

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008 年度 ～ 2010 年度

課題番号：20591174

研究課題名(和文) リウマチ・炎症性疾患におけるヘムオキシゲナーゼ-1の発現制御と治療応用

研究課題名(英文) Regulation of heme oxygenase-1 expression and the therapeutic application in rheumatic and inflammatory diseases

研究代表者

岳野 光洋 (TAKENO MITSUHIRO)

横浜市立大学・医学部・准教授

研究者番号：50236494

研究成果の概要(和文)：本研究は抗炎症作用、抗アポトーシス作用を有するヘムオキシゲナーゼ(heme oxygenase: HO)-1のリウマチ・炎症性疾患における病態への役割を解析した。HO-1はベーチェット病活動期には発現不全がみられ、アトピー性皮膚炎では防御的な役割を果たすこと、血球貪食症候群では診断にも有用な、活動性を反映する指標となることを明らかにした。また、HO-1が睡眠時無呼吸症候群の病態、破骨細胞分化調節、腫瘍増殖機構、抗腫瘍薬耐性獲得機構に関与していることを示した。

研究成果の概要(英文)：This project investigated pathogenic roles of heme oxygenase (HO)-1 in rheumatic and inflammatory diseases. We showed implication of defective HO-1 expression in Behcet's disease, a protective role of HO-1 in atopic dermatitis, and serum HO-1 as a biomarker in hemophagocytic syndrome. Moreover, our studies revealed that HO-1 is involved in sleep apnea syndrome, osteoclastogenesis, tumor growth and acquired resistance to anticancer agents.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：膠原病・アレルギー内科学

キーワード：(1) ヘムオキシゲナーゼ-1 (2) Bach1 (3) 成人発症ステイル病

(4) 血球貪食症候群 (5) ベーチェット病 (6) 破骨細胞 (7) アトピー性皮膚炎 (8) 白血病 (9) 肺癌 (10) 睡眠時無呼吸症候群 (11) 一酸化炭素

1. 研究開始当初の背景

ヘムオキシゲナーゼ(heme oxygenase: HO)-1は虚血や酸化ストレスにより誘導され、ヘムをFe、CO、ビリベルジンに分解する酵素である。その分解産物は炎症性サイトカイン

の産生抑制作用、抗アポトーシス作用、抗酸化作用を有し、「細胞保護作用」と総称されている生理活性を發揮する。研究代表者らは本研究開始時までにリウマチ・膠原病・炎症性疾患におけるHO-1の役割を検討し、以下の

知見を得てきた。

(1) HO-1発現誘導によりMRL/*lpr*マウスの抗DNA抗体産生、インターフェロン-g産生、腎病変局所のiNOS発現が抑制され、ループス腎炎の進展が阻止される。

(2) 血清HO-1値は成人ステイル病、血球貪食症候群活動期に上昇する。

(3) 関節リウマチ (Rheumatoid arthritis: RA) 滑膜細胞に過剰に発現したHO-1はその炎症制御に働いている。

(4) ヒト単球において、腫瘍壊死因子 (tumor necrosis factor: TNF) はHO-1発現を抑制し、HO-1発現低下はさらなるTNF過剰産生をもたらす、炎症が増幅される。抗TNF抗体治療中のRA患者末梢血単核細胞を解析すると、臨床的治療効果と並行してHO-1の発現上昇がみられることから、HO-1の発現回復が抗TNF抗体治療の薬理効果発現機序の一端を担うものと考えられる。

などの知見を見出してきた。本研究はこれらの知見に基づき、リウマチ・炎症性疾患におけるHO-1の役割について、さらに解析を進めるものである。

2. 研究の目的

(1) 成人ステイル病、血球貪食症候群におけるHO-1発現異常のメカニズム：転写因子レベルでの解析

これらの疾患ではマクロファージの異常活性化が特徴であり、活動期には高フェリチン血症とともにHO-1の著明な上昇が見られる。その機序を解明することにより病態の解明が期待される。本研究では、HO-1産生制御にあたる転写因子Nrf2、HIF-1 α およびレプレッサーであるBach1、Bach2によるHO-1遺伝子発現調節機構を中心に解析する。

(2) RAにおけるHO-1発現異常の役割

HO-1の抗炎症機序をさらに解明するとと

もに、RAの終末病態である骨、軟骨破壊への関与、特に破骨細胞分化への影響を検討する。

(3) サイトカインのHO-1発現への影響

HO-1の発現は種々のサイトカインにより正にも負にも制御されることが知られている。IL-10はHO-1の発現を強力に誘導するが、その抗炎症作用の一部は誘導されたHO-1の機能に媒介されることが明らかにされている。一方、研究代表者らが明らかにしたように、TNFはHO-1発現を抑制し、HO-1発現低下はさらにTNF過剰産生をもたらすことで、炎症増幅のサイクルが形成されている。このようなサイトカインによるHO-1発現調節機構を分子レベルで解析する。

以上が、研究開始時の主目的であったが、本研究では、ベーチェット病、アトピー性皮膚炎、睡眠時無呼吸症候群、肺癌、白血病細胞など分野を越えて、それぞれの疾患におけるHO-1の役割を合わせて検討した。

3. 研究の方法

(1) HO-1発現調節における転写因子レベルでの解析

① 健常者末梢血単核細胞およびCD14陽性細胞 (MACSを用いて positive selection)、患者由来白血病細胞、株化白血病細胞株を対象とした。

② 各細胞のrestingあるいはLPS、各種サイトカイン刺激時のHO-1 Nrf2、Bach1の蛋白発現量をwestern法で、mRNA発現量はreal-time PCR法を用いて半定量的に解析した。

③ pGL3にHO-1プロモーター領域を挿入したpHO-1(-4.5k)、pHO-1(-4.0k)を用いたluciferase assayにより転写活性を解析した。

④ Chip assay HO-1プロモーター領域のMEARに結合するNrf2、Bach2を半定量的に解析し

た。

⑤Bach1、HO-1 特異的 siRNA を用いて抗腫瘍薬存在下での生存率を検討した。

(2) 破骨細胞分化における HO-1 の解析

本研究では、HO-1 レプレッサーBach1 欠損マウス（東北大学 五十嵐和彦教授より譲受）を用いて検討した。マウス骨髄単核細胞

(bone marrow derived mononuclear cells: BMM) より RANKL、M-CSF 刺激により破骨細胞分化を誘導し、酒石酸染色、pit formation assay で形態的・機能的に解析するとともに破骨細胞分化マーカーの蛋白レベル、mRNA レベルの発現をそれぞれ、western 法、real-time PCR 法により解析した。

(3) 疾患患者検体の解析

対象患者は、血球貪食症候群、ベーチェット病、アトピー性皮膚炎、睡眠時無呼吸症候群、肺癌、白血病患者など。

血清中 HO-1 は ELISA 法で、末梢血単核細胞の mRNA 発現は real-time PCR 法で解析した。また、睡眠時無呼吸症候群においては、CPAP 治療前後で、就寝時、起床時の全血中 CO (HO-1 による heme 分解産物の一つ) 濃度を測定した。

4. 研究成果

研究成果が多岐にわたるので、次項5で示す発表論文ごとに概説する。

(1) ベーチェット病患者末梢血白血球における HO-1 の発現 (Kirino Y, Takeno M, et al. Arthritis Res Ther. 2008, Mizuki N, Takeno M, Nat Genet. 2010)

ベーチェット病患者末梢血単核細胞は恒常的に TLR4 を過剰発現し、疾患活動期には HO-1 mRNA 発現低下していた。TLR4 と HO-1 の mRNA 発現は逆相関すること、*in vitro* で TLR4 リガンドである LPS、HSP60 刺激により HO-1 発現が低下すること、HO-1 強制発現、ノック

ダウンは TLR4 の発現に影響しないことを考え合わせると、ベーチェット病患者白血球は TLR4 が過剰発現しているために、何らかのリガンドに対し過剰に反応し、活動期の炎症性病変を形成するものと考えられる。

さらに、最近の日本人ベーチェット患者 612 例を対象とした SNP を用いた GWAS の結果は HO-1 の病態への役割を考える上で興味深いものとなった。この GWAS では従来より遺伝素因として重視されてきた HLA-B51、A26 に加えて、*IL10*、*IL23R-IL12RB* を疾患感受性遺伝子として同定され、その有意性を他の民族においても検証された。特に、IL-10 の疾患感受性アレルは IL-10 の low producer を規定していることから、その抗炎症作用の低下がベーチェット病炎症の進展に寄与している可能性が考えられる。今後、HO-1/IL-10 の抗炎症ユニットとして病態への関与を検討する必要がある。

(2) HO-1 によるアトピー性皮膚炎の制御 (Kirino M, Takeno M, et al. J Allergy Clin Immunol. 2008)

アトピー性皮膚炎の病変には HO-1 が発現し、患者血清 HO-1 濃度は疾患活動性に並行して上昇し、IgE、IL-18、TARC などのアトピーマーカーとも相関していた。アトピー性皮膚炎モデルマウスでもやはり病変部では特にマクロファージ系細胞に一致して HO-1 の発現が見られた。このマウスに HO-1 誘導剤、ヘミン投与すると皮膚病変は軽快した。以上の結果より、HO-1 はアトピー性皮膚炎に防御的な役割を果たしていると考えられた。

(3) 血球貪食症候群診断における HO-1 の有用性 (Miyazaki T, Takeno M, Int J Hematol. 2010)

血球貪食症候群の活動期には血清 HO-1 が

高値をとり、治療による回復過程で低下する。血液疾患の経過中には少なからず汎血球減少に遭遇し、鑑別に苦慮することがあるが、血球貪食症候群における血清 HO-1 高値は感度、特異度とも高く、他疾患との鑑別に有用である。

(4) ヒト単球系細胞における Bach1 による HO-1 の発現制御 (Miyazaki T, Takeno M, Cancer Sci. 2010)

健常者単球、患者由来単離直後の白血病細胞における HO-1 は LPS 刺激により低下するのに対し、継代培養した白血病細胞株では逆にその発現が誘導される。また、この LPS に対する反応性は PMA 前処理により全く逆のものとなる。いずれの条件での HO-1 の発現も核内の Nrf2 : Bach1 の比率、特に MRE1A への結合比率で規定され、Nrf2 優位で発現が誘導され、Bach1 優位で抑制される。

患者由来白血病細胞の生存は HO-1 siRNA により短縮し、Bach1 siRNA で HO-1 発現が増強すると延長し、Ara-C に対する薬剤感受性も同様の変化を示した。以上の知見は HO-1 が骨髄系白血病細胞の腫瘍増殖機構および薬剤耐性機序に関与し、Bach1 を標的とした治療の可能性を示唆するものである。ここで得られた Nrf2/Bach1 に関する知見は、マクロファージ系細胞の活性化に基づき HO-1 の過剰産生がみられる成人スチール病、血球貪食症候群の病態の解明にもつながる可能性が高いと思われる、今後の課題と考えている。

(5) Bach1 欠損における破骨細胞分化不全

(投稿中)

破骨細胞分化過程では早期より HO-1 発現は低下し、Bach1 欠損マウス由来 BMM ではその分化が抑制された。この抑制に伴う RANK, TRAF6, c-Fos, NFATc1 発現低下は HO-1 shRNA 導入により回復したが、RANKL 刺激による

Blimp-1 発現低下は不変だった。Bach1 は RANK 発現調節など HO-1 依存性破骨細胞分化を制御するが、Blimp-1 発現系など、一部 HO-1 非依存性の経路も存在する。

以下はリウマチ・炎症性疾患に直接は関連しないが、本研究の成果であるので、ここに記載する。

(6) 睡眠時無呼吸症候群における CO の上昇 (Kobayashi M, Takeno M, Chest 2008)

睡眠時無呼吸症候群患者ではヘムオキシゲナーゼの分解産物である血中 CO レベルは重症度に相関して睡眠後に上昇する。その異常は CPAP 治療により解消された。以上の結果は低換気に伴う低酸素血症に伴い HO-1 の発現が誘導され、結果として蓄積した血中 CO が高値をとったものと考えられる。短期的な治療効果のマーカーとして有用であるとともに、CO をモニターして治療することで、長期予後で最も問題になる心血管系障害の低下にもつながる可能性がある。

(7) 肺癌のシスプラチン耐性機序と HO-1 (Kuroda H, Takeno M , et al. Lung Cancer. 2010)

肺癌由来細胞株 A549 は HO-1 を過剰に発現し、シスプラチンに耐性である。HO-1 の過剰発現には EGF 受容体からの PI3K/Akt を介した NF- κ B の活性化が関与しており、EGFR-TK 阻害薬を投与することで、HO-1 の発現は低下するとともに、シスプラチンへの感受性を回復する。

以上の知見は HO-1 の過剰発現が抗腫瘍薬耐性獲得機序に寄与していることを示すもので、HO-1 発現調節が新たな抗腫瘍効果の標的であることを示唆している。

以上のように、本研究により HO-1 がリウマチ・炎症性疾患、アレルギー疾患、睡眠時無呼吸症候群、癌などのさまざまな疾患の病

態に關与することを解明し、HO-1 疾患マーカーとしての意義や HO-1 発現是正による治療の可能性を提唱した。これらの成果はいずれも独創性が高く、以下の発表論文が示すように国内外でも高く評価されている。

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 7 件)

1. Mizuki N, Takeo M, et al. Genome-wide association studies identify IL23R-IL12RB2 and IL10 as Behçet's disease susceptibility loci. Nat Genet. 42(8):703-6, 2010
2. Miyazaki T, Takeo M, Ueda A., et al. Expression of heme oxygenase-1 in human leukemic cells and its regulation by transcriptional repressor Bach1. Cancer Sci. 101(6):1409-16, 2010
3. Miyazaki T, Takeo M, Ueda A. et al. Serum HO-1 is useful to make differential diagnosis of secondary hemophagocytic syndrome from other similar hematological conditions. Int J Hematol. 91(2): 229-37, 2010
4. Kuroda H, Takeo M, et al. Inhibition of heme oxygenase-1 with an epidermal growth factor receptor inhibitor and cisplatin decreases proliferation of lung cancer A549 cells. Lung Cancer 67(1):31-6, 2010
5. Kirino Y, Takeo M, Ueda A. et al. Association of reduced heme oxygenase-1 with excessive Toll-like receptor 4 expression in peripheral blood mononuclear cells in Behçet's

disease. Arthritis Res Ther. 2008;10(1):R16, 2008 .

6. Kirino M, Takeo M, Ueda A. et al. Heme oxygenase 1 attenuates the development of atopic dermatitis-like lesions in mice: Implications for human disease. J Allergy Clin Immunol. 122(2):290-7, 297. e1-8, 2008
7. Kobayashi M, Takeo M, Ueda A. et al. Circulating carbon monoxide level is elevated after sleep in patients with obstructive sleep apnea. Chest 134(5):904-10., 2008

[学会発表] (計 5 件)

1. Takeo M, Ueda A., et al. Bach1 regulates heme oxygenase-1 expression of human monocytes in response to LPS : implication in Behçet's disease. American College of Rheumatology 74th ACR, Atlanta, 2010, 11.
2. Takeo M, Ishigatsubo Y. Immunological features of Behçet's disease. American College of Rheumatology 74th ACR, Atlanta, 2010, 11
3. Kirino Y, Takeo M, Ueda A. et al. Increased Serum Heme Oxygenase 1 and IL-18 Levels are Associated with Skin Manifestations in Adult Still's Disease and Atopic Dermatitis. American College of Rheumatology 72nd Annual Scientific Meetings, San Francisco, 2008, 10.
4. Takeo M, Ueda A. et al. Excessive TLR4 expression is associated with reduced HO-1 expression in peripheral mononuclear cells in patients with

Behçet's disease 13th International
Conference for Behçet's Disease,
Klagenfurt, 2008, 5.

5. 桐野洋平, 岳野光洋, 上田敦久, 他. 血清 heme oxygenase-1 の上昇と成人ステイ
ル病の病態. 第 52 回日本リウマチ学会総
会, 札幌, 2008, 4.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岳野 光洋 (TAKENO MITSUHIRO)

横浜市立大学・医学部・准教授

研究者番号 : 50236494

(2) 研究分担者

上田敦久 (UEDA ATSUHISA)

横浜市立大学・附属病院・准教授

研究者番号 : 60295483

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :