

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02083

研究課題名（和文）多色リアルタイム発光測定法によるストレス応答経路間のクロストークの解明

研究課題名（英文）Analysis of crosstalk between stress response pathways by multicolor real-time bioluminescence measurement

研究代表者

中島 芳浩（Nakajima, Yoshihiro）

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・研究グループ長

研究者番号：10291080

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は独自に創出した多色リアルタイム発光測定法により、ストレス惹起時に起こるストレス応答経路の動的変動を捉え、ストレス応答経路間のクロストークを明らかにするとともにネットワーク構造解析に資するデータの取得を目的とする。本研究では、酸化ストレス応答や炎症応答などの代表的な細胞内ストレス応答を解析するための発光細胞群を樹立し、それらのダイナミックな変化をリアルタイムに測定するシステムを確立した。さらに、ファイトケミカル、薬剤、物理化学的ストレスなどの各ストレス応答に対する作用を明らかにするとともに、ストレスに対する適応応答に関与するストレス応答間のクロストークについて解析した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果は、細胞の恒常性を維持し、細胞内外からのストレスに対して防御するための手段である適応応答機構の学術的理解を深化させるとともに、構築した解析システムの社会普及によりライフサイエンス研究分野およびバイオテクノロジー関連産業における生理活性物質の開発の加速に貢献することが期待される。

研究成果の概要（英文）：The objective of this study is to capture the dynamic changes in stress response pathways during stress induction using our originally developed multicolor real-time bioluminescence measurement method, and to elucidate the crosstalk between stress response pathways. Furthermore, we aim to obtain data that will contribute to the analysis of the network structure. In this study, we established a luminescent cell line to analyze typical intracellular stress responses such as oxidative stress response and inflammation response. Furthermore, we have established a system to measure these dynamic changes in real-time. We have clarified the effects of phytochemicals, drugs, and physicochemical stresses on each stress response pathway. Furthermore, we analyzed the crosstalk between stress responses involved in the adaptive response to stress.

研究分野：細胞生物学

キーワード：ルシフェラーゼ ストレス応答 クロストーク 細胞内ネットワーク リアルタイム発光測定

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生体の内外で惹起される物理・化学・生物学的ストレスに対し、細胞はストレスを回避して恒常性を維持するための適応応答と呼ばれる防御機構を備えている。近年この適応応答は、多種のストレス応答経路の相互作用(クロストーク)により形成されていることが提唱されている。適応応答に関する分子機序はこれまで広く研究されている。例えば代表的なストレスである酸化ストレスが細胞に惹起されると、酸化ストレス応答の鍵転写因子である Nrf2 が活性化され、抗酸化遺伝子群等の発現を促進して酸化ストレス状態を緩和する。不良タンパク質の蓄積により誘発される小胞体ストレスでは、蓄積を感知して PERK 等のセンサー酵素が活性化、それに引き続く ATF4 等の鍵転写因子の活性化によりシャペロン遺伝子群の発現が促進され、不良タンパク質の蓄積を解消する。その他、炎症、低酸素、DNA 損傷、金属暴露等に対するストレスについても同様に、適応応答に関わる鍵転写因子や標的遺伝子が存在しており、各ストレスに対して各々特異的なストレス応答経路が活性化され、惹起されたストレスから回避することが明らかとなっている。一方で近年、適応応答では多数のストレス応答経路が複雑にクロストークしていることが報告され始めている。例えば、炎症反応の鎮静化には、炎症応答経路の鍵転写因子である NF- κ B による炎症性サイトカイン遺伝子等の標的遺伝子発現を、酸化ストレス経路の鍵転写因子である Nrf2 が抑制することが報告されている。また、小胞体ストレスが惹起された場合、リン酸化酵素 PERK はシャペロン遺伝子群の発現を促進するのみならず、前述の Nrf2 の活性化をトリガーし、酸化ストレス応答経路の活性化も同時に発動することが提唱されている。このようなクロストークは適応応答をより頑強にするための機構として、多くのストレス応答経路が複雑に正、或いは負のフィードバックを形成していることが提唱されているが、詳細については明らかになっていない。

2. 研究の目的

現在、クロストークの解析は、分子細胞生物学的手法、トランスクリプトーム、或いはプロテオミクス解析的手法が用いられているが、同一細胞での経時的測定が不可能であるため、任意の時間間隔で細胞を破碎する必要がある。そのため、ダイナミックに変化するストレス応答の動的変化を正確に捉えることができない。そこで本研究では、独自に創出した多色リアルタイム発光測定法により、ストレス惹起時に起こるストレス応答経路の動的変動を正確に捉え、ストレス応答経路間のクロストークを明らかにするとともに、ネットワーク構造解析に資するデータを取得することを目的とする。

3. 研究の方法

本研究で解析対象とするストレス応答および標的転写因子として、酸化ストレス応答 (Nrf2)、炎症応答 (NF- κ B, STAT3, AP-1)、小胞体ストレス応答 (XBP1, ATF4)、DNA 損傷応答 (p53)、ヒートショック応答 (HSF1)、低酸素応答 (HIF1)、浸透圧応答 (TonEBP)、核内受容体 (PPAR γ , PPAR α) を選定した。多色リアルタイム発光測定に用いるルシフェラーゼ遺伝子には、鉄道虫由来赤色発光ルシフェラーゼ (SLR3)、ヒカリコメツキムシ由来緑色発光ルシフェラーゼ (ELuc)、或いはイリオモテボタル由来緑色発光ルシフェラーゼ (SLG) を用いた。各転写因子が結合する応答配列を文献或いはデータベースから選択し、これらのストレス応答経路の活性化に応じてルシフェラーゼが安定的に発現する発光細胞を作製した。ストレス応答経路の測定は、各種発光細胞に被験物質を処理し、ストレス応答経路の変化および細胞毒性発現の変化を、各々赤色発光ルシフェラーゼ、および緑色発光ルシフェラーゼでリアルタイムに測定した。

4. 研究成果

(1) ストレス応答解析用発光細胞の樹立

ストレス応答の解析に用いる細胞には、ベクターの細胞への導入の容易さと、ストレス応答に伴うシグナル伝達経路の活性化の応答性等を考慮し、ヒト肝癌由来 HepG2 細胞、ヒト骨肉腫由来 U2OS 細胞、ヒト子宮ガン由来 HeLa 細胞、マウス線維芽 A9 細胞を選定した。最初に、これらの細胞にマウス人工染色体ベクターを移入し、薬剤選択によりマウス人工染色体ベクターが導入された細胞を樹立した。マウス人工染色体ベクターの導入はゲノミック PCR で、またコピー数は蛍光 in situ ハイブリダイゼーション解析により確認した。続いて、細胞毒性およびウェル間の発光強度の補正に用いる内部標準用レポーターベクターとして、チミジンキナーゼプロモーターに ELuc 或いは SLG を連結したベクターを作製し、人工染色体ベクター内の標的部位に相同組換えにより挿入し、薬剤選択により細胞を作製した。標的部位への挿入はゲノミック PCR により確認した。続いて、作製した細胞をリアルタイム発光測定に供し、発光強度の確認を行った結果、HepG2 細胞、U2OS 細胞、HeLa 細胞には ELuc が、A9 細胞には SLG が適していることを明らかにした。次に、標的とする転写因子の応答配列をチミジンキナーゼプロモーター、および SLR3 と連結したレポーターベクターを作製し、上記で作製した内部標準レポーターが挿入済みの細胞の人工染色体ベクター内の標的部位に相同組換えにより挿入し、薬剤選択を行

った。ベクターの標的部位への挿入はゲノミック PCR により確認した。続いて、樹立した細胞の作動性を検証するため、各々のストレス応答を活性化する陽性対象物質を細胞に処理し、リアルタイム発光測定を行った。リアルタイム発光測定には、マルチウェルプレートに対応し、色分離機能を備えたルミノメーターを用い、2~3 日間、約 30 分間隔で発光を測定した。なお、リアルタイム発光測定ではストレス応答の変動を SLR3、細胞毒性の発現を ELuc 或いは SLG で同時にモニターし、細胞毒性が発現しない陽性対象物質の濃度において、対象とするストレス応答が活性化されるかを検証した。その結果、酸化ストレス応答 (Nrf2) の解析には HepG2 細胞、U2OS 細胞、HeLa 細胞が、炎症応答 (NF- κ B) の解析には全ての細胞が、小胞体ストレス応答 (XBP1、ATF4) の解析には HepG2 細胞が、DNA 損傷応答 (p53) の解析には HepG2 細胞と A9 細胞が、ヒートショック応答 (HSF1) の解析には HepG2 細胞と A9 細胞が、低酸素応答 (HIF1) の解析には HepG2 細胞と A9 細胞が、浸透圧応答 (TonEBP) の解析には A9 細胞が、そして核内受容体 (PPAR γ 、PPAR α) には A9 細胞が想定した反応を示し、今後の解析に使用できることを確認した。

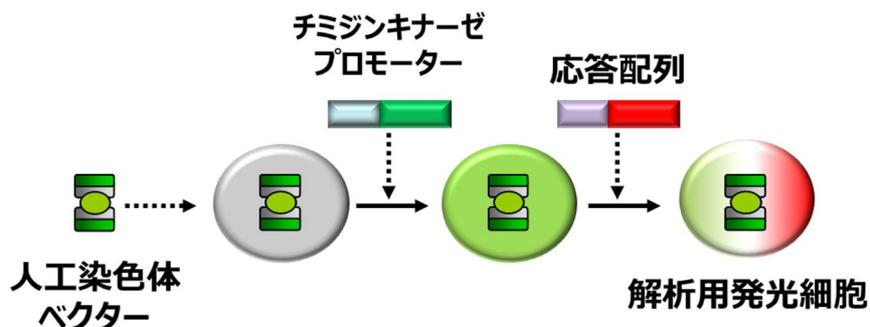


図 1 解析に用いる発光細胞の作製スキーム

(2) フタライド化合物のストレス応答経路の作用解析

フタライド化合物の一種であるセダノライドはセロリの揮発性油の主成分の 1 つであり、抗炎症、抗発がん活性等が報告されているが、詳細な機序については殆ど明らかとなっていない。そこで、上記で樹立したストレス応答解析用の発光細胞を用い、セダノライドのストレス応答経路への作用について解析した。各種の発光細胞にセダノライドを処理し、リアルタイム発光測定を行ったところ、セダノライドは細胞毒性を生じることなく、酸化ストレス応答の鍵転写因子である Nrf2 を濃度依存的に活性化させることが明らかとなった。続いてセダノライドを処理した HepG2 細胞の RNA シークエンス解析を行った結果、セダノライドは Nrf2 経路、およびグルタチオン代謝に関連した抗酸化遺伝子群の発現を誘導することが明らかとなり、セダノライドが酸化ストレスに対する細胞保護効果を付与することが示唆された。そこで次に、セダノライドを前処理した HepG2 細胞に過酸化水素を暴露し、酸化ストレスレベルおよび細胞死への影響を解析した。その結果、セダノライドの前処理により、過酸化水素により誘導される初期アポトーシスが顕著に抑制されることが明らかとなった。また、セダノライドは過酸化水素により誘導される細胞質内およびミトコンドリア内の活性酸素種の生成、ミトコリア膜電位の低下、アポトーシス実行因子であるカスパーゼ 3/7 の活性化を有意に抑制することが明らかとなった。これらの結果から、セダノライドは Nrf2 を活性化することにより抗酸化遺伝子群の発現を誘導し、細胞に酸化ストレス耐性を付与し、酸化ストレスにより誘導されるアポトーシスを抑制することを明らかにした。

(3) プロムワレリル尿素の炎症応答経路の作用解析

古典的催眠鎮静薬であるプロムワレリル尿素は培養マクロファージ細胞やマイクログリア細胞において抗炎症作用を有することが明らかとなっている。またインビボにおいても、盲腸結紮穿孔によるラット敗血症モデル、気管内大腸菌注入による肺傷害モデル、針刺し脳損傷モデル等において、プロムワレリル尿素の投与により顕著な治療効果が発揮されることが明らかとなっている。これらの効果には抗炎症作用の関与が示唆されているが、プロムワレリル尿素は炎症惹起の鍵転写因子である NF- κ B に対して顕著な作用を示さず、プロムワレリル尿素が有する抗炎症作用の詳細なメカニズムは明らかになっていない。そこで、ストレス応答解析用の発光細胞を用い、プロムワレリル尿素のストレス応答経路に対する影響を解析した。抗炎症作用との関連が提唱されている、酸化ストレス応答 (Nrf2)、炎症応答 (NF- κ B)、小胞体ストレス応答 (ATF6)、ヒートショック応答 (HSF1) を解析対象とし、これらのストレス応答解析用の HepG2 発光細胞にプロムワレリル尿素を処理し、リアルタイム発光測定を行った。その結果、小胞体ストレス応答、熱ショックストレス応答等の経路には作用せず、Nrf2 を活性化させる一方、NF- κ B 経路の基底活性を弱く抑制させることが明らかとなった。プロムワレリル尿素による Nrf2 活性化はマウスの株化マイクログリア細胞 (BV2 細胞) でも認められ、Nrf2 の活性化に伴い抗酸化遺伝子群の発現が亢進することも確認された。また Nrf2 の抑制因子である Keap1 をノックダウンす

ることから Nrf2 の活性化が低下したことから、プロムワレリル尿素は Keap1 に作用して Nrf2 を活性化することが示唆された。さらに、BV2 細胞へのリポ多糖処理により惹起される炎症はプロムワレリル尿素により顕著に抑制されるが、この効果は short hairpin RNA により Nrf2 をノックダウンすることで消失することが明らかとなった。これらの結果から、プロムワレリル尿素が持つ抗炎症作用の主要なメカニズムは、酸化ストレス応答の鍵転写因子である Nrf2 の活性化であることが明らかとなった。また、Nrf2 経路と炎症応答経路のクロストークにより、炎症抑制作用をもたらすことが示唆された。

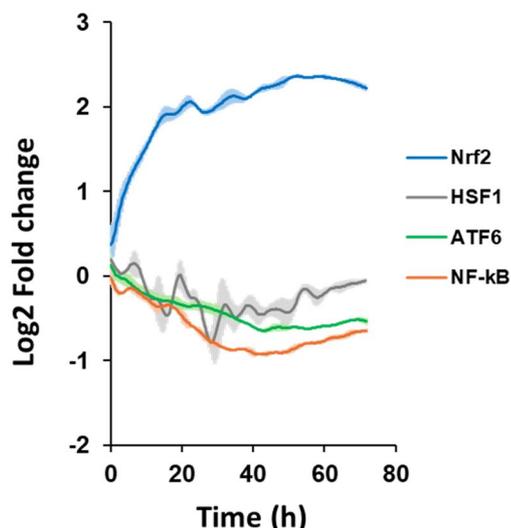


図2 プロムワレリル尿素の各ストレス応答への影響

(4) 浸透圧調節機構の解析

細胞内外の水分と溶質のバランスを保つ浸透圧調節は、生体の恒常性を維持するために不可欠な機構であり、これにより細胞は適切な形状と体積を維持することができる。また個体レベルでは浸透圧調節により、体全体の水分と電解質のバランスが整い、腎臓などの臓器が正常に機能することができる。一方で浸透圧の異常は、脱水症状や過水和症状などを引き起こす可能性がある。このように、浸透圧調節は細胞の健全な機能と生命維持に不可欠な機構であるが、詳細な機序については未だ未解明な点が多く、特に浸透圧に晒された際の浸透圧ストレスに対する適応機構については殆ど明らかにされていない。そこで、浸透圧調節に関与することが知られている転写因子 tonicity-responsive enhancer binding protein (TonEBP) の活性化に伴い発光する浸透圧ストレス解析用の発光細胞を樹立し、浸透圧ストレス惹起時のストレス応答について解析した。TonEBP の応答配列である浸透圧応答配列を用い、前述の通り HepG2 細胞、U2OS 細胞、A9 細胞で発光細胞を作製、塩化ナトリウムにより浸透圧ストレスを惹起し、リアルタイム発光測定を行った。その結果、A9 細胞において急激な TonEBP の活性化と、引き続く不活性化が生じることが明らかとなり、樹立した A9 細胞が浸透圧ストレスの解析に適用できることが判明した。続いて、他のストレス応答とのクロストークについて解析するため、酸化ストレス応答 (Nrf2)、炎症応答 (NF-κB)、小胞体ストレス応答 (XBP1)、低酸素ストレス応答 (HIF1)、ヒートショック応答 (HSF1) 解析用の A9 発光細胞とともに、浸透圧ストレス解析用の A9 細胞を塩化ナトリウムで処理し、リアルタイム発光測定を行った。その結果、細胞毒性が生じない濃度の塩化ナトリウムにより、TonEBP の一過的な活性化に引き続き、小胞体ストレス応答 (XBP1) 経路が緩やかに活性化され、さらにその後、低酸素ストレス応答 (HIF1) 経路が活性化されることが明らかとなった。続いて、約 300 種類のファイトケミカルライブラリー、および約 200 種類の阻害剤ライブラリーを浸透圧ストレス解析用の A9 細胞に処理し、TonEBP を活性化する物質のスクリーニングを行ったところ、ヒートショック応答の鍵転写因子である HSP90 の阻害剤がヒットした。これらの結果から、浸透圧ストレスの適応応答には、TonEBP 経路、小胞体ストレス応答経路、低酸素ストレス応答経路、ヒートショック応答経路がクロストークしていることが示唆され、現在その詳細について解析中である。

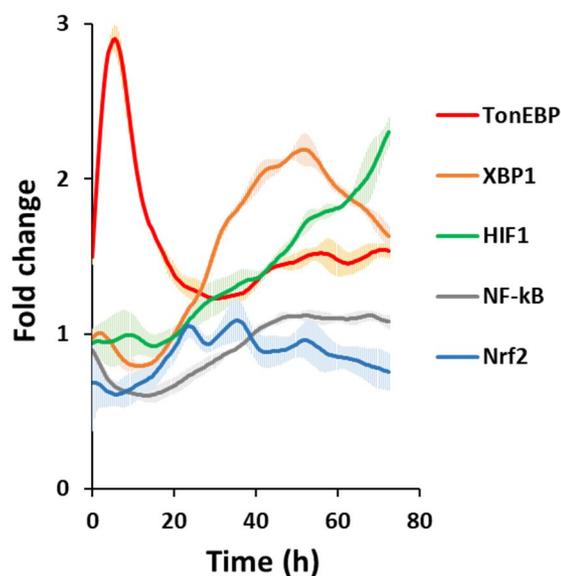


図3 浸透圧ストレスの各ストレス応答への影響

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Iwado Satoru, Abe Satoshi, Oshimura Mitsuo, Kazuki Yasuhiro, Nakajima Yoshihiro	4. 巻 22
2. 論文標題 Bioluminescence Measurement of Time-Dependent Dynamic Changes of CYP-Mediated Cytotoxicity in CYP-Expressing Luminescent HepG2 Cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 2843
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms22062843	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 Tabei Yosuke, Yokota Kazumichi, Nakajima Yoshihiro	4. 巻 9
2. 論文標題 Interleukin-1 released from macrophages stimulated with indium tin oxide nanoparticles induces epithelial-mesenchymal transition in A549 cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Environmental Science: Nano	6. 最初と最後の頁 1489 ~ 1508
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1039/d2en00031h	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 Tomita Tatsunosuke, Kawano Yasuhiro, Kassai Masahiro, Onda Hiroyuki, Nakajima Yoshihiro, Miyazaki Koyomi	4. 巻 13
2. 論文標題 Hydroxy- -sanshool isolated from Zanthoxylum piperitum (Japanese pepper) shortens the period of the circadian clock	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Food & Function	6. 最初と最後の頁 9407 ~ 9418
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1039/d2fo01036d	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 Uno Narumi, Takata Shuta, Komoto Shinya, Miyamoto Hitomaru, Nakayama Yuji, Osaki Mitsuhiko, Mayuzumi Ryota, Miyazaki Natsumi, Hando Chiaki, Abe Satoshi, Sakuma Tetsushi, Yamamoto Takashi, Suzuki Teruhiko, Nakajima Yoshihiro, Oshimura Mitsuo, Tomizuka Kazuma, Kazuki Yasuhiro	4. 巻 12
2. 論文標題 Panel of human cell lines with human/mouse artificial chromosomes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 3009
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-06814-3	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 Tabei Yosuke, Abe Hiroko, Suzuki Shingo, Takeda Nobuaki, Arai Jun-ichiro, Nakajima Yoshihiro	4. 巻 24
2. 論文標題 Sedanolide Activates KEAP1-NRF2 Pathway and Ameliorates Hydrogen Peroxide-Induced Apoptotic Cell Death	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 16532
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms242216532	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 Takeda Haruna, Nakajima Yoshihiro, Yamaguchi Teruaki, Watanabe Itaru, Miyoshi Shoko, Nagashio Kodai, Sekine Hiroki, Motohashi Hozumi, Yano Hajime, Tanaka Junya	4. 巻 174
2. 論文標題 The anti-inflammatory and anti-oxidative effect of a classical hypnotic bromovalerylurea mediated by the activation of NRF2	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 131 ~ 142
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvad030	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5件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 中島芳浩
2. 発表標題 染色体工学技術と生物発光レポーター技術の融合によるセルベースアッセイ系の開発
3. 学会等名 第2回Cell-Based Assayワークショップ (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中島芳浩、藤田康子、太西尚子、玉垣 勇樹、知久季倫
2. 発表標題 多色リアルタイム発光測定による毒性発現時の細胞ストレス応答の解析
3. 学会等名 日本動物実験代替法学会 第34回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中島芳浩
2. 発表標題 多色リアルタイム発光測定系を用いたセルベースアッセイによる毒性および有効性評価
3. 学会等名 BioJapan2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田部井陽介、安部博子、鈴木辰吾、武田信明、新井潤一郎、中島芳浩
2. 発表標題 セダノライドはNRF2 経路の活性化を介して酸化ストレス耐性を付与する
3. 学会等名 第17回日本臨床ストレス応答学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 中島芳浩
2. 発表標題 多色リアルタイム発光測定システムの構築とセルベースアッセイへの応用
3. 学会等名 第50回日本毒性学会学術年会（招待講演）
4. 発表年 2023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	横田 一道 (Yokota Kazumichi) (50633179)	国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・研究員 (82626)	

6. 研究組織（つづき）

	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	宮田 椋 (Miyata Ryo) (20981426)	国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・研究員 (82626)	
研究分担者	于 躍 (Yu Yue) (90881631)	国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・研究員 (82626)	

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