

ノビレチンの作用機序に関する研究：

**TXNIP の発現と小胞体ストレスに着目した解析**

**Studies on the pharmacological actions of nobiletin, focusing on  
TXNIP expression and ER stress**

本論文は静岡県立大学 大学院

薬食生命科学総合学府 博士論文である。

2016 年 3 月

(March, 2016)

静岡県立大学 大学院 薬食生命科学総合学府

博士課程 薬学専攻

衛生分子毒性学講座

池田 絢香

Ikeda, Ayaka

## <目次>

略語表	iii
序論	1
<第1章> 3種細胞株の遺伝子発現に対するノビレチンの効果	
1-1. 緒言	5
1-2. 実験材料	5
1-3. 実験方法	6
1-4. 結果	
1) 3種細胞株を用いたノビレチンによる網羅的遺伝子発現変動解析	11
2) 定量的 RT-PCR 法による <i>DDIT3</i> 、 <i>TRIB3</i> 、 <i>TXNIP</i> 発現変動の解析	12
3) Western blotting によるタンパク質発現の解析	14
4) ノビレチン処理による3種細胞株の細胞形態の変化	14
5) ノビレチン処理による3種細胞株の細胞生存率の変化	14
1-5. 考察	17
<第2章> SK-N-SH 細胞での小胞体ストレス誘導性アポトーシスと細胞 ストレス調節タンパク質 TXNIP 発現に対するノビレチンの作用	
2-1. 緒言	22
2-2. 実験材料	22
2-3. 実験方法	23
2-4. 結果	
1) SK-N-SH 細胞に対する小胞体ストレス誘導薬の作用	25
2) SK-N-SH 細胞でのノビレチンあるいはツニカマイシン処理による アポトーシス誘導の解析	27
3) SK-N-SH 細胞でのノビレチンあるいはツニカマイシン処理による アポトーシスおよび細胞形態の変化	27
4) SK-N-SH 細胞でのノビレチンとツニカマイシンの UPR 関連 タンパク質の発現変動比較	28
5) SK-N-SH 細胞でのノビレチンとツニカマイシンの TXNIP の発現 変動比較	29

6) ノビレチンおよびツニカマイシン処理による細胞内抗酸化物質 レベルの変化	31
2-5. 考察	32
総括	40
謝辞	42
参考文献	43

## <略語表>

### 【A】

A $\beta$  :  $\beta$ -amyloid peptide  
AD : Alzheimer's disease  
AGE : advanced glycation endproduct  
ALS : amyotrophic lateral sclerosis  
AMP : adenosine 5'-monophosphate  
AMPK : AMP-activated protein kinase  
AOM : azoxymethane  
AP-1 : activator protein-1  
AP2 : activator protein-2  
APP : amyloid precursor protein  
ASK1 : apoptosis signal-regulating kinase 1  
ASNS : asparagine synthetase  
ATF : activating transcription factor

### 【B】

BBB : blood-brain barrier  
BCCAO : bilateral common carotid arteries occlusion  
BCA : bicinchoninic acid  
BCL-2 : B-cell lymphoma-2  
BiP : binding immunoglobulin protein  
 $\beta$ -ME :  $\beta$ -mercaptoethanol  
BSA : bovine serum albumin

### 【C】

CCNA2 : cyclin A2  
CCNE2 : cyclin E2  
CDK2 : cyclin-dependent kinase 2  
cDNA : complementary DNA  
C/EBP : CCAAT/enhancer binding protein  
CHOP : C/EBP homologous protein  
ChORE : carbohydrate-response element  
COX : cyclooxygenase  
cPLA2 : cytosolic phospholipase A2

CRE : cAMP response element

CREB : CRE binding protein

cRNA : complementary RNA

CTP : cytidine triphosphate

## **【D】**

dA : deoxyadenosine

DDIT3 : DNA-damage-inducible transcript 3

DEPDC1 : DEP domain containing 1

DGAT : diacylglycerol acyltransferase

DMBA : 7,12-dimethylbenz[*a*]anthracene

DMEM : Dulbecco's modified Eagle medium

DMSO : dimethyl sulfoxide

DNA : deoxyribonucleic acid

dNTP : deoxynucleotide triphosphate

DTT : dithiothreitol

## **【E】**

E2F8 : E2F transcription factor 8

ERK : extracellular signal-regulated kinase

eIF2 $\alpha$  : eukaryotic initiation factor 2 $\alpha$

ER : endoplasmic reticulum

EtBr : ethidium bromide

## **【F】**

FBS : fetal bovine serum

FL : full length

FOXO1 : forkhead box O1

## **【G】**

GKLF : gut-enriched Krüppel-like factor

GlcNAc : *N*-acetylglucosamine

GLUT : glucose transporter

## **【H】**

HDAC : histone deacetylase

HIST1H1B : histone cluster 1, H1b

HRP : horseradish peroxidase

HSE : heat shock element

## **【I】**

IBMX : 3-isobutyl-1-methylxanthine

ICAM-1 : intercellular adhesion molecule-1

IL : interleukin

IPTG : isopropyl thiogalactoside

IRE1 $\alpha$  : inositol requiring enzyme 1 $\alpha$

## **【J】**

JNK : c-Jun *N*-terminal kinases

## **【K】**

KIF11 : kinesine family member 11

## **【L】**

LB : Luria-Bertani

LDL : low-density lipoprotein

LEC : lymphatic microvascular endothelial cells

LKB1 : liver kinase B1

LOX-1 : lectin-like oxidized-LDL receptor-1

LPS : lipopolysaccharide

## **【M】**

MCP-1 : monocyte chemoattractant protein-1

MEM : minimum essential medium

miR : micro RNA

MMLV-RT : moloney murine leukemia virus reverse transcriptase

MMP : matrix metalloproteinase

mRNA : messenger RNA

mTORC1 : mammalian target of rapamycin complex 1

MTP : triglyceride transfer protein

## **【N】**

NFAT : nuclear factor of activated T-cells  
NF- $\kappa$ B : nuclear factor- $\kappa$ B  
NFY : nuclear factor Y  
NMDA : *N*-methyl-D-aspartate  
Nob : nobiletin  
NOR1 : ( $\pm$ )-(E)-methyl-2-[(E)-hydroxyimino]-5-nitro-6-methoxy-3-hexenamide

### **【O】**

OBX : olfactory bulbectomy  
ORF : open reading frame

### **【P】**

PAGE : polyacrylamide gel electrophoresis  
PARP : poly(ADP-ribose) polymerase  
PBS : phosphate-buffered saline  
PCR : polymerase chain reaction  
PERK : protein kinase activated by double-stranded RNA-like ER kinase  
PhIP : 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine  
PMSF : phenylmethylsulfonyl fluoride  
PPAR : peroxisome proliferator-activated receptor  
PPRE : PPAR response element  
PVDF : polyvinylidene fluoride

### **【R】**

RNA : ribonucleic acid  
ROS : reactive oxygen species  
RT : reverse transcription

### **【S】**

SDS : sodium dodecyl sulfate  
SERCA : sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase  
SLC6A9 : solute carrier family 6, member9

### **【T】**

TBST : Tris-buffered saline with Tween 20  
TE : Tris-EDTA

TBE : Tris-borate-EDTA  
TG : thapsigargin  
TLR : toll-like receptor  
TM : tunicamycin  
TMEM116 : transmembrane protein 116  
TNF : tumor necrosis factor  
TPA : 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate  
TRIB3 : tribbles homolog 3  
TRX : thioredoxin  
TXNIP : thioredoxin-interacting protein

**【U】**

UPR : unfolded protein response  
USF : upstream stimulatory factor  
UVB : ultra violet B

**【V】**

VCAM-1 : vascular cell adhesion molecule-1  
Veh : vehicle

**【X】**

XBP1 : X box binding protein 1  
x-gal : 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactoside

## <序論>

### 1. ノビレチン

ノビレチン (nobiletin : Nob) (3',4',5,6,7,8-hexamethoxyflavone) (Fig. 1) は6個のメトキシ基を持った polymethoxyflavone であり、*Citrus tangerina* (ポンカン)、*Citrus suhuiensis* (オレンジ)、*Citrus tachibana* (タチバナ) や *Citrus reticulata* (マンダリンオレンジ) といった柑橘類の果皮に多く含まれる<sup>1,2)</sup>。

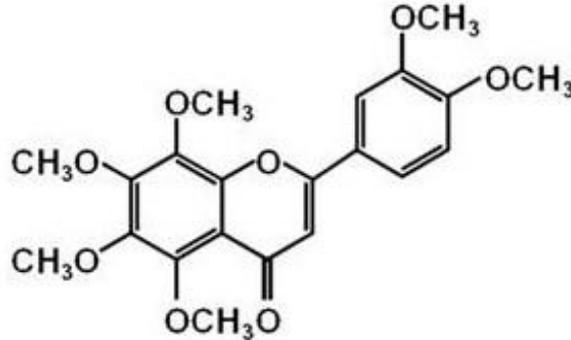


Fig. 1 Nob の構造式

Nob は病態モデル動物 (*in vivo*) や培養細胞 (*in vitro*) を用いた多くの研究の成果に基づき、アルツハイマー病 (Alzheimer's disease : AD) を含む認知症、がんや生活習慣病 (糖尿病、脂質異常症、動脈硬化、肥満など) といった様々な疾患に対して改善作用を発揮するものと期待されている。詳細については以下に述べていく。

#### ・AD改善作用

ADの病態の中心は $\beta$ -amyloid peptide (A $\beta$ ) の産生と蓄積であるというアミロイド仮説<sup>3)</sup>を基に、A $\beta$ を標的としたADモデル動物を用いた研究が進められている。A $\beta$ 注入ADモデルラットやA $\beta$ 前駆体タンパク質であるヒトamyloid precursor protein (APP) 695過剰発現 (APP-SL 7-5 Tg) マウスへのNob投与により記憶・学習能力の改善が認められる<sup>4, 5)</sup>。ADの病理学的重症度の増加に伴ってN-methyl-D-aspartate (NMDA) 受容体のNR1/NR2Bサブユニット発現量は減少することがAD患者の脳で明らかになっているが<sup>6)</sup>、NMDA受容体阻害薬MK-801投与マウスで認められる記憶障害が50 mg/kgのNob投与により回復する<sup>7)</sup>。中枢神経におけるコリン作動性システムの変性により学習・記憶障害が引き起こる嗅覚摘除 (olfactory bulbectomy : OBX)<sup>8, 9)</sup>を行ったマウスへ50-100 mg/kgのNobを11日間投与することにより、海馬でコリン作動性神経変性の抑制が認められる<sup>10, 11)</sup>。AD患者での脳血流量減少は神経活動の低下と血液脳関門 (blood-brain barrier : BBB) 機能障害を起こすが<sup>12)</sup>、マウスへの20分間の両側総頸動脈閉塞 (bilateral common carotid arteries occlusion : BCCAO) では、閉塞前7日間の50

mg/kgのNob投与で海馬CA1神経の遅発性神経細胞死が顕著に阻害される<sup>13)</sup>。上記のようなAD病態モデル動物におけるNobの記憶障害改善作用や神経変性抑制作用は、脳の記憶・学習能力と密接に関係するprotein kinase A (PKA) /extracellular signal-regulated kinase (ERK) /cAMP response element (CRE) binding protein (CREB) シグナルをNobが活性化する<sup>10,14)</sup>ことが密接に関与すると考えられている。

#### ・ 発がん/がん細胞転移・増殖抑制作用

柑橘類果実の摂食はがん予防に有益であることが疫学調査で示されている<sup>15)</sup>ことから、Nobをはじめとした柑橘類成分のがんに対する効果が検証されている。イニシエーターとして7,12-dimethylbenz[*a*]anthracene (DMBA)、プロモーターとして12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) を繰り返し塗布した2段階皮膚腫瘍形成モデルにおいて、TPA塗布前のNob投与により発がんプロモーションの抑制が認められている<sup>16)</sup>。加えて、(±)-(E)-methyl-2-[(E)-hydroxyimino]-5-nitro-6-methoxy-3-hexenamide (NOR1) あるいは亜硝酸過酸化物をイニシエーターとして、TPAをプロモーターとして使用した2段階皮膚腫瘍形成モデルにおいても、Nob投与により腫瘍形成が抑制される結果が得られている<sup>17, 18)</sup>。細胞外マトリックスタンパク質を分解するmatrix metalloproteinase (MMP) -2、MMP-3、MMP-9はがんの転移過程に関与するが<sup>19)</sup>、NobはこれらMMPのmRNAレベルやタンパク質レベルを低下させ<sup>20,21)</sup>、また酵素活性を減弱させる<sup>22)</sup>ことが細胞株を用いた実験で明らかにされている。さらにヒト胃癌細胞株TMK-1を腹腔内投与した重症複合免疫不全 (severe combined immuno-deficient : SCID) マウスにおける腹膜播種結節の形成がNob投与により抑制される<sup>23)</sup>ことも示されている。このほかにも、*in vivo*実験ではNob投与により、前立腺がん好発ラット (transgenic rats developing adenocarcinoma of the prostate : TRAP) での前立腺がん<sup>24)</sup>、2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine (PhIP) 誘発性前立腺がん<sup>25)</sup>、およびazoxymethane (AOM) 誘発性結腸がん<sup>26)</sup>の腫瘍や異常腺窩形成抑制、また*in vitro*実験ではNob処置により、ヒト前立腺がん細胞株LNCaP、DU145、PC3でのアポトーシス誘導<sup>24)</sup>、ラット肝がん細胞株MH1C1およびヒト肝がん細胞株HepG2における細胞増殖抑制、G2/M期細胞周期停止、アポトーシス誘導<sup>27)</sup>、ヒト胃癌上皮細胞株AGSの浸潤抑制<sup>28)</sup>が認められることなどが報告されている。

#### ・ 抗生活習慣病作用

HepG2へのNob処理により、low-density lipoprotein (LDL) 受容体のmRNAレベル上昇とmicrosomal triglyceride transfer protein (MTP) およびdiacylglycerol acyltransferase (DGAT) 1/2のmRNAレベルの低下が起こる<sup>29)</sup>ことに加え、LDLおよびVLDLとして放出されるapolipoprotein B100分泌、コレステロール合成、トリグリセリド合成の顕著な阻害が認められている<sup>29, 30)</sup>。レクチン様酸化LDL受容体 (lectin-like oxidized-LDL receptor-1 : LOX-1) による酸化LDLの取り込み量増加は、アテローム性動脈硬化発症

の重要な要因となるが、TPAによるLOX-1遺伝子の発現上昇は、Nobにより顕著に抑制されることがヒト急性単球性白血病由来細胞株THP-1による実験で明らかにされている<sup>31)</sup>。マウス線維芽細胞株3T3-L1の脂肪細胞様 (adipocyte-like) 細胞への分化過程においてNobを処理すると、脂肪代謝関連転写因子である peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)  $\gamma$ 、CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP)  $\alpha$ の mRNA レベル・タンパク質レベルの低下、脂肪蓄積抑制、AMP-activated protein kinase (AMPK) リン酸化の上昇などを引き起こし、脂肪細胞様細胞への分化を抑制する<sup>32)</sup>。加えてアディポネクチンの分泌上昇や、インスリン抵抗性因子である monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) やレジスチンの分泌減少もNob処理により認められている<sup>33, 34)</sup>。 *In vivo* 実験においてもNobの効果が検証されており、高脂肪食投与LDL受容体欠損マウスにNob投与を行うと、脂肪酸 $\beta$ 酸化の増強、インスリン感受性と耐糖能の上昇が認められ、大動脈洞のアテローム性動脈硬化が劇的に抑制される<sup>29)</sup>ことが報告されている。さらに、Nob投与により血糖値や耐糖能、血漿アディポネクチン量などの改善、白色脂肪組織におけるinterleukin (IL) -6、tumor necrosis factor (TNF) - $\alpha$ やMCP-1の発現低下、アディポネクチンやPPAR $\gamma$ の発現上昇、さらに glucose transporter (GLUT) 4タンパク質発現レベルの上昇が、2型糖尿病および肥満モデルマウス (*ob/ob*マウス)<sup>35)</sup>や高脂肪食投与肥満マウス<sup>36)</sup>を用いた実験により明らかにされている。

#### ・抗炎症作用

ヒト新生児皮膚のリンパ管微小血管内皮細胞 (lymphatic microvascular endothelial cells : LEC) における toll-like receptor 4 (TLR4) を介した lipopolysaccharide (LPS) 誘導性IL-6、IL-8、vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1)、intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) 産生はNobの前処理により抑制することが報告されている<sup>37)</sup>。またNobはLPS刺激による nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) 依存的転写の活性化、炎症性サイトカイン産生、cyclooxygenase (COX) -2の mRNA レベル上昇を抑制する<sup>38, 39)</sup>ことや、短波長紫外線 (ultra violet B : UVB) 照射によるCOX-2の mRNA レベル上昇や細胞内ホスホリパーゼA2 (cytosolic phospholipase A2 : cPLA2) 活性化を減弱させる<sup>40)</sup>ことも細胞株を用いた実験で明らかにされている。 *In vivo* の実験においてもその効果が検証されており、剃毛したマウスの背中に局所的にNobを処置することによって、UVB照射による経皮水分喪失、表皮の肥厚の減少が抑制されることが報告されている<sup>40)</sup>。

## 2. 細胞ストレス調節タンパク質 TXNIP

Thioredoxin-interacting protein (TXNIP) は、細胞の主要な酸化防御システムの一つとして働く thioredoxin (TRX) と結合し、その機能を阻害することで、酸化防御システムに抑制的に働く<sup>41), 42)</sup>。TRXは、酸化ストレスを生じる原因である紫外線、放射線、酸化剤、ウイルス感染、虚血再灌流障害、抗がん剤投与など、様々な要因によって発

現誘導され<sup>43)</sup>、一重項酸素やヒドロキシルラジカルを消去するほか<sup>44)</sup>、TRX依存性ペルオキシダーゼであるペルオキシレドキシンの協調作用により、細胞内のROSを消去する抗酸化物質として働く<sup>45)</sup>。したがってTXNIPはTRXのこれら作用を阻害することになる。TXNIPは、種々疾患の発症・増悪化と関係する小胞体（endoplasmic reticulum : ER）ストレス<sup>46)</sup>や酸化ストレス<sup>47)</sup>によって発現誘導され、TXNIPのmRNAレベル・タンパク質レベルの増加は、2型糖尿病<sup>48), 49)</sup>、AD<sup>50)</sup>、脳虚血再灌流における神経細胞死<sup>51)</sup>、心筋梗塞による心室リモデリング<sup>52)</sup>などを含むいくつかの疾患の原因因子になる可能性が示されつつあることから、TXNIPは細胞ストレス調節タンパク質としてこれら疾患の治療標的となっている。TXNIPの発現上昇が認められる2型糖尿病やADなどの疾患は、Nobが改善作用を示す可能性が期待されている疾患と類似していることから、Nob のTXNIP発現への影響に興味を持たれる。

### 3. 本研究の目的

Nob は多くの研究により様々な疾患に対して改善作用を示す可能性が検証されていることから、ヒト疾患の治療や予防に向けた医薬品や機能性食品成分としての Nob の応用が期待されている。Nob の臨床応用のためには、Nob の疾患改善作用発現機序の詳細を明らかにすること、安全性を評価すること、そして、ヒトでの効果を検証することが不可欠な項目となる。その中でも本研究では、まだ明確になっていないノビレチンの様々な疾患に対する改善作用発現機序と有害作用の有無について推測することを目的として、まずは Nob 処理により発現変動する遺伝子について複数種の細胞株を用いたDNAマイクロアレイ解析を行った。DNAマイクロアレイ解析の結果より、ER ストレスにより発現上昇しアポトーシスに促進的に働く ER ストレス関連タンパク質をコードする遺伝子の発現変動が Nob により認められたことから、続いて Nob と ER ストレス誘発性アポトーシスとの関係性について解析した。

## <第1章>

### 3 種細胞株の遺伝子発現に対するノビレチンの効果

#### 1-1. 緒言

柑橘類果皮成分であるノビレチン (nobiletin : Nob) は、序論で示した通り、様々な疾患に対する改善作用を発揮する可能性が示されている。そのため、これら疾患治療への応用やNob含有機能性食品の開発が期待されているが、Nobの薬効発現の作用機序に関しては、十分に解析されていないのが現状である。Nobの作用機序は、「がん」「糖尿病」といったように、特定の疾患改善効果に的を絞って研究が行われてきた。Nobの薬効発現作用機序の解明のためには、特定の疾患や組織を対象としたNobの作用に限定せず、Nobが起こす生理作用の共通性を見出すことが重要であると考えた。そこで、異なる組織由来の複数の細胞株、具体的にはヒト神経芽細胞腫株SK-N-SH細胞を神経細胞モデル、ヒト肝がん細胞株HuH-7細胞を肝臓細胞モデル、ラット線維芽細胞株3Y1細胞を正常細胞モデルとして用い、これらに共通してNobで変動する遺伝子をDNAマイクロアレイ解析により網羅的に明らかにし、変動した遺伝子がコードするタンパク質の機能からNobの薬効発現機序や有害作用を推定することを目的とした。

#### 1-2. 実験材料

##### 1) 試薬

RNase および DNase 不含脱イオン滅菌水 (RNase-free water) は Nippon Gene (Tokyo, Japan) のものを用いた。Random hexamer、MMLV-RT、AmpliTaq Glod、dNTP、10 x PCR buffer、SYBR Green は Applied Biosystems (Foster City, CA, USA) のものを用いた。QIAquick PCR Purification Kit、QIA shredder、RNeasy mini kit は QIAGEN (Hilden, Germany) から購入した。BCA<sup>TM</sup> Protein Assay Reagent、Pierce Western Blotting Substrate Plus は Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) のものを用いた。現像には FUJIFILM (Tokyo, Japan) のハイレンドール現像液、ハイレンフィックス定着液を用いた。核酸不含 $\alpha$ 改変 Eagle minimum essential medium (MEM $\alpha$ )、penicillin/streptomycin は GIBCO (Carlsbad, CA, USA)、kanamycin sulfate は明治製菓 (Tokyo, Japan) のものを用いた。2.5% Trypsin、TrypLE<sup>TM</sup> Express 溶液、alamarBlue 試薬は Invitrogen (Carlsbad, CA, USA) のものを用いた。Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM)、L-glutamine、PBS (-) は日水製薬 (Tokyo, Japan) のものを用いた。ウシ胎児血清 (FBS) は Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) より購入した。Milli-Q 水は超純水製造装置 Millipore (Darmstadt, Germany) を用いて 17 M $\Omega$ ·cm 以上の超純水を用いた。Nob は本学の清泉康客員教授から提供して頂いたものを用いた。

なお、その他の試薬は、全て和光純薬 (Osaka, Japan) のものを使用し、全ての試薬は、特級以上のグレードを使用した。

## 2) 使用機器、器具等

PCR 反応には TAKARA BIO (Kusatsu, Japan) の Takara PCR Thermal Cycler MP TP3000、定量的 RT-PCR には Applied Biosystems (Foster City, CA, USA) の Applied Biosystems 7300 Real Time PCR System、電気泳動には Mupid (Tokyo, Japan) の Mupid-2、ゲル写真撮影には CANON (Tokyo, Japan) の CANON POWER SHOT G10、遠心分離には TOMY (Tokyo, Japan) の TOMY MX-150 (TMA-11 ロータ)、KUBOTA (Tokyo, Japan) のマイクロ冷却遠心機 3740 (AF-2724A ロータ)、2.5 mL シリンジ、23G 注射針は TERUMO (Tokyo, Japan)、タンパク定量および alamarBlue assay には Perkin Elmer (Waltham, MA, USA) の Wallac 1420 ARV0sx multilabel counter を用いた。SDS-PAGE 電気泳動は ATTO (Tokyo, Japan) の pageRun と e-PAGEL 既成ゲルを用いて行った。転写には AE-6678 ホライズプロット (ATTO) および GE Healthcare (Buckinghamshire, UK) の polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane を用いた。現像には High performance chemiluminescence film (GE Healthcare) を用いた。吸光度測定器は SHIMADZU (Kyoto, Japan) の BioSpec-nano、顕微鏡は OLYMPUS (Tokyo, Japan) の OLYMPUS IX70、顕微鏡用 USB デジタルカメラは WRAYMER (Osaka, Japan) の WRAYCAM G500 を用いた。0.5 mL、1.5 mL、2.0 mL チューブは INA・OPTIKA (Osaka, Japan) の BIO-BIK を用いた。15 mL、50 mL チューブ、および細胞培養の 60 mm ディッシュ、100 mm ディッシュ、24 穴プレートは Sanplatec (Osaka, Japan) の Nest を使用した。

## 3) 培養細胞

ラット線維芽細胞株 3Y1-B クローン 1-6 (3Y1) 細胞とヒト肝細胞癌細胞株 HuH-7 細胞は、Japanese Cancer Research Resources Bank のものを使用した。ヒト神経芽細胞腫株 SK-N-SH 細胞は、近畿大学の宮田信吾准教授に提供して頂いた。3Y1 細胞、HuH-7 細胞は 10% FBS、4 mM の L-glutamine、60 µg/ml の kanamycin sulfate を添加した DMEM を、SK-N-SH 細胞は 10% FBS、penicillin/streptomycin (20 µg/mL penicillin、100 U/mL streptomycin) を添加した MEM $\alpha$ 培地を用いた。これら細胞は 5% 炭酸ガス、95% 湿度のもと、37°C にて培養した。細胞がコンフルエントに達したときに PBS (-) により細胞を洗浄後、3Y1 細胞および HuH-7 細胞に対しては 0.25% Trypsin、SK-N-SH 細胞に対しては TrypLE<sup>TM</sup> Express (GIBCO) を用いて細胞を剥離し、適当に希釈して 60 mm または 100 mm ディッシュに継代した。

### 1-3. 実験方法

#### 1) Nob 調製

大泉康客員教授から提供して頂いた Nob 粉末は最終濃度が 100 mM となるように溶解し、これをストック溶液として -20°C で保存した。試薬刺激には室温に戻した Nob のストック溶液を用いた。なお、Nob の可溶化は溶媒として dimethyl sulfoxide (DMSO) を用いた。

## 2) 試薬刺激

3Y1 細胞、HuH-7 細胞、SK-N-SH 細胞を 24 時間前培養し、培養液を交換した。その後、Nob が 100  $\mu\text{M}$  となるように Nob ストック溶液を直接ディッシュに加えた。また vehicle として DMSO が最終濃度 0.1% となるように刺激を行った。なお、本研究で用いた Nob の刺激濃度は、Nob の種々疾患の改善作用の機序解明を目指した *in vitro* 実験で用いられる平均的な濃度 (100  $\mu\text{M}$ ) を選択した。

## 3) 培養細胞からの total RNA 抽出

基本的には RNeasy mini kit の推奨プロトコルに従って行った。具体的には、培養細胞の 100 mm ディッシュから培養液を除去した後、 $\beta$ -mercaptoethanol ( $\beta$ -ME) を最終濃度 1% となるように添加した 600  $\mu\text{L}$  の RLT buffer を素早く加え、細胞を溶解した。QIA shredder column に細胞溶解液を全量アプライし、マイクロ冷却遠心機 3740 を用いて遠心 (室温、19,283 x g、2 分間) した。得られたろ過液に 600  $\mu\text{L}$  の 70% ethanol を加え、混和後、RNeasy spin column に前述の溶液のうち 600  $\mu\text{L}$  を加えた後、遠心 (室温、9,838 x g、15 秒間) した。ろ過液を捨て、さらに残りの溶液を RNeasy spin column に加え、遠心 (室温、9,838 x g、15 秒間) した。ろ過液を捨て、RNeasy spin column に 700  $\mu\text{L}$  の RW1 buffer を加え、遠心 (室温、9,838 x g、15 秒間) した。ろ過液を捨て、RNeasy spin column に 500  $\mu\text{L}$  の RPE buffer を加え、遠心 (室温、9,838 x g、15 秒間) した。ろ過液を捨て、さらに RNeasy spin column に 500  $\mu\text{L}$  の RPE buffer を加え、遠心 (室温、9,838 x g、2 分間) した。ろ過液を捨て、column に新しい 2 mL チューブをセットし、遠心 (室温、9,838 x g、1 分間) した。さらに新しい 1.5 mL チューブを column にセットし、30  $\mu\text{L}$  の RNase-free water を加えて、遠心 (室温、9,838 x g、1 分間) した。このろ過液を total RNA 溶液とした。BioSpec-nano を用いて、RNA 濃度を算出した。

## 4) DNA マイクロアレイ解析

Nob 処理群 (n=1) および vehicle (DMSO) 処理群 (対照群) (n=2) の各細胞株の total RNA 溶液を用いた。まず、Quick Amp Labeling kit (Agilent technologies、Santa Clara、CA、USA) を用いて cDNA 合成および cRNA ラベルと増幅を行った。500 ng の total RNA、1.2  $\mu\text{L}$  の T7 Promoter primer に Nuclease-free water を加え、全量 6.5  $\mu\text{L}$  とした。RNA Spike In Kit (1 カラー用) の Spike を Cy3 ラベルするサンプルに 5  $\mu\text{L}$  加えた。65°C で 10 分間インキュベート後、5 分間氷上に置き、熱変性させた。8.5  $\mu\text{L}$  の cDNA master mix (4  $\mu\text{L}$  の 5 x First strand buffer、2  $\mu\text{L}$  の 0.1 M DTT、1  $\mu\text{L}$  の 10 mM dNTP mix、0.5  $\mu\text{L}$  の RNase OUT、1  $\mu\text{L}$  の MMLV-RT) を加え、40°C で 2 時間インキュベートした。チューブを水浴から取り出し、65°C で 15 分間インキュベートし反応を停止した後、氷上で 5 分間冷却した。各サンプルに 2.4  $\mu\text{L}$  の 10 mM Cyanine CTP を加えた後、各反応チューブに 57.6  $\mu\text{L}$  の Transcription master mix (15.3  $\mu\text{L}$  の Nuclease-free water、20  $\mu\text{L}$  の 4 x Transcription buffer、6  $\mu\text{L}$  の 0.1 M DTT、6.4  $\mu\text{L}$  の 50%

PEG、0.5  $\mu\text{L}$  の RNase OUT、8.6  $\mu\text{L}$  の Inorganic pyrophosphatase、0.8  $\mu\text{L}$  の T7 RNA polymerase) を加えた。40°Cの水浴で遮光しながら 2 時間インキュベートした。続いて、RNeasy mini spin column (QIAGEN) を用いてラベル化 cRNA 精製を行った。20  $\mu\text{L}$  の Nuclease-free water を反応チューブに加えた。350  $\mu\text{L}$  の RLT buffer を反応チューブに加えた。250  $\mu\text{L}$  の 100% ethanol を反応チューブに加えた。700  $\mu\text{L}$  の cRNA サンプルを column に移し、遠心 (室温、13,000 rpm、1 分間) した。ろ過液を別のチューブに移し、column をチューブに戻した。500  $\mu\text{L}$  の RPE buffer を加え、遠心 (室温、13,000 rpm、1 分間) した。上記の操作をもう一度繰り返し、column を 1.5 mL チューブに移した。30  $\mu\text{L}$  の Nuclease-free water を加え、60 秒間静置した。遠心 (室温、13,000 rpm、1 分間) し、溶出した。上記の操作をもう 1 度行った。続いて、cRNA ターゲット溶液の調製を行った。Cyanine3 ラベル化 cRNA を 1.65  $\mu\text{g}$ 、10 x Blocking Agent を 11  $\mu\text{L}$  加え、Nuclease-free water で全量 52.8  $\mu\text{L}$  になるように 2 x cRNA ターゲット溶液 (1 チューブあたり) を調製した。2 x cRNA ターゲット溶液に 2.2  $\mu\text{L}$  の 25 x Fragmentation buffer を加えた。60°Cの水浴で 30 分間インキュベートした。Fragmentation を停止させるために、55  $\mu\text{L}$  の 2 x Hybridization buffer を加えた。マイクロアレイに全量アプライし、65°Cで約 17 時間、ハイブリオープンで攪拌しながら hybridisation を行った。室温の Agilent Gene Expression wash buffer 1 で 1 分間洗浄した。37°Cの Agilent Gene Expression wash buffer 2 で 1 分間洗浄した。Agilent Technologies Microarray Scanner を用いて 5  $\mu\text{m}$  の解像度でスキャンした。スキャンの結果得られた数値化データを normalization しデータを作成した。なお、DNA マイクロアレイ解析操作は北海道システム・サイエンス社 (Sapporo, Japan) に依頼し、得られたデータは Subio Platform (Tokyo, Japan) を用いて解析した。

#### 5) RT (reverse transcription) 反応

8 連チューブ上で、4  $\mu\text{L}$  の 0.25  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  total RNA 溶液に 2  $\mu\text{L}$  の 0.2  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  Random hexamer と、4.5  $\mu\text{L}$  の RNase-free water を加えた。その後 65°Cで 15 分間加温し、氷水で 3 分間急冷した。これに、1 サンプルあたり 4  $\mu\text{L}$  の 5 x First strand buffer [250 mM Tris-HCl (pH 8.3)、375 mM KCl、15 mM MgCl<sub>2</sub>]、2  $\mu\text{L}$  の 100 mM DTT、2  $\mu\text{L}$  の 10 mM dNTP、1  $\mu\text{L}$  の 200 U/ $\mu\text{L}$  MMLV-RT、0.5  $\mu\text{L}$  の 40 U/ $\mu\text{L}$  RNasin を混和した溶液を 9.5  $\mu\text{L}$  加え、37°Cで 45 分間反応させた。その後、98°Cで 5 分間加熱し、酵素を失活させた。この RT 反応溶液 20  $\mu\text{L}$  に 230  $\mu\text{L}$  の RNase-free water を加え希釈し、これを RT mixture とし、-20°Cで保存した。

#### 6) PCR 法

5.0  $\mu\text{L}$  の RT mixture に 2.5  $\mu\text{L}$  の 10 x PCR buffer [100 mM Tris-HCl (pH 8.3)、500 mM KCl、15 mM MgCl<sub>2</sub>、0.01% (w/v) gelatin]、2.5  $\mu\text{L}$  の 2 mM dNTP、0.5  $\mu\text{L}$  の 25  $\mu\text{M}$  forward primer、0.5  $\mu\text{L}$  の 25  $\mu\text{M}$  reverse primer、および 0.5  $\mu\text{L}$  の AmpliTaq Gold™ を加え、Milli-Q 水で全量 25  $\mu\text{L}$  とし、PCR 反応を行った。なお、使用したプライマーの塩基配列と反

応条件を Table 1 に示した。

#### 7) アガロースゲル電気泳動法

6.5  $\mu$ L の PCR 反応溶液に 2  $\mu$ L の dye (0.04% bromophenol blue、0.04% xylene cyanol FF、30% glycerol) を加えた後、そのうちの 6.5  $\mu$ L を 2% agarose gel (10 ng / mL EtBr を含む) で Mupid-2 を用いて電気泳動を行った。泳動終了後、紫外線照射下、CANON POWER SHOT G10 により写真撮影した。

#### 8) 定量的 RT-PCR 法

Applied Biosystems 社の Power SYBR Green PCR Master Mix を用いて反応を行った。5  $\mu$ L の RT mixture に 6.5  $\mu$ L の 2 x Power SYBR Green PCR Master Mix、0.5  $\mu$ L の 25  $\mu$ M forward primer、0.5  $\mu$ L の 25  $\mu$ M reverse primer および 12.5  $\mu$ L の Milli-Q 水を加えて全量を 25  $\mu$ L とし、定量的 RT-PCR 反応を行った。なお、使用したプライマーの塩基配列と反応条件を Table 1 に示した。また、検量線作成のための標準サンプルは、PCR 反応によって増幅した PCR 産物を QIAquick PCR Purification Kit で精製し、RNase-free water で順次 3 倍または 5 倍希釈した系を用いた。

**Table 1 PCR および定量的 RT-PCR に使用した primer の塩基配列と反応条件**

Gene (primer name)	Product size (bp)		Primer sequence	Reaction condition		
				Denaturation	Annealing	Elongation
rat <i>Gapdh</i>	373	Forward	5'-TTC AAC GGC ACA GTC AAG G-3'	95°C, 1 min	60°C, 1 min	72°C, 2 min
		Reverse	5'-CAT GGA CTG TGG TCA TGA G-3'			
rat <i>Txnip</i>	101	Forward	5'-GGG CCT AAG CAG CCG GAC AT-3'	95°C, 30 sec	58°C, 30 sec	72°C, 30 sec
		Reverse	5'-AGC AAG GTG GAG CTT CTG GGG-3'			
rat <i>Ddit3</i>	140	Forward	5'-AGC TGA GTC TCT GCC TTT CGC CT-3'	95°C, 30 sec	58°C, 30 sec	72°C, 1 min
		Reverse	5'-ATT CTT CCT CTT CGT TTC CTG GGG A-3'			
rat <i>Trib3</i>	110	Forward	5'-AGA TGG CTA GTG CGG TGG CA-3'	95°C, 30 sec	58°C, 30 sec	72°C, 1 min
		Reverse	5'-CTC CAG CAC CAA CTT CGT CCT CTC-3'			
human <i>GAPDH</i>	181	Forward	5'-TGT TGC CAT CAA TGA CCC CTT C-3'	95°C, 30 sec	60°C, 30 sec	72°C, 1 min
		Reverse	5'-AGC ATC GCC CCA CTT GAT TTT G-3'			
human <i>TXNIP</i>	120	Forward	5'-CCT GGC TTG CGG AGT GGC TA-3'	95°C, 30 sec	58°C, 30 sec	72°C, 30 sec
		Reverse	5'-TTC TCA CCT GTT GGC TGG TCT TCC-3'			
human <i>DDIT3</i>	405	Forward	5'-GGA GCT GGA AGC CTG GTA TGA GG-3'	95°C, 30 sec	62°C, 30 sec	72°C, 1 min
		Reverse	5'-TCC CTG GTC AGG CGC TCG ATT TCC-3'			
human <i>TRIB3</i>	110	Forward	5'-AGA TGG CCA CCG CCC TGG CG-3'	95°C, 30 sec	62°C, 30 sec	72°C, 1 min
		Reverse	5'-CTC CAG CAC CAG CTT CTT CCT CTC-3'			

#### 9) 培養細胞からのタンパク質抽出

培養液を除き PBS (-) で 2 回洗浄後、氷冷した 0.4 mL の RIPA buffer [1 x PBS (pH 7.4)、1% NP-40、0.5% sodium deoxycholate、0.1% SDS、phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)、aprotinin、sodium orthovanadate、protease inhibitor cocktail] を 100 mm ディッシュに加え、4°C で 15 分間振盪し、その後セルスクレイパーで細胞を採取し、さらに 0.1 mL の RIPA buffer でディッシュを洗い、細胞を採取し、23G 注射針で DNA をせん断した。4°C で 1 時間転倒混和した後、遠心 (4°C、10,000 x g、10 分間) し、タンパク質溶液とした。

#### 10) タンパク質定量

タンパク質溶液を 20  $\mu$ L ずつ 96 穴プレートに入れ、BCA™ Protein Assay Reagent を 200  $\mu$ L/well で加え、穏やかに混和し、37°C で 20 分間インキュベートした。その後 Wallac 1420 ARVOsx multilabel counter で吸光度の測定を行い、BSA 検量線の値からタンパク質濃度を算出した。

#### 11) Western blotting 法

33.75  $\mu$ L の 1  $\mu$ g/ $\mu$ L タンパク質溶液に、9  $\mu$ L の sample buffer [0.3 M Tris-HCl (pH 6.8)、10% SDS、35% glycerol、0.025% bromophenol blue] と 2.25  $\mu$ L の  $\beta$ -ME を加えた。これを 100°C で 5 分間煮沸し、氷冷した後サンプルとして用いた。タンパク質量が 15  $\mu$ g/lane となるようにサンプルを 12.5% e-PAGEL にアプライし、pageRun を用いてゲル 1 枚当たり 10 mA で 30 分間、その後 20 mA で 60 分間泳動した。続いて、AE-6678 ホライズブロットを用いて泳動分離したタンパク質を PVDF membrane にゲル 1 枚当たり 76.5 mA 定電流で 90 分間転写した。Membrane を、5% スキムミルクもしくは 5% BSA を含む TBST buffer [10 mM Tris-HCl (pH 7.4)、150 mM NaCl、0.1% Tween20] を用いて室温で 1 時間ブロッキングした。その後、各一次抗体を用いて、4°C で一晩インキュベートした。使用した一次抗体は Table 2 に示した。二次抗体には抗ウサギあるいは抗マウス IgG horseradish peroxidase (HRP) 結合抗体 (Cell Signaling Technologies) を使用した。検出は Pierce Western Blotting Substrate Plus を用い、High performance chemiluminescence film に現像した。なお、現像液として希釈したハイレンドール、停止液として 1.5% 酢酸溶液、定着液として希釈したハイレンフィックスを用いた。

#### 12) alamarBlue assay

細胞を 24 穴プレートに細胞懸濁液を 0.5 mL ずつ  $5 \times 10^3$  cells/well で播種し、24 時間前培養した。培養液を交換し、50  $\mu$ L/well で alamarBlue 試薬を添加し、37°C で 3 時間インキュベートした後上清を回収し、励起波長 550 nm/蛍光波長 590 nm で測定した。0、24、48、72、96 時間刺激で測定を行い、各細胞株の 0 時間で得られた蛍光を 100% fluorescence intensity とし、種々の処理細胞の蛍光をそれに応じて計算した。

**Table 2 Western blotting に使用した一次抗体**

1st antibody	M.W. (kDa)	免疫原	クローン	交差性	カタログ番号	メーカー	希釈率
Asparagine synthetase (G-10)	64	mouse	monoclonal	H, M, R	sc-365809	santa cruz	10000
CHOP (L63F7) Mouse mAb	27	mouse	monoclonal	H, M, R	2895	Cell Signaling Technologies	2000
Anti-TRIB3 antibody [EPR3151Y]	40	rabbit	monoclonal	H	ab75846	abcam	5000
Anti-Txnip/VDUP1	50	mouse	monoclonal	H, M, R	K0205-3	MBL	2000
$\beta$ -actin	45	rabbit	polyclonal	H, M, R	4967	Cell Signaling Technologies	5000

各一次抗体は上記の希釈率で用いた。なお、交差性においては H=human、M=mouse、R=rat を示す。

### 13) 統計解析

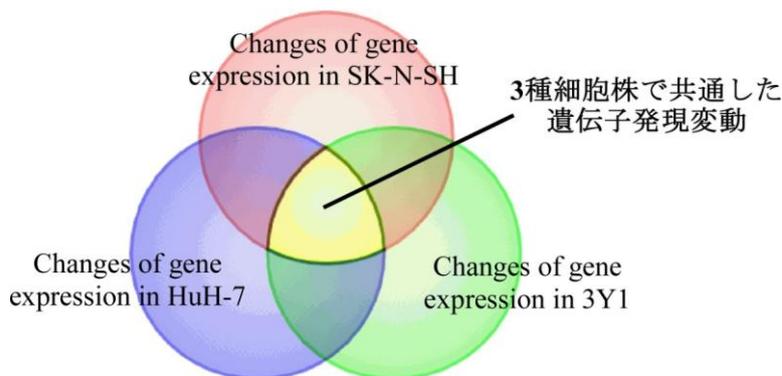
結果は平均値±標準偏差で表した。2 標本間の有意差検定には Student's *t*-test を用い、有意水準  $p < 0.05$  を有意差ありとした。

## 1-4. 結果

### 1) 3種細胞株を用いたノビレチンによる網羅的遺伝子発現変動解析

異なる組織由来の3種細胞株 (SK-N-SH細胞、HuH-7細胞、3Y1細胞) で共通してNobにより変動する遺伝子を明らかにするために、DNAマイクロアレイ法による網羅的遺伝子発現変動解析を行った。SK-N-SH細胞、HuH-7細胞、3Y1細胞の3種細胞株へ100  $\mu$ MのNobを24時間処理し、以下の条件で遺伝子の選定を行った (Fig. 2)。

- 0.1% DMSO処理 (対照) 群と比較してNob処理で2倍以上あるいは0.5倍以下の発現変動
- 対照群あるいはNob処理のいずれかでraw signalが20以上 (発現が著しく低い遺伝子は除外)
- 対照群 (n=2) 間で2倍以上あるいは0.5倍以下の発現変動が認められない



**Fig. 2 DNA マイクロアレイ解析の概要図**

SK-N-SH細胞、HuH-7細胞、3Y1細胞の3種細胞株にvehicleとして0.1% DMSO (n=2) あるいは100  $\mu$ MのNob (n=1) を24時間処理した後、抽出したtotal RNAを用いてDNAマイクロアレイ解析を実施した。Nob処理により3種細胞株で共通して発現変動する遺伝子を選定した。

**Table 3 3種細胞株における DNA マイクロアレイ解析の結果**

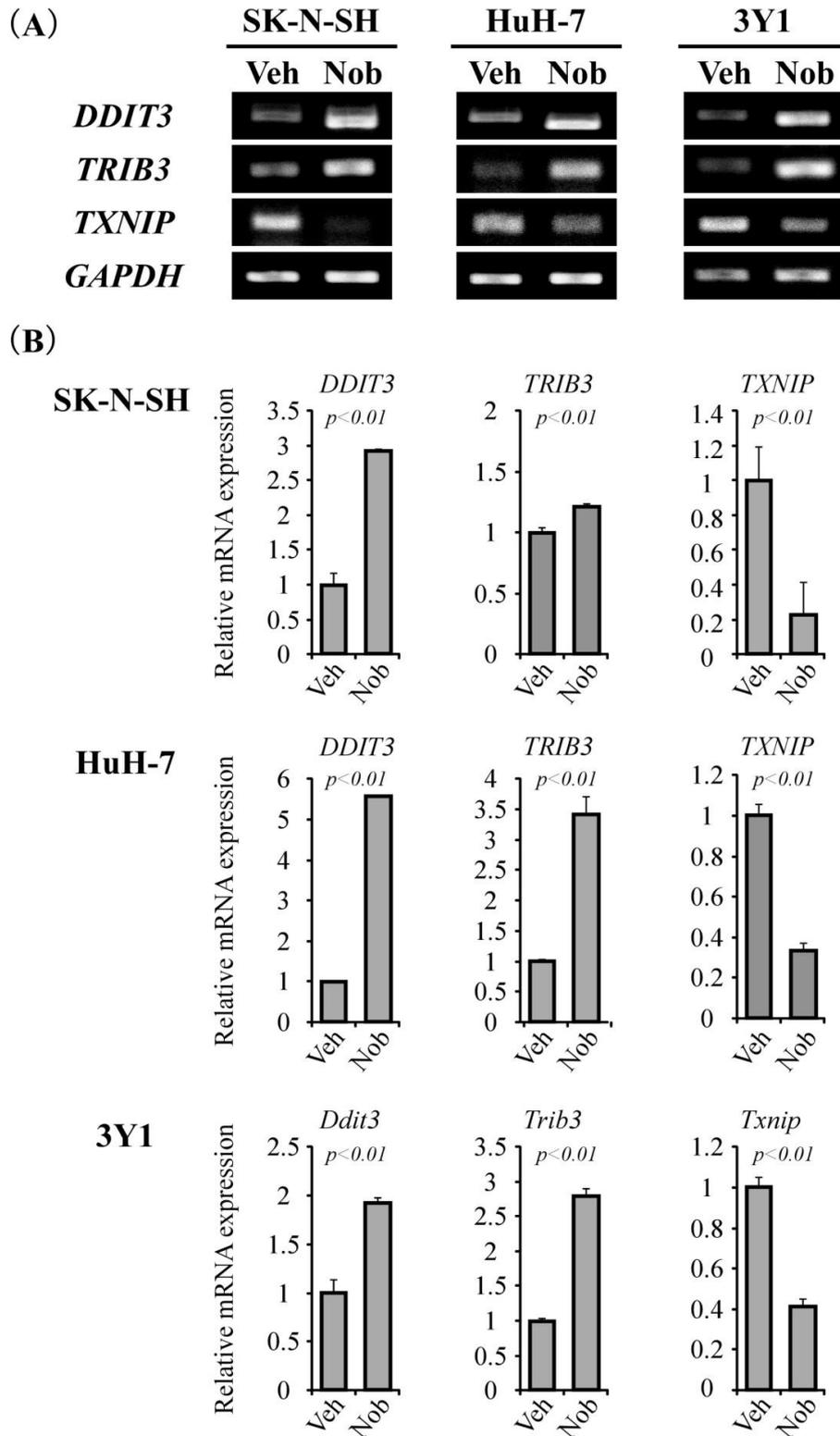
Gene symbol (human/rat)	Gene name	Fold change		
		SK-N-SH	Huh-7	3Y1
<b>Up-regulated</b>				
<i>ASNS/Asns</i>	asparagine synthetase (glutamine-hydrolyzing)	6.04	6.36	2.83
<i>DDIT3/Ddit3</i>	DNA-damage-inducible transcript 3	19.05	4.95	2.71
<i>SLC6A9/Slc6a9</i>	solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, glycine), member 9	4.59	4.95	2.17
		2.79	2.77	2.32
<i>TMEM116/Tmem116</i>	transmembrane protein 116	2.22	2.21	3.73
<i>TRIB3/Trib3</i>	tribbles homolog 3	7.02	3.20	4.92
<b>Down-regulated</b>				
<i>CCNA2/Ccna2</i>	cyclin A2	0.45	0.38	0.48
<i>CCNE2/Ccne2</i>	cyclin E2	0.19	0.38	0.43
		0.32	0.46	
<i>DEPDC1/Depdc1</i>	DEP domain containing 1	0.38	0.33	0.46
<i>E2F8/E2f8</i>	E2F transcription factor 8	0.26	0.30	0.48
<i>HIST1H1B/Hist1h1b</i>	histone cluster 1, H1b	0.39	0.31	0.42
				0.43
<i>KIF11/Kif11</i>	kinesin family member 11	0.41	0.41	0.49
<i>TXNIP/Txnip</i>	thioredoxin interacting protein	0.02	0.18	0.36

表の左側から、ヒトあるいはラットでの遺伝子記号、遺伝子名、各細胞株における対照群に対する Nob 処理での発現変動率を示した。なお、同一遺伝子に対するプローブが複数存在するものについては、それぞれのプローブについて変動率を示した。

前述の条件で絞り込みを行ったところ、Nobにより発現上昇する遺伝子として5種、発現低下する遺伝子として7種を見出した (Table 3)。なお、同一遺伝子に対するプローブが複数存在するものについては、それぞれのプローブについて変動率を示した。

## 2) 定量的RT-PCR法による*DDIT3*、*TRIB3*、*TXNIP*発現変動の解析

変動が認められた遺伝子の中で、Nobによる発現変化が大きく、生理機能が明確になっている遺伝子のうち、これまでに報告されているNobの作用発現に重要であると推測された3種 (*DDIT3*、*TRIB3*、*TXNIP*) を選択し、Nobによる3種細胞株での遺伝子発現変動について再現性を解析した。電気泳動の結果をFig. 3Aに、定量的RT-PCRの結果をFig. 3Bに示す。SK-N-SH細胞では、定量的RT-PCRの結果より、*DDIT3*が2.93倍、*TRIB3*が1.21倍、*TXNIP*が0.22倍であった。マイクロアレイ解析の変動率と比較すると、変動率が小さい結果となったが、いずれの遺伝子においても統計的に有意な変動が認



**Fig. 3** *DDIT3*、*TRIB3*、*TXNIP* 遺伝子発現量変動

溶媒対照 (vehicle : Veh) として 0.1% DMSO あるいは 100  $\mu$ M の Nob を 24 時間処理した SK-N-SH 細胞、HuH-7 細胞、3Y1 細胞の 3 種細胞株から抽出した RNA から調製した cDNA を用いて、RT-PCR および定量的 RT-PCR 法により *DDIT3*、*TRIB3*、*TXNIP*、および *GAPDH* 遺伝子発現量の変動について解析を行った。値は平均値+標準偏差で示した (n=3)。Student's *t*-test,  $p < 0.01$  vs. vehicle control group.

められた。HuH-7細胞では、定量的RT-PCRの結果より、*DDIT3*が5.59倍、*TRIB3*が3.41倍、*TXNIP*が0.33倍であり、マイクロアレイ解析の発現変動と同様の傾向が再現され、いずれの遺伝子もNob処理により有意な変動が認められた。3Y1細胞では、定量的RT-PCRの結果より、*Ddit3*が1.93倍、*Trib3*が2.79倍、*Txnip*が0.41倍であり、マイクロアレイ解析の発現変動と同様の傾向が認められ、いずれの遺伝子もNob処理により有意に変動していた。

### 3) Western blottingによるタンパク質発現の解析

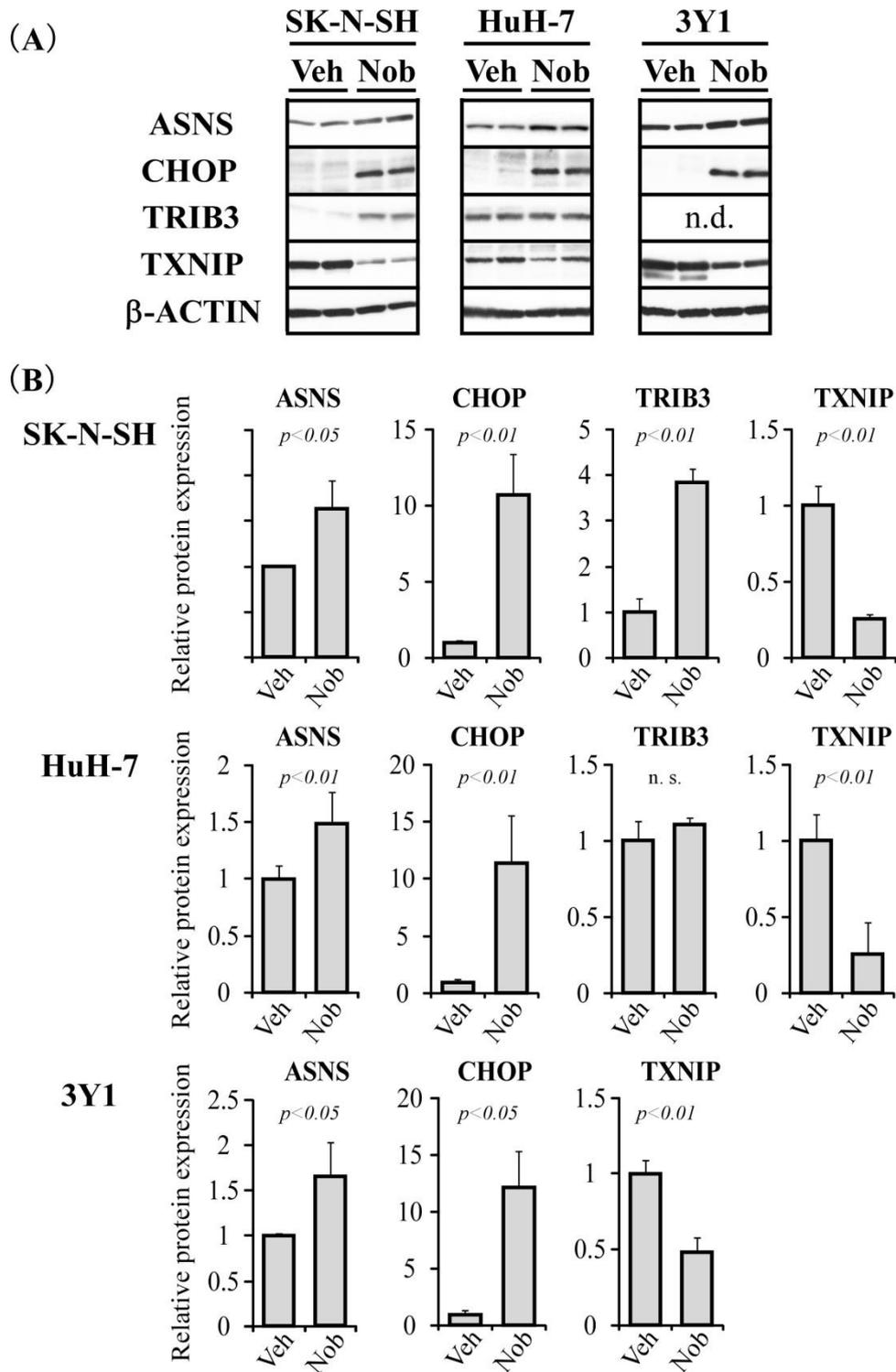
定量的RT-PCR法で発現を解析した*DDIT3*、*TRIB3*、*TXNIP*がコードするタンパク質発現をWestern blotting法により解析した。これに加え、Nobの作用に重要であると推測されたが適切なプライマーが設計出来なかったため遺伝子発現については解析を行わなかったASNSについても、その遺伝子がコードするタンパク質発現をWestern blotting法により解析した。Western blottingの結果をFig. 4Aに、それらのバンドの濃さを画像解析ソフトImageJで定量した結果をFig. 4Bに示す。SK-N-SH細胞では、ASNSが、1.63倍、*DDIT3*が10.7倍、*TRIB3*が3.84倍、*TXNIP*が0.25倍であった。変動率は異なるものの、いずれのタンパク質においても遺伝子発現変動と同様に有意な変動が認められた。HuH-7細胞では、ASNSが、1.49倍、*DDIT3*が11.4倍、*TRIB3*が1.10倍、*TXNIP*が0.26倍であった。HuH-7細胞の*TRIB3*の発現量については大きな変動が認められなかったが、ASNS、*DDIT3*、*TXNIP*に関してはNob処理により有意な発現変動を示した。3Y1細胞では、ASNSが、1.65倍、*DDIT3*が12.1倍、*TXNIP*が0.48倍であった。これらはNob処理により有意な発現変動を示していた。なお3Y1細胞での*TRIB3*については適切な反応抗体が無かったため結果を示していない。

### 4) ノビレチン処理による3種細胞株の細胞形態の変化

種々のがん細胞株を用いた解析により、Nobはアポトーシスを誘導する<sup>24, 27, 53, 54</sup>ことが報告されている。本研究で用いた3種細胞株へのNob処理はアポトーシスを誘導するかどうかを推測するために、100  $\mu$ MのNobをSK-N-SH細胞、HuH-7細胞、3Y1細胞にそれぞれ処理し、位相差顕微鏡で24時間後の細胞形態の観察を行った (Fig. 5)。Nobを処理した3Y1細胞では、Veh処理と比較して細胞がわずかに細長くなっている様子が観察されたが、Nobを処理したSK-N-SH細胞とHuH-7細胞では大きな形態変化は認められなかった。また、いずれの処理群においても、アポトーシスの特徴である丸く光りシャーレ面から剥離しかけた細胞は観察されなかった。

### 5) ノビレチン処理による3種細胞株の細胞生存率の変化

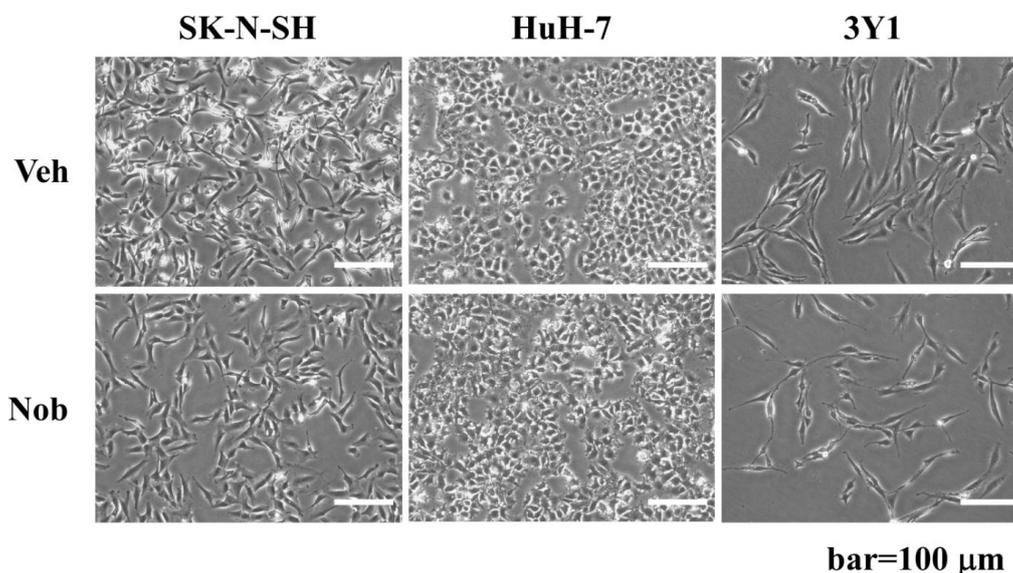
位相差顕微鏡による細胞形態の観察に加え、本研究で用いた3種細胞株へのNob処理のアポトーシス誘導性を推測するために、*AlamarBlue*試薬を用いてNobの細胞生存率への影響を解析した。SK-N-SH細胞、HuH-7細胞、3Y1細胞に100  $\mu$ MのNobを処理し、0時間の蛍光値を100%として96時間後までの蛍光値の相対変化を示した (Fig. 6)。細



**Fig. 4 DDIT3、TRIB3、TXNIP タンパク質発現量変動**

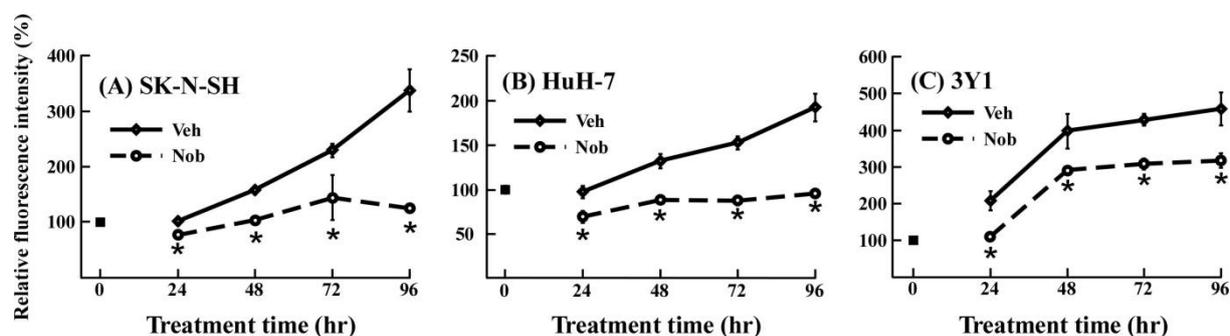
溶媒対照 (vehicle : Veh) として0.1% DMSOあるいは100  $\mu$ MのNobを24時間処理したSK-N-SH細胞、HuH-7細胞、3Y1細胞の3種細胞株から抽出したタンパク質を用いて、Western blotting法によりASNS、CHOP (DDIT3)、TRIB3、TXNIP、および $\beta$ -ACTINタンパク質発現量の変動について解析を行った。値は平均値+標準偏差で示した (n=4)。Student's *t*-test,  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$  vs. vehicle control group. なお、n. d. は検出不可能、n. s. は有意差なしを表す。

胞膜透過性の酸化還元試薬である alamarBlue の蛍光値は生細胞数と比例することから<sup>55)</sup>、蛍光値の変化は細胞生存率の変化として考えられる。SK-N-SH細胞、HuH-7細胞および3Y1細胞のいずれの細胞株においても、溶媒対照群と比較してNob処理では全てのタイムポイントにおいて有意な細胞生存率の低下が認められた。



**Fig. 5** Nob処理によるSK-N-SH細胞、HuH-7細胞、および3Y1細胞の形態変化

溶媒対照 (vehicle : Veh) として0.1% DMSOあるいは100  $\mu$ MのNobを24時間処理したSK-N-SH細胞、HuH-7細胞、3Y1細胞の3種細胞株の形態を位相差顕微鏡下で観察した。



**Fig. 6** 3種細胞株におけるNob処理による alamarBlue 蛍光値の変化

溶媒対照 (vehicle : Veh) として0.1% DMSOあるいは100  $\mu$ MのNobを上図の時間処理したSK-N-SH細胞、HuH-7細胞、3Y1細胞の3種細胞株を用いて alamarBlue assayを行った。蛍光値は■で示した0時間(未処理群)の値を100%とし、平均値±標準偏差で示した (n=8)。Student's *t*-test, \**p*<0.01 vs. corresponding vehicle control group.

## 1-5. 考察

本章では、Nobによって発現変動する遺伝子を明らかにし、変動が認められた遺伝子がコードするタンパク質の機能からNobの薬効発現機序や有害作用を推定するために、異なる組織由来の3種細胞株を用いたDNAマイクロアレイ解析を行った。その結果、SK-N-SH細胞、HuH-7細胞、3Y1細胞の3種細胞株でNob処理により共通して発現上昇する遺伝子として5種 (*ASNS*、*DDIT3*、*SLC6A9*、*TMEM116*、*TRIB3*)、発現低下する遺伝子として7種 (*CCNA2*、*CCNE2*、*DEPDC1*、*E2F8*、*HIST1H1B*、*KIF11*、*TXNIP*)を選定した。これら遺伝子がコードするタンパク質の機能とNobの作用との関連性について、以下のように考察する。

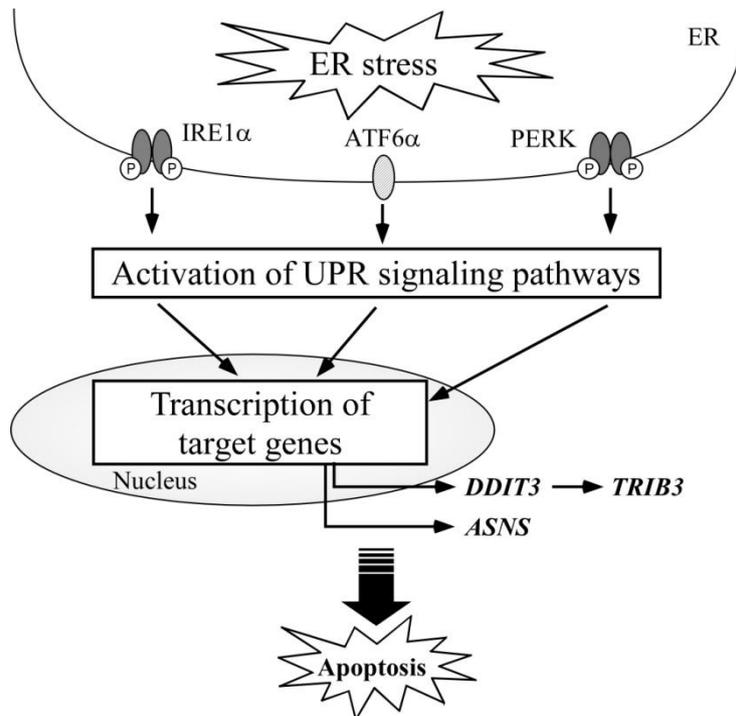
### 1) Nobにより発現が亢進した遺伝子について

Nobにより上昇が認められた遺伝子のうち、*ASNS*、*DDIT3*、*TRIB3*がコードするタンパク質は小胞体 (endoplasmic reticulum: ER) ストレス負荷により発現が亢進する<sup>56-58)</sup>。ERストレスとは、タンパク質の高次構造形成 (折りたたみ) が行われるER内に、折りたたみ不全タンパク質が蓄積した状態の細胞ストレスである。通常、このERストレスは、ERストレス応答 (unfolded protein response: UPR) と呼ばれる反応により解消される<sup>58,59)</sup>。軽度のERストレス負荷であれば、このUPRによりストレスは解消されるが、慢性的あるいは過剰なERストレス負荷が生じると、UPRによってもストレス負荷が解消されず、細胞は最終的にアポトーシスを誘導する<sup>60-62)</sup> (Fig. 7)。

*ASNS*がコードするタンパク質 asparagine synthetase (*ASNS*) は、ATPの加水分解により、アスパラギン酸やグルタミン酸からアスパラギンを生合成する酵素である<sup>63)</sup>。*ASNS*はアミノ酸飢餓や炭水化物飢餓<sup>64,65)</sup>、またERストレス誘導薬<sup>66)</sup>によるUPRシグナル活性化により転写活性化されることから、*ASNS*の発現量上昇はERストレス負荷の指標の1つとして考えられている。ERストレスによる*ASNS*の転写活性化の意義についてはまだ不明な点も多いが、*ASNS*の発現上昇はアポトーシスを促進すると考えられている<sup>66,67)</sup>。

*DDIT3*がコードするタンパク質 C/EBP homologous protein (CHOP) は、29 kDaのCCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) ファミリーに属する転写因子である<sup>68)</sup>。*DDIT3*は、ERストレス負荷時に最も発現が亢進する遺伝子の1つであることがヒト子宮頸がん由来細胞HeLaを用いたマイクロアレイ解析により示されている<sup>69)</sup>。CHOPの発現上昇により、BCL-2ファミリータンパク質の発現制御<sup>70-72)</sup>、ERのROS上昇<sup>71,73)</sup>、ERカルシウムストアの枯渇<sup>74,75)</sup>などを介してアポトーシスが誘導される。

*TRIB3*はショウジョウバエのキナーゼ様分子 *tribbles* のヒトでのホモログとして発見された遺伝子<sup>76)</sup>で *tribbles homolog 3* (*TRIB3*) をコードする。*TRIB3*は前述のCHOPの下流標的遺伝子である。*TRIB3*発現の抑制によりERストレス誘導性アポトーシスが弱まることから<sup>77)</sup>、*TRIB3*はERストレス誘導性アポトーシスを促進すると考えられているが、その詳細な機構についてはまだ明らかになっていない。



**Fig. 7 ER ストレスと UPR シグナル**

ERストレスが生じると、ER膜上に存在する3種のストレスセンサー（IRE1 $\alpha$ 、ATF6 $\alpha$ 、PERK）が活性化し、UPRシグナルが伝達される。これにより翻訳抑制、分子シャペロンの誘導、蓄積タンパク質の分解などを引き起こし、ERストレス負荷に対して適応反応を示す。一方、UPRで解消できない重度・長期的なERストレス負荷が生じると、UPRは最終的にアポトーシスに促進的に作用するDDIT3などのERストレス関連遺伝子の発現上昇を引き起こし、細胞死を誘導する。

ASNS、DDIT3、TRIB3の遺伝子あるいはタンパク質発現について3種細胞株で解析を行ったところ、確かにマイクロアレイ解析の傾向と一致して発現変動が認められた（Fig. 3, 4）。NobはERストレス負荷により発現上昇しアポトーシス促進的に機能するASNS、DDIT3、TRIB3の遺伝子発現レベルを上昇させ、さらにそれら遺伝子がコードするタンパク質発現を上昇させることから、ERストレス誘導性アポトーシスを起こす可能性が考えられた。なお、HuH-7細胞ではTRIB3タンパク質レベルでの変動は認められなかった（Fig. 4）が、TRIB3は前述のCHOPの下流標的遺伝子であることから、シグナル伝達のタイムポイントによる影響で、HuH-7細胞ではまだTRIB3タンパク質としての変動が現れる前であったのではないかと考えられる。Nobは様々ながん細胞株を用いた実験においてアポトーシス誘導作用を示すことが報告されており<sup>27, 54, 78</sup>、NobがERストレスを生じることが誘導要因となっている可能性がある。しかしながら、本研究で用いたSK-N-SH細胞、HuH-7細胞、3Y1細胞へのNob処理では、明らかなアポトーシス様の形態変化は認められなかった（Fig. 5）。一方、alamarBlue試薬を用いた細胞生存率の測定では、いずれの細胞株においてもNob処理により全てのタイムポイントにて細胞生存率の有意な低下が認められた（Fig. 6）が、細胞形態の変化が認め

られないことをふまえると、Nobによる細胞生存率の低下はNobの細胞増殖抑制作用（後述）やミトコンドリア電子伝達系への影響により二次的に起こっている可能性がある。このことから、本章の結果からはNobにアポトーシス誘導作用があると断言するまでには至らなかった。Nobの機能性食品や臨床への安全な応用のためには、NobとERストレス、さらにそれに引き続くアポトーシスとの関連性をより詳細に解析する必要がある。この点に関しては<第2章 SK-N-SH細胞での小胞体ストレス誘導性アポトーシスと細胞ストレス調節タンパク質TXNIP発現に対するノビレチンの作用>で解析した。

*SLC6A9*がコードするタンパク質は、 $\text{Na}^+/\text{Cl}^-$ 依存性神経伝達物質トランスポーターファミリーSLC6のメンバーの1つであるグリシントランスポーターGLYT1である。GLYT1は、シナプスのグリシン濃度を制御し、NMDA受容体を介した神経伝達に影響を与えることが報告されている<sup>79, 80</sup>。*TMEM116*がコードするタンパク質は、transmembrane protein 116である。TMEM116はヒトの腎明細胞がん組織において発現が低下していることが報告されている<sup>81</sup>。しかしながら、これらの遺伝子・タンパク質の詳細な機能についてはまだ不明な点が多いのが現状であり、Nobの既知作用との関わりを推定するには至らなかった。

## 2) Nobにより発現が低下した遺伝子について

*CCNA2*がコードするcyclin A2は、細胞周期のS期の通過とG2期の通過を正に制御する因子として、また、*CCNE2*がコードするcyclin E2は、細胞周期のG1期からS期への移行を正に制御する因子として働く。*E2F8*がコードするE2F transcription factor 8 (E2F8)は、細胞周期のG1期からS期への移行を正に制御する<sup>82</sup>。Nobは細胞周期を停止させ細胞増殖抑制作用を示す<sup>24, 27, 54, 83</sup>ことが種々がん細胞株で示されている。本研究で用いたSK-N-SH細胞、HuH-7細胞、3Y1細胞の3種細胞株においても、Nobにより細胞増殖が抑制される傾向を位相差顕微鏡下での観察で得ている（データ省略）。すなわち、Nobは少なくとも一部は*CCNA2*、*CCNE2*、*E2F8*の発現低下を介して細胞周期の進行を停止させ細胞増殖抑制作用を示していると考えられる。

*DEPDC1*は、DEP domain-containing protein 1A (DEPDC1) をコードしており、膀胱がんや肺腺がんが発現が上昇することが報告されている<sup>84, 85</sup>。また、DEPDC1発現は精巣以外のどの正常組織においてもほとんど発現していないことから、がん/精巣抗原とみなされている<sup>85, 86</sup>。また、E2F8については前述した細胞周期への関与だけでなく、ヒト肝細胞がんにおいて強く発現上昇し、E2F8の異所性過剰発現は細胞増殖やコロニー形成、腫瘍形成を促進する一方で、HuH-7細胞を含むヒト肝がん細胞におけるE2F8のノックダウンはこれらの表現型を抑制することが報告されている<sup>87</sup>。本研究では、3種細胞株においてNob処理により*DEPDC1*と*E2F8*の発現レベルの低下が見られたことから、これらの作用がNobのがん細胞増殖抑制作用において重要な働きをしていることが推察された。

*HIST1H1B*がコードするタンパク質はリンカーヒストンであるhistone 1H1b (H1b)、

*KIF11*がコードするタンパク質はモータータンパク質であるkinesin family member 11 (*KIF11*) である。*H1b*はヌクレオソームのリンカー部に結合し、クロマチン構築に関わってDNA高次構造を安定化している<sup>88)</sup>。また*KIF11*は双極性紡錘体の形成に関与しているタンパク質であり<sup>89)</sup>、ある種のがん細胞株において*KIF11*の発現・機能を抑制すると紡錘体チェックポイントが活性化され有糸分裂が停止、細胞死に至る<sup>90)</sup>ことが明らかになっており、がん治療のターゲットとして*KIF11*阻害薬が臨床試験に進んでいる<sup>91)</sup>。このことから、*Nob*の制がん作用発現に関与している可能性がある。

*TXNIP*がコードするthioredoxin-interacting protein (*TXNIP*) は、細胞の主要な酸化防御システムの一つとして働くthioredoxin (*TRX*) の内因性の結合分子である。*TRX*は12 kDaのタンパク質で、ジスルフィド還元活性を有する。*TRX*は様々なストレス要因によって発現誘導され<sup>43)</sup>、単独で一重項酸素やヒドロキシルラジカルを消去する<sup>44)</sup>ほか、*TRX*依存性ペルオキシダーゼであるperoxiredoxinとの協調作用により、細胞内のROSを消去する内因性の抗酸化物質として働く<sup>45)</sup>。*TXNIP*の*TRX*への結合は、主に2つの作用を生じる。1つ目が*TRX*の酵素活性の減弱<sup>92)</sup>である。*TXNIP*は*TRX*の還元活性部位に直接結合し、その機能を阻害するため、*TRX*によるタンパクジスルフィド還元作用とROS除去活性が減弱することになる。2つ目が*TRX*からのASK1の遊離と活性化<sup>93)</sup>である。*TRX*はapoptosis signal-regulating kinase 1 (*ASK1*) と直接結合し、*ASK1*が活性体にコンフォメーション変化するのを阻害している。*ASK1*は活性化するとc-Jun N-terminal kinase (*JNK*) の活性化を起こす。*TXNIP*が*TRX*と結合することにより、*ASK1*が遊離型となり、結果的に*ASK1*依存性アポトーシスの誘発に繋がることになる。*TXNIP*と疾患の関係が近年注目されてきており、*TXNIP*の遺伝子・タンパク質レベルの上昇が、2型糖尿病<sup>48, 49)</sup>やAD<sup>50)</sup>、脳虚血再灌流における神経細胞死<sup>51)</sup>、心筋梗塞による心室リモデリング<sup>52)</sup>などを含むいくつかの疾患の原因因子になる可能性が証明されてきている。すなわち*Nob*は、*TXNIP*発現を抑制することによりこれら疾患の改善作用を示す可能性が考えられる。興味深いことに、近年、*TXNIP*はERストレス負荷により発現亢進することが臍島細胞腫由来細胞株INS-1を用いた実験により報告された<sup>46, 94, 95)</sup>。*Nob*は*ASNS*や*DDIT3*、*TRIB3*といったERストレスマーカーとなる遺伝子の発現を上昇させたことは前述のとおりであるが、*TXNIP*の遺伝子あるいはタンパク質発現は低下させた (Fig. 3, 4)。すなわち、ERストレス負荷との関係で考えると、これまでの報告とは相反する結果が得られたことになる。ERストレス負荷による*TXNIP*発現上昇は、ERストレス誘導性アポトーシスに促進的に働く<sup>46, 94, 95)</sup>ことから、*Nob*は実際にERストレスを負荷しているのか、またERストレス誘導性アポトーシスにはどのように影響するのか興味を持たれた。この点に関しては<第2章 SK-N-SH細胞での小胞体ストレス誘導性アポトーシスと細胞ストレス調節タンパク質*TXNIP*発現に対するノビレチンの作用>でさらに詳細に解析を行った。

以上、本章では*Nob*により3種細胞株で共通して発現上昇する遺伝子として5種 (*ASNS*、*DDIT3*、*SLC6A9*、*TMEM116*、*TRIB3*)、発現低下する遺伝子として7種 (*CCNA2*、

*CCNE2*、*DEPDC1*、*E2F8*、*HIST1H1B*、*KIF11*、*TXNIP*) を見出した。定量的RT-PCR法により*DDIT3*、*TRIB3*、*TXNIP*の発現について解析したところ、Nobにより有意に発現変動することが明らかとなった。さらにASNS、*DDIT3* (CHOP)、*TRIB3*、*TXNIP*のタンパク質発現もこれとほぼ一致して変動が認められた。このため、ERストレスとNobの関係については詳細な解析が必要である。3種細胞株におけるNobの細胞増殖抑制作用は、細胞周期を正に制御する*CCNA2*、*CCNE2*、*E2F8*の発現をNobが低下させることによると考えられた。がん/精巣抗原である*DEPDC1*、*E2F8*、*KIF11*の発現レベルの低下は、Nobのがん細胞増殖抑制作用に関与することが推察された。*SLC6A9*、*TMEM116*、*HIST1H1B*の発現変動の意義については不明な点が多く、既知のNobが改善作用を発揮すると期待されている疾患との関与を推定するには至らなかった。

## <第2章>

### SK-N-SH細胞での小胞体ストレス誘導性アポトーシスと

#### 細胞ストレス調節タンパク質TXNIP発現に対するノビレチンの作用

##### 2-1. 緒言

第1章の結果より、NobはASNS、DDIT3、TRIB3といったERストレスで発現亢進しアポトーシスに促進的に作用するとされる遺伝子の発現量を増加させることから、ERストレス負荷、さらにそれに引き続きアポトーシスを誘導している可能性が考えられた。しかしながら、ERストレス負荷により発現が亢進し、ERストレス誘発性アポトーシスに関与することが最近報告されたTXNIPの遺伝子・タンパク質発現をNobは顕著に減少させる結果が得られた。すなわち、Nobにより変動が認められたERストレス誘導性遺伝子のうち、TXNIP発現に対しては他の遺伝子変動と相反する結果がNob処理により得られた。ERストレスは神経疾患、糖尿病、非アルコール性肝障害、炎症性腸疾患など様々な疾患の発症・増悪化の要因となる<sup>96,97)</sup>ことから、NobがERストレスを負荷すれば有害作用発現につながる可能性もある。そこで本章では、NobがERストレスを起こしうるのか、またERストレス負荷時の細胞におけるNobの影響を明らかにすることを目的とした。神経細胞はERストレスに対して特に脆弱であり、またAD、パーキンソン病、筋委縮性側索硬化症（amyotrophic lateral sclerosis : ALS）、伝達性海綿状脳症、ポリグルタミン病などの神経変性疾患の病態とERストレスとの関与が示されている<sup>98)</sup>ことから、SK-N-SH細胞を神経細胞モデルとして用いることによりNobとERストレスの関係性を明確にできると考え、本章での実験はSK-N-SH細胞を使用し解析を行った。

##### 2-2. 実験材料

###### 1) 試薬

Tunicamycin (TM)、thapsigargin (TG) は Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) より購入した。Caspase-Glo® 3/7 assay は Promega (Madison, WI, USA) より購入した。Antioxidant Assay kit は Cayman Chemical Company (Ann Arbor, MI, USA) のものを使用した。なお、上記以外のその他の試薬は第1章に準じるものを使用した。

###### 2) 使用機器、器具等

PAGE 電気泳動には ATTO (Tokyo, Japan) の AE-6290E レゾルマックス・二連スラブ、電源装置として ATTO の CROSS POWER1000 を用いた。Caspase-Glo® 3/7 assay、Antioxidant assay には Beckman Coulter (Brea, CA, USA) の Multimode Detector DTX880 を測定に用いた。なお、上記以外のその他の試薬は第1章に準じるものを使用した。

### 3) 培養細胞

ER ストレスに対して特に脆弱である神経細胞モデルとして、家族性 AD の発症に関与する presenilin 1 の変異体を構成的に発現する SK-N-SH 細胞を用いた。基本的な培養方法等は第 1 章と同様に行った。

## 2-3. 実験方法

### 1) 試薬調製

Nob ストック溶液 (100 mM) は第 1 章と同様に調製した。TM は 1 mg/mL、TG は 0.05 mM となるように溶解し、これをストック溶液として -20°C で保存した。試薬刺激には室温に戻したストック溶液を用いた。なお、Nob、TM および TG の可溶化は溶媒として DMSO を用いた。

### 2) 試薬刺激

SK-N-SH 細胞を 24 時間前培養し、培養液を交換した。特に記載がない場合は、Nob が 100 μM、TM が 1 μg/mL、TG が 0.05 μM となるように Nob、TM、あるいは TG のストック溶液を直接ディッシュあるいはプレートに加えた。また、vehicle として DMSO が最終濃度 0.2% となるように刺激を行った。

### 3) 培養細胞からの RNA 抽出

基本的な操作は第 1 章と同様に行った。

### 4) RT 反応

基本的な操作は第 1 章と同様に行った。

### 5) PCR 法

基本的な操作は第 1 章と同様に行った。なお、使用したプライマーの塩基配列と反応条件を Table 4 に示した。

**Table 4 PCR に使用したプライマーの塩基配列と反応条件**

Gene (primer name)	Product size (bp)	Primer set	Reaction condition			
			Denaturation	Annealing	Elongation	
human <i>XBPI</i>	71, 97	Forward	5'-TGG CCG GGT CTG CTG AGT CCG -3'	95°C, 30 sec	55°C, 30 sec	72°C, 30 sec
		Reverse	5'-ATC CAT GGG GAG ATG TTC TGG-3'			

*XBPI* primer は spliced *XBPI* (*sXBPI*) と unspliced *XBPI* (*usXBPI*) の両方を認識する。

## 6) PAGE 電気泳動

25  $\mu\text{L}$  の PCR 反応溶液に dye [0.04% bromophenol blue, 0.04% xylene cyanol FF, 30% glycerol] を 15  $\mu\text{L}$  加えた後、そのうちの 20  $\mu\text{L}$  を 15% PAGE で電気泳動を行った。泳動終了後、0.2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の EtBr (Nippon Gene, Tokyo, Japan) とした 0.5 x TEB buffer (pH 8.2) で 30 分間染色を行った。紫外線照射下、CANON POWER SHOT G10 で写真撮影した。

## 7) 培養細胞からのタンパク質抽出

基本的な操作は第 1 章と同様に行った。

## 8) Western blotting

基本的な操作は第 1 章と同様に行った。Table 5 に使用した一次抗体を示した。

## 9) Caspase-Glo® 3/7 assay

Caspase-Glo® 3/7 assay の推奨プロトコルに準じて行った。具体的には、Caspase-Glo® Buffer を全量 Caspase-Glo® Substrate に加え、Caspase-Glo® Reagent を調製した。その後、96 穴プレートで培養・刺激を行った SK-N-SH 細胞に培養液と等量 (110  $\mu\text{L}$ ) の Caspase-Glo® Reagent を直接加え、細胞を溶解した。室温で 30 分間インキュベーションしたのち、発光量を Multimode Detector DTX880 で測定した。

## 10) Antioxidant assay

Antioxidant Assay Kit の推奨プロトコルに準じて行った。具体的には、試薬刺激後の培養液を除き PBS (-) で 2 回洗浄後、氷冷した 0.4 mL の RIPA buffer [1 x PBS (pH 7.4)、1% NP-40、0.5% sodium deoxycholate、0.1% SDS、PMSF、aprotinin、sodium orthovanadate、protease inhibitor cocktail] を 100 mm ディッシュに加え、4°C で 15 分間振盪した。その後セルスクレイパーで細胞を採取し、さらに 0.1 mL の RIPA buffer で dish を洗い、細胞を採取し、23G 注射針で DNA をせん断した。4°C で 1 時間転倒混和し、遠心 (4°C、10,000 x g、10 分間) しサンプルとした。96 穴プレートに各サンプルを 10  $\mu\text{L}$  ずつアプライし、そこに 10  $\mu\text{L}$  の Metmyoglobin、150  $\mu\text{L}$  の Chromogen、および 40  $\mu\text{L}$  の Hydrogen Peroxide を加え、30 秒間緩やかにボルテックスし、室温で 5 分間インキュベーションした。その後、405 nm で吸光度を測定した。吸光度の値から、サンプル 10  $\mu\text{L}$  に含まれる Trolox 換算抗酸化物質量を求め、タンパク質濃度で補正を行った値を細胞内抗酸化物質レベル (mM) とし、Veh 処理の値を 1 として算出した。

## 11) 統計解析

結果は平均値 + 標準偏差で表した。有意差検定には Dunnett's test および Tukey-Kramer's test を用い、有意水準  $p < 0.05$  を有意差ありとした。

**Table 5 Western blotting に使用した一次抗体**

1st antibody	M.W. (kDa)	免疫原	クローン	交差性	カタログ 番号	メーカー	希釈率
Asparagine synthetase (G-10)	64	Mouse	Monoclonal	H, M, R	sc-365809	Santa Cruz	10000
CHOP (L63F7) Mouse mAb	27	Mouse	Monoclonal	H, M, R	2895	Cell Signaling Technologies	2000
Anti-TRIB3 antibody [EPR3151Y]	40	Rabbit	Monoclonal	H	ab75846	Abcam	5000
Anti-Txnip/VDUP1	50	Mouse	Monoclonal	H, M, R	K0205-3	MBL	2000
eIF2 $\alpha$ Antibody	38	Rabbit	Polyclonal	H, M, R	9722	Cell Signaling Technologies	1000
Phospho-eIF2 $\alpha$ (Ser51) Antibody	38	Rabbit	Polyclonal	H, M, R	9721	Cell Signaling Technologies	1000
ATF-4 (D4B8) Rabbit mAb	49	Rabbit	Monoclonal	H, (M, R)	11815	Cell Signaling Technologies	1000
Anti-IRE1 antibody	110	Rabbit	Polyclonal	H, M, R	ab37073	Abcam	1000
Rabbit polyclonal to IRE1 (phospho S724)	110	Rabbit	Polyclonal	H, M, R	ab48187	Abcam	1000
BiP Antibody	78	Rabbit	Polyclonal	H, M, R	3183	Cell Signaling Technologies	2000
Caspase-3 (8G10) Rabbit mAb	17, 19, 35	Rabbit	Monoclonal	H, M, R	9665	Cell Signaling Technologies	1000
PARP Antibody	89, 116	Rabbit	Polyclonal	H, M, R	9542	Cell Signaling Technologies	2000
$\beta$ -Actin Antibody	45	Rabbit	Polyclonal	H, M, R	4967	Cell Signaling Technologies	5000
$\alpha$ -Tubulin Antibody	52	Rabbit	Polyclonal	H, M, R	2144	Cell Signaling Technologies	5000

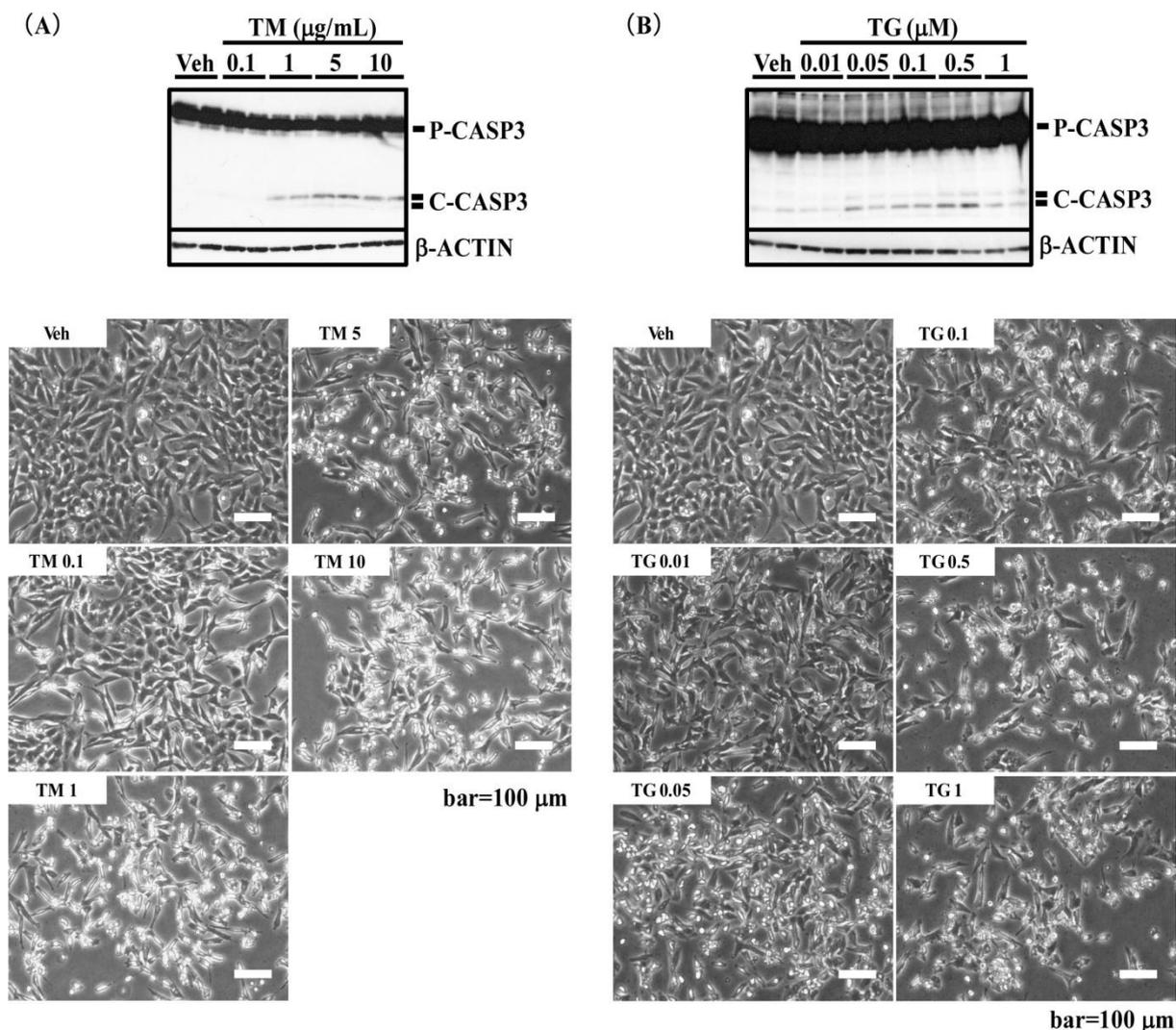
各一次抗体は上記の希釈率で用いた。なお、交差性においては H=human、M=mouse、R=rat を示す。括弧で示した交差性については、“反応する可能性がある”ことを示す。

## 2-4. 結果

### 1) SK-N-SH細胞に対する小胞体ストレス誘導薬の作用

過剰なERストレス負荷により、細胞はERストレス誘発性アポトーシスを生じる。SK-N-SH細胞にERストレス負荷を与えた際にERストレス誘導性アポトーシスが生じるのか明らかにするために、まずはERストレス誘導薬tunicamycin (TM) およびthapsigargin (TG) によるアポトーシス誘導性について解析した。SK-N-SH細胞に0.1から10  $\mu\text{g/mL}$ のTMあるいは0.01から1  $\mu\text{M}$ のTGを24時間処理し、Western blottingによ

りアポトーシスの指標としてcaspase-3の活性化 (cleaved caspase-3の生成) を解析した。TMでは1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ から、TGでは0.05  $\mu\text{M}$ から、cleaved caspase-3 (C-CASP3) の生成がはっきりと認められた (Fig. 8)。細胞形態も、TMでは1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、TGでは0.05  $\mu\text{M}$ からアポトーシスの特徴である丸く光りシャレ面から剥離しかけたアポトーシス様の形態変動が認められており、これはWestern blottingでC-CASP3の発現が認められた濃度と一致していた (Fig. 8)。



**Fig. 8 SK-N-SH 細胞での ER ストレス負荷によるアポトーシス誘導**

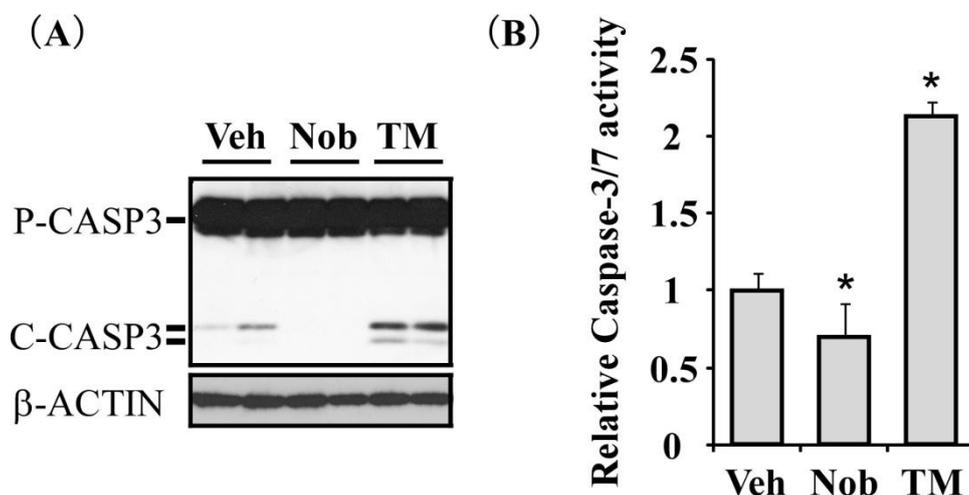
溶媒対照 (vehicle : Veh) として 0.1% DMSO および (A) 0.1~10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の TM、あるいは (B) 0.01~1  $\mu\text{M}$  の TG を 24 時間処理した SK-N-SH 細胞から抽出したタンパク質を用いて、Western blotting 法により caspase-3 および $\beta$ -ACTIN タンパク質発現量の変動について解析を行った (n=2)。なお、P-CASP3 は pro-caspase-3 を、C-CASP3 は cleaved caspase-3 を表す。下段には各刺激 24 時間での細胞形態写真を示す。

## 2) SK-N-SH 細胞でのノビレチンあるいはツニカマイシン処理によるアポトーシス誘導の解析

TMやTGによるERストレス負荷によりアポトーシス誘導が生じることがSK-N-SH細胞で明らかになった。TMとTG共にSK-N-SH細胞においてアポトーシス誘導が確認できたため、以降の実験では、ERストレス誘導薬としてTMを用いることにした。続いて、NobはSK-N-SH細胞のアポトーシス誘導を生じるのかを明らかにするために、TMによるアポトーシス誘導とNobの作用について比較を行った。SK-N-SH細胞に100  $\mu$ MのNobあるいは1  $\mu$ g/mLのTMを24時間処理し、Western blottingによりC-CASP3の生成について解析した結果 (Fig. 9A)、Nob処理ではC-CASP3の生成は認められなかったのに対し、TM処理ではC-CASP3の生成の亢進が認められた。加えて、caspase-3/7活性について測定した結果 (Fig. 9B)、Nob処理では有意な活性低下が、TM処理では有意な活性上昇が認められた。

## 3) SK-N-SH細胞でのノビレチンあるいはツニカマイシン処理によるアポトーシスおよび細胞形態の変化

SK-N-SH細胞へのNob処理ではC-CASP3の生成は認められなかった (Fig. 9A) ことから、NobはERストレス誘導性アポトーシスを生じないと考えられた。興味深いことに、Nob処理によりcaspase-3/7活性の有意な低下が認められた (Fig. 9B) ことから、Nobはむしろアポトーシスの抑制に寄与する可能性が考えられた。そこで、TM誘導



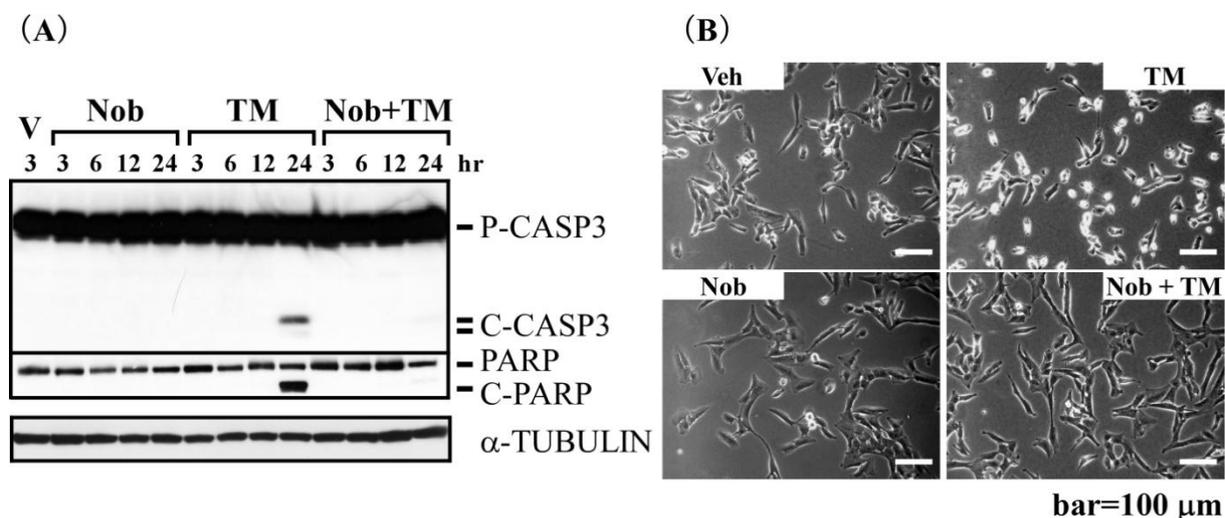
**Fig. 9** Nob および TM 刺激による C-CASP3 生成と caspase-3/7 活性の変化

(A) 溶媒対照 (vehicle : Veh) として0.2% DMSO、100  $\mu$ MのNob、1  $\mu$ g/mLのTMを24時間処理したSK-N-SH細胞から抽出したタンパク質を用いて、Western blotting法によりcaspase-3および $\beta$ -ACTINタンパク質発現量の変動について解析を行った (n=2)。なお、P-CASP3はpro-caspase-3を、C-CASP3はcleaved caspase-3を表す。(B) SK-N-SH細胞に溶媒対照 (Veh) として0.2% DMSO、100  $\mu$ MのNob、1  $\mu$ g/mLのTM処理を24時間行いcaspase-3/7活性を測定した (n=9)。値は平均値+標準偏差で示した。Dunnett's test, \* $p$ <0.01 vs. vehicle group.

性アポトーシスに対しNobがどのような影響を示すのか推測するために、SK-N-SH細胞に100  $\mu$ MのNob、および1  $\mu$ g/mLのTMを単独処理、あるいはNobとTMを同時処理（Nob+TM）することによるアポトーシス関連分子の発現変動についてWestern blottingにより解析したところ（Fig. 10A）、TM単独処理24時間で認められたC-CASP3の生成や、C-CASP3の基質であるpoly(ADP-ribose) polymerase（PARP）の切断（cleaved-PARP（C-PARP）の生成）は、NobとTMの同時処理では認められなかった。加えて、24時間処理の時点での細胞形態の変化について観察を行ったところ（Fig. 10B）、Veh処理と比較してTM処理では丸く光りシャーレ面から剥離しかけたアポトーシス様の形態変動細胞が認められた。一方、Nob単独処理やNobとTMの同時処理ではその様な形態的变化は認められなかった。

#### 4) SK-N-SH細胞でのノビレチンとツニカマイシンのUPR関連タンパク質の発現変動比較

NobとTMの同時処理ではTM単独処理で認められるC-CASP3の生成やC-PARPの生成は認められず、またアポトーシス様の形態変化を生じなかったこと（Fig. 10）から、NobとTMの同時処理ではアポトーシスは起こっていないと考えられた。NobとTMの同時処理でアポトーシスが認められない要因として、NobがTMによるUPRシグナル伝達を阻害している可能性を考えた。そこで、NobのUPRシグナルに対する影響を解析した。SK-N-SH細胞に100  $\mu$ MのNob、1  $\mu$ g/mLのTM、あるいは100  $\mu$ MのNobと



**Fig. 10 Nob および TM 刺激によるアポトーシス誘導と細胞形態の変化**

(A) 溶媒対照（vehicle : V）として0.2% DMSO、100  $\mu$ MのNob、1  $\mu$ g/mLのTM、あるいは100  $\mu$ MのNobと1  $\mu$ g/mLのTM同時処理（Nob+TM）を3～24時間行ったSK-N-SH細胞から抽出したタンパク質を用いて、Western blotting法により各種タンパク質発現量の変動について解析を行った。P-CASP3はpro-caspase-3を、C-CASP3はcleaved caspase-3（活性型）を、C-PARPはcleaved PARP（不活性型）を示す。(B) SK-N-SH細胞に溶媒対照（vehicle : Veh）として0.2% DMSO、100  $\mu$ MのNob、1  $\mu$ g/mLのTM、あるいは100  $\mu$ MのNobと1  $\mu$ g/mLのTMの同時処理（Nob+TM）を24時間行った際の細胞形態写真を示す。

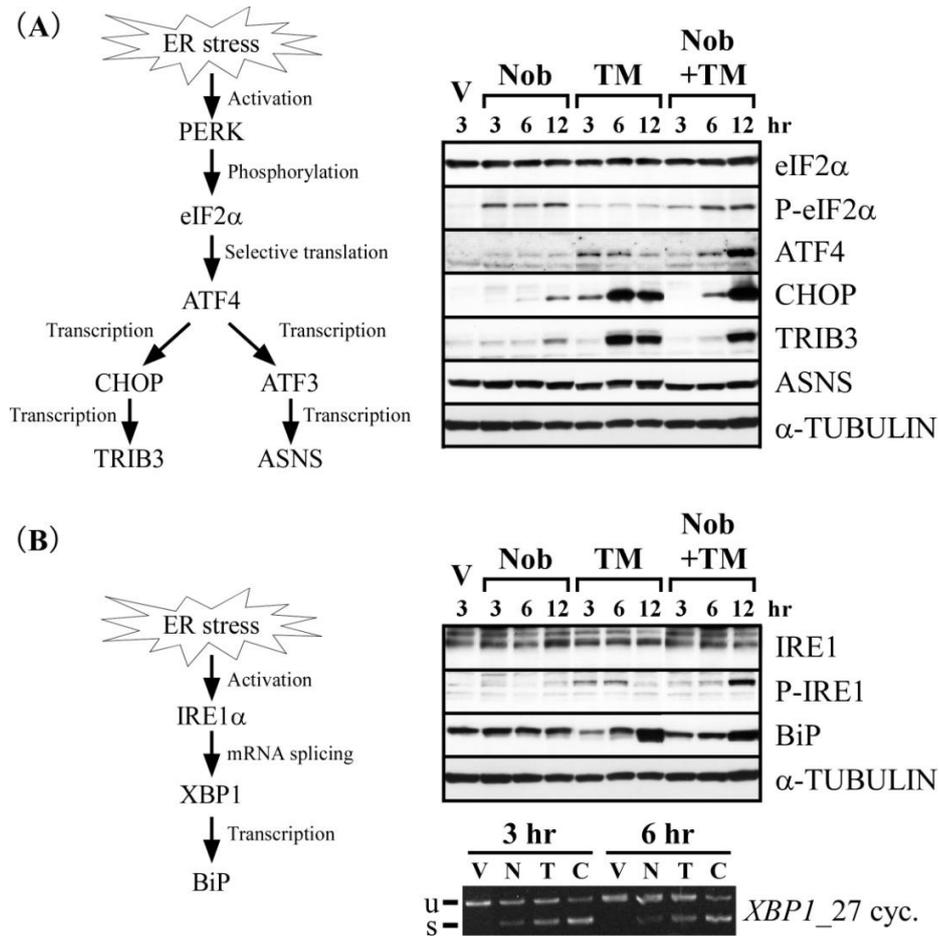
1 µg/mLのTMの同時処理 (Nob+TM) を3、6、12時間行い、Western blotting法によりUPRシグナル関連タンパク質の発現変動について解析を行った (Fig. 11)。

Protein kinase activated by double-stranded RNA-like ER kinase (PERK) 経路では (Fig. 11A)、Nob単独処理3~12時間で持続的なeukaryotic translational initiation factor 2α (eIF2α) のリン酸化、3~12時間でわずかではあるがATF4の発現上昇、また12時間でCHOPとTRIB3の明らかな発現上昇が認められた。ASNSについては3~12時間で持続的に弱い上昇が認められた。一方TM単独処理においては、3~12時間で弱いeIF2αのリン酸化、また3~12時間でATF4の発現上昇が認められた。CHOPについては、3時間から発現上昇が認められ、6~12時間でさらに発現が亢進した。TRIB3についても、CHOPと同様に6~12時間に顕著な発現亢進が認められた。ASNSについては12時間でわずかな上昇が認められた。Nob+TM処理では、6、12時間をピークとして、eIF2αリン酸化が亢進していた。またATF4は12時間で顕著な発現上昇が認められた。CHOPおよびTRIB3については6時間から発現が上昇し、12時間ではさらに発現亢進が認められた。ASNSについても、12時間にわずかな上昇がみられた。

Inositol-requiring enzyme 1α (IRE1α) 経路では (Fig. 11B)、6時間では認められないものの、Nob単独処理3および12時間ではわずかなIRE1αのリン酸化が認められた。加えて、XBP1の活性型であるspliced *XBP1* (s*XBP1*) の発現も3、6時間で認められた。しかしながら、BiPについては明確な発現変動が認められなかった。一方、TM単独処理については、3、6時間で強いIRE1αのリン酸化、s*XBP1*の発現が認められ、さらに12時間では顕著なBiPの発現誘導が引き起こっていた。Nob+TM処理では、特に12時間でのIRE1αのリン酸化の増加、加えて3、6時間でのs*XBP1*発現の増加が認められたが、BiPの発現についてはTM単独処理と同様の変動が認められた。

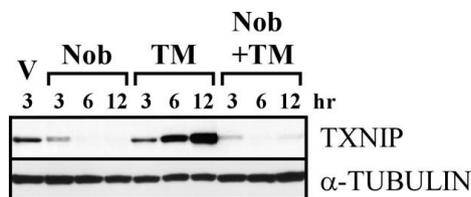
#### 5) SK-N-SH細胞でのノビレチンとツニカマイシンのTXNIPの発現変動比較

NobとTMの同時処理では、TM単独処理でのUPRシグナル伝達と比較して、PERK経路の遅延は認められたものの、UPRシグナルの活性化は起こっていた。すなわち、NobとTMの同時処理ではTM単独処理で認められたようなアポトーシスが起らない要因は、NobがTMのUPR活性化を阻害することではないと考えた。第1章において、NobはERストレス誘導性アポトーシスに促進的に作用するTXNIPの発現を顕著に抑制していたことから、NobとTMを同時処理することによりTM単独処理で認められたようなアポトーシスが起らないのは、NobがTXNIPの発現を抑制することが起因しているのではないかと推測した。そこで、NobとTMの同時処理でのTXNIPの発現レベルの変動についてWestern blottingにより解析を行った (Fig. 12)。TXNIPの発現については、Nob単独処理では3時間から顕著な発現低下が認められた。一方、TM単独処理では、6時間から強力に発現亢進していた。NobとTMの同時処理では、TM単独処理と比較してTXNIPの発現がいずれの時間においても抑制されていることが明らかとなった。



**Fig. 11 Nob および TM の UPR シグナルの比較**

溶媒対照 (vehicle : V) として0.2% DMSO、100  $\mu$ MのNob、1  $\mu$ g/mLのTM、あるいは100  $\mu$ MのNobと1  $\mu$ g/mLのTM同時処理 (Nob+TM) を3~12時間行ったSK-N-SH細胞から抽出したタンパク質を用いて、Western blotting法により各種タンパク質発現量の変動について解析を行った。(A) PERK経路によるタンパク質発現変動、(B) IRE1 $\alpha$ 経路によるタンパク質発現変動について示す。XBP1のPCR結果(27サイクル)における“u”は“unspliced XBP1”(不活性型)を、“s”は“spliced XBP1”(活性型)を表す。また、V : vehicle、N : 100  $\mu$ MのNob、T : 1 $\mu$ g/mLのTM、C : 100  $\mu$ MのNobと1  $\mu$ g/mLのTM同時処理とした。

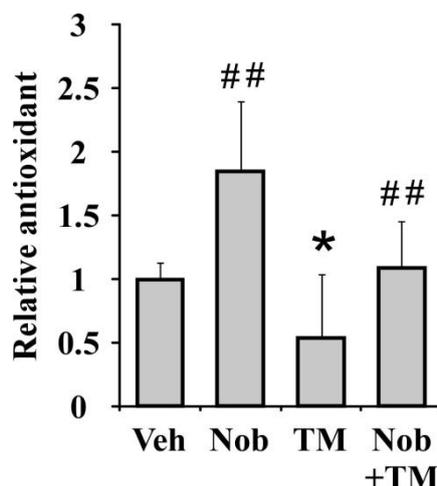


**Fig. 12 Nob および TM 処理による TXNIP の発現変動**

溶媒対照 (vehicle : V) として0.2% DMSO、100  $\mu$ MのNob、1  $\mu$ g/mLのTM、あるいは100  $\mu$ MのNobと1  $\mu$ g/mLのTM同時処理 (Nob+TM) を3~24時間行ったSK-N-SH細胞から抽出したタンパク質を用いて、Western blotting法により各タンパク質発現量の変動について解析を行った。

#### 6) ノビレチンおよびツニカマイシン処理による細胞内抗酸化物質レベルの変化

NobとTMの同時処理ではTM単独処理で認められるアポトーシスが起こらないのは、NobがTXNIPの発現を抑制することが重要である可能性が考えられた。TXNIPの発現上昇は細胞内抗酸化物質TRXの活性阻害につながり、細胞内のROS産生が増加する。そこで、TM単独処理時と比較して、NobとTMの同時処理ではTXNIPの発現抑制が抗酸化作用減弱の抑制に寄与しているのかを明らかにするために、NobあるいはTM処理による細胞内抗酸化物質レベルの変化について解析した (Fig. 13)。細胞内抗酸化物質レベルの測定は、2,2'-Azino-di-[3-ethylbenzthiazoline sulphonate] (ABTS) をMetmyoglobinによってABTS<sup>•+</sup>に酸化する反応を阻害する能力を測定し、水溶性のトコフェロール類似体であるTrolox等量 (mM) としてサンプルの抗酸化活性を評価した。細胞内抗酸化物質レベルはVeh処理と比較して、有意差は認められなかったものの、Nob単独処理では増加傾向が見られた。一方、TM単独処理では有意な減少が認められたが、NobとTMの同時処理ではVeh処理と同程度まで回復していることが明らかとなった。



**Fig. 13** Nob および TM 刺激による細胞内抗酸化物質レベルの変化

SK-N-SH 細胞に溶媒対照 (vehicle : Veh) として 0.2% DMSO、100  $\mu$ M の Nob、1  $\mu$ g/mL の TM、あるいは 100  $\mu$ M の Nob と 1  $\mu$ g/mL の TM 同時処理 (Nob+TM) を 24 時間行った。Antioxidant assay の結果より、Veh 処理に対する細胞内抗酸化物質レベルの比を示した (n=6)。Tukey-Kramer's test, \* $p$ <0.05 vs. vehicle group, ## $p$ <0.01 vs. TM-treatment group.

## 2-5. 考察

第1章において、NobはERストレス負荷により発現が上昇するASNS、CHOP (DDIT3)、TRIB3の遺伝子・タンパク質レベルを上昇させたことから、NobはERストレスを負荷し、ERストレス誘発性アポトーシスを起こす可能性が考えられた。そこで本章では、NobとERストレスの関係性を明らかにするために、ERストレス誘導薬をポジティブコントロールとして、SK-N-SH細胞でのNobのUPRシグナル関連タンパク質の変動とアポトーシス誘導について解析を行った。

### 1) ERストレス誘導薬TMおよびTGによるアポトーシス誘導について

長期的あるいは解消できないような過剰なERストレス負荷によりアポトーシス誘導が生じることが様々な細胞株を用いた実験で示されているが、SK-N-SH細胞でのERストレス誘導性アポトーシスについては報告されていなかった。まずは代表的なERストレス誘導薬として使用されているTMおよびTGの2種を選択し<sup>99)</sup>、SK-N-SH細胞におけるERストレス誘発性アポトーシス応答について解析を行った。TMはERでタンパク質高次構造形成と輸送に重要な役割を担っているN型糖鎖付加の第一段階に参与するGlcNAcリン酸転移酵素を阻害するため<sup>100)</sup>、タンパク質へのN型糖鎖付加が起これば、折りたたみ不全タンパク質がER内に蓄積し、結果的にERストレスを生じる<sup>101)</sup>。TGは小胞体カルシウムATPase (sarcoplasmic/endoplasmic reticulum  $Ca^{2+}$ -ATPase : SERCA) の機能を阻害するため、ER内にカルシウムイオンが取り込まれず細胞質の $Ca^{2+}$ が増加し、カルシウム恒常性が破綻することで、結果的にERストレスを生じる<sup>102, 103)</sup>。Western blottingの結果 (Fig. 8) より、1  $\mu$ g/mLのTMあるいは0.05  $\mu$ MのTGの24時間処理により、SK-N-SH細胞はアポトーシスを起こすことが明らかとなった。ERストレス負荷のメカニズムが異なる2種のERストレス誘導薬いずれにおいてもアポトーシス誘導が認められたため、以降の実験においてはERストレス誘導薬としてTMを用いることにした。

### 2) NobとTMのアポトーシス誘導とUPR関連タンパク質の発現変動比較について

TMをポジティブコントロールとしてNobのアポトーシス誘導作用について比較解析を行ったところ (Fig. 9)、興味深いことにNobはアポトーシスを誘導しないことが明らかとなった。またNob処理によりcaspase-3/7活性の有意な低下が認められたことから、むしろアポトーシスの抑制作用を示す可能性が推測された。実際にNobとTMを同時処理してみると (Fig. 10)、TM単独処理と比較してERストレス誘導性アポトーシスの減弱が認められた。この時のUPR関連タンパク質の発現変動について、以下のように考察した。

#### ・PERK経路について

ER内に折りたたみ不全タンパク質が蓄積すると、PERKはホモダイマーを形成し自己リン酸化され活性化する。活性化したPERKは、eIF2 $\alpha$ のSer51残基をリン酸化

する。リン酸化 eIF2 $\alpha$ の増加は、一般的には一時的な翻訳抑制を生じるが、eIF2 $\alpha$ がリン酸化され翻訳開始効率が低下すると、リボソームは ATF4 の mRNA の上流にある複数の短い open reading frame (ORF) では翻訳を開始せず、後方にある ORF まで到達できるようになり、ATF4 の mRNA 翻訳は増加する<sup>99,104</sup>。このため、ATF4 以下の下流シグナルは翻訳抑制の影響を受けずに伝達される (Fig. 11A)。

Nob 単独処理では、TM 単独処理と比較して CHOP や TRIB3 の発現レベルは低かった (Fig. 11A)。すなわち、Nob は UPR 活性化を介して ASNS、CHOP、あるいは TRIB3 の発現上昇を起こすが、その発現上昇は ER ストレス誘導性アポトーシスを生じるまでには至らないと考えられる。UPR シグナルは ER ストレスを解消するための適応反応でもあるため、Nob による PERK 経路の活性化はストレスへの適応を促進するために生じている可能性がある。ER ストレス阻害薬 salubrinal は、eIF2 $\alpha$ の脱リン酸化を阻害することにより、ER ストレス誘導性アポトーシスを抑制する<sup>105</sup>。Nob は CHOP や TRIB3 を発現誘導するにもかかわらずアポトーシス誘導を生じないのは、salubrinal のように Nob が eIF2 $\alpha$ のリン酸化を持続させることが一部関与している可能性も考えられる。

一方、Nob と TM の同時処理では、TM 単独処理と比較して CHOP の発現上昇の立ち上がりが遅れる傾向が認められた (Fig. 11A)。CHOP の発現上昇は ER ストレス誘導性アポトーシスにおいて最も重要であり<sup>56</sup>、また CHOP の発現上昇が最終的に eIF2 $\alpha$ による翻訳抑制を解除しアポトーシス促進性タンパク質の翻訳を可能にすることを考えると<sup>106</sup>、Nob と TM の同時処理では CHOP 発現が TM 単独処理と比較して遅延したことが、ER ストレス誘導性アポトーシスの抑制に関与している可能性がある。

#### ・IRE1 $\alpha$ 経路について

IRE1 $\alpha$ は3つのERストレスセンサーのうち進化の過程で最も古くから存在し、酵母からヒトまで保存されている<sup>107,108</sup>。ER内に折りたたみ不全タンパク質が蓄積すると、IRE1 $\alpha$ はホモダイマーを形成し、キナーゼ活性により自己リン酸化が起こる。続いて、IRE1 $\alpha$ のキナーゼ活性部位にATPあるいはADPが結合することで、エンドリボヌクレアーゼ活性化が起こり<sup>109</sup>、下流標的であるXBP1のmRNAから26 bpのスプライシングを行い、転写因子として活性を有するsXBP1を発現させる<sup>107,110</sup>。XBP1はBiPなどの分子シャペロンを発現誘導することから、XBP1の活性化はERストレスに適応するためにERの折りたたみ能力を増強する経路の1つであると考えられている<sup>111</sup>。

Nob単独処理では、IRE1 $\alpha$ のリン酸化はTM単独処理と比較して弱かった。またsXBP1の生成はNob処理3、6時間において認められるものの、BiPの発現誘導はいずれの時間においても認められないことから (Fig. 11B)、Nob単独処理で生成したsXBP1は、下流標的因子の転写活性化を促すまでには至らず、Nob単独処理では実質的なIRE1 $\alpha$ 経路の活性化は起こっていないと考えられた。

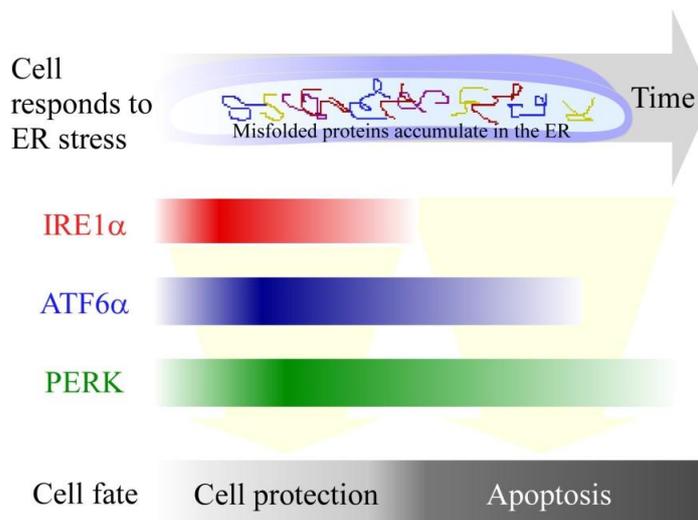
NobとTMの同時処理では、TM単独処理と比較してIRE1 $\alpha$ のリン酸化が持続してい

る様子が認められ、特に12時間では強いリン酸化が認められた (Fig. 11B)。NobとTMの同時処理でのsXBP1の生成はTM単独処理よりも増強している傾向が認められたが、BiPの発現はNobとTMの同時処理後12時間から明らかな発現上昇が認められており、TM単独処理と同程度の発現上昇であった (Fig. 11B)。すなわちNobとTMの同時処理では、TM単独処理と比べてIRE1 $\alpha$ 経路の活性化は持続するがBiPの発現上昇は同様の傾向を示すと考えられた。

#### ・ ATF6 $\alpha$ 経路について

ATF6 $\alpha$ はERに局在する膜貫通型のタンパク質であり、ER内に折りたたみ不全タンパク質が蓄積するとゴルジ体に移行し、Site 1 Protease (S1P) およびSite 2 Protease (S2P) によって50 kDaの細胞質ドメインが切り取られ、膜アンカーから遊離する<sup>112, 113</sup>)。この切断された50 kDaのATF6 $\alpha$  (cleaved ATF6 $\alpha$ ) は転写因子として機能し、XBP1やBiPの発現調節などを行っている<sup>114-116</sup>)。ATF6 $\alpha$ の活性化については、適切な検出系が確立できなかったために、今回の解析では結果を示していない。ATF6 $\alpha$ は、ERストレス負荷時におけるタンパク質の折りたたみ、分泌、分解を最適化し、ストレスからの回復やストレスに対する耐性を促進するために必要であるとされている。Nobの作用を明らかにする上で、ATF6 $\alpha$ 経路の関与も今後解析が必要である。

ERストレス負荷により通常は3つのERストレスセンサー (PERK、IRE1 $\alpha$ 、ATF6 $\alpha$ ) は全て活性化されるが、活性化が解除されるタイミングは異なる<sup>117, 118</sup>) (Fig. 14)。



**Fig. 14** 3つのERストレスセンサー活性化のタイミングと細胞の運命

(Lin et al., *Science*, 318(5852):944-949, 2007 : 文献<sup>118</sup>)参照)

ERストレスが生じると、細胞は3つのERストレスセンサーを介してUPRを活性化させる。3つのERストレスセンサーはERストレス負荷の時間に応じ、IRE1 $\alpha$ 、ATF6 $\alpha$ 、PERKの順に活性化解除が生じる。3つのERストレスセンサーの活性化状態のバランスにより、UPRは保護反応と細胞死反応の両方を起こす。細胞の生死の決定には、特にIRE1 $\alpha$ シグナルの減衰が重要であるとされている。

細胞にERストレス負荷がかかると、まずは全てのERストレスセンサーの活性化が起こり、翻訳抑制、ERのタンパク質折りたたみ能力の増強、折りたたみ不全タンパク質の除去といったストレスに適応するための細胞保護応答が起こる。これと同時に、CHOPの発現誘導も起こるが、この時点ではBiPのようなmRNAおよびタンパク質の半減期が相対的に長い分子が機能していることもあり<sup>119)</sup>、アポトーシス促進よりも細胞保護応答の方が優勢となる。細胞にとって保護的なUPR応答が認められるこの時期は、ストレスに対処するためにERの機能を再調節する重要なタイミングである。もし恒常性の再構築がうまくいかなければ、IRE1 $\alpha$ シグナルと、それに引き続いてATF6 $\alpha$ シグナルが減衰し、細胞は最終的にアポトーシスを誘導し消滅する。それゆえ、持続的なERストレスによるIRE1 $\alpha$ シグナルの減衰はUPR誘導後の細胞の生死を決定する重要なステップであると考えられている<sup>118)</sup>。

NobはわずかにERストレスを生じるが、PERK経路による一時的な翻訳抑制のみで適応できる程度の軽度のストレスであり、NobによるCHOP発現上昇は、eIF2 $\alpha$ による翻訳抑制を解除しERの恒常性を再構築するための機構なのではないかと予想される。つまり、Fig. 14に従って考えると、Nob処理での細胞は「Cell protection」の状態であると予想される。

また、NobとTMの同時処理での細胞はTM単独処理と比較して持続的なIRE1 $\alpha$ の活性化が認められたこと、さらにTM単独処理と比較してCHOP発現上昇の遅延が認められたことから、Fig. 14で示す「Cell protection」の期間が延長されている可能性が考えられた。

なお、3つのストレスセンサーによるUPRのシグナル経路は、実際にはクロストークしている。例えばCHOPの発現誘導にはPERK経路の活性化が必須ではあるが<sup>120, 121)</sup>、最大限のCHOPの発現誘導を起こすためには、ATF6 $\alpha$ 経路やIRE1 $\alpha$ 経路の活性化も必要であるとされている<sup>69)</sup>。このようにERストレス応答分子の発現は複雑な制御を受けており、UPRシグナル伝達のクロストークについてはまだ不明な点が多いのが現状である。しかしながら、ERストレス負荷が生じると3つのERストレスセンサーは全て活性化することから、NobとTMの同時処理でもTM単独処理と同様にUPRの活性化は生じていると考えられる。加えて、SK-N-SH細胞に100  $\mu$ MのNobを24時間前処理した後、1  $\mu$ g/mLのTMを24時間処理した場合も、TM単独処理時と同様にCHOPの上昇が認められる結果を得ている（データ省略）ことから、NobがUPRシグナル伝達の阻害に寄与する可能性は低いと考えられる。すなわち、TM単独処理と比較し、NobとTMの同時処理ではアポトーシス誘導の抑制が認められたのは、UPRシグナル以外の別の因子による影響であることが推測された。

### 3) NobとTMのTXNIP発現変動について

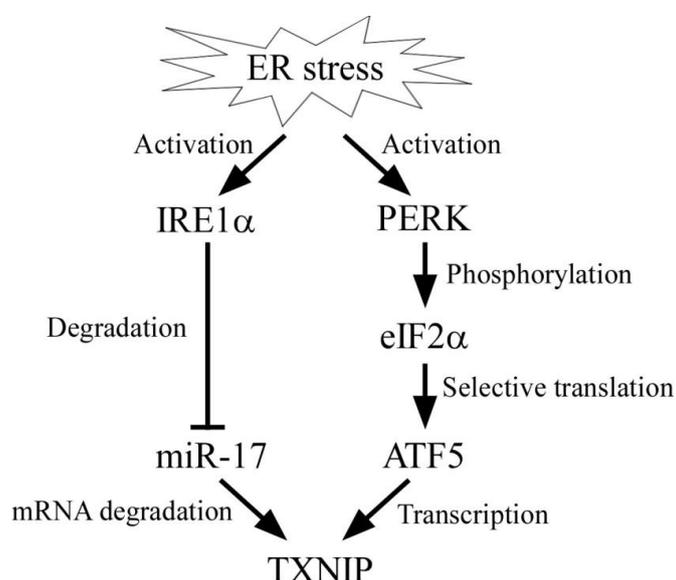
続いて、第1章において3種細胞株でNobにより変動した遺伝子の中から、Nobのアポトーシス抑制作用に関与する遺伝子を推測した。NobはERストレス誘導性ア

ポトーシスに促進的に作用する TXNIP の発現を顕著に抑制していたことから、Nob の TXNIP 発現抑制作用に注目した。

これまでの報告より、ラット膵島腫細胞株 INS-1 において、ER ストレス負荷により IRE1 $\alpha$ あるいは PERK 経路を介して TXNIP 発現が亢進すること、また TXNIP 発現上昇が ER ストレス誘導性アポトーシスに重要であることが示されている<sup>46, 94, 95</sup>)。ER ストレスによる TXNIP 発現上昇は、Fig. 15 に示した経路の関与が INS-1 細胞において報告されているが、SK-N-SH 細胞においても、INS-1 と同様に ER ストレス負荷により TXNIP の顕著な発現亢進が認められた (Fig. 13)。このことから、SK-N-SH 細胞においても ER ストレス誘導性 TXNIP 発現上昇は Fig. 15 の経路によって制御されている可能性が考えられた。

SK-N-SH 細胞への Nob 単独処理では顕著な TXNIP 発現抑制が認められた (Fig. 13)。Nob は PERK 経路をわずかに活性化することから (Fig. 11A)、本来ならば TXNIP の発現は上昇することが予想された。ATF5 の mRNA 発現量については、マイクロアレイ解析および PCR 法による解析の結果から、Nob 処理により変動しないことを SK-N-SH 細胞で確認している (データ省略)。また Nob 処理では IRE1 $\alpha$ 経路の活性化はほとんど認められないことから (Fig. 11A)、Nob は UPR とは独立した他の経路・分子に作用することによって TXNIP の発現を抑制している可能性が考えられる。

Nob と TM の同時処理では、TM 単独処理で認められた TXNIP の顕著な発現亢進が明らかに抑制されていた (Fig. 13)。Nob と TM の同時処理についても、実際には PERK 経路も IRE1 $\alpha$ 経路も活性化が認められるため (Fig. 11)、ER ストレス負荷により



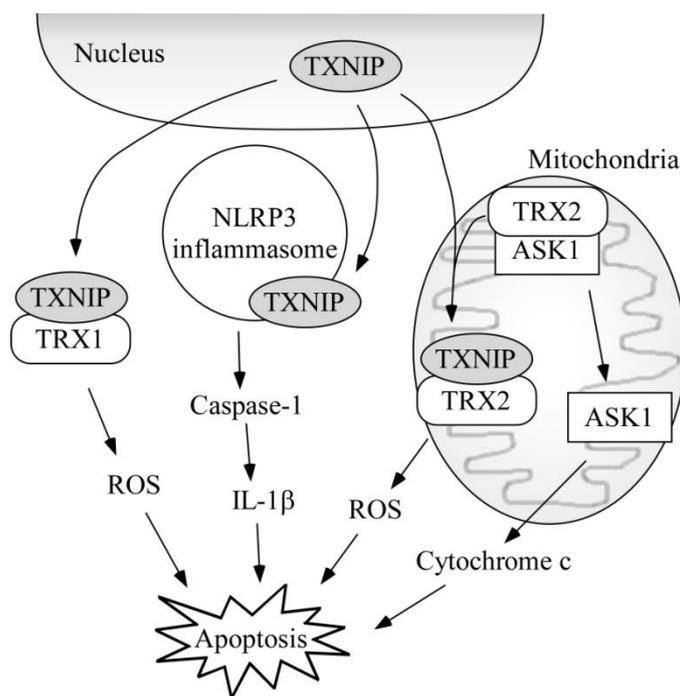
**Fig. 15 ER ストレスによる TXNIP 発現上昇シグナル**

INS-1 細胞における ER ストレス負荷による TXNIP 発現上昇には、PERK と IRE1 $\alpha$ の経路が関与することが報告されている。miR-17 は micro RNA-17 のことを表す。

TXNIP の発現は上昇することが予想された。しかしながら、Nob による UPR を介さない TXNIP 発現抑制作用が相対的に強く現れるため、Nob と TM の同時処理では TM 単独処理と比較して TXNIP の発現抑制が認められた可能性が考えられる。ER ストレス負荷による TXNIP 発現上昇は、細胞のアポトーシスに繋がることから (Fig. 16)、Nob 単独処理あるいは Nob と TM の同時処理で UPR の活性化が認められるにも関わらず、アポトーシスに至らないのは TXNIP の発現を顕著に低下させることが重要である可能性が考えられた。

#### 4) NobおよびTM処理による細胞内抗酸化物質レベルの変化について

TXNIP は内因性抗酸化分子 TRX の還元活性部位に直接結合し、その機能を阻害するため<sup>92,93)</sup>、TXNIP の発現上昇は ROS の産生増加に繋がる。しかしながら、生体内には TRX システム以外にも ROS に対抗する抗酸化システムが多数存在しており、様々な抗酸化物質同士が協調的に作用することで、ROS による傷害への保護作用が増強すると考えられている。そこで、Nob あるいは TM 処理による細胞内抗酸化物質レベルの変化について解析し、TXNIP 発現変動による ROS レベルへの影響について推測を行った (Fig. 13)。



**Fig. 16 TXNIP 発現上昇によるアポトーシス誘発メカニズム**

TXNIP は細胞質において TRX1 と結合し、その活性を阻害することで ROS 産生を増加させる (左)。TXNIP が NLRP3 に結合することにより、NLRP3 inflammasome が活性化し、caspase-1 の活性化を介して IL-1β の成熟を促進させる (中央)。TXNIP はミトコンドリア局在性の TRX2 と結合することで ASK1 を遊離させる (右)。これらの経路は、最終的に細胞のアポトーシスを誘導する。

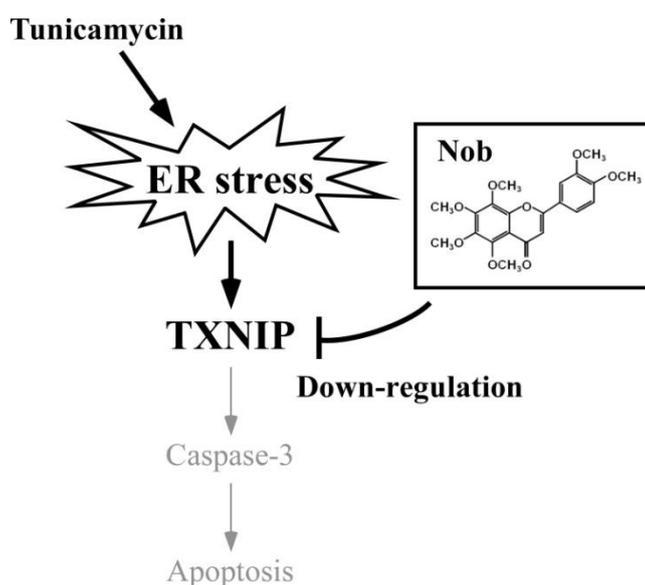
TM単独処理ではVeh処理群と比較して、細胞内抗酸化物質レベルの有意な減少が認められていた。すなわち、TM単独処理ではTXNIP発現上昇によるTRX活性低下により、細胞内ROS産生が増加し、最終的にアポトーシスを引き起こしている可能性が考えられる。

Nob単独処理では有意ではないものの、Veh処理と比較して細胞内抗酸化物質レベルは上昇する傾向が認められた。すなわち、Nob処理によるTXNIP発現低下により、ROS産生は減少した可能性がある。

NobとTMの同時処理では、TM単独処理で認められた細胞内抗酸化物質レベルの低下はVeh処理レベルまで回復した。すなわち、NobとTMの同時処理により、TM処理によるTXNIP発現上昇作用よりもNobによるTXNIP発現抑制作用が相対的に強く現れるため、TRX活性が維持されることでROS産生が抑制され、アポトーシスが起こらなかった可能性が考えられる。

UPRにより解消できないレベルでの長期的なERストレス負荷は、神経疾患、糖尿病、動脈硬化、腎疾患など様々な疾患の発症・増悪化に重要な要因として近年認識されてきている<sup>96)</sup>。中でも、神経細胞はERストレスに対して特に脆弱であり、AD、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症（amyotrophic lateral sclerosis : ALS）、伝達性海綿状脳症、ポリグルタミン病などの神経変性疾患の病態とERストレスとの関与が示されている<sup>98)</sup>。グルタミン酸によるERストレス負荷によりマウス海馬でTXNIPが発現上昇することや<sup>122)</sup>、ラットの中大脳動脈閉塞術による局所脳虚血モデル<sup>123)</sup>、5 x FADマウスやD-galactose投与ラットといったADモデル動物の海馬でTXNIP発現が上昇していること<sup>50, 124)</sup>、また、マウス神経芽細胞腫株Neuro2aをAD患者の脳で発現増加しA $\beta$ の沈着を促進するadvanced glycation endproducts (AGEs)<sup>125-127)</sup>で処理するとTXNIPの発現が顕著に亢進すること<sup>128)</sup>などが報告されている。これらのことから、これまで報告されているNobの疾患改善作用は、TXNIP発現を抑制することに起因しているのではないかと予想された。実際に、TXNIPノックアウトマウスの臍島細胞ではTM誘発性アポトーシスが顕著に抑制されることや<sup>94)</sup>、ヒト白血病T細胞株Jurkatでのセラミド誘発性ERストレスによるアポトーシスがTXNIPのノックダウンにより抑制されること<sup>129)</sup>が報告されている。さらに最近、多くの天然物（例えば、ilexgenin A、mangiferin、quercetin、luteolin、epigallocatechin gallate、astragaloside IV、curcumin）がERストレス誘発性TXNIP発現上昇とアポトーシスを抑制することが培養細胞を用いた実験により明らかにされていることから<sup>122, 130-133)</sup>、本研究で認められたNobによるERストレス誘発性アポトーシスの抑制作用も、これら天然物と同様に、TXNIP発現を顕著に抑制することが重要であると考えられた。

以上の結果をまとめると、SK-N-SH細胞への100  $\mu$ MのNobの24時間処理では、軽度のERストレス負荷がかかりCHOPやTRIB3などの発現上昇が弱く認められるものの、アポトーシスを誘導するまでは至らないことが明らかとなった。また100  $\mu$ MのNobと1 $\mu$ g/mLのTMの同時処理では、TM単独処理で認められたアポトーシスが起こらなかった。TM単独処理で認められるアポトーシスがNobとTMの同時処理で認められないのは、Nobによる細胞ストレス調節タンパク質TXNIPの発現抑制が密接に関与する可能性が考えられ、NobはTXNIP発現を顕著に抑制することによりTMによるROS産生を制御し、アポトーシスを抑制する可能性が考えられた。本章で得られた知見を基にしたNobの作用機構の仮説をFig. 17に示す。



**Fig. 17 NobによるERストレス誘発性アポトーシス抑制機構の仮説**

SK-N-SH細胞にTM処理をしERストレス負荷を誘導すると、TXNIP発現の顕著な亢進を伴って、細胞はアポトーシスを生じる。NobはTXNIP発現を顕著に抑制することにより、TRX活性の回復、ROS産生抑制、またASK1の遊離活性化阻害を引き起こし、アポトーシスを抑制していると考えられる。

## <総括>

Nob は、病態モデル動物や培養細胞を用いたこれまでの研究の成果から、AD を含む認知症、がん、生活習慣病や動脈硬化といった様々な疾患に対して改善作用を発揮するものと期待されている。そこで本研究では、Nob をヒト疾患の治療や予防に応用するために、まだ明確になっていない Nob の薬効発現機序と有害作用の有無を明らかにすることを最終的な目的として以下の研究を行った。

Nob 処理により変動する遺伝子を検索し、それら遺伝子産物の機能から薬効発現機序や有害作用を推定できるものと考え、第 1 章では、Nob 処理を行った培養細胞における遺伝子発現変化を評価した。異なる組織由来の複数の細胞株を用いた DNA マイクロアレイ法による網羅的遺伝子発現解析を行い、それらで共通に発現変動する遺伝子を探索した。ヒト神経芽細胞腫株 SK-N-SH 細胞、ヒト肝がん細胞株 HuH-7 細胞およびラット線維芽細胞株 3Y1 細胞を用いた解析の結果、対照群に対して 2 倍以上または 0.5 倍以下の発現変動を示し、また raw signal が 20 以上の遺伝子として、発現上昇する 5 遺伝子 (*ASNS*、*DDIT3*、*SLC6A9*、*TMEM116*、*TRIB3*)、発現低下する 7 遺伝子 (*CCNA2*、*CCNE2*、*DEPDC1*、*E2F8*、*HIST1H1B*、*KIF11*、*TXNIP*) を見出した。このうち、*ASNS*、*DDIT3*、*TRIB3* は ER ストレス負荷により発現が上昇し、これらの遺伝子産物は ER ストレス誘導性アポトーシスに促進的に働く。すなわち、Nob は ER ストレス誘導性アポトーシスを起こす可能性が考えられた。

そこで第 2 章では、ER ストレスと Nob の関係性について SK-N-SH 細胞をモデル細胞として解析した。その結果、Nob はアポトーシス誘導を起こさず、むしろアポトーシスを抑制する可能性が考えられたため、続いて ER ストレス誘導薬 TM と Nob を同時処理しアポトーシス誘導の変化について解析を行った。その結果、TM 単独処理では明らかなアポトーシス誘導が認められたのに対し、Nob と TM の同時処理では TM 単独処理と比べてアポトーシスが認められなかった。Nob により、発現低下した遺伝子の 1 つである *TXNIP* (*thioredoxin-interacting protein*) の遺伝子産物 TXNIP は、細胞の主要な酸化防御システムの 1 つとして働く TRX の内因性阻害分子であり、その発現量はヒトの 2 型糖尿病や AD モデルマウスで増加することが近年報告されている。さらに、種々疾患の発症・増悪化と関係する細胞ストレスである ER ストレスによって TXNIP 発現が顕著に上昇し、ER ストレス誘発性アポトーシスが生じる。したがって、Nob の様々な疾患改善作用発現には、TXNIP 発現抑制が深く関わっている可能性が考えられた。TM 単独処理では顕著な TXNIP 発現亢進が起こり、Nob と TM の同時処理では TM 単独処理と比較して TXNIP 発現上昇の抑制が認められたことから、Nob と TM 同時処理による ER ストレス誘導性アポトーシスの減弱は、TXNIP 発現の抑制に起因する可能性が考えられた。

以上、本研究において、Nob は *TXNIP* の発現を顕著に低下させ、細胞死や機能障害を抑制することで、AD や糖尿病といった ER ストレス関連疾患の改善作用発現を示

す可能性が考えられた。本研究成果は、TXNIP 発現調節を基盤とした ER ストレス関連疾患治療薬シーズの探索や、Nob を含む天然由来成分の機能性食品や医薬品開発への応用につながることを期待される。

## <謝辞>

本研究を遂行するにあたり、終始御懇篤なるご指導、ご鞭撻を賜りました本学大学院 薬食生命科学総合学府 衛生分子毒性学教室 教授 吉成 浩一 先生に心より御礼申し上げます。

本論文を御精読いただくとともに、貴重な御助言を賜りました、本学大学院 薬食生命科学総合学府 医薬生命科学教室 教授 奥 直人 先生、薬理学教室 教授 石川 智久 先生、統合生理学教室 准教授 海野 けい子 先生に心より感謝いたします。

本研究を遂行するにあたり、直接ご指導、ならびに数々の御助言を賜りました東邦大学 薬学部 公衆衛生学教室 教授 根本 清光 先生に御礼申し上げます。

また、本研究成果は、本学 衛生分子毒性学分野所属である、薬学部薬学科 6 年生 大村 花菜 氏、高橋 智香 氏、5 年生 若月 綾乃 氏のご協力を得てまとめあげられたものであり、深く感謝いたします。

さらに、研究を遂行する上で、数々の御助言を賜りました、本学 薬学部 衛生分子毒性学教室 元教授 出川 雅邦 先生、麻布大学 生命・環境科学部 衛生学研究室 教授 高木 邦明 先生、麻布大学 生命・環境科学部 環境衛生学研究室 准教授 関本 征史 先生、本学大学院 薬食生命科学総合学府 衛生分子毒性学教室 講師 佐々木 崇光 先生、同助教 保坂 卓臣 先生、東邦大学 薬学部 公衆衛生学 講師 菅野 裕一朗 先生、衛生分子毒性学教室員の皆様ならびに諸先輩方、東邦大学 薬学部 公衆衛生学教室員の皆様に感謝いたします。

本研究に際し、多大なるご支援をいただいた本学大学院 薬食生命科学総合学府 客員教授およびノビレチン研究開発コンソーシアムの代表者であります 大泉 康 先生に厚く御礼申し上げます。

本研究で用いたノビレチンの供与を賜りました東京薬科大学 薬学部漢方資源応用学教室 教授 三巻 祥浩 先生、同講師 横須賀 章人 先生に心より感謝いたします。

最後になりますが、これからの衛生分子毒性学教室の益々の発展と、皆様方のご健勝を祈念いたします。

## <参考文献>

- 1) Mak NK, Wong-Leung YL, Chan SC, Wen J, Leung KN, Fung MC: Isolation of anti-leukemia compounds from *Citrus reticulata*. *Life Sci*, **58**, 1269–1276 (1996).
- 2) Nogata Y, Sakamoto K, Shiratsuchi H, Ishii T, Yano M, Ohta H: Flavonoid composition of fruit tissues of citrus species. *Biosci Biotechnol Biochem*, **70**, 178–192 (2006).
- 3) Hardy J, Selkoe DJ: The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science*, **297**, 353–356 (2002).
- 4) Matsuzaki K, Yamakuni T, Hashimoto M, Haque AM, Shido O, Mimaki Y, Sashida Y, Ohizumi Y: Nobiletin restoring beta-amyloid-impaired CREB phosphorylation rescues memory deterioration in Alzheimer's disease model rats. *Neurosci Lett*, **400**, 230–234 (2006).
- 5) Onozuka H, Nakajima A, Matsuzaki K, Shin RW, Ogino K, Saigusa D, Tetsu N, Yokosuka A, Sashida Y, Mimaki Y, Yamakuni T, Ohizumi Y: Nobiletin, a citrus flavonoid, improves memory impairment and Abeta pathology in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J Pharmacol Exp Ther*, **326**, 739–744 (2008).
- 6) Mishizen-Eberz AJ, Rissman RA, Carter TL, Ikonovic MD, Wolfe BB, Armstrong DM: Biochemical and molecular studies of NMDA receptor subunits NR1/2A/2B in hippocampal subregions throughout progression of Alzheimer's disease pathology. *Neurobiol Dis*, **15**, 80–92 (2004).
- 7) Nakajima A, Yamakuni T, Matsuzaki K, Nakata N, Onozuka H, Yokosuka A, Sashida Y, Mimaki Y, Ohizumi Y: Nobiletin, a citrus flavonoid, reverses learning impairment associated with N-methyl-D-aspartate receptor antagonism by activation of extracellular signal-regulated kinase signaling. *J Pharmacol Exp Ther*, **321**, 784–790 (2007).
- 8) Hozumi S, Nakagawasai O, Tan-No K, Nijima F, Yamadera F, Murata A, Arai Y, Yasuhara H, Tadano T: Characteristics of changes in cholinergic function and impairment of learning and memory-related behavior induced by olfactory bulbectomy. *Behav Brain Res*, **138**, 9–15 (2003).
- 9) Yamamoto T, Jin J, Watanabe S: Characteristics of memory dysfunction in olfactory bulbectomized rats and the effects of cholinergic drugs. *Behav Brain Res*, **83**, 57–62 (1997).
- 10) Nagase H, Omae N, Omori A, Nakagawasai O, Tadano T, Yokosuka A, Sashida Y, Mimaki Y, Yamakuni T, Ohizumi Y: Nobiletin and its related flavonoids with CRE-dependent transcription-stimulating and neuritegenic activities. *Biochem Biophys Res Commun*, **337**, 1330–1336 (2005).
- 11) Nakajima A, Yamakuni T, Haraguchi M, Omae N, Song S-Y, Kato C, Nakagawasai O, Tadano T, Yokosuka A, Mimaki Y, Sashida Y, Ohizumi Y: Nobiletin, a Citrus Flavonoid That Improves Memory Impairment, Rescues Bulbectomy-Induced Cholinergic Neurodegeneration in Mice. *J Pharmacol Sci*, **105**, 122–126 (2007).
- 12) Sagare AP, Bell RD, Zlokovic BV: Neurovascular dysfunction and faulty amyloid beta-peptide clearance in Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med*, **2**, (2012).
- 13) Yamamoto Y, Shioda N, Han F, Moriguchi S, Nakajima A, Yokosuka A, Mimaki Y, Sashida Y, Yamakuni

- T, Ohizumi Y, Fukunaga K: Nobiletin improves brain ischemia-induced learning and memory deficits through stimulation of CaMKII and CREB phosphorylation. *Brain Res*, **1295**, 218–229 (2009).
- 14) Nagase H, Yamakuni T, Matsuzaki K, Maruyama Y, Kasahara J, Hinohara Y, Kondo S, Mimaki Y, Sashida Y, Tank AW, Fukunaga K, Ohizumi Y: Mechanism of neurotrophic action of nobiletin in PC12D cells. *Biochemistry*, **44**, 13683–13691 (2005).
  - 15) Steinmetz KA, Potter JD: Vegetables, fruit, and cancer. I. Epidemiology. *Cancer Causes Control*, **2**, 325–357 (1991).
  - 16) Murakami A, Nakamura Y, Torikai K, Tanaka T, Koshiba T, Koshimizu K, Kuwahara S, Takahashi Y, Ogawa K, Yano M, Tokuda H, Nishino H, Mimaki Y, Sashida Y, Kitanaka S, Ohigashi H: Inhibitory effect of citrus nobiletin on phorbol ester-induced skin inflammation, oxidative stress, and tumor promotion in mice. *Cancer Res*, **60**, 5059–5066 (2000).
  - 17) Iwase Y, Takemura Y, Ju-ichi M, Yano M, Ito C, Furukawa H, Mukainaka T, Kuchide M, Tokuda H, Nishino H: Cancer chemopreventive activity of 3,5,6,7,8,3',4'-heptamethoxyflavone from the peel of citrus plants. *Cancer Lett*, **163**, 7–9 (2001).
  - 18) Nishino H, Tokuda H, Satomi Y, Masuda M, Osaka Y, Yogosawa S, Wada S, Mou XY, Takayasu J, Murakoshi M, Jinnno K, Yano M: Cancer prevention by antioxidants. *Biofactors*, **22**, 57–61 (2004).
  - 19) Muller D, Quantin B, Gesnel MC, Millon-Collard R, Abecassis J, Breathnach R: The collagenase gene family in humans consists of at least four members. *Biochem J*, **253**, 187–192 (1988).
  - 20) Sato T, Koike L, Miyata Y, Hirata M, Mimaki Y, Sashida Y, Yano M, Ito A: Inhibition of activator protein-1 binding activity and phosphatidylinositol 3-kinase pathway by nobiletin, a polymethoxy flavonoid, results in augmentation of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 production and suppression of production of matrix metalloproteinases-1 and -9 in human fibrosarcoma HT-1080 cells. *Cancer Res*, **62**, 1025–1029 (2002).
  - 21) Kunimasa K, Ikekita M, Sato M, Ohta T, Yamori Y, Ikeda M, Kuranuki S, Oikawa T: Nobiletin, a citrus polymethoxyflavonoid, suppresses multiple angiogenesis-related endothelial cell functions and angiogenesis in vivo. *Cancer Sci*, **101**, 2462–2469 (2010).
  - 22) Rooprai HK, Kandaneeratchi A, Maidment SL, Christidou M, Trillo-Pazos G, Dexter DT, Rucklidge GJ, Widmer W, Pilkington GJ: Evaluation of the effects of swainsonine, captopril, tangeretin and nobiletin on the biological behaviour of brain tumour cells in vitro. *Neuropathol Appl Neurobiol*, **27**, 29–39 (2001).
  - 23) Minagawa A, Otani Y, Kubota T, Wada N, Furukawa T, Kumai K, Kameyama K, Okada Y, Fujii M, Yano M, Sato T, Ito A, Kitajima M: The citrus flavonoid, nobiletin, inhibits peritoneal dissemination of human gastric carcinoma in SCID mice. *Jpn J Cancer Res*, **92**, 1322–1328 (2001).
  - 24) Tang M, Ogawa K, Asamoto M, Hokaiwado N, Seeni A, Suzuki S, Takahashi S, Tanaka T, Ichikawa K, Shirai T: Protective effects of citrus nobiletin and auraptene in transgenic rats developing adenocarcinoma of the prostate (TRAP) and human prostate carcinoma cells. *Cancer Sci*, **98**, 471–477 (2007).
  - 25) Tang MX, Ogawa K, Asamoto M, Chewonarin T, Suzuki S, Tanaka T, Shirai T: Effects of nobiletin on

- PhIP-induced prostate and colon carcinogenesis in F344 rats. *Nutr Cancer*, **63**, 227–233 (2011).
- 26) Miyamoto S, Yasui Y, Ohigashi H, Tanaka T, Murakami A: Dietary flavonoids suppress azoxymethane-induced colonic preneoplastic lesions in male C57BL/KsJ-db/db mice. *Chem Biol Interact*, **183**, 276–283 (2010).
- 27) Ohnishi H, Asamoto M, Tujimura K, Hokaiwado N, Takahashi S, Ogawa K, Kuribayashi M, Ogiso T, Okuyama H, Shirai T: Inhibition of cell proliferation by nobiletin, a dietary phytochemical, associated with apoptosis and characteristic gene expression, but lack of effect on early rat hepatocarcinogenesis in vivo. *Cancer Sci*, **95**, 936–942 (2004).
- 28) Lee YC, Cheng TH, Lee JS, Chen JH, Liao YC, Fong Y, Wu CH, Shih YW: Nobiletin, a citrus flavonoid, suppresses invasion and migration involving FAK/PI3K/Akt and small GTPase signals in human gastric adenocarcinoma AGS cells. *Mol Cell Biochem*, **347**, 103–115 (2011).
- 29) Mulvihill EE, Assini JM, Lee JK, Allister EM, Sutherland BG, Koppes JB, Sawyez CG, Edwards JY, Telford DE, Charbonneau A, St-Pierre P, Marette A, Huff MW: Nobiletin attenuates VLDL overproduction, dyslipidemia, and atherosclerosis in mice with diet-induced insulin resistance. *Diabetes*, **60**, 1446–1457 (2011).
- 30) Lin Y, Vermeer MA, Bos W, van Buren L, Schuurbijs E, Miret-Catalan S, Trautwein EA: Molecular structures of citrus flavonoids determine their effects on lipid metabolism in HepG2 cells by primarily suppressing apoB secretion. *J Agric Food Chem*, **59**, 4496–4503 (2011).
- 31) Eguchi A, Murakami A, Ohigashi H: Nobiletin, a citrus flavonoid, suppresses phorbol ester-induced expression of multiple scavenger receptor genes in THP-1 human monocytic cells. *FEBS Lett*, **580**, 3321–3328 (2006).
- 32) Kanda K, Nishi K, Kadota A, Nishimoto S, Liu MC, Sugahara T: Nobiletin suppresses adipocyte differentiation of 3T3-L1 cells by an insulin and IBMX mixture induction. *Biochim Biophys Acta*, **1820**, 461–468 (2012).
- 33) Miyata Y, Tanaka H, Shimada A, Sato T, Ito A, Yamanouchi T, Kosano H: Regulation of adipocytokine secretion and adipocyte hypertrophy by polymethoxyflavonoids, nobiletin and tangeretin. *Life Sci*, **88**, 613–618 (2011).
- 34) Kunimasa K, Kuranuki S, Matsuura N, Iwasaki N, Ikeda M, Ito A, Sashida Y, Mimaki Y, Yano M, Sato M, Igarashi Y, Oikawa T: Identification of nobiletin, a polymethoxyflavonoid, as an enhancer of adiponectin secretion. *Bioorg Med Chem Lett*, **19**, 2062–2064 (2009).
- 35) Lee YS, Cha BY, Saito K, Yamakawa H, Choi SS, Yamaguchi K, Yonezawa T, Teruya T, Nagai K, Woo JT: Nobiletin improves hyperglycemia and insulin resistance in obese diabetic ob/ob mice. *Biochem Pharmacol*, **79**, 1674–1683 (2010).
- 36) Lee YS, Cha BY, Choi SS, Choi BK, Yonezawa T, Teruya T, Nagai K, Woo JT: Nobiletin improves obesity and insulin resistance in high-fat diet-induced obese mice. *J Nutr Biochem*, **24**, 156–162 (2013).
- 37) Sawa Y, Ueki T, Hata M, Iwasawa K, Tsuruga E, Kojima H, Ishikawa H, Yoshida S: LPS-induced IL-6, IL-8, VCAM-1, and ICAM-1 expression in human lymphatic endothelium. *J Histochem Cytochem*, **56**,

- 97–109 (2008).
- 38) Choi SY, Hwang JH, Ko HC, Park JG, Kim SJ: Nobiletin from citrus fruit peel inhibits the DNA-binding activity of NF- $\kappa$ B and ROS production in LPS-activated RAW 264.7 cells. *J Ethnopharmacol*, **113**, 149–155 (2007).
- 39) Lin N, Sato T, Takayama Y, Mimaki Y, Sashida Y, Yano M, Ito A: Novel anti-inflammatory actions of nobiletin, a citrus polymethoxy flavonoid, on human synovial fibroblasts and mouse macrophages. *Biochem Pharmacol*, **65**, 2065–2071 (2003).
- 40) Tanaka S, Sato T, Akimoto N, Yano M, Ito A: Prevention of UVB-induced photoinflammation and photoaging by a polymethoxy flavonoid, nobiletin, in human keratinocytes in vivo and in vitro. *Biochem Pharmacol*, **68**, 433–439 (2004).
- 41) Watanabe R, Nakamura H, Masutani H, Yodoi J: Anti-oxidative, anti-cancer and anti-inflammatory actions by thioredoxin 1 and thioredoxin-binding protein-2. *Pharmacol Ther*, **127**, 261–270 (2010).
- 42) Zhou J, Yu Q, Chng WJ: TXNIP (VDUP-1, TBP-2): a major redox regulator commonly suppressed in cancer by epigenetic mechanisms. *Int J Biochem Cell Biol*, **43**, 1668–1673 (2011).
- 43) Nakamura H, Nakamura K, Yodoi J: Redox regulation of cellular activation. *Annu Rev Immunol*, **15**, 351–369 (1997).
- 44) Das KC, Das CK: Thioredoxin, a singlet oxygen quencher and hydroxyl radical scavenger: redox independent functions. *Biochem Biophys Res Commun*, **277**, 443–447 (2000).
- 45) Tamura T, Stadtman TC: A new selenoprotein from human lung adenocarcinoma cells: purification, properties, and thioredoxin reductase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 1006–1011 (1996).
- 46) Osowski CM, Hara T, O'Sullivan-Murphy B, Kanekura K, Lu S, Hara M, Ishigaki S, Zhu LJ, Hayashi E, Hui ST, Greiner D, Kaufman RJ, Bortell R, Urano F: Thioredoxin-interacting protein mediates ER stress-induced beta cell death through initiation of the inflammasome. *Cell Metab*, **16**, 265–273 (2012).
- 47) Junn E, Han SH, Im JY, Yang Y, Cho EW, Um HD, Kim DK, Lee KW, Han PL, Rhee SG, Choi I: Vitamin D3 up-regulated protein 1 mediates oxidative stress via suppressing the thioredoxin function. *J Immunol*, **164**, 6287–6295 (2000).
- 48) Masutani H, Yoshihara E, Masaki S, Chen Z, Yodoi J: Thioredoxin binding protein (TBP)-2/Txnip and  $\alpha$ -arrestin proteins in cancer and diabetes mellitus. *J Clin Biochem Nutr*, **50**, 23–34 (2012).
- 49) Chutkan WA, Birkenfeld AL, Brown JD, Lee HY, Frederick DW, Yoshioka J, Patwari P, Kursawe R, Cushman SW, Plutzky J, Shulman GI, Samuel VT, Lee RT: Deletion of the alpha-arrestin protein Txnip in mice promotes adiposity and adipogenesis while preserving insulin sensitivity. *Diabetes*, **59**, 1424–1434 (2010).
- 50) Perrone L, Sbai O, Nawroth PP, Bierhaus A: The Complexity of Sporadic Alzheimer's Disease Pathogenesis: The Role of RAGE as Therapeutic Target to Promote Neuroprotection by Inhibiting Neurovascular Dysfunction. *Int J Alzheimers Dis*, **2012**, 734956 (2012).
- 51) Kim GS, Jung JE, Narasimhan P, Sakata H, Chan PH: Induction of thioredoxin-interacting protein is mediated by oxidative stress, calcium, and glucose after brain injury in mice. *Neurobiol Dis*, **46**,

- 440–449 (2012).
- 52) Adluri RS, Thirunavukkarasu M, Zhan L, Akita Y, Samuel SM, Otani H, Ho YS, Maulik G, Maulik N: Thioredoxin 1 enhances neovascularization and reduces ventricular remodeling during chronic myocardial infarction: a study using thioredoxin 1 transgenic mice. *J Mol Cell Cardiol*, **50**, 239–247 (2011).
  - 53) Yoshimizu N, Otani Y, Saikawa Y, Kubota T, Yoshida M, Furukawa T, Kumai K, Kameyama K, Fujii M, Yano M, Sato T, Ito A, Kitajima M: Anti-tumour effects of nobiletin, a citrus flavonoid, on gastric cancer include: antiproliferative effects, induction of apoptosis and cell cycle deregulation. *Aliment Pharmacol Ther*, **20 Suppl 1**, 95–101 (2004).
  - 54) Luo G, Guan X, Zhou L: Apoptotic effect of citrus fruit extract nobiletin on lung cancer cell line A549 in vitro and in vivo. *Cancer Biol Ther*, **7**, 966–973 (2008).
  - 55) Nakayama GR, Caton MC, Nova MP, Parandoosh Z: Assessment of the Alamar Blue assay for cellular growth and viability in vitro. *J Immunol Methods*, **204**, 205–208 (1997).
  - 56) Oyadomari S, Mori M: Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress. *Cell Death Differ*, **11**, 381–389 (2004).
  - 57) Jakobsen CH, Storvold GL, Bremseth H, Follestad T, Sand K, Mack M, Olsen KS, Lundemo AG, Iversen JG, Krokan HE, Schonberg SA: DHA induces ER stress and growth arrest in human colon cancer cells: associations with cholesterol and calcium homeostasis. *J Lipid Res*, **49**, 2089–2100 (2008).
  - 58) Tabas I, Ron D: Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress. *Nat Cell Biol*, **13**, 184–190 (2011).
  - 59) Osowski CM, Urano F: Measuring ER stress and the unfolded protein response using mammalian tissue culture system. *Methods Enzymol*, **490**, 71–92 (2011).
  - 60) Kim I, Xu W, Reed JC: Cell death and endoplasmic reticulum stress: disease relevance and therapeutic opportunities. *Nat Rev Drug Discov*, **7**, 1013–1030 (2008).
  - 61) Ferri KF, Kroemer G: Organelle-specific initiation of cell death pathways. *Nat Cell Biol*, **3**, E255–263 (2001).
  - 62) Urano F, Wang X, Bertolotti A, Zhang Y, Chung P, Harding HP, Ron D: Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1. *Science*, **287**, 664–666 (2000).
  - 63) Richards NG, Schuster SM: Mechanistic issues in asparagine synthetase catalysis. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol*, **72**, 145–198 (1998).
  - 64) Arfin SM, Simpson DR, Chiang CS, Andrulis IL, Hatfield GW: A role for asparaginyl-tRNA in the regulation of asparagine synthetase in a mammalian cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **74**, 2367–2369 (1977).
  - 65) Barbosa-Tessmann IP, Pineda VL, Nick HS, Schuster SM, Kilberg MS: Transcriptional regulation of the human asparagine synthetase gene by carbohydrate availability. *Biochem J*, **339 ( Pt 1)**, 151–158 (1999).

- 66) Barbosa-Tessmann IP, Chen C, Zhong C, Schuster SM, Nick HS, Kilberg MS: Activation of the unfolded protein response pathway induces human asparagine synthetase gene expression. *J Biol Chem*, **274**, 31139–31144 (1999).
- 67) Kilberg MS, Barbosa-Tessmann IP: Genomic sequences necessary for transcriptional activation by amino acid deprivation of mammalian cells. *J Nutr*, **132**, 1801–1804 (2002).
- 68) Ron D, Habener JF: CHOP, a novel developmentally regulated nuclear protein that dimerizes with transcription factors C/EBP and LAP and functions as a dominant-negative inhibitor of gene transcription. *Genes Dev*, **6**, 439–453 (1992).
- 69) Okada T, Yoshida H, Akazawa R, Negishi M, Mori K: Distinct roles of activating transcription factor 6 (ATF6) and double-stranded RNA-activated protein kinase-like endoplasmic reticulum kinase (PERK) in transcription during the mammalian unfolded protein response. *Biochem J*, **366**, 585–594 (2002).
- 70) Gotoh T, Terada K, Oyadomari S, Mori M: hsp70–DnaJ chaperone pair prevents nitric oxide- and CHOP-induced apoptosis by inhibiting translocation of Bax to mitochondria. *Cell Death Differ*, **11**, 390–402 (2004).
- 71) McCullough KD, Martindale JL, Klotz LO, Aw TY, Holbrook NJ: Gadd153 sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress by down-regulating Bcl2 and perturbing the cellular redox state. *Mol Cell Biol*, **21**, 1249–1259 (2001).
- 72) Puthalakath H, O'Reilly LA, Gunn P, Lee L, Kelly PN, Huntington ND, Hughes PD, Michalak EM, McKimm-Breschkin J, Motoyama N, Gotoh T, Akira S, Bouillet P, Strasser A: ER stress triggers apoptosis by activating BH3-only protein Bim. *Cell*, **129**, 1337–1349 (2007).
- 73) Ciccaglione AR, Marcantonio C, Tritarelli E, Equestre M, Vendittelli F, Costantino A, Geraci A, Rapicetta M: Activation of the ER stress gene gadd153 by hepatitis C virus sensitizes cells to oxidant injury. *Virus Res*, **126**, 128–138 (2007).
- 74) Li G, Mongillo M, Chin KT, Harding H, Ron D, Marks AR, Tabas I: Role of ERO1- $\alpha$ -mediated stimulation of inositol 1,4,5-triphosphate receptor activity in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *J Cell Biol*, **186**, 783–792 (2009).
- 75) Seimon TA, Obstfeld A, Moore KJ, Golenbock DT, Tabas I: Combinatorial pattern recognition receptor signaling alters the balance of life and death in macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 19794–19799 (2006).
- 76) Du K, Herzig S, Kulkarni RN, Montminy M: TRB3: a tribbles homolog that inhibits Akt/PKB activation by insulin in liver. *Science*, **300**, 1574–1577 (2003).
- 77) Ohoka N, Yoshii S, Hattori T, Onozaki K, Hayashi H: TRB3, a novel ER stress-inducible gene, is induced via ATF4-CHOP pathway and is involved in cell death. *EMBO J*, **24**, 1243–1255 (2005).
- 78) Zheng Q, Hirose Y, Yoshimi N, Murakami A, Koshimizu K, Ohigashi H, Sakata K, Matsumoto Y, Sayama Y, Mori H: Further investigation of the modifying effect of various chemopreventive agents on apoptosis and cell proliferation in human colon cancer cells. *J Cancer Res Clin Oncol*, **128**, 539–546 (2002).
- 79) Yang CR, Svensson KA: Allosteric modulation of NMDA receptor via elevation of brain glycine and

- D-serine: the therapeutic potentials for schizophrenia. *Pharmacol Ther*, **120**, 317–332 (2008).
- 80) Dubroqua S, Serrano L, Boison D, Feldon J, Gargiulo PA, Yee BK: Intact working memory in the absence of forebrain neuronal glycine transporter 1. *Behav Brain Res*, **230**, 208–214 (2012).
- 81) Wrzesinski T, Szelag M, Cieslikowski WA, Ida A, Giles R, Zodro E, Szumska J, Pozniak J, Kwias Z, Bluysen HA, Wesoly J: Expression of pre-selected TMEMs with predicted ER localization as potential classifiers of ccRCC tumors. *BMC Cancer*, **15**, 518 (2015).
- 82) Frank CL, Tsai LH: Alternative functions of core cell cycle regulators in neuronal migration, neuronal maturation, and synaptic plasticity. *Neuron*, **62**, 312–326 (2009).
- 83) Morley KL, Ferguson PJ, Koropatnick J: Tangeretin and nobletin induce G1 cell cycle arrest but not apoptosis in human breast and colon cancer cells. *Cancer Lett*, **251**, 168–178 (2007).
- 84) Okayama H, Kohno T, Ishii Y, Shimada Y, Shiraishi K, Iwakawa R, Furuta K, Tsuta K, Shibata T, Yamamoto S, Watanabe S, Sakamoto H, Kumamoto K, Takenoshita S, Gotoh N, Mizuno H, Sarai A, Kawano S, Yamaguchi R, Miyano S, Yokota J: Identification of genes upregulated in ALK-positive and EGFR/KRAS/ALK-negative lung adenocarcinomas. *Cancer Res*, **72**, 100–111 (2012).
- 85) Kanehira M, Harada Y, Takata R, Shuin T, Miki T, Fujioka T, Nakamura Y, Katagiri T: Involvement of upregulation of DEPDC1 (DEP domain containing 1) in bladder carcinogenesis. *Oncogene*, **26**, 6448–6455 (2007).
- 86) Harada Y, Kanehira M, Fujisawa Y, Takata R, Shuin T, Miki T, Fujioka T, Nakamura Y, Katagiri T: Cell-permeable peptide DEPDC1-ZNF224 interferes with transcriptional repression and oncogenicity in bladder cancer cells. *Cancer Res*, **70**, 5829–5839 (2010).
- 87) Deng Q, Wang Q, Zong WY, Zheng DL, Wen YX, Wang KS, Teng XM, Zhang X, Huang J, Han ZG: E2F8 contributes to human hepatocellular carcinoma via regulating cell proliferation. *Cancer Res*, **70**, 782–791 (2010).
- 88) Misteli T, Gunjan A, Hock R, Bustin M, Brown DT: Dynamic binding of histone H1 to chromatin in living cells. *Nature*, **408**, 877–881 (2000).
- 89) Blangy A, Lane HA, d'Herin P, Harper M, Kress M, Nigg EA: Phosphorylation by p34cdc2 regulates spindle association of human Eg5, a kinesin-related motor essential for bipolar spindle formation in vivo. *Cell*, **83**, 1159–1169 (1995).
- 90) Mayer TU, Kapoor TM, Haggarty SJ, King RW, Schreiber SL, Mitchison TJ: Small molecule inhibitor of mitotic spindle bipolarity identified in a phenotype-based screen. *Science*, **286**, 971–974 (1999).
- 91) Rath O, Kozielski F: Kinesins and cancer. *Nat Rev Cancer*, **12**, 527–539 (2012).
- 92) Yoshihara E, Chen Z, Matsuo Y, Masutani H, Yodoi J: Thiol redox transitions by thioredoxin and thioredoxin-binding protein-2 in cell signaling. *Methods Enzymol*, **474**, 67–82 (2010).
- 93) Liu H, Nishitoh H, Ichijo H, Kyriakis JM: Activation of apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) by tumor necrosis factor receptor-associated factor 2 requires prior dissociation of the ASK1 inhibitor thioredoxin. *Mol Cell Biol*, **20**, 2198–2208 (2000).
- 94) Lerner AG, Upton JP, Praveen PV, Ghosh R, Nakagawa Y, Igarria A, Shen S, Nguyen V, Backes BJ, Heiman M, Heintz N, Greengard P, Hui S, Tang Q, Trusina A, Oakes SA, Papa FR: IRE1alpha induces

- thioredoxin-interacting protein to activate the NLRP3 inflammasome and promote programmed cell death under irremediable ER stress. *Cell Metab*, **16**, 250–264 (2012).
- 95) Anthony TG, Wek RC: TXNIP switches tracks toward a terminal UPR. *Cell Metab*, **16**, 135–137 (2012).
- 96) Kaufman RJ: Orchestrating the unfolded protein response in health and disease. *J Clin Invest*, **110**, 1389–1398 (2002).
- 97) Cao SS, Kaufman RJ: Endoplasmic reticulum stress and oxidative stress in cell fate decision and human disease. *Antioxid Redox Signal*, **21**, 396–413 (2014).
- 98) Lindholm D, Wootz H, Korhonen L: ER stress and neurodegenerative diseases. *Cell Death Differ*, **13**, 385–392 (2006).
- 99) Schroder M, Kaufman RJ: The mammalian unfolded protein response. *Annu Rev Biochem*, **74**, 739–789 (2005).
- 100) Heifetz A, Keenan RW, Elbein AD: Mechanism of action of tunicamycin on the UDP-GlcNAc:dolichyl-phosphate GlcNAc-1-phosphate transferase. *Biochemistry*, **18**, 2186–2192 (1979).
- 101) Schonthal AH: Endoplasmic reticulum stress: its role in disease and novel prospects for therapy. *Scientifica (Cairo)*, **2012**, 857516 (2012).
- 102) Treiman M, Caspersen C, Christensen SB: A tool coming of age: thapsigargin as an inhibitor of sarco-endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPases. *Trends Pharmacol Sci*, **19**, 131–135 (1998).
- 103) Winther AM, Liu H, Sonntag Y, Olesen C, le Maire M, Soehoel H, Olsen CE, Christensen SB, Nissen P, Moller JV: Critical roles of hydrophobicity and orientation of side chains for inactivation of sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase with thapsigargin and thapsigargin analogs. *J Biol Chem*, **285**, 28883–28892 (2010).
- 104) Ma Y, Hendershot LM: Herp is dually regulated by both the endoplasmic reticulum stress-specific branch of the unfolded protein response and a branch that is shared with other cellular stress pathways. *J Biol Chem*, **279**, 13792–13799 (2004).
- 105) Boyce M, Bryant KF, Jousse C, Long K, Harding HP, Scheuner D, Kaufman RJ, Ma D, Coen DM, Ron D, Yuan J: A selective inhibitor of eIF2 $\alpha$  dephosphorylation protects cells from ER stress. *Science*, **307**, 935–939 (2005).
- 106) Novoa I, Zeng H, Harding HP, Ron D: Feedback inhibition of the unfolded protein response by GADD34-mediated dephosphorylation of eIF2 $\alpha$ . *J Cell Biol*, **153**, 1011–1022 (2001).
- 107) Calton M, Zeng H, Urano F, Till JH, Hubbard SR, Harding HP, Clark SG, Ron D: IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA. *Nature*, **415**, 92–96 (2002).
- 108) Patil C, Walter P: Intracellular signaling from the endoplasmic reticulum to the nucleus: the unfolded protein response in yeast and mammals. *Curr Opin Cell Biol*, **13**, 349–355 (2001).
- 109) Papa FR, Zhang C, Shokat K, Walter P: Bypassing a kinase activity with an ATP-competitive drug. *Science*, **302**, 1533–1537 (2003).
- 110) Yoshida H, Matsui T, Yamamoto A, Okada T, Mori K: XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by

- IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. *Cell*, **107**, 881–891 (2001).
- 111) Lee AH, Iwakoshi NN, Glimcher LH: XBP-1 regulates a subset of endoplasmic reticulum resident chaperone genes in the unfolded protein response. *Mol Cell Biol*, **23**, 7448–7459 (2003).
- 112) Haze K, Yoshida H, Yanagi H, Yura T, Mori K: Mammalian transcription factor ATF6 is synthesized as a transmembrane protein and activated by proteolysis in response to endoplasmic reticulum stress. *Mol Biol Cell*, **10**, 3787–3799 (1999).
- 113) Ye J, Rawson RB, Komuro R, Chen X, Dave UP, Prywes R, Brown MS, Goldstein JL: ER stress induces cleavage of membrane-bound ATF6 by the same proteases that process SREBPs. *Mol Cell*, **6**, 1355–1364 (2000).
- 114) Wu J, Rutkowski DT, Dubois M, Swathirajan J, Saunders T, Wang J, Song B, Yau GD, Kaufman RJ: ATF6alpha optimizes long-term endoplasmic reticulum function to protect cells from chronic stress. *Dev Cell*, **13**, 351–364 (2007).
- 115) Yamamoto K, Sato T, Matsui T, Sato M, Okada T, Yoshida H, Harada A, Mori K: Transcriptional induction of mammalian ER quality control proteins is mediated by single or combined action of ATF6alpha and XBP1. *Dev Cell*, **13**, 365–376 (2007).
- 116) Bommasamy H, Back SH, Fagone P, Lee K, Meshinchi S, Vink E, Sriburi R, Frank M, Jackowski S, Kaufman RJ, Brewer JW: ATF6alpha induces XBP1-independent expansion of the endoplasmic reticulum. *J Cell Sci*, **122**, 1626–1636 (2009).
- 117) DuRose JB, Tam AB, Niwa M: Intrinsic capacities of molecular sensors of the unfolded protein response to sense alternate forms of endoplasmic reticulum stress. *Mol Biol Cell*, **17**, 3095–3107 (2006).
- 118) Lin JH, Li H, Yasumura D, Cohen HR, Zhang C, Panning B, Shokat KM, Lavail MM, Walter P: IRE1 signaling affects cell fate during the unfolded protein response. *Science*, **318**, 944–949 (2007).
- 119) Rutkowski DT, Arnold SM, Miller CN, Wu J, Li J, Gunnison KM, Mori K, Sadighi Akha AA, Raden D, Kaufman RJ: Adaptation to ER stress is mediated by differential stabilities of pro-survival and pro-apoptotic mRNAs and proteins. *PLoS Biol*, **4**, e374 (2006).
- 120) Scheuner D, Song B, McEwen E, Liu C, Laybutt R, Gillespie P, Saunders T, Bonner-Weir S, Kaufman RJ: Translational control is required for the unfolded protein response and in vivo glucose homeostasis. *Mol Cell*, **7**, 1165–1176 (2001).
- 121) Harding HP, Novoa I, Zhang Y, Zeng H, Wek R, Schapira M, Ron D: Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. *Mol Cell*, **6**, 1099–1108 (2000).
- 122) Li Y, Li J, Li S, Li Y, Wang X, Liu B, Fu Q, Ma S: Curcumin attenuates glutamate neurotoxicity in the hippocampus by suppression of ER stress-associated TXNIP/NLRP3 inflammasome activation in a manner dependent on AMPK. *Toxicol Appl Pharmacol*, (2015).
- 123) Wang X, Li R, Wang X, Fu Q, Ma S: Umbelliferone ameliorates cerebral ischemia-reperfusion injury via upregulating the PPAR gamma expression and suppressing TXNIP/NLRP3 inflammasome. *Neurosci Lett*, (2015).

- 124) Gao J, He H, Jiang W, Chang X, Zhu L, Luo F, Zhou R, Ma C, Yan T: Salidroside ameliorates cognitive impairment in a d-galactose-induced rat model of Alzheimer's disease. *Behav Brain Res*, **293**, 27–33 (2015).
- 125) Loske C, Gerdemann A, Schepl W, Wycislo M, Schinzel R, Palm D, Riederer P, Munch G: Transition metal-mediated glycooxidation accelerates cross-linking of beta-amyloid peptide. *Eur J Biochem*, **267**, 4171–4178 (2000).
- 126) Vitek MP, Bhattacharya K, Glendening JM, Stopa E, Vlassara H, Bucala R, Manogue K, Cerami A: Advanced glycation end products contribute to amyloidosis in Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 4766–4770 (1994).
- 127) Guglielmotto M, Aragno M, Tamagno E, Vercellinato I, Visentin S, Medana C, Catalano MG, Smith MA, Perry G, Danni O, Boccuzzi G, Tabaton M: AGEs/RAGE complex upregulates BACE1 via NF-kappaB pathway activation. *Neurobiol Aging*, **33**, 196.e113–127 (2012).
- 128) Ren X, Ma H, Qiu Y, Liu B, Qi H, Li Z, Kong H, Kong L: The downregulation of thioredoxin accelerated Neuro2a cell apoptosis induced by advanced glycation end product via activating several pathways. *Neurochem Int*, **87**, 128–135 (2015).
- 129) Chen CL, Lin CF, Chang WT, Huang WC, Teng CF, Lin YS: Ceramide induces p38 MAPK and JNK activation through a mechanism involving a thioredoxin-interacting protein-mediated pathway. *Blood*, **111**, 4365–4374 (2008).
- 130) Li Y, Yang J, Chen MH, Wang Q, Qin MJ, Zhang T, Chen XQ, Liu BL, Wen XD: Ilexgenin A inhibits endoplasmic reticulum stress and ameliorates endothelial dysfunction via suppression of TXNIP/NLRP3 inflammasome activation in an AMPK dependent manner. *Pharmacol Res*, (2015).
- 131) Song J, Li J, Hou F, Wang X, Liu B: Mangiferin inhibits endoplasmic reticulum stress-associated thioredoxin-interacting protein/NLRP3 inflammasome activation with regulation of AMPK in endothelial cells. *Metabolism*, (2014).
- 132) Wu J, Xu X, Li Y, Kou J, Huang F, Liu B, Liu K: Quercetin, luteolin and epigallocatechin gallate alleviate TXNIP and NLRP3-mediated inflammation and apoptosis with regulation of AMPK in endothelial cells. *Eur J Pharmacol*, **745**, 59–68 (2014).
- 133) Zhao Y, Li Q, Zhao W, Li J, Sun Y, Liu K, Liu B, Zhang N: Astragaloside IV and cycloastragenol are equally effective in inhibition of endoplasmic reticulum stress-associated TXNIP/NLRP3 inflammasome activation in the endothelium. *J Ethnopharmacol*, (2015).
- 134) Tsunoda T, Takagi T: Estimating transcription factor bindability on DNA. *Bioinformatics*, **15**, 622–630 (1999).
- 135) Kim KY, Shin SM, Kim JK, Paik SG, Yang Y, Choi I: Heat shock factor regulates VDUP1 gene expression. *Biochem Biophys Res Commun*, **315**, 369–375 (2004).
- 136) Billiet L, Furman C, Larigauderie G, Copin C, Page S, Fruchart JC, Brand K, Rouis M: Enhanced VDUP-1 gene expression by PPARgamma agonist induces apoptosis in human macrophage. *J Cell Physiol*, **214**, 183–191 (2008).
- 137) de Candia P, Blekhman R, Chabot AE, Oshlack A, Gilad Y: A combination of genomic approaches

- reveals the role of FOXO1a in regulating an oxidative stress response pathway. *PLoS One*, **3**, e1670 (2008).
- 138) Ludwig DL, Kotanides H, Le T, Chavkin D, Bohlen P, Witte L: Cloning, genetic characterization, and chromosomal mapping of the mouse VDUP1 gene. *Gene*, **269**, 103–112 (2001).
- 139) Minn AH, Hafele C, Shalev A: Thioredoxin-interacting protein is stimulated by glucose through a carbohydrate response element and induces beta-cell apoptosis. *Endocrinology*, **146**, 2397–2405 (2005).
- 140) Minn AH, Couto FM, Shalev A: Metabolism-independent sugar effects on gene transcription: the role of 3-O-methylglucose. *Biochemistry*, **45**, 11047–11051 (2006).
- 141) Kato T, Shimono Y, Hasegawa M, Jijiwa M, Enomoto A, Asai N, Murakumo Y, Takahashi M: Characterization of the HDAC1 complex that regulates the sensitivity of cancer cells to oxidative stress. *Cancer Res*, **69**, 3597–3604 (2009).
- 142) Butler LM, Zhou X, Xu WS, Scher HI, Rifkind RA, Marks PA, Richon VM: The histone deacetylase inhibitor SAHA arrests cancer cell growth, up-regulates thioredoxin-binding protein-2, and down-regulates thioredoxin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 11700–11705 (2002).
- 143) Cha-Molstad H, Xu G, Chen J, Jing G, Young ME, Chatham JC, Shalev A: Calcium channel blockers act through nuclear factor  $\kappa$ B to control transcription of key cardiac genes. *Mol Pharmacol*, **82**, 541–549 (2012).
- 144) Yu FX, Luo Y: Tandem ChoRE and CCAAT motifs and associated factors regulate Txnip expression in response to glucose or adenosine-containing molecules. *PLoS One*, **4**, e8397 (2009).
- 145) Dorn A, Bollekens J, Staub A, Benoist C, Mathis D: A multiplicity of CCAAT box-binding proteins. *Cell*, **50**, 863–872 (1987).
- 146) Ceribelli M, Dolfini D, Merico D, Gatta R, Vigano AM, Pavesi G, Mantovani R: The histone-like NF- $\kappa$ B is a bifunctional transcription factor. *Mol Cell Biol*, **28**, 2047–2058 (2008).
- 147) Yun J, Chae HD, Choi TS, Kim EH, Bang YJ, Chung J, Choi KS, Mantovani R, Shin DY: Cdk2-dependent phosphorylation of the NF- $\kappa$ B transcription factor and its involvement in the p53-p21 signaling pathway. *J Biol Chem*, **278**, 36966–36972 (2003).
- 148) Heichman KA, Roberts JM: Rules to replicate by. *Cell*, **79**, 557–562 (1994).
- 149) Gudas JM, Payton M, Thukral S, Chen E, Bass M, Robinson MO, Coats S: Cyclin E2, a novel G1 cyclin that binds Cdk2 and is aberrantly expressed in human cancers. *Mol Cell Biol*, **19**, 612–622 (1999).