

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 27 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592735

研究課題名(和文)急性肝不全における新たな早期酸化ストレスマーカーNrf2

研究課題名(英文)Nrf2 is a novel marker of oxidative stress at acute hepatic failure.

研究代表者

清水 裕子(Hiroko, Shimizu)

岡山大学・医学部・客員研究員

研究者番号：80423284

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：転写調節因子nuclear factor erythroid 2 (NF-E2)-related factor 2 (Nrf2)は酸化ストレスを感知し、ヘムオキシゲナーゼ-1をはじめさまざまな抗酸化タンパク質の発現を制御している。肝にp450を誘導するフェノバルビタール水前投与後、四塩化炭素CCl4投与した酸化ストレス肝傷害ラットモデルにおいてCCl4投与後早期に肝にNrf2 mRNAの強誘導が見られ、血清ALT値とNrf2 mRNA発現には強い相関が見られた。Nrf2が酸化ストレスの指標として、また、肝不全の重症度の早期診断に役立つ可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) is an important transcriptional factor in the protection against oxidative stress. Nrf2 binds Map Recognition element (MARE) and regulates expression of antioxidant protein. In the present study, a transient and remarkable induction of Nrf2 mRNA was caused by oxidative stress in carbon tetrachloride (CCl4)-induced serious acute liver failure with phenobarbital pretreatment, a cytochrome P450 inducer. The serum ALT levels at 6 h after treatment were positively correlated with Nrf2 mRNA levels. Our findings suggest that Nrf2 mRNA expression may reflect the extent of oxidative tissue injury and it may be a novel marker of oxidative stress at acute hepatic failure.

研究分野：医歯薬学

キーワード：集中治療医学 急性肝傷害 酸化ストレス Nrf2 オートファジー ヘムオキシゲナーゼ Bach
1 四塩化炭素

1. 研究開始当初の背景

(1) **急性肝不全の重症度の早期把握は、的確な治療法選択のために重要**

急性肝不全はウイルス、薬剤、自己免疫などにより発症する致命的な疾患であるが、全身管理、免疫抑制療法、抗ウイルス療法、血漿交換や血液濾過透析などの肝機能補助を目的とした保存的治療の発達に加え、肝移植の導入により劇的に救命率が上昇してきた。しかし、未だ治療法の選択に難渋することが多く、肝不全の重症度をより詳細に早期判断可能となれば、適切な時期に適正な治療法の選択が可能となる(図1)。

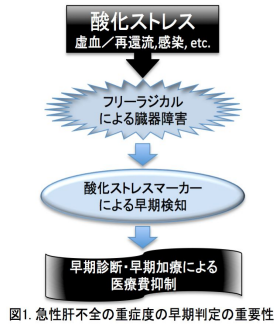


図1. 急性肝不全の重症度の早期判定の重要性

(2) **Nrf2 mRNA は 急性肝不全の酸化ストレスマーカーになりうるか?**

一般に急性臓器不全の細胞傷害には、虚血再灌流や好中球の活性化が引き起こす活性酸素などによる酸化ストレスが大きな役割を果たしている。申請者らはこれまで四塩化炭素 CCl₄ によるラット劇症肝炎モデルにおける肝傷害には、**ヘム由来酸化ストレス**が特に重要な役割をはたしていること明らかにしてきた(Nakahira K,2003)。

ヘム分解の律速酵素である H0-1 の発現を制御する転写調節因子の一つとして Bach1 が報告された (Igarashi K,2004)。 通常、H0-1 遺伝子のエンハンサー配列 MARE に Bach1 が結合して H0-1 遺伝子の発現を抑制している。酸化ストレス下でチトクロームなどのヘムタンパクが崩壊しヘム濃度が上昇すると

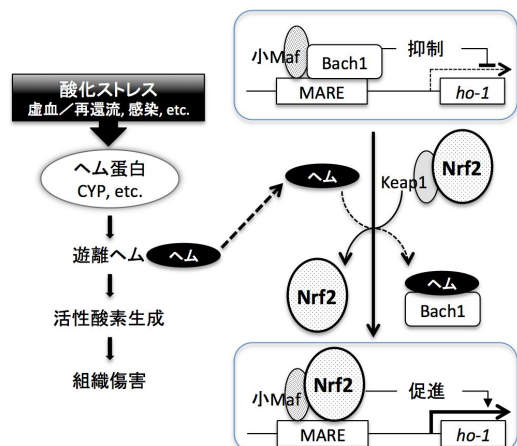


図2. ヘム由来酸化ストレス下でのHO-1発現機序

Bach1 は MARE から離れ、代わりに細胞質内に存在した Nrf2 が Keap1 から離れ MARE に結合し、H0-1 遺伝子が活性化される(図2)。 申請者らは ヘム由来酸化ストレスによる肝傷害の重症度と Bach1 mRNA の発現に相関関係があることを見だし、Bach1 mRNA が急性肝傷害の鋭敏な酸化ストレスマーカーになり得る可能性を提唱してきた (Tanioka N, 2014)。ところで、Nrf2 は様々な酸化ストレスにより活性化され、抗酸化や解毒代謝をになう生体防御系遺伝子の転写を活性化し重要な生体防御的機能をもつことがわかってきた (Taguchi K,2011)。

(3) **重症肝傷害ラットモデルにおける肝傷害重症度とオートファジーの関係**

近年、タンパク分解経路の一つとして オートファジー (自食作用) という概念が提唱されている。オートファジーの基本的な役割は 栄養飢餓時に強誘導され、エネルギー産生やタンパク質新生のために 非選択的に細胞内のタンパク質を分解し、タンパク質の原料であるアミノ酸を供給することである。一方、オートファジーは十分に栄養がある状態でも恒常的に働き、神経変性疾患や肝炎の発症を抑制していることが報告された (Komatsu M,2005,2007)。

最近、オートファジーにより 選択的に分解される p62 タンパク質が同定され、オートファジー減弱時に p62 が細胞内に蓄積すると、Nrf2-Keap1 結合は競合拮抗的に阻害され、Nrf2 が Keap1 から離れ核内に移動し、抗酸化タンパク質群が誘導されるという新たなシステムが発見された (Komatsu M,2010)。また、肝臓特異的オートファジー不全マウスは、p62 の過剰蓄積を伴う肝障害を引き起こすことが明らかとなった。そこで 肝傷害重症度とオートファジーの関係を明らかにすることは、肝傷害重症化の機序の更なる解明と新たな治療法開発につながると考えられる。

2. 研究の目的

そこで、酸化ストレスによるラット肝炎モデルにおいて、早期酸化ストレスマーカーとしての Nrf2 mRNA の有用性を検討し、急性肝不全の重症度の早期診断、早期治療開始を目指す。また、急性肝不全において Nrf2 を活

性化し抗酸化タンパク質遺伝子の発現に関与するオートファジーと Nrf2-Keap1 システムの関係を明らかにし、急性肝不全重症化のメカニズムの更なる解明に迫る。

3. 研究の方法

動物モデル

7 週齢雄性 Sprague Dawley(SD)ラットを用い

モデル 1: 四塩化炭素 (CCl₄) ラットモデル (CCl₄ を腹腔内投与した肝傷害モデル)

モデル 2: ペントバルビタール(PB)+CCl₄ ラットモデル (肝に P450 誘導する PB 水を飲水後、CCl₄ を腹腔内投与しモデル 1 よりさらに重症な肝傷害モデル) を作成し以下の項目を検討した。

(1) 肝臓での Nrf2 mRNA と Bach1 mRNA の発現は肝臓より total RNA を抽出し Northern blot 法により、Nrf2 タンパクは肝臓より核タンパクを抽出し Western blot 法により評価した。

(2) 肝傷害の程度は、生化学検査：血清 ALT 値と、脂質過酸化の指標であるマロンジアルデヒド:MDA 活性により評価した。

(3) オートファジーは肝臓の total protein を抽出し Western blot 法により LC3-I、LC3-II、p62 タンパクを検出しオートファジー活性化を評価した。

4. 研究成果

(1) CCl₄ ラットモデルにおける肝の Nrf2 発現。

雄性 SD ラットに CCl₄ を 0.1~2.0 ml/kg 腹腔内投与、sham 群には corn oil を投与し、経時的に血液と肝臓を採取した。

CCl₄ 投与後 6 時間の肝の Nrf2 mRNA 発現を Fig.1 に示した。CCl₄ 投与容量依存的に Nrf2 mRNA の発現量は増加した。

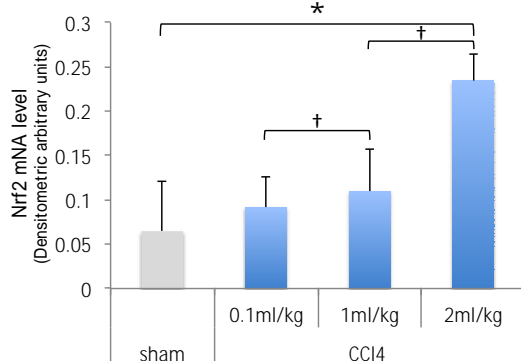


Fig.1 CCl₄投与後6時間のNrf2 mRNAの発現
*p<0.01, †p<0.05

CCl₄ 1.0 ml/kg 投与後の Nrf2 mRNA の発現は CCl₄ 投与後 1~6 時間で上昇傾向を示したが有意な上昇は見られなかった。一方 CCl₄ モデルより重症な肝傷害を引き起こす PB+CCl₄ モデルでは CCl₄ 投与後 1 時間で Nrf2 は上昇を開始し、3 時間でコントロールと比較し有意な上昇を示し、その後急速に減衰し 6 時間後にはコント

ロールレベルに戻った (Fig.2)。以前報告した、ヘム依存性酸化ストレスの指標として Bach1 mRNA の発現は CCl₄ 投与後 6 時間で一過性に強発現したが (Tanioka, 2014)、Nrf2 mRNA はさらに早期に発現することが示された。

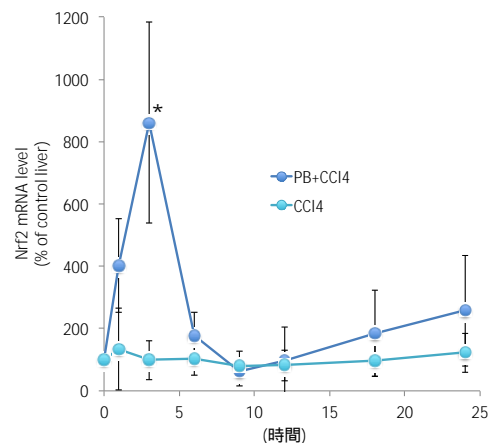


Fig.2 CCl₄投与後のNrf2 mRNA発現の経時的変化
*p<0.001 vs control (0h)

CCl₄ ラットモデルの肝傷害の程度と Nrf2 との関係。CCl₄ 投与後の脂質過酸化の指標である肝 MDA 活性はコントロールレベルに比べて有意に上昇した。また、CCl₄ の投与量増加とともに肝傷害の指標である血清 ALT 値と Nrf2 mRNA レベルはともに上昇した。両者には強い相関が認められ、肝傷害が強い程 Nrf2 mRNA がより誘導されることが示された (Fig.3)。

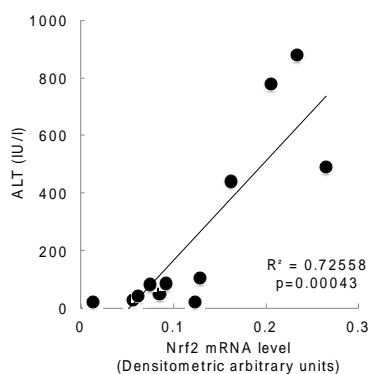


Fig.3 CCl₄投与後のNrf2 mRNAと血清ALT値の関係

CCl₄ ラットモデルの肝の Nrf2、Bach1 タンパク質の局在を Western blot 法にて調べた。CCl₄ モデルで核タンパクの Bach1 は CCl₄ 投与後 0.5、1 時間でコントロール

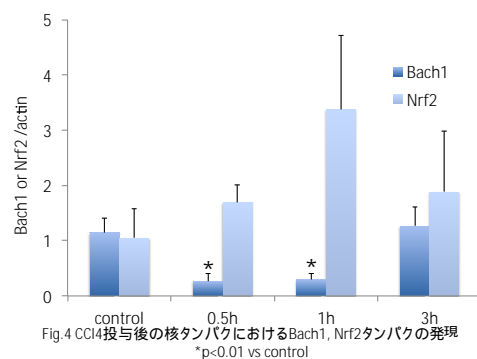


Fig.4 CCl₄投与後の核タンパクにおけるBach1, Nrf2タンパクの発現
*p<0.01 vs control

レベルより有意に低下した。一方、核タンパクの Nrf2 レベルは CCl₄ 投与後 0.5、1 時間で有意差はないが上昇傾向を示した。以上の結果は、CCl₄ 投与後、酸化ストレスによりチトクロームなどのヘムタンパクが崩壊し遊離してきたヘムを Bach1 が検知し MARE 配列から離れ、サイトゾルの Nrf2 が核内に入り MARE 配列に結合し HO-1 を始めとする抗酸化タンパクの合成に關与することを示唆している。

(2) CCl₄ 肝傷害ラットモデルにおける肝オートファジーの活性化。

CCl₄ 投与後肝の LC3 と p62 タンパクを Western blot により検討した。オートファジーが活性化すると LC3-II/I 比が増加し、p62 は分解される低下する。CCl₄ 投与後 1 時間で LC3II/I 比は上昇し、p62 タンパクは減少傾向を示し、CCl₄ 投与によりオートファジーが活性化していることが示唆された。

申請者らは、これまでヘム依存性酸化ストレスによる傷害の指標として Bach1 mRNA がストレスマーカーとして有用ではないかと報告してきた。今回、CCl₄ 投与肝不全モデルにおいて Nrf2 mRNA は血清 ALT 値と強い相関を示し、Bach1 mRNA や ALT 値の上昇より早い 3 時間で Nrf2 mRNA の有意な誘導が確認された。以上のことより、Nrf2 mRNA は早期酸化ストレスマーカーの指標となりえ、重症肝傷害のより早期の、的確な治療方針の決定に役立ち、さらなる救命率の上昇につながると考える。

今後、酸化ストレス下での Nrf2 の誘導とオートファジーの関係をさらに追及し、臨床現場での Nrf2 のストレスマーカーとしての有用性、臓器傷害と Nrf2、オートファジーの関係について検討することは肝不全の機序を解明する上でも重要である。

<引用文献>

Igarashi K and Sun J, The heme-Bach1 pathway in the regulation of oxidative stress response and erythroid differentiation. *Antioxid Redox Signal.* (1-2): 107-18,2006
Tanioka N, et al., Induction of hepatic Bach1 mRNA expression by carbon tetrachloride-induced acute liver injury in rats. *BIOMEDICAL REPORTS*, 2:359-363, 2014
Taguchi K, et al., Molecular mechanisms of the Keap1-Nrf2 pathway in stress response and cancer evolution. *Gene Cells.* 16(2): 123-40, 2011
Komatsu M, et al., Impairment of starvation-induced and constitutive autophagy in *Atg7-deficient mice*. *J Cell Biol.* 169(3): 425-34,2005.

Komatsu M, et al., Essential role for autophagy protein Atg7 in the maintenance of axonal homeostasis and the prevention of axonal degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104(36): 14489-94, 2007

Komatsu, et al., The selective autophagy substrate p62 activates the stress responsive transcription factor Nrf2 through inactivation of Keap1. *Nat Cell Biol.* 12(3):213-23, 2010

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2件)

Tanioka N, Shimizu H, Takahashi T, Omori E, Kuroda K, Shibata M, Yamaoka M, Toda Y, Matsusaki T, Morimatsu H, Induction of hepatic Bach1 mRNA expression by carbon tetrachloride-induced acute liver injury in rats. *BIOMEDICAL REPORTS*, 査読有、vol.2, 2014, pp359-363
doi: 10.3892/br.2014.235

Kosaka J, Morimatsu H, Takahashi T, Shimizu H, Kawanishi S, Omori E, Endo Y, Tamaki N, Morita M, Morita K, Effects of Biliverdin Administration on Acute Lung Injury Induced by Hemorrhagic Shock and Resuscitation in Rats. *PLOS One*, 査読有、8巻、2013
doi: 10.1371/journal.pone.0063606.

[学会発表](計6件)

Tanioka N, Shimizu H, Takahashi T, Omori E, Yamaoka M, Nakamura R, Morimatsu H, The role of transcription factor Bach1 in a rat model on acute liver injury induced by experimental endotoxemia. *International Anesthesia Research Society 2015 Annual Meeting, Hawaii(USA)*, 2015年3月23日

Yamaoka M, Shimizu H, Takahashi T, Omori E, Tanioka N, Nakamura R, Morimatsu H, Dynamic change in Bach1 expression in a rat model of glycerol-induced acute kidney injury. *International Anesthesia Research Society 2015 Annual Meeting, Hawaii(USA)*, 2015年3月22日

山岡 正和、清水 裕子、高橋 徹、谷岡野人、黒田 浩佐、中村 龍、森松 博史、横紋筋融解症性急性腎傷害ラットモデルにおける Bach1 発現とその意義、第 42 回日本集中医療医学会学術集会、2015年2月9日、ホテル日光東京、東京都港区

谷岡 野人、清水 裕子、高橋 徹、山岡正和、森松 博史、四塩化炭素投与によるラット急性肝傷害にける肝 Bach1 遺伝子の発現、第 41 回日本集中医療医学会学術集会、2014 年 2 月 27 日、国立京都国際会館、京都府京都市

Takahashi T, Kawanishi S, Kosaka J, Shimizu H, Morimatsu H, Protective role of heme oxygenase-1/CO system in hemorrhagic shock induced acute lung injury. 16th International Symposium on Molecular Medicine, Creta (Greece), 2013 年 10 月 10 日～12 日

Shimizu H, Takahashi T, Matsumi J, Omori E, Matsusaki T, Morimatsu H, Morita K, Induction of Bach1 messenger RNA in the graft liver after reperfusion during living donor liver transplantation. American Society of Anesthesiologists Annual Meeting, Washington, DC.(USA), 2012 年 10 月 16 日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

清水 裕子 (SHIMIZU HIROKO)
岡山大学・医学部・客員研究員
研究者番号：80423284

(2) 研究分担者

森田 潔 (MORITA KIYOSHI)
岡山大学・医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号：40108171
(H24 年度)

高橋 徹 (TAKAHASHI TORU)
岡山県立大学・保健福祉学部・教授
研究者番号：40252952

森松 博史 (MORIMATSU HIROSHI)
岡山大学・医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号：30379797

(3) 研究協力者

大森 恵美子 (OMORI EMIKO)
岡山大学・医歯薬学総合研究科・技術補佐員