

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2007～2009  
 課題番号：19599008  
 研究課題名（和文） ヘムオキシゲナーゼ - 1（HO - 1）が凝固・線溶系因子の発現調節に果たす役割の解明  
 研究課題名（英文） The effects of Heme Oxygenase-1 on expression of blood coagulation / fibrinolysis associated proteins.  
 研究代表者  
 關谷 暁子（SEKIYA AKIKO）  
 金沢大学・保健学系・助教  
 研究者番号：10452111

研究成果の概要（和文）：ヘムオキシゲナーゼ-1(HO-1)およびその代謝産物が血液凝固・線溶系因子の発現を調節し、血液凝固を阻害するかどうか、およびその作用機序を *in vitro* で検討した。その結果、HO-1 および HO-1 代謝産物は p38MAPK および ERK1/2 を介して組織因子、プラスミノゲンアクチベーターインヒビタータイプ I の発現を抑制、トロンボモジュリンの発現を促進し、血液凝固を阻止する可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study was to elucidate the effects of heme oxygenase-1 (HO-1) or HO-1 products on expression of blood coagulation / fibrinolysis associated proteins *in vitro*. It was suggested that HO-1 or HO-1 products might decrease expression of tissue factor and plasminogen activator inhibitor type 1 and increase that of thrombomodulin, then finally prevent thrombus formation.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,100,000	0	1,100,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	660,000	3,960,000

研究分野：臨床検査医学，血液学  
 科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学  
 キーワード：ヘムオキシゲナーゼ-1，血栓，凝固・線溶

## 1. 研究開始当初の背景

ヘムオキシゲナーゼ(HO)は、細胞毒性の強

いへムを一酸化炭素(CO), ビリベルジン, 遊離鉄に分解する. ビリベルジンは速やかにビリベルジン還元酵素によりビリルビンになる. HO の 3つのアイソフォームのうち HO-1 は, へム, へミンなどの HO 基質に加え, 活性酸素などの様々なストレス刺激により肝臓や脾臓などを中心に産生が誘導される. HO-1 代謝産物である CO やビリルビンには抗炎症作用や抗酸化作用があることなどから, HO-1 は細胞を酸化ストレスから守る細胞保護タンパクとして注目されている.

近年谷内江らにより報告された世界第一例の先天性 HO-1 欠損症患者は, 発熱, 関節痛, 皮膚紅斑などの多様な炎症症状を示し, 血液学的検査所見では溶血性貧血, 血中フェリチン・へムの著増に加え, フィブリン分解産物(FDP)の著増, 凝固・線溶系の活性化の指標であるトロンビン・アンチトロンビン複合体(TAT), プラスミン・プラスミンインヒビター複合体(PIC)の著しい高値を認めた. 以上の HO-1 欠損症患者の臨床所見より, HO-1 は凝固・線溶系の調節に密接に関わっている可能性が考えられた.

## 2. 研究の目的

HO-1 あるいは HO-1 代謝産物が凝固・線溶系因子の発現調節におよぼす影響を明らかにするため, ヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC), および, 健常者ならびに HO-1 欠損症患者由来 Epstein-Barr ウイルス形質転換 B 細胞株(lymphoblastoid cell line, LCL)を用いて, HO-1 誘導下における凝固・線溶系因子の発現調節について検討した. さらに, HO-1 および HO-1 代謝産物による凝固・線溶系関連因子発現調節が, 細胞内シグナル伝達系の p38 mitogen-activated protein kinase(p38MAPK) および Extracellular Signal-regulated

Kinase1/2(ERK1/2)を介しているかについても検討した.

## 3. 研究の方法

HUVEC, および健常者ならびに HO-1 欠損症患者由来 LCL に, HO-1 誘導剤であるへミンを添加し, HO-1 誘導下における凝固・線溶系因子の mRNA および蛋白発現量の変動を検討した. また, この調節作用が HO-1 そのものによるものなのか, あるいは HO-1 の代謝産物である一酸化炭素(CO)やビリルビンによるものなのかを明らかにするため, HUVEC および LCL に, CO 供与体である Dichloro tricarbonylruthenium(II) dimer (CORM-2)あるいはビリルビンを添加し, 凝固・線溶系関連因子の mRNA および蛋白発現量の変動を検討した. 検討する凝固・線溶系因子は, 血液凝固を促進する組織因子(TF), 凝固を阻害するトロンボモジュリン(TM), 線溶を阻害するプラスミノゲンアクチベーターインヒビタータイプ I (PAI-1) とし, mRNA 測定にはリアルタイム PCR, 蛋白発現量測定には ELISA 法およびウェスタンブロットティングを用いた.

さらに, 健常者ならびに HO-1 欠損症患者由来 LCL にへミンを添加し, 細胞内シグナル伝達系の p38MAPK および ERK1/2 が活性化するかどうかをウェスタンブロットティングにより検討した.

## 4. 研究成果

HUVEC において, TF はへミン単独添加では有意な変動がみられなかったものの, へミンに加え HO-1 活性阻害剤であるスズプロトポルフィリン-IX (SnPP)を添加すると mRNA, 抗原量ともに有意に増加した (Fig.1C,D). PAI-1 は, へミン単独添加群に比べて, へミン+SnPP 添加群では mRNA,

抗原量ともに有意ではないものの増加傾向を示した(Fig.1 E,F). TM はヘミン単独添加群では mRNA, 抗原量ともに有意な増加を示したが, ヘミン+SnPP 添加群ではヘミン単独添加群に比べて有意に低下した (Fig.1 G,H).

LCL を用いた実験では, 健常者由来 LCL ではヘミン添加により TF mRNA は HO-1 欠損症患者由来 LCL の約 2 倍に増加し, 蛋白も増加をみとめた(Fig.2 B,C). また, PAI-1 mRNA も健常者由来 LCL ではヘミン添加によりほとんど変化を示さなかったが, 患者由来 LCL では約 2.5 倍に有意に増加し, タンパクも増加を認めた(Fig.2 D,E).

HO-1 代謝産物添加実験では HUVEC, LCL において, HO-1 を誘導しない代わりに HO-1 代謝産物である, CO ないしビリルビンを追加した場合にも TF, PAI-1 発現抑制効果および TM 発現促進効果が認められた.

これらの結果から, HO-1 およびその代謝産物が TF, PAI-1 の発現を抑制, TM の発現を促進することにより, 血栓形成を抑制する可能性が示された.

さらに, 健常者ならびに HO-1 欠損症患者由来 LCL にヘミンを追加し, 細胞内シグナル伝達系の p38MAPK および ERK1/2 が活性化するかどうかを検討した結果, 健常者由来 LCL では, ヘミン添加により p38MAPK はほとんど変化を認めなかったが, 患者由来 LCL では p38MAPK のリン酸化が著明に認められた(Fig.3 A). また, ERK1/2 は健常者および患者由来 LCL ともにリン酸化の抑制がみられたが, 健常者に比べ患者由来 LCL では抑制がより著明であった(Fig.3B). このことから, HO-1 ならびにその代謝産物による TF, PAI-1 の発現抑制効果には, p38MAPK 経路および, ERK1/2 経路が関与しているものと考えられた.

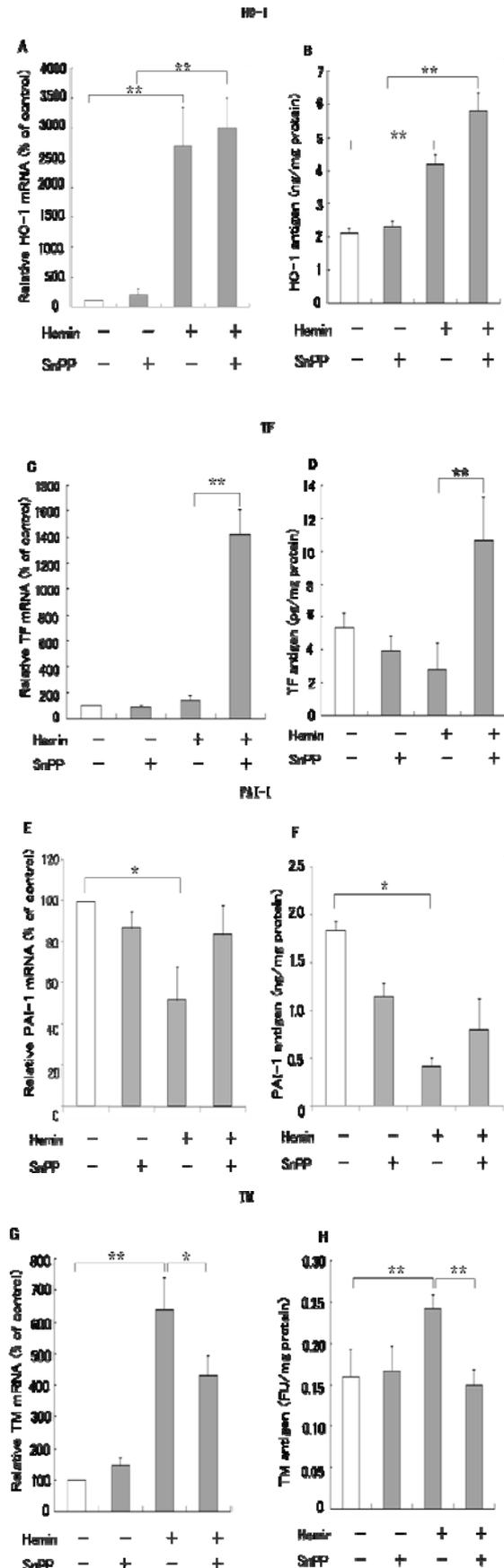


Figure 1 HUVEC にヘミンを追加後の各凝固・線溶系因子の変動

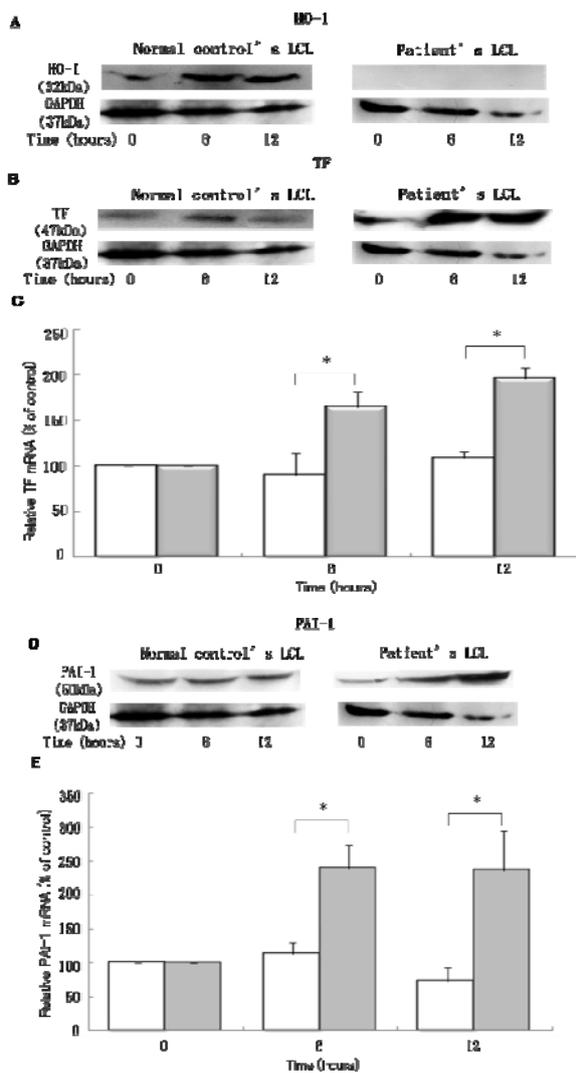


Figure 2 健常者由来 LCL および HO-1 欠損症患者由来 LCL にヘミン添加後の HO-1, TF, PAI-1 の変動

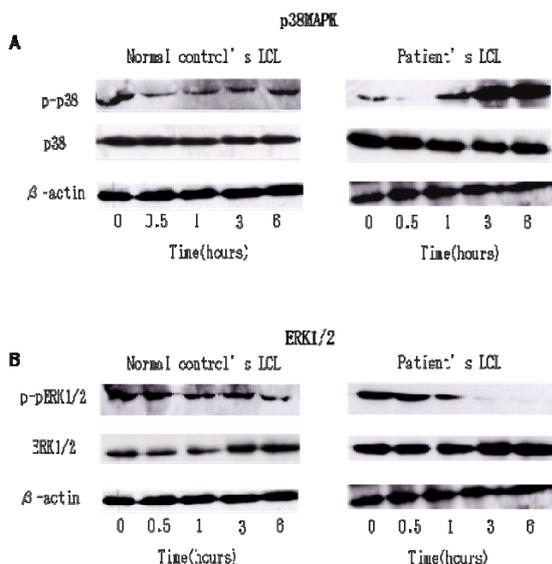


Figure 3 健常者由来 LCL および HO-1 欠損症患者由来 LCL にヘミン添加後の p38MAPK および ERK1/2 経路の活性化

#### (4. 研究成果のまとめ)

本研究により、HO-1 および HO-1 代謝産物は TF, PAI-1 の発現を抑制し、TM の発現を促進することにより血栓形成を抑制する可能性が示唆された。以上のことより、HO-1 の働きを巧みに調節することは、炎症で惹起される微小血栓による臓器障害に対して有効な治療戦略になる可能性が考えられる。本研究の成果を踏まえ、今後、ラット炎症惹起 DIC モデルにおいて、HO-1 誘導が血栓形成を阻止するかどうかを *in vivo* でも検討する予定である。

#### 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 10 件)

- Hayashi T, Morishita E (他4名), Expression of annexin II in experimental abdominal aortic aneurysms. *Int J Hematol.* 90(3):336-342. 2009. 査読有
- 寺上貴子, 大場教子, 森下英理子 (他7名), 2007年能登半島地震における深部静脈血栓症の発生状況. *臨床病理.* 57(5):411-416. 2009. 査読有
- 長屋聡美, 森下英理子, 高見昭良, 丸山慶子, 關谷暁子 (他3名), 高齢になってから診断された先天性プレカリクレイン欠乏症の1症例. *日本老年医学会雑誌.* 46(4):348-351. 2009. 査読有
- 丸山慶子, 森下英理子, 關谷暁子 (他6名), ヘムオキシゲナーゼ-1 (HO-1) による血管内皮細胞上の組織因子, トロンボモジュリンの調節. *日本血栓止血学会誌.* 20(3):315-322, 2009. 査読有

5. Morishita E, Sekiya A, Hayashi T(他5名), Increased macrophage colony-stimulating factor levels in patients with Graves' disease. *Int J Hematol.* 88(3):272-277, 2008. 査読有
6. 關谷暁子, 堀田宏, 汎用β2-マイクログロブリン測定試薬の4社の比較検討. *医学検査.* 57(7):982-987, 2008. 査読有

[学会発表] (計 15 件)

1. 關谷暁子, 森下英理子, 柄戸めぐみ, 他, MLPA法によってlarge deletionの同定された先天性アンチトロンビン欠損症の1症例. 第49回日本臨床検査医学会東海・北陸支部総会, 第320回日本臨床化学会東海・北陸支部例会連合大会, 2010年3月14日, 名古屋大学 (愛知県)
2. 油野岳夫, 森下英理子, 關谷暁子, 他, クルクミン誘導ヘムオキシゲナーゼ-1(HO-1)による末梢血単核球細胞における組織因子(TF)発現抑制効果の検討. 第49回日本臨床検査医学会東海・北陸支部総会, 第320回日本臨床化学会東海・北陸支部例会連合大会, 2010年3月14日, 名古屋大学 (愛知県)
3. 丸山慶子, 森下英理子, 關谷暁子, 他, ヘムオキシゲナーゼ-1(HO-1)による凝固・線溶系因子の調節, 第20回日本老年医学会北陸地方会, 2009年11月7日, 金沢大学附属病院 (石川県)
4. 油野岳夫, 森下英理子, 關谷暁子, 他, LPS誘発ラット播種性血管内凝固症候群(DIC)モデルでの各種臓器におけるヘムオキシゲナーゼ-1(HO-1)mRNA発現の検討, 第34回北陸臨床病理集談会, 2009年9月26日, 金沢医療センター(石川県)

5. 丸山慶子, 森下英理子, 關谷暁子, 他, ヘムオキシゲナーゼ1(HO-1)による血管内皮細胞上の凝固・線溶因子の調節, 第56回日本臨床検査医学会学術集会, 2009年8月26日, 札幌コンベンションセンター (北海道)
6. 丸山慶子, 森下英理子, 關谷暁子, 他, ヘムオキシゲナーゼ-1(HO-1)による凝固・線溶系因子の調節, 第32回日本血栓止血学会学術集会, 2009年6月6日, 北九州国際会議場 (福岡県)
7. 丸山慶子, 森下英理子, 關谷暁子, 他, ヘムオキシゲナーゼ1(HO-1)による血管内皮細胞上の凝固・線溶因子の調節, 第19回日本老年医学会北陸地方会, 2008年11月15日, 富山大学 (富山県)
8. 丸山慶子, 森下英理子, 關谷暁子, 他, ヘムオキシゲナーゼ1(HO-1)による血管内皮細胞上の凝固・線溶因子の調節, 第9回日本検査血液学会学術集会, 2008年7月26日, 三重県総合文化センター (三重県)
9. 關谷暁子, 森下英理子, 下川原逸美, 他, 新しい変異を認めた先天性プロテインS欠損症の遺伝子解析, 第47回日本臨床検査医学会東海北陸支部総会, 第316回日本臨床検査医学会東海北陸支部例会連合大会, 2008年3月9日, 富山国際会議場 (富山県)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

關谷 暁子 (SEKIYA AKIKO)  
 金沢大学・保健学系・助教  
 研究者番号: 10452111

##### (2) 研究分担者

森下 英理子 (MORISHITA ERIKO)

金沢大学・保健学系・准教授

研究者番号：50251921

(3) 連携研究者

谷内江 昭宏 (YACHIE AKIHIRO)

金沢大学・医学系・教授

研究者番号：40210281

(H19：研究分担者)

(4) 研究協力者

丸山 慶子 (MARUYAMA KEIKO)

金沢大学・医学系研究科・博士後期課程

1年