

山本雅之

東北大学大学院医学系研究科・教授

環境応答破綻がもたらす炎症の慢性化機構と治療戦略

## §1. 研究実施体制

### (1)「山本」グループ

- ① 研究代表者: 山本 雅之 (東北大学大学院医学系研究科、教授)
- ② 経時的・非侵襲的な炎症反応の個体モニタリングシステムの構築
  - ・HDC-GFP マウスの作成
  - ・IL-6-Luc マウスの作成
- ③ 環境異物・酸化ストレス応答の破綻と炎症の遷延化
  - ・ダイオキシン受容体の機能亢進により惹起される慢性皮膚炎の解析
  - ・慢性炎症におけるマクロファージにおけるストレス応答系の解析
  - ・Keap1-Nrf2 ストレス応答系の機能破綻がもたらす炎症病態の解析

### (2)「田中」グループ

- ① 主たる共同研究者: 田中 伸幸 (宮城県立がんセンター研究所・がん先進治療開発研究部・部長)
- ② 細胞質ストレスによる生体防御系の活性化と炎症
  - ・ESCRT 輸送系不全がもたらす細胞質ストレスと Keap1-Nrf2 ストレス応答系の役割の解析
  - ・ESCRT 輸送系不全と慢性炎症病態との関係の解析

### (3)「本橋」グループ

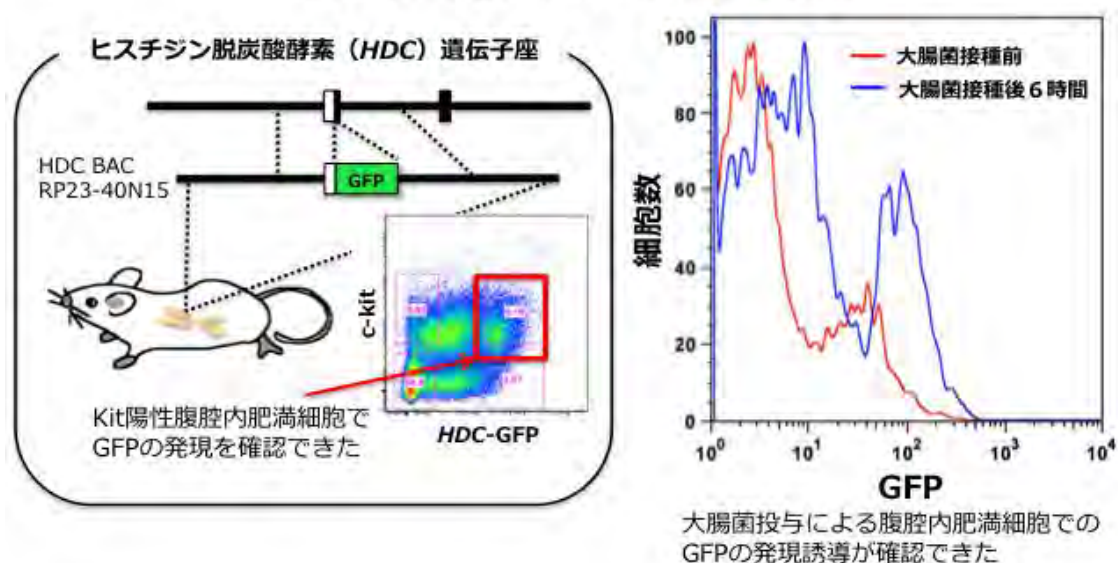
- ① 主たる共同研究者: 本橋 ほづみ (東北大学大学院医学系研究科、准教授)
- ② 慢性炎症における骨髄応答とその記憶の解析
  - ・慢性炎症モデル K14-AhRCA マウスを用いた Nrf2 の造血細胞における機能貢献の解析

## §2. 研究実施内容

### (1) 経時的・非侵襲的な炎症反応の個体モニタリングシステムの構築

本項目では、本研究で利用する炎症応答 *in vivo* モニタリング系を作出する。具体的には *HDC* (ヒスチジン脱炭酸酵素) 遺伝子および *IL-6* 遺伝子の転写活性化を指標とするモニタリングマウスを作成する。平成 23 年度に *HDC* 遺伝子座を含む大腸菌人工染色体 (BAC)

図1 *HDC*-GFPマウスへの大腸菌接種実験



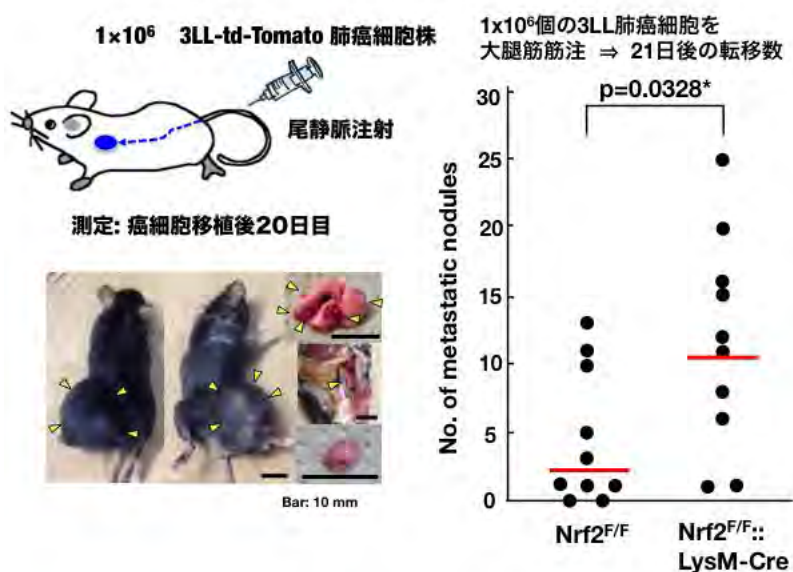
クローンに対して GFP 遺伝子を挿入して、2ラインのトランスジェニックレポーターマウスを作成した。平成 24 年度には、これらのマウスに対する大腸菌の接種実験を行った。*HDC*-GFP マウスの腹腔内に大腸菌を接種して敗血症を誘導し、腹腔内肥満細胞での GFP 発現の変化を検討した。その結果、大腸菌接種6時間後には肥満細胞での GFP 発現が誘導された (図1)。このように炎症モニタリングマウス作出に成功したので、今後は刺激による炎症誘発を行い、本モニターマウスを用いた個体レベルでの炎症メカニズムの検討を進める。さらに、慢性皮膚炎を発症する K14-AhR CA マウスとの交配により、肥満細胞と *HDC* 遺伝子の動態を検討する。また、ヒト *IL-6* 遺伝子座を含む BAC クローンを準備して、LUC cDNA 挿入ベクターを作成し、3ラインの *IL-6*-LUC トランスジェニックマウスを得て、これらをすべてライン化した。今後、炎症誘発による *IL-6* レポーターの応答をしらべ、炎症モニターマウスとしての有用性を検証する。

### (2) 環境異物・酸化ストレス応答の破綻と炎症の遷延化

本項目では、AhR と Nrf2 の機能亢進もしくは機能不全が炎症慢性化にいかにか寄与するかを明らかにする。平成 24 年度には、上述の K14-AhR CA マウスの詳細解析を実施して、同マウスではアトピー性皮膚炎の特徴である経表皮水分喪失が顕著に見られること、また、*IL-33* や *TSLP* 発現が増加していることを見いだした。平成 25 年度には、同マウスにおける

慢性炎症発症において Keap1-Nrf2 応答系が果たす役割を明らかにするために、同マウスと *Nrf2* 欠損マウス、*Keap1* 欠損マウスの交配を進め、複合変異マウスの解析を実施する。また、慢性皮膚炎発症のメカニズムを明らかにするために、*Hdc* 欠損マウス、*Langerin-DTR* マウス、*Rag2* 欠損マウス、*Tslp* 欠損マウスとの交配を行い、複合変異マウスの解析を実施する。さらに、ケラチノサイトにおける AhR 標的遺伝子を明らかにするために、ChIP-seq 解析の準備を進める。すでにライブラリー作成を完了している。

図2 顆粒球系細胞におけるNrf2の発現の重要性



私たちは、Nrf2（成果発表論文リスト 5, 13, 14；以下同じ）は肺や食道の発生にも重要な役割を果たす一方（3, 4）、がんの進展にも重要な役割を果たしていることを見いだした（11, 17）。Nrf2 機能不全が炎症慢性化を惹起するという仮説の検証のために、糖尿病時における膵β細胞障害、糖尿病性腎症、関節リウマチにおける骨リモデリ

ング異常、栄養過多による肝機能障害（9, 15）の4つのモデル系を用いて Nrf2 機能の検証を進めた。顆粒球系特異的な Nrf2 欠損マウスを作成したところ、同マウスにおいてはがんの肺転移が抑制されており、この抑制には骨髄由来免疫抑制細胞（MDSC）における Nrf2 機能が重要であった（図2）。また、動脈硬化発症において、血液細胞における *Nrf2* 欠損が *ApoE* 欠損マウスの動脈硬化を軽減することを見いだした（16）。

私たちは、Nrf2 の抑制性制御因子である Keap1 がオートファジーにより分解されることを発見した（12）。オートファジーが活性化されると Keap1 タンパク質量が減少することで、Nrf2 が安定化することが示唆される。また、一部の親電子性物質の添加により Keap1 のオートファジー分解が亢進することも明らかになったが、これはシステイン残基の修飾をうけて反応性を失った Keap1 がオートファジーにより分解され、新規に合成される Keap1 と交換することで、親電子性物質に対する反応性を回復するというメカニズムの存在を示唆する。

### （3）細胞質ストレスによる生体防御系の活性化と炎症

細胞内の物質輸送系である ESCRT は、外来異物分解と同時にオートファジーによる細胞内タンパク質分解にも重要な役割を果たしており、細胞内ストレス抑制機構と考えられる。本項目では、細胞質ストレスによる炎症遷延化メカニズムへの Keap1-Nrf2 制御系の関与を検証する。平成24年度には、ESCRT 機能不全により蓄積する異常タンパク質が、Keap1-Nrf2

系を活性化し、病態形成に関与するか否かを検討した。海馬特異的条件付き Hrs 遺伝子欠失マウスを作成したところ、マウスは生後7週齢までに死亡した。海馬錐体細胞にユビキチン化タンパク質が蓄積し、細胞変性と細胞脱落を認めた。ストレスキナーゼ P38 活性化および ROS 上昇を認め、細胞内ストレス亢進は顕著であった。Keap1 と会合する p62 異常タンパクセンサーは蓄積していたが、Keap1-Nrf2 の明確な活性化を認めなかった。

病原微生物感染時の ESCRT と Keap1-Nrf2 系の関連を調べるために *Listeria* 感染モデルを用いた解析を行った。*Listeria* は細胞内寄生菌であり、エンドソームから細胞質に逃避して細胞質ストレスを惹起する。細胞はオートファゴソームにより *Listeria* を捕捉することから、殺菌に至る過程で ESCRT 関与が想定される。さらに、*Listeria* の生体内ターゲット臓器である肝臓での感染制御を調べた。肝臓特異的条件付き Hrs ノックアウトマウス (Albumin-Cre) に *Listeria* を尾静注し、3日後に肝および脾における生存菌数を調べ、*Listeria* 包含小胞について検討している。今後は病原体感染と Keap1-Nrf2 の関連に焦点を絞り解析を進める。

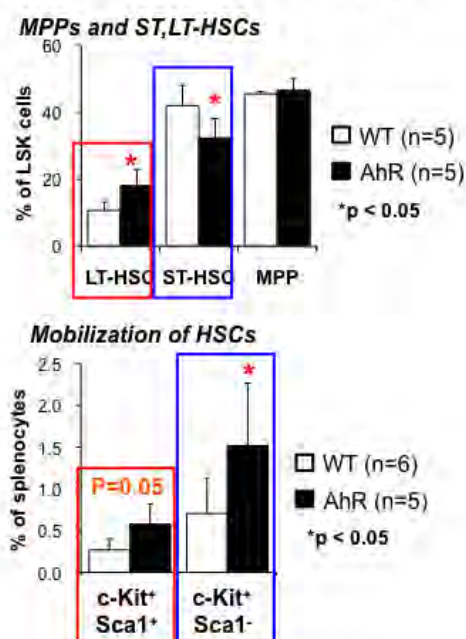
#### (4) 慢性炎症における骨髄応答とその記憶の解析

環境要因は細胞のエピジェネティック変化をもたらし、遺伝子発現を長期的に変化させる。本項目では、炎症において、サイトカインなど生理活性物質による刺激が慢性的に持続した場合に、それに応答して造血細胞、特に、幹細胞においてエピジェネティック変化がおこるのか、もし起こるのであれば、Keap1-Nrf2 系がどのような影響を与えるのかを明らかにする。

平成24年度には、Keap1-Nrf2 制御系の造血細胞における働きを明らかにするために、*Nrf2* 欠損マウスと条件付き *Keap1* 欠損マウスの骨髄細胞の解析を行った。その結果、*Nrf2* は骨髄幹細胞・前駆細胞の分化を抑制して未分化な状態に維持するとともに、分化した細胞については、顆粒球系へのコミットメントを促進することがわかった。次に慢性皮膚炎を呈する K14-AhR CA マウスを解析したところ、骨髄でも脾臓でも、幹細胞分画の割合が著増していた (図3)。造血幹細胞の細胞周期が活性化されているという結果が得られたことから、慢性炎症による刺激の持続により、造血幹細胞の活性化と末梢への動員がおこっていると結論された。

慢性炎症モデル *Scurfy* マウスの骨髄幹細胞の解析を行った結果、顆粒球系への分化亢進と造血幹細胞数の減少が観察された。これは、造血幹細胞の増殖が亢進した結果、枯渇状態になり始めているものと推測される。平成25年度中には、*Scurfy::Nrf2<sup>fl/fl</sup>::Vav-Cre* マウス、*Scurfy::Keap1<sup>fl/fl</sup>::Vav-Cre* マウスを得て、造血幹細胞の解析を実施する予定である。

図3 慢性炎症に伴う造血幹細胞の活性化と動員



### §3. 成果発表等

#### (3-1) 原著論文発表

##### ● 論文詳細情報

1. Juliana FM, Nara H, Onoda T, Rahman M, Araki A, Jin L, Fujii H, Tanaka N, Hoshino T, Asao H. Apurinic/aprimidinic endonuclease1/redox factor-1 (Ape1/Ref-1) is essential for IL-21-induced signal transduction through ERK1/2 pathway. *Biochem Biophys Res Commun.* 420, 628-634 (2012) DOI: 10.1016/j.bbrc.2012.03.051.
2. Tamai K, Shiina M, Tanaka N, Nakano T, Yamamoto A, Kondo Y, Kakazu E, Inoue J, Fukushima K, Sano K, Ueno Y, Shimosegawa T, Sugamura K. Regulation of hepatitis C virus secretion by the Hrs-dependent exosomal pathway. *Virology* 422, 377-385 (2012) DOI: 10.1016/j.virol.2011.11.009.
3. Cho HY, van Houten B, Wang X, Miller-Degraff L, Fostel J, Gladwell W, Perrow L, Panduri V, Kobzik L, Yamamoto M, Bell DA, and Kleeberger SR. Targeted deletion of Nrf2 impairs lung development and oxidant injury in neonatal mice. *Antioxid Redox Signal* 17, 1066-1082 (2012) DOI: 10.1089/ars.2011.4288.
4. Chen H, Li J, Li H, Hu Y, Tevebaugh W, Yamamoto M, Que J, and Chen X. Transcript profiling identifies dynamic gene expression patterns and an important role for Nrf2/Keap1 pathway in the developing mouse esophagus. *PLoS One* 7, e36504 (2012) DOI:10.1371/journal.pone.0036504.
5. Takaya K, Suzuki T, Motohashi H, Onodera K, Satomi S, Kensler TW, Yamamoto M. Validation of the multiple sensor mechanism of the Keap1-Nrf2 system. *Free Radic Biol Med* 53, 817-827 (2012) DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2012.06.023.
6. Hirotsu Y, Hataya N, Katsuoka F, Yamamoto M. NF-E2-related factor 1 (Nrf1) serves as a novel regulator of hepatic lipid metabolism through regulation of the Lipin1 and PGC-1 $\beta$  genes. *Mol Cell Biol* 32, 2760-2770 (2012) DOI: 10.1128/MCB.06706-11.
7. Kalra S, Knatko EV, Zhang Y, Honda T, Yamamoto M, and Dinkova-Kostova AT. Highly Potent Activation of Nrf2 by Topical Tricyclic Bis (Cyano Enone): Implications for Protection against UV Radiation during Thiopurine Therapy. *Cancer Prev Res* 5, 973-981 (2012) DOI: 10.1158/1940-6207.CAPR-12-0041.

8. Kaidery NA, Banerjee R, Yang L, Smirnova NA, Hushpulia DM, Liby KT, Williams CR, Yamamoto M, Kensler TW, Ratan RR, Sporn MB, Beal MF, Gazaryan IG, and Thomas B. Targeting Nrf2-mediated gene transcription by extremely potent synthetic triterpenoids attenuates dopaminergic neurotoxicity in the MPTP- mouse model of Parkinson's disease. *Antioxid Redox Signal* 18, 139-157 (2012) DOI: 10.1089/ars.2011.4491.
  
9. Abdullah A, Kitteringham NR, Jenkins RE, Goldring C, Higgins L, Yamamoto M, Hayes J, and Park BK. Analysis of the role of Nrf2 in the expression of liver proteins in mice using two-dimensional gel-based proteomics. *Pharmacol Rep* 64, 680-697 (2012) DOI number なし
  
10. Lämsä V, Levonen AL, Sormunen R, Yamamoto M, Hakkola J. Heme and heme biosynthesis intermediates induce Heme oxygenase-1 and Cytochrome P450 2A5, enzymes with putative sequential roles in heme and bilirubin metabolism: Different requirement for transcription factor Nuclear factor erythroid-derived 2-like 2. *Toxicol Sci* 130, 132-144 (2012) DOI: 10.1093/toxsci/kfs237.
  
11. Mitsuishi Y, Taguchi K, Kawatani Y, Shibata T, Nukiwa T, Aburatani H, Yamamoto M, Motohashi H. Nrf2 redirects glucose and glutamine into anabolic pathways in metabolic reprogramming. *Cancer Cell* 22, 66-79 (2012) DOI: 10.1016/j.ccr.2012.05.016.
  
12. Taguchi K, Fujikawa N, Komatsu M, Ishii T, Unno M, Akaike T, Motohashi H, Yamamoto M. Keap1 degradation by autophagy for the maintenance of redox homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 13561-13566 (2012) DOI: 10.1073/pnas.1121572109.
  
13. Mukaigasa K, Nguyen LT, Li L, Nakajima H, Yamamoto M, and Kobayashi M. Genetic evidence of an evolutionarily conserved role for Nrf2 in the protection against oxidative stress. *Mol Cell Biol* 32, 4455-4461 (2012) DOI: 10.1128/MCB.00481-12.
  
14. Hirotsu Y, Katsuoka F, Funayama R, Nagashima T, Nishida Y, Nakayama K, Douglas Engel J, Yamamoto M. Nrf2-MafG heterodimers contribute globally to antioxidant and metabolic networks. *Nucleic Acids Res* 40, 10228-10239 (2012) DOI: 10.1093/nar/gks827.
  
15. Okada K, Warabi E, Sugimoto H, Horie M, Gotoh N, Tokushige K, Hashimoto E, Utsunomiya H, Takahashi H, Ishii T, Yamamoto M, and Shoda J. Deletion of Nrf2 leads to rapid progression of steatohepatitis in mice fed atherogenic plus high-fat diet. *J Gastroenterol* 2012 Sep 13 DOI number なし



16. Harada N, Ito K, Hosoya T, Mimura J, Maruyama A, Noguchi N, Yagami KI, Morito N, Takahashi S, Maher JM, Yamamoto M, and Itoh K. Nrf2 in bone marrow-derived cells positively contributes to the advanced stage of atherosclerotic plaque formation. *Free Radic Biol Med.* 53, 2256-2262 (2012) DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2012.10.001.
17. Ohkoshi A, Suzuki T, Ono M, Kobayashi T, Yamamoto M. Roles of Keap1-Nrf2 System in Upper Aerodigestive Tract Carcinogenesis. *Cancer Prev Res (Phila).* 6, 149-159 (2013) DOI: 10.1158/1940-6207.CAPR-12-0401-T.

**(3-2) 知財出願**

- ① 平成 24 年度特許出願件数(国内 0 件)
- ② CREST 研究期間累積件数(国内 0 件)