

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：15101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20096

研究課題名(和文) LPS投与時における転写因子Nrf2の臓器細胞および炎症細胞における役割

研究課題名(英文) The role of Nrf2 in organ and inflammatory cells during sepsis

研究代表者

北川 良憲 (KITAGAWA, YOSHINORI)

鳥取大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：40595154

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：lipopolysaccharide (LPS) による酸化ストレスによって転写因子Nrf2及び抗酸化分子ヘムオキシゲナーゼ-1 (HO-1) が誘導されることが知られているが、本研究は低用量LPSの先行暴露によるプレコンディショニング(PC)効果にNrf2が関与していることを明らかにした。また、PC群では肝臓のクッパー細胞でHO-1発現が顕著に誘導されており、クッパー細胞がPC効果による肝保護に関与していることが示唆された。脳、肺、腎のHE染色による病理組織学的検討でも、PC群でLPSの本刺激後の炎症所見は軽減しており、これらの臓器におけるPC効果にもNrf2が関与している可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：Sepsis is a syndrome triggered by endotoxin lipopolysaccharide (LPS) during bacterial infection. Vital organs may sometimes gain a tolerance against sepsis when exposed to an initial, LPS-induced sepsis, which prevents severe organ disorders on the occurrence of a second sepsis. Preconditioning (PC) is an endogenous protective mechanism by which sublethal damage confers tolerance to a subsequent lethal load. Oxidative stress is one of the important pathogenetic mechanisms that occur in sepsis. The nuclear factor erythroid 2 (NF-E2)-related factor-2 (Nrf2) system is a key regulatory transcription factor that protects organs and cells against oxidative stress and may be associated with the PC effect in repeated sepsis. Our results suggest that activation of the Nrf2 system is, at least in part, one of the mechanisms of a PC effect in the mouse liver in the case of repeated LPS stimulation.

研究分野：麻酔科学

キーワード：LPS 敗血症 Nrf2 HO-1 酸化ストレス

1. 研究開始当初の背景

敗血症は、感染によって自己免疫が過剰に応答する病態であるが、敗血症に起因する肺、肝、腎をはじめとする臓器障害は、生命予後に大きな影響を及ぼす。よって、敗血症時の詳細な病態を臓器側要因・炎症細胞側要因についてそれぞれ明らかにすることは、将来的な臨床応用を考えた際に極めて重要である。

転写因子 NF-E2-related factor 2 (Nrf2) は、抗酸化タンパク質や様々な防御因子の発現を誘導するマスター転写因子であり、臓器側にとっては保護因子として重要と考えられる。一方で Nrf2 は好中球やマクロファージなど炎症系細胞の攻撃力も高めてしまう反面も持つと考えられる。敗血症においては、リポ多糖 (Lipopolysaccharide : LPS) などの刺激により活性酸素が発生するが、これに対する防御反応として、転写因子 Nrf2 を介したヘム分解の律速酵素である Heme Oxygenase-1 (HO-1) などの抗酸化分子の誘導が知られている。

同一又は類似の負荷に繰り返し暴露された際、2 回目以降の負荷に対して耐性を示すことがあり、プレコンディショニング (PC) 効果として知られている。LPS に反復して暴露された場合、2 回目以降では症状が軽減することがあり、一種の PC 効果と考えられている。しかし、PC 効果の詳細なメカニズムは解明されていない。

2. 研究の目的

本研究では、LPS によるエンドトキシンショックモデルを用い、経時的に Nrf2 活性化状況を臓器細胞・炎症系細胞の両方で確認し、時間と空間を意識した Nrf2 調節による臓器障害予防を目指すことを目的とした。

3. 研究の方法

C57BL/6 マウスを用い、LPS を 2 回に分けて腹腔内投与した。1 回目は PC として非致死量の LPS (1.7 または 5.0 mg/kg 体重)、2 回目は 5 日後に本刺激として致死量の LPS (20 mg/kg 体重) を投与し、PC 効果を検討した。非 PC 群は 1 回目に PBS を投与した。PC 効果は生存率変化および臓器障害について検討し、後者に関しては主に肝臓で、血漿トランスアミナーゼ活性測定、病理組織学的検討を

行い評価した。PC 効果の詳細なメカニズムを明らかにするために、DNA マイクロアレイを行い、その結果を元に in vivo Nrf2 レポーターアッセイ、HO-1 の発現誘導、及び局在をそれぞれウエスタンブロット、免疫染色により、PC 群と非 PC 群で比較検討した。PC に対する Nrf2 の関与を明らかにするために、Nrf2 欠失マウスを用いて同様の検討を行った。

4. 研究成果

本刺激 7 日後の生存率は非 PC 群 12.5% に対して、PC 群 (1.7 または 5.0 mg/kg 体重) ではそれぞれ 100%、87.5% と生存率の上昇効果を認めた。

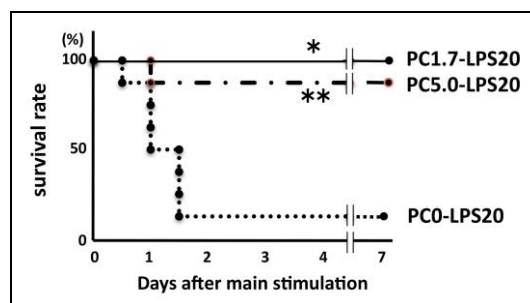


図 1. Life spans of LPS-injected mice

肝障害に関する検討では、非 PC 群で本刺激後の血漿トランスアミナーゼ活性上昇、肝臓の巣状壊死、類洞内好中球浸潤を認めたのに対し、PC 群では本刺激後の血漿トランスアミナーゼ活性上昇の抑制、肝臓の巣状壊死や好中球浸潤の軽減が認められ、PC による肝保護効果が示された。

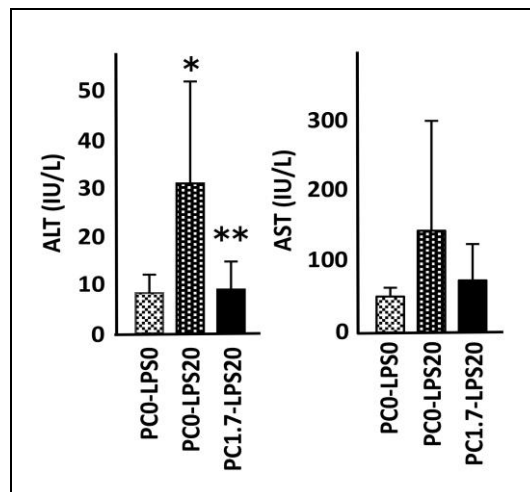


図 2. 血清 ALT および AST 値

DNA マイクロアレイでは、PC 群において抗酸化に関連する遺伝子群の発現上昇が示唆されたため、抗酸化分子発現のマスター転写因子 Nrf2 に注目してさらなる検討を行った。

in vivo Nrf2 レポーターアッセイでは、非 PC 群に比して PC 群で本刺激後の Nrf2 活性化が全身で増強していることが示された。

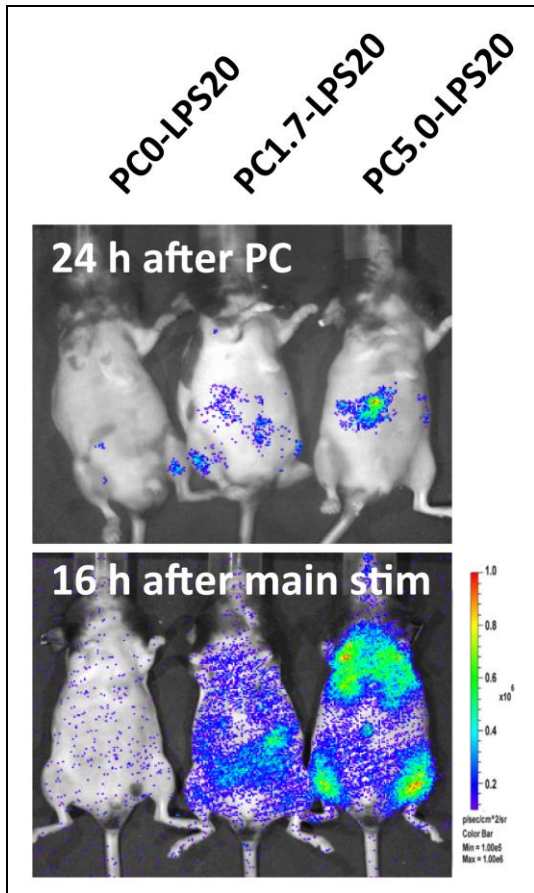


図 3. in vivo Nrf2 レポーターアッセイ

Nrf2 の主要標的分子である HO-1 は、肝臓において、非 PC 群に比して PC 群で顕著な誘導が認められた。また、免疫染色により、この HO-1 発現は主に CD163 陽性クッパー細胞に認められることが明らかになった。

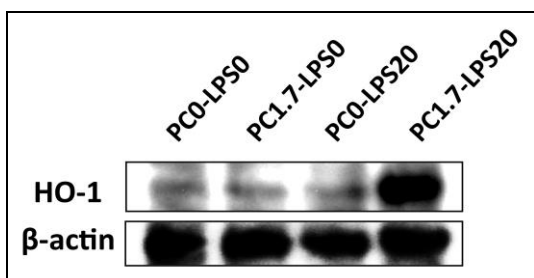


図 4. LPS の PC による HO-1 の発現変化

Nrf2 欠失マウスを用いた検討では PC 効果と

しての HO-1 誘導が認められず、PC 群においても非 PC 群同様、本刺激後の肝臓の巣状壊死、好中球浸潤、さらに肝臓内微小出血を認めた。

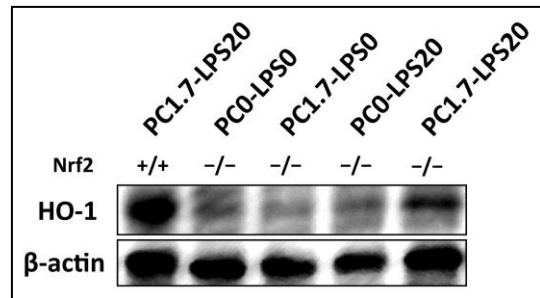


図 5. Nrf2 欠失マウスでの HO-1 の発現変化

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 5 件)

1. Hanaki T, Horikoshi Y, Nakaso K, Nakasone M, Kitagawa Y, Amisaki M, Arai Y, Tokuyasu N, Sakamoto T, Honjo S, Saito H, Ikeguchi M, Yamashita K, Ohno S, Matura T. Nicotine enhances the malignant potential of human pancreatic cancer cells via activation of atypical protein kinase C. *Biochim Biophys Acta* 2016; 1860: 2404-2415. (査読あり)
2. Nakaso K, Horikoshi Y, Takahashi T, Hanaki T, Nakasone M, Kitagawa Y, Koike T, Matura T. Estrogen receptor-mediated effect of δ -tocotrienol prevents neurotoxicity and motor deficit in the MPTP mouse model of Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 2016; 610: 117-122. (査読あり)
3. Takahashi T, Nakaso K, Horikoshi Y, Hanaki T, Yamakawa M, Nakasone M, Kitagawa Y, Matura T. Rice Bran Dietary Supplementation Improves Neurological Symptoms and Loss of Purkinje Cells in Vitamin E-deficient Mice. *Yonago Acta Med* 2016; 59: 188-195. (査読あり)
4. Nakasone M, Nakaso K, Horikoshi Y, Hanaki T, Kitagawa Y, Takahashi T, Inagaki Y, Matura T. Preconditioning by low dose LPS prevents subsequent

LPS-induced severe liver injury via Nrf2 activation in mice. *Yonago Acta Med* 2016; 59: 223-231. (査読あり)

5. Horikoshi Y, Kamizaki K, Hanaki T, Morimoto M, Kitagawa Y, Nakaso K, Kusumoto C, Matsura T. α -Tocopherol promotes HaCaT keratinocyte wound repair through the regulation of polarity proteins leading to the polarized cell migration. *BioFactors* 2018; 44(2): 180-191. (査読あり)

[学会発表](計 1 件)

1. 北川良憲, 中曾一裕, 仲宗根正人, 堀越洋輔, 松浦達也. LPS 反復投与による HO-1 の発現誘導と細網内皮系細胞内での転写調節に関する検討. 第 58 回日本生化学会 中国・四国支部例会. 2017 年 5 月 20 ~21 日. サポートホール高松(香川)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

- 出願状況(計 0 件)
- 取得状況(計 0 件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

北川 良憲 (KITAGAWA, Yoshinori)
鳥取大学・医学部附属病院・助教
研究者番号: 40595154

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

なし