

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 12 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460354

研究課題名(和文) ストレス応答型転写因子Nrf2の新規生理機能の発見

研究課題名(英文) Search for novel physiological function of transcriptional factor Nrf2

研究代表者

鈴木 隆史 (Suzuki, Takafumi)

東北大学・医学系研究科・講師

研究者番号：70508308

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：Nrf2は環境ストレスに応答して活性化する。Nrf2は通常Keap1により抑制されているが、Keap1を欠失した場合にはストレスがない状態でもNrf2は常に活性化する。Keap1欠失マウスは、食道閉塞による母乳摂取不全のため生後間もなく死亡してしまい、詳細に調べるのが困難であった。そこで、食道におけるNrf2の発現を欠失することで、成獣まで生育できるKeap1欠失マウスを作製し、食道以外の全身組織でのNrf2過剰活性化による影響を検討した。その結果、腎臓発生期のNrf2活性化は尿崩症を呈することを発見した。今後、腎性尿崩症の発症機序の理解およびその治療や予防に役立つと期待される。

研究成果の概要(英文)：Nrf2 regulates the cellular response to oxidative/electrophilic stresses, and loss of Keap1 increases Nrf2 protein level. As Keap1-null mice die of esophageal hyperkeratosis, whole-body phenotypes of Nrf2 hyperactivation in adult animals remain to be delineated. To circumvent this problem, we deleted esophageal Nrf2 in Keap1-null mice. These mice survived until adulthood, but developed polyuria with low osmolality and bilateral hydronephrosis. This novel phenotype appears to be attributable to defects in water reabsorption caused by a reduction in the level of the AQP2 channel in the kidney. This phenotype was recapitulated by renal tubular deletion of Keap1, which generated symptoms of nephrogenic diabetes insipidus, demonstrating that Nrf2 activation in developing tubular cells causes a water reabsorption defect. Our approach to rescue mice from the lethal first hit of Keap1 ablation serves as a useful tool to study novel functions of Nrf2.

研究分野：医化学

キーワード：Nrf2 Keap1 腎性尿崩症

1. 研究開始当初の背景

酸化ストレスや外来異物に対する応答系の破綻は様々な疾患の発症と密接に関わる。このような疾患を未然に防ぐ目的で、細胞はストレスに対して素早い応答で対応し恒常性を維持する。転写因子 Nrf2 は抗酸化タンパク質・異物代謝に関わる遺伝子群を統一的に制御し生体防御に働く。Nrf2 活性化機構はその抑制因子 Keap1 による分解からの脱抑制と考えられている。Nrf2 による生体防御機能の増強作用は国内外で注目を浴びており、様々な疾患の予防・治療への応用を目指して多くの Nrf2 誘導剤の開発が進んでいる。

Keap1 欠失マウスは恒常的 Nrf2 活性化により生体防御能亢進しストレスに強いスーパーマウスになると予想された。しかし驚いたことに、全身 Keap1 欠失マウスは食道の扁平上皮細胞の分化異常により角化が亢進し食道閉塞のため摂餌障害により致死に至ることが明らかになった。この表現型は Nrf2 の同時欠失によって完全に改善されたことから、Keap1 欠失による恒常的 Nrf2 活性化によってもたらされた表現型であることがわかった。Keap1 欠失マウスは生後間もなく致死に至るため、成獣における全身の恒常的 Nrf2 活性化が何を引き起こすのか調べることができなかった。

2. 研究の目的

扁平上皮特異的 Nrf2 欠失によって全身 Keap1 欠失マウスの致死性を回避し、扁平上皮以外すべての組織において Nrf2 が活性化するマウスを創出する。そして、食道以外の全身における Nrf2 活性化が引き起こす表現型を明らかにし、Nrf2 活性化が引き起こす新たな生理機能発見を目的とした。

3. 研究の方法

これまでに Keratin5-Cre(K5Cre)を用いた扁平上皮特異的 Keap1 欠失マウスが全身 Keap1 欠失マウスと同様に食道において Nrf2 活性化および過角化を起こし致死に至ることを明らかにしていた。すなわち食道過角化および致死の表現型は扁平上皮における Nrf2 活性化に起因する。そこで、本研究では、逆に全身 Keap1 欠失マウスにおいて扁平上皮特異的 Nrf2 欠失することにより致死性を回避し、全身 Keap1 欠失マウスの致死性を回避し、その表現型を調べた。

4. 研究成果

食道以外の全身の臓器・組織で Nrf2 が過剰活性化した成獣マウスを詳しく調べたところ、腎尿細管のアクアポリン水チャネルの発現量が低下することにより、水の保持機構が正常に働かなくなり、大量の尿を排泄する病態、すなわち尿崩症を引き起こすことが明らかになった。この事象をさらに検討するために、Keap1 遺伝子の発現を胎児期から腎臓特異的に破壊して、Nrf2 を活性化させたマウ

スを作成したが、このマウスも、同じように尿崩症を発症したことから、腎臓における Nrf2 活性化が原因であることが実証された。一方、成獣になってから同様に Keap1 遺伝子を破壊して、腎臓特異的に Nrf2 を活性化させたマウスは、尿崩症を発症しなかった。これらの検討結果から、この腎性尿崩症の発症には腎臓の発生期における Nrf2 の過剰活性化が重要であることが理解された。すなわち、腎臓の発生期における Nrf2 の過剰活性化は尿崩症を引き起こすことが明らかになった。

腎性尿崩症は、抗利尿ホルモン 2 型受容体の遺伝子異常による先天性の病型がよく知られているが、環境要因による後天性の腎性尿崩症の原因はこれまでよくわかっていなかった。本研究により、マウスの腎臓形成期における過剰なストレスによる Nrf2 の異常活性化が腎性尿崩症を引き起こす可能性が示された。このことから、ヒトにおいても腎臓形成期である胎児・乳児期に環境汚染物質などに暴露すると、Nrf2 が過剰活性化し、その結果として腎性尿崩症を引き起こす可能性があることが示唆された。本研究の成果は、今後の腎性尿崩症の発症機序の理解に役立つことが期待される。

また、Nrf2 は酸化ストレスなどに対する生体保護に働くため、Nrf2 活性化剤は腎臓を含む様々な臓器を対象に、疾患の予防や治療に応用されることが期待されている。本研究の知見は、妊婦・乳幼児が Nrf2 活性化剤を服用すると後天的な腎性尿崩症を発症するリスクがあることを示唆しており、この知見は今後の Nrf2 活性化剤の開発において役立つことが期待される。

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 12 件)(全て査読あり)

1. Suzuki T, Seki S, Hiramoto K, Naganuma E, Kobayashi HE, Yamaoka A, Baird L, Takahashi N, Sato H and Yamamoto M. (2017) Hyperactivation of Nrf2 in early tubular development induces nephrogenic diabetes insipidus. *Nature Communications*. 8, 14577. doi: 10.1038/NCOMMS14577.
2. Higashi C, Kawaji A, Tsuda N, Hayashi M, Saito R, Yagishita Y, Suzuki T, Uruno A, Nakamura M, Nakao K, Furusako S, Yamamoto M. (2017) The novel Nrf2 inducer TFM-735 ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis in mice. *Eur J Pharmacol*. 2017 Feb 25. pii: S0014-2999(17)30130-9. doi: 10.1016/j.ejphar.2017.02.044.
3. Hidaka T, Ogawa E, Kobayashi HE, Suzuki T, Funayama R, Nagashima T, Fujimura T, Aiba S, Nakayama K, Okuyama R, Yamamoto M. (2017) The aryl hydrocarbon

- receptor AhR links atopic dermatitis and air pollution via induction of neurotrophic factor Artemin. *Nature Immunology*. 18, 64-73. doi: 10.1038/ni.3614.
4. Iso T, **Suzuki T**, Baird L, Yamamoto M. (2016) Absolute amounts and status of Nrf2-Keap1-Cul3 complex within cells. *Molecular and Cellular Biology*, 36, 3100-3112. doi: 10.1128/MCB.00389-16
 5. Nezu M, Souma T, Yu L, **Suzuki T**, Saigusa D, Ito S, Suzuki N, and Yamamoto M. (2016) Nrf2 hyperactivation in early-phase renal ischemia-reperfusion injury prevents tubular damage progression. *Kidney International*. 91, 387-401. doi: 10.1016/j.kint.2016.08.023.
 6. Saito T, Ichimura Y, Taguchi K, **Suzuki T**, Mizushima T, Takagi K, Hirose Y, Nagahashi M, Iso T, Fukutomi T, Ohishi M, Endo K, Uemura T, Nishito Y, Okuda S, Obata M, Kouno T, Imamura R, Tada Y, Obata R, Yasuda D, Takahashi K, Fujimura T, Pi J, Lee MS, Ueno T, Ohe T, Mashino T, Wakai T, Kojima H, Okabe T, Nagano T, Motohashi H, Waguri S, Soga T, Yamamoto M, Tanaka K, and Komatsu M. (2016) p62/Sqstm1 promotes malignancy of HCV-positive hepatocellular carcinoma through Nrf2-dependent metabolic reprogramming. *Nature Communications*. 7, 12030. doi: 10.1038/ncomms12030.
 7. Kobayashi HE, **Suzuki T**, Funayama R, Nagashima T, Hayashi M, Sekine H, Tanaka N, Moriguchi T, Motohashi H, Nakayama K, and Yamamoto M. (2016) Nrf2 suppresses macrophage inflammatory response by blocking proinflammatory cytokine transcription. *Nature Communications*. 7, 11624. doi: 10.1038/ncomms11624.
 8. Saito R, **Suzuki T**, Hiramoto K, Asami S, Naganuma E, Suda H, Iso T, Yamamoto H, Morita M, Baird L, Furusawa Y, Negishi T, Ichinose M, Yamamoto M. (2016) Characterizations of Three Major Cysteine Sensors of Keap1 in Stress Response. *Molecular and Cellular Biology*. 36, 271-284. doi: 10.1128/MCB.00868-15.
 9. Ito A, Shimazu T, Maeda S, Shah AA, Tsunoda T, Iemura S, Natsume T, **Suzuki T**, Motohashi H, Yamamoto M, Yoshida M. (2015) The subcellular localization and activity of cortactin is regulated by acetylation and interaction with Keap1. *Science Signaling*. 8, ra120. doi: 10.1126/scisignal.aad0667.
 10. **Suzuki T**, Yamamoto M. (2015) Molecular basis of the Keap1-Nrf2. *Free Radic Biol Med*. 88, 93-100. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2015.06.006.
 11. Hiramoto K, Satoh H, **Suzuki T**, Moriguchi T, Pi J, Shimosegawa T, Yamamoto M. (2014) Myeloid lineage-specific deletion of antioxidant system enhances tumor metastasis. *Cancer Prevention Research* 7, 835-844. doi: 10.1158/1940-6207.CAPR-14-0094.
 12. Miyazaki Y, Shimizu A, Pastan I, Taguchi K, Naganuma E, **Suzuki T**, Hosoya T, Yokoo T, Saito A, Miyata T, Yamamoto M, Matsusaka T. (2014) Keap1 inhibition attenuates glomerulosclerosis. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 29, 783-791. doi: 10.1093/ndt/gfu002.
- [学会発表](計 24 件)
1. **鈴木隆史**, 山本雅之 Keap1 の反応性システイン残基による多様なストレス感知機構 第 69 回日本酸化ストレス学会学術集会 仙台国際センター(仙台市) 2016 年 8 月 30-31 日
 2. **鈴木隆史**, 山本雅之 Keap1 センサーシステイン残基による多様なストレス感知機構 第 89 回日本生化学会大会 仙台国際センター(仙台市) 2016 年 9 月 25-27 日
 3. 吉田瑛紀, **鈴木隆史**, 長沼絵理子, 小林枝里, 守田匡伸, 山本雅之 Nrf2 活性化は骨形成低下を引き起こす 第 89 回日本生化学会大会仙台国際センター(仙台市) 2016 年 9 月 25-27 日
 4. 小林枝里, **鈴木隆史**, 舟山亮, 長嶋剛史, 中山啓子, 山本雅之 転写因子 Nrf2 による炎症性サイトカイン遺伝子の転写阻害 第 89 回日本生化学会大会 仙台国際センター(仙台市) 2016 年 9 月 25-27 日
 5. 日高高德, 小林枝里, **鈴木隆史**, 山本雅之 Air pollution induces Atopic dermatitis-like pathologies via Aryl hydrocarbon receptor 第 89 回日本生化学会大会 仙台国際センター(仙台市) 2016 年 9 月 25-27 日
 6. **Suzuki T**, Saito R, Hiramoto K, Asami S, Naganuma E, Suda H, Iso T, Yamamoto H, Morita M, Baird L, Furusawa Y, Negishi T, Ichinose M, Yamamoto M. Characterizations of Three Major Cysteine Sensors of Keap1 in Stress Response. The 9th International Conference on the Biology, Chemistry, and Therapeutic Applications of Nitric Oxide, and the 16th Annual Scientific Meeting of the Nitric Oxide Society of Japan, Symposium Redox signaling in oxidative stress, Sendai International Center, Sendai, May 20-22, 2016.
 7. Takanori Hidaka, Eri H Kobayashi, **Takafumi Suzuki**, Masayuki Yamamoto. Air pollution activates Aryl hydrocarbon receptor of un-differentiated keratinocytes, leading to Atopic dermatitis-like pathologies. 46th Annual Meeting of the

- European Society for Dermatological Research. the Technical University of Munich, Munich, Germany, September 7-10, 2016
8. Takanori Hidaka, Eri Kobayashi, Takafumi Suzuki, Taku Fujimura, Setsuya Aiba, Masayuki Yamamoto. *AhR activation induces atopic dermatitis*. The 26th Annual Meeting of Korean Society for Investigative Dermatology, Seoul, Republic of Korea, March 25-26, 2016.
 9. Takanori Hidaka, Eri H Kobayashi, Takafumi Suzuki, and Masayuki Yamamoto. *Air pollution activates Aryl hydrocarbon receptor in murine epidermis, leading to Atopic dermatitis-like pathologies*. The 41st Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology, Sendai international center, Sendai, Japan, December 9-11, 2016.
 10. Higashi C, Hayashi M, Tsuda N, Kawaji A, Nakao K, Satoh F, Nakamura M, Furusako S, Saito R, Suzuki T, Uruno A, Yamamoto M. A novel Nrf2 inducer TFM-735 ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis in mice. 32nd Congress of the European Committee for Treatment and Research in Multiple Sclerosis, London, UK. September 14-17, 2016
 11. 鈴木隆史 Keap1-Nrf2 系による生体防御機構 第 64 回脳研・高度先進合同セミナー 弘前大学, 弘前市 2015 年 4 月 23 日
 12. 磯達朗, 鈴木隆史, 山本雅之. ストレス応答における Nrf2, Keap1, Cul3 の細胞内分子挙動の解析 第 81 回日本生化学会東北支部例会, 片平さくらホール, 仙台, 2015 年 5 月 9 日
 13. 森脇さや香, 後藤志麻, 宮脇出, 出口二郎, 船橋斉, 鈴木隆史, 山本雅之 Nrf2 欠損マウスにおけるアセトアミノフェン誘発性肝障害の機序検討~ミトコンドリア Fusion/Fission へ及ぼす影響~ 第 42 回日本毒性学会学術年会, 石川県立音楽堂, 金沢 2015 年 6 月 29 日-7 月 1 日
 14. 斎藤良太, 平本圭一郎, 浅見颯一郎, 鈴木隆史, 山本雅之 新規変異体創出によるストレスセンサー Keap1 のシステム残基の機能解明 BMB 2015 神戸ポートアイランド, 神戸 2015 年 12 月 1-4 日
 15. 浅見颯一郎, 斎藤良太, 平本圭一郎, 鈴木隆史, 山本雅之 ストレスセンサー Keap1 のシステム変異体ノックインマウスの機能解析 BMB 2015 神戸ポートアイランド, 神戸 2015 年 12 月 1-4 日
 16. 鈴木香絵, 椎名政昭, 浜田恵輔, 石川涼平, 金井達哉, 豊後泰子, 岡田千佳子, 馬場しほ, 鈴木隆史, 太田力, 山本雅之, 緒方一博 分子構造に基づく転写因子 Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2(Nrf2) の抗酸化剤応答配列認識機構の解析 BMB 2015 神戸 2015 年 12 月 1-4 日
 17. Takafumi Suzuki, Ryota Saito, Kei-ichiro Hiramoto, Tatsuro Iso, Masayuki Yamamoto. Keap1 Cys273 and Cys288 are functional sensors for 15d-PGJ₂ to activate Nrf2 signaling. The Keap1/Nrf2 Pathway in Health and Disease. Robinson College, Cambridge, UK. January 6-8 2015.
 18. Eri H. Kobayashi, Takafumi Suzuki, Masayuki Yamamoto. Myeloid-specific transcriptional regulation by Nrf2. The Keap1/Nrf2 Pathway in Health and Disease. Robinson College, Cambridge, UK. January 6-8 2015.
 19. 鈴木隆史, 柴田龍弘, 高屋快, 本橋ほづみ, 山本雅之 転写因子 Nrf2 の遺伝子発現量の重要性 日本生化学会東北支部第 80 回例会 秋田パークホテル, 秋田 2014 年 5 月 10 日
 20. 小林枝里, 鈴木隆史, 舟山亮, 長嶋剛史, 中山啓子, 山本雅之 転写因子 Nrf2 による炎症性サイトカイン遺伝子の発現抑制 第 87 回日本生化学会大会 国立京都国際会館, 京都 2014 年 10 月 15-18 日
 21. 小林枝里, 鈴木隆史, 舟山亮, 長嶋剛史, 中山啓子, 山本雅之 ストレス応答型転写因子 Nrf2 による炎症性サイトカイン遺伝子の発現抑制 修飾シグナル病 若手ワークショップ ホテルあかね, 湯河原町 2014 年 9 月 30 日-10 月 2 日
 22. 鈴木隆史, 平本圭一郎, 長沼絵理子, 高橋信行, 佐藤博, 山本雅之 複合遺伝子欠失レスキュー法による転写因子 Nrf2 の新規生理機能探索 第 87 回日本生化学会大会 国立京都国際会館, 京都 2014 年 10 月 15-18 日
 23. 守田匡伸, 大槻晃史, 鈴木隆史, 須田博美, 鈴木未来子, 清水律子, 山本雅之 CRISPR/Cas9 システムを用いた Nrf2 点変異マウスの作製 第 87 回日本生化学会大会 国立京都国際会館, 京都 2014 年 10 月 15-18 日
 24. Takafumi Suzuki, Kai Takaya, Ryota Saito, Keiichiro Hiramoto, Tatsuro Iso and Masayuki Yamamoto. Multiple Sensor Mechanism of the Keap1-Nrf2 System. Symposium for young ubiquitin researchers in Japan "New Era in the Ubiquitin Research" Internal Institute for Advanced Studies, Kyoto, Japan. November 11-12, 2014
- 〔図書〕(計 1 件)
1. 鈴木隆史, 山本雅之 カラー図解 人体の細胞生物学 第 3 章 3. 遺伝子発現の調節 日本医事新報社 印刷中
- 〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

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
東北大学・大学院医学系研究科 医化学分野
<http://www.dmbc.med.tohoku.ac.jp/official/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 隆史 (SUZUKI, Takafumi)
東北大学・大学院医学系研究科・講師
研究者番号：70508308

(2) 研究協力者

関 詩織 (SEKI, Shiori)
東北大学・医学部保健学科・学生

平本 圭一郎 (HIRAMOTO, Keiichiro)
東北大学・大学院医学系研究科・大学院生

長沼 絵理子 (NAGANUMA, Eriko)
東北大学・大学院医学系研究科・技術補助員

高橋 信行 (TAKAHASHI, Nobuyuki)
東北大学・大学院薬学系研究科・准教授
研究者番号：40588456

佐藤 博 (SATO, Hiroshi)
東北大学・大学院薬学系研究科・教授
研究者番号：60215829

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