

Genetic and pharmacological induction of Nrf2 relieves inflammation and organ damages of sickle cell disease model mice

著者	KELEKU LUKWETE NADINE
号	85
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	医博第3547号
URL	http://hdl.handle.net/10097/00097184

(書式12)

氏名	ケレク ルクウェテ ナディー-ン Keleku-Lukwete Nadine
学位の種類	博士(医学)
学位授与年月日	平成28年3月25日
学位授与の条件	学位規則第4条第1項
研究科専攻	東北大学大学院医学系研究科(博士課程) 医科学専攻
学位論文題目	Genetic and pharmacological induction of Nrf2 relieves inflammation and organ damages of sickle cell disease model mice. (Nrf2の遺伝的および薬剤による誘導は鎌状赤血球症モデルマウスの炎症と組織障害を軽減する)
論文審査委員	主査 教授 今泉 益栄 教授 清水 律子 教授 田中 耕三

論文内容要旨

Sickle cell disease (SCD) is a heritable disorder due to a missense point mutation in hemoglobin β chain, leading to the production of abnormal-shaped red blood cells (RBCs). RBCs bearing the mutated globin are vulnerable to intravascular hemolysis, resulting in inflammation and vaso-occlusion, which factors contribute to organs damages and impaired organs function. The transcription factor Nuclear factor-erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) mediates adaptation to oxidative stress and cell defense. Under homeostatic conditions, Nrf2 is sequestered by Keap1 (Kelch-like ECH-associated protein 1) in the cytosol and degraded through the proteasomal pathway. Upon exposure to stress stimuli, such as ROS or electrophiles, Nrf2 is stabilized and translocate into the nucleus where it activates transcription of cytoprotective and antioxidants genes.

I here elucidate the benefit of genetic induction of Nrf2 through the ablation of its cytosolic repressor Keap1, using a SCD knock-in mouse model bearing human mutated globin loci, crossed with mutated Keap1 I generate a compound mutant ($h\beta^{S/S}::Keap1^{-/-}$) mice, in which Nrf2 was constitutively activated. Histological analysis of the liver and lungs revealed that congestion and necrosis regions observed in SCD ($h\beta^{S/S}::Keap1^{+/+}$) mice, were significantly lessened in $h\beta^{S/S}::Keap1^{-/-}$. Moreover, liver damage marker alanine transferase (ALT) plasma level was decreased in $h\beta^{S/S}::Keap1^{-/-}$ when compared to $h\beta^{S/S}::Keap1^{+/+}$ mice. I further examined inflammatory status using human IL6 reporter mice system and found that luciferase activity reflecting expression of human *IL6* gene, was markedly seen in SCD mice than control mice, while Nrf2 activation in SCD significantly lowered that activity. More interestingly, mRNA expression levels of IL-6, IL-1 β and IL-18 measured by PCR in

(書式 1 2)

lung homogenates of all mice, revealed that these pro-inflammatory cytokines were highly expressed in $h\beta^{S/S}::Keap1^{+/+}$ mice than in $h\beta^{A/S}::Keap1^{+/+}$ control mice, and markedly repressed with Nrf2 activation. In addition measured adhesion molecules expression in aorta by PCR shows their important repression in $h\beta^{S/S}::Keap1^{F/-}$ mice. Although Nrf2 activation did not substantially modify stress erythropoiesis as well as hemolysis in $h\beta^{S/S}::Keap1^{F/-}$ mice, plasma heme and heme metabolites level were significantly decreased when compared to common $h\beta^{S/S}::Keap1^{+/+}$ mice. These results demonstrate that Nrf2 activation in SCD does not only repress pro-inflammatory cytokines and adhesion molecules, but also preserves organs from heme and oxidative stress mediated injuries, independently from improvement of hemolysis.

To determine whether pharmacological compounds that induces Nrf2 could procure same effects as genetic activation of Nrf2, CDDO-Im (2-cyano-3, 12 dioxooleana-1, 9 diene-28-imidazolide) was given to $h\beta^{S/S}$ mice for three weeks. After treatment, I observe gradually decreasing numbers of WBC (white blood cells) in $h\beta^{S/S}$ CDDO-Im treated mice compared $h\beta^{S/S}$ vehicle treated mice. Also PCR analysis of mRNA expression of pro-inflammatory cytokines revealed significant decrease of IL-6 and IL-1 β in the lungs of CDDO-Im-treated $h\beta^{S/S}$ mice. Furthermore $h\beta^{S/S}$ CDDO-Im treated mice liver section showed impressive amelioration of necrotic lesions. These results indicate that administration of a chemical Nrf2 inducer relieves inflammation and organ damage in the $h\beta^{S/S}$ mice. Collectively, these data provide the evidence that Nrf2 activation improves ROS-mediated organ damages and inflammation. Since endogenous Nrf2 protein is likely to be insufficient to overcome the abiding oxidative stress in SCD, I believe that further boost up of Nrf2 with pharmacological molecules will be beneficial for synergic therapy in medical care of sickle patients.

審査結果の要旨

博士論文題目 Genetic and pharmacological induction of Nrf2 relieves inflammation and organ damages of sickle cell disease model mice (Nrf2 の遺伝的および薬剤による誘導は鎌状赤血球症モデルマウスの炎症と組織障害を軽減する)

所属専攻・分野名 医科学専攻 ・ 小児血液腫瘍学 分野

学籍番号 B2MD5145 氏名 KELEKU-LUKWETE NADINE

鎌状赤血球症は世界で最も患者数が多い遺伝性疾患の一つで、赤道付近アフリカに多く全世界では数千万人が罹患する根本的治療のない難病である。Keleku-Lukwete Nadine さんの研究は、この鎌状赤血球症の新しい治療法の開発につながる橋渡しの研究として大きな成果を挙げた。

鎌状赤血球症はヘモグロビンβ鎖の変異により、赤血球が鎌状に変形する遺伝性疾患である。鎌状赤血球は血管内容血により炎症や血管閉塞を惹起し、多臓器障害を引き起こす。一方、Nrf2 は細胞の解毒や酸化ストレス応答を制御する転写因子である。非ストレス刺激下では Nrf2 は細胞質で Keap1 に捕捉され分解されているが、ストレス暴露で Nrf2 は安定化し、核に移行し解毒、抗酸化応答遺伝子の転写を活性化する。

本研究で、Keap1 欠損により遺伝的に Nrf2 を活性化させたマウスを用いて、Nrf2 活性化による鎌状赤血球症の症状改善効果を検討した。鎌状赤血球症 (SCD) モデルマウスと Keap1 ノックダウン・マウスとを交配し、複合変異 (SCD::Keap1^{F/-}) マウスを得た。このマウスでは Nrf2 が恒常的に活性化し、肝臓と肺において SCD マウスでみられたうっ血や壊死は軽減し、肝障害の程度も SCD マウスと比較して減少し、肺の炎症も改善していた。さらに、肺での炎症サイトカイン IL6 や IL1β の発現も複合変異マウスでは減少していた。これらの結果は、Nrf2 の活性化が SCD マウスの組織障害と炎症を改善することを示している。

鎌状赤血球から放出されるヘムが ROS 産生を介して炎症や組織障害を引き起こしている病態において、Nrf2 の活性化によって鎌状赤血球の溶血自体は改善していない。この事実から、Nrf2 は血漿中のヘムとその代謝産物を除去することで組織障害や炎症を改善することが示唆された。そこで、SCD マウスに Nrf2 誘導剤である CDDO-Im を投与したところ、末梢血中の白血球数が減少し、炎症性サイトカイン IL6 や IL1β の発現も減少した。この結果から、薬剤による Nrf2 の誘導によって SCD マウスの炎症と組織障害が改善することが示され、Nrf2 の誘導剤が鎌状赤血球症の治療に効果があることが示唆された。

よって、本論文は博士（医学）の学位論文として合格と認める。