

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月31日現在

機関番号：11101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790304

研究課題名（和文） サイトカインネットワーク制御におけるNrf2の役割の解明

研究課題名（英文） Analysis of Nrf2 function in cytokine network regulation

研究代表者

三村 純正（MIMURA JUNSEI）

弘前大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：60344884

研究成果の概要（和文）：本研究によってグリア細胞におけるカルノシン酸による *NGF* 遺伝子発現の増強が、酸化ストレス応答性の転写因子である Nrf2 によって直接的に制御されること、また、カルノシン酸が炎症性サイトカインである IL-1 β と協調して *NGF* の発現を誘導することが明らかとなった。NGF は神経栄養因子として働くほか、炎症性サイトカインとして機能することから、Nrf2 の活性化は *NGF* の発現制御を介して神経細胞や免疫細胞の制御に関わることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：In this study, our data revealed that the oxidative stress-inducible transcription factor Nrf2 mediates carnosic acid-inducible *NGF* gene expression directly in glial cells. We also found that carnosic acid and IL-1 β cooperatively enhances *NGF* gene expression. Since NGF functions as a neurotrophic factor and inflammatory cytokine, these results indicate that Nrf2 may regulate neural or immune cell function through *NGF* gene regulation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：分子病態学、酸化ストレス、免疫応答、神経栄養因子、グリア細胞

1. 研究開始当初の背景

NF-E2 related factor 2 (Nrf2)は酸化ストレス応答性の転写因子であり、酸化ストレス応答や外来異物の代謝に関わっている（図1）。Nrf2は無刺激時には Keap1 と呼ばれるタンパク質と結合することにより常にユビキチン化され、プロテアソーム経路で分解されている。酸化ストレスや親電子性物質による刺激を受けると Nrf2 は Keap1 から解放され、

安定化し、核へ移行する。核移行した Nrf2 は小 Maf と呼ばれるタンパク質とヘテロ二量体を形成し、標的遺伝子の転写制御領域に存在する Antioxidant responsive element (ARE) と呼ばれるエンハンサー配列に結合し、その転写を活性化させる。近年の解析により、Nrf2 は酸化ストレス応答や異物代謝のほかに免疫応答を含む様々な生体応答に関わっていることが明らかとなっている。以前、

小坂らはローズマリーに含まれるジテルペノイドであるカルノシン酸が T98G グリオーマ細胞において NGF を誘導することを見出した。一方、佐藤らはカルノシン酸が Nrf2 の誘導剤として働くことを神経細胞において確認していた。そこで、我々はカルノシン酸による NGF 誘導における Nrf2 の関わりについて検討した。その結果、カルノシン酸による NGF 誘導において Nrf2 が関わっている可能性が示唆されたが、その詳細なメカニズムは不明のままであった。また、NGF は神経栄養因子として働くことがよく知られているが、炎症性サイトカインとしても働き、炎症性サイトカインの誘導に関わっていることが明らかとなっている。しかしながらこの応答において Nrf2 がどう関わっているかは不明であった。

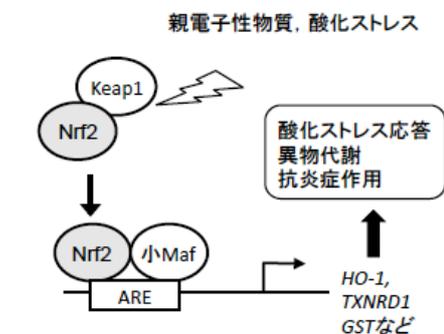


図1. Nrf2による遺伝子発現調節

2. 研究の目的

本研究の目的は、NGF 遺伝子発現における Nrf2 の機能とその詳細なメカニズムを解明することにより、NGF 遺伝子発現制御における Nrf2 の役割を明らかにすること。また、NGF の発現を介した Nrf2 の免疫系への影響も解明することを目的とする。NGF は神経栄養因子として機能するほか、炎症性サイトカインとして機能し、TNF α とともにサイトカインネットワークを形成することが示唆されている。これまでの研究により、NGF 遺伝子の発現に Nrf2 が関わっていることを示唆させるデータが得られてきた。NGF 遺伝子の発現制御において重要な役割を果たすと考えられる Nrf2 は抗酸化能・薬物代謝の制御因子として認識されてきたが、免疫制御にも関わることを示唆されている。しかしながらその制御機構は今まで不明であった。そこで、仮説として Nrf2 が NGF 遺伝子発現を制御することにより免疫応答性制御しているということが考えられる。免疫応答における Nrf2 を介した NGF の誘導メカニズムが明らかとなれば、サイトカインネットワークにおける炎症反応メカニズムの一端が明らかとなり、Nrf2 経路を利用した。炎症性疾患に対する新たな予防法、治療法の開発にもつ

ながることも考えられる。また、先に述べたように Nrf2 は本来、酸化ストレス応答系の転写因子であることから、免疫応答と酸化ストレスとの関連性も明らかになると思われる。さらに、NGF はアルツハイマー病などの神経変性疾患への治療法として考えられていることから、Nrf2 による NGF 誘導機構の解明は神経変性疾患治療法の開発という点においても注目されると思われる。

3. 研究の方法

本研究ではカルノシン酸による NGF 誘導のメカニズムの解明のために以下の方法もちいた。

(1) T98G グリオーマ細胞においてカルノシン酸による NGF 遺伝子発現の上昇が転写の上昇によるものか、mRNA の安定化によるものか、mRNA 合成阻害剤であるアクチノマイシン D を用いて検討した。また、カルノシン酸による NGF 遺伝子発現誘導の経時的な変化、カルノシン酸の濃度依存性について検討した。また、U373MG アストロサイトーマ、ヒト正常アストロサイトにおいても同様の解析を行う。

(2) T98G グリオーマ細胞においてカルノシン酸が Nrf2 を活性化するかどうか、核抽出物のイムノブロットおよび、免疫化学染色によって検討した。また、典型的な Nrf2 の標的遺伝子である HO-1 や TXNRD1 のカルノシン酸による誘導についても検討した。

(3) T98G グリオーマ細胞においてカルノシン酸による NGF 誘導における Nrf2 の必要性を確認するために、siRNA による Nrf2 のノックダウンを行い、その効果を検証した。

(4) T98G グリオーマ細胞において Nrf2 の阻害因子である Keap1 のノックダウンを行い、カルノシン酸非存在下での NGF の発現について検証した。

(5) T98G 細胞においてカルノシン酸による NGF の誘導において Nrf2 のドミナントネガティブ変異体の効果について検討した。

(6) T98G 細胞において NGF 遺伝子発現におけるカルノシン酸と炎症性サイトカイン IL-1 β 、TNF α 、あるいはホルボールエステルである TPA との協調作用について検討した。

(7) ヒト NGF 遺伝子上の Nrf2 応答配列を抽出し、レポーター解析あるいは、ChIP 解析によりその機能を検証した。

(8) RAW264.7 細胞あるいは THP1 細胞を用いてカルノシン酸による NGF 誘導能について検討した。

(9) ラジカル除去剤であるエダラボンとカルノシン酸の NGF 誘導における協調作用について検討した。

4. 研究成果

(1) T98G 細胞を用いてカルノシン酸による *NGF* 遺伝子発現誘導のプロファイルを RT-qPCR で解析したところ、50 μ M のカルノシン酸で強く誘導され、誘導のピークは 24h であった。また、アクチノマイシン D 前処理により、*NGF* mRNA の安定性を見てみると、カルノシン酸は *NGF* mRNA の安定性には影響を与えていないことから、カルノシン酸による *NGF* mRNA の誘導は転写の段階で制御されていることが示唆された。カルノシン酸による *NGF* の誘導は T98G 細胞だけでなく、U373MG アストロサイトーマ、ヒト正常アストロサイトにおいても確認されたことから、グリア細胞一般的なことであると推定された。

(2) T98G 細胞においてカルノシン酸が Nrf2 経路を活性化するかどうか確認した。その結果、50 mM カルノシン酸処理 6 時間において、Nrf2 タンパク質の核蓄積がみられることが免疫ブロット、免疫化学染色によって明らかとなった。また、カルノシン酸処理によって Nrf2 の典型的な標的遺伝子である Heme oxygenase-1 (*HO-1*)、Thioredoxin reductase 1 (*TXNRD1*) などの発現誘導も見られた。これらのことから、T98G 細胞においてはカルノシン酸処理によって Nrf2 経路が活性化していることが明らかとなった。

(3) カルノシン酸による *NGF* の誘導における Nrf2 の必要性を探るために Nrf2 に対する siRNA によるノックダウンを行った。Nrf2 のノックダウンの効果は免疫ブロット、あるいは典型的な Nrf2 の標的遺伝子である *HO-1*、*TXNRD1* の発現により確認された。一方、Nrf2 ノックダウンを行った細胞においてはカルノシン酸による *NGF* 誘導が顕著に減少することが確認された。また、構成的な *NGF* 遺伝子の発現も Nrf2 のノックダウンにより減少したことから、Nrf2 はカルノシン酸により活性化された時のみではなく、*NGF* 遺伝子の構成的な発現においても機能していることが示唆された。

(4) Nrf2 はその阻害因子である Keap1 によって無刺激時においては負に制御されている。そのため、Keap1 のノックダウンは刺激無しで Nrf2 の活性化を引き起こす。そこで、カルノシン酸による *NGF* の誘導は Nrf2 単独で起こるかどうかが検討するために、siRNA による Keap1 のノックダウンを行い、*NGF* 遺伝子発現に対する影響を観測した。その結果、Keap1 のノックダウンによりカルノシン酸を加えること無しに Nrf2 の活性化がみられ、*NGF* の発現も上昇することが確認された。さらに、Keap1 siRNA と Nrf2 siRNA をコトランスフェクションすることによりダブルノックダウンを行ったところ、Keap1 単独ノックダウンによる *NGF* の誘導が減じたことから、Nrf2 の活性化は *NGF* 遺

伝子発現誘導において十分であることが明らかとなった。

(5) カルノシン酸による *NGF* 誘導において Nrf2 がどのように関わっているか検討する為にカルノシン酸による *NGF* 誘導における Nrf2 のドミナントネガティブ変異体の効果を検討した。その結果、Nrf2 ドミナントネガティブ変異体の強制発現により、カルノシン酸による *HO-1* の誘導は減弱されたものの、*NGF* の誘導は影響を受けなかった。このことは Nrf2 による *NGF* 遺伝子発現制御様式は通常 Nrf2 による遺伝子発現制御機構とは異なることを示唆している。

(6) これまで、IL-1 β や TNF α のような炎症性サイトカイン、あるいはホルボールエステルである TPA などが *NGF* 遺伝子発現を増強することが知られている。これらの刺激とカルノシン酸が協調的に *NGF* 遺伝子発現を増強するかどうか検討した。その結果、TNF α と TPA はカルノシン酸と相加的に働き、*NGF* 遺伝子発現を増強したが、IL-1 β はカルノシン酸と相乗的に働き、強く *NGF* を誘導することが判明した。このことは IL-1 β 刺激による *NGF* 誘導経路とカルノシン酸による *NGF* 誘導経路、すなわち Nrf2 経路との間に機能的なクロストークが存在することが示唆される。

以上、(1) から (6) の内容については酸化ストレス学会、The 12th meeting of Hirosaki International Forum of Medical Science において発表を行い、Journal of Biochemistry に投稿した。

(7) 酸化ストレスなどで活性化された Nrf2 は小 Maf タンパク質とヘテロ二量体を形成し、標的遺伝子の転写制御領域に存在する ARE と呼ばれる応答配列へ結合することにより遺伝子発現を増強する。ヒト *NGF* 遺伝子上の ARE 配列を同定するために、ヒト *NGF* 遺伝子の 5' 上流領域 16 kb までの部分をルシフェラーゼレポーター遺伝子につないだレポーターコンストラクトを用いてカルノシン酸あるいは Nrf2 に対する応答性を検討した。その結果、この -16 kb までの領域においては Nrf2 の応答性が見られないことが分かった。そこで、ゲノム情報のデータベースである UCSC Genome Browser 上で公開されているヒト *NGF* 遺伝子上のヒストン H3 の K27 のアセチル化が強く起こっている領域を中心に塩基配列上の ARE 配列を抽出し、他の哺乳動物の *NGF* 遺伝子の DNA 塩基配列と比較することにより *NGF* 遺伝子上の Nrf2 応答領域の候補を抽出した。その結果、-88 kb 上流の領域に存在する ARE 配列を候補の一つとして抽出された。この領域をルシフェラーゼ遺伝子上流に導入したレポーター遺伝子は Nrf2 の強制発現により強く活性化されたことから、この領域が Nrf2

を介した *NGF* 遺伝子発現に必要であると考えられた。また、クロマチン免疫沈降法(ChIP法)においてもカルノシン酸処理によりこの領域に *Nrf2* が蓄積することが判明した。以上のことから、カルノシン酸は *NGF* 遺伝子の-88 kb 上流に存在する ARE を介して *NGF* 遺伝子の転写を活性化することが示唆された。

(1) から (6) の内容に (7) の結果を加えて分子生物学会年会において発表を行った。

(8) 免疫系細胞でのカルノシン酸による *NGF* 誘導能を検証するために、マクロファージ系の培養細胞である RAW264.7 細胞あるいは THP1 細胞をカルノシン酸で刺激し、*NGF* 誘導能について調べた。その結果、これらの細胞系ではグリオーマとは異なり、カルノシン酸による *NGF* の誘導を見ることができなかった。この原因についてはまだ不明のままである。

(9) 以前の研究から、ラジカル除去剤であるエダラボンが *NGF* を誘導することが吉田らによって見出されていた。そこで、カルノシン酸とエダラボンが協調的に *NGF* の誘導を行うかどうか検討した。その結果、U373MG アストロサイトーマにおいて、エダラボンとカルノシン酸が協調的に *NGF* 遺伝子発現を増強することが見出された。また、この *NGF* 遺伝子発現増強は *Nrf2* に依存することが判明した。

(9) の内容については *Neuroscience Research* に投稿した。

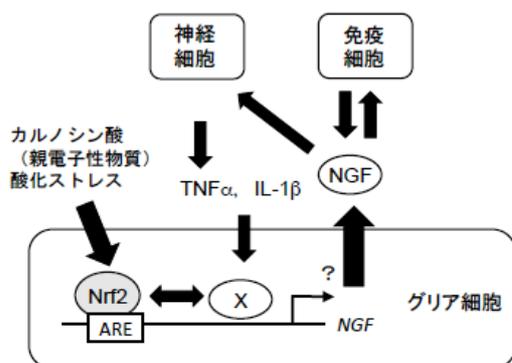


図2. *Nrf2*と*NGF*、炎症性サイトカインとの関わり仮説

以上のことから、カルノシン酸による *NGF* 遺伝子の発現誘導において *Nrf2* が深く関わっていることが明らかとなった(図2)。*NGF* は神経栄養因子として機能する他、炎症性サイトカインとしても機能し、神経細胞や免疫細胞の機能を制御すると考えられている。このことから、*Nrf2* 経路の活性化は *NGF* の誘導を介して神経細胞の生存や増殖の他、免疫応答に影響を与えることが示唆された。また、*Nrf2* が酸化ストレスによって誘導されるこ

とから、酸化ストレスが、*NGF* の産生に影響を与えることが考えられる。また、*Nrf2* はスルホラファンやイソチオシアネートのような親電子性物質により、容易に活性化できることから、今回得られた結果により、新規な神経変性疾患や免疫疾患に対する予防法や治療法の開発に繋がると考えられる。

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2件)

① Mimura J, Kosaka K, Maruyama A, Satoh T, Harada N, Yoshida H, Satoh K, Yamamoto M, Itoh K, *Nrf2* regulates *NGF* mRNA induction by carnosic acid in T98G glioblastoma cells and normal human astrocytes, *Journal of Biochemistry*, (査読あり), 150, 2011, 209-217
DOI: 10.1093/jb/mvr065

② Yoshida H, Mimura J, Imaizumi T, Matsumiya T, Ishikawa A, Metoki N, Tanji K, Ota K, Hayakari R, Kosaka K, Itoh K, Satoh K, Edaravone and carnosic acid synergistically enhance the expression of nerve growth factor in human astrocytes under hypoxia/reoxygenation, *Neuroscience Research*, (査読あり), 69, 2011, 291-298
DOI: 10.1016/j.neures.2010.12.0.16

[学会発表] (計3件)

① 三村 純正、*NGF* induction by the oxidative stress responsive transcription factor *Nrf2*、第34回日本分子生物学会年会、平成23年12月13日~16日、神奈川県

② Junsei Mimura、*NGF* induction by the oxidative stress responsive transcription factor *Nrf2*、The 12th meeting of Hiroasaki International Forum of Medical Science、平成22年10月29日、青森県

③ 三村 純正、酸化ストレス応答性転写因子 *Nrf2* による *NGF* 発現制御、第63回日本酸化ストレス学会、平成22年6月24日、神奈川県

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.hirosaki-u.ac.jp/~admed/department/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三村 純正 (MIMURA JUNSEI)

弘前大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：60344884

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし