG の添加が膜電位の上昇と酸素消費の増加をもたらすことが明らかになった。この効果は、酸化型グルタチオン GSSG では見られなかった。これらの結果から、活性硫黄種がミトコンドリアの酸素呼吸を促進することが確認された。次に、活性硫黄種の代謝にかかわるミトコンドリア酵素を 4 種類(CARS2, SQOR, ETHE1, SUOX)のノックダウンを行ったところ、SUOX 以外でミトコンドリアの膜電位の低下と酸素消費の減少が見られた。そして、GSSSG 添加によるミトコンドリアの機能促進は、SQOR ノックダウンによりキャンセルされたことから、活性硫黄種がミトコンドリアで代謝されることが、酸素呼吸の促進に必要であることがわかった。

一方、NRF2 が今回の実験系でミトコンドリア機能を促進することを確認するために、NRF2 のノックダウン、KEAP1 のノックダウンを行い、膜電位と酸素消費を調べたところ、たしかに、NRF2 の活性増加がミトコンドリアの酸素呼吸の促進をもたらした。そして、NRF2 の活性化は、細胞内の活性硫黄種の増加をもたらすことも明らかになった。このメカニズムとして、NRF2 によるシスチントランスポーター-xCT の活性化が重要であると予想し、xCT の阻害剤サルファサラジン(SASP)を細胞に添加してミトコンドリア機能への影響を検討した。その結果、SASP 添加は細胞内の活性硫黄種を減少させ、ミトコンドリアの膜電位も消失させた。重要なことに、NRF2 活性化がもたらす活性硫黄種の増加やミトコンドリア膜電位の上昇は、いずれも SASP によりキャンセルされたことから、NRF2 の活性化は、xCT の発現上昇を介してミトコンドリア機能を強化しているといえる。さらに、NRF2 活性化がもたらす活性硫黄種の増加やミトコンドリア膜電位の上昇は、ミトコンドリアにおける活性硫黄種代謝酵素のノックダウンによってもキャンセルされた。したがって、NRF2 は xCT を介してシスチンの取り込みを促進し、ミトコンドリアにおける活性硫黄種の産生と代謝を促進することによりその機能を増強することが明らかになった。

以上の成果は、本年 2023 年 4 月に、Redox Biology 誌に論文として発表された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Kishino A, Masuda T, Nomura Y, Shigihara S, Oshima T	4. 巻 144
2. 論文標題 Comparison between MB11 BERophone and ALG02e color for hearing screening in Japanese healthy newborns	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Int J Pediatr Otorhinolaryngol	6. 最初と最後の頁 110673
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ijporl.2021.110673	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Kishino A, Nakamura K, Oshima T	4. 巻 33
2. 論文標題 Lymphoepithelial carcinoma of the submandibular gland in a Japanese woman: A case report	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Oral Maxillofac Surg Med Pathol	6. 最初と最後の頁 605-609
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ajoms.2021.04.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 原 将太、岸野明洋、新藤秀史、原田英誉、平井良治、野村泰之、嶋原俊太郎、大島猛史	4. 巻 30
2. 論文標題 耳管開放症診断基準案2016による耳管開放症確実例の検討	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Otology Japan	6. 最初と最後の頁 50-57
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Alam, M. M., Kishino, A., Sung, E., Sekine, H., Abe, T., Murakami, S., Akaike, T., & Motohashi, H.	4. 巻 60
2. 論文標題 Contribution of NRF2 to sulfur metabolism and mitochondrial activity.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Redox biology	6. 最初と最後の頁 102624
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.redox.2023.102624	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 三好彰、三邊武幸、岸野明洋、東川俊彦
2. 発表標題 コロナ対策マスク着用時の難聴児・者の困惑
3. 学会等名 第66回日本聴覚医学会総会・学術講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kishino A, Murakami S, Sekine H, Akaike T, Motohashi H
2. 発表標題 NRF2 Controls the Mitochondrial Membrane Potential by Regulating Sulfur Metabolism
3. 学会等名 Cold Spring Harbor Laboratory meeting (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Sekine H, Kishino A, Anzawa H, Izumi Y, Takahashi M, Bamba T, Kinoshita K, Motohashi H
2. 発表標題 Vitamin B6 is an Oxygen-Sensitive Nutrient Shaping Macrophage Inflammatory Phenotype under Chronic Hypoxia by Suppressing Lysosomal Activity
3. 学会等名 Cold Spring Harbor Laboratory meeting (国際学会)
4. 発表年 2021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
---------	---------