

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K08292

研究課題名（和文）ガス分子薬開発に向けたヘムオキシゲナーゼ/一酸化炭素による腸内環境調整作用の解明

研究課題名（英文）Heme oxygenase/carbon monoxide-mediated intestinal modulation for the development of gas molecule drugs

研究代表者

高木 智久（Tomohisa, Takagi）

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） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：Bach1欠損マウス（Heme Oxygenase-1(HO-1)高発現マウス）では、デキストラン硫酸（DSS）惹起性腸炎が野生型マウスに比較して抑制されることをもとに、Bach1欠損マウス（HO-1高発現マウス）の腸内環境を移植された野生型マウスにおいてもDSS惹起性腸炎が抑制されることを明らかにした。さらに、HO-1高発現環境下で優位性を示す腸内細菌の一つとして同定されたParaprevotella claraの投与により腸炎が抑制されること、さらには、潰瘍性大腸炎患者で有意に減少している菌種であることを確認しており、抗炎症性細菌として有望な候補菌であると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Bach1欠損マウス（Heme Oxygenase-1(HO-1)高発現マウス）を用いて、一酸化炭素（Carbon monoxide: CO）高産生環境下での腸炎抑制効果を明らかにするとともに、この腸内環境形成に関与する腸内細菌叢としてParaprevotella claraを同定したことは本領域における重要な知見となった。さらに、Paraprevotella claraは日本人潰瘍性大腸炎患者で有意に減少している菌種であることを確認しており、抗炎症性細菌として有望な候補菌であると考えられ、新たな治療手段として期待される研究成果と考えられた。

研究成果の概要（英文）：Based on the fact that dextran sulphate (DSS)-induced enteritis is suppressed in Bach1-deficient mice (mice with high expression of Heme Oxygenase-1 (HO-1)) compared to wild-type mice, it has been shown that DSS-induced enteritis was suppressed in wild-type mice transplanted with the intestinal environment of Bach1-deficient mice (HO-1-high expressing mice). Furthermore, the administration of Paraprevotella clara, which was identified as one of the intestinal bacteria showing predominance in the HO-1 high-expressing environment, suppressed intestinal inflammation, and was also found to be a significantly reduced species in patients with ulcerative colitis. It was considered to be a promising candidate bacterium as an anti-inflammatory bacterium.

研究分野：消化器内科学

キーワード：Heme Oxygenase-1 一酸化炭素 Bach1 潰瘍性大腸炎 Paraprevotella

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) 炎症性腸疾患患者の動向

本邦でも若年者を中心に患者数の増加が著しい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、既存治療薬剤を用い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ため、炎症性腸疾患の病因・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、既存の治療法にとらわれない革新的な新規治療法の開発が必要である。

### (2) 一酸化炭素(Carbon monoxide: CO)と腸炎研究の接点

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、抗酸化酵素 Heme oxygenase-1 (HO-1)による Heme の分解・代謝により内因性に生成される。この内因性 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。また、外因性 CO による病態改善効果についても、肺・心筋障害モデルや小腸・腎移植モデルをはじめとした様々な実験動物モデルにおいて抗炎症・臓器保護効果が示されている。腸管炎症病態においても、外因性に投与された CO により腸炎発症・進展抑制効果を発揮すること (Takagi T. *Dig Dis Sci.* 2010, Oynish JC. *Gastroenterology* 2013) について、我々も含めて国内外から報告がなされている。

### (3) CO を新規治療分子とした腸管炎症病態制御

我々は、抗酸化酵素 HO-1 やその生成物である CO に焦点を当てて継続的に腸管炎症病態における新規治療分子としての可能性を探索してきた。炎症性腸疾患患者の活動性粘膜において抗酸化酵素 HO-1 が高発現すること (Takagi T. *Aliment Pharmacol Ther.* 2006, Takagi T. *J Gastroenterol Hepatol.* 2008) HO-1 が腸管粘膜内サイトカインバランスを制御すること (Takagi T. *Redox Rep.* 2010, Takagi T. *J Clin Biochem Nutr.* 2018)、HO-1 発現が腸管内マクロファージ(Mφ)に局在し、M2(抗炎症・免疫制御性)形質を誘導すること (Harusato A, ... Takagi T. *Inflamm Bowel Dis.* 2013) この大腸粘膜保護作用には HO-1 から誘導される CO を介していること (Takagi T. *Digestion.* 2015)、CO がリンパ球の Th17 分化を直接的に制御すること (Takagi T. *Free Radic Res.* 2018)、を明らかにしてきた。これらの知見は CO が自然免疫機構 (Mφ) と獲得免疫機構 (リンパ球) を架橋するメディエーターとして作用し、抗炎症作用をもたらすことを意味していると考えられる。

我々はこれらを背景に、CO をガス状治療分子とした検討も重ねており、CO ガス吸入 (Takagi T. *Dig Dis Sci.* 2010)、腸管内 CO ガス投与 (Takagi T. *Med Gas Res.* 2012)、CO 遊離剤 (Takagi T. *Dig Dis Sci.* 2011, Steiger C, ... Takagi T. *J Control Release.* 2016)、局所遊離型 CO 注腸剤などによる腸管炎症抑制効果を検証し、最終的にはヒト外挿可能な高濃度 CO 溶解注腸液の開発を達成した。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、その臨床応用が期待されている。しかしながら、依然、CO による腸管免疫制御や粘膜治癒促進効果の分子機構の詳細は十分に解明されておらず、また、HO-1・CO 系を介した腸内環境との相互作用は不明のままであり、その解明が重要な課題となっている。

## 2. 研究の目的

CO をガス状治療分子とした新規腸炎治療薬開発へむけた一連の研究知見は、我々が継続的な検討によって世界に先駆けて明らかにしてきた現象であり、これまでの既存治療法にとらわれない、国内外でも試みのない学術独自性・創造性の高い画期的な新規治療の開拓に繋がるものであると考えられる。しかしながら、CO や内因性に CO を生成する酵素である HO-1 による腸管免疫制御や粘膜治癒促進効果の分子機構の詳細は不明のままであり、その解明が重要な課題となっている。

そこで、本研究では、腸管内に発現する HO-1・CO 系に着目して腸内細菌叢解析・腸管内代謝物メタボロミクス解析を通じた腸内環境解析を実施し、さらには、外因性 CO 投与時における皮膚潰瘍・大腸潰瘍腸の治癒促進効果炎に関わるメカニズムについても解析を行うことにより、CO をガス状治療分子とする新規治療法としての基盤形成を目指すことを目的として検討を行った。

### 3．研究の方法

本検討課題では、腸管内に発現する HO-1・CO 系に着目して腸内細菌叢や腸管内短鎖脂肪酸を含めた腸内環境解析を実施した。具体的には、HO-1・CO 系を介した Mph 機能変容を検証するとともに、HO-1 高発現環境下における腸内細菌叢を含めた腸内環境を検証し、その生体有益性を明らかにするとともに、抽出された抗炎症作用に寄与する候補腸内細菌・候補代謝物による腸炎発症進展抑制・粘膜治癒促進作用について検証を実施した。

また、CO の毒性克服という課題を解決した CO 溶解液の開発を達成しており、さらに、既に医薬品の乳化剤・賦形剤として安全に用いられているミリスチン酸イソプロピルを溶媒とすることで生理食塩水の 10 倍の高濃度 CO 溶解性(9000 $\mu$ M)が達成され(特願 2018-110688・特願 2018-110717・PCT/JP2019/019578) より少ない頻度の投与での治療効果が期待された。そこで本検討では、高濃度 CO 溶解剤を用いて、マウス皮膚潰瘍モデル・ラット大腸潰瘍モデルを用いた治療効果について検討を行った。また、高濃度 CO 溶解剤について、その毒性や製剤安定性についても検討を行った。

### 4．研究成果

#### (1) Bach1 欠損マウス (Heme Oxygenase-1(HO-1)高発現マウス) を用いた検討

Bach1 欠損マウス (Heme Oxygenase-1(HO-1)高発現マウス) では、デキストラン硫酸(DSS) 惹起性腸炎が野生型マウスに比較して抑制されること、さらには、糞便移植や co-housing により Bach1 欠損マウス (HO-1 高発現マウス) の腸内環境を移植された野生型マウスにおいても DSS 惹起性腸炎が抑制されることを明らかにした。

Bach1 欠損マウス (HO-1 高発現マウス) の腸内環境についても解析を行い、糞便中有機酸解析において短鎖脂肪酸、特に酪酸が多く維持されていることを確認した。さらに、HO-1 高発現環境下で優位性を示す腸内細菌を探索し、候補腸内細菌の一つとして *Paraprevotella clara* を同定し、*Paraprevotella clara* の投与により腸炎の発症進展が抑制されることを確認した。*Paraprevotella clara* については酪酸をはじめとした短鎖脂肪酸生成能を有することを確認しており、また、日本人潰瘍性大腸炎患者で有意に減少している菌種であることを確認しており、抗炎症性細菌として有望な候補菌であると考えられた。

一方、Bach1 欠損マウス由来の HO-1 高発現マクロファージを用いてピーズ貪食活性試験を実施したものの、HO-1・CO 系を介した明らかな貪食能亢進作用は確認出来なかった。このことから、Bach1 欠損マウス (HO-1 高発現マウス) と野生型マウスの腸内環境の相違にはマクロファージの貪食能に依存しない別の機序が存在することが想定された。

#### (2) CO 溶解剤を用いた検討

CO による抗炎症効果・損傷治癒促進効果についても検討を行っており、マウス皮膚潰瘍モデルを用いた検討において、CO 投与により潰瘍部肉芽組織において VEGF 産生亢進を介した血管新生が促進され、潰瘍治癒促進作用がもたらされることを明らかにし、本成果については英文誌報告を行った。

また、ラット大腸潰瘍モデルを用いた CO 溶解液の注腸投与による大腸潰瘍治癒促進作用についても皮膚潰瘍の治癒機転と同様の血管新生を介した修復機構が存在すること、CO の大腸潰瘍治癒促進作用が既存薬剤 (5-アミノサリチル酸、ステロイド) の効果を凌駕するものであることを明らかにした。さらに、腸管上皮細胞のシグナル分子解析を行い、CO が Rho シグナルを活性化することにより、細胞遊走能を亢進させることを明らかにした。これらのことから、CO はこれらの多彩な作用機転を介して大腸潰瘍の治癒促進効果を発揮することが示され、本成果については英文誌報告を行った。

一方、CO 溶解剤の臨床応用を見据えて、CO 溶解液の注腸投与による CO 挙動・毒性発現についても検証を行い、CO 注腸後 5 分程度で大腸組織内 CO 濃度がピークを迎えること、血中 CO-Hb 濃度は 30 分程度でピークを迎えるものの、最大 CO-Hb 濃度は約 2.2%にとどまり、中毒 CO-Hb 濃度に至らないことを確認した。さらには、誤投与を想定した注腸投与（経肛門投与）以外の経口投与・腹腔内投与においても、最大 CO-Hb 濃度は 5%に達しないことを確認し、単回投与での安全性を確認した。

CO溶解剤安定性についても確認を行っており、安定性試験（40℃、6ヶ月の加速試験）において、想定規格（CO濃度変化 $\pm$ 5%以内）内の安定性が確認され、新規不純物も検出されないことを確認しており、臨床応用が期待される製剤型であることが確認された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Takagi T, Okayama T, Asai J, Mizushima K, Hirai Y, Uchiyama K, Ishikawa T, Naito Y, Itoh Y.	4. 巻 199
2. 論文標題 Topical application of sustained released-carbon monoxide promotes cutaneous wound healing in diabetic mice.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochem Pharmacol.	6. 最初と最後の頁 115016
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bcp.2022.115016.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takagi T, Okayama T, Asai J, Mizushima K, Hirai Y, Uchiyama K, Ishikawa T, Naito Y, Itoh Y.	4. 巻 199
2. 論文標題 Topical application of sustained released-carbon monoxide promotes cutaneous wound healing in diabetic mice.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochem Pharmacol.	6. 最初と最後の頁 115016
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bcp.2022.115016.	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 Katada K, Takagi T, Iida T, Ueda T, Mizushima K, Fukui A, Okayama T, Kamada K, Uchiyama K, Ishikawa T, Naito Y, Itoh Y.	4. 巻 11
2. 論文標題 Role and Potential Mechanism of Heme Oxygenase-1 in Intestinal Ischemia-Reperfusion Injury.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Antioxidants.	6. 最初と最後の頁 559
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/antiox11030559.	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 Ushiroda C, Takagi T, Fuke N, Mizushima K, Hirai Y, Higashimura Y, Harusato A, Kamada K, Uchiyama K, Ishikawa T, Aizawa K, Suganuma H, Itoh Y, Naito Y.	4. 巻 33
2. 論文標題 Lycopene intake induces colonic regulatory T cells in mice and suppresses food allergy symptoms.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Pediatr Allergy Immunol.	6. 最初と最後の頁 e13691
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/pai.13691.	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 Takagi T, Naito Y, Higashimura Y, Uchiyama K, Okayama T, Mizushima K, Katada K, Kamada K, Ishikawa T, Itoh Y.	4. 巻 107
2. 論文標題 Rectal administration of carbon monoxide inhibits the development of intestinal inflammation and promotes intestinal wound healing via the activation of the Rho-kinase pathway in rats.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nitric Oxide.	6. 最初と最後の頁 19-30
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.niox.2020.12.006.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 185高木智久、内山和彦、堅田和弘、内藤裕二。
2. 発表標題 新規治療分子としてのCOの可能性～微小循環研究の知見から～。
3. 学会等名 第47回日本微小循環学会総会・シンポジウム1「歯科、消化器、微小循環研究の新展開」
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高木智久、内山和彦、鎌田和浩、内藤裕二
2. 発表標題 腸管炎症病態における抗酸化酵素Heme oxygenase-1の役割とその生成物Carbon monoxideの新規治療分子としての可能性
3. 学会等名 第20回日本抗加齢医学会総会
4. 発表年 2020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	内藤 裕二  (Naito Yuji)  (00305575)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・教授    (24303)	

6. 研究組織（つづき）

	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	内山 和彦  (Uchiyama Kazuhiko)  (50298428)	京都府立医科大学・医学（系）研究科（研究院）・講師    (24303)	
研究分担者	堅田 和弘  (Katada Kazuhiro)  (60593910)	京都府立医科大学・医学（系）研究科（研究院）・准教授    (24303)	

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