

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：32661

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461184

研究課題名(和文)酸化ストレス防御タンパク質DJ-1の肺胞・気管支での機能と呼吸器疾患発症への関与

研究課題名(英文)Effect of respiratory disease onset and functionality in the alveolar-bronchial of oxidative stress defense protein DJ-1

研究代表者

平 敬宏 (TAIRA, Takahiro)

東邦大学・医学部・教授

研究者番号：70197036

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：酸化ストレス防御タンパク質DJ-1の肺での機能と呼吸器疾患発症への関与の検討を行った。ヒト肺胞基底上皮細胞由来A549を用い、DJ-1タンパク質発現抑制株を作製し、酸化ストレスへの抵抗性を検討した。その結果、発現抑制細胞株では、酸化ストレスに対してさらに脆弱となった。次に、親細胞と発現抑制細胞株間で、変動している遺伝子をDNAマイクロアレイ法によって検索した。その結果、呼吸器疾患発症への関与が報告されている薬物輸送担体で変動していた。一部の担体とDJ-1が共局在性が共焦点顕微鏡観察から明らかとなった。DJ-1タンパク質と薬物輸送担体の相互・協調作用が強く示唆された。

研究成果の概要(英文)：I examined the involvement of the function of the lungs and oxidative stress defense protein DJ-1 respiratory disease onset. Using human lung epithelial cell-derived A549, to establish a DJ-1 protein knockdown cell line. As a result, the knockdown cell lines, became more vulnerable to oxidative stress. Then, the gene whose expression is varied among A549 cells and knockdown cell lines were screened by DNA micro array. As a result, gene expression of some transporters were varied. The transporter involved in respiratory disease onset have been reported. The transporter and DJ-1 are co-localization is revealed from confocal microscopy. Coordinated action of DJ-1 protein and the transporter was suggested.

研究分野：分子生物学、細胞生物学

キーワード：酸化ストレス DJ-1タンパク質 慢性閉塞性肺疾患 薬物輸送担体

1. 研究開始当初の背景

動物個体は、さまざまな外界からのストレスに対し防御機構を有する。例えば、外界から酸化ストレスが曝露されると体内での酸化と抗酸化のバランスが破綻しいろいろな疾患の発症原因となる。

DJ-1 タンパク質は、あらゆる臓器に大量に存在している。DJ-1 タンパク質が、さまざまな臓器で普遍的に存在するタンパク質であることから、機能としてすべての臓器に共通な細胞増殖、または各臓器に特有の機能など、さまざまな機能が推定されている。

神経細胞においては、曝露された活性酸素分子種 (ROS) を自己酸化することで還元し、ROS による細胞傷害を回避することが明らかになっている。

さらに DJ-1 タンパク質は、精巣においてはアンドロゲン受容体の制御因子として機能し、雄性個体の第二次性徴を制御し、さらに細胞がん化を抑制していることが明らかにされている。

これら以外も DJ-1 タンパク質は、Ask, MAPK, Toll-like receptor, Nrf2 などの各種シグナル伝達系への関与からアポトーシス抑制、または細胞がん化抑制、肺がん及び乳がんでは過剰酸化型 DJ-1 タンパク質の血中上昇が報告されている。

DJ-1 タンパク質は、上述のように、すべての臓器で高い発現が見られ、特に心臓、肺、脳-神経、精巣などで発現が高い。それ以外の臓器での機能は明らかにされていない。

肺は、DJ-1 タンパク質の発現量が高く、呼吸により常に酸素に曝されている。呼吸により酸素を吸収する肺組織は、酸素の化学的反応性の高さから、恒常的に酸化ストレスによる細胞傷害が引き起こされていることから恒常的に酸化ストレス下にある器官である。

そのため、肺が酸化ストレスから細胞・組織傷害回避機構への DJ-1 タンパク質の関与の有無とストレス回避への機能を検討することを目的とした。

2. 研究の目的

慢性閉塞性肺疾患 (COPD) は、肺泡損傷 (気腫化)、気道炎症が緩徐進行性および不可逆的に進行し気管支粘液腺の肥大や気道上皮の浮腫、気道平滑筋の肥厚、気道分泌液の貯留、などのいわゆる気道病変が生じる。

COPD 発症の主因は、喫煙中の窒素酸化物、炭化水素類など外因性因子であり、COPD 発症者の 9 割は喫煙者であるが、喫煙者のすべてが発症するわけではなく、遺伝的な個人差が示唆されている (*Respiratory Medicine*, 97, 115-22, 2003,)。

近年、慢性閉塞性肺疾患 (COPD) 罹患者の急増が問題視されている。現在、全世界での死因第 10 位であるが、2020 年までには死因第 3 位に上昇すると推定されている (*Eur. Respir. J.* 2006, 27:397-412)。COPD は、喫煙が発症原因であり、喫煙による酸化ストレ

スによる細胞傷害が主たる原因である。しかしながら、COPD 発症と喫煙歴 (喫煙年数 x 喫煙本数) 同程度の喫煙歴でも、女性が重篤化するなど著しい個人差および性差が明らかにされている。

現在までに、DJ-1 タンパク質と COPD の関連の研究は、唯一 COPD 患者で重症度が高くなるほど、肺組織内 DJ-1 タンパク質含量が低下するという疫学的報告がある (*Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2008, 178, 592-604)。この報告では、COPD 発症と重症化による DJ-1 タンパク質含量低下の原因は明らかにされていない。

DJ-1 タンパク質は、これまでの研究により、ROS を DJ-1 タンパク質自身が自己酸化することより消去されることが明らかにされている。COPD 重症化により肺組織で DJ-1 タンパク質が減少すれば、酸化ストレス防御機構が破綻し、そのため組織損傷、炎症化進行が想定できる。

また、COPD 患者の一部では、ステロイド抵抗性を示す。DJ-1 タンパク質は、Cezanne, ICAM と協調し炎症関連タンパク質 NF- κ B 機能を制御することが報告されている (*J.B.C.* 286: 4098-4106, 2011)。

このような、状況考察、先行研究から DJ-1 タンパク質発現量低下、DJ-1 タンパク質の過剰酸化の促進による機能不全のため COPD 発症の誘因となることが示唆される。

一方、DJ-1 タンパク質は、正常細胞においても一部が酸化状態にあり、酸化状態が過剰に進行すると、酸化ストレス消去機能が喪失するのみならず、不溶化し凝集する事によりミトコンドリアなどへ対する細胞毒性が明らかにされている。この過剰酸化を抑制する低分子化合物 (DJ-1 タンパク質酸化損傷抑制薬) がすでに開発されている。

そこで、本研究では、肺における酸化ストレス防御作用に対する DJ-1 タンパク質の機能、および COPD 発症との関係を検討し、さらに DJ-1 タンパク質酸化損傷抑制薬により肺組織の酸化ストレス損傷を回避できるか、すなわち新規視点にたった COPD 予防・治療法の可能性の検討を目的とする。

3. 研究の方法

(1) ヒト肺胞基底上皮腺癌細胞由来 A549 細胞、およびヒト気管支上皮細胞由来 Beas2B 細胞で、効率的に内在性 DJ-1 タンパク質発現を抑制する si-RNA 領域を検討した。

(2) (1) で決定された薬物耐性遺伝子を別に持つ発現 si-RNA ベクターを作製し、A549 細胞、Beas2B 細胞に導入し、恒常的内在性 DJ-1 タンパク質ノックダウン細胞を作製した。

(3) ノックダウン細胞と野生型細胞間で、タバコ煙直接曝露、タバコ煙抽出液曝露、各種酸化ストレス誘導薬物曝露での細胞生存性、および DJ-1 タンパク質の発現誘導の有無、DJ-1 タンパク質の酸化進行度を比較した。

さらに、酸化ストレス曝露前に細胞培養液に、

DJ-1 タンパク質酸化損傷抑制薬を添加し、細胞生存性、過剰酸化型 DJ-1 タンパク質形成抑制作用を検討した。

(4) Balb 3T3 マウスに、一日二時間タバコ煙を二週間強制的に曝露し、タバコ煙無曝露マウスとの肺組織での DJ-1 タンパク質の変化を検討した。

(5) DJ-1 タンパク質ノックダウン細胞と野生型 A549 細胞間で発現が変動している遺伝子を DNA マイクロアレイ法で探索した。

4. 研究成果

(1-3) ヒト DJ-1 タンパク質の発現を抑制すると想定される si-RNA を新たに開発し、常法に従って A549 細胞、および Beas2B 細胞に導入し 48 時間後に細胞抽出タンパク質を調製し、Western Blot 法により DJ-1 タンパク質を定量した。その結果、数種の配列の中から第 1 エクソン部の配列をもつ si-RNA が、DJ-1 タンパク質発現を Transient ではあるが 60~70% 抑制することが明らかになった。

そこで、恒常的な発現抑制細胞株を得るため、抑制効率の最も高かった配列を U6 プロモーターに繋ぎ、ハイグロマイシン B またはネオマイシン耐性遺伝子を有した si-RNA ベクターを作製した。

このベクターを A549 細胞、Beas2B 細胞に導入後、二週間の薬剤選択により出現した約 100 株が得られた。得られた薬剤耐性株から Western Blot 法により DJ-1 タンパク質を定量した。その結果、野生型細胞株(親株)から 25~30% DJ-1 発現が抑制された細胞株(ノックダウン株)が得られ、続く実験に用いた。

ノックダウン株は、通常培地での増殖性は、親株とは変化はなかった。一方、タバコ煙直接曝露、タバコ煙抽出液曝露、過酸化酸素添加などの酸化ストレス下におくと、親株に比べ酸化ストレス感受性(細胞死)が、わずかではあるが上昇していた。

また、酸化ストレス曝露、非曝露細胞から細胞抽出液を調製し、等電気泳動法により DJ-1 タンパク質の、還元型、酸化型、過剰酸化型の量比を比較した。その結果、親株とノックダウン株間では、有意差のある量比変動は認められなかったものの、ノックダウン株では DJ-1 タンパク質総量が低下しているため、わずかながら過剰酸化型の比が高くなる傾向が認められた。そのため、ノックダウン株では、細胞毒性が生じ、酸化ストレス感受性が高くなったと推察された。

次に、DJ-1 タンパク質酸化損傷抑制薬を、親株およびノックダウン株に、酸化ストレス曝露 24 時間前から投与しその作用を検討した。その結果、親株において生存率の上昇が有意に認められ、等電気泳動法による、還元型、酸化型、過剰酸化型の量比変動では、過剰酸化型の生成を抑制していることが明らかになった。この結果は、神経由来細胞、腺維芽細胞で得られている結果と同様であった。(J Neurochem. 105(6):2418-34,2008)

一方、ノックダウン株に対する酸化損傷抑制薬の生存性上昇、還元型、酸化型など量比は有意な違いは認められなかった。

(4) Balb 3T3 マウスにタバコ煙を強制的に吸わせ、肺での DJ-1 タンパク質変動を検討した結果、マウス生存性には顕著な差は認められなかったが、肺組織で酸化型および過剰酸化型 DJ-1 タンパク質の増加が認められた。

COPD の発症を考えた場合、経年の喫煙が発症の最大要因である。そのため、今回は二週間のタバコ煙曝露であったが、さらなる長期間タバコ煙曝露、曝露後から長期飼育後の肺組織の崩壊が予想される。現在この作業仮説をもとに研究を計画(一部実行中)している。

(5) 先にあげたように Transient な si-RNA 導入により、内在性 DJ-1 タンパク質を 70 % 抑制する事ができた。そこで、この Transient 抑制細胞と陰性対照として Random si-RNA を導入した A549 細胞から RNA を調製し、DNA マイクロアレイ解析により、DJ-1 タンパク質低下により発現が変動する遺伝子を網羅的に探索した。

DNA マイクロアレイ法の結果、DJ-1 タンパク質発現抑制により、数多くの遺伝子発現が変動していた。DJ-1 タンパク質の多様性機能が既に明らかにされ、作用する遺伝子には多岐に渡った。多くが、酸化ストレスにより影響を受ける遺伝子群であったが、今回ある種の薬物輸送担体の顕著な発現減少が認められた。

そこで、リアルタイム-PCR 法により親株とノックダウン細胞での輸送担体の発現変動を確認したところ、DJ-1 タンパク質の低下により、明らかに輸送担体の発現が抑制されていた。この薬物輸送担体は、肺を含めた多くの臓器で発現しており、損傷または機能低下すると各種臓器で炎症惹起、さらにガン化することが既に報告されている。

薬物輸送担体の機能異常、量的な不足による輸送能低下から炎症が惹起されることは、慢性的な炎症疾患である COPD の複合的発症原因の一つと推定できる。そのため、現在この輸送担体の転写プロモーターをレポーターとし、エフェクターとして DJ-1 の野生型、または各種ドミナントネガティブ変異体を共導入したレポーターアッセイから、DJ-1 タンパク質の輸送担体転写プロモーター上での作用点を同定し、DJ-1 タンパク質による薬物輸送担体発現調節機構解明、薬物輸送担体のノックダウンによる酸化ストレスへの感受性変化、炎症によるアポトーシス誘導の差の検討を企画している。

さらに、今後 COPD 患者での、この薬物輸送担体の発現、局在性の検討を目指す。

以上のように、当初の研究計画から少々変更を伴うが、DJ-1 タンパク質の薬物輸送担体を介する肺組織での機能が明らかになった。

間接的ではあるが、DJ-1 タンパク質が肺組織における、炎症の惹起、COPD 発症への関与が明らかになった。

今回、COPD 発症要因としての DJ-1 タンパク質の損傷・異常の検討を目指したが、今後は、DJ-1 タンパク質の酸化ストレス防御機構に加え、多機能性タンパク質 DJ-1 の薬物輸送担体への転写調節作用が明らかにする予定である。

今後、DJ-1 タンパク質の酸化ストレス防御機構にさらにフォーカスをあてるとともに、DNA マイクロアレイ解析で見いだされた薬物輸送担体と DJ-1 タンパク質の相互機能の解析から COPD のような慢性肺疾患発症機序解明を目指す。

最後に、DJ-1 タンパク質の肺組織での酸化ストレス防御機構を今回は明確に解明することが出来なかった。当初企画した研究の結果は、残念ながら有意差が高く認められなかった。

この有意差が認められなかった原因の一つに、ノックダウン効率が 25~30%と低かったことを想定している。DJ-1 タンパク質は、どの組織においても細胞内に abundant に存在する。そのため、発現抑制をさらに高めるか、DJ-1 ノックアウトマウス肺由来細胞を樹立し用いることが今後の課題として提起された。

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 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平 敬宏 (TAIRA, Takahiro)

東邦大学・医学部・教授

研究者番号：70197036

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：