

平成23年4月30日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590911

研究課題名 (和文) 敗血症性 ARDS における Keap1 誘導性防御機構の解明とそれに基づく新規治療法開発

研究課題名 (英文) Role of Keap1/Nrf2 system in host defense against acute lung injury.

研究代表者

石井 幸雄 (ISHII YUKIO)

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・准教授

研究者番号：80272194

研究成果の概要 (和文) : Keap1/Nrf2 系を標的とした ARDS に対する治療法を開発すべく、Keap1/Nrf2 系の急性肺傷害防御機構について複数のモデルを用いて分子レベルで解析した。Nrf2 はブレオマイシン、リポ多糖体、ウィルス感染など様々な環境因子で活性化され、抗酸化ストレス酵素の誘導に加え、炎症性転写因子の不活化、炎症性サイトカインの抑制など多彩な機能で肺傷害に防御的に作用することが明らかとなった。

研究成果の概要 (英文) : In the present study, we investigated the role of Nrf2 in protection against the development of acute lung injury. Mice lacking Nrf2 were susceptible to acute lung injury induced by several stimuli, such as bleomycin, lipopolysaccharide, and influenza virus. The induction of several self-defense genes was lower in the lungs of Nrf2-deficient mice than in wild-type mice. Activation of nuclear factor- κ B and induction of proinflammatory cytokines were significantly higher in Nrf2-deficient mice than in wild-type mice. Results indicate Nrf2 is a pivotal factor in protection against the development of acute lung injury induced by environmental stimuli.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：呼吸器内科学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・呼吸器内科学

キーワード：Nrf2, Keap1, 酸化ストレス, 急性肺傷害, マクロファージ

1. 研究開始当初の背景

急性肺損傷、急性呼吸促迫症候群 (ALI/ARDS) は肺野領域の炎症に基づく、透過性亢進型肺水腫であり、予後不良の疾患である。敗血症における ALI/ARDS を含む全身炎症は、微生物およびその菌体成分に対する高サイトカイン血症を中心とした過剰な宿主反応の結果である。

炎症性サイトカインの産生は主としてマクロファージ系細胞に発現する Toll 様受容体 (TLRs) を介したレドックス感受性転写因子 NF- κ B の活性化により誘導されるが、Nrf2 は細胞内の酸化ストレスを軽減することで、NF- κ B の活性化を抑制する。Nrf2 の活性化は酸化ストレスセンサー蛋白でもある Keap1 により制御されている。従って、Nrf2/Keap1 システムは ALI/ARDS の発症感受性を規定する重要な宿主因子であり、有望な治療標的であると思われる。

2. 研究の目的

今回の研究では、ALI/ARDS における Nrf2/Keap1 システムの役割を分子レベルで明らかにし、同分子を標的とした新治療法の開発を最終目標とした。第一にマクロファージにおける Nrf2/Keap1 を中心とした抗炎症分子経路を解明すること、第二に Nrf2/Keap1 システムが実際の ALI/ARDS において防御系の中核であるかを個体レベルで検証すること、第三に Nrf2 の活性化システムを確立し、治療への足がかりをつけることをそれぞれ具体的な目標とした。

3. 研究の方法

(1) 動物：実験には C57BL/6 マウスおよび同系の Nrf2 欠損マウス、Nrf2 標的遺伝子であるペルオキシレドキシシン I (PrxI) 欠損マウスを用いた。動物実験は全て筑波大学動物実験委員会の倫理審査を受け承認を得た。

(2) マクロファージの単離：腹腔マクロファージはマウスにチオグリコレート培地を腹腔注射した 5 日後に腹腔洗浄を行って回収した。肺野マクロファージはマウスより気管支肺野洗浄により回収した。細胞を 1×10^6 /ml 濃度でプラスチックシャーレに培養し、接着細胞としてマクロファージを単離した。

(3) ALI/ARDS モデル：ブレオマイシン、リポ多糖体 (LPS)、およびインフルエンザウィルス感染によるマウス急性肺野傷害モデルを作成した。ブレオマイシンモデルは 5mg/kg のブレオマイシンを気管内投与し作成した。LPS モデルは 5mg/kg の LPS を腹腔内投与して作成した。インフルエンザモデルは 1 日 5 本の喫煙あるいは清浄空気曝露下に 200pfu の A 型インフルエンザウィルス (PR8 株) を気道感染させることで作成した。

(4) ALI/ARDS モデルの評価：マウスに各刺激を曝露後、経時的に気管支肺野洗浄を行った。初回収液上清中のタンパク濃度を測定し、肺浮腫 (肺透過性) の指標とした。全回収液中の炎症細胞数を計測し、肺炎の指標とした。さらに同時点で肺組織を採取し、病理学的解析を行った。

(5) リアルタイム定量 PCR：マクロファージ、あるいは肺組織より total RNA を抽出し、mRNA 発現量をリアルタイム PCR にて定量解析した。抗酸化ストレス酵素群として NAD(P)H: キノン酸化還元酵素 1 (NQO1), ヘムオキシゲナーゼ 1 (HO-1), グルタミン酸システインリガーゼの触媒サブユニット (GCLC) および修飾サブユニット (GCLM), グルタチオン S 転移酵素 (GSTs), PrxI を、向炎症性サイトカインとして腫瘍壊死因子 (TNF) α , macrophage inflammatory protein (MIP)-2, keratinocyte-derived chemokine (KC) を、および転写因子群として T-bet, GATA-3 の各 mRNA 発現量を解析した。各プライマーは全て ready-made primers (Applied Biosystems) を用いた。

(6) ウェスタンブロット解析：転写因子の活性化は転写因子の核移行の程度をウェスタンブロットにて解析することで行った。マクロファージ、あるいは肺組織から核抽出キット (Panomics) を用いて細胞核を単離した。核タンパクを電気泳動後、PVDF 膜に転写し、抗 Nrf2 抗体、抗 NF- κ B p65 抗体を用いたイムノブロットを行った。

(7) ELISA：気管支肺野洗浄初回収液上清中の向炎症性サイトカイン (TNF α , KC, MIP-2) および Th1/Th2 サイトカイン (インターフェロロン γ , インターロイキン (IL) 4, IL-13) 各濃度は ELISA キット (R&D systems) を用いて行った。同液中の macrophage migration inhibitory factor (MIF) 濃度や ムチン分子 (MUC5AC) 濃度はそれぞれ抗 MIF 抗体、抗 MUC5AC 抗体を用いた ELISA 法にて行った。や肺組織ホモジネート上清中の各タンパク濃度測定は ELISA 法を用いて行った。

(8) 酸化ストレス評価：酸化ストレスの程度は 8-イソプロスタニン産生量を解析し評価した。肺組織ホモジネート中の 8-イソプロスタニン量は ELISA キット (Cayman Chemicals) にて定量評価し、肺組織中の 8-イソプロスタニン産生局在については抗 8-イソプロスタニン抗体を用いた免疫組織化学法にて評価した。

(9) 統計：データは平均 + 標準誤差で表した。二群の比較は t 検定を用いて行い、多群比較は 1 元配置分散分析および Scheffe の検定を用いて行った。生存率の比較は log-rank 試験を用いて行った。p < 0.05 をもって有意差ありと判定した。

4. 研究成果

(1) プレオマイシン誘発急性肺傷害における Nrf2/ Keap1 システムの役割について：

プレオマイシン投与後の生存率を野生型マウス、Nrf2 欠損マウスで比較すると、死亡率は Nrf2 欠損マウスで有意に高く、プレオマイシン肺傷害の感受性が Nrf2 欠損マウスで高まっていることが示された。

プレオマイシン投与後 1 日から 3 日の肺組織では両マウスともに肺泡領域の浮腫や好中球を中心とした炎症細胞浸潤を特徴とした急性肺傷害の病理像が見られたが、その程度は Nrf2 欠損マウスで顕著であった。同時期の気管支肺胞洗浄液中のタンパク濃度や好中球数も Nrf2 欠損マウスで有意に高値であり、急性肺傷害の程度が Nrf2 欠損マウスで亢進していることが明らかとなった。

気管支肺胞洗浄液中の TNF α 、MIP-2 濃度は同時期に Nrf2 欠損マウスで有意に増加しており、肺組織中の NF- κ B 活性化も Nrf2 欠損マウスで顕著に亢進していた。

プレオマイシン投与後の肺組織中 8-イソプロスタニン産生量は Nrf2 欠損マウスで野生型マウスに比べ有意に増加しており、Nrf2 欠損マウスでは酸化ストレスが高まっていることが示された。また野生型マウスの肺組織ではプレオマイシン刺激により GSTs、GCLC、NQO1 などの酸化ストレスタンパクが誘導されたが、Nrf2 欠損マウスではこれらのタンパクの発現誘導が見られなかった。

さらに Nrf2 欠損マウスの肺組織ではプレオマイシン刺激後の転写因子 STAT6 のリン酸化、GATA3 活性化、および IL-4、IL-13 産生が亢進しており、Th2 偏移の状態であった。以上より、Nrf2/Keap1 システムはプレオマイシン刺激で活性化され、標的遺伝子である酸化還元遺伝子群の統一的誘導を介して酸化ストレスを抑制することが明らかとなった。酸化ストレスの抑制はレドックス感受性転写因子 NF- κ B 活性化を抑制し炎症性サイトカイン、ケモカインの発現を抑制することで肺炎症を防御するものと思われた。また酸化ストレスの軽減は STAT6 リン酸化抑制を介して Th2 偏移を抑制することより、後の線維化形成にも防御的に作用するものと考えられた。

(2) LPS 誘発急性肺傷害における Nrf2/ Keap1 システムの役割について：

TLR4 リガンドである LPS 投与によっても両マウスの肺組織には胞隔浮腫や好中球浸潤を特徴とした急性肺傷害の病理像が見られたが、その程度は Nrf2 欠損マウスで顕著であった。LPS 投与後 6 時間、および 24 時間の気管支肺胞洗浄液におけるタンパク濃度や好中球数は Nrf2 欠損マウスで有意に亢進しており、同マウスでは LPS 誘発肺傷害の感受性が高まっていることが明らかとなった。

Nrf2 欠損マウスでは気管支肺胞洗浄液中の TNF α 、MIP-2 濃度が有意に増加していた。また同液中の 8-イソプロスタニン産生量も有意に高値であり、野生型マウス肺組織で LPS 刺激により誘導される酸化還元酵素である PrxI の発現誘導が、Nrf2 欠損マウスでは低下していた。また Nrf2 欠損マウスでは LPS 投与後の肺組織中 MIF 濃度が有意に高値であった。

PrxI は MIF 活性を阻害することが知られていることから PrxI 欠損マウスを用いて LPS 誘発急性肺傷害モデルを作成し検討を行った。PrxI 欠損マウスでは LPS 投与後の急性肺傷害の程度が野生型マウスに比べ有意に増加しており、肺組織中の MIF 濃度やマクロファージにおける MIF 産生が亢進していた。

以上より、Nrf2 は LPS 刺激により活性化されプレオマイシン誘発急性肺傷害同様に酸化還元ストレスタンパク作用とともに、PrxI を介した MIF 抑制により NF- κ B 不活化や炎症性サイトカイン産生を抑制し、急性肺傷害に防御的に働くものと思われた。

(3) インフルエンザウイルス誘発急性肺傷害における Nrf2 の役割について：

Nrf2 欠損マウス由来のマクロファージでは野生型マウス由来のマクロファージに比べ、タバコ抽出液(CSE)や TLR3 リガンドである poly(I:C)の共刺激により NF- κ B 活性化や TNF α 発現が顕著に亢進していた。

喫煙曝露を行った Nrf2 欠損マウスは同曝露の野生型マウスに比べインフルエンザウイルス感染後の死亡率が有意に高かった。また Nrf2 欠損マウスでは感染後 3 日から 7 日の肺炎症や肺浮腫の程度が野生型マウスに比べ亢進しており、インフルエンザ感染後の急性肺傷害発症感受性が高まっていた。

Nrf2 欠損マウス肺組織ではインフルエンザ感染後の肺泡マクロファージにおいて 8-イソプロスタニン産生が亢進しており、NF- κ B 活性化や TNF α 発現も有意に亢進していた。また同マウス気管支では杯細胞の過形成とともに気管支肺胞洗浄液中の MUC5AC 濃度の有意な増加が見られ、粘液産生の亢進が生じているものと思われた。

以上より Nrf2 はインフルエンザ感染後の気道炎症や肺傷害に対し抑制的に働くことが明らかとなった。病原微生物やその菌体成分は TLR s シグナリングを活性化するが、この時に TLR s にカップリングする NADPH 酸化酵素を介した内因性に生じる活性酸素が NF- κ B 活性化の一因であることが知られている。Nrf2 による酸化還元酵素誘導はこれらの活性酸素をスカベンジすることにより TLR s シグナリングからの NF- κ B を介した炎症カスケードを抑制することが抗炎症機序の一因と考えられた。また Nrf2 欠損マウスでは喫煙

曝露下のインフルエンザ感染に対し強い肺傷害感受性を示した。喫煙との関連の深い肺炎炎症性疾患である慢性閉塞性肺疾患(COPD)の急性増悪の主因としてインフルエンザなどのウイルス感染が重要である事実と考え合わせると、Nrf2はCOPD急性増悪に関する生体側防御因子であると考えられ、極めて興味深い所見であった。

当該科学研究費補助金による一連の研究により、Nrf2/Keap1システムは肺組織において主にマクロファージで作動する防御系であり微生物やその菌体成分を含めた多彩な環境因子による肺炎症、肺傷害から生体を防御する重要な因子であることが、その機序と共に明らかになった。本研究の成果は今後のALI/ARDS治療法開発に繋がるものと期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計6件)

①Yageta Y, Ishii Y, Morishima Y, et al. Role of Nrf2 in host defense against influenza virus in cigarette smoke-exposed mice. *Journal of Virology* 85: 4679-4690, 2011 (査読有)

②Kikuchi N, Ishii Y, Morishima Y, et al. Aggravation of bleomycin-induced pulmonary inflammation and fibrosis in mice lacking peroxiredoxin I. *American Journal of Respiratory Cellular and Molecular Biology* (In press) 2011 (査読有)

③Kikuchi N, Ishii Y, Morishima Y, et al. Nrf2 protects against pulmonary fibrosis by regulating the lung oxidant level and Th1/Th2 balance. *Respiratory Research* 11, 31, 2010 (査読有)

④石井幸雄. ARDSと活性酸素, 最新ARDSのすべて, 別冊・医学のあゆみ, 45-50, 2010 (査読無)

⑤石井幸雄. 呼吸器疾患と転写因子. 呼吸と循環. 56, 393-403, 2008 (査読無)

⑥石井幸雄. 転写因子 Nrf2(NF-E2 related factor-2)をめぐって. *Annual Review* 2008 呼吸器. 33-39, 2008 (査読無)

[学会発表] (計6件)

①菊池教大、石井幸雄、原口典博、他：転写因子Tbetはブレオマイシン誘発肺線維症を抑制する。第50回日本呼吸器学会学術講演会；2010.4.23-25, 京都

②Yageta Y, Kikuchi N, Ishii Y, et al. Genetic ablation of Nrf2 exacerbates

influenza virus-

induced lung injury after cigarette smoke exposure in mice. 106th International Conference of American Thoracic Society; 2010.5.14-19, New Orleans(USA)

③Yamadori T, Ishii Y, Yageta Y, et al. Nrf2-mediated cell proliferation is regulated by EGFR-MAPK signaling in Keap1 wild-type non-small cell lung cancer. 106th International Conference of American Thoracic Society; 2010.5.14-19, New Orleans(USA)

④菊池教大、石井幸雄、本間晋介、他：LPS敗血症モデルにおけるPeroxi-redoxin-Iの抑制効果。第49回日本呼吸器学会学術講演会；2009.6.12-14, 東京

⑤Kikuchi N, Ishii Y, Yageta Y, et al. The role of preoxiredoxin I in the pathogenesis of bleomycin-induced pulmonary inflammation and fibrosis. 105th International Conference of American Thoracic Society; 2009.5.15-20, San Diego(USA)

⑥菊池教大、石井幸雄、原口典博、他：急性肺損傷および肺線維症に対するペルオキシレドキシニンIの防御作用。第48回日本呼吸器学会学術講演会；2008.6.15-17, 神戸

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石井 幸雄 (ISHII YUKIO)

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・准教授

研究者番号：80272194