

「炎症の慢性化機構の解明と制御に向けた基盤技術の創出」
平成 23 年度採択研究代表者

H25 年度
実績報告

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 研究項目:

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

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

・慢性炎症病態下での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 研究項目

細胞質ストレスによる生体防御系の活性化と炎症

・Keap1-Nrf2 系による感染応答と炎症制御

(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 加齢医学研究所、教授)

② 研究項目

慢性炎症における骨髄応答とその記憶の解析

- Keap1-Nrf2 経路の造血幹細胞における機能の解析
- 慢性炎症モデルマウスを用いた造血細胞での炎症ストレス応答の解析

§ 2. 研究実施の概要

(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

非侵襲的に動物個体内での炎症状態をモニターできるレポーターマウスラインの開発に取り組んでいます。IL-6 遺伝子の持つ炎症性刺激への高い反応性を利用し、炎症反応に応じてルシフェラーゼ活性が誘導されるトランスジェニックマウスの作成に成功しました。このマウス系統は炎症反応を動物個体レベルで経時的にモニターする評価系として有用であり、慢性炎症に伴う疾患の病態メカニズムを解明するために重要な役割を果たすものと期待されます。

(2) 環境異物・酸化ストレス応答の破綻と炎症の遷延化

環境汚染物質や酸化ストレスが炎症の慢性化に寄与することが広く知られています。そこで、環境異物・酸化ストレス応答に関わる転写因子 AhR と Nrf2 に注目し、その機能亢進もしくは機能不全が慢性炎症病態を招来するメカニズムの解明を目指します。

AhR は環境汚染物質等によって活性化し、異物代謝に関わる遺伝子群を活性化することが知られています。ところが、皮膚において AhR が恒常的に活性化する遺伝子改変マウスを作成したところ、アトピー性皮膚炎患者と同様の炎症を起こしやすく、搔爬行動を誘発して皮膚バリアが破綻することが観察されました。これらの結果から、環境汚染物質等による AhR の恒常的活性化が、異物代謝酵素を誘導して生体を防御する一方で、Th2 炎症応答の活性化などによって、アトピー性皮膚炎の病態を形成することが明らかになりました。この知見は、アトピー性皮膚炎の治療法開発や環境汚染と各種疾患発症のつながりを検討する上で重要な発見です。

転写因子 Nrf2 は酸化ストレス消去だけでなく炎症の抑制にも働くことが知られています。マクロファージを LPS および IFN γ で刺激して炎症促進性 (M1) マクロファージに誘導すると IL-1 β 、IL-1 α 、IL-6 などの炎症性サイトカイン遺伝子の発現が上昇しますが、同時に Nrf2 を活性化させると、これら炎症性サイトカイン遺伝子の発現は抑制されました。この知見は Nrf2 欠損によって炎症病態モデルが慢性化するメカニズムや、Nrf2 活性化剤を炎症性疾患治療に適用する際の作用機序を検討する上で重要な情報と考えられます。

(3) 細胞質ストレスによる生体防御系の活性化と炎症

本項目では、細胞質ストレスによる炎症惹起と炎症消退に至る過程における Keap1-Nrf2 制御系の役割を解析します。本年度は、Nrf2 が病原微生物感染応答に与える影響を明らかにするために、Nrf2 遺伝子欠失マウスに対して黄色ブドウ球菌 *S. aureus* を皮下接種し、惹起される炎症の性状と経過を調べました。Nrf2 遺伝子欠損マウスから採取した炎症組織では、接種後早期から IL-1 β および IL-6 の分泌が有意に高く、炎症部位に集まる好中球数も多いことが確認されました。また、Nrf2 遺伝子欠損マウス由来の好中球では、殺菌能が高いこともわかりました。以上のことから、S.

aureus 感染の初期応答において、Nrf2 が炎症を抑制しているものと考えられます。

(4) 慢性炎症における骨髄応答とその記憶の解析

本項目では、慢性炎症にともなう造血幹細胞の性質変化をエピゲノムの観点から解析し、Nrf2 活性化がその過程に変化を及ぼすのかを明らかにすることを目的とします。本年度は、アトピー性皮膚炎モデルマウスと自己免疫疾患モデルマウスという2種類の慢性炎症モデルマウスの造血幹細胞の解析を行い、いずれのマウスにおいても造血幹細胞の動員、骨髄球系への分化亢進、造血幹細胞の枯渇、がおこることを見出しました。また、Nrf2 が恒常的に活性化している *Keap1* 欠損マウス由来の造血幹細胞では、細胞周期の促進、骨髄球系への分化ポテンシャルの偏向、造血幹細胞の減少がおこることを明らかにしました。*Keap1* 欠損による造血幹細胞の変化は、慢性炎症によりもたらされる造血幹細胞の変化と類似していました。

§ 3. 成果発表等

(3-1) 原著論文発表

論文詳細情報(国際)

1. Xue P, Hou Y, Chen Y, Yang B, Fu J, Zheng H, Yarborough K, Woods CG, Liu D, Yamamoto M, Zhang Q, Andersen ME, and Pi J, “Adipose deficiency of Nrf2 in ob/ob mice results in severe metabolic syndrome”, *Diabetes* 62, 845-854, 2013 (DOI:10.2337/db12-0584)
2. Ohkoshi A, Suzuki T, Ono M, Kobayashi T, and Yamamoto M, “Roles of Keap1-Nrf2 system in upper aerodigestive tract carcinogenesis”, *Cancer Prev Res* 6, 149-159, 2013 (DOI: 10.1158/1940-6207)
3. Guiu J, Shimizu R, D'Altri T, Fraser ST, Hatakeyama J, Bresnick EH, Kageyama R, Dzierzak E, Yamamoto M, Espinosa L, and Bigas A, “Hes repressors are essential regulators of hematopoietic stem cell development downstream of Notch signaling”, *J Exp Med* 210, 71-84, 2013 (DOI: 10.1084/jem.20120993)
4. Ruotsalainen AK, Inkala M, Partanen ME, Lappalainen JP, Kansanen E, Mäkinen PI, Heinonen SE, Laitinen HM, Heikkilä J, Vatanen T, Hörkkö S, Yamamoto M, Ylä-Herttuala S, Jauhiainen M, and Levonen AL, “The absence of macrophage Nrf2 promotes early atherogenesis”, *Cardiovasc Res* 98, 107-115, 2013 (DOI:10.1093/cvr/cvt008)

5. Ashino T, Yamamoto M, Yoshida T, and Numazawa S, “Redox-sensitive transcription factor nrf2 regulates vascular smooth muscle cell migration and neointimal hyperplasia”, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 33, 760-768 , 2013 (DOI:10.1161/ATVBAHA.112.300614)
6. Suzuki M, Yamazaki H, Mukai HY, Motohashi H, Shi L, Tanabe O, Engel JD, and Yamamoto M, “Disruption of the Hbsl1-Myb locus causes hereditary persistence of fetal hemoglobin in mouse”, *Mol Cell Biol* 33, 1687-1695, 2013 (DOI:10.1128/MCB.01617-12)
7. Toki T, Kanezaki R, Kobayashi E, Kaneko H, Suzuki M, Wang R, Terui K, Kanegane H, Maeda M, Endo M, Mizuochi T, Adachi S, Hayashi Y, Yamamoto M*, Shimizu R, and Ito E*, “Naturally occurring oncogenic GATA1 mutants with internal deletions in transient abnormal myelopoiesis in Down syndrome ”, *Blood* 121, 3181-3194 , 2013 (DOI:10.1182/blood-2012-01-405746) (*corresponding authors)
8. More VR, Xu J, Shimpi PC, Belgrave C, Luyendyk JP, Yamamoto M, and Slitt AL, “Keap1 knockdown increases markers of metabolic syndrome after long-term high fat diet feeding ”, *Free Radic Biol Med* 61C, 85-94, 2013 (DOI:10.1016/j.freeradbiomed.2013.03.007)
9. Wang L, Jia Y, Rogers H, Suzuki N, Gassmann M, Wang Q, McPherron AC, Kopp J, Yamamoto M, and Noguchi CT, “Erythropoietin contributes to slow oxidative muscle fiber specification via PGC-1a and AMPK activation ”, *Int J Biochem Cell Biol.* 45, 1155-64, 2013 (DOI: 10.1016/j.biocel.2013.03.007)
10. Suzuki T*, Shibata T*, Takaya K, Shiraishi K, Kohno T, Kunitoh H, Tsuta K, Furuta K, Goto K, Hosoda F, Sakamoto H, Motohashi H, and Yamamoto M, “Regulatory nexus of synthesis and degradation deciphers cellular Nrf2 expression levels ”, *Mol Cell Biol* 33, 2402-2412, 2013 (DOI: 10.1128/MCB.00065-13) (*equal contribution) (selected “Spotlight”)
11. Hayashi R, Himori N, Taguchi K, Ishikawa Y, Uesugi K, Ito M, Duncan T, Tsujikawa M, Nakazawa T, Yamamoto M, and Nishida K, “The role of the Nrf2-mediated defense system in corneal epithelial wound healing ”, *Free Radic Biol Med* 61C, 333-342, 2013 (DOI:10.1016/j.freeradbiomed.2013.04.008)
12. Eba S, Hoshikawa Y, Moriguchi T, Mitsuishi Y, Satoh H, Ishida K, Watanabe T, Shimizu T, Shimokawa H, Okada Y, Yamamoto M, and Kondo T, “The nuclear factor erythroid 2-related factor 2 activator oltipraz attenuates chronic hypoxia-induced cardiopulmonary alterations in mice ”, *Am J Respir Cell Mol Biol* 49, 324-333, 2013 (DOI:10.1165/rmb.2011-0396OC)

13. Satoh H, Moriguchi T, Takai J, Ebina M, and Yamamoto M, “Nrf2 prevents initiation but accelerates progression through the Kras signaling pathway during lung carcinogenesis”, *Cancer Res* 73, 4158-4168, 2013 (DOI:10.1158/0008-5472.CAN-12-4499)
14. Fujita R, Takayama-Tsujimoto M, Satoh H, Gutiérrez L, Aburatani H, Fujii S, Sarai A, Bresnick EH, Yamamoto M*, and Motohashi H*, “NF-E2 p45 is important for establishing normal function of platelets”, *Mol Cell Biol* 33, 2659-2670, 2013 (DOI:10.1128/MCB.01274-12) (*corresponding authors)
15. Uruno A, Furusawa Y, Yagishita Y, Fukutomi T, Muramatsu H, Negishi T, Sugawara A, Kensler TW, and Yamamoto M, “The Keap1-Nrf2 system prevents onset of diabetes mellitus”, *Mol Cell Biol* 33, 2996-3010, 2013 (DOI:10.1128/MCB.00225-13)
16. Yamazaki S, Souma T, Hirano I, Pan XQ, Minegishi N, Suzuki N, and Yamamoto M, “A mouse model of adult-onset anaemia due to erythropoietin deficiency”, *Nature Commun* 4, 1950, 2013 (DOI:10.1038/ncomms2950)
17. Okita Y, Kamoshida A, Suzuki H, Itoh K, Motohashi H, Igarashi K, Yamamoto M, Ogami T, Koinuma D, and Kato M, “Transforming growth factor- β Induces transcription factors MafK and Bach1 to suppress expression of the heme oxygenase-1 gene”, *J Biol Chem* 288, 20658-20667, 2013 (DOI:10.1074/jbc.M113.450478)
18. Souma T, Yamazaki S, Moriguchi T, Suzuki N, Hirano I, Pan X, Minegishi N, Abe M, Kiyomoto H, Ito S, and Yamamoto M, “Plasticity of renal erythropoietin-producing cells governs fibrosis”, *J Am Soc Nephrol* 24, 1599-1616, 2013 (DOI:10.1681/ASN.2013010030)
19. Ke B, Shen XD, Zhang Y, Ji H, Gao F, Yue S, Kamo N, Zhai Y, Yamamoto M, Busuttill RW, and Kupiec-Weglinski JW, “Keap1-Nrf2 complex in ischemia-induced hepatocellular damage of mouse liver transplants”, *J Hepatol* 59, 1200-1207, 2013 (DOI:10.1016/j.jhep.2013.07.016)
20. Mukai HY, Suzuki M, Nagano M, Ohmori S, Otsuki A, Tsuchida K, Moriguchi T, Ohneda K, Shimizu R, Ohneda O, Yamamoto M, “Establishment of erythroleukemic GAK14 cells and characterization of GATA1 N-terminal domain”, *Genes Cells* 18, 886-898, 2013 (DOI:10.1111/gtc.12084)
21. Muramatsu H, Katsuoka F, Toide K, Shimizu Y, Furusako S, and Yamamoto M, “Nrf2 deficiency leads to behavioral, neurochemical and transcriptional changes in mice”, *Genes Cells* 18, 899-908, 2013 (DOI:10.1111/gtc.12083)

22. Suzuki M, Kobayashi-Osaki M, Tsutsumi S, Pan X, Ohmori S, Takai J, Moriguchi T, Ohneda O, Ohneda K, Shimizu R, Kanki Y, Kodama T, Aburatani H, and Yamamoto M, “GATA factor switching from GATA2 to GATA1 contributes to erythroid differentiation ”, *Genes Cells* 18, 921-933, 2013 (DOI:10.1111/gtc.12086)
23. Ishikado A, Morino K, Nishio Y, Nakagawa F, Mukose A, Sono Y, Yoshioka N, Kondo K, Sekine O, Yoshizaki T, Ugi S, Uzu T, Kawai H, Makino T, Okamura T, Yamamoto M, Kashiwagi A, and Maegawa H, “4-Hydroxy hexenal derived from docosa-hexaenoic acid protects endothelial cells via Nrf2 activation ”, *PLoS One* 8, e69415, 2013 (DOI:10.1371/journal.pone.0069415)
24. Holmström KM, Baird L, Zhang Y, Hargreaves I, Chalasani A, Land JM, Stanyer L, Yamamoto M, Dinkova-Kostova AT, Abramov AY, “Nrf2 impacts cellular bioenergetics by controlling substrate availability for mitochondrial respiration ”, *Biol Open* 2, 761-770, 2013 (DOI:10.1242/bio.20134853)
25. Ichimura Y, Waguri S, Sou Y-S, Kageyama S, Hasegawa J, Ishimura R, Saito T, Yang Y, Kouno T, Fukutomi T, Hoshii T, Hirao A, Takagi K, Mizushima T, Motohashi H, Lee M-S, Yoshimori T, Tanaka K*, Yamamoto M*, and Komatsu M*, “Phosphorylation of p62 activates the Keap1-Nrf2 pathway during selective autophagy ”, *Mol Cell* 51, 618-631, 2013 (DOI:10.1016/j.molcel.2013.08.003) (*corresponding authors)
26. Takai J, Moriguchi T, Suzuki M, Yu L, Ohneda K, and Yamamoto M, “The Gata1 5' region harbors distinct cis-regulatory modules that direct gene activation in erythroid cells and gene inactivation in HSCs ”, *Blood* 122, 3450-3460, 2013 (DOI:10.1182/blood-2013-01-476911) (selected as “Inside Blood”)
27. Shimizu R, Hasegawa A, Ottolenghi S, Ronchi A, and Yamamoto M, “Verification of the in vivo activity of three distinct cis-acting elements within the Gata1 gene promoter-proximal enhancer in mice ”, *Genes Cells* 18, 1032-1041, 2013 (DOI:10.1111/gtc.12096)
28. Watanabe S, Zan TD, Ishizaki T, Yasuda S, Kamijyo H, Yamada D, Aoki T, Kiyonari H, Kaneko H, Shimizu R, Yamamoto M, Goshima G, and Narumiya S, “Loss of a Rho-regulated actin nucleator, mDia2, impairs cytokinesis during mouse fetal erythropoiesis ”, *Cell Reports* 5, 926-932, 2013 (DOI:10.1016/j.celrep.2013.10.021)
29. Suzuki N, Hirano I, Pan X, Minegishi N, and Yamamoto M, “Erythropoietin production in neuroepithelial and euralcrest cells during primitive erythropoiesis ”, *Nature Commun* 4, 2902, 2013 (DOI:10.1038/ncomms3902)

30. Taguchi K, Hirano I, Itoh T, Tanaka M, Miyajima A, Suzuki A, Motohashi H, and Yamamoto M, "Nrf2 enhances cholangiocyte expansion in Pten-deficient livers ", *Mol Cell Biol* 34, 900-913, 2014 (DOI:10.1128/MCB.01384-13)
31. Fukutomi T, Takagi K, Mizushima T, Ohuchi N, and Yamamoto M, "Kinetic, Thermodynamic and Structural Characterizations of Association between Nrf2-DLGex Degron and Keap1 ", *Mol Cell Biol* 34, 832-846, 2014 (DOI:10.1128/MCB.01191-13)
32. Ashino T, Ohkubo-Morita H, Yamamoto M, Yoshida T, and Numazawa S, "Possible involvement of nuclear factor erythroid 2-related factor 2 in the gene expression of Cyp2b10 and Cyp2a5 ", *Redox Biology* 10, 284-288, 2014 (DOI:10.1016/j.redox.2013.12.025)
33. Murakami S, Shimizu R, Romeo P-H, Yamamoto M*, and Motohashi H*, "Keap1-Nrf2 system regulates cell fate determination of hematopoietic stem cells ", *Genes Cells* 19, 239-53, 2014 (DOI: 10.1111/gtc.12126) (*corresponding authors)
34. Onodera Y, Motohashi H, Takagi K, Miki Y, Shibahara Y, Watanabe M, Ishida T, Hirakawa H, Sasano H, Yamamoto M, and Suzuki T, "NRF2 immunolocalization in human breast cancer patients as a prognostic factor ", *Endocr Relat Cancer* 21, 241-252, 2014 (DOI:10.1530/ERC-13-0234)
35. Wakabayashi N, Skoko JJ, Chartoumpekis DV, Kimura S, Slocum SL, Noda K, Palliyaguru DL, Fujimuro M, Boley PA, Tanaka Y, Shigemura N, Biswal S, Yamamoto M, and Kensler TW, "Notch-Nrf2 axis: Regulation of Nrf2 gene expression and cytoprotection by Notch signaling ", *Mol Cell Biol* 34, 653-63, 2014 (DOI:10.1128/MCB.01408-13)
36. Murakami S, Yamamoto M, and Motohashi H, "Hematopoietic stem and progenitor cell activation during chronic dermatitis provoked by constitutively active aryl-hydrocarbon receptor driven by Keratin 14 promoter ", *Toxicol Sci* 138, 47-58, 2014 (DOI:10.1093/toxsci/kft273)
37. Yagishita Y, Fukutomi T, Sugawara A, Kawamura H, Takahashi T, Pi J, Uruno A, and Yamamoto M, "Nrf2 protects pancreatic β -cells from oxidative and nitrosative stress in diabetic model mice ", *Diabetes* 63, 605-618, 2014 (DOI:10.2337/db13-0909)
38. Pomeschik Y, Kidin I, Savchenko E, Rolova T, Yamamoto M, Levonen AL, Ylä-Herttua S, Kanninen K, Malm T, and Koistinaho J, "Does Nrf2 gene transfer facilitate recovery after contusion spinal cord injury? ", *Antioxid Redox Signal* 20, 1313-1323, 2014 (DOI:10.1089/ars.2013.5453)

39. Himori N, Yamamoto K, Maruyama K, Ryu M, Taguchi K, Yamamoto M, and Nakazawa T, “Critical role of Nrf2 in oxidative stress-induced retinal ganglion cell death”, *J Neurochem* 127, 669-680, 2014 (DOI:10.1111/jnc.12325)
40. Nagata T, Murata K, Murata R, Sun SL, Saito Y, Yamaga S, Tanaka N, Tamai K, Moriya K, Kasai N, Sugamura K, Ishii N, “Hepatocyte growth factor regulated tyrosine kinase substrate in the peripheral development and function of B-cells”, *Biochem Biophys Res Commun* 443, 351-356, 2014 (DOI:10.1016/j.bbrc.2013.11.029)
41. Endo H, Shiroki T, Nakagawa T, Yokoyama M, Tamai K, Yamanami H, Fujiya T, Sato I, Yamaguchi K, Tanaka N, Iijima K, Shimosegawa T, Sugamura K, Satoh K, “Enhanced expression of long non-coding RNA HOTAIR is associated with the development of gastric cancer”, *PLoS One* 8, e77070, 2014 (DOI:10.1371/journal.pone.0077070. eCollection 2013)
42. Imai T, Tamai K, Oizumi S, Oyama K, Yamaguchi K, Sato I, Satoh K, Matsuura K, Saijo S, Sugamura K, Tanaka N, “CD271 defines a stem cell-like population in hypopharyngeal cancer”, *PLoS One* 8, e62002, 2013 (DOI:10.1371/journal.pone.0062002)

(3-2) 知財出願

- ① 平成 25 年度特許出願件数(国内 1 件)
- ② CREST 研究期間累積件数(国内 1 件)