

機関番号：32607
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2009～2010
 課題番号：21790132
 研究課題名（和文） 親電子性物質により発現誘導される酸性スフィンゴミエリナーゼの生理的機能の解析
 研究課題名（英文） Analysis of physiological role of acidic sphingomyelinase induced by electrophiles
 研究代表者 熊谷 剛 （ KUMAGAI TAKESHI ）
 北里大学・薬学部・助教
 研究者番号：30365184

研究成果の概要（和文）：本研究では、様々な疾病を引き起こす一因と考えられている親電子性物質により誘導される酸性スフィンゴミエリナーゼ(ASMase)が、どのような生理的機能を持っているのかについて、細胞障害と炎症反応における役割に着目して解析を行った。その結果、1) 発現誘導される ASMase が細胞死の誘導に関わること、2) 炎症応答において、炎症性サイトカインに対する細胞の応答性を亢進すること、を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：In this study, we investigated the role of acidic sphingomyelinase (ASMase) induced by electrophile, which is contained in environmental pollutant and has a potential to induce cell injury, focusing on cell injury and inflammatory response. As a result, we demonstrated that electrophile-induced ASMase involves in 1) the induction of cell death, in particular apoptosis 2) the enhancement of cell susceptibility to proinflammatory cytokines.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：生化学

科研費の分科・細目：薬学・環境衛生学

キーワード：ストレス、スフィンゴ脂質、炎症、脂質ラフト

1. 研究開始当初の背景

環境中には、様々な自然界由来または産業由来の物質が存在しており、私達は日常生活において常にこれらの物質に曝されている。それらの中にはアルデヒドやアフラトキシン、ベンゼン、塩化ビニルなどの人体にとって有害な化学物質も多く含まれており、これ

らの物質が気管支喘息、内臓疾患、ガンなど種々の疾病の原因となっていると考えられている。これらの化学物質の多くは親電子性物質であり、生体成分であるタンパク質や脂質、核酸などと反応し易く、その結果生体に傷害を与えると考えられているが、詳細な毒性発揮の機構や疾病の発症メカニズムはまだ不明な点が多かった。

我々は、酸化ストレスと脂質代謝酵素の発現変動についての研究を行う過程で、細胞の増殖や分化、細胞死誘導など様々な細胞応答に関与することが知られているスフィンゴ脂質であるセラミドの生成に関わる酵素であるにもかかわらず、これまで発現の制御機構についてほとんど解析が行われていなかった酸性スフィンゴミエリナーゼ(ASMase)の発現が、ホルムアルデヒド、アクリルアミド、ヒドロキノン、メチル水銀、塩化カドミウムなどの親電子性を持つ化学物質により発現誘導されることを見出した。また興味深いことに多くの親電子性物質を含み様々な疾病の誘発に関わっていることが知られているタバコ煙の抽出液でも ASMase の発現が顕著に誘導された (図 1)。



図 1 ヒト膀胱癌由来ECV304細胞における親電子性物質によるASMaseの発現誘導

さらに、これらの親電子性物質による ASMase の発現誘導機構について詳細な解析を行った結果、転写因子である Nrf2 が発現誘導に関わっていることを明らかとした。Nrf2 は、酸化ストレスや親電子性物質に細胞が曝露されると活性化され、種々の抗酸化酵素・解毒酵素の発現を誘導することから、生体防御応答において重要な役割を果たしている分子としてよく知られているが、この結果は、

- ① これまでに Nrf2 が脂質代謝酵素の発現を制御するとの報告はなかった。
- ② 細胞死を誘導するセラミドを生成する ASMase が、生体防御に重要な役割を果たす Nrf2 により発現の制御がされることは、ASMase が生体防御の面で機能している可能性、あるいは逆に Nrf2 が細胞障害を促進する負の作用を有している可能性を示唆した。

という点から、これまでの知見とは全く異なった ASMase や Nrf2 の機能の発見につながることを期待された。

2. 研究の目的

本研究では、ASMase および Nrf2 が親電子性物質による細胞障害に果たす役割を明確化して、化学物質により引き起こされる種々の疾病の治療法・予防法への応用につなげることを目的として、

- 1) 親電子性物質により誘導される ASMase は、種々の細胞応答において、どのような役割を果たしているのか？
- 2) ASMase の発現誘導制御に関与する Nrf2 は、生体にとってこれまでの防御的な機能とは異なった生理的意義を果たしているのか？

を明らかとするため、培養細胞を用いて生化学的、分子生物学的手法により解析を行った。

3. 研究の方法

実験にはヒト膀胱癌由来細胞 ECV-304 株を用いた。親電子性物質としては発ガン性、アレルギー誘発などが知られているベンゼンの代謝物であり、環境中に広く存在しているヒドロキノンや、タバコ主流煙抽出液、ホルムアルデヒドのほか、親電子性物質による細胞応答の解析に広く使われているジエチルマレイン酸 (DEM) を用いて解析を行った。

1) 親電子性物質による細胞死誘導への ASMase の関与の検討

ヒドロキノン処理後の細胞死誘導を、MTT アッセイをはじめアポトーシスの指標である DNA の断片化、カスパーゼの活性化等で検討した。誘導された細胞死誘導に対する ASMase の関与は、ASMase 特異的阻害剤を用いた薬理的解析および ASMase を標的とした siRNA を用いた発現抑制実験および ASMase 過剰発現細胞を用いた実験などの分子生物学的解析により検討した。

2) 炎症性サイトカインの生成に対する ASMase の関与の検討

化学物質はアレルギー反応や炎症を引き起こし、種々の疾病を誘発することが知られている。一方、ASMase についても炎症反応とのつながりが報告されている。そこで、DEM、ホルムアルデヒド、タバコ煙抽出液処理による炎症性サイトカイン (TNF- α 、IL-1 α , β 、IL-6

などの生成を RT-PCR、ELISA などにより検討し、細胞死の場合と同様、薬理的解析および分子生物学的解析により ASMase の関与を検討した。

最後に 1)、2) により得られた ASMase の機能の結果を基に、Nrf2 が ASMase 発現誘導を介して果たす意義について解析した。

4. 研究成果

1) 親電子性物質による細胞死誘導への ASMase の関与の検討

セラミドは細胞死、特にアポトーシスの誘導に関与することが報告されている。そこで、親電子性物質により誘導される細胞死に対して発現誘導される ASMase が関与するのではないかと考え、ヒドロキノン刺激として用いて解析を行った。ECV304 細胞において、ヒドロキノン処理により DNA の断片化やカスパーゼ 3 の活性化などのアポトーシスに特徴的な現象が引き起こされた。それと並行して ASMase の発現が濃度依存的、経時的に誘導された。そこで、ASMase の関与を ASMase 特異的阻害剤であるデシプラミンを用いて検討した。その結果、阻害剤の濃度依存的に DNA の断片化は抑制された。さらに ASMase の関与を実証するために ASMase を標的とした siRNA を用いて同様に解析した。その結果、ヒドロキノンによる DNA の断片化は ASMase の発現をノックダウンすることで抑制された (図 2)。これらの結果から、発現誘導される ASMase は細胞死の誘導、特にアポトーシスの誘導に関与していることが明らかとなった。

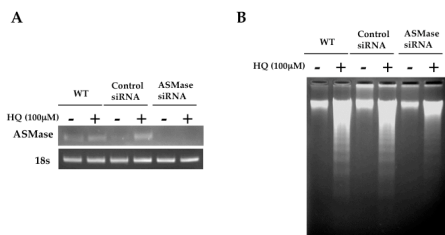


図2 親電子性物質により誘導されるDNA断片化に対するASMase発現抑制の効果

2) 炎症性サイトカインの生成に対する ASMase の関与の検討

多くの親電子性物質を含むタバコの煙な

どは炎症反応を引き起こして様々な疾病を誘発することが知られている。そこでこの炎症反応に、誘導された ASMase が関与しているのではないかと考えて解析を行った。その結果、ECV-304 細胞では親電子化合物単独処理では炎症性サイトカインである IL-6 の顕著な発現誘導は認められなかった。しかし興味深いことに、親電子性物質で予め処理した細胞では、炎症性サイトカインである TNF- α に対する感受性が亢進し IL-6 の発現誘導が顕著に増大することが示された (図 3)。

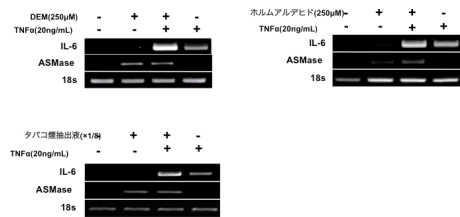


図3 親電子性物質処理によるTNF- α に対する細胞の感受性の亢進

そこでこの TNF- α に対する細胞の感受性の亢進に ASMase が関与しているのではないかと考え、阻害剤および siRNA を用いた検討を行った。その結果、ともに親電子性物質処理により認められる TNF- α によって誘導される IL-6 の発現の亢進は抑制された (図 4)。さらに ASMase 過剰発現細胞株を構築して解析を行ったところ、確かに対照株と比較して TNF- α による IL-6 の発現が顕著に亢進した (図 5)。

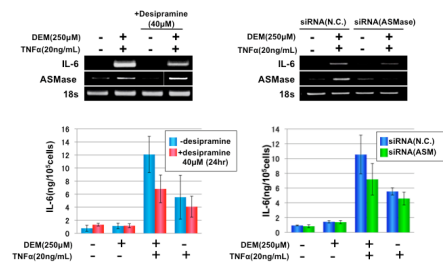


図4 親電子性物質によるTNF- α に対する感受性の亢進におけるASMase阻害剤およびASMaseの発現抑制の効果

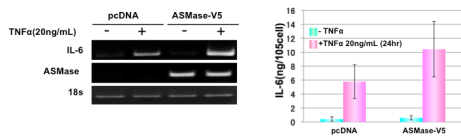


図5 ASMase過剰発現細胞株におけるTNF- α によるIL-6の発現誘導の亢進

以上の結果より、親電子性物質により発現誘導されるASMaseが、サイトカインによる炎症応答に対する細胞の感受性の亢進に関わっていることが示された。

そこで、ASMaseがどのような経路で炎症桜桃の亢進に関わっているのかについてさらに詳細に検討した。まず情報伝達経路に関わる分子の発現変動に着目して解析した結果、TNF- α 受容体1(TNFR1)やNF- κ Bなどの発現量には変動がなかったことから、感受性の亢進が関連分子の発現量の変動に寄与しているものではないことを明らかとなった。

次にSMaseの代謝産物であるセラミドを多く含み、外部刺激の情報伝達において重要な役割を果たすことが知られている細胞膜上での脂質ラフトの形成に着目して、ASMase特異的阻害剤を用いた薬理学的およびASMaseを標的としたsiRNAを用いた分子生物学的方法により解析した。その結果、親電子性物質によるASMaseの発現誘導に伴い、細胞膜上での脂質ラフトの形成が促進されること、それに伴ってTNFR1の脂質ラフトへの移行が亢進されることが示された(図6)。

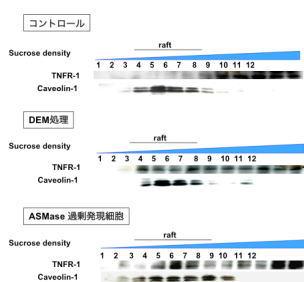


図6 親電子性物質処理およびASMase過剰発現によるTNFR1の脂質ラフトへの移行

さらに脂質ラフトを破壊することによりTNF- α によるIL-6の発現誘導が抑制されたことから、脂質ラフトの形成亢進がTNF- α によるIL-6の発現誘導に関わっていることを実証した(図7)。

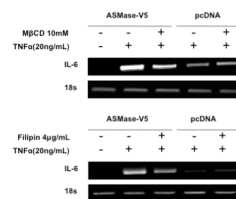


図7 TNF- α によるIL-6の発現誘導に対する脂質ラフトの関与

以上の結果より、親電子性物質により発現誘導されたASMaseは、脂質ラフトの形成を促進して炎症反応を亢進することで細胞障害誘導に寄与していることを明らかとなった。

親電子性物質に暴露される環境では、気管支炎や肝炎など炎症反応を伴う疾病を引き起こしやすい。今回の成果は、これらの疾病の発症におけるASMaseの関与を明らかにし、ASMaseを標的とした治療と予防法の開発に繋がることが期待される点から意義ある成果であると考えられる。

これまでの結果より、ASMaseが細胞死に関与すること、および炎症応答に対する感受性の亢進に関わることが明らかとなった。これらの成果はASMaseの発現を制御するNrf2が、本来の生体防御的な機能とは別に細胞障害においても機能していることを示唆している。Nrf2を標的としたsiRNAを用いた解析より、Nrf2がこれらの現象に関わっていることを示す結果は得られたが、残念ながら研究機関内にNrf2が細胞障害性の発揮に十分に寄与していることを実証するには至らなかった。今後さらに解析を進め、Nrf2が細胞障害性に果たす役割について明確に検証していく。

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 0 件)

[学会発表] (計 7 件)

熊谷剛、光山佳奈、三輪朋代、中川靖一 低濃度ヒドロキノン処理によるMn-SODの発現誘導における酸性スフィンゴミエリナーゼの関与 日本薬学会第129年会(京都) 2009.3.26、京都

石野智大、熊谷剛、中川靖一 親電子性物質により発現誘導される酸性スフィンゴミエ

リナーゼの炎症反応における役割の解析
日本薬学会第129年会 2009.3.26、京都

石野智大、熊谷剛、大原雄希、中川靖一 親
電子性物質により発現誘導される酸性スフィン
ゴミエリナーゼの炎症反応における役割
の解析 第82回日本生化学会大会
2009.10.21~24、神戸

光山佳奈、熊谷剛、三輪朋代、中川靖一 低
濃度ヒドロキノン処理による Mn-SOD の発
現誘導における酸性スフィンゴミエリナー
ゼの関与 第82回日本生化学会大会
2009.10.21~24、神戸

石野智大、熊谷剛、大原雄希、中川靖一 親
電子性物質により発現誘導される酸性スフ
ィンゴミエリナーゼは TNF- α による炎症反
応を増大する フォーラム 2009 衛生薬学
・環境トキシコロジー 日本薬学会環境衛
生部会 2009.11.5~6、沖縄

光山佳奈、熊谷剛、三輪朋代、中川靖一 低
濃度ヒドロキノン処理による Mn-SOD の発
現誘導における酸性スフィンゴミエリナー
ゼの関与 フォーラム 2009 衛生薬学・環
境トキシコロジー 日本薬学会環境衛生部
会 2009.11.5~6、沖縄

熊谷剛、石野智大、大原雄希、中川靖一 親
電子性物質により発現誘導された酸性スフ
ィンゴミエリナーゼは TNF α による炎症反
応を増大する 第63回日本酸化ストレス学
会学術集会 2010.6.24~25、神奈川

[その他]

ホームページ

http://www.pharm.kitasato-u.ac.jp/eisei/eisei/Top_page.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

熊谷 剛 (KUMAGAI TAKESHI)

北里大学・薬学部・助教

研究者番号：30365184