

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 17 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460959

研究課題名(和文) H0-1/CO系を基軸とした抗炎症性マクロファージ誘導と腸管炎症制御機構の解明

研究課題名(英文) The role of Heme oxygenase-1 and carbon monoxide in the intestinal inflammation

研究代表者

高木 智久 (Tomohisa, Takagi)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：70405257

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)：抗酸化酵素H0-1(heme oxygenase-1)、ならびに、H0-1の生成物であるCO(carbon monoxide：一酸化炭素)による腸管炎症病態における役割の検討を行った。その結果、腸管粘膜内のH0-1高発現マクロファージは抗炎症性M2マーカーを発現すること、COがTh1/Th17リンパ球分化を制御することを明らかにした。このことから、H0-1、ならびに、COが協調して粘膜免疫機構の制御を行っていることが推察された。

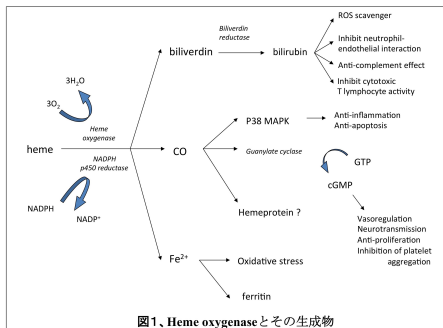
研究成果の概要(英文)：In this research, we investigated the role of heme oxygenase-1 (H0-1) and carbon monoxide (CO), which is a by-product of H0-1, in intestinal inflammation. In results, we confirmed that H0-1 highly expressing macrophages expressed M2 marker, and CO regulated Th1/Th17 differentiation of lymphocytes. Thus, H0-1 and CO might regulate intestinal immune system.

研究分野：消化器病学

キーワード：Heme oxygenase 一酸化炭素 マクロファージ リンパ球

1. 研究開始当初の背景

- (1) 本邦でも増加傾向にある潰瘍性大腸炎やクローン病などの難治性・再発性炎症性腸疾患では、近年、免疫調整剤や生物学的製剤などの新たな治療手段が導入され、患者 QOL の改善に一定の成果がみられている (Mowat C. Gut 2011, Sandoborn WJ. Dig Dis. 2010)。しかしながら、これらの疾患は未だに病因が不明であり、これらの治療によっても十分な病態改善が得られない症例が少なくない。従って、その病因・病態を解明し、有効な治療手段を確保することは重要な医学的・国民的課題であり、基礎研究を通じて既存の治療法にとらわれない革新的な新規治療法の開発が必要である。
- (2) 抗酸化酵素 Heme oxygenase-1 (HO-1) は、ヘムを分解し一酸化炭素 (Carbon monoxide: CO)、ビリベルジン、還元鉄を生成するストレス応答蛋白質であり、その細胞保護効果・抗炎症効果が注目されている。一方、HO-1 から誘導される CO についても様々な生理機能が明らかにされつつあり、内因性 CO がガス状メディエーターとして様々なシグナル伝達機構に関わることが解明されつつある (図 1)。一方、外因性 CO による病



態改善効果についても、肺障害 (Otterbein LE. AJP. 1999)、心筋傷害 (Fujimoto H. ATVB. 2004)、小腸移植 (Nakao A. Surgery. 2003)、腎移植 (Nakao A. AJP. 2009) などの実験動物モデルにおいて CO 吸入による抗炎症・臓器保護効果が明らかにされ、その臨床応用が期待されている

- (3) HO-1/CO による抗炎症効果は各種病態において注目されており、腸管炎症病態においても、我々の検討も含めて HO-1/CO 系が抗炎症効果を発揮することが報告されている (Hegazi RA. J Exp Med. 2005, Sheikh SZ. J Immunol. 2011)。このことから、HO-1/CO 系を基軸とした治療手段の創出は、既存治療とは一線を画した新規性の高い治療法と考えられ、その応用が期待されている。

2. 研究の目的

研究代表者らは一貫して炎症性腸疾患の病態解明・新規治療法の創出を目指して、臨床・基礎研究への取り組みを継続している。なかでも、酸化ストレスと消化管炎症病態に関しては、1990 年代より精力的に論文報告等を行っており、HO-1 研究に関しても抗酸化酵素として着目して解析を進めてきた経緯がある。また、最近では、消化管炎症と活性酸素などによる翻訳後酸化修飾に着目した蛋白質の機能解析を進めており、我々が世界をリードする研究分野となっている。本研究課題は下記2点に集約して研究を行った。

- (1) HO-1/CO 系を基軸とした、腸管炎症病態での役割に係わる研究については、HO-1 が腸管粘膜内 Th1/Th2 サイトカンバランスを制御し (Naito Y. APT. 2004)、腸炎の発症とともに大腸粘膜内に HO-1 が発現誘導され大腸粘膜保護作用を示し (Takagi T. APT. 2006)、この大腸粘膜保護作用には HO-1 から誘導される CO が重要な役割を担っていること、CO 吸入 (平成 18-19 年度基盤研究 C、研究代表者)・腸管内投与 (平成 21-24 年度基盤研究 C、研究代表者) や CO 放出剤が腸管炎症を改善することを報告してきた。また、網羅的遺伝子発現解析によって CO が、腸管内線維芽細胞の miRNA-710 を抑制することにより FGF15 発現を亢進させ、大腸上皮の損傷治癒を促進することを見出しており、CO の標的分子の一つを同定するに至っている。この様に、HO-1/CO 系を基軸とした腸管炎症における病態解明・新規治療分子創出に関する研究は、国内外において我々のグループに優位性がある独創性の高い研究である。しかしながら、HO-1 発現細胞に関しては種々の報告があり明確ではない。これまでの予備検討において、HO-1 発現が腸管内マクロファージ (Macrophage: Mph) に局在することを確認しており、本研究課題では腸管内 Mph における HO-1 発現、ならびに、HO-1 高発現 Mph の機能性を検証する。
- (2) また、HO-1 が大腸粘膜内の Th1/Th2 サイトカンバランスのみならず、Th17 サイトカン産生を抑制することも予備検討により確認しており、この効果には HO-1 から生成される CO がメディエーターとして作用している可能性が示唆されている。本研究課題では、CO によるリンパ球制御機構についても検討を行った。

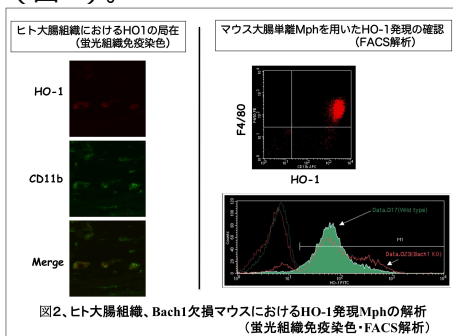
本検討課題の遂行により、腸管粘膜内におけるHO-1/COを基軸とした腸管粘膜免疫機構の一端を明らかにすることが出来るものと期待される。

3. 研究の方法

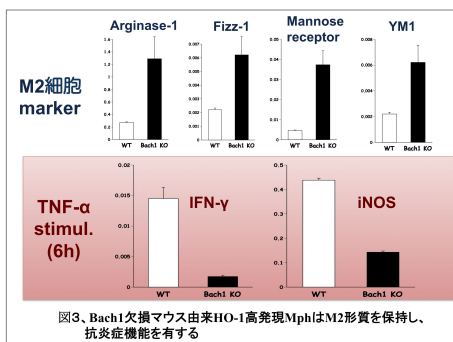
- (1) 正常・炎症腸管内に発現するHO-1 発現細胞を検証していく。予備検討にてHO-1がMphに発現する知見を得ており、MphマーカーであるCD11b、F4/80(マウス)を検証していく予定である。検体はヒト炎症性腸疾患患者(手術検体・小腸/大腸内視鏡下生検組織検体)、ならびに、下記のマウス実験腸炎モデルを用いる。Dextran Sulfate Sodium (DSS)腸炎モデル-潰瘍性大腸炎類似モデル
Trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS)腸炎モデル-クローン病類似モデル
また、HO-1発現を負に調節する転写因子Bach1の欠損マウス(東北大学五十嵐和彦教授より供与済み)を用いても検討を行い、腸炎の発症進展に伴うHO-1高発現Mphの挙動を検討していく。
- (2) 正常腸管粘膜内の常在型Mphは細菌貪食・殺菌能は保持しているものの、CD14等の抗原提示にかかわる共刺激分子の発現を欠くことにより抗原への低応答性を示し、腸内細菌との共生をもたらす免疫制御性を獲得しているが(Smythies LE. J Clin Invest. 2005)、炎症性腸疾患患者ではCD14陽性Mphが増加し(Kamada N. J Clin Invest. 2010)、この免疫制御機構が破綻し、炎症病態を呈することが報告されている。この最近の知見を背景にHO-1高発現Mphに関してCD14、TLR4、Fc受容体、抗炎症性M2マーカー(Arginase-1, Mannose receptor, Fizz-1, Ym-1)などの発現を検証していく。
- (3) HO-1高発現Mphを標的とした新規治療法の開拓を念頭に、HO-1高発現Mphが腸管炎症を抑制することを検証する。HO-1高発現Mphは、Bach1欠損マウスから抽出されたHO-1高発現腹腔Mphを用いて検討を行う。既報に従い(Hunter MM. Gastroenterology. 2010)、Mph細胞移入を行い、マウス大腸炎モデルを作成し、HO-1非発現Mph移入群を対照群として、腸炎抑制効果を検証する。
- (4) HO-1から生成されるCOの機能性についても粘膜免疫制御機構の観点から検討を行う。マウス脾細胞由来ナイーブCD4⁺T細胞のTh1/Th17分化系におけるCOの影響を検証していく。
また、naive CD4 T細胞移入腸炎モデル-代表的免疫学的大腸炎モデルを用いてCO投与に伴う、大腸粘膜内のTh1/Th17分化における影響も検証を行っていく。

4. 研究成果

- (1) マウス実験腸炎を用いた検討において腸炎の発症とともにHO-1発現が腸管Mphに局在することを確認した。また、ヒト炎症性腸疾患患者の組織検体を用いた検討においてもHO-1発現がMphに局在することを確認した。さらに、HO-1発現を負に制御する転写因子Bach1の欠損マウスではHO-1発現誘導を介して腸管炎症が改善するが、このマウスにおいても腸管MphにHO-1が発現誘導されていることを確認した(図2)。



- (2) Bach1欠損マウス由来のHO-1高発現MphがArginase-1やMannose receptorなどのM2(抗炎症・免疫制御性)形質を保持し、抗炎症性Mphとして作用していることを明らかにした。実際に、HO-1高発現MphではTNF- α 刺激によるIFN- γ /iNOS発現が抑制されることを確認した(図3)。



- (3) Bach1欠損マウスから抽出されたHO-1高発現腹腔Mphを移入した野生型マウスと、野生型C57BL/6マウスから抽出した腹腔Mphを移入した野生型マウスを用いてマウス大腸炎モデルを作成したところ、HO-1高発現腹腔Mphを移入した野生型マウスでは腸炎の発症が有意に抑制された。
- (4) CO遊離剤を用いた検討において、マウス脾より単離したnaive CD4 T細胞を用いてTh1/Th17分化における影響を検証したところ、COによりTh1/Th17分化が制御されることを明らかにした。
また、naive CD4 T細胞移入腸炎を用いた検討においても、CO投与により大

腸粘膜内の Th1/Th17 分化が抑制されることが明らかとなった。

以上の結果から、HO-1 高発現 Mph は抗炎症性サイトカインを産生するとともに、HO-1 から生成される CO がリンパ球分化制御に関与することにより、この両者がメディエーターとして粘膜免疫機構の制御を行っていることが推察された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 9 件)

Takagi T, Naito Y, Uchiyama K, Mizushima K, Suzuki T, Horie R, Hirata I, Tsuboi H, Yoshikawa T. Carbon monoxide promotes gastric wound healing in mice via the protein kinase C pathway. *Free Radic Res.* 2016 Jun 2;1-8. PubMed PMID: 27170088. 査読有.

Naito Y, Takagi T, Uchiyama K, Katada K, Yoshikawa T. Multiple targets of carbon monoxide gas in the intestinal inflammation. *Arch Biochem Biophys.* 2016 Apr 1;595:147-52. doi:10.1016/j.abb.2015.06.020. PubMed PMID: 27095232. 査読有.

Takagi T, Uchiyama K, Naito Y. The therapeutic potential of carbon monoxide for inflammatory bowel disease. *Digestion.* 2015;91(1):13-8. doi: 10.1159/000368765. Epub 2015 Jan 20. Review. PubMed PMID: 25632911. 査読有.

Naito Y, Takagi T, Higashimura Y. Heme oxygenase-1 and anti-inflammatory M2 macrophages. *Arch Biochem Biophys.* 2014 Dec 15;564:83-8. doi: 10.1016/j.abb.2014.09.005. Epub 2014 Sep 18. Review. PubMed PMID: 25241054. 査読有.

Fukuda W, Takagi T, Katada K, Mizushima K, Okayama T, Yoshida N, Kamada K, Uchiyama K, Ishikawa T, Handa O, Konishi H, Yagi N, Ichikawa H, Yoshikawa T, Cepinskas G, Naito Y, Itoh Y. Anti-inflammatory effects of carbon monoxide-releasing molecule on trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis in mice. *Dig Dis Sci.* 2014 Jun;59(6):1142-51. doi: 10.1007/s10620-013-3014-1. Epub 2014 Jan 19. PubMed PMID: 24442266. 査読有.

Higashimura Y, Naito Y, Takagi T, Tanimura Y, Mizushima K, Harusato A, Fukui A, Yoriki H, Handa O, Ohnogi H, Yoshikawa T. Preventive effect of agaro-oligosaccharides on non-steroidal

anti-inflammatory drug-induced small intestinal injury in mice. *J Gastroenterol Hepatol.* 2014 Feb;29(2):310-7. doi: 10.1111/jgh.12373. PubMed PMID: 23980531. 査読有.

Harusato A, Naito Y, Takagi T, Uchiyama K, Mizushima K, Hirai Y, Higashimura Y, Katada K, Handa O, Ishikawa T, Yagi N, Kokura S, Ichikawa H, Muto A, Igarashi K, Yoshikawa T. BTB and CNC homolog 1 (Bach1) deficiency ameliorates TNBS colitis in mice: role of M2 macrophages and heme oxygenase-1. *Inflamm Bowel Dis.* 2013 Mar-Apr;19(4):740-53. doi: 10.1097/MIB.0b013e3182802968. PubMed PMID: 23446334. 査読有.

Yoriki H, Naito Y, Takagi T, Mizushima K, Hirai Y, Harusato A, Yamada S, Tsuji T, Kugai M, Fukui A, Higashimura Y, Katada K, Kamada K, Uchiyama K, Handa O, Yagi N, Ichikawa H, Yoshikawa T. Hemin ameliorates indomethacin-induced small intestinal injury in mice through the induction of heme oxygenase-1. *J Gastroenterol Hepatol.* 2013 Apr;28(4):632-8. doi: 10.1111/jgh.12074. PubMed PMID: 23216607. 査読有.

Higashimura Y, Naito Y, Takagi T, Mizushima K, Hirai Y, Harusato A, Ohnogi H, Yamaji R, Inui H, Nakano Y, Yoshikawa T. Oligosaccharides from agar inhibit murine intestinal inflammation through the induction of heme oxygenase-1 expression. *J Gastroenterol.* 2013 Aug;48(8):897-909. 査読有.

〔学会発表〕(計 2 件)

高木智久、内山和彦、内藤裕二. パネルディスカッション 1 「Translational medicine への展開を目指した腸疾患研究」Carbon monoxide を治療分子とした新規治療法の探索. 第 102 回日本消化器病学会総会. 2016.4.21-23 (23 日); 東京 (京王プラザホテル)

高木智久、内藤裕二、福田 亘、堅田和弘、内山和彦、半田 修、伊藤義人. ワークショップ 1 「腸管免疫から見た炎症性腸疾患の制御」Heme oxygenase-1/Carbon monoxide 系による腸管免疫制御機構の解明. 第 10 回日本消化器学会総会学術集会. 2014.2.14-15 (14 日); 福島 (福島ビューホテル)

〔図書〕(計 2 件)

Takagi T, Uchiyama K, Naito Y. Chapter 18 oxidative stress in Inflammatory Bowel

Disease. Oxidative Stress in Applied Basic Research and Clinical Practice. Studies on Pediatric Disorders. Editors: Hirokazu Tsukahara, Kazunari Kaneko. Springer: 301-314, 2014.

内藤裕二, 高木智久, 内山和彦, 堅田和弘, 東村泰希. Heme oxygenase-1 高発現 M2 マクロファージを標的分子にした IBD 治療. 消化器と免疫 No.50. 三浦総一郎監修. マイライフ社. 東京: pp33-37, 2013.

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

特記事項なし

取得状況(計 0 件)

特記事項なし

〔その他〕

ホームページ等: 特記事項なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高木 智久 (Tomohisa Takagi)
京都府立医科大学・医学研究科・准教授
研究者番号: 70405257

(2) 研究分担者

内藤 裕二 (Yuji Naito)
京都府立医科大学・医学研究科・准教授
研究者番号: 00305575

堅田 和弘 (Kazuhiro Katada)
京都府立医科大学・医学研究科・助教
研究者番号: 60593910

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

水島 かつら (Katsura Mizushima)