

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 16 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：26461395

研究課題名(和文) 転写因子Nrf2活性化による鎌状赤血球症の新規治療法の検討

研究課題名(英文) Development of novel therapeutic strategies for sickle cell disease by activating Nrf2

研究代表者

鈴木 未来子 (Suzuki, Mikiko)

東北大学・医学系研究科・講師

研究者番号：80508309

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：鎌状赤血球症はグロビン遺伝子の変異によって、赤血球が鎌状に変形する遺伝性疾患である。鎌状赤血球は毛細血管を間欠的に閉塞させることによって、周囲に酸化ストレスを惹起する(虚血再灌流障害)。Nrf2は酸化ストレス防御にはたらく転写因子である。鎌状赤血球症モデルマウスにおいて、Nrf2の抑制因子であるKeap1をノックダウンすることによって遺伝的にNrf2を活性化すると、鎌状赤血球症の症状である肝臓の壊死や肺の炎症の改善がみられた。さらにNrf2活性化剤の投与によっても同様の効果がみられた。これらの結果から、Nrf2を活性化が鎌状赤血球症の新規治療法となることが示された。

研究成果の概要(英文)：Sickle cell disease (SCD) is an inherited disease caused by a mutation in globin gene. Hemoglobins containing the mutated globin polymerize in red blood cells (RBC) and deform RBC into a sickle-like shape. The sickle-shaped RBCs are prone to intravascular hemolysis and intermittent blood flow occlusion, which results in ischemia-reperfusion injury generating oxidative stresses. Nrf2 is a transcription factor that induces expression of target genes involved in cellular defense against oxidative stresses. In this study, we found that genetic and pharmacologic activation of Nrf2 ameliorated tissue damages and inflammation in SCD model mice, indicating that Nrf2 activation relieves symptoms of SCD. Based on these results, we propose that Nrf2 is a therapeutic target for the treatment of SCD.

研究分野：医化学

キーワード：鎌状赤血球症 Nrf2 酸化ストレス

1. 研究開始当初の背景

鎌状赤血球症は、赤血球で酸素を運搬するヘモグロビンの構成因子であるβグロビン遺伝子の変異によって起こる遺伝性疾患である。鎌状赤血球症患者は、アフリカ、インド、中東地域に多くみられる。現在、鎌状赤血球症の治療薬として認可されているものはヒドロキシウレアのみである。ヒドロキシウレアは、赤血球の鎌状化を抑制し、鎌状赤血球症の症状を軽減する。しかしながら、ヒドロキシウレアは鎌状赤血球症患者の約3分の1には効果を示さない。そのため、新しい治療薬の開発が求められている。

変異型βグロビンを含むヘモグロビンは、低酸素に陥った際に、繊維状に連なることによって赤血球を鎌状に変形させる。鎌状に変形した赤血球は、毛細血管をスムーズに通じ抜けることが出来ず、血管を閉塞させたり、再び開通させたりを繰り返す。これにより、虚血再灌流を引き起こし、様々な臓器に酸化ストレス障害を与える。また、鎌状赤血球は血管内で容易に破壊される(溶血する)ため、血管内に遊離ヘモグロビンや遊離ヘムを放出する。これらもまた様々な臓器に酸化ストレス障害を引き起こす(図1)。

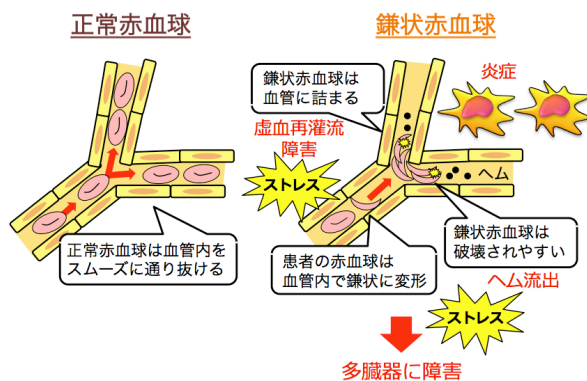


図1 鎌状赤血球症の発症機序

鎌状赤血球は毛細血管に詰まりやすく、また血管内で溶血しやすいために周囲に酸化ストレスを惹起し、多臓器に障害を与える。

転写因子 Nrf2 は、細胞が親電子性物質や活性酸素種などの酸化ストレスに曝された際に、それを解毒、還元および排出するために必要な酵素や輸送体の遺伝子の発現を活性化することで、細胞を防御する役割をもつ。Nrf2 は細胞が酸化ストレスに曝された場合のみ、速やかに誘導される。定常状態(ストレスの無い状態)では、Nrf2 は細胞質で Keap1 タンパク質によって捉えられ、分解されている。細胞がストレスに曝されると、Keap1 が不活性化され、Nrf2 が蓄積し、核へと移行して標的遺伝子の発現を活性化する。

Nrf2 を活性化するはたらきをもつ Keap1 阻

害剤は、すでに開発が進んでおり、ジメチルフルマル酸が多発性硬化症の治療薬として認可されている。また、さらに強力な Nrf2 活性化剤についても臨床試験が行われており、今後、臨床応用されることが予想される。

2. 研究の目的

本研究では、Nrf2 の活性化が鎌状赤血球症の症状を改善するかを、遺伝的に Nrf2 を活性化させた鎌状赤血球症モデルマウスを用いて明らかにすることを目的とした。また、Nrf2 活性化剤を鎌状赤血球症モデルマウスに投与することによって、症状改善がみられるかを検討した。

3. 研究の方法

本研究では、Townes らが樹立した鎌状赤血球症モデルマウスを用いた検討を行った。このマウスは、鎌状赤血球症患者にみられる貧血、炎症、組織障害を再現する。鎌状赤血球症モデルマウスと Keap1 ノックダウンマウスを交配させることによって、全身で Nrf2 が活性化された鎌状赤血球症モデルマウスを作製し、鎌状赤血球症モデルマウスでみられる症状が改善しているかを検討した。また、鎌状赤血球症モデルマウスに Nrf2 活性化剤(Keap1 阻害剤)である CDDO-Im を経口投与することによって鎌状赤血球症が改善するかを検討した。

さらに、どの細胞における Nrf2 の活性化が症状改善効果に貢献しているかを明らかにするために、Keap1 条件付きノックアウトマウスと血管内皮細胞またはマクロファージで特異的に Cre 酵素を発現するマウスを鎌状赤血球症モデルマウスと交配することによって、血管内皮細胞またはマクロファージ特異的に Nrf2 を活性化させたマウスを作製し、症状改善効果を検討した。

4. 研究成果

(1) 遺伝的 Nrf2 活性化は鎌状赤血球症の症状を改善する

鎌状赤血球症モデルマウスでは、肝臓に壊死がみられ、肝障害マーカーである ALT (GPT) の値が正常マウスと比較して上昇している。全身で Nrf2 を活性化させた Keap1 ノックダウン鎌状赤血球症モデルマウスでは、この肝臓の壊死が軽減していた。また ALT (GPT) の値も低下しており、肝障害が軽減していることが示された。さらに、鎌状赤血球症モデルマウスでは肺に炎症がみられるが、これも Nrf2 を全身で活性化させることによって軽減した。

このことから、遺伝的に Keap1 をノックダ

ウンすることによって全身性に Nrf2 を活性化すると、鎌状赤血球症の組織障害および炎症が改善することが明らかとなった (図 2)。

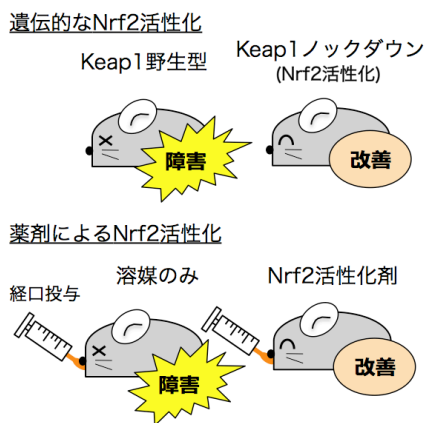


図 2 Nrf2 活性化による鎌状赤血球症の症状改善効果
Keap1 ノックダウンによって遺伝的に Nrf2 を活性化した場合 (上段) および Nrf2 活性化剤を投与することによって薬剤誘導的に Nrf2 を活性化した場合 (下段) の両方において鎌状赤血球症の症状を改善することができた。

(2) Nrf2 活性化は組織の酸化ストレス障害を抑制することによって症状を改善する

Nrf2 活性化による症状改善効果のメカニズムを明らかにするために、赤血球の溶血を抑制する効果があるか検証した。赤血球寿命を測定したところ、鎌状赤血球症モデルマウスでみられる赤血球寿命の短縮は、Nrf2 を活性化しても改善しなかった。このことから、Nrf2 は鎌状赤血球の鎌状化や溶血の抑制には貢献していないことが示唆された。一方で、溶血によって放出される血漿中の遊離ヘム量は、Nrf2 の活性化によって減少していた。ヘムの分解酵素である HO1 は Nrf2 の標的遺伝子のひとつであることが知られているため、Nrf2 はヘムの分解を促進することによって、組織障害を軽減していることが考えられた。また、組織細胞での Nrf2 の活性化は、酸化ストレスからそれぞれの細胞を保護する役割があるため、このことも症状改善に貢献していると考えられる。

以上のことから、Nrf2 は、ヒドロキシウレアのように赤血球の鎌状化および溶血を抑制するのではなく、それによって引き起こされる酸化ストレス障害を抑制することによって、鎌状赤血球症の症状を改善していることが明らかとなった (図 3)。

(3) Nrf2 活性化剤の投与は鎌状赤血球症の症状改善効果がある

薬剤によって Nrf2 を誘導させた場合においても、鎌状赤血球症の症状改善効果がみら

れるかを検討するために、Nrf2 の活性化剤である CDDO-Im を鎌状赤血球症モデルマウスに 3 週間、1 日おきに経口投与する実験を行った。溶媒投与群と比較して、CDDO-Im 投与群では、鎌状赤血球症モデルマウスの肝臓の障害および肺の炎症が軽減していた。このことから、Nrf2 活性化剤の投与が鎌状赤血球症の治療として有効であることが明らかとなった (図 2)。

以上の研究成果をまとめて、Proc Natl Acad Sci USA. (PNAS) 誌に論文を発表した (5. 主な発表論文等 雑誌論文 2)。

(4) 血管内皮およびマクロファージにおける Nrf2 の活性化が鎌状赤血球症の症状改善に貢献している

次にどの細胞における Nrf2 の活性化が鎌状赤血球症の症状改善に貢献しているのかを解析することにした。鎌状赤血球症は血管内溶血が原因であるため、これに最初に遭遇する血管内皮細胞に着目した。さらに、全身で Nrf2 を活性化したマウスにおいて、血漿中のヘム量が減少していたことから、ヘムの分解を担うマクロファージにも着目した。

Keap1 条件付き欠失マウスと血管内皮特異的 Cre 酵素発現マウス (Tiel-Cre マウス) またはマクロファージ特異的 Cre 酵素発現マウス (LysM-Cre マウス) を鎌状赤血球症モデルマウスと交配することによって、血管内皮細胞およびマクロファージで特異的に Nrf2 が活性化した鎌状赤血球症モデルマウスを得た。このマウスを解析したところ、肝臓の障害と肺の炎症が改善していた。これらの結果から、血管内皮細胞およびマクロファージにおける Nrf2 の活性化が症状改善に貢献していることが明らかとなった。その他の細胞系列については、現在、検討中である。

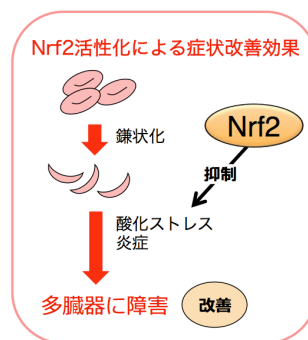


図 3 Nrf2 活性化による症状改善の機序

Nrf2 は赤血球の鎌状化を抑制するのではなく、それによって生じる酸化ストレスや炎症を抑制することによって鎌状赤血球症の症状を改善する。

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 5 件)

1. Tsuchida K, Tsujita T, Hayashi M, Ojima A, Keleku-Lukwete N, Katsuoka F, Otsuki A, Kikuchi H, Oshima Y, Suzuki M*, and Yamamoto M*. Halofuginone enhances the chemo-sensitivity of cancer cells by suppressing NRF2 accumulation. *Free Radic Biol Med* **103**, 236-247 (2017) *co-corresponding authors 査読有 doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.12.041.
2. Suzuki M, Otsuki A, Keleku-Lukwete N, and Yamamoto M. Overview of redox regulation by Keap1-Nrf2 system in toxicology and cancer. *Curr Opin in Toxicol* **1**, 29-36 (2016) 査読有 doi: 10.1016/j.cotox.2016.10.001
3. Otsuki A, Suzuki M*, Katsuoka F, Tsuchida K, Suda H, Morita M, Shimizu R, and Yamamoto M*. Unique cistrome defined as CsMBE is strictly required for Nrf2-sMaf heterodimer function in cytoprotection. *Free Radic Biol Med* **91**, 45-57 (2016) *co-corresponding authors 査読有 doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2015.12.005.
4. Keleku-Lukwete N, Suzuki M*, Otsuki A, Tsuchida K, Katayama S, Hayashi M, Naganuma E, Moriguchi T, Tanabe O, Engel JD, Imaizumi M, Yamamoto M*. Amelioration of inflammation and tissue damage in sickle cell model mice by Nrf2 activation. *Proc Natul Acad Sci USA*. **112**, 12169-12174 (2015) *co-corresponding authors 査読有 doi: 10.1073/pnas.1509158112.
5. Suzuki M, Yamamoto M, and Engel JD. Fetal globin gene repressors as drug targets for molecular therapies to treat the β -globinopathies. *Mol Cell Biol* **34**, 3560-3569 (2014) 査読有 doi: 10.1128/MCB.00714-14.

[学会発表] (計 4 件)

1. NRF2 protects sickle cell disease model mice from inflammation and organ damages. Nadine Keleku-Lukwete, 鈴木未来子、大槻晃史、土田恒平、片山紗乙莉、林真貴子、森口尚、田邊修、今泉益栄、山本雅之 日本生化学会東北支部第 81 回例会 東北大学さくらホール 仙台 2015 年 5 月 9 日
2. Keap1-Nrf2 System: Potential Role in Prevention of Sickle Cell Disease and Inflammation. Nadine Keleku-Lukwete,

Mikiko Suzuki, Akihito Otsuki, Kouhei Tsuchida, Saori Katayama, Makiko Hayashi, Eriko Naganuma, Takashi Moriguchi, Osamu Tanabe, James Douglas Engel, Masayuki Yamamoto. 57th ASH Annual Meeting, Orlando, FL, U.S.A. December 5-8, 2015

3. Sulforaphane improves inflammation and organ damage in sickle cell disease by Keap1-Nrf2 pathway. Harit Panda, Nadine Keleku-Lukwete, 鈴木未来子、山本雅之. 第 89 回日本生化学会大会, 仙台国際センター, 仙台, 2016 年 9 月 25-27 日
4. Insight mechanism underlying the importance of Nrf2 in sickle cell disease. Nadine Keleku-Lukwete, Harit Panda, 長沼絵里子, 鈴木未来子、山本雅之. 第 89 回日本生化学会大会, 仙台国際センター, 仙台, 2016 年 9 月 25-27 日

[図書] (計 1 件)

1. 鈴木未来子, 山本雅之「遺伝子発現制御—クロマチン, 転写制御, エピジェネティクス—」第 16 章 ストレス応答制御 167-175 頁 (2017) 東京化学同人

[その他]

ホームページ等

研究内容紹介

<http://www.dmbc.med.tohoku.ac.jp/cgi-bin/project-2/view.cgi>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 未来子 (SUZUKI MIKIKO)

東北大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号 : 80508309