

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592052

研究課題名(和文)肺高血圧症治療ターゲットとしての抗酸化ストレス転写因子Nrf2の役割の解明

研究課題名(英文)Therapeutic potency of Nrf2, a key antioxidative transcription factor, for pulmonary hypertension

研究代表者

星川 康(Hoshikawa, Yasushi)

東北大学・加齢医学研究所・助教

研究者番号：90333814

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、薬物(oltipraz)による抗酸化ストレス転写因子Nrf2の活性化および遺伝子操作によるNrf2活性化の両者が、マウス低酸素性肺高血圧における右心室肥大や肺血管病変の増悪を抑制することを明らかにした。さらに、この抑制機序に細胞外基質、tenascin-C発現が関与する可能性を示した。同時に、低酸素により肺血管には酸化ストレスが蓄積するにもかかわらず、Nrf2標的遺伝子発現は減弱することを示した。同様の現象は、肺高血圧合併たばこ肺患者においても観察された。低酸素血症を伴う慢性呼吸器疾患の予後不良因子である肺高血圧予防の観点から、Nrf2活性化剤の臨床応用の可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：Three weeks of hypoxia exacerbated pulmonary hypertension (PH), right ventricular hypertrophy (RVH), and pulmonary vascular remodeling in mice. These pathological changes were associated with aberrant accumulation of an extracellular glycoprotein, Tenascin-C. Both administration of oltipraz, a potent Nrf2 activator, and Keap1 (negative regulator of Nrf2) knockdown significantly attenuated RVH and pulmonary vascular remodeling and concomitantly ameliorated Tenascin-C accumulation in the hypoxic mouse lungs. Expression of the Nrf2-regulated antioxidant enzymes was decreased in a patient with chronic obstructive pulmonary disease associated with PH. The decreased antioxidant enzymes may underlie the pathogenesis of cardiopulmonary changes in the patient with chronic obstructive pulmonary disease and PH. The efficacy of oltipraz highlights a promising therapeutic potency of Nrf2 activators for the prevention of PH in patients with hypoxemic lung disease.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・胸部外科学

キーワード：肺高血圧症 酸化ストレス Nrf2 遺伝子改変マウス 低酸素曝露 慢性呼吸器疾患

## 1. 研究開始当初の背景

特発性肺動脈性肺高血圧症 (IPAH, idiopathic pulmonary arterial hypertension) は肺細動脈における血管内皮細胞と血管平滑筋細胞増殖による著明な肺血管抵抗上昇と右心不全を特徴とする難治性疾患である。ほとんどの IPAH 症例は進行性であり、一般に、診断確定からの中間生存期間は 2.5~3 年、5 年生存率約 40%前後の予後不良な疾患である (D'Alonzo GE, Ann Intern Med. 1991)。その治療成績は、プロスタサイクリン (以下 PGI<sub>2</sub>) 持続静注療法の出現により飛躍的に改善されたが治療抵抗性を示す症例も少なくない。その後、PGI<sub>2</sub> に加えエンドセリン受容体拮抗薬、phosphodiesterase (PDE) 5 阻害剤が治療のオプションとして登場したが、近年の meta-analysis によるとそれらにより生命予後が改善されるとするエビデンスはない。依然として肺移植の適応となる症例も少なくないのが現状である。本邦では 1997 年 10 月の臓器移植法施行から 2010 年 9 月までの間に 173 例の肺移植が行われ、うち 41 例 (約 24%) が IPAH であった。当施設でも 10 例の IPAH 患者に対して脳死両側片肺移植および生体部分肺移植を行った。しかし、ドナー不足はいまだ深刻であり脳死肺移植患者の平均待機日数は 1000 日を越える。2010 年 9 月 30 日現在の延べ肺移植待機患者 455 人中 104 人 (約 23%) が IPAH であるが、このうち 37 人 (約 36%) が既に死亡しており、本疾患に対する新規治療法および肺移植へのブリッジング法開発は依然として極めて重要といえる。

IPAH の発症機序に関しては 1990 年代後半から 2000 年代前半にかけて Bone morphogenetic protein receptor-II (BMPRII) の突然変異や Serotonin transporter (5-HTT) promoter の遺伝子多型等多数の遺伝子異常の関与が明らかにされ、それらの機能解析に関する知見が急速に集積された。しかしいずれの遺伝子異常も全ての症例に存在するわけではなく、また現時点では治療戦略には結びついていない。我々の共同研究者である Norbert Voelkel 博士らは、IPAH 患者肺の血管病変において非常に強い酸化ストレスが生じていることを明らかにし、病態への酸化ストレスの関与を示唆した (Bowers R, Am J Respir Crit Care Med. 2004)。一方、長期低酸素曝露によりマウスやラットにおいても肺血管リモデリングを伴う肺高血圧、右心室肥大が招来されるためヒト肺高血圧症のモデルとしてしばしば用いられるが、我々は、この低酸素性肺高血圧モデルにおいても病態進展に酸化ストレスが強く関与することを示した (Hoshikawa Y, J Appl Physiol. 2001)。

Nuclear factor E2 p45-related factor 2 (Nrf2) は抗酸化剤応答配列に結合して生体防御酵素遺伝子群の発現を強力に誘導することにより酸化ストレスに対抗する転写因子である。その活性化剤である oltipraz (プロッコリスプラウト抽出物) が酸化ストレスの制御

を介して発癌を予防することが実験的に示され、その臨床応用が期待されている。

一方、我々は、低酸素性肺高血圧ラットとマウス肺の microarray analysis の結果、強い肺血管病変をきたすラット肺で著明に発現増強し、肺血管病変が軽微なマウス肺では変化しない遺伝子のひとつとして細胞増殖性の細胞外基質であるオステオポンチン遺伝子を抽出し報告した (Hoshikawa Y, Physiol Genomics. 2003)。その後、2005~2006 年度萌芽研究「オステオポンチンは肺高血圧症の発症機序・病態生理に關与するか?」(代表 星川 康) で、マウスにおけるオステオポンチン (OPN) の遺伝子操作による高発現が低酸素性肺高血圧、右心室肥大、肺血管リモデリングを著明に増強させることを明らかにした (星川 康、日本臨床. 2008) [Matsuda Y, Hoshikawa Y, Am J Respir Crit Care Med(suppl.). 2005]。さらに、IPAH 患者肺において、特異的な肺血管病変、plexiform lesion とその周囲に集積したマクロファージに OPN が高発現していることを示した (星川 康、日本臨床. 2008) [Hoshikawa Y, Chest(suppl.). 2005]。Voelkel らの示した IPAH 患者肺組織中の酸化ストレスマーカー、8-hydroxy guanosine (8-HG) の局在は、我々の示した OPN の局在と非常に似通っている。一方、近年ある種の細胞において Nrf2 を高発現させると OPN 遺伝子発現が著明に抑制されることが報告された (Hinoi E, Bone. 2007)。以上のことから、OPN が IPAH 肺血管病変における酸化ストレスの effector molecule であるとの着想に至った。細胞内酸化ストレス制御の key factor である Nrf2 の動態が肺高血圧病態を左右し、かつ Nrf2 活性化が病態制御に寄与するとの仮説を立てた。

## 2. 研究の目的

肺移植時摘出された肺高血圧患者肺あるいは剖検肺を用い、Nrf2 と誘導される抗酸化酵素群、酸化ストレス、細胞増殖性細胞外基質 OPN が関連性をもって発現していることを証明する。

低酸素曝露野生型マウスにおける右心室肥大、肺血管リモデリングに対する Nrf2 活性化剤 oltipraz の効果を検討する。

Nrf2 欠損マウス、Nrf2 活性化マウス (Keap1 の条件付き欠損 [Keap1<sup>f/f</sup>] マウス) における低酸素性肺高血圧、肺血管リモデリングの程度を野生型マウスと比較する。これらに対する急性期の肺血管攣縮の寄与についても検討する。

Nrf2 欠損マウスを用い、低酸素曝露野生型マウスにおける右心室肥大、肺血管リモデリングに対する oltipraz の効果が Nrf2 依存性か否かを明らかにする。

以上をもって Nrf2 が肺高血圧症における全く新規の治療ターゲットであることを証明する。

### 3. 研究の方法

#### 実験動物

東北大学大学院医学系研究科医化学分野 山本雅之博士より供与された C57BL6/J マウスに純系化した *Nrf2* 欠損マウス (以下 *Nrf2*<sup>-/-</sup> マウス) 及び C57BL6/J マウスに純系化した *Keap1* 条件付き欠損マウス (以下 *Keap1*<sup>fl/fl</sup> マウス) を自家繁殖させた。

実験には、Pathogen free の雄性 *Nrf2*<sup>-/-</sup> マウスと *Keap1*<sup>fl/fl</sup> マウス、野生型 C57BL6/J マウス (以下 WT マウスあるいは *Nrf2*<sup>+/+</sup> マウス) を用いた。マウスは SPF 施設内で維持し、東北大学動物実験委員会の指針に基づいて管理及び実験を施行した。

実験 (1) *Nrf2* 活性化剤、oltipraz 投与によるマウス肺 *Nrf2* 活性と *Nrf2* 遺伝子、*Nrf2* 標的遺伝子発現の変化。

(1) - 核内 *Nrf2* タンパクの Western blot analysis

*Nrf2*<sup>+/+</sup> マウスを (1) vehicle 群、(2) oltipraz 群に分け、24 時間ごとに 3 回 vehicle (0.1 ml of 1% cremophor and 25% glycerol) あるいは *Nrf2* 活性化剤、oltipraz (LKT Laboratories, Inc., MN, USA; 50 mg/kg in 0.1 ml of 1% cremophor and 25% glycerol) をゾンデを用いて胃内投与した。*Nrf2*<sup>-/-</sup> マウスを (1) vehicle 群、(2) oltipraz 群に分け、vehicle あるいは oltipraz 500 mg/kg を 1 回胃内投与した。*Keap1*<sup>fl/fl</sup> マウスにも vehicle を 1 回胃内投与した。最終の胃内投与 24 時間後に頸椎脱臼により犠牲死させ、胸骨正中切開により肺を摘出した。左肺から核タンパク質を抽出し Western blot analysis に供した。

(1) - *Nrf2*、NQO1、GCLC mRNA の定量 RT-PCR

*Nrf2* 標的遺伝子 NAD(P)H quinone oxidoreductase 1 (NQO1) と glutamate-cysteine ligase catalytic subunit (GCLC) 発現への oltipraz の容量依存性を検討する実験では、*Nrf2*<sup>+/+</sup> マウスを vehicle 群、oltipraz 5 mg/kg 群、50 mg/kg 群、500 mg/kg 群、*Nrf2*<sup>-/-</sup> マウスを vehicle マウス、oltipraz 500 mg/kg マウスに分け、vehicle あるいは oltipraz を 1 回胃内投与した 24 時間後に頸椎脱臼により犠牲死させ、胸骨正中切開により肺を摘出した。Oltipraz 投与後の肺 NQO1 遺伝子発現の時間経過を検討する実験では、*Nrf2*<sup>+/+</sup> マウスを control 群 (oltipraz 投与なし)、oltipraz 50 mg/kg 投与後 1 2 時間群、2 4 時間群、3 6 時間群、4 8 時間群に分け、それぞれのタイムポイントに犠牲死させ肺摘出した。右肺から総 RNA を抽出し、定量 RT-PCR を行った。

実験 (2) 長期低酸素曝露による野生型 (*Nrf2*<sup>+/+</sup>, WT) マウス肺高血圧、右心室肥大、肺血管リモデリングに対する oltipraz の効果。

Oltipraz (50 mg/kg in 0.1 ml of 1% cremophor and 25% glycerol) あるいは vehicle

(0.1 ml of 1% cremophor and 25% glycerol) を 24 時間おきに 2 回胃内投与した。2 回目の投与直後から hypobaric hypoxic chamber (直径 59 cm × 奥行き 88 cm の円筒形、シヅメメディカル社、Tokyo, Japan) 内 (高度 17,000 feet、気圧 410 mmHg、吸気酸素分圧 76 mmHg) あるいは室内環境 (normoxia; 気圧 760 mmHg、吸気酸素分圧 150 mmHg) で 3 週間飼育した。以後、oltipraz 50 mg/kg あるいは vehicle を 1 日 1 回、週 5 日胃内投与した。飼育中は 1 2 時間ごとに点消灯を行い、1 週間に 2 回ケージ交換、水・飼料の補充を行った。

以上の飼育方法・投与方法により *Nrf2*<sup>+/+</sup> マウスを以下の 4 群に分けた: Normoxia + vehicle、Normoxia + oltipraz、Hypoxia + vehicle、Hypoxia + oltipraz。

3 週間の低酸素曝露あるいは室内飼育終了後、ketamine hydrochloride (100 mg/kg)、xylazine (15 mg/kg) により筋注麻酔し、マウスを仰臥位に固定。26G 注射針 (TERUMO, Tokyo, Japan) を心窩部より右心室に直接経皮穿刺し右心室収縮期圧 (right ventricular systolic pressure, RVSP) を測定した (PowerLab, AD Instruments, NSW, AUSTRALIA)。心臓穿刺によりヘパリン採血しヘマトクリット (Hct) 値を測定した後、頸椎脱臼により犠牲死させた。左肺は摘出し、直ちに ISOGEN 内でホモジェナイズ後液体窒素で凍結させ、-80°C で保存、遺伝子発現検索に供した。気管切開し気管カニューラ (22G サーフロー留置針外筒、SR-OT 2225C, TERUMO, Tokyo, Japan) を挿入し、気道に 10% ホルマリン液を注入した後、心肺を一塊として摘出して浸漬固定し、右肺及び縦隔葉を免疫組織染色に供した。心臓は 24 時間ホルマリン固定後に心房や大血管を除去し、右心室と左心室 + 中隔に切り分け、右心室肥大の指標として右心室壁重量 / (左心室 + 中隔壁重量) 比 [RV / (LV + S)] を求めた。

肺血管リモデリングは、肺胞管レベルの肺細動脈筋性化の程度と細気管支レベルの肺動脈壁肥厚の 2 つで評価した。右肺及び縦隔葉のパラフィンブロックから 2µm の切片を作製し、αSMA に対する免疫組織染色を行った。肺胞管レベルの細動脈筋性化の評価は、1 群につき n=5 ずつ、1 マウスあたり 100 ずつの肺胞管レベルの外径 25µm 以下の肺細動脈に関して、顕微鏡下 (Nikon ECLIPSE 80i, Nikon, Tokyo, Japan) に、血管壁に全く αSMA 陽性細胞を認めない non-muscular、全周の 75% 未満に αSMA 陽性細胞を認める partially muscular、全周の 75% 以上に αSMA 陽性細胞を認める fully muscular の 3 つに分類し、その割合を求めた。細気管支レベルの肺動脈壁肥厚の評価は、1 群につき n=5 ずつ、1 マウスあたり 30 ずつの外径 30 - 50 µm の肺動脈に関して外径 (Ed) および内径 (Id) を顕微鏡下に測定し、外径に対する壁厚の比 (以下 Vessel wall thickness : VWT) を  $VWT = (Ed - Id) / Ed$  を求めた。

実験(3) *Nrf2*<sup>-/-</sup> (KO) マウスにおける長期低酸素曝露による肺高血圧、右心室肥大、肺血管リモデリングの *Nrf2*<sup>+/+</sup> (Wild-type, WT) マウスとの比較。

*Nrf2*<sup>-/-</sup> マウス及び *Nrf2*<sup>+/+</sup> マウスを以下の4群に分け、実験2と同様に低酸素曝露あるいは室内飼育を行った。 *Nrf2*<sup>+/+</sup> + Normoxia、*Nrf2*<sup>-/-</sup> + Normoxia、*Nrf2*<sup>+/+</sup> + Hypoxia、*Nrf2*<sup>-/-</sup> + Hypoxia。3週間後、実験2と同様に RVSP、Hct 値、RV/(LV+S) を測定し、肺胞管レベルの細肺動脈筋性化の程度と細気管支レベルの肺動脈壁肥厚 (VWT) を評価した。

実験(4) *Nrf2*<sup>-/-</sup> マウスにおける長期低酸素曝露による肺高血圧、右心室肥大、肺血管リモデリングに対する oltipraz の効果。

*Nrf2*<sup>-/-</sup> マウスを Hypoxia + vehicle、Hypoxia + oltipraz の2群に分け、実験2と同様に vehicle あるいは oltipraz 50 mg/kg を24時間おきに2回胃内投与した後 hypobaric hypoxic chamber 内で3週間飼育した。Vehicle あるいは oltipraz は1日1回、週5日胃内投与した。3週間後、RV/(LV+S) を測定し、肺胞管レベルの細肺動脈筋性化の程度と細気管支レベルの肺動脈壁肥厚 (VWT) を評価した。

実験(5) *Keap1*<sup>ff</sup> マウスにおける長期低酸素曝露による肺高血圧、右心室肥大、肺血管リモデリングの WT (*Nrf2*<sup>+/+</sup>) マウスとの比較。

*Nrf2* が恒常的に活性化された *Keap1* 条件付き欠損 (*Keap1*<sup>ff</sup>) マウス及び WT マウスを以下の4群に分け、実験2と同様に低酸素曝露あるいは室内飼育を行った。WT + Normoxia、*Keap1*<sup>ff</sup> + Normoxia、WT + Hypoxia、*Keap1*<sup>ff</sup> + Hypoxia。3週間後、実験2と同様に RVSP、Hct 値、RV/(LV+S) を測定し、肺胞管レベルの細肺動脈筋性化の程度と細気管支レベルの肺動脈壁肥厚 (VWT) を評価した。

実験(6) 低酸素曝露が WT (*Nrf2*<sup>+/+</sup>) マウス肺 *Nrf2* 標的遺伝子発現に及ぼす影響と oltipraz の効果。

(6)- 全肺組織中 NQO1、GCLC mRNA の定量 RT-PCR

WT マウスを実験2と同様に hypobaric hypoxic chamber 内あるいは室内環境で2日間あるいは7日間飼育した。頸椎脱臼により犠牲死させ左肺を摘出。実験(1)-2と同様に総 RNA を抽出した。低酸素曝露あるいは室内飼育2日後のマウス肺総 RNA は、実験(2)の Normoxia + vehicle、Hypoxia + vehicle、Hypoxia + oltipraz から抽出したものをを用いた。実験(1)-と同様に NQO1、GCLC mRNA の定量 RT-PCR を行い、各遺伝子の相対的発現量 (relative expression level) を  $\beta$ -actin mRNA 発現量で補正した。

(6)-2 NQO1、GCLC に対する免疫組織染色。

WT マウスを Normoxia + vehicle、Hypoxia + vehicle、Hypoxia + oltipraz の3群に分け、実験(2)と同様に vehicle あるいは oltipraz 50 mg/kg を24時間置きに2回胃内投与した後、室内環境あるいは hypobaric hypoxic chamber 内で2日間飼育した。Vehicle あるいは oltipraz は室内飼育あるいは低酸素曝露開始24時間後にも1回胃内投与した。犠牲死させた後、左肺から総 RNA を抽出し、実験(8)(後述)の定量 RT-PCR に供した。右肺および縦隔葉を10%ホルマリン液で伸展固定し免疫組織染色を施行した。

実験(7) 低酸素曝露がマウス肺 CD31 陽性血管内皮細胞における酸化ストレス (ROS) 蓄積、*Nrf2* および *Nrf2* 標的遺伝子発現に及ぼす影響。

(7)- ROS 蓄積の測定。

*Nrf2*<sup>+/+</sup> (WT) マウスと *Nrf2*<sup>-/-</sup> マウスを、*Nrf2*<sup>+/+</sup> + Normoxia 群、*Nrf2*<sup>+/+</sup> + Hypoxia 群、*Nrf2*<sup>-/-</sup> + Normoxia 群、*Nrf2*<sup>-/-</sup> + Hypoxia 群に分け、室内あるいは低酸素環境下で2日間飼育した。頸椎脱臼により犠牲死させた後右肺下葉を摘出し鋏で破碎。タンパク質分解酵素で処理し細胞懸濁液を作成した。血管内皮細胞を分離するために抗 CD31 抗体 (BD Pharmingen, CA, USA) と反応させ、5  $\mu$ M 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFDA Invitrogen, CA, USA) 内で37 $^{\circ}$ C、30分インキュベートし、FACS-Aria と FACS-Caliber (BD Pharmingen, CA, USA) を用いてフローサイトメトリーを行った。解析は FACS-Diva 6.0 (BD Bioscience, CA, USA) と FlowJo (TOMY Digital Biology, Tokyo, Japan) を用いて行った。

(7)- *Nrf2*、NQO1、GCLC、HO-1 mRNA の定量 RT-PCR

(7)- で作成したマウス肺細胞懸濁液から Shih らの方法を用いて CD31 陽性細胞を分離した。すなわち、ビオチン化抗 CD31 抗体 (BD Pharmingen, CA, USA) と反応させ、次いでストレプトアビジンコート磁性ビーズ (polyscience, Warrington, PA, USA) を用いて CD31 陽性細胞を回収した。総 RNA を抽出し、*Nrf2*、NQO1、GCLC、HO-1 mRNA の定量 RT-PCR を施行した。

実験(8) 強力な肺動脈中膜平滑筋細胞増殖作用を有する細胞外基質、tenascin-C (TN-C) の低酸素曝露による発現増強に対する oltipraz の効果。

(8)- TN-C mRNA の定量 RT-PCR。

実験(6)- で室内飼育あるいは低酸素曝露開始2日後の WT マウス (Normoxia + vehicle 群、Hypoxia + vehicle 群、Hypoxia + oltipraz 群) の左肺から抽出した総 RNA と、同

様のプロトコールで vehicle あるいは oltipraz 50 mg/kg を 24 時間おきに胃内投与しながら室内環境あるいは hypobaric hypoxic chamber 内で 7 日間飼育した WT マウス (Normoxia + vehicle 群 [n=4]、Hypoxia + vehicle 群 [n=4]、Hypoxia + oltipraz 群 [n=4]) 左肺から抽出した総 RNA を用いて TN-C の定量 RT-PCR を施行した。

( 8 ) - TN-C に対する免疫組織染色。

実験 ( 8 ) - の室内飼育あるいは低酸素曝露開始 7 日後の WT マウス (Normoxia + vehicle 群、Hypoxia + vehicle 群、Hypoxia + oltipraz 群)、*Nrf2*<sup>-/-</sup> マウスおよび *Keap1*<sup>ff</sup> マウス (Normoxia 群、Hypoxia 群) の右肺及び縦隔葉を 10%ホルマリン液で伸展固定し、免疫組織染色を施行した。

実験 ( 9 ) 肺高血圧患者肺における *Nrf2* 標的遺伝子発現。

( 9 ) - NQO1 及び GCLC mRNA の定量 RT-PCR。

IPAH 患者 4 例の肺移植術時摘出肺と当科で肺切除術を施行された患者の非病変部凍結肺 (control 肺) から ISOGEN (ニッポンジーン、Toyama、Japan) のプロトコールに従って総 RNA を抽出し、NQO1、GCLC mRNA に対する定量 RT-PCR を行った。

( 9 ) - NQO1、GCLC に対する免疫組織染色。

IPAH 患者肺、control 肺、そして肺高血圧を合併し呼吸不全のために死亡した COPD 症例の剖検肺のホルマリン固定パラフィンブロックから 2 $\mu$ m の切片を作製し、GLCC に対する免疫組織染色を行った。

統計学的検討

各測定値は平均値  $\pm$  標準誤差で表示した。統計ソフト Prism 5 for Mac OS X を用い、多群間の比較には one-way analysis of variance の後 Tukey's multiple comparison test を、2 群間の比較には unpaired t test を施行した。いずれの検定においても  $p < 0.05$  を有意とした。

#### 4 . 研究成果

Oltipraz の経口投与により野生型 (WT) マウス肺核分画における *Nrf2* 蛋白質が増加すること、*Nrf2* 欠損マウスでは同様の現象が見られないこと、*Keap1*<sup>ff</sup> マウスでは oltipraz 投与なしで、肺核分画への *Nrf2* 蛋白集積が見られること、oltipraz 投与によりその増強はみられないことを確認した。さらに、oltipraz 経口投与は容量依存性に WT マウス肺組織中の *Nrf2* 標的遺伝子 NQO1 と GCLC 発現を増強させた。

Oltipraz の経口投与は、野生型マウスの長期低酸素曝露による右心室肥大と肺胞管レベルの肺細動脈筋性化、より太い細気管支レベルの肺動脈壁肥厚を抑制することを明らかにした。

*Nrf2* 欠損マウスの低酸素曝露による肺血管リモデリングは野生型マウスと同程度であったが、右心室肥大はより重症であった。*Nrf2* 欠損マウスに対する oltipraz 投与は低酸素曝露による心肺病変を抑制せず、野生型マウスにおける oltipraz の効果は、*Nrf2* 依存性であることが明らかとなった。

*Keap1* の条件付き欠損 (*Keap1*<sup>ff</sup>) による *Nrf2* の恒常的な活性化が長期低酸素曝露による心肺病変に及ぼす効果は、oltipraz 投与による *Nrf2* 活性化と同様、右心室肥大、肺胞管レベルの肺細動脈筋性化、より太い細気管支レベルの肺動脈壁肥厚の抑制であった。

WT マウス肺から FACS を用いて単離した CD31 陽性 (血管内皮細胞) 分画の活性酸素種 (ROS) 蓄積 (蛍光 ROS indicator の DCFDA を使用し評価) は、低酸素曝露により高値となった。*Nrf2* 欠損マウス肺から単離した CD31 陽性細胞における低酸素曝露後 ROS 蓄積は WT に比し高い傾向を認めた。

低酸素曝露により CD31 陽性肺血管内皮細胞における酸化ストレス蓄積が招来されることから、*Nrf2* が活性化されていることが予想されたが、予想に反し、低酸素曝露 WT マウス全肺組織では *Nrf2* 標的遺伝子 NQO1 と GCLC の mRNA 発現が低下していた。免疫組織学的検討では、室内気飼育 WT マウス肺血管における NQO1 シグナルは主に肺動脈中膜に、GCLC シグナルは主に肺動脈血管内皮にみられたが、低酸素曝露 WT マウス肺動脈では、それらのシグナルをほとんど認めなかった。

低酸素曝露 WT マウス肺から単離した CD31 陽性細胞中の *Nrf2* 標的遺伝子 GCLC と HO-1 発現は室内気飼育 WT マウス肺由来の CD31 陽性細胞中の発現に比し有意に低値であった。

低酸素曝露により最も phenotype が変化する肺動脈平滑筋細胞の強力な増殖促進作用と apoptosis 抑制作用を持ち、ラット肺高血圧モデルでは前述のオステオポンチンと相補的な作用を発揮し、低酸素曝露によりオステオポンチンが誘導されないマウス肺における肺血管リモデリングでの重要な役割が示唆される細胞外マトリックス tenascin-C (TN-C) のマウス肺における変化を解析した。WT マウス肺 TN-C 遺伝子発現は、低酸素曝露 2 および 7 日語に有意に高値となり、*Nrf2* 活性化剤、oltipraz の投与により、その発現亢進は有意に抑制された。免疫組織学的解析の結果、室内飼育 WT マウスに比し低酸素曝露 WT マウスでは、肺動脈外弾性板により強い TN-C のシグナルを認めた。Oltipraz 投与 + 低酸素曝露 WT マウスでは、oltipraz を投与しない低酸素曝露 WT マウスに比し肺動脈外弾性板における TN-C のシグナルが弱かった。*Keap1*<sup>ff</sup> マウス肺では室内飼育時には WT マウスと同様の TN-C 発現パターンであったが、低酸素曝露後には oltipraz 投与 WT マウスと同様であった。低酸素曝露による肺血管リモデリングと *Nrf2* 活性化によるその抑制の機序に TN-C の関与が示唆された。

IPAH患者肺におけるNQO1とGCLC遺伝子発現は、対照肺（肺癌患者の非腫瘍部）に比し有意に高値で、免疫組織染色では、肥厚肺動脈の血管内皮や特徴的な肺動脈閉塞性叢状病変内のスリット状の血管を内張りする細胞層にNQO1とGCLCの強いシグナルを認めた（この局在は、先行研究におけるosteopontin、他科からの酸化ストレスマーカーの指標：8-hydroxydeoxyguanosineとほぼ同一であった）。低酸素曝露マウス肺とIPAH患者肺ではNrf2標的遺伝子発現が全くことなる方向性を有していることが示唆された。

ヒト対照肺においては肺血管壁で比較的強い発現を認めたNQO1とGCLCは、肺高血圧合併慢性閉塞性肺疾患（COPD）患者における肺血管では微弱なシグナルしか認めなかった。

本研究によって、Nrf2がマウス低酸素性肺高血圧モデルにおける肺血管リモデリング、右心室肥大に対して抑制的な作用を有することが明らかとなった。低酸素曝露により肺血管に酸化ストレスが蓄積するにもかかわらず、いくつかのNrf2標的遺伝子発現が低下していることが示された。同様の現象は肺高血圧合併COPD患者剖検肺においても観察された。低酸素血症を伴う慢性呼吸器疾患の最も重要な予後不良因子の1つである肺高血圧予防の観点から、Nrf2活性化剤の臨床応用が期待される。

#### 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1件）

- (1) Eba S, Hoshikawa Y, Moriguchi T, Mitsuishi Y, Satoh H, Ishida K, Watanabe T, Shimizu T, Shimokawa H, Okada Y, Yamamoto M, Kondo T. The Nrf2 Activator Oltipraz Attenuates Chronic Hypoxia-Induced Cardiopulmonary Alterations In Mice. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2013, 49(2): 324-333. DOI: 10.1165/rcmb.2011-0396OC（査読有）

〔学会発表〕（計6件）

- (1) S. Eba, Y. Hoshikawa\*, T. Moriguchi, Y. Mitsuishi, H. Sato, K. Ishida, T. Watanabe, Y. Okada, M. Yamamoto, T. Kondo. Activation of NRF2 Attenuates Hypoxia-induced Cardiopulmonary Alterations in Mice. *Aspen Lung Conference 2012*年06月07日. Aspen, CO, USA.
- (2) S. Eba, Y. Hoshikawa, T. Moriguchi, Y. Mitsuishi, H. Sato, T. Watanabe, Y. Watanabe, Y. Okada, T. Kondo. Activation Of Nrf2 Attenuates Hypoxia-Induced Cardiopulmonary Alterations In Mice. *American Thoracic Society International Conference 2012*. 2012年05月20日. San Francisco, CA, USA.
- (3) 星川 康、江場俊介、森口 尚、光石陽一郎、佐藤大希、石田和之、渡邊龍秋、岡田 克典、近藤 丘. 低酸素性肺高血圧症の病

態解明の進歩. 第52回日本呼吸器学会学術講演会(招待講演). 2012年04月20日. 神戸

- (4) 江場俊介 星川康 光石陽一郎 渡邊龍秋 川村昌輝 石橋直也 渡辺有為 野津田泰嗣 鈴木隆哉 大石久 前田寿美子 野田雅史 佐渡哲 桜田晃 遠藤千顕 岡田克典 山本雅之 近藤丘. 肺高血圧病態における抗酸化ストレス転写因子Nrf2の役割の検討. *White Conference 2012*. 2012年1月21日. 軽井沢
- (5) 江場俊介 星川康 光石陽一郎 渡邊龍秋 川村昌輝 石橋直也 渡辺有為 野津田泰嗣 鈴木隆哉 大石久 前田寿美子 野田雅史 佐渡哲 桜田晃 遠藤千顕 岡田克典 近藤丘. Nrf2活性化剤oltiprazの長期低酸素曝露による心肺病変抑制効果. *iPUC (integrated Pulmonary Circulation Research)-II*. 2011年6月25日. 東京
- (6) S Eba, Y Hoshikawa, Y Mitsuishi, H Sato, T Watanabe, Y Watanabe, S Maeda, Y Okada, T Kondo. An Nrf2 Activator, Oltipraz Attenuates Chronic Hypoxia-induced Cardiopulmonary Alterations in Mice. *American Thoracic Society International Conference 2011*. 2011年5月11日. Denver, Colorado, USA

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

星川 康 (Yasushi Hoshikawa)

東北大学・加齢医学研究所・助教  
研究者番号：90333814

##### (2) 研究分担者

近藤 丘 (Takashi Kondo)

東北大学・加齢医学研究所・教授  
研究者番号：10195901

##### (3) 研究分担者

福本 義弘 (Yoshihiro Fukumoto)

久留米大学・医学部・教授

研究者番号：70363372

##### (4) 研究分担者

野田 雅史 (Masafumi Noda)

東北大学・大学病院・講師

研究者番号：70400356

##### (5) 研究分担者

岡田 克典 (Yoshinori Okada)

東北大学・加齢医学研究所・准教授

研究者番号：90323104