

## 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 1 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790127

研究課題名（和文）生体防御システムの破綻と病態

研究課題名（英文）Pathogenesis by disrupting the cytoprotective system

研究代表者

田口 恵子（TAGUCHI KEIKO）

東北大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：20466527

研究成果の概要（和文）：生体防御システムの破綻と病態

Keap1-Nrf2 システムは内因性・外因性刺激に対して生体防御遺伝子群の発現を制御する。Keap1 欠損マウスにおける恒常的な Nrf2 の活性化は上部消化管に過角化を引き起こすことが報告されている。本研究では、タンパク質分解系オートファジー不全時における Keap1-Nrf2 システムの破綻が引き起こす肝病態について解析した。その結果、Keap1 により Nrf2 の活性が適切に制御される重要性を示した。

研究成果の概要（英文）：Pathogenesis by disrupting the cytoprotective system

Keap1-Nrf2 system regulates a battery of cytoprotective genes in response to both endogenous and exogenous stimuli. Constitutive Nrf2 activation by Keap1 deletion leads to hyperkeratosis in the upper digestive tract. In this study, we examined impaired autophagy activates Nrf2 to cause liver injury. The results indicate that Nrf2 activation needs properly regulation by Keap1.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：環境衛生学

科研費の分科・細目：薬学・環境衛生学

キーワード：転写因子・蛋白質分解・肝臓

## 1. 研究開始当初の背景

Keap1-Nrf2 システムは内因性・外因性刺激に対して生体防御遺伝子群の発現を制御する環境応答転写因子として知られている。我々は遺伝子改変マウスを利用して、生体における Keap1-Nrf2 システムの役割を解析している。通常、Nrf2 の活性化は Keap1 により負に制御されている。内因性・外因性刺激

により Keap1 と Nrf2 の相互作用が阻害されると、Nrf2 の活性が上昇する。しかし、Keap1 欠損マウスでみられる恒常的な Nrf2 の活性化は上部消化管に過角化をもたらして致死となる。このことから、内因性・外因性刺激による一過的な Nrf2 活性化と異なり、恒常的な Nrf2 の活性化は生体において病態をもたらすことが示された。

我々は、東京都臨床医学総合研究所・田中啓二博士および小松雅明博士らとの共同研究により、タンパク質分解システムのひとつであるオートファジーが肝臓で破綻すると p62 タンパク質の異常蓄積が起これ、これが Nrf2 の恒常的な活性化を引き起こして肝傷害をもたらすことを見出した (Komatsu et al., Nat Cell Biol, 2011)。また、このときに Keap1 タンパク質が蓄積することを見つけた。

## 2. 研究の目的

オートファジー不全時にみられる肝病態と Keap1-Nrf2 システムについて調べることに、Keap1-Nrf2 システムの破綻と病態との関連を明らかとする。オートファジーが破綻すると蓄積した p62 が Nrf2 を活性化する。オートファジーの破綻でみられる肝傷害は、p62 の蓄積によるのか、p62 の蓄積による Nrf2 の活性化によるのかについて調べる。さらに、オートファジー不全時に蓄積する Keap1 タンパク質の分解システムについて調べる。

## 3. 研究の方法

肝臓特異的オートファジー不全マウス (Atg7-Alb)、Keap1 や Nrf2 欠損マウスを利用することにより、各種複合マウスを作製して、個体レベルにおける病態について調べた。リアルタイム PCR により mRNA レベルを、また、ウェスタンブロットによりタンパク質レベルを定量した。

## 4. 研究成果

オートファジー不全マウス (Atg7-Alb) の肝臓では、p62 が異常蓄積した。p62 の蓄積は Keap1 と Nrf2 の相互作用を阻害することにより、結果的に Nrf2 を活性化して肝傷害を引き起こした。Atg7-Alb における肝傷害は、p62 欠失 (Atg7-Alb:p62) あるいは Nrf2 欠失 (Atg7-Alb/Nrf2) により改善し、Keap1 欠失 (Atg7:Keap1-Alb) により増悪した。オートファジー不全でみられる肝病態が p62 蓄積による Nrf2 活性化によるのか、Nrf2 活性化そのものによるのかを調べるため、Atg7:Keap1-Alb/p62、または、Atg7:Keap1-Alb/Nrf2 の三重欠損マウスを作製した。Atg7:Keap1-Alb の肝傷害は、p62 欠失では一部改善が見られたが、Nrf2 欠失では p62 の蓄積は見られるものの完全に消失した。よって、オートファジー不全でみられる肝傷害は、p62 の異常蓄積ではなく、Nrf2 の活性化が直接的な原因であることが明らかとなった。

Atg7-Alb では p62 の蓄積と同様に、Keap1 の蓄積が見られた。この Keap1 の蓄積は、mRNA レベルではなくタンパク質レベルであった。

よって、Keap1 はオートファジーで分解されるタンパク質であることが疑われた。

そこで、HepG2 細胞株を用いて、細胞レベルで Keap1 タンパク質の分解について検討した。栄養飢餓によりオートファジーを促進すると、Keap1 タンパク質レベルの減少が見られた。一方、各種オートファジー阻害剤では Keap1 タンパク質に変化は見られなかった。シクロヘキシミド処理により、Keap1 タンパク質の半減期は 12 時間であった。Keap1 タンパク質のシステイン残基を標的とした、いくつかの親電子性試薬 (Nrf2 活性化剤) を同時に処理すると、半減期は 3-10 時間にはやまった。よって、化学修飾を受けた Keap1 タンパク質は早く分解されることが示唆された。

以上より、オートファジー不全でみられる肝傷害は Nrf2 の活性化が原因であり、Keap1 により Nrf2 の活性化が適切に制御される重要性を示した。

## 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 13 件)

1. Okada K, Warabi E, Sugimoto H, Horie M, Tokushige K, Ueda T, Harada N, Taguchi K, Hashimoto E, Itoh K, Ishii T, Utsunomiya H, Yamamoto M, Shoda J (2012) Nrf2 inhibits hepatic iron accumulation and counteracts oxidative stress-induced liver injury in nutritional steatohepatitis. *J Gastroenterol, in press*  
査読有り
2. Cheng Q, Taguchi K, Aleksunes LM, Manautou JE, Cherrington NJ, Yamamoto M, Slitt AL (2011) Constitutive activation of nuclear factor-E2-related factor 2 induces biotransformation enzyme and transporter expression in livers of mice with hepatocyte-specific deletion of Kelch-like ECH-associated protein 1. *J Biochem Mol Toxicol*, 25:320-329  
査読有り
3. Miura T, Shinkai Y, Jiang HY, Iwamoto N, Sumi D, Taguchi K, Yamamoto M, Jinno H, Tanaka-Kagawa T, Cho AK, Kumagai Y (2011) Initial response and cellular protection through the Keap1/Nrf2 system during exposure of primary mouse hepatocytes to 1,2-naphthoquinone. *Chem Res*

- Toxicol, 24:559-567  
査読有り
4. Inoue D, Kubo H, Taguchi K, Suzuki T, Komatsu M, Motohashi H, Yamamoto M (2011) Inducible disruption of autophagy in the lung causes airway hyper-responsiveness. *Biochem Biophys Res Commun*, 405:13-18  
査読有り
  5. Yamano S, Shibata M, Kita H, Matsusue K, Narimatsu S, Taguchi K, Kumagai Y (2011) Two-electron quinone reductase (AKR1C isozyme) augments the oxidative DNA damage induced by quinones in diesel exhaust particles by accelerating redox cycling. *J Health Sci*, 57:107-114  
査読有り
  6. 田口恵子 (2011) Nrf2-Keap1 生体防御システムの機能とその破綻による病態の解明、*東北醫學雑誌*、123: 51-45  
査読無し
  7. Taguchi K, Motohashi H, Yamamoto M (2011) Molecular mechanisms of the Keap1-Nrf2 pathway in stress response and cancer evolution. *Genes Cells*, 16: 123-140  
査読有り
  8. Komatsu M, Kurokawa H, Waguri S, Taguchi K, Kobayashi A, Ichimura Y, Sou YS, Ueno I, Sakamoto A, Tong KI, Kim M, Nishito Y, Iemura S, Natsume T, Ueno T, Kominami E, Motohashi H, Tanaka K, Yamamoto M (2010) The selective autophagy substrate p62 activates the stress responsive transcription factor Nrf2 through inactivation of Keap1. *Nat Cell Biol*, 12:213-223  
査読有り
  9. Taguchi K, Maher JM, Suzuki T, Kawatani Y, Motohashi H, Yamamoto M (2010) Genetic Analysis of Cytoprotective Functions Supported by Graded Expression of Keap1. *Mol Cell Biol*, 30:3016-3026  
査読有り
  10. Riley BE, Kaiser SE, Shaler TA, Ng AC, Hara T, Hipp MS, Lage K, Xavier RJ, Ryu KY, Taguchi K, Yamamoto M, Tanaka K, Mizushima N, Komatsu M, Kopito RR (2010) Ubiquitin accumulation in autophagy-deficient mice is dependent on the Nrf2-mediated stress response pathway: a potential role for protein aggregation in autophagic substrate selection. *J Cell Biol*, 191:537-552  
査読有り
  11. Satoh H, Moriguchi T, Taguchi K, Takai J, Maher JM, Suzuki T, Winnard PT Jr, Raman V, Ebina M, Nukiwa T, Yamamoto M (2010) Nrf2-deficiency creates a responsive microenvironment for metastasis to the lung. *Carcinogenesis*, 31:1833-1843  
査読有り
  12. Gebel S, Diehl S, Pype J, Friedrichs B, Weiler H, Schüller J, Xu H, Taguchi K, Yamamoto M, Müller T (2010) The transcriptome of Nrf2<sup>-/-</sup> mice provides evidence for impaired cell cycle progression in the development of cigarette-smoke-induced emphysematous changes. *Toxicol Sci*, 115:238-252  
査読有り
  13. Sugimoto H, Okada K, Shoda J, Warabi E, Ishige K, Ueda T, Taguchi K, Yanagawa T, Nakahara A, Hyodo I, Ishii T, Yamamoto M (2010) Deletion of nuclear factor-E2-related factor-2 leads to rapid onset and progression of nutritional steatohepatitis in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 298:G283-294  
査読有り
- [学会発表] (計 6件)
1. 田口恵子、本橋ほづみ、山本雅之、Keap1-Nrf2 システムと Pten-PI3K-Akt シグナルのクロストークは肝臓における細胞増殖と分化を制御する、GCOE 冬の合宿 2012、秋保温泉、2012年2月4-5日
  2. 田口恵子、藤川奈々子、本橋ほづみ、山本雅之、転写因子 Nrf2 の活性制御タンパク質 Keap1 の分解と合成、フォーラム 2011：衛生薬学・環境トキシコロジー、金沢市、2011年10月27-28日
  3. Nanako Fujikawa, Keiko Taguchi,

Hozumi Motohashi, Masayuki Yamamoto. Keap1 degradation by autophagy for the maintenance of redox homeostasis. 16th World Congress on Advances in Oncology and 14th International Symposium on Molecular Medicine. 381, Hotel Rodos Palace, Rhodes Island in Greece, 2011/October 6-8

4. Keiko Taguchi, Hozumi Motohashi, Masayuki Yamamoto. Co-activation of Nrf2 and Akt causes bile ductal metaplasia. Tohoku University Global COE for conquest of Signal Transduction Diseases with "Network Medicine", Network Medicine Winter Camp of GCOE, 2011/February 5-6, Akiu, Miyagi

5. 田口恵子、鈴木隆史、本橋ほづみ、山本雅之、上皮細胞における転写因子 Nrf2 の活性化、フォーラム 2010: 衛生薬学・環境トキシコロジー、2010年9月9日、星薬科大学

6. 田口恵子、鈴木隆史、本橋ほづみ、山本雅之、上皮細胞における転写因子 Nrf2 の活性化、第76回日本生化学会東北支部会例会、2010年5月8日、コラッセ福島

[図書] (計 1件)

1. 田口恵子、山本雅之 (2012) 羊土社、実験医学 2012 増刊号「シグナル伝達研究の最前線 2012-2013」7. 活性酸素種や親電子性物質によるシグナル伝達、759-765

[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

田口 恵子 (TAGUCHI KEIKO)  
東北大学・大学院医学系研究科・助教  
研究者番号：20466527

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：