

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 3 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592288

研究課題名(和文) 転写因子Nrf2活性化による急性肺傷害の保護に関する研究

研究課題名(英文) Study on protection by Nrf2 activation against acute lung injury

研究代表者

持田 晋輔 (MOCHIDA, Shinsuke)

鳥取大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：70403433

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、転写因子Nrf2を誘導し、リポポリサッカライド(LPS)により惹起される急性肺傷害を予防することが可能かどうかを細胞実験および動物実験で検討した。RAWマクロファージ細胞を用いた細胞実験では、ヒドロキノンとクルクミンがNrf2によって発現が増加する細胞内ヘムオキシゲナーゼ-1の発現を増強し、LPS添加後のRAW細胞の一酸化窒素産生を抑制した。マウスを用いた動物実験では、低濃度LPSの前刺激後に致死量のLPSで本刺激した場合、本刺激後に前刺激マウスのみにおいて著明な全身発光が見られ、LPS前刺激は本刺激後のNrf2活性化を亢進させることにより生存率を改善することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we investigated whether Nrf2 activation suppresses macrophage activation as well as acute lung injury in mice induced by lipopolysaccharide (LPS). Hydroquinone and curcumin inhibited the production of nitric oxide in RAW macrophage cells treated with LPS via activation of Nrf2. When mice were treated with low dose of LPS followed by its lethal dose, all mice survived via marked induction of Nrf2 after treatment with lethal dose of LPS.

It was suggested that Nrf2 activation could protect against LPS-induced acute lung injury in mice.

研究分野：麻酔・蘇生・集中治療学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・麻酔・蘇生学

キーワード：Nrf2 急性肺傷害 ポリフェノール エンドトキシン マクロファージ

### 1. 研究開始当初の背景

手術等の侵襲的処置を受ける患者にとって、術後の敗血症に起因する臓器障害は予後に大きな影響を及ぼすとされており、これらの予防は周術期管理学上の重要な課題とされている。敗血症の病態には、グラム陰性菌の細胞壁成分であるリポポリサッカライド (LPS) により活性化された単球/マクロファージにより産生される炎症性サイトカインなどの種々の炎症性メディエーターや活性酸素の関与が指摘されている。この観点から、抗酸化剤投与や抗サイトカイン療法などが考案されているが、サイトカインには多くのネットワークが存在し、単一あるいは数種類のサイトカインを抑制するのみでは改善しない症例も多く存在する。転写因子 Nrf2 はゲノム上転写調節領域の antioxidant response element (ARE) を介して、抗酸化能を有する様々なタンパク質の発現を誘導することが報告されている (図1)。このシステムは単独の転写因子を活性化することにより、複数の内在性抗酸化タンパク質を同時に誘導することが可能である。さらに、発現誘導されたタンパク質群が互いに酸化還元のリサイクルシステムを形成し、長時間にわたって抗酸化能を維持することができるため、今までにない観点から抗酸化治療への応用が可能であると考えられる。また、Nrf2 は TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、COX-2、iNOS などの炎症性サイトカインやメディエーターの抑制に関与することが報告されている (Lin et al., *Biochem Pharmacol* 76:967-973, 2008)。さらに、Nrf2 が自然免疫の重要な調節因子として働き、敗血症を防御することが、Nrf2 欠損マウスを用いて報告されている (Thimmulappa et al., *J Clin Invest* 116:984-995, 2006)。しかしながら、Nrf2 を活性化させて敗血症に伴う急性肺傷害を予防する研究はほとんど行われていない。そこで Nrf2 活性化により、LPS により誘導される急性肺傷害を予防できるかを細胞実験および動物実験にて検討した。

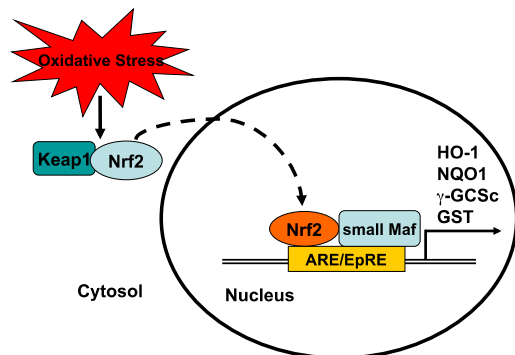


図1. 転写因子Nrf2による抗酸化蛋白遺伝子発現のメカニズム

### 2. 研究の目的

本研究は、転写レベルでの予防(治療)法を開発することを目的に、主に食品機能性成分等により、数多くの抗酸化タンパク質や炎症因子を誘導することが知られている転

写因子 Nrf2 を誘導し、内在性の抗酸化および抗炎症システムを同時に活性化させることにより LPS により惹起される急性肺傷害を予防することが可能かどうかを検討する研究である。

本研究により、食品機能性成分等の標的分子を含めた Nrf2 活性化の作用機序が解明できれば、より効果的な急性肺傷害予防(治療)の化学物質を合成することができ、新規の創薬につながる可能性も含めて、本研究の成果は周術期管理に大いに役立つものと考えられる。

### 3. 研究の方法

#### (1) 細胞実験

マウスマクロファージ由来の細胞株である RAW264 細胞を、10%ウシ胎児血清、2 mM グルタミン、抗生物質を添加したダルベッコ変法イーグル培地で培養した。培養2時間後、プレート非接着細胞を除去後、新しい培地を加え LPS (1  $\mu$ g/ml) を添加した。各種ポリフェノールやキノンは LPS 刺激の24時間前に添加した。細胞生存率を MTT 法で、培地中の NO 濃度を Griess 法で、細胞内ヘムオキシゲナーゼ-1 (HO-1) の発現をウエスタンブロット法で解析した。

#### (2) 動物実験

雄性 C57BL/6 系マウス(7週齢)をクレア(株)より購入し、1週間飼育した。水及び飼料の摂取は自由とした。Nrf2 レポーターマウスである OKD-Luc マウスは群馬大学医学部岩脇隆夫先生より提供された。

LPS (サルモネラ菌由来、Sigma Chemical より購入) は phosphate-buffered saline に溶解し、50 または 150 mg/kg 体重の用量で腹腔内投与した。初めの LPS 投与5日後に 600 mg/kg LPS を腹腔内投与した。2度目の LPS 投与後、12時間ごとに132時間後までマウスの生死を確認した。対照マウスには同量の溶媒を投与した。Nrf2 活性化を *in vivo* で調べるために OKD-Luc マウスを用いて上記と同様の実験を行った。LPS 初回投与時、2回目投与時、2回目投与20時間後におけるマウスの全身のルシフェラーゼ発光を観察した。LPS 初回投与との変わりにケルセチンあるいはブチルヒドロキシアニソール(BHA)を投与し、同様の実験を行った。

### 4. 研究成果

ポリフェノールやキノンのNrf2活性化能についてRAWマクロファージ細胞を用いて検討した。Nrf2は上述したように、炎症性サイトカインやメディエーターの抑制に関与することが報告されているので、ポリフェノールやキノンのLPSによるRAW細胞活性化に対する抑制効果をNO産生抑制効果により調べた。

ヒドロキノ (HQ) (0, 1.25, 2.5, 5  $\mu$ M) を RAW細胞に添加24時間後に培地を交換し、1  $\mu$ g/ml LPSを添加して、さらに24時間保温後、培養上清中のNO量を測定した。HQはLPS単独添加により増加したNO量を用量依存性に16、

21, 23%抑制した(図2)

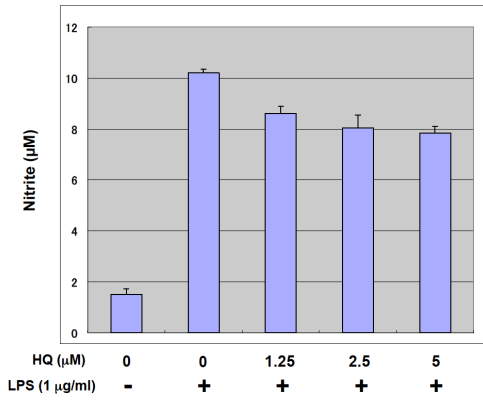


図2. HQ前処理によるLPS添加後のRAW細胞におけるNO産生の抑制効果

このときの細胞生存率は2.5 μM HQまでは変化が見られなかったが、5 μM HQではHQの細胞毒性により約10%低下した(図3)

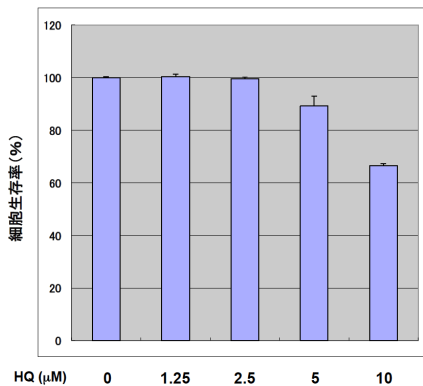


図3. HQ前処理によるLPS添加後のRAW細胞における細胞生存率の変化

Nrf2によって発現が増加するHO-1をウェスタンブロットティングで測定したところ、1.25 μMおよび2.5 μM HQの24時間処理により、未処理細胞に対して1.6倍のHO-1発現増強が認められた(図4)

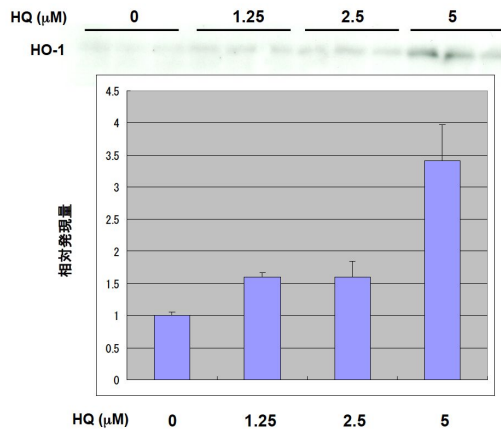


図4. HQによるRAW細胞におけるHO-1発現誘導

食品ポリフェノールであるクルクミンもLPS

添加後のRAW細胞のNO産生を抑制し、それ自身RAW細胞のHO-1発現を増強した。しかしながらクルクミンも高濃度では細胞毒性が出現した(データ未提示)

動物実験において、低濃度 LPS (50 mg/kg 体重) 投与により Nrf2 活性化が起こるかを Nrf2 レポーターマウスである OKD-Luc マウスを用いて検討した(図5)

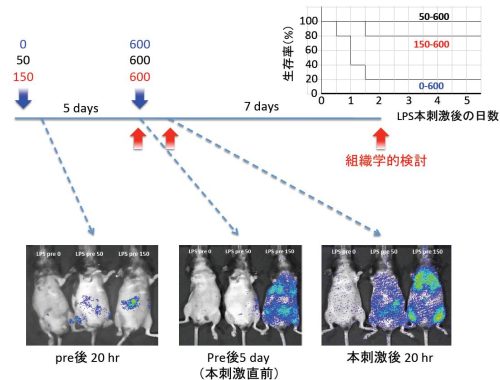


図5. プレコンディショニングによるLPS本刺激後のマウスにおけるNrf2活性化と生存率に対する効果

低濃度 LPS 刺激 5 日後までマウスにはルシフェラーゼによる発光は観察されなかった。一方、150 mg/kg LPS を投与されたマウスは LPS 投与後 20 時間から一部発光を認め、5 日後には全身の発光が観察された。予め弱い刺激を与えておくと、本刺激に対する応答が増強することが知られている(プレコンディショニング)。低濃度 LPS (50 mg/kg) で前刺激 5 日後に致死量の LPS (600 mg/kg) で本刺激を行い 20 時間後のマウスのルシフェラーゼ発光を調べた。前刺激および前刺激を行わないコントロールマウスとも本刺激時にはルシフェラーゼの発光が見られなかったが、本刺激 20 時間後に前刺激マウスにおいて著明な全身発光が見られた。プレコンディショニングのマウス生存率に及ぼす影響を調べるために C57BL/6 マウスを用いて実験を行った。低濃度 LPS でプレコンディショニングを行ったマウスの本刺激 5 日後のマウスの生存率は 100%であった。これに対し、低濃度 LPS を投与しなかったマウス(コントロール)では生存率は 20%であった。以上の結果より、LPS 前刺激は本刺激後の Nrf2 活性化を亢進させることにより生存率を改善することが示唆された。低濃度 LPS のかわりに前刺激としてポリフェノールであるケルセチンあるいは Nrf2 活性化剤として知られる BHA を用いた場合、生存率はごくわずかに上昇した(データ未提示)。

今後は Nrf2 活性化を介してさらに生存率を改善できるポリフェノールなどの機能性成分を探索することが必要と考えられた。

## 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1件)

Nakaso K, Tajima N, Ito S, Teraoka M, Yamashita A, Horikoshi Y, Kikuchi D, Mochida S, Nakashima K and Matura T. Dopamine-mediated oxidation of methionine 127 in  $\alpha$ -synuclein causes cytotoxicity and oligomerization of  $\alpha$ -synuclein. PLOS ONE. 査読有、Vol.8, 2013, e55068, DOI:10.1371/journal.pone.0055068.

〔学会発表〕(計8件)

山下 敦、中曾一裕、片野 諭、田島奈緒子、岡子哲平、寺岡麻梨、楠本智章、松浦達也、ポリフェノールの部分構造とNrf2活性化に関する検討、日本ビタミン学会第63回大会、2011年6月4日～5日、広島市、安田女子大学

松浦達也、岡子哲平、山下 敦、田島奈緒子、寺岡麻梨、楠本智章、持田晋輔、中曾一裕、CoQ10の Maus 肝内胆汁うっ滞型肝障害保護効果:Nrf2活性化の関与、日本ビタミン学会第64回大会、2012年6月22日～23日、岐阜市、長良川国際会議場

堀越洋輔、鳥海健太郎、中曾一裕、田島奈緒子、菊池大介、山下 敦、持田晋輔、竹腰 進、松浦達也、細胞極性に対する酸化ストレスの作用とビタミンEによる細胞極性保護効果、第24回ビタミンE研究会、2013年1月11日～12日、東京、慶応義塾大学芝共立キャンパス

堀越洋輔、菊池大介、山下 敦、田島奈緒子、中曾一裕、持田晋輔、竹腰 進、松浦達也、細胞極性に対する CoQ10 の作用の検討、日本コエンザイム Q 協会第10回研究会、2013年2月1日、八王子市、東京工科大学片柳研究所棟

堀越洋輔、中曾一裕、紙崎孝基、田島奈緒子、仲宗根正人、持田晋輔、松浦達也、上皮細胞の極性に対するビタミンEの作用の検討、2013年度 合同広島大会、2013年9月5日～6日、広島市、県立広島大学 広島キャンパス

紙崎孝基、堀越洋輔、中曾一裕、田島奈緒子、仲宗根正人、持田晋輔、松浦達也、ビタミンEの上皮細胞創傷治癒に対する作用の検討、第25回ビタミンE研究会、2014年1月24日～25日、米子市、米子市文化ホール

紙崎孝基、堀越洋輔、花木武彦、田島奈緒子、中曾一裕、仲宗根正人、持田晋輔、池口正英、松浦達也、CoQ10によるプロテインキナーゼCの機能制御を介した創傷治癒促進効果、日本コエンザイムQ協会第11回研究会、2014年1月28日、八王子市、東京工科大学片柳研究所棟

堀越洋輔、紙崎孝基、花木武彦、田島奈緒子、中曾一裕、仲宗根正人、持田晋輔、

池口正英、松浦達也、ビタミンEはプロテインキナーゼC/Par-3複合体の機能制御を介し創傷治癒過程を促進する、日本過酸化脂質・抗酸化物質学会 第21回年会、2014年3月15日、仙台市、東北大学片平北門会館エスパス

〔図書〕(計0件)

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

持田 晋輔 (MOCHIDA Shinsuke)  
鳥取大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号：70403433

(2) 研究分担者

松浦 達也 (MATSURA Tatsuya)  
鳥取大学・医学部・教授  
研究者番号：00199746

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：