

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：23701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460070

研究課題名(和文) レドックス制御機構としてのエピジェネティクスにおける細胞内銅イオン動態の意義

研究課題名(英文) Involvement of intracellular copper ion homeostasis in epigenetic redox regulation

研究代表者

神谷 哲朗 (Kamiya, Tetsuro)

岐阜薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：60453057

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)：ヒト単球系細胞株のマクロファージへの分化過程における抗酸化酵素SOD3の発現制御機構を解析したところ、細胞内銅イオン依存的に制御を受けることを明らかにした。また、銅輸送タンパクAtox-1がSOD3遺伝子の直接的な転写因子として機能することを見出した。細胞内銅イオン動態の変化とエピジェネティクスとの関連性を検討したところ、ヒストンのアセチル化修飾に細胞内銅イオン関与の可能性が示唆された。以上、本研究成果はレドックス制御機構としての細胞内銅イオン動態の役割をクローズアップするものであり、血管系疾患の治療・予防に向けて有益な知見を提供できたものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：We investigated the involvement of intracellular copper homeostasis in SOD3 regulation during monocytic differentiation into macrophage. We confirmed that the alteration of copper homeostasis after phorbol ester (TPA) treatment regulates SOD3 expression. Moreover, Atox-1, a copper chaperone, functions as a transcription factor of SOD3. It raises the possibility that the alteration of copper homeostasis after TPA treatment changes histone modification, especially in histone acetylation. Overall, our results suggest that intracellular copper ion functions as a key molecule for the redox regulation, and better understanding the role of copper ion might lead to improve vascular diseases.

研究分野：医歯薬学

キーワード：SOD3 銅イオン Atox-1

1. 研究開始当初の背景

心血管系疾患は、我が国における死亡原因の上位であることから、その予防・改善に向けてガイドラインの改定など社会的対策が進められている。近年、慢性的な酸化ストレスが血管系疾患増悪のキープクターとなる考え方が広まっており、酸化ストレスを軽減することが疾患の増悪の抑制に繋がると考えられている。

本研究のターゲット遺伝子である **superoxide dismutase (SOD)** は生体内における主要な抗酸化酵素であり、**SOD1**、**SOD2** および **SOD3** の三種のアイソザイムの存在が知られている。**SOD3** は細胞外局在型のアイソザイムであり、血管内皮細胞フロントラインにおいて組織を酸化ストレスから防御している。**SOD1** と **SOD3** は共に活性中心に銅イオンを配し、非活性ならびに活性発現は同一であることが報告されている。**SOD3** への銅イオンの配位については、**copper transporter 1**、**antioxidant-1 (Atox-1)** および **ATP7A** がその責任タンパクとして同定されている。最近では、**ATP7A** が糖尿病の増悪に関与すること、**Atox-1** が銅輸送タンパクとしての機能以外に転写因子として機能し遺伝子の発現制御に関与することが報告されている。このことから、細胞内外における銅イオン動態と各種疾患との関連性の解明が注目されている。

我々はこれまでに、血管系疾患の増悪因子となるヒト単球系細胞株において、エピジェネティックな **SOD3** 発現制御機構が存在することを見出している。**DNA** メチル化やヒストン修飾を含む遺伝子のエピジェネティクス制御の破綻と各種疾患との関連性が報告されている。特に、単球系細胞のマクロファージへの分化過程においては、細胞内銅イオンバランスが変化することから、細胞内銅イオン動態の変化がエピジェネティックな **SOD3** 発現を制御している可能性が示唆される。そこで、**SOD3** 発現制御機構としての細胞内銅イオンの関与とともに、本制御機構におけるエピジェネティクスの役割の解明を目指した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、生体に広範に存在する銅イオンの酸化ストレスに対する恒常性の維持への直接的関与の可能性を検証することである。

そこで、**SOD3** をモデルタンパクとし、そのエピジェネティクス制御機構としての銅イオンならびにその銅輸送タンパクの関与の意義の解明を、①**SOD3** 発現制御機構における銅輸送タンパク **Atox-1** の関与、②エピジェネティックな **SOD3** 発現に及ぼす銅イオンの関与、の観点から解析した。

3. 研究の方法

(1) 細胞培養

ヒト単球系細胞株 (THP-1 細胞) は、4 mM L-グルタミン、100 unit/mL ペニシリン、0.1 mg/mL ストレプトマイシン、10% 非働化ウシ胎児血清 (FCS) を含む RPMI1640 を用いて、37°C、5% CO₂ 条件下で培養した。THP-1 細胞のマクロファージ様細胞への分化は、100 nM ホルボールエステル (TPA) 処理により行った。

(2) mRNA 発現量の測定

TPA 処理した細胞ならびに各種阻害剤で処理した細胞から、トリゾール試薬を用いて総 RNA を抽出し、次いで cDNA の合成を行った。調製した cDNA を用いて、**SOD3** および **Atox-1** を含む各種銅輸送タンパクの mRNA 発現量を real time RT-PCR 法にて測定した。

(3) タンパク質発現量の測定

TPA 処理した細胞ならびに各種阻害剤で処理した細胞から、総タンパク質、核タンパク質あるいはコアヒストンの抽出を行い、ウェスタンブロット法にて、**Atox-1** を含む各種銅輸送タンパク発現量ならびにアセチル化ヒストン発現量を測定した。

(4) **Atox-1** 過剰発現 THP-1 細胞の作製

THP-1 細胞より調製した cDNA を鋳型として、**Atox-1** タンパク質特異的プライマーを用いて遺伝子を増幅した。その後、本遺伝子を pcDNA3.1 プラスミドに組み込むことで、**Atox-1** 過剰発現プラスミドを作製した。THP-1 細胞を播種した後、リポフェクタミン 3000 を用いて本プラスミドをトランスフェクションすることで、**Atox-1** が一過性に過剰発現された細胞を作製した。

(5) **Atox-1** ノックダウン THP-1 細胞の作製

THP-1 細胞を播種した後、siRNA MAX を用いて **Atox-1** の siRNA をトランスフェクションすることで、**Atox-1** が一過性にノックダウンされた細胞を作製した。

(6) クロマチン免疫沈降法 (ChIP 法)

TPA 処理した THP-1 細胞を、1%パラホルムアルデヒドにて固定化した後、細胞溶解液を調製した。その後、細胞溶解液を超音波処理することで 100 から 800 bp の DNA 断片を調製した。調製した DNA 断片を **Atox-1** 抗体あるいは非特異的 IgG 抗体と一晚インキュベートした。その後、磁気ビーズを添加し、さらに 2 時間インキュベートした。インキュベート後、フェノール/クロロホルム抽出およびエタノール沈殿することで免疫沈降物を得た。得られた沈降物を用いて PCR 反応を行い、**SOD3** プロモーター領域における **Atox-1** の結合度を評価・解析した。

4. 研究成果

(1) TPA 処理による銅輸送タンパク発現変動とその細胞内局在の変化

SOD3 発現制御機構における Atox-1 の関与を検討するにあたり、はじめに TPA 処理による銅輸送タンパクの発現変動を検討した。THP-1 細胞を TPA で 24 時間処理したところ、ATP7A mRNA およびタンパク発現の有意な増大が認められた (図 1A、1B)。一方で、copper chaperon for SOD1 (CCS) および Atox-1 mRNA 発現に顕著な変化は認められなかった。ATP7A の発現増大は、細胞内銅イオン濃度の上昇に由来するという報告があることから、TPA 処理により細胞内銅イオン濃度が上昇している可能性が示唆された。

近年、Atox-1 は銅輸送タンパクとしての機能以外に、細胞内の銅イオン濃度依存的に転写因子として機能することが報告された。そこで、TPA 処理により Atox-1 が核移行している可能性をウエスタンブロッティング法により検討した。その結果、TPA 処理 1 時間後に Atox-1 の核移行が認められた (図 1C)。以上より、THP-1 細胞を TPA で処理することで細胞内銅イオン濃度が増大する可能性とともに、Atox-1 が転写因子として機能している可能性が示唆された。

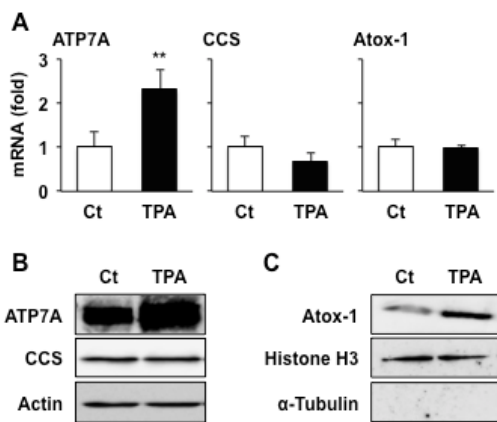


図 1 TPA 処理による銅輸送タンパクの発現変動と細胞内局在変化

A: mRNA 発現量 (** $p < 0.01$ vs. TPA 未処理細胞)、B: タンパク質発現量、C: 核画分における Atox-1 タンパク発現量

(2) TPA 誘導性 SOD3 発現増大に及ぼす細胞内銅イオンの関与

TPA 誘導性 SOD3 発現増大に及ぼす細胞内銅イオンの関与を、銅イオンキレーター bathocuproinedisulfonic acid (BCS) を用いて検討した。200 μ M の BCS で THP-1 細胞を 72 時間培養した後、TPA で 24 時間処理したところ、TPA 誘導性の SOD3 発現増大は有意に抑制された (図 2A)。この結果より、TPA 誘導性の SOD3 発現増大には、細胞内銅イオン

濃度の増大が関与することが明らかとなった。また、TPA 誘導性の Atox-1 タンパクの核移行も BCS の前処理により顕著に抑制された (図 2B)。以上より、TPA 処理による細胞内銅イオンの増大が Atox-1 の核移行を促進し、SOD3 発現を増大させると考えられた。

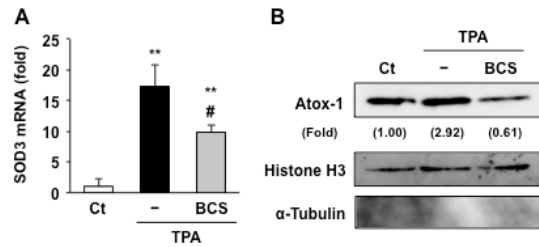


図 2 TPA 誘導性 SOD3 発現増大に及ぼす細胞内銅イオンの関与

A: SOD3 mRNA 発現量 (** $p < 0.01$ vs. TPA 未処理細胞, # $p < 0.05$ vs. TPA 処理細胞)、B: Atox-1 タンパク発現量

(3) SOD3 発現制御機構における Atox-1 の意義

Atox-1 が直接 SOD3 遺伝子プロモーターに結合し転写因子として機能しているか否かを、ChIP 法にて検討した。TPA 未処理の細胞においては SOD3 遺伝子プロモーター領域への Atox-1 の結合は認められなかったが、TPA 処理により本領域に Atox-1 が結合することを見出した (図 3)。

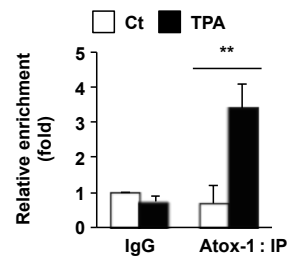


図 3 SOD3 遺伝子プロモーター領域における Atox-1 の結合解析

ChIP 法 (** $p < 0.01$ vs. TPA 未処理細胞)

上記の結果を踏まえ、Atox-1 の過剰発現細胞株およびノックダウン細胞株を作製し、SOD3 発現制御機構における Atox-1 の役割を詳細に解析した。Atox-1 発現プラスミドを THP-1 細胞に導入した結果、Atox-1 発現の増大が認められた (図 4A)。また、Atox-1 の過剰発現により SOD3 発現が増大すること、TPA 誘導性の SOD3 発現増大をさらに亢進することを見出した (図 4B)。一方、siRNA を用いて Atox-1 発現をノックダウンした細胞においては、TPA 誘導性の SOD3 発現増大は有意に抑制された (図 4C、4D)。以上の結果より、TPA 誘導性の SOD3 発現制御機構において、Atox-1 が SOD3 遺伝子プロモーターに結合し、

転写因子として機能することで、その発現を正に制御すると考えられた。

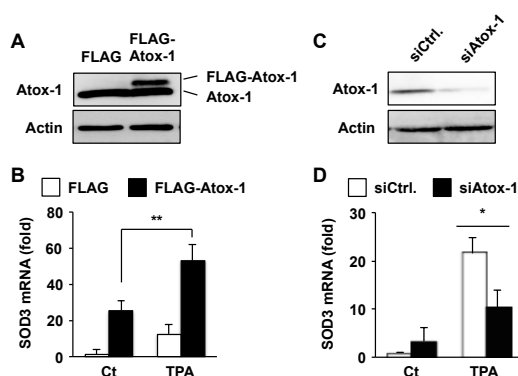


図4 Atox-1の過剰発現あるいはノックダウン細胞におけるSOD3発現

A: Atox-1タンパクの過剰発現、B: SOD3 mRNA発現量 (** $p < 0.01$ vs. TPA未処理細胞)、C: Atox-1タンパクのノックダウン、D: SOD3 mRNA発現量 (* $p < 0.01$ vs. siCtrl.)

(4) エピジェネティックなSOD3発現に及ぼす銅イオンの関与

これまでに、THP-1細胞におけるSOD3発現制御機構として、DNAメチル化およびヒストンアセチル化などのエピジェネティクスが関与することを見出している。そこで、エピジェネティックなSOD3発現に及ぼす銅イオンの関与を検討した。200 μ MまでのCuSO₄添加ならびにBCSの添加によりDNAメチル化状態に大きな変化は認められなかったものの、ヒストンアセチル化レベルに関しては変動する傾向が認められた(データ未掲載)。

以上の結果より、ヒト単球系細胞のマクロファージへの分化過程において、Atox-1の核移行を介してSOD3発現が増大することが明らかとなった。SOD3は血管系において、抗酸化作用の他、血管拡張に関与する一酸化窒素のバイオアベイラビリティの向上に関与することが報告されている。また、Atox-1のノックアウトマウスでは、損傷を受けた血管の再構築(血管リモデリング)が阻害されることから、細胞内銅イオン動態を適切に制御することは、血管の組織恒常性の維持に繋がると考えられた。

血管組織恒常性維持におけるAtox-1の機能が明らかになりつつある一方、ヒト血管内皮細胞においては、Atox-1は炎症性サイトカインであるTNF α 誘導性の血管細胞接着因子-1 (VCAM-1)の発現増大に関与することが報告されている。我々も本研究において、Atox-1が活性酸素産生酵素gp91^{phox}の発現を正に制御している可能性を見出している(データ未掲載)。今後、Atox-1の転写因子としての機能を詳細に解析していくことは、細胞内銅イオン動態の変化に伴う生体応答の

解明に繋がると考えられた。

エピジェネティクスとは、塩基配列によらない遺伝子の発現制御機構のことであり、エピジェネティクス異常と各種疾患の発症との関連性が指摘されている。本研究において、SOD3発現制御機構としての細胞内銅イオン動態とエピジェネティクスとの関連性を検討したが、有意な結果は認められなかった。エピジェネティクスは標的とする組織・細胞により大きくその制御機構が異なることが報告されていることから、今後、その関与を詳細に検討していく必要があると考えられた。

本研究成果は、レドックス制御機構としての細胞内銅イオン動態の役割をクローズアップするものであり、各種疾患の発症・増悪の抑制に向けて有益な知見を提供できたものとする。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計9件)

- ① Atsuko Ohashi, Hiroyuki Yasuda, Tetsuro Kamiya, Hirokazu Hara, Tetsuo Adachi. CAPE increases the expression of SOD3 through epigenetics in human retinal endothelial cells. *J. Clin. Biochem. Nutr.*, in press, 査読有.
- ② Tetsuro Kamiya, Risa Nakahara, Namiki Mori, Hirokazu Hara, Tetsuo Adachi. Ten-eleven translocation functions as a mediator of SOD3 expression in human lung cancer A549 cells. *Free Radic. Res.*, 51, 329-336, 2017, 査読有. doi: 10.1080/10715762.2017.1313415.
- ③ Shuhei Hattori, Tetsuro Kamiya, Hirokazu Hara, Tetsuo Adachi (他2名, 2番目). CoCl₂ decreases EC-SOD expression through histone deacetylation in COS7 cells. *Biol. Pharm. Bull.*, 39, 2036-2041, 2016, 査読有. doi.org/10.1248/bpb.b16-00551.
- ④ Risa Nakahara, Junya Makino, Tetsuro Kamiya, Hirokazu Hara, Tetsuo Adachi. Caffeic acid phenethyl ester suppresses monocyte adhesion to the endothelium by inhibiting NF- κ B/NOX2-derived ROS signaling. *J. Clin. Biochem. Nutr.*, 58, 174-179, 2016, 査読有. doi: 10.3164/jcfn.15-94.
- ⑤ Tetsuro Kamiya, Aki Goto, Eri Kurokawa, Hirokazu Hara, Tetsuo Adachi. Crosstalk mechanism among EMT, ROS, and histone acetylation in phorbol ester-treated human breast cancer MCF-7 cells. *Oxid. Med. Cell. Longev.*, 2016, 1284372, 2016, 査読有. doi: 10.1155/2016/1284372.
- ⑥ Junya Makino, Tetsuro Kamiya, Hirokazu Hara, Tetsuo Adachi (他4名, 3番目). Royal jelly constituents increase the

expression of extracellular-superoxide dismutase through histone acetylation in monocytic THP-1 cells. *J. Nat. Prod.*, 79, 1137-1143, 2016, 査読有. doi: 10.1021/acs.jnatprod.6b00037.

- ⑦ Junya Makino, Tetsuro Kamiya, Hirokazu Hara, Tetsuo Adachi (他 4 名, 3 番目). Suppression of EC-SOD by oxLDL during vascular smooth muscle cell proliferation. *J. Cell. Biochem.*, 117, 2496-2505, 2016, 査読有. doi: 10.1002/jcb.25542.
- ⑧ Gin-Fu Chen, Tetsuro Kamiya (他 16 名, 6 番目). Copper transport protein antioxidant-1 promotes inflammatory neovascularization via chaperone and transcription factor function. *Sci. Rep.*, 5, 14780, 2015, 査読有. doi: 10.1038/srep14780.
- ⑨ Junya Makino, Miyuki Nii, Tetsuro Kamiya, Hirokazu Hara, Tetsuo Adachi. Oxidized low-density lipoprotein accelerates the destabilization of extracellular-superoxide dismutase mRNA during foam cell formation. *Arch. Biochem. Biophys.*, 575, 54-60, 2015, 査読有. doi: 10.1016/j.abb.2015.04.001.

[学会発表] (計 10 件)

- ① 神谷 哲朗、市原 茉莉、原 宏和、足立 哲夫、SOD3 発現制御機構としてのクロマチンリモデリングの分子機構、日本酸化ストレス学会東海支部第 5 回学術集会、2017 年 2 月 18 日、愛知学院大学 (愛知・名古屋) .
- ② Tetsuro Kamiya, Kosuke Takeuchi, Saki Fukudome, Hirokazu Hara, Tetsuo Adachi, Copper transporter, antioxidant-1 (Atox-1) modulates redox homeostasis during phorbol ester-induced THP-1 cell differentiation, 23rd Annual Meeting of the society for Redox Biology and Medicine, 2016 年 11 月 17 日、San Francisco (USA).
- ③ 神谷 哲朗、仲原 理紗、森 菜美紀、原 宏和、足立 哲夫、SOD3 発現制御機構としてのジオキシゲナーゼ TET1 の関与、第 14 回がんハイポキシア研究会、2016 年 11 月 4 日、岐阜グランドホテル (岐阜・岐阜) .
- ④ 神谷 哲朗、エピジェネティクスを介した SOD3 発現制御機構、第 89 回日本生化学会大会、2016 年 9 月 27 日、仙台国際センター (宮城・仙台) .
- ⑤ 神谷 哲朗、市原 茉莉、原 宏和、足立 哲夫、ヒト単球系細胞株における SOD3 発現制御機構としてのクロマチンリモデリングの解明、第 69 回日本酸化ストレス学会学術集会、2016 年 8 月 31 日、仙台国際センター (宮城・仙台) .

- ⑥ 神谷 哲朗、酸化ストレスとエピゲノム～「創薬」への展開～、第 11 回プラズマ医療サイエンスの扉・サイエンスカフェ、2016 年 5 月 20 日、名古屋大学 (愛知・名古屋) .
- ⑦ Tetsuro Kamiya, Risa Nakahara, Hirokazu Hara, Tetsuo Adachi, 22nd Annual Meeting of the society for Redox Biology and Medicine, 2015 年 11 月 19 日、Boston (USA).
- ⑧ 神谷 哲朗、仲原 理紗、原 宏和、足立 哲夫、Ten-eleven translocation 1 を介した EC-SOD 遺伝子の DNA 脱メチル化機構、第 68 回日本酸化ストレス学会学術集会、2015 年 6 月 12 日、かごしま県民交流センター (鹿児島・鹿児島) .
- ⑨ Tetsuro Kamiya, Aki Goto, Hirokazu Hara, Tetsuo Adachi, Crosstalk among ROS, epigenetics and TPA-induced EMT in human breast cancer MCF7 cells, 2014 年 11 月 22 日、Seattle (USA).
- ⑩ 神谷 哲朗、レドックス制御機構としてのエピジェネティクス、第 26 回腎とフリーラジカル研究会、2014 年 9 月 20 日、愛知県産業労働センター ウィンクあいち (愛知・名古屋) .

[図書] (計 2 件)

- ① 神谷 哲朗、安田 浩之、原 宏和、山田 晴生、足立 哲夫、腎と透析、東京医学社、964-970、2017.
- ② 神谷 哲朗、服部 脩平、原 宏和、足立 哲夫、腎とフリーラジカル第 12 集、東京医学社、100-103、2014.

[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
<http://sv1.gifu-pu.ac.jp/lab/rinyaku/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

神谷 哲朗 (KAMIYA, Tetsuro)
岐阜薬科大学・薬学部・助教
研究者番号：60453057

(2) 研究分担者

原 宏和 (HARA, Hirokazu)
岐阜薬科大学・薬学部・准教授
研究者番号：30305495

足立 哲夫 (ADACHI, Tetsuo)
岐阜薬科大学・薬学部・教授
研究者番号：40137063

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし