

転写因子 Nrf2 の活性化により誘導される細胞応答

~保護効果の増強と、化学療法に対する感受性の変化~

Cellular Responses Induced by Activation of Transcription Factor Nrf2:
Enhancement of Cytoprotective Effects and Modulation of Sensitivity
to Chemotherapy

平成 25 年度入学 西本 翔一 (Nishimoto, Shoichi)

指導教員 小笠原 裕樹

生体は外界から摂取した毒物や体内で生じた有害な成分を無毒化・排泄する機能を備えている。近年の研究から、抗酸化・解毒代謝酵素等の細胞保護に関わる遺伝子の発現制御において中心的な役割を担う転写因子として NF-E2 p45-related factor 2 (Nrf2)が見出された。Nrf2 は非ストレス状態では細胞質で Kelch-like ECH associated protein 1 (Keap1)に捕捉され、ユビキチン-プロテアソーム系による分解を受けているが、酸化ストレス、求電子物質、重金属¹⁾による刺激により Keap1 による抑制が解除され、核内に移行する。Nrf2 は核内で抗酸化応答配列と結合し、下流にある解毒代謝、抗酸化に関わる遺伝子の発現を誘導することで細胞の恒常性維持に寄与していると考えられている。

Nrf2/Keap1 pathway (Nrf2 系) は細胞保護的に機能することから、Nrf2 系を活性化する物質が、酸化およびカルボニルストレス等の関与が予想される疾患の治療薬として臨床応用され始めている。しかし、その解毒・細胞保護メカニズムには未だ不明瞭な点を残している。

現在、Nrf2 活性化剤が疾患の予防、治療薬として注目されている一方で、がん細胞における Nrf2 系の活性化が抗がん剤による薬物治療の妨げとなる可能性が危惧されている。

本研究の第 1 部では、神経細胞における、反応性の高いカルボニル化合物であるメチルグリオキサール (MG) の解毒機構における Nrf2 系の関与を明らかにするため、ヒト由来神経細胞株 SH-SY5Y を用いて、MG 曝露に対する Nrf2 活性化剤の効果について検討した。第 2 部では、急性前骨髄球性白血病 (APL) などの化学療法において Nrf2 系の活性化がもたらす影響に着目し、APL 由来細胞株 NB4 に対し、抗がん剤である三酸化ヒ素 (ATO) を処理するとき、事前の Nrf2 系の活性化が与える効果について検証した。

1-1. 神経細胞株における Nrf2 活性化による MG 毒性の軽減²⁾

神経細胞株 SH-SY5Y に対し Nrf2 活性化剤として知られている carnosic acid (CA) または 1-[2-cyano-3-,12-dioxooleana-1,9(11)-dien-28-oyl] imidazole (CDDO-Im) を前処理したところ、Nrf2 の核内蓄積 (Fig.1A) と、それに伴う MG による細胞毒性の軽減が観察された (Fig. 1B)。また、MG との反応で生成するカルボキシエチルリジン (CEL)

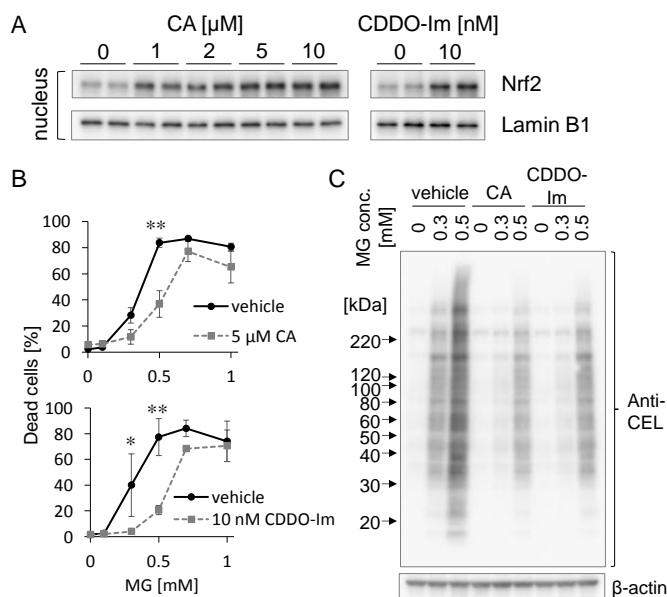


Fig. 1. SH-SY5Y 細胞における Nrf2 活性化による MG 毒性軽減効果

SH-SY5Y 細胞に対し、(A)各濃度の CA または CDDO-Im を 24 時間処理し、核画分中の Nrf2 をウエスタンブロット法により検出した。(B, C) 5 μM CA または 10 nM CDDO-Im を 24 時間前処理し、培地交換により CA または CDDO-Im を除去した後に各濃度の MG を添加し、24 時間培養後の死細胞の割合 (B) を蛍光染色法で測定し、4 時間後の CEL 構造を有するタンパク質 (C) をウエスタンブロット法で検出した。Mean ± SD (n = 3), *P < 0.05, **P < 0.01.

化された細胞内タンパク質の生成は、Nrf2系の活性化により顕著に抑制された(Fig. 1C)。この結果から、Nrf2系の活性化が、MGによる神経細胞の毒性発現とそれに伴うタンパク質の修飾に対し、防御的に働くことが示唆された。

1-2. MG 毒性軽減における還元型グルタチオン(GSH)の役割

MGのグリオキサラーゼ(GLO)系による解毒代謝には、GSHが基質として必要であり、Nrf2系がGSH合成に関与することが知られている。本研究において、Nrf2活性化剤の処理により、律速酵素であるGLO1自体の発現には変化は見られなかったが、GSH合成に関わる遺伝子(GCLC、GCLM、xCT)の発現増大が認められた(Table 1)。そこで、GCL特異的な阻害剤であるbuthionine sulfoximine (BSO)を用いて検討を行ったところ、Nrf2活性化剤によ

Table 1. SH-SY5Y細胞におけるNrf2活性化剤による遺伝子発現変動

Gene	Relative mRNA expression (vehicle = 1)		
	vehicle	5 μ M CA	10 nM CDDO-Im
GCLC	1.00 \pm 0.18	1.43 \pm 0.11*	1.40 \pm 0.12*
GCLM	1.00 \pm 0.25	2.50 \pm 0.44**	1.98 \pm 0.32*
xCT	1.00 \pm 0.45	6.30 \pm 1.89**	5.82 \pm 1.17**
GLO1	1.00 \pm 0.02	0.94 \pm 0.02	0.94 \pm 0.12

Mean \pm SD (n = 3), * P < 0.05, ** P < 0.01 vs vehicle. GCLC, γ -glutamyl-cysteine ligase catalytic subunit; GCLM, γ -glutamyl-cysteine ligase modifier subunit; xCT, solute carrier family 7 member 11; GLO1, glyoxalase 1

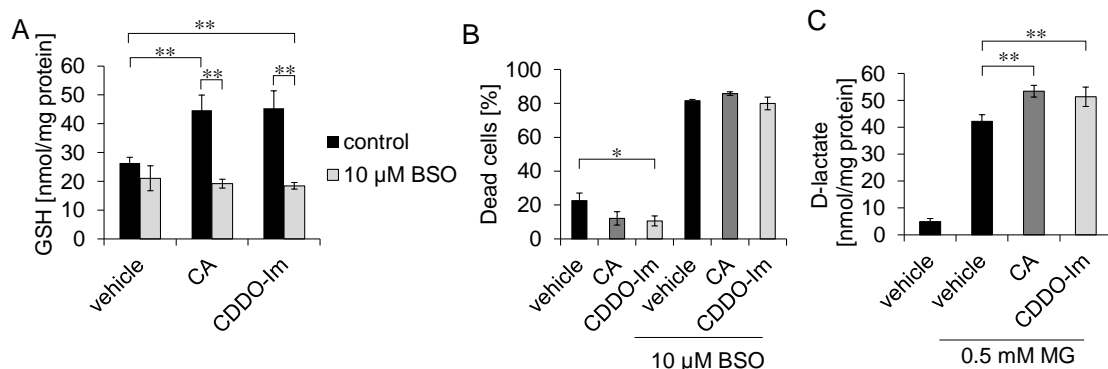


Fig. 2. Nrf2活性化剤のMG毒性軽減効果におけるGSHの関与

SH-SY5Y細胞に対し、(A) 5 μ M CAまたは10 nM CDDO-Imと同時に10 μ M BSOを24時間処理した後、細胞内GSH濃度を測定した。(B) 5 μ M CAまたは10 nM CDDO-Imと同時に10 μ M BSOを24時間処理し、培地交換した後に0.3 mM MGを24時間曝露した。その後、死細胞の割合を蛍光染色法で測定した。(C) 5 μ M CAまたは10 nM CDDO-Imを24時間処理し、培地交換した後に0.5 mM MGを30分間曝露した。その後、直ちに細胞内D-lactateを測定した。Mean \pm SD (n = 3), * P < 0.05, ** P < 0.01.

る細胞内 GSH 量の増大(Fig.2A)と MG 毒性軽減効果(Fig.2B)は BSO 処理によって共に消出した。また、MG のグリオキサラーゼ系による解毒代謝産物である D-乳酸の生成は Nrf2 活性化により促進された(Fig. 2C)。以上の結果より、Nrf2 系の活性化によって、SH-SY5Y 細胞内 GSH 量は増大し、グリオキサラーゼ系による代謝効率を促進することで MG によるタンパク質の修飾を抑制し、細胞毒性を軽減していることが明らかとなった。

2-1. Nrf2 活性化剤がヒ素製剤の抗がん作用に与える影響³⁾

急性前骨髄球性白血病 (APL)における事前の Nrf2 系の活性化が、ATO の抗がん作用に与える影響について調べた。その結果、NB4 細胞に対し CA を処理することで Nrf2 が核内に蓄積し

(Fig. 3A)、細胞内 GSH 量が増大することが確認された(Fig. 3B)。更に、CA 前処理を行った NB4 細胞に ATO を処理するとき、

APL に対する殺細胞性が抑制された(Fig. 3C)。

2-2. Nrf2 活性化による細胞内ヒ素蓄積の抑制

NB4 細胞に対し CA を前処理せずに ATO を添加したとき、細胞内ヒ素濃度は上昇し、12 時間後に最大となった (Fig. 4)。しかし、CA を前処理することにより、ATO 処理による細胞内ヒ素濃度の上

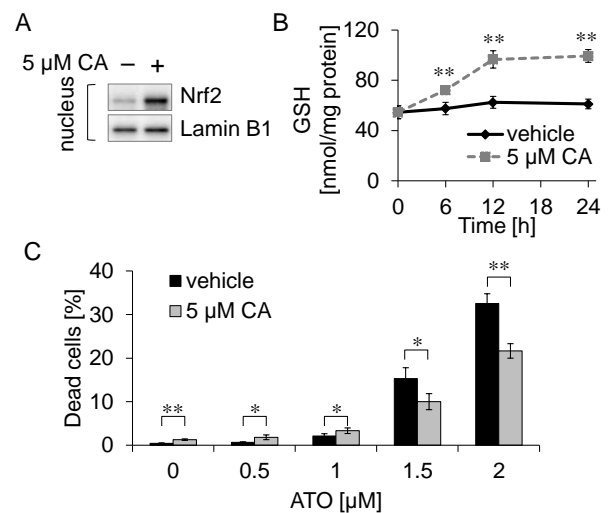


Fig. 3. NB4 細胞に対する ATO 処理における CA 前処理の影響

NB4 細胞に対し、(A) 5 μM CA を 24 時間処理し、核画分中の Nrf2 をウエスタンブロット法により検出した。(B) 5 μM CA を 0-24 時間処理したときの細胞内 GSH 濃度を測定した。(C) 5 μM CA を 24 時間前処理し、次いで 0-2 μM ATO を 48 時間処理した後、死細胞の割合を蛍光染色法で測定した。Mean ± SD (n = 4), *P < 0.05, **P < 0.01.

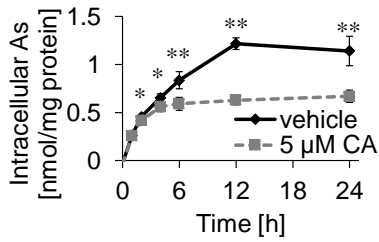


Fig. 4. CA 前処理による細胞内ヒ素蓄積への影響 NB4 細胞に対し 5 μ M CA を 24 時間前処理し、次いで 2 μ M ATO を処理したときの細胞内ヒ素濃度の変化を ICP-MS で測定した。Mean \pm SD (n = 4), * P < 0.05, ** P < 0.01.

昇はおよそ 6 時間後に見かけ上一定となり、細胞内ヒ素の蓄積が抑制された (Fig. 4)。CA 前処理により細胞内ヒ素が最大濃度に達するまでの時間が短縮されたことから、Nrf2 系の活性化は細胞内ヒ素の排出に対して影響を及ぼす可能性が示唆された。

2-3. 細胞内ヒ素蓄積抑制メカニズムの解析

細胞内に取り込まれたヒ素は GSH と結合した後に薬剤排出トランスポーターである multidrug resistance protein (MRP) を介して細胞外へ排出されると考えられている。そこで、Nrf2 活性化後の *MRP1,2,4* の発現量を調べたところ、有意な変動は見られなかった (Fig. 5A)。しかし、CA により Nrf2 系を活性化したのち、MRP 阻害剤である MK-571 を処理してから ATO を添加したところ、Nrf2 活性化によるヒ素蓄積抑制効果は消失した (Fig. 5B)。この結果から、NB4 細胞において、ヒ素の細胞外排出には MRP を介した経路が関

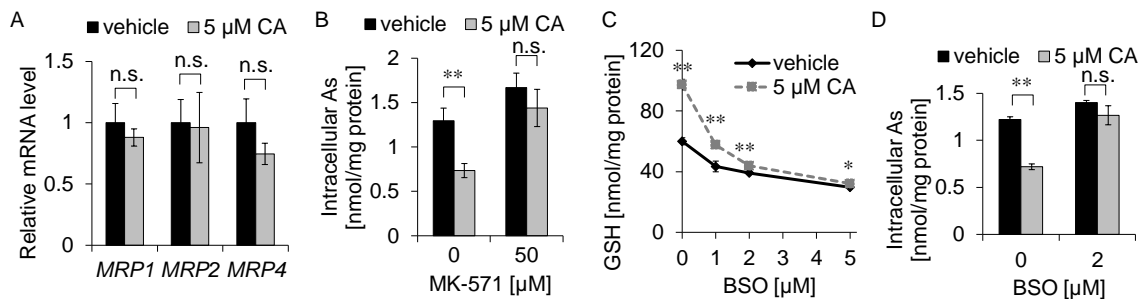


Fig. 5. MRP および GSH のヒ素排出への関与

NB4 細胞に対し、(A) 5 μ M CA を 24 時間処理したときの *MRP1,2,4* mRNA の発現変動を定量 PCR で測定した。(B) 5 μ M CA を 24 時間前処理し、次いで 2 μ M ATO と同時に 50 μ M MK-571 を 12 時間処理したときの細胞内ヒ素濃度を ICP-MS で測定した。(C) 5 μ M CA と同時に各濃度の BSO を 24 時間処理したときの細胞内 GSH 濃度を測定した。(D) 5 μ M CA と同時に各濃度の 2 μ M BSO を 24 時間処理し、次いで 2 μ M ATO を 12 時間処理したときの細胞内ヒ素濃度を ICP-MS で測定した。Mean \pm SD (n = 3 or 4), * P < 0.05, ** P < 0.01, n.s. not significant.

与していることが明らかとなった。更に、細胞内 GSH のヒ素排出への影響を調べるために GSH 合成を阻害する BSO を用いた検討を行った。BSO の処理により CA による細胞内 GSH 量の増大は抑制され (Fig. 5C)、それに伴いヒ素蓄積抑制効果も消失した (Fig. 5D)。これらの結果から、Nrf2 活性化剤は GSH 量を増大させることで MRP の基質となる As-GSH 複合体の生成を促し、ヒ素を活発に排出することで、ATO による抗がん作用を減弱することが示唆された。

総括

近年、Nrf2 系は細胞のストレスに対する防御機構を司る主経路として認識されている。しかしその生理的意義は十分に解明された訳ではない。当研究室では、神経細胞に対する MG の毒性に着目して研究を行っているが⁴⁾、本研究の結果から、その毒性の抑制に Nrf2 系が関与し、GSH 合成の促進が解毒機構において重要な位置を占めることが明らかとなった。その一方で、APL 由来細胞における Nrf2 系の活性化は GSH 合成を促進することで、異物である抗がん剤 (ATO) の排出速度を高め、その感受性を低下させることが示された。

以上のことから、Nrf2 系の活性化には両刃の剣ともいふべき側面があり、今後、腎疾患、神経変性疾患などに Nrf2 活性化剤を適用する際には、他の医薬品の効果を低下させてしまう可能性を考慮し、Nrf2 系を適切にコントロールした治療が行われることが望まれる。

《参考文献》

- 1) Ogasawara Y., Takeda Y., Takayama H., Nishimoto S., Ichikawa K., Ueki M., Suzuki T., Ishii K., *Free Radic. Biol. Med.*, **69**, 58-66 (2014).
- 2) Nishimoto S., Koike S., Inoue N., Suzuki T., Ogasawara Y., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, accepted.
- 3) Nishimoto S., Suzuki T., Koike S., Yuan B., Takagi N., Ogasawara Y., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **305**, 161-168 (2016).
- 4) Koike S., Kayama T., Yamamoto S., Komine D., Tanaka R., Nishimoto S., Suzuki T., Kishida A., Ogasawara Y., *Neurotoxicology*, **55**, 13-19 (2016).