

2. 薬剤の急性毒性・晩発性毒性の発症における AhR/Nrf2-Keap1 制御系の関与の検討

研究要旨

薬剤の急性毒性・晩発性毒性の発症における第1相酵素群、第2相酵素群の関与を、個体において明らかにするために、それらの統一的な制御因子である AhR と Nrf2 それぞれの機能を変化させた遺伝子改変マウスを作製し、それらの薬剤に対する反応性を調べた。その結果、Nrf2 により制御される遺伝子群の機能は、薬剤の毒性発現の抑制に重要であることが示された。また、ヒトにおける薬剤応答性の個人差の発生に、これら遺伝子の機能的な差異がどれほど影響しているかを明らかにするために、*keap1* 遺伝子と *nrf2* 遺伝子の多型解析を行い、それぞれの遺伝子に複数の多型が存在することを明らかにした。こうした遺伝子多型とヒトの薬剤感受性の違いに相関が有るかどうか検討するための、検体収集を行った。

A. 研究目的

異物代謝系第1相酵素群と第2相酵素群の協調的な作用により、体内に摂取された薬物は代謝され、体外に排泄される。第1相酵素群は、主として、チトクローム P450 群により触媒されており、薬物を酸化、あるいは、水酸化することにより、反応性の高い代謝中間産物を形成する。摂取された薬剤が、第1相酵素群の誘導的な発現をもたらすが、その作用は、ステロイドホルモン受容体に類似した受容体型転写因子により実現されている。芳香族炭化水素類は、ダイオキシン受容体 (AhR) を活性化することにより、CYP1 族の酵素群を誘導し、フェノバルビタール類は CAR を介して CYP2 族酵素群を誘導する。また、PXR は、合成ステロイド剤を含む様々な化合物により活性化されて、CYP3 族の発現をもたらす。PPAR はペルオキシソーム増殖剤や非遺伝毒性発癌剤などにより活性化されて CYP4 族の酵素群を誘導することが、報告されている。第1相反応により生成した活性化代謝中間産物は、第2相酵素群の発現を誘導し、

第2相反応により水溶性の高い硫酸基、グルタチオン基、あるいは、グルクロン酸基などと抱合され、排泄される。これまでの我々の研究から、第2相酵素群の統一的な制御因子が Nrf2 であることが明らかになった。

本研究の目的は、これら異物代謝系が、薬物による急性毒性や慢性毒性、晩発性障害である発癌などの副作用の発現の防止にどのように貢献しているのかを、それらの統一的な制御因子の機能を操作することを通して明らかにすることである。さらに、ヒトにおけるこれら制御因子の遺伝子多型が存在するかどうかの検討を行い、薬剤に対する反応の個人差の発生に、こうした遺伝子多型がどれほど貢献しているのかを明らかにすることである。そして、ひいては、個人の特徴的な反応性に応じた薬剤を適切な投薬量で処方するという、オーダーメイドの薬物治療を可能にすることである。

B. 研究方法

(1) Nrf2 欠損マウスの易発がん性の検討 第1相反応により形成される活性型代謝中間産物は、蛋白質や核酸などの生体高分子に対して障害性を示し、組織の障害や発癌を惹起する。Nrf2 が統一的に制御している第2相酵素群はこれらの中間産物を抱合反応などにより無毒化して排泄を促す。Nrf2 により制御される因子群が、薬物の急性毒性のみならず、晩発性影響である発癌に対してどのような貢献を果たしているかを明らかにするために、*nrf2* 欠損マウスに対する発癌実験を行った。*nrf2* 欠損マウスに対して、ベンツピレンの皮下投与を行い、皮下腫瘍の形成までの期間と、形成数、生成後の腫瘍の増殖を観察した。また、Nrf2 欠損マウスに対してニトロサミン (BBN) を投与し、膀胱がんの発生率、腫瘍の悪性度を調べた。さらに、オルティプラッツという第2相酵素群の誘導剤が抗ガン作用を示すかどうかを、ニトロサミンとオルティプラッツの同時投与実験により検討した。

(2) AhRR 遺伝子欠損マウスの易発がん性の検討 薬剤の毒性発現に対する第1相酵素群の役割を明らかにするため、第1相酵素群の誘導に関わる制御因子のうち AhR に注目し、同因子の抑制性因子として同定された AhRR の遺

伝子欠損マウスを作製し、その易発ガン性を、ベンツピレンの皮下投与実験により調べた。*AhRR* 遺伝子欠損マウスでは、AhR の機能に対する抑制がかからない状態になっているため、皮下にベンツピレンを投与した場合、その酸化が亢進し、DNA 障害性を有するエポキシドの生成が増加し、発癌が促進されると予想した。

(3) ヒト *nrf2* 遺伝子、*keap1* 遺伝子の多型を解析 ヒトの様々な疾患感受性に Nrf2/Keap1 制御系の機能の個体差が関与している可能性を考え、ヒトの癌組織や、皮膚疾患、自己免疫疾患、慢性呼吸器疾患の患者血液など、様々なサンプルを用いて、ヒト *nrf2* 遺伝子、*keap1* 遺伝子の多型解析を行った。それぞれの遺伝子上にプライマーを設計し、ヒトサンプルから得られた DNA を鋳型に PCR を行い、ダイレクトシーケンス反応により、ゲノム DNA の配列を決定した。

倫理面への配慮

本研究では、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」を遵守し、患者に末梢血の提供を依頼した。この際、事前に本研究の趣旨を、患者本人（患者が未成年者の場合はその保護者）に直接説明し、理解と承諾が得られた場合にのみ、提供をうけた。なお、採血は熟練した医師が行った。血液の提供に同意しない患者が、治療の上で不利益を被ることがないように、十分に配慮し、また、得られた検体は、番号を付して、提供者の氏名は一切同定不可能とすることにより、プライバシーを保護した。なお、この研究の一部は、研究協力者 楊 景堯 講師・小山哲夫 教授により、筑波大学倫理委員会に申請され、承諾を得ている。

本研究では遺伝子組換えマウスを実験に使用したが、その飼育、薬剤投与、屠殺にあたっては、動物愛護の精神にのっとり、与える苦痛が最小限になるように配慮した。また、無駄な屠殺を行うことがないように、計画を十分に吟味してから実験を行った。本実験計画は、筑波大学動物実験委員会及び遺伝子組換え安全委員会に申請をおこない、それぞれから承認されている。

C. 研究結果

(1) *nrf2* 欠損マウスの易発がん性の検討 ベンツピレンを投与された *Nrf2* 欠損マウスは、コントロールの野生型マウスに比べて、早い時期に皮下の腫瘍を形成し、その後の腫瘍の増殖も早い傾向にあることが明らかになった。また、ニトロサミンの投与を受けた *nrf2* 欠損マウスは、膀胱がんの発生率が上昇し、腫瘍の悪性度もやや増悪している傾向が認められた。また、野生型マウスにオルティプラッツとニトロサミン(BBN)を同時投与すると、ニトロサミンによる膀胱がんの発生が抑制された。しかし、*nrf2* 欠損マウスにおいては、オルティプラッツの発癌抑制効果が観察されなかった。以上の結果から、皮膚と膀胱において、*Nrf2* により制御される酵素群が、がん抑制に重要であること、また、オルティプラッツの発癌抑制効果は、*Nrf2* に依存していることが明らかになった。

(2) *AhRR* 遺伝子欠損マウスの易発がん性の検討 *AhR* の抑制因子であると考えられている *AhRR* の遺伝子破壊マウスを作製し、その易発がん性を調べた。同マウスでは、3-メチルコラントレン投与による *CYP1A1* の誘導が延長しており、*AhR* の機能に対する抑制がかからない状態になっているものと考えられる。そのため、皮下にベンツピレンを投与した場合、その酸化が亢進し、DNA 障害性を有するエポキシドの生成が増加し、発癌が促進されると予想した。しかし、この予想に反して、*AhRR* 遺伝子欠損マウスでは、腫瘍の発生により長い時間がかかるという結果であり、癌抵抗性を獲得していることが明らかになった。より詳細に調べたところ、同マウスでは、*CYP1A1* をはじめとする異物代謝系第一相酵素群の誘導が促進されていると同時に、第2相酵素群の誘導も認められていることが明らかになった。持続的な第2相酵素群の誘導の影響で、かえって化学発がんに対して、抵抗性を獲得したものと考えられる。興味深いことに、*AhRR::nrf2* 2重欠損マウスを作製したところ、同マウスでは、このような抵抗性は認められなかった。これは、*Nrf2* により低レベルながら誘導されている酵素群が、やはり、発癌に対する防御機構において重要であること

を示す結果である。

(3) ヒト *nrf2* 遺伝子, *keap1* 遺伝子の多型を解析 ダイレクトシーケン
ス反応を用いた多型解析の結果、ヒト *nrf2* 遺伝子では、アミノ酸翻訳領域には
多型を検出することはできなかったが、プロモーター領域に複数の多型が存在
することが明らかになった。*keap1* 遺伝子ではアミノ酸翻訳領域に様々な多型
が存在しており、特に、アミノ酸の置換を伴うものが複数存在することが確認
された。そこで、これらの多型が、ヒトの薬剤応答性とどのように関連するの
かを調べるために、薬剤投与により急性肝障害、急性呼吸不全を示す症例の血
液検体の収集を行い、現在も進行中である。次年度にこれらの検体を用いて、
nrf2 遺伝子と *keap1* 遺伝子の多型を解析する。

D. 考察

Nrf2 の標的遺伝子群が、生体の薬剤による急性毒性・慢性毒性からの防御に
重要であることが、個体レベルで確認された。この結果は、Nrf2 の選択的活性
化剤が、がん予防の薬として利用可能であることを示唆しており、本研究の後
半に予定している Nrf2 活性化剤の開発に向けてのよりどころを与えるものであ
る。

AhRR 遺伝子欠損マウスで認められた化学発がんに対する抵抗性は、
AhRR::nrf2 2重欠失マウスでは、観察されなかった。これは、Nrf2 により制御
されている遺伝子群が *AhRR* 欠損マウスにおける癌抵抗性の実現に大きく貢献
していることを示すものであり、薬剤に対する抵抗性が、Nrf2 の機能に大きく
依存していることを示唆するものである。

多型解析では、ヒト *nrf2* 遺伝子では、プロモーター領域に複数の多型が、*keap1*
遺伝子ではアミノ酸翻訳領域に様々な多型が存在することが確認された。今後、
これらの多型がどのような集団に多いかを検討し、疾患や薬剤感受性の異常と
の関連を明らかにすることにより、個人ごとの薬剤応答性を予測することを可
能にする手がかりが得られると期待される。

E. 結論

Nrf2 により制御されている異物代謝系酵素群は、薬剤の毒性発現の抑制に重要である。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

“1. Nrf2-Keap1 制御系の活性化機構の分子レベルでの解析”の項目に同じ

2. 学会発表

“1. Nrf2-Keap1 制御系の活性化機構の分子レベルでの解析”の項目に同じ

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

特になし。

2. 実用新案登録

特になし。

3. その他

特になし。

3. Nrf2 活性化をもたらす物質の探索と検討

研究要旨

一部のプロスタグランジン (15d-PGJ2) が親電子性を有し、Keap1 に共有結合性に反応することにより、Nrf2 の活性化をもたらすことを明らかにした。Nrf2 欠損マウスでは、カラゲニン誘発の胸膜炎が遷延する傾向にあるが、これは、同マウスが Nrf2 を介する 15d-PGJ2 に対する応答を欠損しているためであることが示された。

A. 研究目的

Nrf2 は非刺激時には、細胞質において Keap1 との結合により、プロテアソームにより分解されている。これまで、環境中や食物中に含まれる親電子性物質、あるいは、活性酸素種への曝露により、Nrf2 は、Keap1 との結合とそれに伴う分解を免れるようになり、核内へ移行して転写を活性化する。こうした外来性の刺激以外で、Nrf2 を活性化するような内在性の物質が存在するかどうかは、これまで大きな疑問であった。

近年、Nrf2 の標的遺伝子として同定されている heme oxygenase 1 や peroxiredoxin 1 に、抗炎症作用があることが見いだされた。このことから、Nrf2 が制御する因子群として、炎症に拮抗する働きを有するものがあることを予想し、Nrf2 の炎症における役割の解明と、その際に生成されるさまざまな炎症性物質のうちで Nrf2 の活性化作用があるものを同定することを目的とした。

B. 研究方法

nrf2 遺伝子欠損マウスとそのコントロールマウスに対して、胸膜腔にカラゲニンを投与して胸膜炎を誘発し、胸水中に含まれるアルブミンの濃度、遊走する細胞数と種類を調べた。次いで、炎症の際に生成される物質で親電子性であることが確認されているプロスタグランジンの一つ、15d-PGJ(2)が、カラゲニン誘発性胸膜炎において、産生されるかを、同物質に対する抗体を用いた免疫染色により検討した。そして、15d-PGJ(2)が Nrf2 の標的遺伝子群を、Nrf2 依存

的に誘導するかどうかを野生型マウス由来の腹腔内マクロファージと *nrf2* 欠損マウス由来の腹腔内マクロファージとを用いて調べた。さらに、15d-PGJ(2)の生成の律速酵素である COX-2 の阻害剤を投与して、カラゲニン胸膜炎における 15d-PGJ(2)-Nrf2 のカスケードの重要性を検討した。

倫理面への配慮

本研究では遺伝子組換えマウスを実験に使用したが、その飼育、薬剤投与、屠殺にあたっては、動物愛護の精神にのっとり、与える苦痛が最小限になるように配慮した。また、無駄な屠殺を行うことがないように、計画を十分に吟味してから実験を行った。本実験計画は、筑波大学動物実験委員会及び遺伝子組換え安全委員会に申請をおこない、それぞれから承認されている。

C. 研究結果

nrf2 欠損マウスでは、野生型マウスに比べて、胸水中のアルブミンが増加しており、遊走する細胞数も増えていた。興味深いことは、遊走するマクロファージ数のピークが、野生型ではカラゲニン投与後 48 時間後であるのに対して、*nrf2* 欠損マウスでは 72 時間後と、遅延する傾向が認められた。実際、カラゲニン投与後 24 時間の腹腔内マクロファージには、15d-PGJ(2)の蓄積が観察された。また、外来性に、15d-PGJ(2)を投与すると、Nrf2 の標的遺伝子群の誘導が認められ、それらの誘導は、*nrf2* 欠損マウス由来のマクロファージでは認められなかった。これは、15d-PGJ(2)が、Nrf2 依存的に Nrf2 の標的遺伝子の発現を誘導することを示している。この際、15d-PGJ(2)が Keap1 分子に共有結合性に結合していることを示すことにも成功した。さらに、COX-2 の阻害剤を投与すると、野生型マウスであっても、*nrf2* 欠損マウスと同様に、炎症の消退過程が遅延し、炎症が遅延することが明らかになった。

D. 考察

15d-PGJ(2)が Keap1 分子に共有結合性に結合することが明らかになったこと

から、Keap1 分子が親電子性物質のセンサーとして機能していることがさらに確認されたといえる。

COX-2 の阻害剤の投与により、炎症が遷延し、このような COX-2 阻害剤の効果が 15d-PGJ(2)の同時投与によりキャンセルされることから、炎症の過程における 15d-PGJ(2)から Nrf2 へのシグナルの流れは、炎症の消退を促進することであると結論される。

内在性 Nrf2 活性化物質の同定は、今後の Nrf2 活性化薬剤の開発に有用な情報を提供すると期待される。

E. 結論

15d-PGJ(2)は、内在性の Nrf2 活性化物質であることが明らかになった。これは、炎症の後期に産生が誘導され、Nrf2 の活性化を通して、炎症の消退を促進する働きをするものと考えられる。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

“1. Nrf2-Keap1 制御系の活性化機構の分子レベルでの解析” の項目に同じ

2. 学会発表

“1. Nrf2-Keap1 制御系の活性化機構の分子レベルでの解析” の項目に同じ

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

特になし。

2. 実用新案登録

特になし。

3. その他

特になし。

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Katsuoka, F., Motohashi, H., Tamagawa, Y., Kure, S., Igarashi, K., Engel, J.D. and Yamamoto, M.	Small Maf compound mutants display CNS neuronal degeneration, aberrant transcription and Bach protein mislocalization coincident with myoclonus and abnormal startle response.	Mol. Cell. Biol.	23	1163-1174	2003
Ramos-Gomez, M., Dolan, P.M., Itoh, K., Yamamoto, M. and Kensler, T.W.	Influence of <i>nrf2</i> genotype on modulation by oltipraz of benzo[a]pyrene-DNA adducts and tumor yield in mice.	Carcinogenesis	24	461-467	2003
Kwak, M.K., Wakabayashi, N., Itoh, K., Motohashi, H., Yamamoto, M. and Kensler, T.W.	Modulation of <i>keap1</i> and <i>nrf2</i> - dependent gene expression by cancer chemopreventive dithiolethiones: IDENTIFICATION OF NOVEL GENE CLUSTERS.	J. Biol. Chem.	278	8135-8145	2003
Itoh, K., Wakabayashi, W., Katoh, Y., Ishii, T., O'Connor, T. and Yamamoto, M.	Keap1 regulates both cytoplasmic-nuclear shuttling and degradation of Nrf2 in response to electrophiles.	Genes Cells.	8	379-391	2003
Hirayama, A., Yoh, K., Nagase, S., Ueda, A., Itoh, K., Morito, N., Hirayama, K., Takahashi, S., Yamamoto, M. and Koyama, A.	EPR imaging and analysis of reducing activity in oxidative stress-related Nrf2 transcription factor deficient mice.	Free Rad. Biol. Med.	34	1236-1242	2003
Noda, S., Harada, N., Hida, A., Fujii-Kuriyama, Y., Motohashi, H. and Yamamoto, M.	Gene expression of detoxifying enzymes in AhR and Nrf2 compound null mutant mouse.	Biochem. Biophys. Res. Commun.	303	105-111	2003
Moriguchi, T., Motohashi, H., Hosoya, T., Nakajima, O., Takahashi, S., Ohsako, S., Aoki, Y., Nishimura, T., Tohyama, C., Fujii-Kuriyama, Y., and Yamamoto, M.	Distinct specificity of xenobiotic response in AhR-humanized model mouse.	Proc. Natl. Acad. Sci. USA	100	5652-5657	2003
McMahon, M., Itoh, K., Yamamoto, M. and Hayes, J.D.	Keap1-dependent proteasomal degradation of transcription factor Nrf2 contributes to the negative regulation of ARE-driven gene expression.	J. Biol. Chem.	278	21592-21600	2003
Aono, J., Yanagawa, T., Itoh, K., Li, B., Yoshida, H., Kumagai, Y., Yamamoto, M. and Ishii,	Activation of Nrf2 and accumulation of ubiquitinated A170 by arsenic in osteoblasts.	Biochem. Biophys. Res. Commun.	305	271-277	2003

T.					
Nioi, P., McMahon, M., Itoh, K., Yamamoto, M. and Hayes, J.	Identification of a novel Nrf2-regulated antioxidant response element (ARE) in the mouse NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 gene: reassessment of the ARE consensus sequence.	Biochem. J.	374	337-348	2003
Pi, J., Horikuchi, S., Sun, Y., Nikaido, M., Hayashi, T., Yamauchi, H., Itoh, K., Yamamoto, M., Sun, G., Waalkes, M.P., Shimojo, N. and Kumagai, Y.	A potential mechanism for the impairment of nitric oxide formation caused by prolonged oral exposure to arsenate in rabbits.	Free Rad. Biol. Med.	35	102-113	2003
Wakabayashi, N., Itoh, K., Wakabayashi, J., Motohashi, H., Noda, S., Takahashi, S., Imakado, S., Kotsuji, T., Otsuka, F., Roop, D.R., Harada, T., Engel, J.D. and Yamamoto, M.	<i>Keap1</i> -null mutation leads to postnatal lethality due to constitutive Nrf2 activation.	Nature Genetics	35	238-245	2003
Hayashi, A., Suzuki, H., Itoh, K., Yamamoto, M. and Sugiyama, Y.	Transcription factor Nrf2 is required for the constitutive and inducible expression of multidrug resistance-associated protein1 (Mrp1/Abcc1) in mouse embryo fibroblasts.	Biochem. Biophys. Res. Commun.	310	824-829	2003
Jowsey, I.R., Jiang, Q., Itoh, K., Yamamoto, M. and Hayes, J.D.	Expression of the aflatoxin B1-8,9-epoxide-metabolizing murine glutathione S-transferase A3 subunit is regulated by the Nrf2 transcription factor through an antioxidant response element.	Mol. Pharmacol.	64	1018-1028	2003
Kwak, M.K., Wakabayashi, N., Greenlaw, J.L., Yamamoto, M. and Kensler, T.W.	Antioxidants enhance mammalian proteasome expression through the Keap1-Nrf2 signaling pathway.	Mol. Cell. Biol.	23	8786-8794	2003
Itoh, K., Mochizuki, M., Ishii, Y., Ishii, T., Shibata, T., Kawamoto, Y., Kelly, V., Sekizawa, K., Uchida, K. and Yamamoto, M.	Transcription factor Nrf2 regulates inflammation by mediating the effect of 15-deoxy-D ^{12,14} -prostaglandin J ₂ .	Mol. Cell. Biol.	24	36-45	2004
Kyo, M., Yamamoto, T., Motohashi, H., Kamiya, T., Kuroita, T., Tanaka, T., Kawakami, B. and Yamamoto, M.	Evaluation of MafG interaction with Maf recognition element arrays by surface plasmon resonance imaging technique.	Genes Cells	9	153-164	2004
Ishii, T., Itoh, K., Ruiz, E., Leake, D.S., Unoki, H., Yamamoto, M. and Mann, G.E.	Role of Nrf2 in the regulation of CD36 and stress protein expression in murine macrophages: activation by oxidatively modified LDL and	Circulation Res.	94	609-616	2004

	4-hydroxynonenal.					
Wakabayashi, N., Dinkova-Kostova, A.T. Holtzclaw, W.D., Kang, M-I., Kobayashi, A., Yamamoto, M., Kensler, T.W. and Talalay, P.	Protection against electrophile and oxidant stress by induction of the phase 2 response: Fate of cysteines of the Keap1 sensor modified by inducers.	Proc. Natl. Acad. Sci. USA	101	2040-2045	2004	
Kang, M.I., Kobayashi, A., Wakabayashi, N., Kim, S.G. and Yamamoto, M.	Scaffolding of Keap1 to the actin cytoskeleton controls the function of Nrf2 as key regulator of cytoprotective phase 2 genes.	Proc. Natl. Acad. Sci. USA	101	2046-2051	2004	
Motohashi, H., Katsuoka, F., Engel, J.D. and Yamamoto, M.	Small Maf proteins are transcriptional cofactors for normal keratinocyte differentiation in the Keap1-Nrf2 regulatory pathway.	Proc. Natl. Acad. Sci. USA		in press		
Kobayashi, A., Ohta, T. and Yamamoto, M.	Unique function of the Nrf2-Keap1 pathway in the inducible expression of antioxidant and detoxifying enzymes.	Methods Enzymology	378	273-286	2004	
Itoh, K., Tong, K.I. and Yamamoto, M.	Molecular mechanism activating Nrf2-Keap1 pathway in regulation of adaptive response to electrophiles.	Free Radical Biol. Med.		in press		
Kobayashi, M. and Yamamoto, M.	Molecular mechanisms activating Nrf2-Keap1 pathway in regulation of antioxidant genes.	Antioxidants Redox Signaling		in press		
山下年晴, 山本雅之	環境応答系転写因子の分子機構の解明	化学工業	54	641-645	2003	
伊東 健, 山本雅之	親電子性物質応答の分子機構	生化学		印刷中		
細谷朋方, 山本雅之	Keap1-Nrf2 システムによる抗酸化酵素群の統一的発現制御機構.	分子呼吸器病		印刷中		

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ

20030360

以降は雑誌/図書等に掲載された論文となりますので、
「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。