

令和 4 年 6 月 23 日現在

機関番号：35408

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07359

研究課題名(和文)敗血症増悪化に関わる遊離ヘムによる消化管上皮バリア機能障害機構の解明

研究課題名(英文) Mechanism of intestinal barrier disruption caused by free heme causing aggravation of sepsis

研究代表者

赤木 玲子 (Akagi, Reiko)

安田女子大学・薬学部・教授

研究者番号：50150967

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：消化管の出血に起因する遊離ヘム濃度の上昇をもたらすバリア障害の発症機序とそれに対する誘導型ヘム分解系酵素ヘムオキシゲナーゼ(HO)-1の役割を、ヒト結腸癌細胞Caco-2を用いた敗血症モデルを作成して解明した。ヘムにより誘導合成されるHO-1は細胞内遊離ヘムを分解することによりバリア機能回復に寄与することをHO-1をノックアウトしたCaco-2を作成して証明した。さらに、HOの反応生成物であるCOはバリア障害からの回復を促す可能性が示唆された。ビリルビンは、HO反応の最終生成物であり、内因性の抗酸化物質として消化管保護作用を示す。以上の情報を盛り込んで総説論文にまとめた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

敗血症は全身性炎症性反応症候群に分類され、重篤な消化管の障害はバリア機能低下により増悪化をもたらす。私たちは、敗血症腸管の出血部位において、赤血球崩壊に伴う局所的遊離ヘム濃度上昇がバリア機能を障害することを見出した。そのような状況では、ヘム分解酵素であるヘムオキシゲナーゼ 1(HO-1)が誘導合成されるが、HOを阻害するとバリア障害が増悪化し、HO-1欠損はヘムによる細胞死を誘因することから、HO-1がバリア保護的に機能していることが分かった。HO-1を誘導することにより敗血症等の消化管出血を伴う疾病の新規治療法の開発に有用な研究結果と考えている。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the mechanism of intestinal barrier disruption caused by abnormally increased intracellular free heme levels observed after intestinal hemorrhage in endotoxemia, by using filter-grown Caco-2 cells model. Inducible isozyme of heme oxygenase (HO)-1, which catalyzes the rate limiting step of heme degradation, plays an important role in the recovery of impaired barrier function, because inhibition of HO activity resulted in aggravation of heme-induced barrier dysfunction. We established HO-1 knockout Caco-2 cells and demonstrated that they were significantly vulnerable to heme-induced barrier dysfunction. HO reaction produces specific chemicals, CO and bilirubin, which are also shown to protect intestinal barrier integrity. All these results from this study were summarized to a review article, submitted for publication.

研究分野：生化学・分子生物学

キーワード：タイトジャンクション バリア障害 遊離ヘム ヘムオキシゲナーゼ-1 (HO-1) 一酸化炭素 (CO) HSF1 NRF2

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

厚生労働省より特定疾患に指定されているクローン病や潰瘍性大腸炎は、出血や発熱、炎症を繰り返す炎症性腸疾患だが、原因が不明であるために未だ十分な治療法が確立されていない (Hatoum et al. 2005, *Inflamm Bowel Dis*)。これら疾患の症状の1つである消化管出血は、腸管上皮細胞間に形成されるバリア機能を障害することが知られている (AI-Dasooqi et al. 2014, *Pathol Oncol Res*)。このバリア機能障害は敗血症などを誘発し、患者 (特に高齢者) の生命予後を著しく悪化させるため、有効な解決策が必要とされている。

消化管上皮細胞は、隣り合う細胞間に形成されるタイトジャンクション (TJ) によって強固に密接することで、細菌などが体内へ侵入することを防ぐバリア機能を形成している (Rodriguez-Boulan et al. 1989, *Science*)。これまでの研究から、出血に際し、ヘム (2 価の鉄原子とポルフィリンからなる錯体) がヘモグロビンから遊離されること、そしてその結果生じる周辺細胞内における遊離ヘムの濃度の増加は、ヘム分解酵素である heme oxygenase (HO)-1 の発現を誘導することが明らかにされている (Tenhunen et al. 1970, *J Lab Clin Med*)。申請者はさらに、敗血症モデルラットにおいて、重篤な消化管出血に伴うバリア障害の程度は HO-1 の発現レベルと逆相関することを報告している (Fujii et al. 2003, *Crit. Care Med.*)。これらの研究結果から、出血に伴って遊離したヘムがバリア機能を障害している可能性が示唆されたが、ヘムがバリア機能障害を引き起こすメカニズムは明らかにされていなかった。

本研究は、申請者らがこれまでに積み重ねてきたヘム代謝や HO-1 と種々な組織機能障害の関係性に関する知見に立脚し、これまでに明らかにされていない、ヘムによるバリア機能障害のメカニズムを解明することを目指して開始した。

2. 研究の目的

申請者らは HO-1 が酸化ストレスに対する細胞保護作用を有することに着目して、その発現調節機構と生理的意義を解析してきた (Akagi et al. 2005, *Contrib Nephrol*; Takahashi et al. 2004, *Curr Med Chem*; Takahashi et al. 2007 *Mini Rev Med Chem*)。その過程で、HO-1 が腸管障害保護的に働くことを明らかにした (Fujii et al. 2003, *Crit Care Med*; Uehara et al. 2003, *Crit Care Med*) が、メカニズムについては長らく不明であった。動物実験で見出した HO-1 の消化管上皮細胞保護効果の分子メカニズムを検討するために、ヒト結腸癌由来培養細胞 Caco-2 を transwell で培養し、敗血症モデルを作成すべくヘムを添加したところ、漿膜側特異的にヘム濃度依存性のバリア障害が起こることを見出した (Akagi et al. 2016, *Biol Pharm Bull*)。この障害は可逆的であり、細胞内ヘム濃度上昇によって誘導される HO-1 の酵素活性を阻害すると増悪化することから、TJAC 構成タンパク質のいずれかが遊離ヘムと結合することで構造が変化し、その結果、バリア機能障害が生じている可能性が考えられた。そこでまず、HO-1 欠損 Caco-2 (Caco-2-HO-1KO) を樹立し、ヘム依存性バリア障害を検討することにより、バリア機能維持における HO-1 の重要性を証明することを試みた。

近年、上皮細胞アピカル膜直下に広がるタイトジャンクションアピカル複合体 (TJAC: アピカル膜、アピカル細胞骨格、細胞間接着装置) が詳細に研究され、TJAC が消化管上皮細胞によるバリア機能の構築に中心的な役割を果たしていることが報告されている (Tanaka et al. 2017, *Ann NY Acad Sci*)。消化管出血モデルにおいて、細胞内ヘム依存的にバリア機能が障害されることから、細胞内へ取込まれたヘムがバリア機能を担う TJAC 構成タンパク質に結合することで、バリア機能障害を引き起こしている可能性が考えられたので、ヘム結合性 TJAC 構成タンパク質を同定することを目的として、細胞内ヘム含量を変化させた Caco-2 から抽出したタンパク質を分析した。

3. 研究の方法

(1) HO-1 ノックアウト Caco-2 細胞株の樹立

ヒト HO-1 遺伝子の第一エクソンを標的として sgRNA を設計し、px330 に組み込んで Caco-2 に導入し、CRISPR-Cas9 法で Caco-2-HO-1KO を樹立した。クローニングした細胞にヘミン添加して 6 時間培養後、HO-1 発現をウエスタンブロット法で確認し、発現誘導が認められなかったクローンを Caco-2-HO-1KO として用いた (図 1)。

(2) バリア機能測定

Caco-2 を transwell で培養し、ヘミン添加により出血モデルを作成し、ミリセルを用いて経上皮抵抗値を測定することによりバリア機能を測定した。

(3) ヘム結合 TJAC 構成タンパク質の探索

バリア形成した分化 Caco-2 を溶解した後遠心分離し、ヘム-アガロースを添加してヘム結合性

タンパク質を吸着させ、非特異的なタンパク質を洗浄除去後、ポルフィリン環をもつヘムの前駆体であるプロトポルフィリンIX (PPIX)で洗浄し、ヘムで溶出されるタンパク質を分離した。回収したタンパク質は、SDS-PAGEにより分画した。細胞内ヘム濃度を調整する目的で、ヘム合成前駆体である5-アミノレブリン酸(A)もしくはヘム合成阻害作用を持つサクシニルアセトン(S)添加培地で培養したものと、比較検討した。

4. 研究成果

(1) Caco-2-HO-1KO 細胞株の樹立と、ヘムによるバリア障害の検討

Moch 細胞では、ヘム添加により回復を伴う一時的なバリア障害が認められ、Caco-2-HO-1KO では障害は増悪化した (図 1)。最近得られた結果から、Caco-2-HO-1KO にヘミン添加すると、野生型では認められなかった細胞死が起こっていることを見出した。この細胞死はフェロトシスである可能性が考えられるので、今後詳細に検討する予定である。

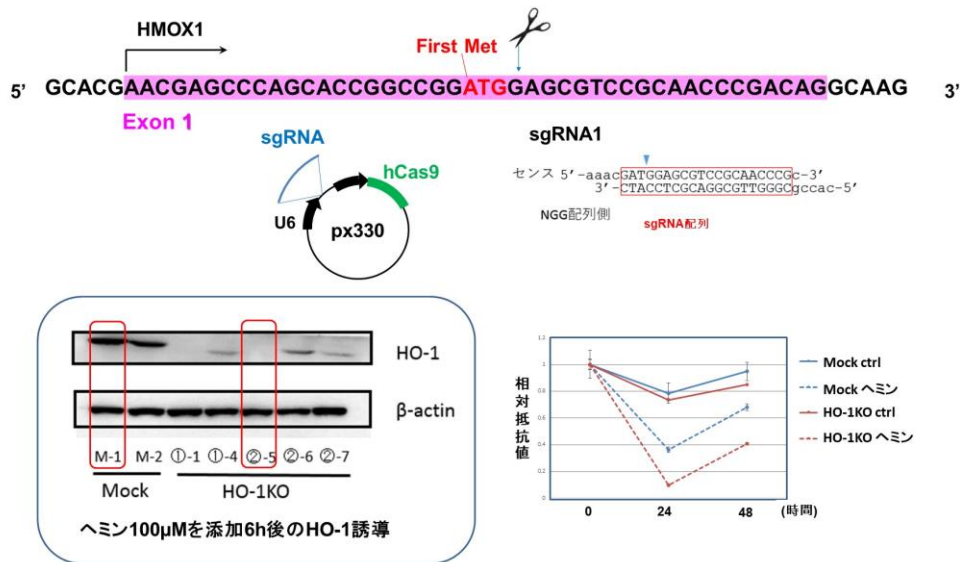


図1 CRISPR-Cas9によるHO-1 KO Caco-2細胞株の樹立

(2) ヘム依存性のバリア障害からの回復におけるCOの果たす役割

HO 反応生成物であるCOは高親和性ヘム結合物質であることから、COとヘムによる巧妙なバリア調節機構が存在するのではないかと考えた。すなわち、HO-1が細胞質に浮遊している遊離ヘムを分解し、その結果生じるCOがTJAC複合体に結合したヘム内にある鉄原子と結合することで、タンパク質との結合能が変化する可能性を証明する目的で、CO-releasing moleculesを添加したところ、ヘムによるバリア障害からの回復が改善された。

(3) ヘム結合 TJAC 構成タンパク質の網羅的探索

ヘム-アガロースを用いたアフィニティークロマトグラフィーにより、ヘム結合性タンパク質を抽出した (図 2)。目的のタンパク質は、ヘム合成前駆体5-アミノレブリン酸添加培地で培養した細胞抽出液(A)では細胞内ヘム含量増加により減少し、ヘム合成阻害剤サクシニルアセトン存在下で培養した細胞抽出液(S)では逆に増加すると考えられる。TJAC 構成タンパク質のうち、代表的な細胞間接着タンパク質であるClaudin (20-27 kDa)、Occludin (65 kDa)、細胞骨格タンパク質であるβ-actin (42 kDa) の分子量に相当する領域に特徴的な数種のバンドを検出している (図 2)。以上の条件を満たすタンパク質候補数種類について、近日中に質量分析(MALDI-TOF MS)を行うことで、ヘム特異的結合タンパク質の同定をする。

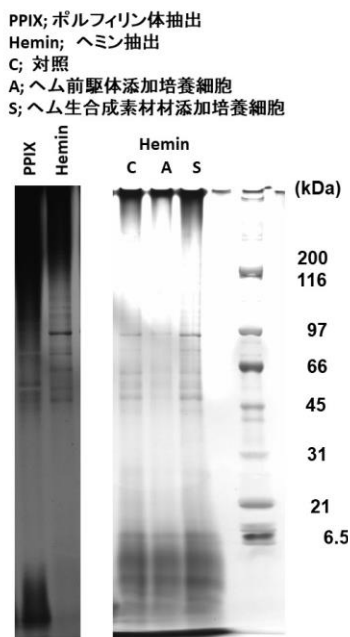


図2 ヘム結合性タイトジャンクション構成タンパク質の抽出

(4) HO-1 のストレス誘導に関する転写因子の結合領域の解明

敗血症等の酸化ストレス負荷時には個体レベルでは発熱を伴うため、遊離ヘムに起因する酸化ストレスに加えて、温熱ストレスが負荷された状態と考えられる。HO-1 は熱ショックタンパク質としても知られているが、その熱ショック応答性は動物種によって異なり、ヒトでは概して応答しないとされている。本研究を遂行する過程で、Caco-2 では温熱ストレス応答性の HO-1 誘導が認められたので、転写因子群の関与について検討した (図 3)。熱ショック応答性が大きく異なるラットとマウスについて、両ストレスの同時負荷による HO-1 誘導動態を検討した結果、温熱ストレス応答性転写因子 HSF1 と酸化ストレス応答性転写因子 NRF2 のみならず、抑制系転写因子 BACH1 が核内へ移行し、巧妙なクロストークにより HO-1 発現が調節されていることを解明し、報告した(Akagi et al. 2021, J Biochem)。Caco-2 でも同様に検討中である。

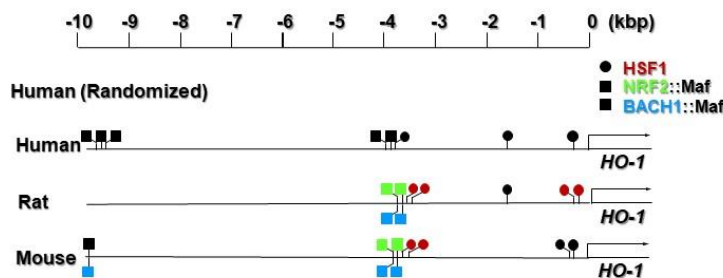


図3 *ho-1*遺伝子の熱ショック誘導に関する転写調節領域

有機鉄の1つであるヘムは、その分子量はわずか 616.499 g/mol という非常に小さな分子である。このヘムは様々なタンパク質と結合することで、酸素運搬や電子伝達系タンパク質の補欠分子族として機能する(Poulos et al. 2007, *Nat Prod Rep.*)のみならず、転写制御(Sun et al. 2002, *EMBO J*; Zenke-Kawasaki et al. 2007, *Mol Cell Biol*)、ion channel chemosensing (Tang et al. 2003, *Nature*)、概日リズム制御(Kaasik et al. 2004, *Nature*)、microRNA プロセッシング(Faller et al. 2007, *Nat Struct Mol Biol*)など、多彩な細胞内のイベントに関与していることが知られている。本研究により、ヘムが新たに腸管のバリア機能を制御していることが明らかとなり、難治性の腸管出血を示す各種疾患に対する新たな治療戦略への情報提供できたと考えている。細胞内ヘム濃度は合成系と分解系によって厳密に制御されており、後者の主役となるのが HO-1 発現誘導である。腸管上皮細胞においても、HO-1 が遊離ヘムによるバリア障害からの回復に重要であることが明らかとなり、反応生成物である CO は高親和性ヘム結合物質であることから、CO とヘムによる巧妙なバリア調節機構も視野に入れたより効果的な対策を講じるための情報基盤が構築されたと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Hatori, Y., Kubo, T., Sato, Y., Inouye, S., Akagi, R., Seyama, T.	4. 巻 9
2. 論文標題 Visualization of the Redox Status of Cytosolic Glutathione Using the Organelle- and Cytoskeleton-Targeted Redox Sensors	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Antioxidants (Basel)	6. 最初と最後の頁 1-14
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/antiox9020129	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Inoue, R., Irie, Y., Akagi, R.	4. 巻 103
2. 論文標題 Role of heme oxygenase-1 in human placenta on iron supply to fetus	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Placenta	6. 最初と最後の頁 53-58
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.placenta.2020.09.065	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Takanori Kubo, Yoshio Nishimura, Yuta Hatori, Reiko Akagi, Keichiro Miura, Kazuyoshi Yanagihara, Toshio Seyama	4. 巻 93
2. 論文標題 Antitumor effect of palmitic acid-conjugated DsiRNA for colon cancer in a mouse subcutaneous tumor model.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Chemical Biology & Drug Design	6. 最初と最後の頁 570-581
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cbdd.13454	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Reiko Akagi, Takanori Kubo, Yuta Hatori, Takafumi Miyamoto, and Sachiye Inouye	4. 巻 170
2. 論文標題 Heme oxygenase-1 induction by heat shock in rat hepatoma cell line is regulated by the coordinated function of HSF1, NRF2 and BACH1	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J. Biochemistry	6. 最初と最後の頁 570-581
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvab065	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計20件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 赤木玲子、久保貴紀、羽鳥勇太、宮本崇史、井上幸江
2. 発表標題 ラットHeme oxygenase-1の熱ショック応答～HSF1、NRF2、BACH1による転写調節～
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 井上幸江、伊豫田拓也、沖田直之、宮本崇史、久保貴紀、坂本祐美、赤木玲子
2. 発表標題 抗酸化酵素ヘムオキシゲナーゼ-1 (HO-1) の熱ショック応答機構
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 辻大輔、中山淳、山本 璃子、赤木玲子、伊藤 孝司、難波 康祐
2. 発表標題 光刺激による細胞傷害活性を示す低分子蛍光物質の探索とそのメカニズムの解明
3. 学会等名 第63回日本生化学会中国・四国支部例会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 赤木玲子、久保貴紀、村上千穂、井上幸江
2. 発表標題 温熱ストレス負荷によるヘムオキシゲナーゼ 1 誘導メカニズム～HSF1, NRF2, BACH1の役割～
3. 学会等名 第61回日本生化学会中国・四国支部例会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松富 香名子、井上 幸江、村上 千穂、赤木 玲子
2. 発表標題 腸上皮バリア障害におけるヘム代謝の影響
3. 学会等名 第61回日本生化学会中国・四国支部例会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松富 香名子、木村 希、村上 千穂、井上 幸江、赤木 玲子
2. 発表標題 Heme oxygenase-1による消化管上皮バリア機能の調節機構
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 赤木玲子、佃美穂、久保貴紀、村上千穂、井上幸江
2. 発表標題 マウス由来肝癌細胞におけるH0-1遺伝子の熱ショック応答機構の解明
3. 学会等名 第59回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Sachiye Inouye, Takuya Iyoda, Naoyuki Okita, Takafumi Miyamoto, Yoichi Mizukami, Reiko Akagi
2. 発表標題 Alteration of the H0-1 induction in an HL60 cell line by differentiation
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佃美穂、鍵平光希、村上千穂、赤木玲子
2. 発表標題 ヒト由来培養細胞における分化後のヘムオキシゲナーゼ-1の熱ショック応答機構の解明
3. 学会等名 日本薬学会第141回年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 赤木 玲子、齋藤 静果、羽鳥 勇太、久保 貴紀、井上 幸江
2. 発表標題 温熱ストレス負荷によりラットのヘムオキシゲナーゼ 1 は主にNRF2を介して誘導される
3. 学会等名 第60回日本生化学会中国・四国支部例会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 久保 貴紀、西村 良夫、羽鳥 勇太、赤木 玲子、柳原 五吉、瀬山 敏雄
2. 発表標題 -カテニン遺伝子を標的としたパルミチン酸コンジュゲートDicer-substrate siRNA (C16-DsiRNA) のRNA干渉効果
3. 学会等名 第60回日本生化学会中国・四国支部例会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 久保 貴紀、西村 良夫、羽鳥 勇太、佐藤 雄一郎、赤木 玲子、柳原 五吉、瀬山 敏雄
2. 発表標題 In vitroおよびin vivoで高いRNAi効果を示すパルミチン酸コンジュゲートDicer-substrate siRNAの開発
3. 学会等名 日本核酸医薬学会第5回年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 赤木玲子、羽鳥勇太、久保貴紀、井上幸江
2. 発表標題 マウスHeme oxygenase-1の熱ショック応答におけるNRF2の役割
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鍵平光希、後藤瑞稀、羽鳥勇太、赤木玲子
2. 発表標題 THP-1(ヒト急性単球性白血病由来)細胞の分化に伴うストレス応答性の変化
3. 学会等名 第58回日本薬学会日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田代 愛、羽鳥 勇太、赤木 玲子
2. 発表標題 Heme oxygenase-1のストレス応答へのKEAP1の関与
3. 学会等名 第58回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松富香名子、羽鳥勇太、赤木玲子
2. 発表標題 ヒト結腸癌由来腸上皮細胞のバリア機能保持におけるheme oxygenase-1の役割
3. 学会等名 第58回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 井上幸江、沖田直之、伊豫田拓也、宮本崇史、赤木玲子
2. 発表標題 マウス膵β細胞MIN6のインスリン分泌に及ぼす遊離ヘムの作用
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	宮本 崇史 (Miyamoto Takafumi) (50740346)	筑波大学・医学医療系・助教 (12102)	
研究分担者	井上 幸江 (Inouye Sachie) (60159978)	山陽小野田市立山口東京理科大学・薬学部・教授 (25503)	
研究分担者	北澤 健生 (Kitazawa Takeo) (70791490)	安田女子大学・薬学部・准教授 (35408)	
研究分担者	久保 貴紀 (Kubo Takanori) (90435751)	安田女子大学・薬学部・准教授 (35408)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------