

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5 月 15 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21592307

研究課題名（和文） 急性肝不全に対する新しい治療ターゲット：B a c h 1

研究課題名（英文） Bach1 mRNA expression is a novel marker of heme-mediated oxidative liver injury.

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

研究成果の概要（和文）：転写調節因子Bach1はヘムを感知し、ヘム分解の律速酵素であるheme oxygenase-1 (HO-1)の発現を制御している。四塩化炭素CCl<sub>4</sub>投与によるヘム依存性酸化ストレス肝傷害ラットモデルの肝にBach1の強誘導が見られ、Bach1がヘム依存性酸化ストレスの指標となりうる可能性が考えられた。また、肝不全発症後早期に誘導されるBach1は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）：Bach1 is a heme-responsive transcription factor that represses *ho-1* gene expression. In the present study, a transient and dramatic induction of Bach1 was caused by heme-mediated oxidative stress in carbon tetrachloride (CCl<sub>4</sub>)-induced acute liver failure in rats. These findings suggest that Bach1 mRNA is increased by heme-mediated oxidative stress and that it may be a marker of heme-mediated oxidative stress.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・救急医学

キーワード：集中治療学、急性肝不全、酸化ストレス、ヘム、Bach1、ヘムオキシゲナーゼ、チトクローム p450、四塩化炭素

## 1. 研究開始当初の背景

急性肝不全は未だ致命的な疾患の一つであるが全身管理技術の向上に加え、肝移植の導

入により救命率が劇的に上昇してきた。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。

一般に急性臓器不全の細胞障害には、酸化ストレスが大きな役割を果たしている。酸化ストレスが加わると細胞中のヘム蛋白からヘムが遊離する。ヘムは、チトクロームP450など細胞の生存に必須のヘム蛋白の構成要素として重要な役割を果たしているが、ヘム蛋白から遊離したヘムは鉄-プロトポルフィリン体という脂溶性の鉄として活性酸素を生成し、細胞障害をさらに増悪させると考えられる。申請者らはこれまでラットの虚血性急性腎不全、ハロタン肝炎、敗血症、四塩化炭素による劇症肝炎モデル等における臓器障害にはヘム由来酸化ストレスが重要な役割をはたしていること明らかにし、キーポイントであるヘム由来酸化ストレスを、遊離ヘムの指標とされるmicrosomal heme contentを測定することで間接的にとらえてきた(Nakahira K, 2003)。しかし、臓器障害にクリティカルな役割を果たすヘム由来酸化ストレスを迅速かつ正確に測定する方法は未だない。近年、Bach1は、ヘム分解の律速酵素であるHO-1の発現を制御する転写調節因子であることが報告された(Igarashi K, 2004)。通常はHO-1遺伝子のエンハンサー配列MAREにBach1が結合してHO-1遺伝子の発現を抑制している。酸化ストレス下でヘム濃度が上昇するとBach1はヘムと結合しMAREより離れ核外へ移動する。代わりにNrf2がMAREに結合して、HO-1遺伝子が活性化されると考えられている。

## 2. 研究の目的

そこで本研究では、肝不全においてBach1がヘム由来酸化ストレスのマーカーとして使えるかを検討するため、*in vivo*、さらにはヒト急性肝不全症例でのBach1の発現動態を明らかにする目的で立案した。

## 3. 研究の方法

(1) *in vivo*における酸化ストレスとBach1の誘導について検討。

**Heme Arginate (HA) ラットモデル**:ヘムの合成異常により発症するポルフィリン症の治療薬として用いられている(米国等)HAを静注することで(Tenhunen R, 1987)、ヘムは関与するが酸化ストレスは起こさずHO-1が誘導されるモデル。

**四塩化炭素  $CCl_4$  ラットモデル**: $CCl_4$ 由来フリーラジカルにより肝細胞のP450が崩壊し遊離ヘムの増加からさらなる細胞障害を助長するヘム由来酸化ストレスによりHO-1が誘導されるモデル(Nakahira K, 2003)。

**cis-Stilbene oxide (CSO) ラットモデル**:グルタチオン(フリーラジカルスカベンジャーの一つ)枯渇剤であるCSOを投与し、ヘムが関与しない酸化ストレスによるHO-1誘導モデル(Oguro T, 1997)。以上モデルの三つのモデルを用い、

- ① 肝臓でのHO-1発現量を、薬物( $CCl_4$ , CSO, HA)の投与量と経時的変化から検討する。HO-1 mRNA発現量が同程度の時間、投与量でBach1 mRNA、ヘムによって発現が抑制されるヘム合成の律速酵素:非特異型デルタアノレブリン酸合成酵素(ALAS-N) mRNAの誘導をNorthern blot法により調べることで、各モデルがヘム依存性にHO-1が発現されるモデルかどうか、HO-1とBach1の発現に相関関係があるかどうか明らかにする。
- ② 各モデルの酸化ストレスの程度を還元型グルタチオン(GSH値)と脂質加算化の指標であるマロンジアルデヒド:MDA活性により評価する。
- ③ 各モデルの肝障害の程度を血清ALT値により検討し、Bach1の発現量と肝傷害の関

係を明らかにする。

次に、動物実験での結果を踏まえ、

(2) 臨床レベルでBach1がヘムの関与する酸化ストレスが関与すると考えられるヒト急性肝不全症例(Fujii H. 2004)にて検討する。症例は対照群(転移性肝がん切除組織の正常肝部分)と肝不全群(劇症肝障害症例)の肝サンプルとする。両群のBach1 mRNAの発現を、Northern blot法にて定量。以前報告したHO-1、ALAS1 mRNAの発現(Fujii H. 2004)とあわせてBach1発現の臨床的意義を検討する。

#### 4. 研究成果

##### (1) *in vivo*における酸化ストレスとBach1の誘導について検討

雄性Sprague-Dawleyラットに HA、CCl<sub>4</sub>、CSOを投与し、経時的に血液と肝臓を採取した。

① HA 15mg/kg 静注、CCl<sub>4</sub> 1.0 ml/kg 腹腔内投与、CSO 2μmol/kg 腹腔内投与したラットモデルにおけるHO-1、ALAS1、Bach1 mRNAの誘導：各ラットモデルの肝のHO-1、ALAS1、Bach1 mRNAをNorthern blot法により検出した。各薬剤投与後、いずれも6時間をピークとしてHO-1 mRNAの同レベルの強い誘導が確認された(図1)。

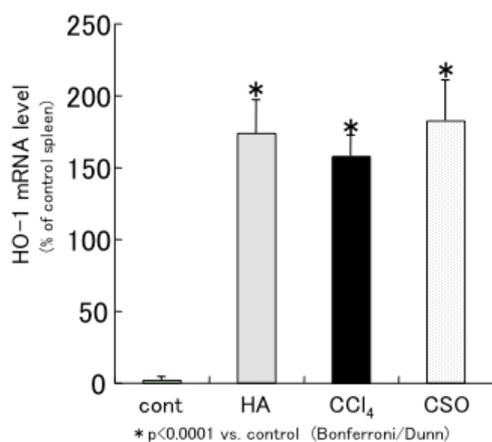


図1 HA, CCl<sub>4</sub>, CSOラットモデルにおける投与後6時間の肝HO-1 mRNAの誘導

さらにALAS1 mRNAはCCl<sub>4</sub>、HAモデルでコントロールに比べて有意な低下が見られ、

CCl<sub>4</sub>、HAモデルでは肝臓内のヘム濃度が上昇したためヘム合成系の律速酵素であるALAS1が抑制され、分解系の律速酵素であるHO-1が強誘導されたと考えられる。CSO投与群ではALAS1はむしろ上昇したことから、CSOモデルは細胞内ヘム濃度の上昇を伴わないHO-1誘導モデルであると考えられた。

一方は、ヘムを感知してHO-1の誘導を制御しているBach1 mRNAはCCl<sub>4</sub>モデルでのみ投与後6時間をピークとして強い誘導が認められた。HO-1は強誘導されているにも関わらずHA、CSOモデルでは Bach1 mRNAの有意な上昇は見られなかった(図2)。

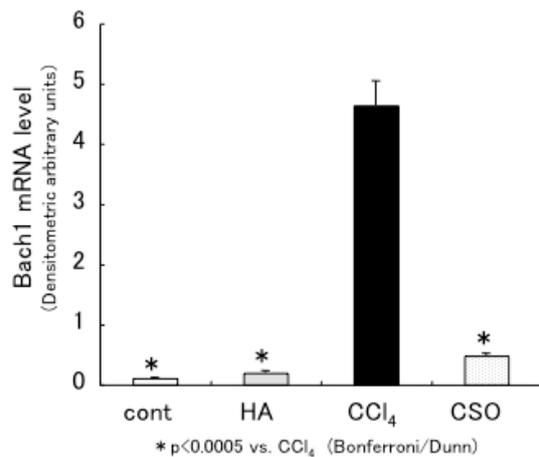


図2 HA, CCl<sub>4</sub>, CSOラットモデルにおける投与後6時間の肝のBach1 mRNAの誘導

② HA, CCl<sub>4</sub>, CSO ラットモデルにおける酸化ストレスの評価：各ラットモデルの肝臓における酸化ストレスの程度を還元型グルタチオン GSH 値で、脂質過酸化の指標として MDA を測定した。GSH 値はコントロール群に比べ CCl<sub>4</sub>, CSO ラットモデルで有意に低下し、MDA は CCl<sub>4</sub>, CSO モデルで有意に上昇した。以上の結果より CCl<sub>4</sub>, CSO ラットモデルでは肝に脂質過酸化による肝傷害をうけていると考えられた。また、各モデルの血清 ALT 値は CCl<sub>4</sub> モデ

ルでのみコントロール群と比較し有意に上昇した。以上より HA モデル(15mg/kg 静注)は酸化ストレスを引き起こさず肝傷害もみられないモデル、CSO モデル(2 $\mu$ mol/kg、腹腔内投与)は肝傷害を引き起こさない程度の酸化ストレスを受けたモデル、CCl<sub>4</sub> モデルは酸化ストレスにより強い肝傷害の見られる HO-1 誘導モデルであることが確認された。

- ③ CCl<sub>4</sub> ラットモデルの肝障害の程度と Bach1 の発現量との関係: CCl<sub>4</sub> を 0.1-2.0 ml/kg 腹腔内投与し、肝における Bach1 mRNA 発現量と肝傷害の指標血清 ALT 値の関係を調べた。

CCl<sub>4</sub> 投与量の増加とともに Bach1 mRNA レベルと血清 ALT は共に上昇した。両者には強い相関が認められ、肝傷害が強いほど Bach1 がより誘導されることが示された(図3)。

また HO-1 と Bach1 mRNA も有意に相関することも確認した。

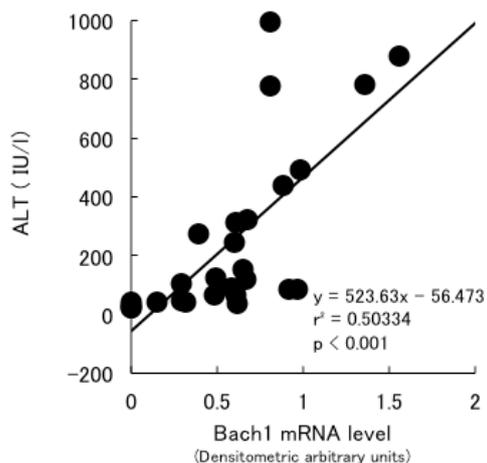


図3 CCl<sub>4</sub>ラットモデルにおける投与後6時間の肝のBach1 mRNAの誘導と血清ALT値との関係

- (2) ヒト急性肝不全症例における肝の Bach1 mRNA の誘導

ヒト急性肝不全症例肝において対照群(転移性肝がん切除組織の正常肝部分)と比較して HO-1 mRNA の有意な上昇と、ALAS1 mRNA の有

意な低下を報告している(Fujii H, 2004)。同症例で Bach1 mRNA の発現を検討したところヒト急性肝不全症例において HO-1 同様 Bach mRNA の強誘導を確認した(図4)。

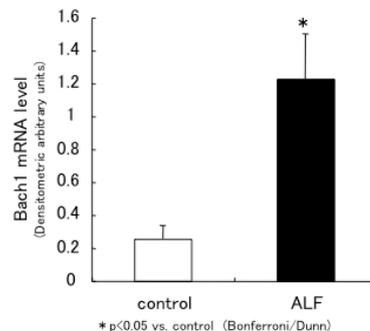


図4 ヒト急性肝不全(ALF)症例における肝のBach1 mRNAの誘導

本研究で、ヘムを感知して HO-1 の誘導を制御している Bach1 は酸化ストレスにより引き起こされた肝傷害ラットモデルでのみ誘導されることが確認された(表1)。

モデル	control	HA	CCl <sub>4</sub>	CSO	ヒト肝不全症例
Bach1	±	±	+++	±	+++
酸化ストレス	-	-	+++	++	++?
血清ALT値	→	→	↑↑↑	→	↑↑↑
HO-1	-	+++	+++	+++	+++
ALAS1	++	±	±	+++	±
free heme (推定)	±	±	++	±	++?

表1 Bach1 mRNA誘導とヘム依存性酸化ストレス肝傷害の関係

これらの研究結果より、虚血再灌流や炎症などの酸化ストレスにより遊離ヘムが増加すると Bach1 タンパクが消費されるため、減少した Bach1 を補充するためポジティブフィードバックがかかり Bach1 mRNA が増加したことが推測され、Bach1 はヘム依存性酸化ストレスのマーカーとして利用できると思われる。酸化ストレスには遊離ヘムが重要な役割を担っていると考えられるが、遊離ヘムを直接的に測定することは现阶段では非常に難しい。現在、遊離ヘムの測定は主に pyridine hemochromogen 法による heme content の上昇と、HO-1 mRNA の誘導、ALAS1 mRNA の抑制をとらえることにより、間接的に測定している。遊離ヘムのより直接的測定は様々な方法で試みられているがまだ開発途

上である。

本研究の特色は、肝傷害の重症度をヘム依存性酸化ストレスという新たな視点からとらえたことである。ヘム依存性酸化ストレス肝傷害モデルの一つと考えられる CCl<sub>4</sub> モデルで傷害後早期に Bach1 mRNA の誘導が確認されたこと、またヒト肝不全症例でも Bach1 の誘導が確認されたことは、Bach1 が、臨床現場でも肝不全のより早期的確な治療方針の決定に役立ち、更なる救命率の上昇につながると考える。

#### 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 4 件)

- ① Matsumi J, Morimatsu H, Matsusaki T, Kaku R, Shimizu H, Takahashi T, Yagi T, Matsumi M, Morita K. Heme breakdown and ischemia / reperfusion injury in grafted liver during living donor liver transplantation, Int J Mol Med. vol. 29 2012 135-140, 査読有
- ② Morimatsu H, Takahashi T, Matsusaki T, Hayashi M, Matsumi J, Shimizu H, Matsumi M, Morita K. An increase in exhaled CO concentration in systemic inflammation/sepsis. J Breath Res. 2010 Dec;4(4):047103. Epub 2010 Nov 30. 査読有
- ③ Kanagawa F, Takahashi T, Inoue K, Shimizu H, Omori E, Morimatsu H, Maeda S, Katayama H, Nakao A, Morita K. Protective effect of carbon monoxide inhalation on lung injury after hemorrhagic shock/resuscitation in rats. J Trauma. 2010 Jul;69(1):185-94.

査読有

- ④ Arimori Y, Takahashi T, Nishie H, Inoue K, Shimizu H, Omori E, Kawanishi S, Toda Y, Morimatsu H, Morita K. Role of heme oxygenase-1 in protection of the kidney after hemorrhagic shock. Int J Mol Med. 2010 Jul;26(1):27-32, 査読有

[学会発表] (計 4 件)

- ① Shimizu H, Takahashi T, Omori E., Morimatsu H., Morita K., Induction of Bach1 messenger RNA in a rat model of acute liver injury, American Society of Anesthesiologists Annual Meeting, Oct 18, 2011, Chicago, ILLINOIS, USA. 査読有
- ② 川西 進, 高橋 徹, 清水裕子, 小坂順子, 森松博史, 松三昌樹, 森田 潔, 低濃度一酸化炭素吸入は自然免疫系の活性を抑制してラット出血性ショック後の急性肺障害を軽減する、第 16 回日本エンドトキシン・自然免疫研究会、2010 年 11 月 13 日、かしはら万葉ホール、奈良県橿原市. 査読有
- ③ Shimizu H, Takahashi T, Omori E, Akagi R, Morita K., Induction of Bach1 messenger RNA by heme-mediated oxidative stress, HEME OXYGENASES IN BIOLOGY AND MEDICINE 6<sup>th</sup> INTERNATIONAL CONGRESS ON HEME OXYGENASES, October 2, 2009, Miami, Florida, USA. 査読有
- ④ 清水裕子, 高橋 徹, 大森恵美子, 森松博史, 赤木玲子, 森田 潔, Bach1 は酸化ストレスの指標になりうるか?、第 6 回 Heme Oxygenase 研究フォーラム、2009 年 8 月 28 日、京都府立医科大学青蓮会館、京都. 査読有

〔図書〕（計 3 件）

- ① Morimatsu H, Takahashi T, Shimizu H,  
Matsumi J, Kosaka J, Morita K, INTECH,  
Oxidative Stress, Chapter 6 Heme  
proteins, Heme Oxygenase-1 and  
Oxidative Stress, 2012
- ② 川西 進、高橋 徹、清水裕子、小坂順  
子、森松博史、松三昌樹、森田 潔、低  
濃度一酸化炭素吸入は自然免疫系の活性  
を抑制してラット出血性ショック後の急  
性肺障害を軽減する、医学図書出版、エ  
ンドトキシン研究14、2011、70-74
- ③ 高橋 徹、井上一由、清水裕子、榎田佳  
奈、有森 豊、川西 進、松三昌樹、片  
山 浩、森松博史、森田 潔、グルタミ  
ンはHO-1誘導を介して自然免疫系の活性  
化を抑制し出血性ショック後の腸管障害  
を軽減する、医学図書出版、エンドトキ  
シン研究13、2010、65-68

## 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・大学院医歯薬学総合研究科・教  
授

研究者番号：40108171

高橋 徹 (TAKAHASHI TORU)

岡山大学・岡山大学病院・准教授

研究者番号：40252952

(H21 のみ、H22～H23 は連携研究者)

### (3) 連携研究者

### (4) 研究協力者

大森 恵美子 (OHMORI EMIKO)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・技  
術補佐員