

平成21年 5月30日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19590735
 研究課題名（和文） 炎症性腸疾患におけるヘムオキシゲナーゼの抗炎症作用に関する検討
 研究課題名（英文） Investigation into anti-inflammatory effect of heme oxygenase for Inflammatory Bowel Disease
 研究代表者
 中道 郁夫（NAKAMICHI IKUO）
 九州歯科大学・歯学部・助教
 研究者番号：60419570

研究成果の概要：炎症性腸疾患は再発を繰り返す原因不明の疾患で、その治療法は確立されていない。一方、ヘムオキシゲナーゼという酵素が抗炎症作用を有する事が知られてきたが、その詳細も分かっていなかった。本研究ではヘムオキシゲナーゼをマクロファージで発現させることにより、マウス実験腸炎の発症を抑制できた。また培養細胞を用いた実験から、抗炎症作用が STAT1 シグナルの抑制を介した IL-12 の分泌減少によることが分かった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
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：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：炎症性腸疾患、ヘムオキシゲナーゼ、マクロファージ、STAT1、IL-12

1. 研究開始当初の背景

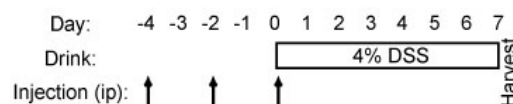
ヘミンや各種ストレスで誘導されるヘムオキシゲナーゼ 1 (HO-1) の抗炎症作用が報告されるようになっていたが、その分子機構は不明であった。また我々の研究では、炎症性腸疾患の大腸組織で HO-1 が高発現している事が分かった。

2. 研究の目的

炎症性腸疾患における HO-1 の抗炎症作用を確認し、その分子機構を解明することによって新たな治療戦略を提案する。

3. 研究の方法

(1) マウスのデキストラン硫酸 (DSS) 大腸炎モデルで HO-1 の抗炎症効果を検討する。



①ヘミン (25 μ g/g) をマウスの腹腔内に隔日で3回注射し HO-1 を大腸で発現誘導する。このマウスに4%のDSSを含有する飲料水を7日間自由飲水させて腸炎を誘発する。腸炎誘発前後で体重変化、便性状、便潜血を総合して活動性スコアとして算出し、病理学的ス

- コアと併せて検討する。
 ②大腸組織からmRNA を回収し、サイトカインの量を検討する。
 ③大腸組織の免疫染色で HO-1 を高発現している細胞を同定する。

(2) マウスの培養細胞を用いて抗炎症作用の分子機構を検討する

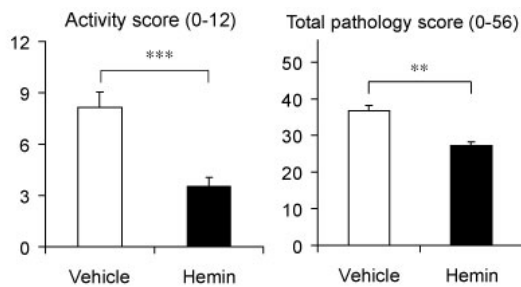
- ①マウス由来培養細胞の培養液にヘミン(75 μ M)を添加して HO-1 を誘導する。細胞から mRNA を回収しマイクロアレイでHO-1 誘導により変化したmRNA を網羅的に同定する。有意に減少したmRNA をバイオインフォマティクスで解析し関与するパスウェイを推定する。
 ②ヘミンで HO-1 を誘導した培養細胞において ELISA 法でサイトカインの分泌量を測定する。この際に前述①のパスウェイに刺激を加えて関与を確認する。
 ③抗炎症作用に対するヘミンの影響を排除するため HO-1 発現細胞株を樹立し、さらに検証を行う。

(3) 遺伝子改変マウスを用いて個体レベルで分子機構を検証する。

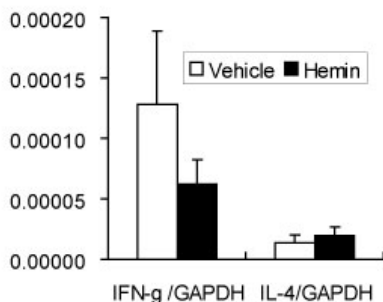
- ①前述の培養細胞で得られた候補遺伝子の改変マウスから炎症細胞を回収し、サイトカイン分泌能を ELISA にて検討する。
 ②さらに遺伝子改変マウスに DSS で腸炎を誘発し、体重減少、病理像、サイトカイン転写量を検討する。

4. 研究成果

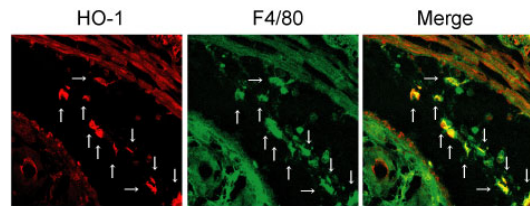
(1) マウス DSS 腸炎に対するヘミンを用いた HO-1 誘導による抗炎症作用の検討。



①ヘミンで HO-1 を誘導したマウスでは活動性スコアは有意に半減し、病理学的スコアも有意に改善した。



②大腸組織でインターフェロン(IFN)とインターロイキン(IL)のmRNA を定量したところ、ヘミンで HO-1 を誘導した大腸では Th1 型の IFN- γ が減少しており、Th2 型の IL-4 は変化が認められなかった。

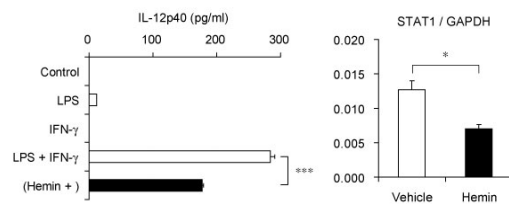


③大腸組織の免疫染色では HO-1 (赤) を高発現している細胞は F4/80 (緑) にも染色された。F4/80 はマクロファージ系細胞のマーカであることより HO-1 は主にマクロファージで誘導されている事が分かった。

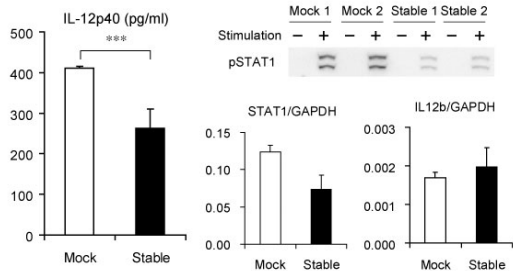
(2) マクロファージ系培養細胞(RAW264.7)を用いた抗炎症機構の検討。

Pathway	p-value
Interferon Signaling	0.0001
JAK/Stat Signaling	0.0110
GM-CSF Signaling	0.0117
PDGF Signaling	0.0174
Sonic Hedgehog Signaling	0.0794
Pyrimidine Metabolism	0.1054
Serotonin Receptor Signaling	0.1186
EGF Signaling	0.1211
Toll-like Receptor Signaling	0.1352
Glycosaminoglycan Degradation	0.1449

①RAW264.7 細胞にヘミンもしくは溶媒を添加して培養し mRNA を回収した。これを Agilent 社のマイクロアレイで網羅的に定量し確実に減少した 105 個のプローブを得た。さらに Ingenuity 社のバイオインフォマティクスによるパスウェイ解析 (IPA) にて上表の如く、IFN とその下流である JAK/STAT の関与が強く示唆された。

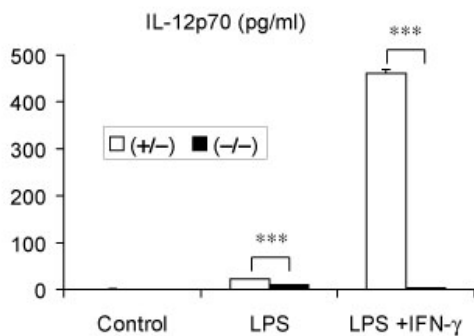


②(1)の結果よりヘミンの抗炎症効果は Th1 型炎症の抑制と考えられること、HO-1 はマクロファージで誘導されることがわかった。そこで、RAW264.7 細胞に菌体毒素 (LPS) や IFN- γ で刺激を加えて、T 細胞を Th1 型へ分化誘導する IL-12 の分泌量を ELISA で測定した。結果として IL-12p40 は LPS あるいは IFN- γ 単独の刺激では十分に分泌されず、共刺激によって有効に分泌される事が分かった。また、この分泌機構はヘミンの前処置により有意に抑制された。

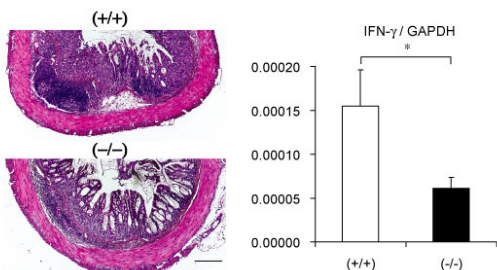


③抗炎症作用のHO-1依存性を確認するためHO-1を過剰発現するRAW264.7細胞株(Stable)を樹立した。この細胞株においてもIL-12p40の分泌は有意に抑制されており、この時のSTAT1 mRNA(IL-12b)の転写とリン酸化STAT1(pSTAT1)蛋白の発現は減少していた。また、IL-12p40のmRNAであるIL-12bの転写量に変化が無く、むしろ増加傾向であった。

(3) STAT1欠損マウスとその腹腔マクロファージを用いたTh1型腸炎の検討。

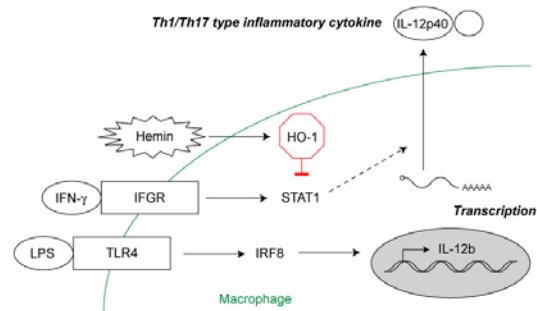


①コントロールマウス(+/-)とSTAT1欠損マウス(-/-)にチオグリコレートを腹腔内注射して活性化マクロファージを回収した。このマクロファージにLPS単独とLPSとIFN-γの共刺激を行いIL-12p70の分泌量をEISAで検討したところ、やはりIFN-γはIL-12の分泌に必要である事が分かった。また、下流のSTAT1の欠損でこの分泌促進作用が失われることも確認できた。



②野生型マウス(+/-)とSTAT1欠損マウス(-/-)にDSSで腸炎を誘発したところ、STAT1が欠損していると腸炎は病理学的にも軽症で、IFN-γのmRNA転写も減少していた。

(4) 成果のまとめ



- ①マウスDSS腸炎モデルでヘミンによるHO-1の発現誘導が抗炎症作用を示した。
- ②ヘミンはマクロファージでHO-1発現を誘導し、STAT1シグナルを抑制した。
- ③STAT1の欠損でIL-12分泌は著しく減少し、DSS腸炎も軽症化した。

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 3件)

①Kudo T, Matsumoto T, Nakamichi I, Yada S, Esaki M, Jo Y, Ohji Y, Yao T, Iida M. Recombinant human granulocyte colony stimulating factor reduces colonic epithelial cell apoptosis and ameliorates murine dextran sulfate sodium-induced colitis. *Scand J Gastroenterol.* 43(6):689-97, 2008. 査読有り

②Torisu T, Matsumoto T, Takata Y, Ansai T, Soh I, Awano S, Nakamichi I, Kagiya S, Sonoki K, Yoshida A, Hamasaki T, Iida M, Takehara T. Atrophic gastritis, but not antibody to Helicobacter pylori, is associated with body mass index in a Japanese population. *J Gastroenterol.* 43(10):762-6, 2008. 査読有り

③Toivola DM, Nakamichi I, Strnad P, Michie SA, Ghori N, Harada M, Zeh K, Oshima RG, Baribault H, Omary MB. Keratin overexpression levels correlate with the extent of spontaneous pancreatic injury. *Am J Pathol.* Apr;172(4):882-92, 2008. 査読有り

[学会発表] (計 5件)

①中道 郁夫、松本 主之、飯田 三雄 HO-1誘導マクロファージの抗炎症作用に対するマイクロRNAの網羅的検討 第5回日本消化管学会総会 2009年2月12-13日 東京

② Nakamichi I, Matsumoto T, Kobayashi T, Habtezion A, Yoshimura A, Omary MB, Iida M. Heme oxygenase-1 suppresses IL-12 secretion with inhibition of IFN-STAT signaling: a potential therapeutic target for Th1-type colitis. American Gastroenterological Association. May 17-22, 2008. San Diego, CA, USA.

③ 中道 郁夫、松本 主之、飯田 三雄
HO-1 誘導による実験腸炎の抑制とその分子機構 第 94 回日本消化器病学会総会 2008 年 5 月 8-10 日 福岡

④ 中道 郁夫、松本 主之、飯田 三雄
HO-1 による STAT1 シグナルを介した IL-12p40 分泌抑制：Th1 型腸炎への応用を目指して 第 49 回日本消化器病学会大会 2007 年 10 月 18-21 日 神戸

⑤ Nakamichi I, Matsumoto T, Habtezion A, Omary MB, Iida M. Heme oxygenase-1 induced macrophages protect from DSS-mediated colitis in association with STAT1 suppression. American Gastroenterological Association. May 19-24, 2007. Washington, DC, USA.

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中道 郁夫 (NAKAMICHI IKUO)

九州歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：60419570

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

飯田 三雄 (IIDA MITSUO)

九州大学・医学研究科・教授

研究者番号：00127961

松本 主之 (MATSUMOTO TAKAYUKI)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：10278955

矢田 親一郎 (YADA SHINICHIRO)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：00346800