

学位論文の要旨

学位の種類	博 士	氏 名	遠 藤 整
学 位 論 文 題 目			
A Novel Role of the NRF2 Transcription Factor in the Regulation of Arsenite-Mediated Keratin 16 Gene Expression in Human Keratinocytes			
(亜硫酸ナトリウム曝露によるkeratin 16遺伝子の発現調節機序に関する研究)			
共 著 者 名 杉岡良彦、中木良彦、西條泰明、吉田貴彦			
Environmental Health Perspectives, 116 (7), 875-879, 2008			
研 究 目 的			
<p>慢性砒素曝露は、皮膚、肝臓、膀胱などに発癌をはじめとした様々な健康影響を引き起こすことが多くの疫学調査により報告されている¹⁾。特に、皮膚角化症は慢性砒素中毒における特徴的な病変の一つであり、有棘細胞癌などの皮膚癌の前癌病変として考えられている。</p> <p>Keratinは、上皮細胞特異的に発現し中間径フィラメントを構成する主要タンパクであり、現在までに20種以上のファミリーが同定されている。Keratin 16 (K16)を表皮特異的に強制発現させたトランスジェニックマウスは、ケラチノサイトの異常増殖により表皮が肥厚し、角化症を呈することが知られている²⁾。また、慢性砒素中毒患者の皮膚病変において、K16の発現および産生亢進が認められている。しかしながら、砒素曝露が直接K16の遺伝子発現を誘導するか否かは全く分かっていない。そこで、本研究ではヒトケラチノサイトを用いて、亜硫酸ナトリウム添加によるK16遺伝子の発現調節機序の解明を目指した。</p>			
材 料 ・ 方 法			
<p>細胞株は、ヒトケラチノサイトHaCaT細胞を使用した。亜硫酸ナトリウム(iAs; NaAsO₂, Merck)は、新たに調整して使用した。</p>			
<p>遺伝子発現</p> <p>K16, erythroid-derived 2 related factor 2 (NRF2), kelch-like ECH-associated protein 1 (KEAP1), c-Jun, c-Fos, およびThioredoxin (TXN)などの各遺伝子発現は、RT-PCR法により検討した。</p>			
<p>タンパク発現</p> <p>細胞からの核蛋白および細胞質蛋白の抽出は、NE-PER nuclear and cytoplasmic extraction kit (Pierce)を使用した。K16, NRF2, KEAP1, およびc-Junなどのタンパク発現は、各種特異的抗体を用いてwestern blot法により解析した。</p>			
<p>転写活性測定、プラスミド</p> <p>K16遺伝子の転写活性は、ルシフェラーゼアッセイにより検討した。K16のプロモーター領域は、HaCaT細胞からDNAをクローニングし、ルシフェラーゼベクターpXP-1に挿入したプラスミドを用いた。また、K16の転写活性化促進部位を詳細に検討するため、pXK-1 (515 bp), pXK-3 (406 bp), pXK-4 (259 bp), pXK5-1 (162 bp), およびpXK5-2 (141 bp)のdeletion constructを使用した(Dr. Y-N Wang, National Cheng Kung University, Taiwanより提供)。ARE (antioxidant response element)の転写活性は、3つのARE配列を組み込んだルシフェラーゼベクターp3xARE/Luc (Dr. X.L. Chen, Discovery Research AtheroGenics Inc.より提供)を用いた。</p>			
<p>NRF2の強制発現は、発現ベクターpcDNA3.1(+)にNRF2のcDNAを組み込んだプラスミド(WT-NRF2)を用いて検討した(Dr. H.S. So, Wonkwang University School of Medicineより提供)。細胞への遺伝子導入は、LipofectAMINE plus (Invitrogen)を用いて行った。</p>			

Electrophoretic mobility-shift assays (EMSA)

DNAと転写因子の結合は、EMSAにより検討した。*K16*の転写開始部位の近位に存在するAP-1/ARE (GGAGTCAGC)を含む塩基配列と、変異ARE (GGAGTCA \underline{aa})を含む塩基配列の両末端にビオチン標識したDNAプローブを作成した。すなわち、WT-K16ARE (-157/-132, 5'-GGGGAACCTGGAGTCAGCAGTTAGGA-3')と、Mut-K16ARE (5'-GGGGAACCTGGAGTCA \underline{aa} AGTTAGGA-3')である。DNAとの結合蛋白の特定は、抗c-Jun抗体および抗NRF2抗体を使用し、EMSA Super-Shift Assayにより解析した。

NRF2タンパクの半減期

NRF2発現の転写後調節は、cycloheximide (CHX)を使用し検討した。20 μ MのiAsをHaCaT細胞に添加し6時間培養後、CHX 100 μ g/mLを含む培養液に交換し、さらに0, 10, 30, 60, 120, および240分間培養した。各々の培養時間後、細胞から全蛋白質を抽出し、抗NRF2抗体を用いてWestern blot法により検討した。

統計解析

全ての結果は、平均値 \pm 標準偏差で示した。統計解析は、対数変換後にStudent's t-testを行い、*p*値が0.01未満を統計学的に有意とした。

成 績

iAs添加による*K16*遺伝子の発現誘導

- * HaCaT細胞において1-20 μ MのiAsを6時間添加したところ、*K16*の遺伝子発現は濃度依存的に増加した。*K16*のタンパク発現は、1-20 μ MのiAsを10時間添加後に濃度依存的な増加を認めた。
- * *K16*のルシフェラーゼアッセイにおいて、iAsは*K16*のプロモーター領域 (515 bp) を濃度依存的に活性化した。
- * *K16*のdeletion constructを用いたルシフェラーゼアッセイにおいて、iAsはAP-1依存的な転写活性を示した。また、ARE単独のconstructにおいてもiAsの活性化が認められた。

*K16*遺伝子発現におけるAP-1およびAREの関与

- * iAsはAP-1の構成因子であるc-Junの遺伝子およびタンパク発現を誘導したが、c-Fosは誘導しなかった。
- * ARE配列を用いたルシフェラーゼアッセイおよびEMSAにおいて、iAsはAREを活性化することが認められた。
- * iAsは、細胞内におけるNRF2の産生を高めると同時に核内移行を促進させた。iAsにより誘導されたNRF2は、*K16*のプロモーター領域内のAREに結合することが示された。しかしながら、c-JunのAREへの結合は認められなかった。
- * 変異AREプローブを用いたEMSAにおいて、NRF2のAREへの結合は消失した。

iAsによるNRF2産生の促進

- * NRF2の遺伝子発現、およびKEAP1の遺伝子発現とタンパク産生は、iAs添加により変化しなかった。
- * CHXを用いてNRF2の発現量を検討した結果、iAsの添加によってNRF2の半減期が延長することが示された。

NRF2による*K16*遺伝子の発現誘導

- * HaCaT細胞にNRF2を一過性に強制発現させたところ、iAs添加時と同様に*K16*遺伝子の発現誘導が認められた。
- * iAsの添加、もしくはNRF2の強制発現は、*K16*遺伝子の発現誘導のみならず、生体防御において重要な役割を担う*TXN*遺伝子の発現誘導を引き起こした。
- * *K16*のルシフェラーゼアッセイにおいてNRF2を強制発現させたところ、NRF2は*K16*のプロモーター領域にあるAREを介し、直接*K16*遺伝子の転写活性に関与することが示された。

考 案

K16は皮膚角化症や乾癬など、表皮組織の異常増殖を伴う皮膚疾患において高発現が認められることから、角化細胞の増殖マーカーとして知られている。また、慢性砒素曝露患者の皮膚病変組織では、K16の強い発現が認められる。しかしながら、砒素によるK16遺伝子の発現調節機序は、全く解明されていない。

本研究は、ヒトケラチノサイトHaCaT細胞において、iAsがK16遺伝子の発現を誘導することを明らかにした。また、iAsはK16プロモーター領域のc-Jun/AP-1を介し、転写調節していることが示された。さらに、iAsはNRF2の半減期を延長することで細胞内のタンパク発現を高め、核内移行したNRF2がAREに結合し、K16の遺伝子発現を誘導することが明らかとなった。

定常状態時、NRF2は細胞質内においてKEAP1と結合しており、プロテアソーム系を介して迅速に分解されている。しかしながら、化学物質や毒物などの曝露時、NRF2はKEAP1との結合から逃れて核内移行し、AREに結合することで異物代謝酵素や抗酸化応答遺伝子などの生体防御系遺伝子群を誘導する。すなわち、NRF2は酸化ストレス応答の遺伝子発現を統一的に制御し、細胞の恒常性を保護する重要な転写因子である。しかしながら、KEAP1^{-/-}マウスは、生体内でNRF2を恒常的に発現させることにより生体防御系遺伝子を強力に誘導する一方、皮膚・前胃・食道の上皮が肥厚し強い角化症を呈する事が観察されている³⁾。今回の研究において、iAsはNRF2産生を誘導し、抗酸化応答因子であるTXNの発現誘導を示すだけでなく、角化進展に重要なK16の発現を誘導した。つまり、NRF2は生体防御機構の活性化をもたらす反面、皮膚角化症の進展に重要な役割を担うことが考えられた。

本研究では、ヒトケラチノサイトにおいて、iAsがc-Jun/AP-1およびNRF2/AREを介してK16の遺伝子発現を誘導することを初めて明らかにした。NRF2が関与するより詳細な分子機序を解明することは、砒素曝露が引き起こす角化症の予防や治療に繋がると期待される。

結 論

1. ヒトケラチノサイトにおいて、iAsはAP-1とAREを介しK16の遺伝子発現を誘導する。
2. iAsはNRF2の半減期を延長し、NRF2の核内移行を引き起こす。
3. iAsはNRF2の発現を介して、K16と生体防御系遺伝子TXNの発現を誘導する。

引 用 文 献

1. McLellan F. Arsenic contamination affects millions in Bangladesh. Lancet. 359:1127. 2002.
2. Takahashi K, Folmer J, Coulombe PA. Increased expression of keratin 16 causes anomalies in cytoarchitecture and keratinization in transgenic mouse skin. J Cell Biol.127:505-520. 1994.
3. Wakabayashi N, Itoh K, Wakabayashi J, et al. Keap1-null mutation leads to postnatal lethality due to constitutive Nrf2 activation. Nat Genet. 35:238-245. 2003.

参 考 文 献

1. Sugioka Y, Endo H, et al. c-Jun NH₂-terminal kinase pathway is involved in constitutive matrix metalloproteinase-1 expression in a hepatocellular carcinoma-derived cell line. Int J Cancer, 109, 867-874, 2004
2. Sugioka Y, Endo H, et al. Chronic exposure to arsenite causes fibrogenic changes in the skin of mice, and short-term exposure may show anti-fibrogenic effects on fibroblast cells. Jpn J Clin Ecol, 16, 117-126, 2007.
3. Yoshida T, Yamauchi H, et al. Chronic health effects in people exposed to arsenic via the drinking water: dose-response relationships in review. Toxicol Appl Pharmacol, 198:243-252, 2004.

学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第 号		
学位の種類	博士(医学)	氏名	遠藤 整
<u>審査委員長 飯塚 一</u> <u>審査委員 立野 正敏</u> <u>審査委員 吉田 貴彦</u>			
学位論文題目 A Novel Role of the NRF2 Transcription Factor in the Regulation of Arsenite-Mediated Keratin 16 Gene Expression in Human Keratinocytes (亜砒酸ナトリウム曝露による keratin 16 遺伝子の発現調節機序に関する研究)			
<p>慢性砒素曝露が引き起こす健康障害の一つに、砒素角化症が知られている。慢性砒素曝露による皮膚疾患において、keratin 16 (K16)の発現や産生の亢進が認められることから、K16 が角化症の進展に関与していることが示唆される。本研究は、亜砒酸ナトリウム(iAs)を用いた K16 の発現とその発現調節機序についての検討である。</p> <p>ヒト角化細胞由来 HaCaT 細胞を用いて、1-20 μM の iAs を 6 時間添加したところ K16 遺伝子とタンパク発現が誘導された。K16 プロモーター領域のルシフェラーゼアッセイにおいて、iAs は転写レベルで K16 を発現させることが明らかとなり、また、K16 プロモーター領域の検索により、上流 148-140 bp の AP-1 site は GC 塩基を末端に持つ ARE (antioxidant response element)配列になりうる可能性が見出された。K16 プロモーター領域における deletion construct を用いて、iAs による詳細な K16 の転写活性化部位を検討したところ、K16 の誘導は AP-1 と ARE を介した新しい機序により引き起こされることが示され、さらに、</p>			

iAs は AP-1 構成因子である c-Jun の発現を誘導すること、転写因子 NRF2 の産生と核内移行を誘導すること、K16ARE に NRF2 が結合することが見出された。興味深いことに、NRF2 の K16ARE への結合には ARE 末端の GC 塩基が不可欠であることが、変異プローブを用いた EMSA により示され、AP-1 との相違が明確になった。さらに、iAs による NRF2 産生の増加は、NRF2 自身の転写活性化や NRF2 結合タンパクである KEAP1 の減少によるものではなく、NRF2 が安定化することで分解が抑制され、half-life が延長したためであることも見出された。iAs および NRF2 の一過性強制発現による遺伝子発現を検討したところ、K16 だけではなく解毒に関わる Thioredoxin (TXN) の発現誘導が認められ、また、K16ARE 単独の construct を用いたルシフェラーゼアッセイにおいて、NRF2 の強制発現は K16 の転写を直接活性化させることも明らかとなった。

本論文は、分子生物学的手法を駆使し、iAs が c-Jun/AP-1 および NRF2/ARE を介して K16 遺伝子を発現誘導する機序を世界で初めて明らかにした点で、砒素角化症の病態解明に大きく貢献するものである。また、NRF2 は生体防御機構を活性化する一方で、角化症の進展にも関与する可能性を示しており、今後の角化症研究にとって重要な基礎的知見を提示する価値ある研究と考えられる。

学位申請者は、本論文の関連領域における位置づけ、および今後の研究展開を明確に認識し、本論文の内容や関連分野に対し深い知識を有している。また、各審査委員による試問に対しても的確な解答が得られた。

以上の結果より、本審査委員会は本論文が博士（医学）の学位に十分値するものと判定した。