

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月24日現在

機関番号：11301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2010～2011

課題番号：22890014

研究課題名（和文）

膵β細胞における Keap1-Nrf2 システムによる酸化ストレス応答機構の解明

研究課題名（英文）

The role of Keap1-Nrf2 system in oxidative stress response of pancreatic β-cells

研究代表者

宇留野 晃 (URUNO AKIRA)

東北大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：90396474

研究成果の概要（和文）：転写因子である Nrf2 は酸化ストレスなどにより活性化され、数多くの抗酸化酵素を増加させることで、ストレス防御に重要な役割を果たしている。Keap1 はストレスセンサーを感知して Nrf2 の機能を制御しており、Keap1-Nrf2 システムとして生体の環境維持に重要な役割を果たしている。本研究では、Keap1-Nrf2 システムの膵β細胞における役割について解析を行った。膵ランゲルハンス島において、Nrf2 標的遺伝子群は、酸化ストレス等によって誘導され、Nrf2 遺伝子ノックアウトマウスの膵ランゲルハンス島では Nrf2 標的遺伝子の発現は低下していた。さらに、膵β細胞障害モデルマウスにおける Nrf2 遺伝子ヘテロノックアウトは、膵ランゲルハンス島の障害を悪化させ、血糖値を上昇させた。以上より、Keap1-Nrf2 システムは膵β細胞におけるストレスに対する防御機構に重要な役割を果たしており、その破綻は糖尿病発症に結びつくことが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：Nrf2 (NF-E2-related factor 2) is a basic region-leucine zipper-type transcription factor, which belongs to the Cap'n'collar family. Nrf2 is activated by various stresses including electrophiles, reactive oxygen species (ROS), reactive nitrogen species (RNS), and heavy metals, and coordinately induces anti-oxidant enzymes. Keap1 (Kelch-like ECH-associated protein 1) is an adaptor protein for Cullin3-base ubiquitin E3 ligase and acts as a sensor for stresses, which strictly regulates the Nrf2 activity. We found that both Nrf2 and Keap1 are expressed in isolated islets from mice, and expression of Nrf2-target genes is upregulated by electrophiles, ROS and RNS. In addition, the β-cell-damaged diabetes model mice crossed with Nrf2 hetero knockout showed elevated blood glucose levels and smaller islet size. Thus, these results support our contention that the Keap1-Nrf2 system plays important roles in the maintenance of pancreatic β-cells. The results further suggest that the Keap1-Nrf2 system may be involved in the pathogenesis of diabetes mellitus in stress conditions.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,260,000	378,000	1,638,000
2011年度	1,160,000	348,000	1,508,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,420,000	726,000	3,146,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：医化学一般

キーワード：Keap1-Nrf2 システム、糖尿病、酸化ストレス

### 1. 研究開始当初の背景

Nrf2はCNCファミリーに属する転写因子であるが、親電子性物質、活性酸素種、活性窒素種、重金属類などのストレスにより活性化され、多くの解毒酵素や抗酸化酵素を誘導しストレス防御に重要な役割を果たしている。Keap1はユビキチンリガーゼのアダプタータンパク質であるがストレスセンサー機能も併せ持ち、Keap1-Nrf2 システムとして、生体の環境応答に重要な役割を果たしている。一方、膵β細胞は抗酸化遺伝子の発現が低いことが知られており、酸化ストレス防御機構の解明は糖尿病の病態の理解に重要である。

### 2. 研究の目的

(1) 膵β細胞におけるKeap1-Nrf2システムの生理的役割を解明する。

(2) 糖尿病発症におけるKeap1-Nrf2システムの役割を解明する。

### 3. 研究の方法

(1) 野生型およびNrf2遺伝子ノックアウトマウスの膵臓から膵ランゲルハンス島を単離して抗酸化遺伝子発現の解析を行った。単離膵ランゲルハンス島からのインスリン分泌の解析を行った。

(2) Nrf2遺伝子ノックアウトマウスと膵β細胞特異的酸化ストレスモデルマウスを交配して作製したマウスを用いて、生体での糖尿病の評価および抗インスリン抗体を使用した膵病理解析により、膵ランゲルハンス島の病理学的検討を行った。

### 4. 研究成果

(1) 親電子性物質、活性酸素種、活性窒素種は、膵ランゲルハンス島におけるNrf2標的遺伝子群の発現を増加させた。また、Nrf2遺伝子ノックアウトマウスから単離した膵ランゲルハンス島において、Nrf2標的遺伝子の発現低下を認めた。

Nrf2遺伝子ノックアウトマウスから単離した膵ランゲルハンス島におけるブドウ糖誘導性インスリン分泌は、野生型と比較して低下を認めた。

これらの結果より、膵ランゲルハンス島においてKeap1-Nrf2システムによる遺伝子調節機構が機能していることが明らかとなった。

(2) 生体での糖尿病発症におけるKeap1-Nrf2システムの役割を解明するために、膵β細胞障害モデルマウスにおけるNrf2遺伝子ノックアウトの影響の検討を行った。膵β細胞障害モデルマウスにおけるNrf2遺伝子ヘテロノックアウトは、膵ランゲルハンス島のインスリン染色陽性領域の縮小と、ブドウ糖負荷試験における血糖値の上昇を認めた。この結果により、Keap1-Nrf2システムは糖尿病の発症において重要な役割をしていることが明らかとなった。

(3) 以上の研究結果をまとめると、本研究において、Keap1-Nrf2システムは膵β細胞におけるストレスに対する防御機構に重要な役割を果たしており、さらにKeap1-Nrf2システムの破綻は糖尿病の発症に結びつくことが明らかとなった。

### 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 12 件)

1. Urano A, Motohashi H.  
The Keap1-Nrf2 system as an in vivo sensor for electrophiles.  
*Nitric Oxide*. 2011;25(2):153-60.  
査読有り
2. Urano A, Noguchi N, Matsuda K, Nata K, Yoshikawa T, Chikamatsu Y, Kagechika H, Harigae H, Ito S, Okamoto H, Sugawara A.  
All-trans retinoic acid and a novel synthetic retinoid tamibarotene (Am80) differentially regulate CD38 expression in human leukemia HL-60 cells: possible involvement of protein kinase C-δ  
*J Leukoc Biol*. 2011;90(2):235-47.  
査読有り
3. Urano A, Matsuda K, Noguchi N, Yoshikawa T, Kudo M, Satoh F, Rainey WE, Hui XG, Akahira JI, Nakamura Y, Sasano H, Okamoto H, Ito S, Sugawara A. Peroxisome proliferator-activated receptor-γ suppresses CYP11B2 expression and aldosterone production.  
*J Mol Endocrinol*. 2011;46(1):37-49.  
査読有り

4. Inoue D, Suzuki T, Mitsuiishi Y, Miki Y, Suzuki S, Sugawara S, Watanabe M, Sakurada A, Endo C, **Urano A**, Sasano H, Nakagawa T, Satoh K, Tanaka N, Kubo H, Motohashi H, Yamamoto M.  
Accumulation of p62/SQSTM1 is associated with poor prognosis in patients with lung adenocarcinoma.  
*Cancer Sci.* 2012;103(4):760-6.  
査読有り
  5. Zhou L, Zhang R, Wang L, Shen S, Okamoto H, Sugawara A, Xia L, Wang X, Noguchi N, Yoshikawa T, **Urano A**, Yao W, Yuan Y.  
Up-regulation of REG I  $\alpha$  accelerates tumor progression in pancreatic cancer with diabetes.  
*Int J Cancer.* 2010;127(8):1795-803.  
査読有り
  6. **宇留野晃**:  
核内受容体および肝細胞増殖因子による血管応答機構の解明  
東北医学雑誌123:203-206, 2011  
査読有り
  7. **宇留野晃**, 松田謙、野口直哉、吉川雄朗、工藤正孝、佐藤文俊、伊藤貞嘉、岡本宏、菅原明:  
チアゾリジン誘導体は PPAR  $\gamma$  および Ca<sup>2+</sup>/カルモジュリン依存性キナーゼ (CaMK) を介して副腎皮質腫瘍 H295R 細胞におけるアルドステロン分泌を抑制する  
ACTH related peptides 20:36-37, 2010  
査読無し
  8. **宇留野晃**, 菅原明、松田謙、岩崎泰正、斉藤明子、工藤正孝、伊藤貞嘉  
レチノイド受容体による POMC 転写調節機構  
ACTH related peptides 20:25-26, 2010  
査読無し
  9. **宇留野晃**, 森口尚、山本雅之  
ストレスと生体反応～Nrf2-Keap1 システムによるストレス応答制御～  
Diabetes Frontier 21:412-417, 2010  
査読無し
  10. 菅原明、**宇留野晃**、松田謙、工藤正孝、伊藤貞嘉:  
PPAR  $\gamma$  と生活習慣病  
ホルモンと臨床 58:143-148, 2010  
査読無し
  11. **宇留野晃**:  
膵  $\beta$  細胞における Keap1-Nrf2 システムの役割  
日本応用酵素協会誌 46:90-90, 2011  
査読無し
  12. **宇留野晃**:  
PPAR  $\gamma$  による CYP11B2 およびアルドステロン分泌調節機構の検討  
日本応用酵素協会誌 45:101-102, 2010  
査読無し
- [学会発表] (計 6 件)
1. **Urano A**, Matsuda K, Kudo M, Iwasaki Y, Ito S, Sugawara A.  
Effects of Retinoid X Receptor on ACTH Secretion and POMC Gene Expression in AtT20 Corticotroph Cells.  
*The Endocrine Society 93rd Annual Meeting.* June 4, 2011, Boston.
  2. Matsuda K, **Urano A**, Kudo M, Satoh F, Ito S, Sugawara A.  
Differential effects among ARBs on aldosterone synthase (CYP11B2) gene expression in human adrenal H295R cells.  
*The Endocrine Society 93rd Annual Meeting.* June 4, 2011, Boston.
  3. Yoshikawa T, Takayanagi S, Noguchi N, **Urano A**, Okamoto H, Sugawara A, Yanai K.  
Role of heparan sulfate in glucose-induced insulin secretion in MIN6 cells.  
*American Diabetes Association 70th Scientific Sessions.* June 25, 2010 Orlando.
  4. **宇留野晃**, 柳下陽子、菅原明、山本雅之:  
膵  $\beta$  細胞における Keap1-Nrf2 システムの役割  
第 77 回日本生化学会東北支部会例会  
2011 年 7 月 23 日 仙台
  5. 松田謙、**宇留野晃**、工藤正孝、佐藤文俊、伊藤貞嘉、菅原明:  
各アンジオテンシン II 受容体拮抗薬 (ARB) はアルドステロン合成酵素 (CYP11B2) 発現に異なる影響を及ぼす  
第 84 回日本内分泌学会学術総会 2011 年 4 月 22 日 神戸
  6. 工藤正孝、佐藤文俊、青木空真、森本玲、岩倉芳倫、小野美澄、松田謙、村上治、**宇留野晃**、菅原明、佐藤憲一、伊藤貞嘉:  
基本的血液検査データを用いたパターン認識手法に基づくクッシング症候群の早期診断支援システムの開発  
第 84 回日本内分泌学会学術総会 2011 年 4 月 23 日 神戸

〔図書〕（計 2 件）

1. **宇留野晃**、菅原明、松田謙、工藤正孝、岩崎泰正、伊藤貞嘉：  
レチノイン酸受容体(RAR)による POMC 遺伝子発現における転写因子 NeuroD1 および Tpit の役割  
厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業)間脳下垂体機能障害調査研究班  
平成 22 年度 総括・分担研究報告書、46-51、2011
2. **宇留野晃**、菅原明、岩崎泰正、伊藤貞嘉：  
レチノイド X 受容体(RXR)が ACTH 分泌・POMC 遺伝子発現に及ぼす影響に関する検討  
厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業)間脳下垂体機能障害調査研究班  
平成 21 年度 総括・分担研究報告書、48-54、2010

〔産業財産権〕

○出願状況（計 1 件）

1. 名称：糖尿病の予防または治療剤  
発明者：山本雅之、宇留野晃、古澤祐樹  
権利者：国立大学法人東北大学  
持田製薬株式会社  
種類：発明  
番号：特願 2012-72990  
出願年月日：2012 年 3 月 28 日  
国内外の別：国内

○取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.dmbc.med.tohoku.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宇留野 晃 (URUNO AKIRA)  
東北大学・大学院医学系研究科・助教  
研究者番号：90396474

(2) 研究分担者

研究者番号：

(3) 連携研究者

山本 雅之 (YAMAMOTO MASAYUKI)  
東北大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号：50166823