

令和元年6月7日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09322

研究課題名(和文) 炎症性腸疾患に対する局所制御型一酸化炭素遊離薬の開発

研究課題名(英文) The development of drug delivery system of carbon monoxide for inflammatory bowel disease

研究代表者

高木 智久 (Takagi, Tomohisa)

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) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：マウス実験腸炎モデルを用いた検討により抗酸化酵素HO-1(heme oxygenase-1)が主に腸管粘膜固有層のマクロファージに発現し、HO-1から生成される一酸化炭素(carbon monoxide: CO)によるTh17リンパ球分化制御を介して、腸管炎症の発症・進展が制御されること、さらには、大腸粘膜内のHO-1発現が腸内細菌叢構成に影響することを明らかにした。また、COを高含有した溶解液を開発し、本剤の注腸投与によるラット大腸炎モデルにおける腸炎発症進展抑制効果・粘膜損傷治癒促進効果を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

難治性・再発性疾患である炎症性腸疾患に対する病態解明・新規治療法の開発は重要な課題であり、本研究により抗酸化酵素HO-1(heme oxygenase-1)が抗原提示細胞(マクロファージ)に発現し、生成する一酸化炭素(carbon monoxide: CO)を介してリンパ球分化を制御し、一酸化炭素を介した免疫担当細胞間のシグナル架橋が存在することを示すことができた。また、COを治療分子とした新規治療法開発として、CO高含有溶解液作成が達成された。

研究成果の概要(英文)：In this project, we confirmed that heme oxygenase-1 (HO-1) is mainly expressed in macrophages in the inflamed colonic mucosa using the murine colitis model, and carbon monoxide (CO) produced from HO-1 directly regulates Th17 differentiation of lymphocytes, and CO regulated the gut environment by augmenting clearance of enteric microbes. In addition, the rectal administration of a CO-saturated solution protected the intestinal mucosa from inflammation and accelerated colonic ulcer healing through enhanced epithelial restoration. These data suggested that CO could be a novel therapeutic molecule in patients with inflammatory bowel disease, including ulcerative colitis and Crohn's disease.

研究分野：消化器内科学

キーワード：Heme oxygenase-1 一酸化炭素 炎症性腸疾患

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

- (1) 若年者を中心に患者数が増加してい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、免疫抑制剤や生物学的製剤などを用いた新たな治療戦略が構築され、患者 QOL の改善に一定の成果がみられている。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は依然、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れない革新的な新規治療法の開発が必要である。
- (2) 化学室息性有毒ガスとして知られる一酸化炭素(Carbon monoxide: CO)は、内因性には抗酸化酵素 Heme oxygenase-1 (HO-1)による Heme の分解・代謝により生成される。CO は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っており、その細胞保護効果・抗炎症効果が注目されている。外因性 CO による病態改善効果は様々な病態モデルにおいて検証されており、腸管炎症病態においても CO が腸炎発症・進展抑制効果を発揮することが報告されている。このように、CO を基軸とした腸管炎症病態に対する治療手段の創出は、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るが、その毒性を克服した創薬の開発が必要である。

## 2. 研究の目的

これまでの我々の先行研究において、CO による腸炎抑制作用にはリンパ球分化制御を介した腸管粘膜免疫機構制御が関与し、CO が自然・獲得免疫機構を繋ぐガス状メディエーターとして作用する可能性を見出しているが、その分子機構の詳細は不明である。また、CO を治療分子とした臨床治療応用には CO の毒性を克服した治療法の開発が必要となっている。本研究課題では、CO による腸管免疫・炎症制御の分子機構を明らかにし、安全性の高い局所遊離型 CO 製剤の開発を行うことにより腸炎治療における新規治療戦略の探索を行った。

## 3. 研究の方法

- (1) マウス脾細胞由来ナイーブ CD4<sup>+</sup>T 細胞を用いたリンパ球分化における CO の影響を検証する。また、ナイーブ CD4<sup>+</sup>T 細胞移入腸炎モデルを用いて、外因性 CO 投与による腸管粘膜内における有効性、ならびに、リンパ球分化制御についても解析を行う。併せて、HO-1 やその生成物である CO は Mph での貪食機能調節を介して腸管内の細菌クリアランスを維持することで腸管炎症を制御する可能性が報告されており、HO-1/CO 系を介した腸内細菌叢の調整作用についても検討する。
- (2) 局所制御型 CO 遊離剤として CO 溶解液の注腸投与による腸炎治療効果を検討する。CO 溶解液に関しては、CO 溶解度や放出特性、さらには、毒性出現などについて臨床応用を意識した溶媒を探索し作成を行う。また、開発された CO 溶解液注腸投与による腸炎発症・進展阻止効果、腸炎治癒促進効果について、ラット Trinitrobenzenesulfonic acid(TNBS)腸炎モデルを用いて検討する。

## 4. 研究成果

- (1) CO によるリンパ球分化における影響の検討として、マウス脾臓から単離したナイーブ CD4<sup>+</sup>T 細胞に対して CO 遊離剤での刺激による影響を検証した。その結果、CO 遊離剤により転写因子 ROR $\gamma$ c 発現が制御され、Th17 が選択的に分化制御されることを明らかにした。また、in vivo モデルでの検証としてナイーブ CD4<sup>+</sup>T 細胞移入腸炎モデルを用いた検討を行い、CO 投与により Th17 リンパ球分化制御を介して腸管炎症が制御されることを明らかにした (Takagi T, et al. Free Radic Res. 2018)。
- (2) 腸管炎症病態における HO-1 の炎症抑制効果について、HO-1 阻害剤にて腸管炎症病態が悪化すること、Bach1 欠損マウス (高 HO-1 発現マウス) では腸管炎症が軽減されることを確認し、HO-1 は主に腸管粘膜固有層のマクロファージに発現することを見出した (Takagi T, et al. J Clin Biochem Nutr. 2018)。これらの結果は HO-1 を高発現する抗原提示細胞 (マクロファージ) が一酸化炭素を介してリンパ球分化を制御する可能性を示すものであり、一酸化炭素を介したサイトカインと同様の免疫担当細胞間のコミュニケーションが存在する可能性を示すことが出来た。
- (3) 高 HO-1 発現マウス (Bach1 欠損マウス) を用いて大腸粘膜内の HO-1 発現が腸内環境に及ぼす影響を検証しており、両マウスを共飼育することにより腸内環境を移入させると、野生型マウスの腸炎が改善すること、また、糞便移植を用いた検討にて、Bach1 欠損マウスの糞便を移植された野生型マウスでも腸管炎症の発症進展が抑制されることを明らかにしており、大腸粘膜内における HO-1 発現が腸内細菌叢構成にも影響することを明らかにした。これらのマウスを用いたメタゲノム解析を実施し、大腸粘膜内における HO-1 高発現に伴い増加する腸内細菌叢を同定した。

- (4) 腸管炎症病態に対するCOを用いた新規治療法の開発として、炎症局所にCOを送達する安全なDelivery Systemの構築を目指し、生理食塩水にCOを溶解させた溶液を用いた注腸投与を開発し、ラット腸炎モデルを用いた検討にて腸炎抑制効果・粘膜治癒促進効果を確認した。さらに、高濃度のCO溶解性を有する溶媒を探索し、より少ない投与回数で腸炎抑制効果・粘膜治癒促進効果が達成されることを見出し、平成30年6月8日に特許出願に至った(炎症性消化器疾患用組成物、特願2018-110688)。また、CO注腸投与では全身的な毒性が認められないことを確認した。

## 5. 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計 6 件)

Takagi T, Naito Y, Inoue R, Kashiwagi S, Uchiyama K, Mizushima K, Tsuchiya S, Dohi O, Yoshida N, Kamada K, Ishikawa T, Handa O, Konishi H, Okuda K, Tsujimoto Y, Ohnogi H, Itoh Y. Differences in gut microbiota associated with age, sex, and stool consistency in healthy Japanese subjects. *J Gastroenterol*. 2019 Jan;54(1):53-63. doi: 10.1007/s00535-018-1488-5. 査読有.

Takagi T, Homma T, Fujii J, Shirasawa N, Yoriki H, Hotta Y, Higashimura Y, Mizushima K, Hirai Y, Katada K, Uchiyama K, Naito Y, Itoh Y. Elevated ER stress exacerbates dextran sulfate sodium-induced colitis in PRDX4-knockout mice. *Free Radic Biol Med*. 2018 Dec 19;134:153-164. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2018.12.024. 査読有.

Takagi T, Naito Y, Mizushima K, Hirai Y, Harusato A, Okayama T, Katada K, Kamada K, Uchiyama K, Handa O, Ishikawa T, Itoh Y. Heme oxygenase-1 prevents murine intestinal inflammation. *J Clin Biochem Nutr*. 2018 Nov;63(3):169-174. doi:10.3164/jcbs.17-133. 査読有.

Takagi T, Naito Y, Tanaka M, Mizushima K, Ushiroda C, Toyokawa Y, Uchiyama K, Hamaguchi M, Handa O, Itoh Y. Carbon monoxide ameliorates murine T-cell-dependent colitis through the inhibition of Th17 differentiation. *Free Radic Res*. 2018 Dec;52(11-12):1328-1335. doi: 10.1080/10715762.2018.1470327. 査読有.

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 Oct;50(10):1098-1105. PubMed PMID: 27170088. 査読有.

Steiger C, Uchiyama K, Takagi T, Mizushima K, Higashimura Y, Gutmann M, Hermann C, Botov S, Schmalz HG, Naito Y, Meinel L. Prevention of colitis by controlled oral drug delivery of carbon monoxide. *J Control Release*. 2016 Oct 10;239:128-36. doi: 10.1016/j.jconrel.2016.08.030. 査読有.

### 〔学会発表〕(計 5 件)

Tomohisa Takagi, Yuji Naito, Kazuhiro Uchiyama, Yasuki Higashimura, Katsura Mizushima, Yoshito Itoh. Carbon monoxide promotes intestinal mucosal healing in colitis model. 9TH International conference on Heme Oxygenase (国際学会) 2016年 (Prague)

高木智久. 腸管炎症病態におけるHeme oxygenase-1/Carbon monoxide系の役割. 第69回酸化ストレス学会(招待講演) 2016年(仙台)

Tomohisa Takagi, Yuji Naito. The role of heme oxygenase-1 in intestinal inflammation. 10th International Conference of Heme Oxygenase (招待講演・国際学会) 2018年 (Souel)

Tomohisa Takagi, Yuji Naito, Katsura Mizushima, Yasuko Hirai, Kazuhiro Uchiyama, and Yoshito Itoh. Heme oxygenase-1 regulates the intestinal inflammation in murine colitis model. 10th International Symposium on Cell/ Tissue Injury and Cytoprotection/Organoprotection (ISCTICO). 2018年(京都)

高木智久、内山和彦、豊川優季、東村泰希、柏木里織、後田ちひろ、水島かつら、平井泰子、鎌田和浩、石川剛、半田修、内藤裕二. Heme oxygenase-1/Carbon monoxide系の 新規治療標的分子としての可能性. 第71回日本酸化ストレス学会学術集会腸管炎症病態における. 2018年(京都)

### 〔産業財産権〕

#### ○出願状況(計 2 件)

名称: 炎症性消化器疾患用組成物

発明者: 高木智久、内藤裕二、三浦かつら、坂上茂樹

権利者: 京都府公立大学法人、住友精化株式会社

種類: 特許

番号: 特願 2018-110688

出願年: 2018 年

国内外の別：国内

名称：皮膚創傷用組成物

発明者：高木智久、浅井純、岡山哲也、三浦かつら、坂上茂樹

権利者：京都府公立大学法人、住友精化株式会社

種類：特許

番号：特願 2018-110717

出願年：2018 年

国内外の別：国内

## 6. 研究組織

(研究分担者)

研究分担者氏名：内藤 裕二

ローマ字氏名：Naito Yuji

所属研究機関名：京都府立医科大学

部局名：医学（系）研究科（研究院）

職名：准教授

研究者番号（8桁）：00305575

研究分担者氏名：内山 和彦

ローマ字氏名：Uchiyama Kazuhiko

所属研究機関名：京都府立医科大学

部局名：医学（系）研究科（研究院）

職名：助教

研究者番号（8桁）：50298428

研究分担者氏名：堅田 和弘

ローマ字氏名：Katada Kazuhiro

所属研究機関名：京都府立医科大学

部局名：医学（系）研究科（研究院）

職名：助教

研究者番号（8桁）：60593910