

分担研究報告書

ダイオキシン誘導性セレン結合性タンパク質 1 (SELENBP1): ヒト由来細胞を用いた検討

研究分担者 石井 祐次 九州大学大学院薬学研究院細胞生物薬学分野 准教授

研究要旨

当教室ではこれまでに、ラットおよびマウスのセレン結合性タンパク質 1 (Selenbp1)がダイオキシン類で誘導されることを明らかにしてきた。また、最近、Selenbp1-KO マウス腎臓を用いた検討により、Selenbp1 は脂質代謝の調節に重要であることが分かった。一方、ダイオキシン類がヒトにおいても SELENBP1 を誘導するか否かは明らかになっていない。油症患者において脂質代謝異常が起こっていることは、これまでの検討から明らかであり、肝臓の SELENBP1 レベルが変動しているとすれば、ラットやマウスなど実験動物での検討結果が有用となる。そこで、R4 年度は、ヒト肝臓がん由来細胞 HepG2 を芳香族炭化水素受容体 (AHR)リガンドで処理し、SELENBP1 が誘導されるか否か検討した。HepG2 を AHR リガンドである 3-メチルコランスレン (MC)処理した。代表的マーカーである cytochrome P450 1A1 (CYP1A1) mRNA の発現は、MC 濃度依存的に誘導された。SELENBP1 への影響は有意ではなく、むしろ抑制傾向にあった。次いで、AHR アンタゴニストである α -ナフトフラボン (α -NF) により処理したところ、CYP1A1 が誘導された。 α -NF には弱いながら CYP1A1 誘導作用があることが分かっていたことから、これを支持する結果となった。一方、 α -NF は、CYP1A1 誘導作用が有意でない濃度において、SELENBP1 mRNA を有意に誘導した。また高濃度では却って影響が弱くなった。そこで、別の AHR リガンドとして知られる β -NF で処理したところ、MC に比べて弱いものの CYP1A1 mRNA が β -NF 濃度依存的に誘導された。この時、SELENBP1 は低濃度で増加傾向にあったが、影響は有意ではなかった。 β -NF の影響には Nrf2 が関与している可能性もあるため、Nrf2 の活性化剤となる tBHQ を用いて CYP1A1 発現に及ぼす影響を調べたところ、低濃度では影響せず、高濃度でわずかな CYP1A1 mRNA レベルの上昇を認めた。tBHQ は SELENBP1 mRNA レベルに影響を与えなかった。これらの結果は、がん由来細胞を用いたためと推定し、未処理の HepG2 細胞を調べると SELENBP1 がタンパク質レベルでは確認できず、SELENBP1 が、がん抑制的働きを持つことを伺わせる結果であった。

A. 研究目的

A. 研究目的

セレン結合性タンパク質 (Selenbp1) は、肝臓、腎臓、性腺などに多く発現するサイトゾルタンパク質の一つである (1)。Selenbp1 は、生体内においてセレンとの結合能を有し、セレンの生理的役割に関わ

るものと推定されている。これまでに、抗酸化的作用 (2)、増殖抑制作用 (3)、ゴルジ層板間のタンパク質構成因子 (4) 等の機能が報告されているものの、これらは、いずれも決定的とは言い難く、その生理的機能は十分に理解されているとは言い難い。

当研究室では、ダイオキシン類の一種、3,3',4,4'-pentachlorobiphenyl、および多環芳香族炭化水素、3-methylcholanthrene (MC)のラットへの曝露により肝臓における Selenbp1 タンパク質および mRNA 発現が顕著に誘導することをすでに報告している (5-7)。ダイオキシン類は、免疫抑制、肝障害、発がんプロモーション作用等、生体に対して非常に多彩な毒性を引き起こすが (8)、その大部分の毒性発現に関与すると考えられているのが芳香族炭化水素受容体 (AhR) である (9)。ダイオキシン類は、細胞内においてサイトゾルに局在している AhR に結合することで核内へと移行し、AhR nuclear translocator とヘテロダイマーを形成する。この複合体が様々な遺伝子上流に存在するコンセンサス配列、xenobiotic responsive element (XRE) に結合することで、cytochrome P450 1A1 (CYP1A1)に代表される遺伝子発現を変動させることが知られている (10)。ダイオキシン類により変動する遺伝子は実に数百種類にもものぼるが、どの遺伝子変動がどの毒性発現に重要であるのかなど詳細に関しては未だ十分には明らかになっていない。

当研究室では、これまでにラットにおいて見出されている Selenbp1 遺伝子の誘導に注目し、ダイオキシンによる毒性との関連性を検証することを目指して研究を行って来た。マウスにおいては Selenbp1 とアミノ酸配列で約 97% の相同性を示す Selenbp2 (アセトアミノフェン結合性タンパク質) が存在することが知られているが、これは異なる遺伝子産物であり臓器分布等も多少異なる (11)。Selenbp2 は、アセトアミノフェン代謝物との結合を介して肝障害発現に関わると推定されているが (12)、Selenbp1 同様に肝臓に多く発現していること、および、その相同性の高さから Selenbp1 との機能的な関連性も示唆されている。当研究室では、ダイオキ

シンによる Selenbp1 の誘導機構を解析するため、ダイオキシン類に対して親和性の異なる AhR を有する二系統のマウス (C57BL/6J マウス: 高親和性 AhR、および DBA/2J マウス: 低親和性 AhR) を用いて比較検討することにより、Selenbp1 の誘導に対する AhR 依存性が検証されるとともに、Selenbp1 ノックアウト (KO) マウスを作製し、その表現型の解析を行った (13)。これらの結果から、Selenbp1 には、卵巣におけるガンへの防御的な役割がある可能性が示された。また、Selenbp1 と Selenbp2 は、2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)による誘導性に差があることが分かったが、Selenbp1-KO マウスの肝臓においては、依然として Selenbp2 が発現しており、Selenbp1-KO によるダイオキシン毒性の悪化や軽減作用を見出すことは出来ず、その誘導の意義について理解することが難しかった。

最近、当研究室では、絶食により肝臓及び腎臓において、リアルタイム RT-PCR により検討を行った際に、Selenbp1 発現は影響を受けないが、Selenbp2 発現が著しく低下することを見だした。Selenbp2 の発現は腎臓において低いことが報告されているため (14)、当研究室では、ダイオキシン誘導性 Selenbp1 の腎臓における役割を明らかにすることを目的として研究を推進してきた。

平成 30 年度までの検討により、ダイオキシンにより変動する他の因子を排除して検討するために、ダイオキシン非投与条件下で絶食を行い、野生型の C57BL マウスと Selenbp1 欠損マウスの腎臓を用いたメタボロミクス解析を行った。また、マイクロアレイ解析も行った。さらに、リアルタイム RT-PCR による解析を通じて、脂質代謝関連因子が変動する可能性が示唆された。令和元年度は、個体数を増やして、メタボロミクスの精度を上げるとともに、引き続き Selenbp1 の脂質代謝への影響に

着目してさらなる解析を行った。平成 30 年度及び令和元年度の検討において Selenbp1-KO マウスの腎臓では、脂肪酸の ω および ω -1 水酸化に関与することが知られている cytochrome P450 4a (Cyp4a) サブファミリーのうち、Cyp4a12a および Cyp4a12b の発現が有意に低下することが示唆された。また、ペルオキシゾームでの分岐脂肪酸の不飽和化を触媒する acyl-CoA oxidase3 (Acox3) の発現も有意に低下した。さらに、脂質代謝系の酵素の発現を制御する peroxisome proliferator-activated receptor- α (Ppar α) の発現レベルの有意な低下が示唆された。これは、先に行ったマイクロアレイの結果を支持した。一方、Ppar- β (Pparb) および Ppar- γ (Pparg) の発現レベルには影響がなかった。Ppar α とヘテロオリゴマーを形成して遺伝子発現を促進させる retinoid-X-receptor- α (Rrx α) の発現の低下が示唆されている。従って、Ppar α および Rrx α の発現低下を通じた Cyp4a の低下が示唆された。一方、cyclooxygenase 1 (Cox1), Cox2 および 3 種の lipoxigenase レベルは変動しなかった。これに符合して、ロイコトリエン類の増加が推定された。また、抗酸化酵素の発現解析を行ったところ、superoxide dismutase 1 (Sod1) および Sod2 の発現が有意に低下していた。また、Sod 活性、過酸化水素生成量が Selenbp1-KO マウス腎臓で低下することを明らかにした。この時、腎臓及び血中のセレン含量については変動がなかった。

一方、ダイオキシン類がヒトにおいても SELENBP1 を誘導するか否かは明らかになっていない。油症患者において脂質代謝異常が起こっていることは、これまでの検討から明らかであり、肝臓の SELENBP1 レベルが変動しているとすれば、ラットやマウスなど実験動物での検討結果が有用となる。そこで、R4 年度は、ヒト肝臓がん由来細胞 HepG2 を芳香族炭化水素受容体 (AHR) リガンドで処理し、SELENBP1

が誘導されるか否か検討した。

B. 研究方法

1. 試薬

α -ナフトフラボン (α -NF) は Sigma-Aldrich より、MC および β -NF は、ナカライテスクより、t-BHQ は東京化成工業より購入して使用した。

2. 細胞培養

HepG2 cell は、Cellular Engineering Technologies, Inc.社より購入して使用した。HepG2 細胞は 10% ウシ胎児血清 (FBS) を含む D-MEM 培地を使用して、5% CO₂、37°C の加湿インキュベーターで培養し、2~3 日に 1 回 0.25% トリプシン / EDTA で継代を行った。12 well plate に 1x10⁵ cells/well として播種した。24 時間後に、被検物質を含む培地を 1 mL/well ずつ添加した (n=3)。その 24 時間後、HepG2 細胞を回収した。

3. リアルタイム RT-PCR 法

回収した HepG2 細胞から RNeasy® Mini Kit を使用して、total RNA を抽出した。抽出した total RNA を定量したのち、PrimeScript RT reagent kit with gDNA Eraser (タカラバイオ社) を用いて cDNA を合成した (15)。これを鋳型とし、Fast SYBR Green Master Mix (Life Technologies 社) を用いて目的タンパク質の mRNA 発現変動を解析した。解析は、ターゲット mRNA の threshold cycle (Ct) 値を β -actin mRNA の Ct 値で補正した。

C. 研究結果

ヒト肝臓がん由来細胞 HepG2 を芳香族炭化水素受容体 (AHR) リガンドで処理し、SELENBP1 が誘導されるか否か検討した。HepG2 を AHR リガンドである MC 処理した。0.1-10 μ M MC 処理を行ったところ、代表的マーカーである cytochrome P450 1A1 (CYP1A1) mRNA の発現は、MC 濃度

依存的に誘導された (Fig. 1)。10 μM MC における誘導は特に顕著であった。一方、SELENBP1 への影響は有意ではなく、むしろ抑制傾向にあった (Fig. 1)。MC 濃度依存性は認められていない。次いで、AHR アンタゴニストである $\alpha\text{-NF}$ (16) により処理した。2.5-10 μM $\alpha\text{-NF}$ で処理したところ、CYP1A1 が誘導された (Fig. 2)。この誘導作用は、10 μM で比較すると MC のそれに比べて 10 分の 1 程度であった。 $\alpha\text{-NF}$ には弱いながら CYP1A1 誘導作用があることが分かっていたことから、これを支持する結果となった。一方、 $\alpha\text{-NF}$ は、その CYP1A1 誘導作用が有意でない 2.5 μM 濃度において、SELENBP1 mRNA を有意に誘導した (Fig. 2)。また高濃度では却って影響が弱くなった。そこで、別の AHR リガンドとして知られる $\beta\text{-NF}$ により処理した。0.1-10 μM $\beta\text{-NF}$ で処理したところ、MC に比べて弱いものの CYP1A1 mRNA が $\beta\text{-NF}$ 濃度依存的に誘導された (Fig. 3)。この時、SELENBP1 は低濃度で増加傾向にあったが、影響は有意ではなかった (Fig. 3)。 $\alpha\text{-NF}$ および $\beta\text{-NF}$ の影響には Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) が関与している可能性もあるため、Nrf2 の活性化剤となる tert-butylhydroquinone (tBHQ) を用いて CYP1A1 発現に及ぼす影響を調べた。1-100 μM tBHQ を用いて検討したところ、低濃度では影響せず、高濃度 100 μM tBHQ でわずかな CYP1A1 mRNA レベルの上昇を認めた (Fig. 4)。tBHQ は SELENBP1 mRNA レベルに影響を与えなかった (Fig. 4)。これらの結果は、がん由来細胞を用いたためと推定し、未処理の HepG2 細胞をウェスタンブロッティングで調べると SELENBP1 がタンパク質レベルでは確認できず (Data not shown)、HepG2 ががん由来細胞であることと、SELENBP1 はがん抑制的な働きがあると報告されていることを総合すると、がん由来細胞故に SELENBP1 の発現が抑えられ

ているのかもしれない。SELENBP1 が、がん抑制的働きを持つことを伺わせる結果であった。

D. 考察

本研究では、ヒトにおける SELENBP1 の発現調節を明らかにすることを目的として、ヒト肝臓がん由来細胞 HepG2 を芳香族炭化水素受容体 (AHR) リガンドで処理し、SELENBP1 が誘導されるか否か検討した。HepG2 を AHR リガンドである MC で処理した場合、AHR を介した誘導の代表的マーカーである CYP1A1 mRNA の発現を著しく上昇させた。このことから、HepG2 細胞において AHR 依存的な CYP1A1 遺伝子の発現誘導を捉えることが出来ることが確認された。一方、SELENBP1 への影響は有意ではなく、むしろ抑制傾向にあった (Fig. 1)。過去に、他の研究者が HepG2 細胞を用いたマイクロアレイを行っており、HepG2 への TCDD の影響を研究した際、顕著な変化を示す遺伝子の中に SELENBP1 はなかった (17, 18)。また、SELENBP1 発現量減少と glutathione peroxidase 1 (GPX1) 発現量増加について述べた報告では、SMMC7721 細胞に SELENBP1 の発現が高く、HepG2 細胞には SELENBP1 の発現が低い結果が示されている (19)。マイクロアレイは網羅的解析であるため、個々の解析については別途行う必要がある。また、後者においては、AHR リガンドの影響を検討したわけではなく、検証が必要であった。本研究では、MC および $\beta\text{-NF}$ という 2 つの AHR リガンドを用いて用量依存性を調べた結果 10 μM までの範囲では SELENBP1 の誘導が認められていない。本研究では、ダイオキシン類のうち最強の AHR リガンドである TCDD の影響は調べていないため、結論づ

けることはできないものの、今回検討した2つのAHRリガンドはCYP1A1を誘導していることから考えて、HepG2細胞では人工的AHRリガンドはSELENBP1を誘導しにくいものと推察される。次に、AHRアンタゴニストである α -NFの影響について考察する。本来であれば、AHRリガンドと併用して、その作用に拮抗することを示す目的で用いるべきところだが、まず、 α -NFの影響について調べた。 α -NFが弱いながらCYP1A1誘導作用があることは分かっていたため、まずそれを検証した (Fig. 2)。次に、SELENBP1への影響を確認したところ、誘導作用を示した (Fig. 2)。その誘導作用は、CYP1A1誘導よりも低濃度で起こった。何故、このような現象が起こったのかを明らかにするため、Nrf2の系による調節の可能性を探った。 α -NFおよび β -NFには、Nrf2の系を活性化させる作用も報告されている (20)。 α -NFはNrf2系を介してエストロゲン誘導性の乳がんを抑制することも報告されている (21)。Nrf2は、ダイオキシンによるAHR活性化の系に対して防御的に働く可能性があり、期待されている (22)。そこで、具体的には、tBHQという親電子性物質を用いて検討を行った。しかし、tBHQは高濃度でCYP1A1を誘導するにとどまり、SELENBP1の発現へは影響を与えなかった (Fig. 4)。これらの結果から、HepG2細胞でのNrf2を介したSELENBP1の誘導は限定的だと思われる。 α -NFは、AHRアンタゴニスト (16)としてだけでなく、CYP1A1の阻害剤としても働くと考えられている (23)。また、最近の報告では、CYP1A1の阻害剤がAHRを活性化することも示唆されている (24)。後者の場合、CYP1A1の阻害を通じた内因性リガンドの蓄積が起こることによるAHR活性化と捉えられている。今回観察された、HepG2における α -NFによるSELENBP1の誘導がCYP1A1の阻害を通じた内因性リガン

ドの蓄積によるものである可能性も否定できない。この検証のためには、別のCYP1A1阻害剤による影響、さらには内因性リガンド候補を併用する実験を行う必要があるだろう。

また、本研究では、HepG2においては、元々のSELENBP1の発現レベルがかなり低いことも改めて確認された。このことから、未処理の細胞においてもSELENBP1の発現レベルが高い細胞種を選択して検討を行う必要がある。市販細胞で薬物代謝酵素レベルが正常肝臓細胞と遜色ないものとしてHepaRG細胞があるため、これを用いた検討が望まれる。

E. 結論

以上の結果から、1) 本研究では、 α -NFがヒト肝臓がん由来細胞HepG2でSELENBP1を誘導することを初めて明らかにした。2) AHRリガンドであるMCは、CYP1A1を濃度依存的に誘導したが、SELENBP1は誘導しなかった。3) α -NFは、CYP1A1を誘導するよりも低濃度でSELENBP1を誘導した。今後、この α -NFによるSELENBP1誘導機構の検討を通じて、ヒトにおけるSELENBP1の調節にAHRが関与するか否かを明らかにする必要がある。

F. 研究発表

1. なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

H. 参考文献

- 1) Bansal MP, Oborn CJ, Danielson KG, Medina D. *Carcinogenesis*, **10**: 541-546 (1989).
- 2) Jamba L, Nehru B, Bansal MP. *Mol Cell Biochem*, **177**: 169-175 (1997).
- 3) Pohl NM, Tong C, Fang W, Bi X, Li T, Yang W. *PLoS One*, **4**: e7774 (2009).

- 4) Porat A, Sagiv Y, Elazar Z. *J Biol Chem*, **275**: 14457-14465 (2000).
- 5) Ishii Y, Hatsumura M, Ishida T, Ariyoshi N, Oguri K. *Chemosphere*, **32**: 509-515 (1996).
- 6) Ishii Y, Hatsumura M, Ishida T, Ariyoshi N, Oguri K. *Toxicol Lett*, **87**: 1-9 (1996).
- 7) Ishida T, Ishii Y, Tasaki K, Ariyoshi N, Oguri K. *Fukuoka Acta Medica*, **88**: 135-143 (1997).
- 8) Poland A, Knutson JC. *Ann Rev Pharmacol Toxicol*, **26**: 371-399 (1982).
- 9) Fernandez-Salguero PM, Hilbert DM, Rudikoff S, Ward JM, Gonzalez FJ. *Toxicol Appl Pharmacol*, **140**: 173-179 (1996).
- 10) Mimura J, Fujii-Kuriyama Y. *Biochim Biophys Acta*, **1619**: 263-268 (2003).
- 11) Bartolone JB, Sparks K, Cohen SD, Khairallah EA. *Biochem Pharmacol*, **36**: 1193-1196 (1987).
- 12) Pumford NR, Martin BM, Hinson JA. *Biochem Biophys Res Commun*, **182**: 1348-1355 (1992).
- 13) Tsujimoto S, Ishida T, Takeda T, Ishii Y, Onomura Y, Tsukimori K, Takechi S, Yamaguchi T, Uchi H, Suzuki SO, Yamamoto M, Himeno M, Furue M, Yamada H. *Biochim Biophys Acta*, **1830**: 3616-3624 (2013).
- 14) Lanfear J, Fleming J, Walker M, Harrison P. *Carcinogenesis*, **14**: 335-340 (1993).
- 15) Matsumoto Y, Ishida T, Takeda T, Koga T, Fujii M, Ishii Y, Fujimura Y, Miura D, Wariishi H, Yamada H. *J Toxicol Sci*, **35**: 365-373 (2010).
- 16) Koley AP, Buters JT, Robinson RC, Markowitz A, Friedman FK. *J Biol Chem*, **272**: 3149-3152 (1997).
- 17) Puga A, Maier A, Medvedovic M. *Biochem Pharmacol*, **60**: 1129-1142 (2000).
- 18) Frueh FW, Hayashibara KC, Brown PO, Whitlock Jr JP. *Toxicol Lett*, **122**: 189-203 (2001).
- 19) Huang C, Ding G, Gu C, Zhou J, Kuang M, Ji Y, He Y, Kondo T, Fan J. *Clin Cancer Res*, **18**: 3042-3053 (2012).
- 20) Timme-Laragy AR, Van Tiem LA, Linney EA, Di Giulio RT. *Toxicol Sci*, **109**: 217-227 (2009).
- 21) Singh B, Bhat NK, Bhat HK. *Carcinogenesis*, **33**: 156-163 (2012).
- 22) Furue M, Ishii Y, Tsukimori K, Tsuji G. *Int J Mol Sci*, **22**: 708 (2021).
- 23) Juvonen RO, Jokinen EM, Javaid A, Lehtonen M, Raunio H, Pentikäinen OT. *Chem Biol Drug Des*, **95**: 520-533 (2020).
- 24) Yoda T, Tochitani T, Usui T, Kouchi M, Inada H, Hosaka T, Kanno Y, Miyawaki I, Yoshinari K. *J Toxicol Sci*, **47**: 359-373 (2022).

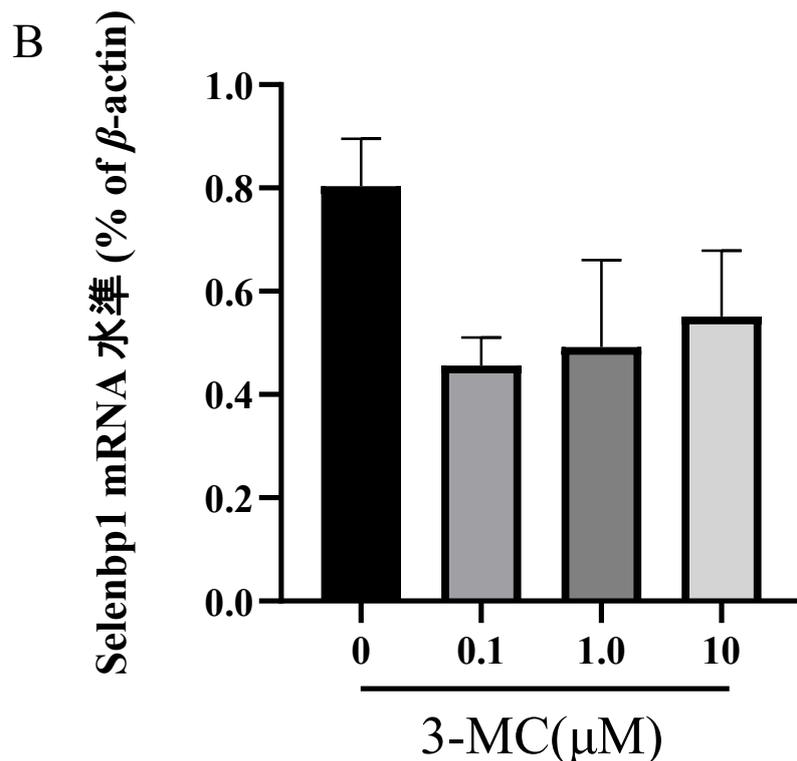
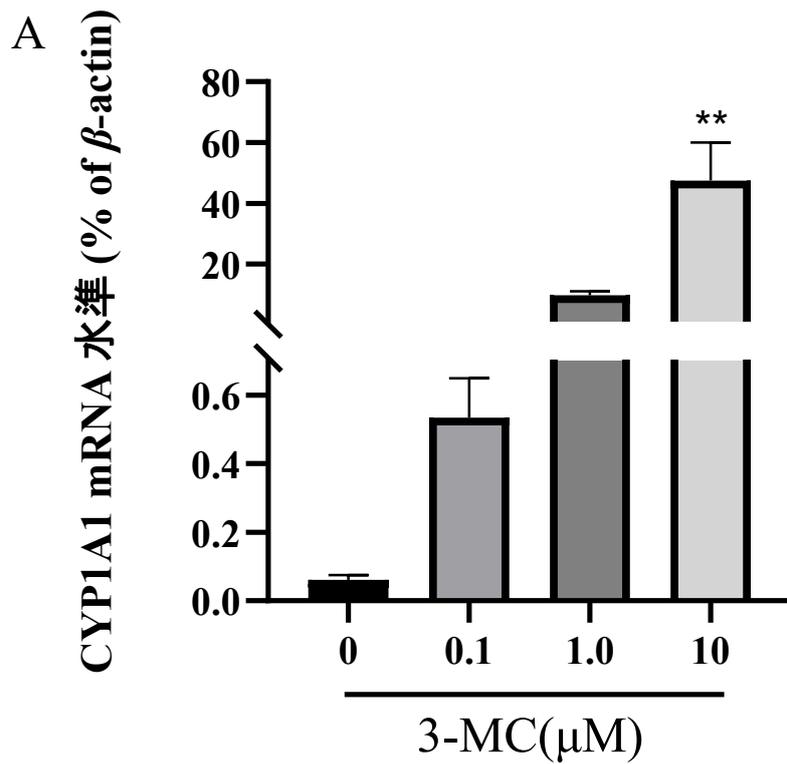


Fig. 1 Effect of 3-MC on CYP1A1 and SELENBP1 mRNA in HepG2 cells. Cells were exposed to 3-MC at 0.1, 1.0 and 10 μ M for 24 hr. For the control, the vehicle DMSO was added. Each bar represents the mean \pm standard error of the mean (S.E.M.) of 3 samples. Significantly different from control, **, $p < 0.01$

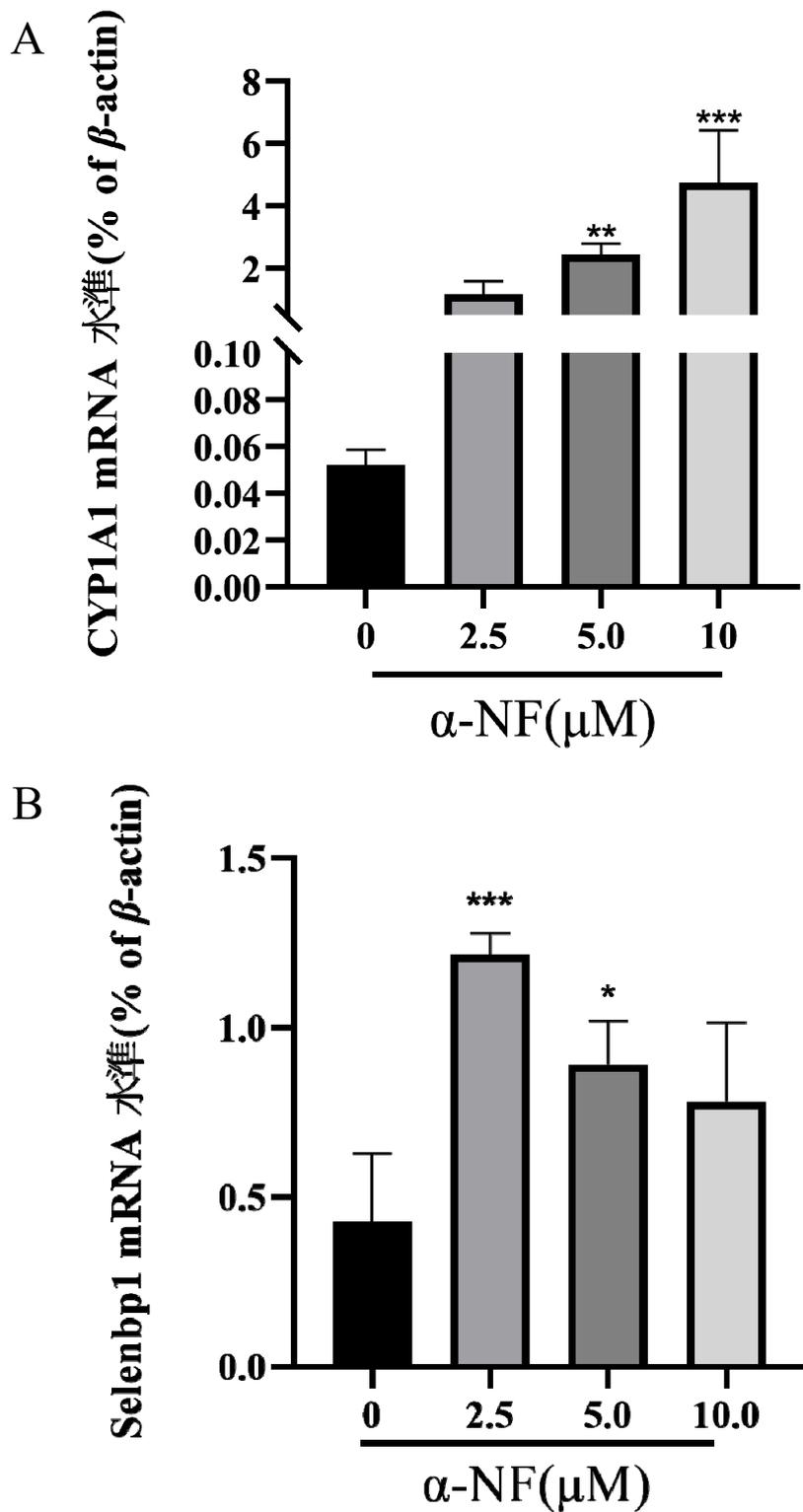


Fig. 2 Effect of α -NF on CYP1A1 and SELENBP1 mRNA in HepG2 cells. Cells were exposed to α -NF at 2.5, 5.0 and 10 μ M for 24 hr. For the control, the vehicle DMSO was added. Each bar represents the mean \pm standard error of the mean (S.E.M.) of 3 samples. Significantly different from control, *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$.

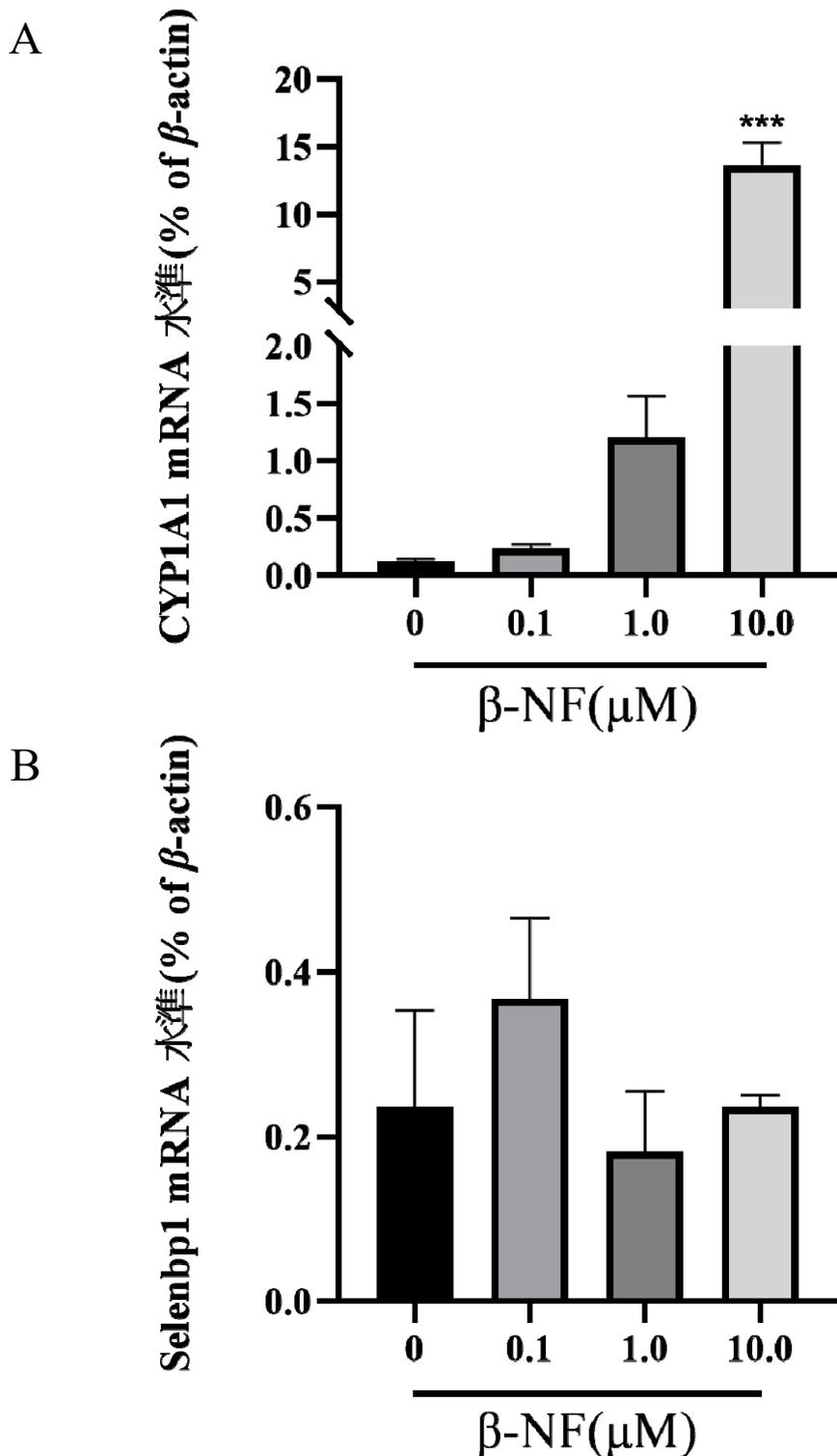


Fig. 3 Effect of β -NF on CYP1A1 and SELENBP1 mRNA in HepG2 cells. Cells were exposed to β -NF at 0.1, 1.0 and 10 μ M for 24 hr. For the control, the vehicle DMSO was added. Each bar represents the mean \pm standard error of the mean (S.E.M.) of 3 samples. Significantly different from control, ***, $p < 0.001$.

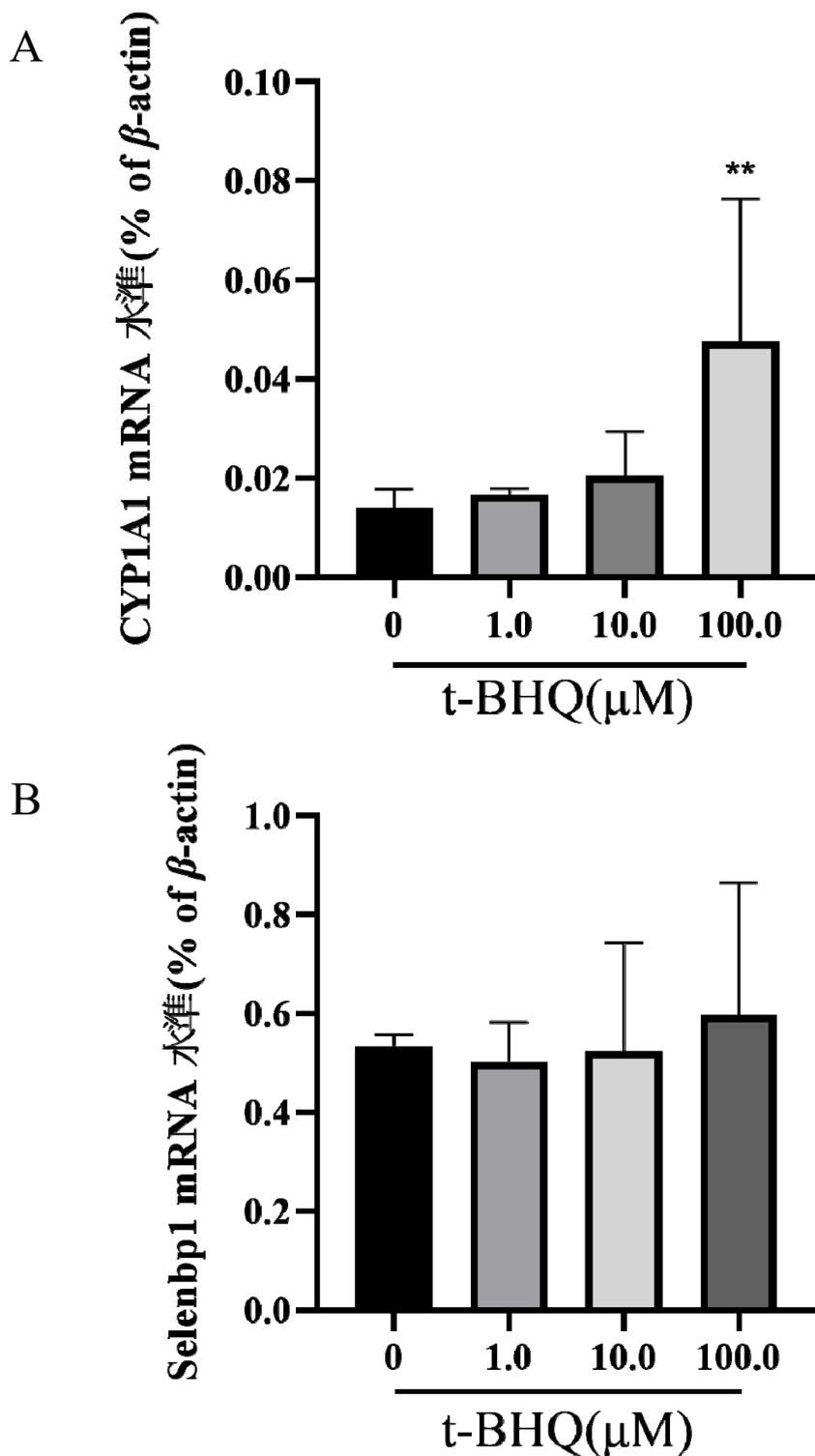


Fig. 4 Effect of t-BHQ on CYP1A1 and SELENBP1 mRNA in HepG2 cells. Cells were exposed to t-BHQ at 1.0, 10.0 and 100.0 μM for 24 hr. For the control, the vehicle DMSO was added. Each bar represents the mean \pm standard error of the mean (S.E.M.) of 3 samples. Significantly different from control, **, $p < 0.01$.