

## Nrf2 酸化ストレス応答系による病態制御

伊 東 健

転写因子 Nrf2 は、親電子性物質、活性酸素、小胞体ストレスや血流によるずり応力によって活性化され、高等動物における酸化ストレス適応反応を統一的に制御する。毒性学では、少量のストレスが細胞の防御機構を誘導し引き続く重篤なストレスに耐性となる現象を“ホルミシス”と呼ぶが、Nrf2 は酸化ストレスに対するホルミシスを仲介すると考えられる。近年、ファイトケミカル (phytochemical) 等による Nrf2 の活性化が、様々な疾患の予防・治療に有効であることが動物モデルで明らかになりつつある。本総説では、Nrf2 応答系について概説し、ヒト疾患との関連について議論する。

## はじめに

生体は、酸化-抗酸化 (レドックス) のバランスを調節し、細胞内酸化還元状態を一定に維持して機能する。酸化-抗酸化因子のバランスが酸化の方向に傾いた状態 (酸化ストレス) は、様々な疾患の原因または誘因になることが知られている。一方、細胞のホメオスタシスの維持には転写因子が重要な機能を担っている。転写因子 Nrf2 (NF-E2 related factor 2) は、グロビン遺伝子発現制御領域中の NF-E2 結合配列と呼ばれる遺伝子発現制御配列 (GRE) に結合する因子として 1994 年にクローニングされた<sup>1)</sup>。私たちは、NF-E2 結合配列と抗酸化剤応答配列 (ARE) との類似性から、Nrf2 が ARE を介した遺伝子発現を制御することを明らかにした<sup>2)</sup>。ARE は化学発がん研究の分野で見いだされた GRE である。すなわち、ブチル化ヒドロキシアニソールなどのフェノール性食物防腐剤 (抗酸化剤) はマウスやラットにおいて一群の解毒化酵素の発現を統一的に誘導して化学物質による発がんを抑制することが知られていたが<sup>3)</sup>、これは今日では防腐剤が生体内で親電子性物質

に代謝され ARE を介した転写を活性化することによって分っている。現在ではブロッコリースプラウトに含まれるスルフォラフェンやカレーのターメリックに含まれるクルクミンなどの親電子性物質 (毒性の低い親電子性だと考えられている) は Nrf2 を活性化することによって発がん物質の解毒化を促進し、発がんを抑制すると理解されている<sup>4)</sup>。本稿では、近年注目されている Nrf2 の炎症防御における役割を中心に概説する。

## 1. Nrf2 の構造と機能

Nrf2 は、塩基性領域/ロイシンジッパー構造 (b-Zip 構造) を持つ転写因子であり、CNC 転写因子群に属する。この転写因子群は、ヒトで *p45NF-E2*, *Nrf1*, *Nrf2*, *Nrf3*, *Bach1*, *Bach2* の 6 遺伝子が報告されている<sup>1)</sup>。この転写因子群で初めに発見された *p45NF-E2* は  $\beta$  グロビン遺伝子発現制御領域に存在する NF-E2 配列に結合する転写因子としてマウス赤血球系細胞株よりクローニングされた。

ニワトリとヒトの Nrf2 をアミノ酸レベルで比較すると高度に保存された領域が六つ存在しており、我々はこれらの領域を Neh1-6 ドメイン (Nrf2-ECH homology 1-6) と命名した (図 1)<sup>5)</sup>。タンパク質の C 末端には、二量体形成に必要なロイシンジッパー領域、および DNA 結合に必要な塩基性領域が存在する (Neh1)。N 末端に存在する Neh2 は、種間で非常に保存性が高く、Nrf2 タンパク質の機能制御ドメインである。Neh2 結合因子としてクローニング

弘前大学大学院附属高度先進医学研究センター分子生体防御学講座 (〒036-8562 弘前市在府町 5 番地)  
Disease regulation by Nrf2 antioxidant system  
Ken Itoh (Department of Stress Response Science, Center for Advanced Medical Research, Hirosaki University Graduate School of Medicine, 5 Zaifucho, Hirosaki 036-8562, Japan)

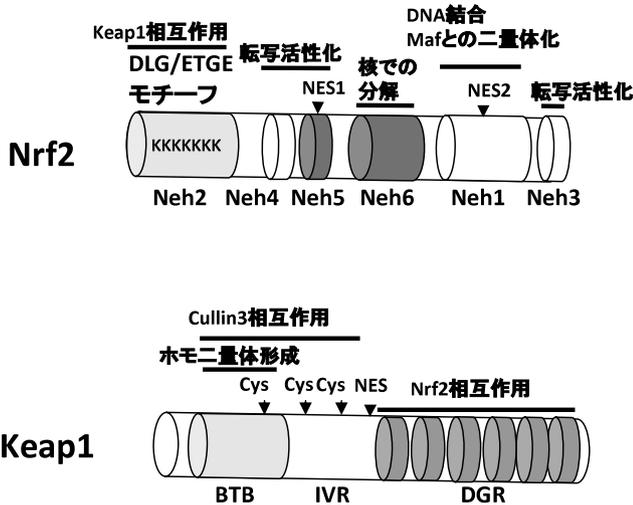


図1 Nrf2, Keap1のドメイン構造とその機能  
 Nrf2のNES1は、酸化ストレスに感受性でありNES2は非感受性であるという報告がある。Keap1のBTBドメインはKeap1のホモ二量体形成を担う。Cullin3はBTBおよびIVRと相互作用する。ストレス感知を担う反応性システインはBTBおよびIVRの両ドメインに存在する。Neh; nrf2-ECH homology, NES; nuclear export signal, BTB; Broad complex, Tramtrack, and Bric-a-brac, IVR; intervening region, DGR; double glycine repeat.

された細胞質タンパク質 Keap1 (Kelch-like ECH-associated protein1) は Nrf2 の活性化を抑制する (図1)。Neh4 および Neh5 は Nrf2 の転写活性化ドメインである。

2. Nrf2の標的遺伝子セット

Nrf2は、親電子性物質の解毒化酵素であるグルタチオンS-転移酵素(GST)やNAD(P)Hキノン還元酵素(NQO1)などの異物代謝酵素群、グルタチオン合成酵素やヘムオキシゲナーゼ1(HO-1)などの酸化ストレス防御遺伝子群、抗炎症性遺伝子群、ユビキチンプロテアソーム系に關与する遺伝子群、ヘム・鉄代謝遺伝子、薬物トランスポーター遺伝子などを統一的に誘導し、ストレスに対する恒常性維持機構として働いていることがマイクロアレイ等により詳細に解析されている<sup>6)</sup>。

3. Nrf2の活性化機構

非ストレス状態の細胞においてNrf2はKeap1により抑制されている。細胞が親電子性物質、活性酸素、小胞体ストレスや血管ずり応力の刺激を受けると、Nrf2はKeap1の抑制から開放されて活性化される(図2および図3)。活性酸素の感知を考える上でセンサータンパク質Keap1

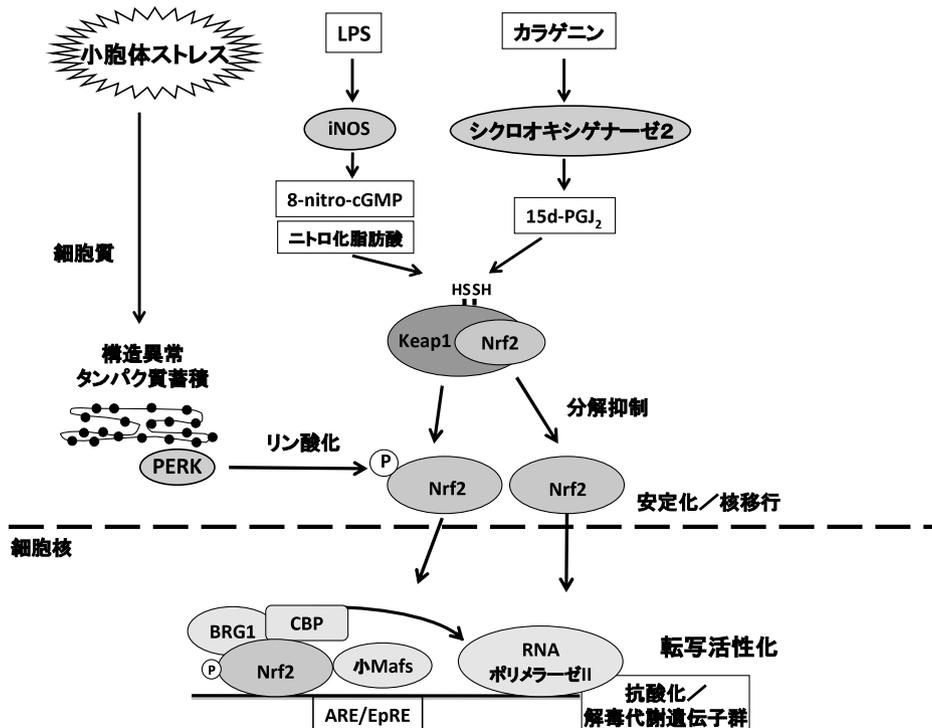


図2 炎症および小胞体ストレスによるNrf2の活性化機構  
 小胞体ストレスによりPERK (PKR-like endoplasmic reticulum kinase) が活性化し、Nrf2をリン酸化する。安定化し核内へ移行したNrf2は小Maf因子とヘテロ二量体を形成し、酸化化剤/親電子性物質応答配列 (antioxidant/electrophile responsive element: ARE/EpRE) に結合する。Nrf2はARE/EpRE上にCBP, BRG1などをリクルートし、転写装置RNAポリメラーゼIIのプロモーターへのリクルートを増強させ、酸化化や解毒代謝を担う遺伝子群の転写が活性化される。

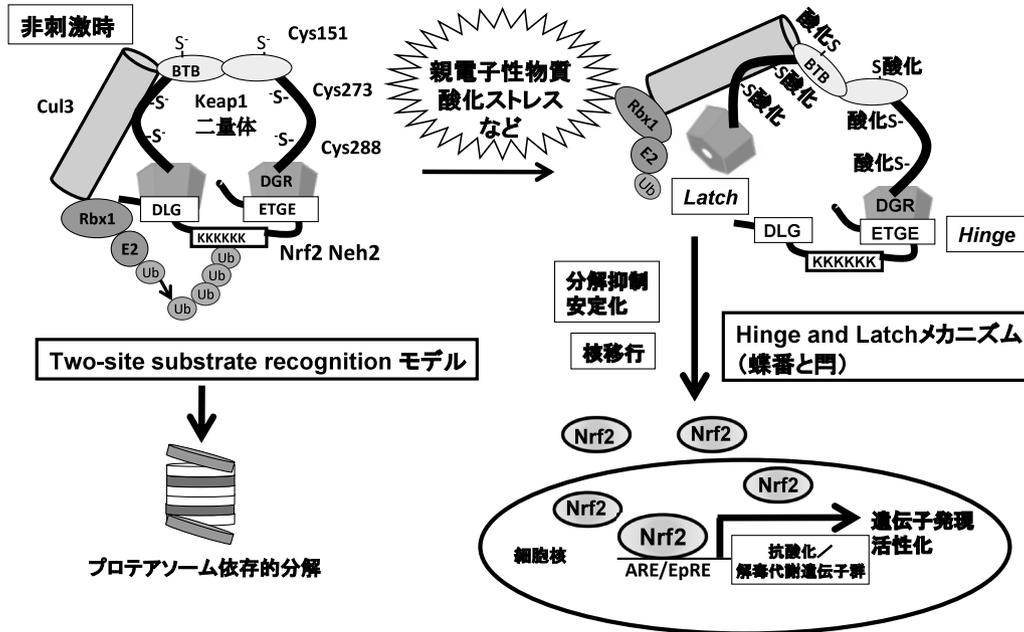


図3 蝶番と門モデルによる Nrf2 の活性化機構  
 細胞が親電子性物質や酸化ストレスなどの刺激を受けるとマウス Keap1 タンパク質を構成する 25 個 (ヒトでは 27 個) のシステインのうち Cys151, Cys273, Cys288 をはじめとするシステインが酸化修飾を受ける。その結果, Cullin3 ユビキチン複合体による Nrf2 ユビキチン化が減弱し, 新たに合成された Nrf2 は分解を逃れて核内へ移行し, 抗酸化/解毒代謝遺伝子群の発現増強を行う。Nrf2 Neh2 ドメインは Keap1 の DGR ドメインと相互作用する。Keap1 は Neh2 の ETGE モチーフと DLG モチーフの両モチーフを認識し, それによって最適に配置されたりジンを Cullin3 ユビキチン複合体がユビキチン化する (Two-site substrate recognition model)。

の細胞内局在は重要であるが, 近年, 渡井らは Keap1 特異的のモノクローナル抗体を用いてマウス細胞画分を解析し, Keap1 は主に核近傍の細胞質 (81%) と小胞体 (14%) および核 (5%) に存在することを示した<sup>7)</sup>。

1) 非ストレス状態における Nrf2 抑制機構

i) Keap1 による分解

非ストレス状態下では, Nrf2 は Keap1 に捕捉されプロテアソームによって分解される (図3)。Keap1 を介した Nrf2 分解促進作用は, Cullin3-Rbx1 ユビキチンリガーゼ複合体による Nrf2 ユビキチン化の促進による<sup>8)</sup>。Keap1 は BTB ドメインを介して二量体を形成して, Nrf2 の ETGE モチーフと DLG モチーフの両モチーフと結合し, それによって空間的に配置されたりジンを Cullin3 ユビキチンリガーゼ複合体がユビキチン化する (Two-site substrate recognition model; 文献 9: 図3)。

ii) 核外輸送

Nrf2 には二つの, Keap1 には一つの核外移行シグナルコンセンサス配列が存在し, Nrf2, Keap1 ともに細胞質と核をシャトリングするという仮説が提唱されている<sup>10)</sup>。実際に, 核外輸送タンパク質である Crml の特異的阻害剤であるレプトマイシン処理や Nrf2 誘導剤であるジエチルマレイン酸により, Keap1, Nrf2 ともに核に蓄積することが報告されており, 核外輸送活性の低下が Nrf2 の活性化に関

与することが考えられた<sup>11)</sup>。しかしながら, 我々はこれと矛盾した結果も得ており<sup>7)</sup>, Keap1 の核-細胞質シャトリングには議論が残る。細胞種または細胞の状態によって核-細胞質シャトリングする Keap1 の量が違う可能性があると考えられる。

2) 親電子性物質および活性酸素による活性化機構

Nrf2 を活性化するシグナルは, Keap1 による Nrf2 抑制作用を阻害することにより, Nrf2 の安定化を誘導する。Nrf2 の過剰発現が Nrf2 応答系を活性化するのに十分であることなどから, 転写活性化のステップ等には親電子性物質によるシグナルは必要ではないと考えられる。Keap1 が持つ反応性のシステインの酸化が Nrf2 活性化の鍵反応であると考えられているが少なくとも部分的には, リン酸化などによる翻訳後修飾が Nrf2 の活性化に関与していると考えられる。以下に, Keap1 を介する活性化経路と介さない活性化経路についてその分子機構を概説する。

i) Keap1 を介する経路

システインのチオール基は, 親電子性物質や活性酸素に対するセンサーとして最も有望なものであり, 実際にマウス Keap1 は 25 個のシステインを持つ。また Nrf2 を活性化する親電子性物質の活性は Keap1 との反応性と相関することから, 我々は Keap1 が親電子性物質に対するセンサーであると考えている<sup>12)</sup>。

親電子性物質による Nrf2 の核への蓄積は、親電子性物質によって Keap1 が酸化修飾され Nrf2 ユビキチン化が低下することによる。小林らは、Keap1 による Nrf2 分解が減弱すると、Keap1 と Nrf2 の解離が起きずに Keap1 の Nrf2 結合部位が飽和し、新規合成されたタンパク質が核に移行することを示した<sup>13)</sup>。Nrf2 と Keap1 の解離なしに、Nrf2 の分解が抑制される分子機構は、山本らの提唱する Hinge and Latch (蝶番と門) モデルによって説明できる<sup>9,14)</sup>。この蝶番と門モデルでは、Nrf2 ETGE モチーフと Keap1 との相互作用を蝶番部分、Nrf2 DLG モチーフと Keap1 との相互作用を門部分に見立てる。Nrf2 DLG と Keap1 との相互作用は、Nrf2 ETGE モチーフ-Keap1 との相互作用より約 2 オーダー弱く、門部分は Keap1 のわずかなコンフォメーション変化によっても容易に解離すると予想される。これにより、基質となる Nrf2 リジン残基の空間的配置が乱れ、Nrf2 のユビキチン化は阻害される。このモデル以外にもキノン系の親電子性物質はユビキチン分子 63 番目のリジンを介した Keap1 のポリユビキチン化を促進しプロテアソーム非依存的な Keap1 の分解を促進することが報告されている<sup>15)</sup>。また、スルフォラフェンは Keap1 と Cullin3 の相互作用を減弱する<sup>16)</sup>。これらの報告は、親電子性物質の種類により Keap1 の酸化修飾コードが異なり、それにとまって Keap1 の機能変換様式も異なることを示唆する。

質量分析による解析により、Keap1 の IVR (intervening region) に存在する Cys<sup>273</sup> や Cys<sup>288</sup> あるいは BTB ドメインに存在する Cys<sup>151</sup> などが親電子性物質と高い反応性を有することが明らかになっている<sup>17)</sup>。親電子性物質種により修飾されるシステインが異なることが報告されているが、これは化学物質の立体的な構造や大きさの違いによると思われる。実際には、特異的な複数のシステインの酸化修飾が、Keap1 が Nrf2 を分解する能力の不活化に関与すると思われる。

Keap1 の 151 番目のシステインに変異を導入すると酸化ストレス下においても Nrf2 のユビキチン化が減弱しないことから、Keap1 の酸化修飾によって起こるコンフォメーション変化に 151 番目のシステインが重要であるか、またはこのシステインが実際に重要な標的のシステインであることが考えられる<sup>18,19)</sup>。また、内因性の親電子性プロスタグランジン 15deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J<sub>2</sub> (15d-PGJ<sub>2</sub>) や、一酸化窒素 (NO) と cGMP との反応生成物である 8-nitro-cGMP やニトロ化脂肪酸が内因性の親電子性物質として Nrf2 を活性化することが近年報告され注目を集めている<sup>20,21)</sup>。

#### ii) リン酸化酵素を介する経路

プロテインキナーゼ C (PKC) が Nrf2 の 40 番目のセリンをリン酸化することによって、キノン系親電子性物質に

よる Nrf2 の活性化を仲介することが報告されている<sup>22)</sup>。また、神経細胞などにおいては、PI3K/Akt 経路が Nrf2 の活性化に関与する<sup>23)</sup>。これは、GSK3 $\beta$  による直接のリン酸化を介した Nrf2 の核外移行促進を Akt が GSK3 $\beta$  をリン酸化して不活性化することによる<sup>23)</sup>。MAP キナーゼも Nrf2 の活性化に関与するという報告がある。例えば、高酸素応答においては、NAD (P) H オキシダーゼ (Nox) によって生じた活性酸素が ERK1 および ERK2 の活性化を誘導して、Nrf2 を活性化する<sup>24)</sup>。

#### 3) 活性酸素による活性化

活性酸素による直接の Keap1 システインの酸化修飾はまだ報告されていない。一方、Nox によって生成された活性酸素は、より安定な反応性中間物質またはリン酸化経路を介して Nrf2 を活性化することが報告されている<sup>25)</sup>。

#### 4) 小胞体ストレスによる活性化

Nrf2 は、UPR (unfolded protein response) に重要な役割を果たすリン酸化酵素 PERK (PKR-like endoplasmic reticulum kinase) の基質として同定された<sup>26)</sup>。Nrf2 は様々な UPR 誘導物質で活性化される。

### 4. Nrf2 の炎症制御における役割

Nrf2 遺伝子欠失マウス (Nrf2 KO) はタバコ誘発性の肺気腫、および抗酸化剤であるブチル化ヒドロキシトルエン、高酸素またはカラゲニンによる急性肺障害、およびカラゲニンによる胸膜炎などの様々な肺疾患に高感受性であることが報告されており、Nrf2 が急性肺障害および急性炎症の生体側防御因子として重要な働きをすることが明らかになっている<sup>1,17)</sup>。Nrf2 KO の炎症に対する感受性増大の原因としては、Nrf2 KO では酸化ストレスが増大していること、あるいは Nrf2 がなんらかの分子機構で炎症反応を直接制御していることが考えられる。実際に活性酸素の過剰はそれ自体で、炎症を増悪することが知られている。

Thimmulappa らは、Nrf2 KO がエンドトキシンショックに高感受性であることを報告した<sup>27)</sup>。Nrf2 KO においては、リポ多糖 (LPS) や腫瘍壊死因子  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) による MyD88 依存的および非依存的な炎症性サイトカインの亢進が LPS 投与初期の段階でグローバルに観察される。これは、Nrf2 KO のマクロファージおよび胎児期線維芽細胞で NF- $\kappa$ B および IRF3 (interferon regulatory factor 3) の活性化が増大していることと相関している。これら Nrf2 KO における炎症性因子の活性増大は N-アセチルシステインの投与によって回復することから、少なくとも部分的にはグルタチオンの低下を伴った酸化ストレスの増大がこれらの変化の原因であり、Nrf2 は炎症下で活性酸素の産生を抑制して炎症反応を抑制する機能を有すると考えられる (図 4)。また、Kong らのグループは、マウス腹腔マクロファージを用いて Nrf2 の活性化剤であるスルフォラフェ

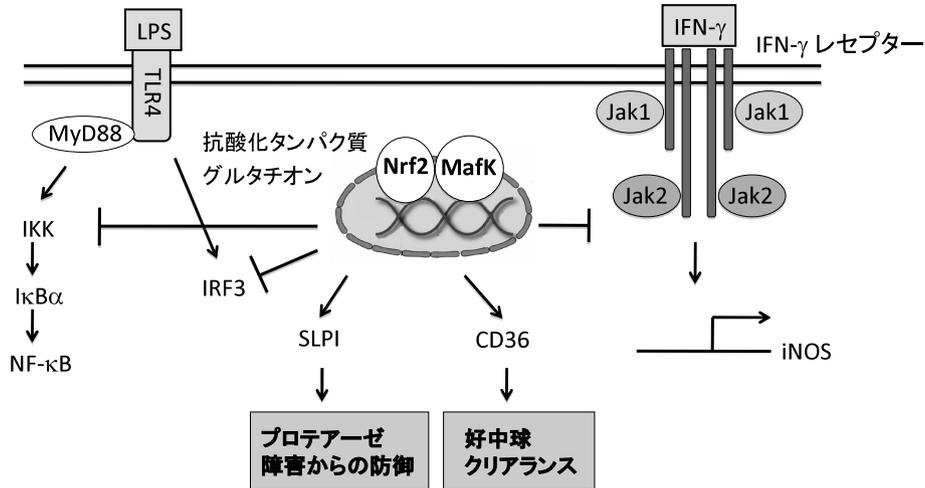


図4 マクロファージ Nrf2 による炎症抑制機構

Nrf2 はマクロファージにおいて活性酸素の産生を抑制することにより、MyD88 依存のおよび非依存的な経路を抑制する。また、IFN $\gamma$  による iNOS の誘導を抑制する。さらに、SLPI および CD36 を制御することにより、好中球性の炎症に対して防衛的に働く。

ンが LPS に応答した TNF $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、iNOS (inducible NO synthase) などの発現誘導を Nrf2 依存性に抑制することを示した<sup>28)</sup>。興味深いことに、iNOS のスルフォラフェンによる抑制は他の炎症性因子に比べて感受性が高い<sup>28)</sup>。また、Talalay らのグループは iNOS の誘導における phase 2 誘導剤の阻害効果を解析して、LPS に対する阻害よりもインターフェロン $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) 投与に対する阻害効果が Nrf2 に依存性の高い反応であることを報告している<sup>29,30)</sup>。一方、Nrf2 KO は喘息などのアレルギー疾患に対しても高感受性である<sup>31)</sup>。樹状細胞に対する酸化ストレスは T 細胞分化に際して Th2 優位の細胞分化を促進してアレルギー反応を悪化させる<sup>32)</sup>。Nrf2 KO の樹状細胞では、活性酸素が細胞内に蓄積した結果、Th2 優位の T 細胞分化を促進しアレルギー反応を増大していることが報告されている<sup>33)</sup>。

我々は、カラゲニンによる急性炎症モデルを用いて、Nrf2 の炎症に対する役割を解析した。その結果、カラゲニンによる胸膜炎および肺炎モデルのいずれにおいても、Nrf2 KO においては好中球性の炎症が増悪していることが明らかになった<sup>20,34)</sup>。さらにカラゲニンを用いた急性胸膜炎モデルにおいては、HO-1 などの Nrf2 標的遺伝子がマクロファージに局限して発現誘導されることを見いだした<sup>20)</sup>。Gilroy らは、ラットのカラゲニン胸膜炎のモデルにおいて炎症後期にマクロファージで誘導されるシクロオキシゲナーゼ 2 (COX-2) が PPAR $\gamma$  のリガンドである 15d-PGJ<sub>2</sub> の産生および HO-1 の誘導を介して炎症の終結反応に関与することを報告していた<sup>35)</sup>。我々の行った胸膜炎モデルにおいても COX-2 特異的阻害剤である NS398 の投与によりマクロファージにおける Nrf2 標的遺伝子群の発現誘導が阻害された。また、15d-PGJ<sub>2</sub> は Keap1 と共有結合し

て Nrf2 を活性化した。15d-PGJ<sub>2</sub> は PPAR $\gamma$  を活性化して AP-1 や NF- $\kappa$ B を抑制すること、さらには I $\kappa$ B キナーゼや NF- $\kappa$ B p65 サブユニットと直接結合してその活性を抑制することも知られており、炎症の程度や種類による 15d-PGJ<sub>2</sub> の蓄積量の違いなどにより抗炎症作用のターゲットとなる因子が複数存在する可能性がある。

また、Nrf2 KO はブタ臓臓エラストラーゼ (PPE) 誘発性の肺気腫に対しても高感受性を示した<sup>36)</sup>。PPE 誘発性の肺気腫モデルでは初期に起こる出血性および好中球性の病変がその後起きる肺気腫の原因となるが、PPE 投与後の炎症初期において肺胞マクロファージにおける Nrf2 依存的な標的遺伝子の発現がみられた<sup>36)</sup>。このようなことから、カラゲニンや PPE による炎症刺激によっては、Nrf2 がマクロファージにおいて活性化され炎症反応を抑制することが考えられた。Nrf2 のマクロファージでの炎症抑制における役割の重要性を解析するために、骨髄移植を用いて解析した。PPE 誘発性の肺気腫モデルを用いて解析すると、Nrf2 KO に野生型骨髄細胞を移植した場合には肺気腫の病態の劇的な改善が観察されたが、Nrf2 KO 由来の骨髄を移植した場合には、病態の改善は観察できなかった<sup>36)</sup>。骨髄細胞が、レジデントの肺胞マクロファージに寄与する割合が我々の実験系で約 10% 前後であることを考えると、生着した少数の野生型のマクロファージが何らかの分子機構で生体防御機能を果たしていることが考えられた。

Nrf2 のマクロファージにおける標的遺伝子を解析するために我々はキリンホールディングス・フロンティア技術研究所との共同研究により、Nrf2 の活性化物質である 15d-PGJ<sub>2</sub> とマウスマクロファージ細胞株である Raw264.7 細胞を用いて標的遺伝子を解析した。その結果、Nrf2 は、

抗酸化タンパク質・解毒化酵素群に加えて、それと同程度の抗炎症性を持った遺伝子の発現を制御していることが明らかになった（未発表）。それらの中には、SLPI（secretory leukocyte protease inhibitor）やCD36などの抗炎症性の因子が含まれる。SLPIは好中球エラスターゼの阻害因子として知られる分泌因子であるが、実際に前述したエラスターゼ誘発性肺気腫モデルにおいてマクロファージでNrf2依存的に発現し、好中球エラスターゼ活性を阻害している様子が観察された。また、CD36はNrf2の標的因子として酸化LDLによって発現誘導される因子として発見されたが、タバコ誘導性肺気腫モデルにおいてはNrf2依存的に肺胞マクロファージにおいて誘導され、好中球の貪食に関与することが示唆された<sup>37)</sup>。

### 5. 内皮細胞におけるNrf2の抗炎症作用と動脈硬化症における役割

血管内皮細胞は血管を形成するだけでなく、血管内の化学的および物理的な刺激を感知して、生体のホメオスタシスの維持に重要な働きをする。例えば物理的な刺激として、血管内皮細胞は常に血流によるずり応力（shear stress）に曝されている。shear stressは血管の部位によってその方向や強さが異なり、分岐部や彎曲部には渦をまく乱流（turbulent flow）や往復を繰り返すような流れ（oscillatory flow）が生じる一方、直線部には一方向の層流（laminar flow）が起こる。動脈硬化症が血管の分岐部に好発することから、

turbulent flowやoscillatory flowは動脈硬化を促進する一方、laminar flowは動脈硬化症を抑制すると考えられる。Chenおよび蕨らは、laminar flowが血管内皮細胞において、一連のNrf2標的遺伝子の発現を誘導することを報告した<sup>38,39)</sup>。我々は、ヒト大動脈由来血管内皮細胞（HAEC細胞）を用いて、laminar flowおよびoscillatory flowのNrf2制御系に対する影響を詳細に解析し、laminar flowが特異的にNrf2制御系を活性化することを明らかにした<sup>40)</sup>。どちらのshear stressによっても、Nrf2は核に蓄積したが、oscillatory flowではNrf2のNQO1制御領域への結合がなんらかの原因で阻害されていた。また、DaiらはNrf2抗体を用いた免疫染色法によりマウスの血管分岐部においてはNrf2の核蓄積が減弱していることを報告した<sup>41)</sup>。Nrf2が血管分岐部では不活化状態にあることが、動脈硬化巣の好発部位の特異性に関与していることが考えられる。近年、laminar flowによって活性化される転写因子KLF2がNrf2の核蓄積を促進して、Nrf2標的遺伝子の発現誘導を増強することが報告された<sup>42)</sup>。我々はさらにHAEC細胞を用いてlaminar flowによるNrf2の活性化機構を解析して、laminar flow開始後の初期段階にはCOX-2の誘導を介した15d-PGJ<sub>2</sub>の産生が関与することを明らかにした（図5）。また、蕨らは正常ヒト臍帯静脈内皮細胞（HUVEC）を用いて、laminar flowがキサンチンオキシダーゼやNoxを介してスーパーオキシドを産生し、これが脂質の過酸化を介してNrf2を活性化することを報告している<sup>25)</sup>。また、Dai

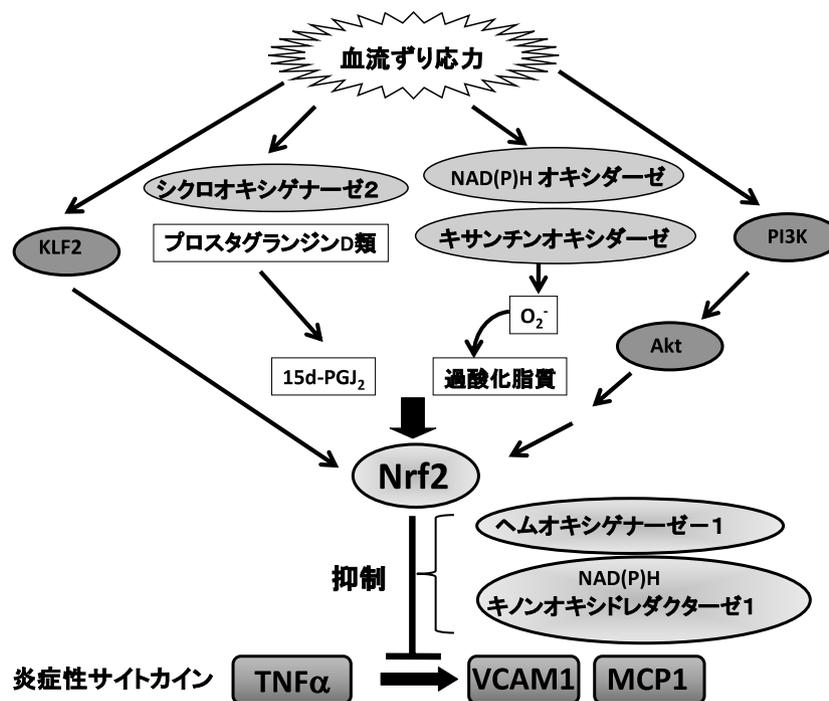


図5 Lamellar shear ストレスによるNrf2の活性化機構（詳細は本文を参照）

らは同様に HUVEC 細胞を用いて PI3K/Akt 経路が Nrf2 の活性化に必要であると報告している<sup>41)</sup>。

ところで、血管内皮細胞において TNF $\alpha$  は主要な炎症性因子の一つである。TNF $\alpha$  に応答した炎症性接着因子 VCAM-1 の発現に Rac1-Nox の経路を介した活性酸素の産生が関与していることが報告されている<sup>43,44)</sup>。Nox の阻害剤である DPI (diphenylenciodonium) は、活性酸素の産生と VCAM-1 の発現を抑制するが TNF $\alpha$  による NF- $\kappa$ B の誘導には影響を与えないことから<sup>44)</sup>、活性酸素は NF- $\kappa$ B を介さない系で VCAM-1 の発現誘導に関わっていると考えられる。Nrf2 または NQO1 の過剰発現は、TNF $\alpha$  による VCAM-1 の発現を抑制することから<sup>38)</sup>、Nrf2 は活性酸素の産生を抑制することによって VCAM-1 の発現誘導を抑制している可能性がある。Nrf2 が NF- $\kappa$ B には影響を与えずに、p38 MAP キナーゼの活性化を抑制して VCAM-1 の発現を抑制するという報告はこの仮説と一致する<sup>45)</sup> (図 6)。Nrf2 経路が NF- $\kappa$ B の活性を抑制するという報告もあることから<sup>46,47)</sup>、血管内皮細胞において Nrf2 が VCAM-1 を始めとする炎症性因子を抑制する詳細な分子機構に関しては、今後の課題である。

ところで、我々は以前に腹腔マクロファージを用いた解析から、酸化 LDL は Nrf2 を介してスカベンジャーレセプ

ター CD36 の発現を誘導して泡沫化マクロファージの形成に寄与することを報告した<sup>48)</sup>。さらに、Nrf2 が CD36 遺伝子第一エクソンの上流に存在する特定の ARE に結合し CD36 の転写を直接的に制御することを明らかにした<sup>49)</sup>。最近、APOE (apolipoproteinE) と Nrf2 のダブルノックアウトマウスの解析により、Nrf2 の欠失により動脈硬化巣の形成が著明に軽減することが報告された<sup>50)</sup>。動脈硬化巣においては、CD36 遺伝子の発現低下が認められ、これが泡沫化マクロファージの形成を阻害しているようである。

## 6. 治療標的としての可能性

これまで概説したように、Nrf2 の機能欠損は、個体において酸化ストレスを引き起こし、様々な疾患の増悪因子となる。逆に、ファイトケミカルやその誘導体による Nrf2 の活性化は、疾患の予防および改善に有効であることが期待される。近年、山本らのグループをはじめとした複数のグループから、肺腺がん患者および肺扁平上皮がん患者のがん組織における Keap1 および Nrf2 の体細胞変異が報告されている<sup>51~53)</sup>。興味深いことにこれらの変異はすべて Nrf2 の活性化にいたる変異であった。Nrf2 は生体防御遺伝子を統一的に制御し細胞の生存に必須な転写因子であるが、Nrf2 標的遺伝子セットは疾患においても“病巣

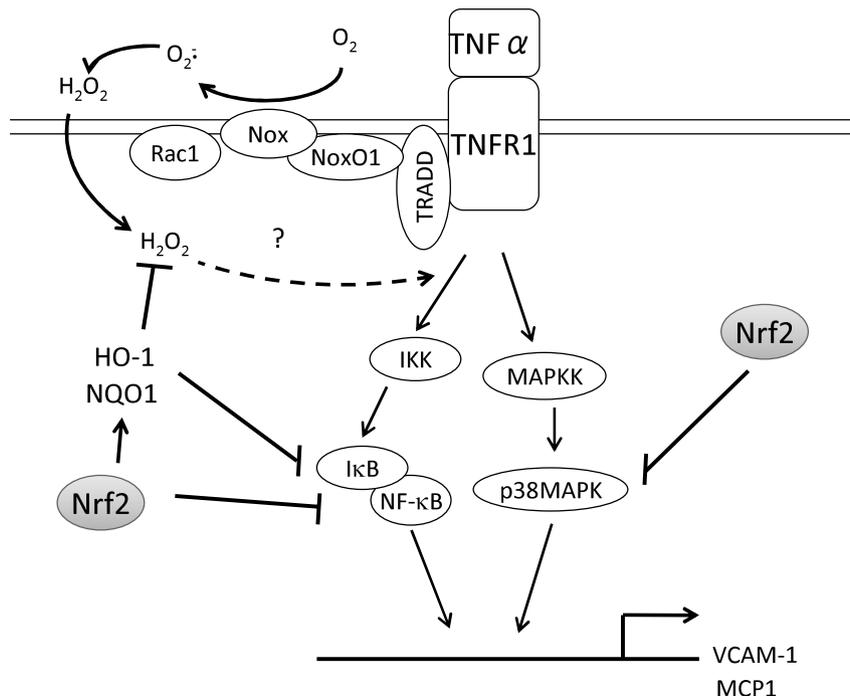


図 6 動脈内皮細胞における TNF $\alpha$  による VCAM-1 の発現誘導機構と Nrf2 経路による阻害機構

Nrf2 の活性化によって内皮細胞における TNF $\alpha$  に応答した VCAM-1 の発現誘導が阻害される。Nrf2 は HO-1 や NQO1 などの抗酸化タンパク質の誘導を介して TNF $\alpha$  シグナル伝達系を阻害する。Nrf2 は I $\kappa$ B のリン酸化の阻害、NF- $\kappa$ B の核移行を行ったり、TNF $\alpha$  依存的に Nox によって産生された ROS を消去することによって TNF $\alpha$  シグナルを抑制すると考えられる。

の生存”に役割を果たして病態形成に関与する。こういった場合には Nrf2 の阻害剤が治療薬として有望である。

### 文 献

- 1) Motohashi, H. & Yamamoto, M. (2004) *Trends Mol. Med.*, **10**, 549–557.
- 2) Itoh, K., Chiba, T., Takahashi, S., Ishii, T., Igarashi, K., Katoh, Y., Oyake, T., Hayashi, N., Satoh, K., Hatayama, I., Yamamoto, M., & Nabeshima, Y. (1997) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **236**, 313–322.
- 3) Talalay, P. (2000) *Biofactors*, **12**, 5–11.
- 4) Egger, A.L., Gay, K.A., & Mesecar, A.D. (2008) *Mol. Nutr. Food Res.*, **52**, S84–94.
- 5) Itoh, K., Wakabayashi, N., Katoh, Y., Ishii, T., Igarashi, K., Engel, J.D., & Yamamoto, M. (1999) *Genes Dev.*, **13**, 76–86.
- 6) Hayes, J.D. & McMahon, M. (2009) *Trends Biochem. Sci.*, **34**, 176–188.
- 7) Watai, Y., Kobayashi, A., Nagase, H., Mizukami, M., McEvoy, J., Singer, J.D., Itoh, K., & Yamamoto, M. (2007) *Genes Cells*, **12**, 1163–1178.
- 8) Kobayashi, A., Kang, M.I., Okawa, H., Ohtsuji, M., Zenke, Y., Chiba, T., Igarashi, K., & Yamamoto, M. (2004) *Mol. Cell Biol.*, **24**, 7130–7139.
- 9) Tong, K.I., Kobayashi, A., Katsuoka, F., & Yamamoto, M. (2006) *Biol. Chem.*, **387**, 1311–1320.
- 10) Sun, Z., Zhang, S., Chan, J.Y., & Zhang, D.D. (2007) *Mol. Cell Biol.*, **27**, 6334–6349.
- 11) Velichkova, M. & Hasson, T. (2005) *Mol. Cell Biol.*, **25**, 4501–4513.
- 12) Dinkova-Kostova, A.T., Holtzclaw, W.D., Cole, R.N., Itoh, K., Wakabayashi, N., Katoh, Y., Yamamoto, M., & Talalay, P. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, **99**, 11908–11913.
- 13) Kobayashi, A., Kang, M.I., Watai, Y., Tong, K.I., Shibata, T., Uchida, K., & Yamamoto, M. (2006) *Mol. Cell Biol.*, **26**, 221–229.
- 14) Tong, K.I., Padmanabhan, B., Kobayashi, A., Shang, C., Hirotsu, Y., Yokoyama, S., & Yamamoto, M. (2007) *Mol. Cell Biol.*, **27**, 7511–7521.
- 15) Zhang, D.D., Lo, S.C., Sun, Z., Habib, G.M., Lieberman, M. W., & Hannink, M. (2005) *J. Biol. Chem.*, **280**, 30091–30099.
- 16) Zhang, D.D., Lo, S.C., Cross, J.V., Templeton, D.J., & Hannink, M. (2004) *Mol. Cell Biol.*, **24**, 10941–10953.
- 17) 伊東 健 (2006), 生化学, **78**, 79–92.
- 18) Zhang, D.D. & Hannink, M. (2003) *Mol. Cell Biol.*, **23**, 8137–8151.
- 19) Yamamoto, T., Suzuki, T., Kobayashi, A., Wakabayashi, J., Maher, J., Motohashi, H., & Yamamoto, M. (2008) *Mol. Cell Biol.*, **28** 2758–2770.
- 20) Itoh, K., Mochizuki, M., Ishii, Y., Ishii, T., Shibata, T., Kawamoto, Y., Kelly, V., Sekizawa, K., Uchida, K., & Yamamoto, M. (2004) *Mol. Cell Biol.*, **24**, 36–45.
- 21) Sawa, T., Zaki, M.H., Okamoto, T., Akuta, T., Tokutomi, Y., Kim-Mitsuyama, S., Ihara, H., Kobayashi, A., Yamamoto, M., Fujii, S., Arimoto, H., & Akaike, T. (2007) *Nat. Chem. Biol.*, **3**, 727–735.
- 22) Bloom, D.A. & Jaiswal, A.K. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 44675–44682.
- 23) Martin, D., Rojo, A.I., Salinas, M., Diaz, R., Gallardo, G., Alam, J., De Galarreta, C.M., & Cuadrado, A. (2006) *J. Biol. Chem.*, **281**, 14841–14851.
- 24) Papaiahgari, S., Zhang, Q., Kleeberger, S.R., Cho, H.Y., & Reddy, S.P. (2006) *Antioxid. Redox Signal.*, **8**, 43–52.
- 25) Warabi, E., Takabe, W., Minami, T., Inoue, K., Itoh, K., Yamamoto, M., Ishii, T., Kodama, T., & Noguchi, N. (2007) *Free Radic. Biol. Med.*, **42**, 260–269.
- 26) Cullinan, S.B. & Diehl, J.A. (2006) *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **38**, 317–332.
- 27) Thimmulappa, R.K., Lee, H., Rangasamy, T., Reddy, S.P., Yamamoto, M., Kensler, T.W., & Biswal, S. (2006) *J. Clin. Invest.*, **116**, 984–995.
- 28) Lin, W., Wu, R.T., Wu, T., Khor, T.O., Wang, H., & Kong, A. N. (2008) *Biochem. Pharmacol.*, **76**, 967–973.
- 29) Dinkova-Kostova, A.T., Liby, K.T., Stephenson, K.K., Holtzclaw, W.D., Gao, X., Suh, N., Williams, C., Risingsong, R., Honda, T., Gribble, G.W., Sporn, M.B., & Talalay, P. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 4584–4589.
- 30) Liu, H., Dinkova-Kostova, A.T., & Talalay, P. (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 15926–15931.
- 31) Rangasamy, T., Guo, J., Mitzner, W.A., Roman, J., Singh, A., Fryer, A.D., Yamamoto, M., Kensler, T.W., Tuder, R.M., Georas, S.N., & Biswal, S. (2005) *J. Exp. Med.*, **202**, 47–59.
- 32) Kim, H.J., Barajas, B., Wang, M., & Nel, A.E. (2008) *J. Allergy Clin. Immunol.*, **121**, 1255–1261.
- 33) Williams, M.A., Rangasamy, T., Bauer, S.M., Killeddar, S., Karp, M., Kensler, T.W., Yamamoto, M., Breyse, P., Biswal, S., & Georas, S.N. (2008) *J. Immunol.*, **181**, 4545–4559.
- 34) Mochizuki, M., Ishii, Y., Itoh, K., Iizuka, T., Morishima, Y., Kimura, T., Kiwamoto, T., Matsuno, Y., Hegab, A.E., Nomura, A., Sakamoto, T., Uchida, K., Yamamoto, M., & Sekizawa, K. (2005) *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **171**, 1260–1266.
- 35) Gilroy, D.W., Colville-Nash, P.R., Willis, D., Chivers, J., Paul-Clark, M.J., & Willoughby, D.A. (1999) *Nat. Med.*, **5**, 698–701.
- 36) Ishii, Y., Itoh, K., Morishima, Y., Kimura, T., Kiwamoto, T., Iizuka, T., Hegab, A.E., Hosoya, T., Nomura, A., Sakamoto, T., Yamamoto, M., & Sekizawa, K. (2005) *J. Immunol.*, **175**, 6968–6975.
- 37) Iizuka, T., Ishii, Y., Itoh, K., Kiwamoto, T., Kimura, T., Matsuno, Y., Morishima, Y., Hegab, A.E., Homma, S., Nomura, A., Sakamoto, T., Shimura, M., Yoshida, A., Yamamoto, M., & Sekizawa, K. (2005) *Genes Cells*, **10**, 1113–1125.
- 38) Chen, X.L., Varner, S.E., Rao, A.S., Grey, J.Y., Thomas, S., Cook, C.K., Wasserman, M.A., Medford, R.M., Jaiswal, A.K., & Kunsch, C. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 703–711.
- 39) Warabi, E., Wada, Y., Kajiwara, H., Kobayashi, M., Koshiba, N., Hisada, T., Shibata, M., Ando, J., Tsuchiya, M., Kodama, T., & Noguchi, N. (2004) *Free Radic. Biol. Med.*, **37**, 682–694.
- 40) Hosoya, T., Maruyama, A., Kang, M.I., Kawatani, Y., Shibata, T., Uchida, K., Warabi, E., Noguchi, N., Itoh, K., & Yamamoto, M. (2005) *J. Biol. Chem.*, **280**, 27244–27250.
- 41) Dai, G., Vaughn, S., Zhang, Y., Wang, E.T., Garcia-Cardena, G., & Gimbrone, M.A. Jr. (2007) *Circ. Res.*, **101**, 723–733.
- 42) Fledderus, J.O., Boon, R.A., Volger, O.L., Hurttila, H., Ylä-Herttuala, S., Pannekoek, H., Levenon, A.L., & Horrevoets, A. J. (2008) *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **28**, 1339–1346.
- 43) Chen, X.L., Zhang, Q., Zhao, R., Ding, X., Tummala, P.E., & Medford, R.M. (2003) *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **305**, 573–580.
- 44) Tummala, P.E., Chen, X.L., & Medford, R.M. (2000) *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **32**, 1499–1508.

- 45) Chen, X.L., Dodd, G., Thomas, S., Zhang, X., Wasserman, M. A., Rovin, B.H., & Kunsch, C. (2006) *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **290**, H1862-1867.
  - 46) Liao, B.C., Hsieh, C.W., Liu, Y.C., Tzeng, T.T., Sun, Y.W., & Wung, B.S. (2008) *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **229**, 161-171.
  - 47) Pae, H.O., Oh, G.S., Lee, B.S., Rim, J.S., Kim, Y.M., & Chung, H.T. (2006) *Atherosclerosis*, **187**, 274-284.
  - 48) Ishii, T., Itoh, K., Ruiz, E., Leake, D.S., Unoki, H., Yamamoto, M., & Mann, G.E. (2004) *Circ. Res.*, **94**, 609-616.
  - 49) Maruyama, A., Tsukamoto, S., Nishikawa, K., Yoshida, A., Harada, N., Motojima, K., Ishii, T., Nakane, A., Yamamoto, M., & Itoh, K. (2008) *Arch. Biochem. Biophys.*, **477**, 139-145.
  - 50) Sussan, T.E., Jun, J., Thimmulappa, R., Bedja, D., Antero, M., Gabrielson, K.L., Polotsky, V.Y., & Biswal, S. (2008) *PLoS ONE*, **3**, e3791.
  - 51) Padmanabhan, B., Tong, K.I., Ohta, T., Nakamura, Y., Scharlock, M., Ohtsuji, M., Kang, M.I., Kobayashi, A., Yokoyama, S., & Yamamoto, M. (2006) *Mol. Cell*, **21**, 689-700.
  - 52) Ohta, T., Iijima, K., Miyamoto, M., Nakahara, I., Tanaka, H., Ohtsuji, M., Suzuki, T., Kobayashi, A., Yokota, J., Sakiyama, T., Shibata, T., Yamamoto, M., & Hirohashi, S. (2008) *Cancer Res.*, **68**, 1303-1309.
  - 53) Shibata, T., Ohta, T., Tong, K.I., Kokubu, A., Odogawa, R., Tsuta, K., Asamura, H., Yamamoto, M., & Hirohashi, S. (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 13568-13573.
-