

# 転写因子 Nrf3 を標的としたシミ予防研究への HIV-1 プロテアーゼ阻害剤リポジショニング

同志社大学生命医科学部医生命システム学科遺伝情報研究室

和久 剛

Melanin is a pigment produced from the amino acid L-Tyrosine in melanosomes. The CNC-family transcription factor Nrf3 is expressed in the basal layer of the epidermis, where melanocytes reside. Our previous *in vitro* study using mouse melanoma B16F10 and human normal melanocytes showed that Nrf3 promotes melanogenesis by upregulating the core melanogenic gene circuit, which includes Mitf, Tyr, Tyrp1, Pmel, and Oca2. Nrf3 also induces the gene expression of several autophagosome-related factors for melanin precursor uptake by macropinocytosis, an evolutionarily-conserved fluid-phase form of endocytosis. In parallel, Nrf3 prompts autophagic degradation of melanosome for melanocyte survival. Furthermore, Nrf3-mediated melanin production is suppressed by an HIV-1 protease inhibitor nelfinavir (NFV). Here, we investigated the anti-melanogenic effect of NFV by histological and gene expression analyses using a mouse model of UV-induced hyperpigmentation. In this model, C57BL/6 mice were exposed to 130 mJ/cm<sup>2</sup> UV once every two days for 2 weeks. For the next 2 weeks of UV treatment, 10 μM NFV was topically applied to the right ear (UV+NFV), while the left ear received either vehicle oil (UV). Then, mouse ear specimens were fixed in formalin and embedded in paraffin. Bright-field microscopy images of none stained paraffin section were used for melanin quantification. We found that NFV treatment attenuates UV-induced melanin accumulation. Furthermore, we confirmed that NFV treatment suppressed the UV-induced gene expression of core melanogenic and autophagosome-related factors, including Mitf, Tyr, and Cln3. These results indicate the anti-melanogenic potential of NFV *in vivo*.

## 1. 緒言

皮膚は、紫外線 (UV) 照射、環境汚染、乾燥など、様々な有害刺激に対する物理的バリアとして機能している<sup>1, 2)</sup>。特に、過度の紫外線照射はDNA損傷や遺伝子変異を引き起こし、皮膚がんの発生につながる。そこで、皮膚は表皮の基底細胞層にあるメラノサイトで作られる天然色素のメラニンを使って、過剰な紫外線から身を守っている<sup>3)</sup>。

メラニン生成は、遺伝子発現、酵素反応、膜輸送を含むメラニン生成カスケードとして知られている<sup>3)</sup>。メラニン生成カスケードは、メラノサイト内においてメラニン生成の内因性誘導物質として機能する $\alpha$ -メラノサイト刺激ホルモン ( $\alpha$ MSH) に応答して、Gタンパク質共役型受容体であるメラノコルチン1受容体 (MC1R) が活性化することによって始まる<sup>4)</sup>。そして、活性化されたMC1Rはアデニル酸シクラーゼに細胞内の環状アデノシンリン酸 (cAMP) の増加を促し、cAMPシグナル伝達経路を介してメラノサイト誘導転写因子 (Mitf) の遺伝子発現を誘導する。Mitfタンパク質は、チロシナーゼ (Tyr) やチロシナーゼ関連タンパク質1 (Tyrp1) などのメラニン生合成酵素チロシナーゼファミリーや、メラノサイトタンパク質

Pmel 17 (Pmel) などのメラノサイト構造マトリックスタンパク質の遺伝子発現などメラニン生成のマスター転写因子として機能する<sup>5)</sup>。Mitfは、Mitf-A、Mitf-C、Mitf-H、Mitf-Mの少なくとも4つのアイソフォームから構成されている。Mitf-Mはメラノサイトにのみ発現し、このアイソフォームを欠くマウスは表皮と毛包にメラノサイトがないことが知られている<sup>6)</sup>。

メラノソームの形成は多段階にわたる。まず、Pmelタンパク質は、初期エンドソームと呼ばれる色素を含まないステージIおよびIIのメラノソームでフィブリル構造を形成する。その後、TyrとTyrp1タンパク質がトランスゴルジからエンドソーム膜に選別され、メラニン生成が開始される。このメラニン生成は、ステージIIIおよびIVのメラノソームのPmelフィブリルに豊富に存在している。これらの知見は、多くのメラニン生成成分がエンドソーム起源であることを示唆している<sup>7-9)</sup>。Tyrタンパク質はメラニン合成の律速酵素であり、アミノ酸L-チロシン (L-Tyr) からL-DOPA、さらにメラノソームへの仕分け後にL-ドーパキノンに触媒する<sup>10)</sup>。さらに、陰イオン輸送体タンパク質と考えられている眼皮アルビニズム2型 (Oca2、別名P for pink-eyed dilute) は、メラノソームのpHを調節してメラニンを生成するのに必須である<sup>11, 12)</sup>。

NRF3はCNC-bZipファミリーに属する転写因子の一つとして同定され、そのホモログにはNRF1およびNRF2が存在する<sup>13)</sup>。通常、NRF3は小胞体膜に繫留されており、ERADユビキチン結合酵素HRD1によるユビキチン・プロテアソーム系によって分解されている<sup>14)</sup>。しかしアミノ酸欠乏などのストレスに応答して、NRF3はアスパ



Drug Repositioning of a HIV-1 Protease Inhibitor as an anti-melanogenic reagent targeting Nrf3

Tsuyoshi Waku

Laboratory for Genetic Code, Department of Medical Life Systems, Faculty of Life and Medical Sciences, Doshisha University

ルチルプロテアーゼ DNA-damage-inducible 1 homolog 2 (DDI2) によって切断される<sup>15)</sup>。次に、切断された Nrf3 タンパク質は核内に移行し、小 MAF (sMAF) タンパク質とヘテロ二量体を形成する。その後、NRF3-sMAF 複合体はゲノム DNA 中の抗酸化応答配列に結合し、下流の遺伝子の発現を誘導する<sup>13)</sup>。また我々は、HIV-1 プロテアーゼ阻害剤が DDI2 の酵素活性を阻害する、すなわち NRF3 の阻害剤として機能する可能性を見出している<sup>16)</sup>。

興味深いことに、マウスではケラチノサイトやメラノサイトが存在する表皮基底層で Nrf3 が高いレベルで発現し、さらにケラチノサイトにおける Nrf3 の紫外線誘発アポトーシス効果を報告があった<sup>17)</sup>。近年、我々はマウスメラノーマやヒトメラノサイトを用いた *in vitro* 解析から、Nrf3 が Mitf や Tyr, Tyrp1, Oca2 といった既知のメラニン産生遺伝子の発現を誘導することでメラニン産生を促進していることを見出した。また興味深いことに、Nrf3 は複数のオートファジー因子 (Cln3, Ulk2, Gabarapl2) も同時に発現誘導し、メラニン前駆体の細胞内取り込みやメラノーマ細胞の生存に寄与していることも明らかにしている<sup>18)</sup>。そこで本研究では、この Nrf3-メラニン産生経路を標的とした新たなシミ予防の可能性を検討するため、Nrf3 阻害効果を期待できる HIV プロテアーゼ阻害剤ネルフィナビル (NFV) のメラニン産生抑制効果を *in vivo* で検証した。

## 2. 方法

### UV 照射マウスモデル作製と薬剤処理

先行研究を参考に実施した<sup>19-21)</sup>。4 週齢の C57BL/6N CrSlc マウス (清水実験材料) に、130mJ/cm<sup>2</sup> の強度で 2 日に 1 回 UV を照射した。UV 照射には、Handy UV Lamp (アズワン 254nm suv-4) を用いた。14 日以降は UV 照射直前に、10μM NFV を右耳介に塗布し、左耳介には溶媒のみを塗布した。溶媒には、1% プロピレングリコール:エタノール (5:3) 混合溶液を用いた。NFV 塗布して 14 日後に耳介を回収した。またコントロールとして、UV 照射しない同系同週齢マウスの耳介を用いた。

### パラフィン切片作製とメラニン定量

耳介組織を 4% パラホルムアルデヒド・リン酸緩衝液 (Wako) に浸漬し、4℃ で 24 時間固定した。固定後の耳

介組織はエタノール/キシレンで置換し、その後パラフィンブロック中に耳介組織を包埋した。マイクロームを用いて 6μm に薄切し、組織切片を作製した。組織中のメラニンとして、未染色の明視野像に観察される黒色領域を ImageJ で定量した。

### 定量的リアルタイム PCR

Isogen II (ナカライテスク) を用いて、未固定の耳介組織から Total RNA を精製した。次に M-MLV RTase (Invitrogen) を用いて cDNA を合成した後に、TB Green Premix Ex Taq II (TaKaRa) を用いてリアルタイム PCR を行った。各遺伝子の mRNA 量は ΔΔCt 法で数値化した後、β-actin mRNA 量で標準化した。使用したプライマー配列は表 1 に示す。

## 3. 結果

### NFV は UV 照射マウス耳介組織におけるメラニン蓄積を減弱できる

Nrf3 は通常、小胞体にアンカーされており、タンパク質切断を受けることで活性化する転写因子である。この Nrf3 のタンパク質切断を担う酵素がアスパルチルプロテアーゼ DDI2 である。X 線結晶構造解析から、DDI2 は HIV-1 プロテアーゼと類似した酵素活性ドメインを有していることが明らかになっている<sup>19)</sup>。HIV-1 プロテアーゼは、後天性免疫不全症候群 (AIDS) の発症原因となるヒト免疫不全ウイルス (HIV) が持つプロテアーゼである。そのため、これまでに様々な HIV-1 プロテアーゼ阻害剤が開発され、AIDS 治療薬として臨床利用されてきた。我々は先行研究において、Nrf3 によるメラニン産生の促進が、HIV-1 プロテアーゼ阻害剤の 1 つであるネルフィナビル (NFV) によって減弱することを、マウスメラノーマ細胞 B16F10 を用いた *in vitro* 解析から見出している。しかし NFV が *in vivo* においても同様のメラニン産生抑制効果を有するのことは未だ不明であったため、本研究では UV 照射マウスモデルを用いて検証した。まず C57BL/6N CrSlc マウス (4 週齢) に、130mJ/cm<sup>2</sup> の強度で 2 日に 1 回 14 日間 UV を照射した。その後は、UV 照射直前に 10μM NFV を右耳介に塗布し、左耳介には溶媒のみを塗布した。NFV 塗布して 14 日後に耳介を回収した。またコントロールと

表 1 リアルタイム PCR プライマー配列

Target gene	Forward primer	Reverse primer
mouse β-actin	TGTCCACCTTCCAGCAGATGT	AGCTCAGTAACAGTCCGCCTAG
mouse Mitf	AGCGTGATATTTTCCCCACAGAG	AGCTCCTTAATGCGGTCGTTTA
mouse Tyr	ATCGGCCAACGATCCCATT	TAGGTGCATTGGCTTCTGGG
mouse Cln3	AACCAGAGCCATGTGGAACC	GCGCCAGGAGTTTGATGACA

して、UV 照射しない同系同週齢マウスの耳介を用いた。これらの耳介組織をパラホルムアルデヒドで固定した後、パラフィンブロックを作成し、マイクロトームを用いて 6µm の組織切片を作製した。次いで組織中のメラニンとして、未染色の明視野像に観察される黒色領域を定量比較した (図 1A)。その結果、耳介組織中のメラニンは UV 照射によって増加した (図 1B, Ctrl vs. Vehicle)。しかし、このメラニン増加は NFV 塗布によって減弱した (図 1B, Vehicle vs. NFV)。この結果は、NFV は UV 照射によるメラニン蓄積を抑制できることを示している。

### NFV は耳介組織でも Nrf3-メラニン産生経路に関与する遺伝子発現を抑制する

上述したマウス耳介の組織学的解析から、NFV が UV 照射によって誘導されるメラニン産生を減弱できることを見出した。そこで次に、NFV が Nrf3-メラニン産生経路を阻害できているのかを検討した。マウスメラノーマ細胞やヒトメラノサイト細胞を用いた先行研究から、Nrf3 は Mitf や Tyr のメラニン産生遺伝子に加え、オートファジー関連因子である Cln3 も発現誘導していることを見出し

ていた<sup>18)</sup>。そこで UV 照射マウス耳介において、これら 3 つの遺伝子 (Mitf, Tyr, Cln3) の発現が NFV 塗布によって変動するのか検討した。まず上述と同様にマウス耳介組織を回収し、表 1 に示すプライマーを用いて定量的リアルタイム PCR を行った (図 2)。その結果、Mitf, Tyr, Cln3 の 3 遺伝子すべての mRNA 量が UV 照射で増加し (Ctrl vs. Vehicle)、さらに NFV によって減少することを明らかにした (Vehicle vs. NFV)。この結果は、NFV が Nrf3 を阻害してメラニン産生を抑制していることを示唆している。

## 4. 考 察

本研究は、Nrf3 抑制効果のある HIV-1 プロテアーゼ阻害剤のシミ予防研究へのリポジショニングを目的としている。UV 照射モデルを用いた組織学的解析の結果、NFV は皮膚にダメージを及ぼすことなく UV 照射によるメラニン蓄積を抑制できることを明らかにした。また遺伝子発現解析の結果、NFV は Nrf3 を阻害してメラニン産生を抑制している可能性を見出した。しかし今回行った遺伝子発現解析では、耳介組織を全て用いているため、メラノサイトとケラチノサイトは区別できない。さらにマウス個体への NFV

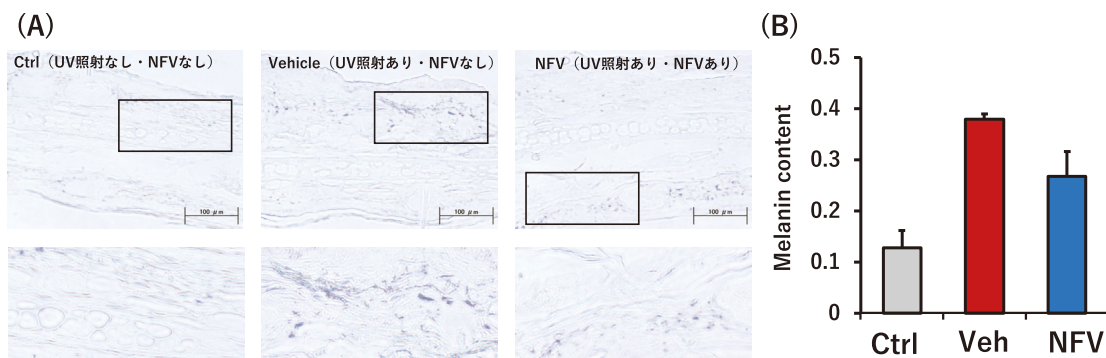


図 1 UV 照射マウス耳介組織のメラニン量に NFV 塗布が及ぼす影響

- (A) 各マウス耳介組織の代表的な明視野像。四角で囲った領域の拡大像を下段に表示した。  
(Ctrl: コントロール、Vehicle: 溶媒のみ、NFV: 10µM NFV 塗布)  
(B) 各マウス耳介組織のメラニン定量 (n=3, mean ± SD)

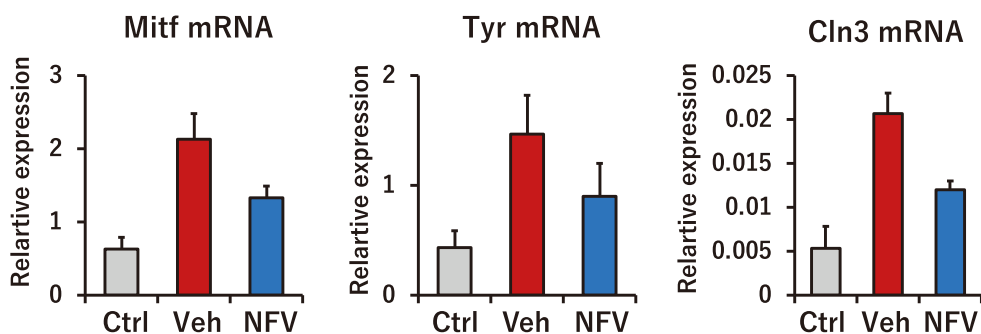


図 2 UV 照射マウス耳介組織における遺伝子発現解析 (n=3, mean ± SD)  
(Ctrl: コントロール、Veh: Vehicle/溶媒のみ、NFV: 10µM NFV 塗布)

塗布が、実際にメラノサイト内のNrf3タンパク質切断を阻害できているのか確認できていない。そこで今後は、マウス耳介からメラノサイトを単離して解析する必要がある。またNFVが耳介の皮膚構造に及ぼす影響や、NFV以外のHIV-1プロテアーゼ阻害剤も検討する必要がある。

美意識の変化から女性のみならず男性も皮膚の健康、特に美白需要が高まってきている。現在、これらのメラニン産生経路を標的に、効率的にメラニン蓄積を予防・改善できる方法が求められている。シミ（色素斑）の原因は日光性と加齢性に大別される。日光性色素斑は日焼けに代表されるもので、強い紫外線を含む日光を長時間浴びることが引き金となる。また加齢性色素斑は、わずかな紫外線でもメラニンが過剰に作られやすくなることや（紫外線感受性の増加）、メラニンを含む皮膚細胞が垢となって剥がれ落ちることなく長期間皮膚に留まり続けること（皮膚細胞のターンオーバー低下）が原因であると考えられている。現在、日光性色素斑の予防を目的とした数多くの日焼け止め製品が市販されており、その主成分は、紫外線が皮膚に入り込むのを防止する紫外線吸収剤と紫外線散乱剤である。一方の加齢性色素斑の予防には、トラネキサム酸などで紫外線感受性を低下させることが有効である。またビタミンC誘導体やコウジ酸のように、Tyrの酵素活性やメラノソーム形成を低下させることで、メラニンの産生や蓄積を抑制することも美白効果が認められている。このような紫外線の入り込み防止や感受性低下、酪氨酸酵素やメラノソームの阻害を目的とした既存製品とは異なり、本研究で着目したHIV-1プロテアーゼ阻害剤はNrf3活性を阻害することでメラニン産生を包括的に抑制できる可能性がある。またHIV-1プロテアーゼ阻害剤と既存製品の併用は、紫外線を防止しつつ多層的にメラニン産生を抑制し日焼けや加齢に伴うシミの原因となるメラニン蓄積を強力に阻害できる、より有効なシミ予防・美白製品の開発につながると期待できる。

#### (引用文献)

- 1) Ovaere, P. *et al.* The emerging roles of serine protease cascades in the epidermis. *Trends in Biochemical Sciences* **34**, 453-463 (2009)
- 2) Hsu, Y. C., Li, L. & Fuchs, E. Emerging interactions between skin stem cells and their niches. *Nature Medicine* **20**, 847-856 (2014)
- 3) D'Mello, S. A. N. *et al.* Signaling pathways in melanogenesis. *International Journal of Molecular Sciences* **17**, 1144 (2016)
- 4) Thody, A. J.  $\alpha$ -MSH and the regulation of melanocyte function. *Annals of the New York Academy of Science* **885**, 217-229 (1999)
- 5) Hida, T. *et al.* Elucidation of melanogenesis cascade for identifying pathophysiology and therapeutic approach of pigmentary disorders and melanoma. *International Journal of Molecular Sciences* **21**, 1-23 (2020)
- 6) Flesher, J. L. *et al.* Delineating the role of MITF isoforms in pigmentation and tissue homeostasis. *Pigment Cell and Melanoma Research* **33**, 279-292 (2020)
- 7) Hossain, M.R. *et al.* Diversified stimuli-induced inflammatory pathways cause skin pigmentation. *International Journal of Molecular Sciences* **22**, 3970 (2021)
- 8) Ohbayashi, N. *et al.* Recent advances in understanding the molecular basis of melanogenesis in melanocytes. *F1000Res.* **9**, F1000 Faculty Rev-608 (2020)
- 9) Raposo, G., and Marks, M.S. Melanosomes - dark organelles enlighten endosomal membrane transport. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **8**, 786-797 (2007)
- 10) Eisenhofer, G. *et al.* Tyrosinase: a developmentally specific major determinant of peripheral dopamine. *The FASEB Journal* **17**, 1248-1255 (2003)
- 11) Brilliant, M.H. The mouse p (pink-eyed dilution) and human P genes, oculocutaneous albinism type 2 (OCA2), and melanosomal pH. *Pigment Cell and Melanoma Research* **14**, 86-93 (2001)
- 12) Grønskov, K., Ek, J., and Brøndum-Nielsen, K. Oculocutaneous albinism. *Orphanet Journal of Rare Diseases* **2**, 43-48 (2007)
- 13) Kobayashi, A. *et al.* Molecular cloning and functional characterization of a new Cap'n' collar family transcription factor Nrf3. *Journal of Biological Chemistry* **274**, 6443-6452 (1999)
- 14) Chowdhury, AMMA. *et al.* Multiple regulatory mechanisms of the biological function of NRF3 (NFE2L3) control cancer cell proliferation. *Scientific Reports* **7**, (2017)
- 15) Hirose, S. *et al.* NRF3 activates mTORC1 arginine-dependently for cancer cell viability. *iScience* **26**, 106045-106045 (2023)
- 16) Gu, Y. *et al.* Nelfinavir inhibits human DDI2 and potentiates cytotoxicity of proteasome inhibitors. *Cellular Signalling* **75**, 109775 (2020)
- 17) Siegenthaler, B. *et al.* (2018) Nrf3 promotes UV-induced keratinocyte apoptosis through suppression

- of cell adhesion. *Cell Death & Differentiation* **25**, 1749–1765.
- 18) Waku T. *et al.* The CNC-family transcription factor Nrf3 coordinates the melanogenesis cascade through macropinocytosis and autophagy regulation. *Cell Reports* **42**, 111906 (2023)
- 19) Kumar, KJS. *et al.* In Vitro and In Vivo Studies Disclosed the Depigmenting Effects of Gallic Acid: A Novel Skin Lightening Agent for Hyperpigmentary Skin Diseases. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology* **39**, 259–270 (2013)
- 20) Fang, Y. *et al.* Spherical Nucleic Acids for Topical Treatment of Hyperpigmentation. *Journal of the American Chemical Society* **143**, 1296–1300 (2021)
- 21) Patzelt, A. *et al.* In vivo investigations on the penetration of various oils and their influence on the skin barrier. *Skin Research and Technology* **18**, 364–369 (2012)
- 22) Sivá, M. *et al.* Human DNA-Damage-Inducible 2 Protein Is Structurally and Functionally Distinct from Its Yeast Ortholog. *Scientific Reports* **6**, 30443 (2016)