

平成 28 年 5 月 27 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460339

研究課題名(和文) 新しい抗線維化薬の開発に向けた活性酸素産生酵素NOX4のシグナル伝達機構の解明

研究課題名(英文) A study on signaling pathways associated with NOX4/NADPH oxidase for the development of new antifibrotic drugs

研究代表者

勝山 真人 (Katsuyama, Masato)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：60315934

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：組織線維化に関与する活性酸素種(ROS)産生酵素NOX4の上流と下流に位置する情報伝達経路を解析した。TGF- β によるNOX4の発現誘導に、NOX4遺伝子の転写開始点の約75塩基上流のSmad結合配列が必須であることを見出した。NOX4が産生するROSの標的蛋白を探索し、細胞外マトリックスの重合に関与すると考えられる蛋白XのmRNAの発現がNOX4のノックダウンで減少すること、機能未知の蛋白ZがNOX4由来ROSの直接の標的である可能性を見出した。一方NOX4が細胞増殖に関わるヒト神経芽細胞腫の細胞株では、増殖因子受容体AがNOX4由来ROSの直接の標的である可能性を見出した。

研究成果の概要(英文)：It is well known that NOX4/NADPH oxidase is involved in fibrogenesis. Signaling pathways upstream and downstream of NOX4 were analyzed. A Smad binding element at approx. 75-base upstream of the transcription start site of the NOX4 gene was found essential for TGF- β -induced NOX4 expression. Proteomics analyses using cleavable isotope-coded affinity tags were carried out on a human lung fibroblast cell line stimulated with TGF- β to identify proteins that oxidized thiols were decreased by knock-down of NOX4. Among them, Protein X, an enzyme that has been thought to be involved in polymerization of extracellular matrices, was found decreased by knock-down of NOX4 at mRNA levels. On the other hand, Protein Z, of which function is unknown, was suggested to be a target of NOX4-derived reactive oxygen species (ROS). In a human neuroblastoma cells in which NOX4 is involved in cell proliferation, Protein A, a growth factor receptor, was suggested to be a target of NOX4-derived ROS.

研究分野：薬理学

キーワード：活性酸素 NADPHオキシダーゼ 線維化

1. 研究開始当初の背景

組織の線維化は様々な疾患の終末像として見られる組織所見である。ウイルス性肝炎が進行した肝硬変、間質性肺炎、拡張型心筋症のほか、糖尿病性腎症や非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) においても、病状が進行すると組織の線維化が起こる。線維化は不可逆的な変化であり、それを根治する薬物療法は現在のところ存在せず、最終的には臓器移植に頼らざるを得ないのが現状である。

近年、活性酸素種 (ROS) が組織の線維化に重要な役割を果たすことが明らかとなってきた。細胞内の主要な ROS 産生酵素は NADPH オキシダーゼであり、その触媒サブユニットである NOX には 5 種類のアイソフォームが存在する。申請者は NOX1 ノックアウトマウスを作製し、NOX1 が肝臓星細胞の増殖と肝線維化に関与することを見出した。一方肺や腎臓などの複数の臓器において NOX4 由来 ROS が TGF- β による組織線維化に重要な役割を果たすことが国外の複数の研究室より報告され、NOX4 は新たな抗線維化薬の標的分子として注目されている。しかし組織線維化における NOX4 の上流および下流のシグナリング機構はほとんど解明されていなかった。

一方 NOX4 はほとんど全ての細胞に構成的に発現し、ある種の細胞では増殖を促進し、また別の細胞では細胞死を誘発するといった「多能性」を有する。申請者は神経芽細胞腫において、NOX4 が p53 シグナリングの不活性化を介して増殖促進に関与することを見出した。このような多能性は、NOX4 阻害薬を抗線維化薬として臨床応用した場合に有害作用の原因となる恐れがあり、その分子機構の解明は必須である。しかし NOX4 の多能性のメカニズムはほとんど解明されていなかった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、組織線維化に関わる NOX4 について、以下のことを明らかにすることである。

- (1) 線維化の引き金となる TGF- β が NOX4 mRNA の発現を誘導する機構を、転写調節の観点から明らかにする。
- (2) ROS に対する感受性が最も高いシステイン残基の修飾に着目し、NOX4 由来 ROS が標的とする蛋白を同定することにより、NOX4 を介する線維化促進機構を明らかにする。
- (3) NOX4 由来 ROS が細胞増殖を促進する機構を、その標的蛋白を同定することにより解明する。

3. 研究の方法

(1) 細胞培養

ヒト肺線維芽細胞株 IMR-90 細胞はイーグル培地 (アール塩含有) (1% 非必須アミノ酸と 10% ウシ胎仔血清を添加) で培養した。マウス胚性線維芽細胞株 NIH3T3 細胞はダルベ

ッコ変法イーグル培地 (10% ウシ胎仔血清を添加) で培養した。ヒト TGF- β 1 (PeproTech 社) は 2 μ g/ml の濃度になるように 0.1% 牛血清アルブミン溶液 (pH 5.2) に溶解し、培地中に 1000 倍希釈して添加した。

(2) 定量 PCR

TGF- β 1 (2 ng/ml) 存在下で 24 時間培養した IMR-90 細胞とコントロールの細胞から、QIAGEN 社の RNeasy Plus Mini Kit を用いて total RNA を抽出した。TOYOBO 社の THUNDERBIRD SYBR qPCR / RT Set を用いて逆転写と PCR 反応を行った。反応と解析はサーモフィッシャーサイエンティフィック社の StepOnePlus を用いて行った。段階希釈したプラスミドを対照に絶対定量を行い、ヒポキサンチンホスホリボシルトランスフェラーゼ (HPRT) の発現量を指標に補正を行った。

(3) ルシフェラーゼアッセイ

IMR-90 細胞から NOX4 遺伝子のプロモーター領域を PCR により単離し、ルシフェラーゼベクター pNL1.2 (プロメガ社) に組み込んだ。24 ウェルプレートで培養した NIH3T3 細胞に TransIT-LT1 試薬 (Mirus 社) を用いてベクターと導入効率補正用ベクター pGL4.23 を導入し、24 時間後に TGF- β 1 を添加してさらに 24 時間培養した。細胞抽出液を NanoGlo 試薬および OneGlo 試薬 (プロメガ社) と反応させ、転写活性を発光測定器で測定した。

(4) Smad3 ノックダウン細胞の作製

マウス Smad3 mRNA に対する shRNA とスクランブル shRNA をデザインし、レンチウイルスベクター pGreenPuro (SBI 社) に組み込んだ。定法により 293T 細胞にベクターを導入し、作製されたレンチウイルスを NIH3T3 細胞に感染させた。ピューロマイシンによる選択を行い、耐性の細胞を以降の解析に用いた。Smad3 のノックダウンをウエスタンブロットにより確認した。

(5) ウエスタンブロット

細胞から総蛋白を抽出し、定法により SDS-PAGE とウエスタンブロットを行った。目的の蛋白を検出した後抗体を除去し、 α -actin の検出を行った。

(6) IMR-90 細胞への siRNA の導入

ヒト NOX4 mRNA に対する siRNA またはコントロール siRNA (サーモフィッシャーサイエンティフィック社: 最終濃度 20 nM) をリポフェクタミン RNAiMAX 試薬 (サーモフィッシャーサイエンティフィック社) を用いて IMR-90 細胞へ導入した。24 時間後に TGF- β 1 を添加し、さらに 24 時間培養した。

(7) ICAT 法による酸化システインの網羅的検出

TGF- β 1 で刺激した IMR-90 細胞からの蛋白

抽出に際し、まず還元型のシステイン残基をあらかじめブロックするため、50 mM の N-エチルマレイミドを含む溶解バッファー (8M 尿素、4% CHAPS、50 mM トリス塩酸 pH8.5) に溶解した。次に 20 mM のトリス (2-カルボキシエチル) フォスファインで還元し、生じた還元システイン残基を Cleavable ICAT 試薬 (AB Sciex 社) で標識した。コントロール siRNA を導入した細胞は light 試薬で、NOX4 に対する siRNA を導入した細胞は heavy 試薬で標識した。トリプシン消化したペプチドを陽イオン交換カラムおよびアピジンカラムで精製した。得られたペプチドをナノ流速逆相クロマトグラフィー質量分析装置 (LTQ-Orbitrap Velos、サーモフィッシャーサイエンティフィック社) で測定し、質量スペクトルデータを Proteome Discoverer ソフトウェア (サーモフィッシャーサイエンティフィック社) を用いて解析した。

(8) ポリエチレングリコール (PEG) マレイミドを用いたウエスタンブロット法

ICAT 法における蛋白の調製と同様に、還元型システイン残基のブロッキングと酸化システインの還元を行い、生じた還元システイン残基を PEG マレイミドで標識した。標識前の総蛋白と PEG マレイミドで標識した蛋白を用いて定法によりウエスタンブロット法を行った。

(9) SH-SY5Y 細胞

ヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y 細胞はハム F12: イーグル培地 (アール塩含有) (1:1) (1% 非必須アミノ酸と 15% ウシ胎仔血清を添加) で培養した。NOX4 ノックダウン細胞の作製は、IMR-90 細胞で用いた siRNA と同部位の配列をレンチウイルスベクターに組み込み、以下方法(4)と同様の方法で行った。

4. 研究成果

(1) TGF- β による NOX4 遺伝子の転写調節領域の同定

IMR-90 細胞を 2 ng/ml の TGF- β 1 で 24 時間刺激したところ、NOX4 mRNA レベルは約 16 倍に増加した (図 1)。そこでヒト NOX4 遺伝子上の TGF- β 応答領域の同定を試みた。

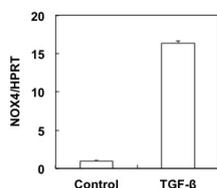


図1 TGF- β による NOX4 mRNA の発現誘導

IMR-90 細胞は遺伝子導入が困難であったことから、TGF- β 依存的に NOX4 の発現が増加することが報告されている NIH3T3 細胞を用いてレポーターアッセイを行った (引用文献)。ヒト NOX4 遺伝子の転写開始点の上流約 4.2 kb までを単離して解析したところ、TGF- β に応答する領域は転写開始点から上流-226 塩基までの間に存在した (図 2A)。転写開始点の上流-77/-74 と-51/-48 は Smad 結合配列 (SBE) と呼ばれる 5' -agac-3' であり、-11/-8 はその相補的配列であることから、これらの部分をさらに詳細に解析したところ、TGF- β 応答性は転写開始点の上流-74 塩基まで欠失させると大きく減弱した (図 2B)。

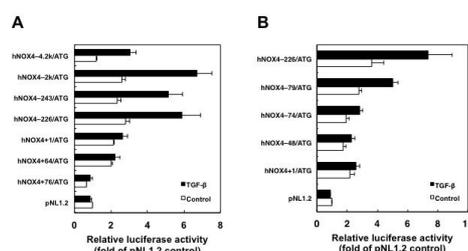


図2 TGF- β による NOX4 遺伝子の転写活性化

Smad3 に対する shRNA を安定に発現させ、Smad3 をノックダウンした NIH3T3 細胞を樹立した (図 3A)。この細胞ではスクランブル shRNA を発現させた細胞に比して、NOX4 遺伝子の転写開始点の上流-77/-74 を介する TGF- β 依存性の転写促進の度合いが減少していた (図 3B)。

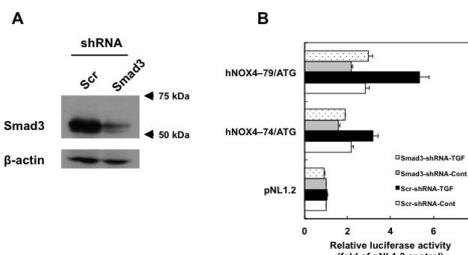


図3 Smad3 のノックダウンによる NOX4 遺伝子の転写活性化の抑制

TGF- β 刺激により NOX4 の発現が誘導されることはこれまでに知られていたが、そのメカニズムについては不明であった。

ヒト肺線維芽細胞株 IMR-90 細胞は TGF- β 応答性が極めて高く、NOX4 の発現も顕著に誘導されたが、遺伝子の導入が極めて困難であったため、レポーターアッセイに用いることはできなかった。そこで遺伝子導入が可能で、TGF- β 依存的に NOX4 の発現が増加することが報告されている NIH3T3 細胞を用いてレポ

ーターアッセイを行った。そしてノックダウン細胞を用いた検討により、Smad3がNOX4遺伝子の転写開始点の上流-77/-74のSmad結合配列(SBE)を介する転写促進に必須であることが証明された。

このSBEに対する細胞内でのSmad3の結合をクロマチン沈降法により検討したが、IMR-90細胞の増殖が極めて遅く十分量の高品質なクロマチンの単離が困難であったこと、またクロマチン沈降法に用いることができるとされる市販の抗Smad3抗体では検出が困難であったことから断念した。

またこのSBEに対する試験管内でのSmad3の結合をゲルシフトアッセイにより解析したが、直接的なSmad3の結合は検出できなかった。一方SBEに隣接した配列に結合する転写因子(あるいは転写共役因子)が認められ、この結合はTGF- β で刺激した細胞では減弱した。Smadファミリーの転写因子は標的遺伝子上に安定に結合して転写活性化複合体を形成する場合もあるが、転写抑制因子を標的遺伝子から解離させることにより転写を活性化する例も存在する(引用文献)。今回同定したSBEが「転写抑制の解除」によって機能しているのか、今後詳細に解析したいと考えている。

一方、競合するアラバマのグループから、ヒトNOX4遺伝子のTGF- β 応答領域を同定したとする論文が発表された。このグループが同定した配列は転写開始点の上流-4.76kbに存在する「AP-1サイトとSBEが隣接した配列」であり、申請者が検討した部分よりもさらに上流の配列であった。レポーターアッセイにはIMR-90細胞を用いており、TGF- β による転写活性化は顕著であった。またクロマチン沈降法によりSmad3の直接的な結合も証明している。しかし申請者が同定した近位のSBEについては転写活性化に関与しないという結果を提示している(引用文献)。申請者はこのアラバマのグループが行ったのと同じ試薬を用いてリポフェクション法でIMR-90細胞にレポーター遺伝子の導入を試みたが、前述のように信頼に値するほどの導入効率を得ることができなかった。よって申請者が同定した近位のSBEについては、IMR-90細胞で転写活性を示すことは困難であると思われる。

申請者が見出した近位のSBEがマウスNIH3T3細胞以外でも機能することは、共同研究者のTörökらによって証明された。申請者が単離したヒトNOX4遺伝子の転写開始点の上流2kbを含む領域は、マウス初代肝細胞においてTGF- β による転写活性化を示した。またそれはSmad3に依存していた(発表論文1)。このSBEを取り巻く配列はマウス、ラットのNOX4遺伝子でも相同性が高い(引用文献)。TGF- β によるNOX4遺伝子の転写促進は種を越えて保存されており、このSBEの寄与も無視できないものと考えられる。

(2)組織線維化に関わるNOX4由来ROSの標的蛋白の同定

コントロールまたはNOX4に対するsiRNAを導入したIMR-90細胞(siContまたはsiNOX4細胞)をTGF- β で刺激し、酸化システインがsiNOX4細胞で減少する蛋白を、ICAT法により網羅的に解析した。同定された蛋白のうち、特定のシステイン残基の酸化が再現性よくsiNOX4細胞で減少したものは13種類存在した。その中で今回、3種類の蛋白に着目した。

これらの蛋白のシステイン残基の酸化の減少が発現量の減少に由来するのか、あるいは実際に酸化自体が減少しているのかを明らかにするため、定量PCRを行った。蛋白Xと蛋白YのmRNAは、siCont細胞に比してsiNOX4細胞で大きく減少していた。しかしTGF- β による発現誘導は蛋白X、蛋白Yともに、どちらの細胞においても認められなかった(図4)。一方蛋白ZのmRNAは、siCont細胞に比してsiNOX4細胞でわずかに増加していた。TGF- β による発現誘導はどちらの細胞においても認められなかった(図4)。

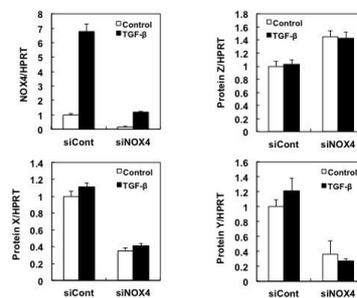


図4 同定した蛋白質群のmRNAの発現変動

蛋白ZがNOX4由来ROSの直接的な標的であるかどうかを、PEGマレイミドを用いたウエスタンブロット法により解析した。酸化された蛋白Z、すなわちPEG標識により高分子側にシフトしたバンドがTGF- β で刺激したsiContのサンプルで認められたが、siNOX4のサンプルでは認められなかった(図5)。

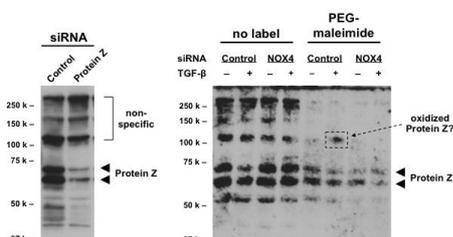


図5 PEGマレイミドによる蛋白Zの標識

蛋白Xはコラーゲンとエラスチンの重合を

行う酵素、また蛋白 Y は弾性繊維と会合する細胞外マトリックス糖蛋白であり、両者とも組織線維化と深く関わる蛋白である。定量 PCR の結果、蛋白 X と蛋白 Y は NOX4 のノックダウンにより mRNA 量が減少していることが明らかとなった。すなわち両者とも NOX4 由来 ROS の直接的な標的ではなかった。TGF-による発現誘導が認められなかったことから、両者とも、NOX4 由来 ROS が mRNA の発現レベルを増加させていることが明らかとなった。蛋白 X については、転写阻害剤アクトノマイシン D の添加によっても NOX4 のノックダウンによる mRNA レベルの低下は影響を受けなかったことから、NOX4 由来 ROS が蛋白 X の mRNA の安定化に関わる可能性が考えられた。しかしこの結果は NOX4 に対する RNA 干渉のオフターゲット効果、すなわち NOX4 に対する siRNA が蛋白 X の mRNA を直接分解している可能性も考えられ、別の siRNA を用いたさらなる解析が必要である。

蛋白 Z の機能については未解明であるが、細胞質と核小体に局在し、酸化ストレスによって核小体での局在が減少してストレス顆粒に局在するようになることが報告されている。また喘息患者におけるゲノムワイド関連解析から、蛋白 Z の発現レベルと気管支拡張作用を持つ 2 アドレナリン受容体の発現レベルが反比例することが見出されている。定量 PCR の結果、NOX4 のノックダウンによる蛋白 Z の mRNA レベルでの発現量の低下は認められなかった。PEG マレイミドを用いたウエスタンブロットでは、TGF-で刺激した際に認められる高分子側へシフトしたバンドが、NOX4 のノックダウンにより認められなくなった。同様の結果が DNA マレイミドを用いた検出においても得られたことから、蛋白 Z が NOX4 由来 ROS の直接の標的である可能性が高いと考えられた。今後は蛋白 Z の NOX4 由来 ROS により修飾されるシステイン残基を置換した変異体を作製し、線維化における蛋白 Z の果たす役割を解析したいと考えている。

(3)細胞増殖に関わる NOX4 由来 ROS の標的蛋白の同定

スクランブルまたは NOX4 に対する shRNA を安定に発現する SH-SY5Y 細胞 (shScr または shNOX4 細胞) を比較し、酸化システインが shNOX4 細胞で減少する蛋白を、ICAT 法により網羅的に解析した。同定された蛋白のうち、特定のシステイン残基の酸化が再現性よく shNOX4 細胞で減少したものは 26 種類存在した。その中で増殖因子受容体である蛋白 A に着目した。定量 PCR の結果、NOX4 のノックダウンによる受容体 A の mRNA レベルでの発現量の低下は認められなかった。

受容体 A は鎖と鎖がそれぞれ 2 つずつの四量体として機能するが、mRNA からは鎖と鎖がつながった前駆体ペプチドとして翻訳される。同定した酸化システインの部位は鎖の N 末端側に相当したため、PEG マレ

イミドを用いたウエスタンブロットでは鎖を検出した。PEG 標識により高分子側にシフトしたバンドが NOX4 のノックダウンにより若干減弱した (図 6)。

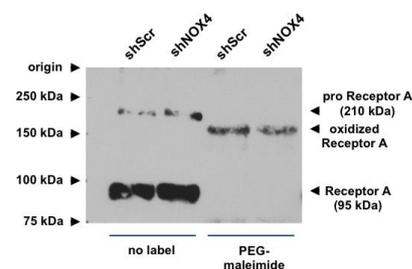


図6 PEGマレイミドによる受容体Aの標識

同定した酸化システインの部位は受容体 A の鎖の N 末端側に相当し、前駆体からのプロセッシングに重要である可能性が考えられた。しかし申請者の予備的検討では、NOX4 のノックダウンによる鎖の蛋白量の減少や、四量体形成の効率低下は認められなかったことから、このシステイン残基の酸化修飾が受容体 A の機能に及ぼす影響は現在のところ不明である。

<引用文献>

Liu RM, Choi J, Wu JH, Gaston Pravia KA, Lewis KM, Brand JD, et al. Oxidative modification of nuclear mitogen-activated protein kinase phosphatase 1 is involved in transforming growth factor beta1-induced expression of plasminogen activator inhibitor 1 in fibroblasts. *J Biol Chem.* 2010; 285: 16239-16247.

Yang X, Ji X, Shi X, Cao X. Smad1 domains interacting with Hoxc-8 induce osteoblast differentiation. *J Biol Chem.* 2000; 275: 1065-1072.

Bai G, Hock TD, Logsdon N, Zhou Y, Thannickal VJ. A far-upstream AP-1/Smad binding box regulates human NOX4 promoter activation by transforming growth factor-beta. *Gene.* 2014; 540: 62-67.

Jiang F, Liu GS, Dusting GJ, Chan EC. NADPH oxidase-dependent redox signaling in TGF-beta-mediated fibrotic responses. *Redox Biol.* 2014; 2: 267-272.

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)

Bettaieb A, Jiang JX, Sasaki Y, Chao TI, Kiss Z, Chen X, Tian J, Katsuyama M, Yabe-Nishimura C, Xi Y, Szyndralewicz C, Schröder K, Shah A, Brandes RP, Haj FG,

Török NJ. (2015) Hepatocyte NADPH Oxidase 4 Regulates Stress Signaling, Fibrosis, and Insulin Sensitivity During Development of Steatohepatitis in Mice. *Gastroenterology* 149, 468-480. 査読有

〔学会発表〕(計4件)

Masato Katsuyama, Noriaki Arakawa, Chihiro Yabe-Nishimura. Analyses of signaling pathways involved in TGF- β -induced NOX4 expression and ensuing fibrogenic responses. 2014 Gordon Research Conferences on Nox Family NADPH Oxidases. May 21, 2014. Renaissance Tuscany Il Ciocco Resort, Lucca (Barga), Italy.

勝山真人. NOX/NADPH オキシダーゼの多彩な機能と病態への関与. 第31回臨床フリーラジカル会議. 2014年12月5日. 里山の休日 京都・烟河(京都府亀岡市).

勝山真人, 荒川憲昭, 矢部千尋. NOX4/NADPH オキシダーゼ由来活性酸素種の標的蛋白の探索. 第88回日本薬理学会年会. 2015年3月19日. 名古屋国際会議場(愛知県名古屋市).

勝山真人, 矢部千尋. ほ乳類における NOX/NADPH oxidase の生理機能. BMB2015(第38回日本分子生物学会年会・第88回日本生化学会大会合同大会). 2015年12月2日. 神戸ポートピアホテル(兵庫県神戸市).

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・大学院医学研究科・准教授
研究者番号: 60315934

(3) 連携研究者

荒川 憲昭 (ARAKAWA, Noriaki)
横浜市立大学・生命ナノシステム科学研究科・助教
研究者番号: 60398394

矢部(西村) 千尋 (YABE-NISHIMURA, Chihiro)
京都府立医科大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号: 70150571