

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年4月20日現在

機関番号：13301
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2009～2011
 課題番号：21590613
 研究課題名（和文） 生体侵襲時におけるヘムオキシゲナーゼ-1 を介する血栓形成制御機構の解明
 研究課題名（英文） Investigation of antithrombotic effects of heme oxygenase-1 on the hypercoagulable state by inflammation or oxidative stress
 研究代表者
 森下 英理子（MORISHITA ERIKO）
 金沢大学・保健学系・准教授
 研究者番号：50251921

研究成果の概要（和文）：ヘムオキシゲナーゼ-1（HO-1）が、単球あるいは血管内皮細胞における血液凝固・線溶系因子の産生を調節し抗血栓作用を有するかどうかについて検討した。その結果、HO-1 代謝産物である一酸化炭素ならびに HO-1 の発現を誘導するクルクミンをあらかじめ投与しておく、炎症刺激による組織因子やプラスミノゲンアクチベーター・インヒビターの発現増加を抑制し、血栓傾向を阻止することを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：The purpose of the present study was to examine the antithrombotic role of heme oxygenase-1 (HO-1) in detail, and to examine whether endothelial HO-1 induced by curcumin or carbon monoxide (CO) endogenously produced by HO-1 contributes to this antithrombotic effect. As a result, CO or endothelial HO-1 induced by curcumin would be effective for the prevention and treatment of hypercoagulable state by inflammation or oxidative stress.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011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：血栓止血学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

キーワード：ヘムオキシゲナーゼ 1、血栓、組織因子、プラスミノゲンアクチベーター・インヒビター、一酸化炭素、クルクミン

1. 研究開始当初の背景

ヘムオキシゲナーゼ (heme oxygenase;HO) は、ヘモグロビンの構成成分であるヘムの分

解に関わる酵素であると同時に、細胞を酸化ストレスによる傷害から守る細胞保護蛋白としても注目されている。HO の異なる3つのアイソザイムのうち HO-1 は、細胞毒である

ヘムをビリベルジン、一酸化炭素 (CO) ならびに遊離鉄に直接分解することにより、細胞傷害を防いでいると考えられている。

Poss、利根川らのグループは HO-1 ノックアウトマウスを作成し、酸化ストレスによって集積した細胞内遊離鉄の排除と再利用の障害が重要であると報告した。しかし、われわれが以前経験した世界第一例の「HO-1 欠損症」患児に認められた所見は、広範な生体防御機構の機能異常と遷延性炎症、著明な血栓形成による多臓器不全であった (Yachie A, et al; J Clin Invest, 1999)。患児に見られた細胞傷害は全ての臓器や細胞に見られたわけではなく、血管内皮、単球および腎尿管上皮など、特定の細胞や臓器に集中して観察された。患児単球は形態異常とともに表面抗原の発現低下による食能の低下も示し、HO-1 欠損は単球の機能異常をきたすことも発見した (Yachie A, et al; Exp Biol Med, 2003)。また、剖検所見からは小血管レベルの血栓形成が数多く認められた (Kawashima, et al; Hum Pathol, 2002)。このように、HO-1 ノックアウトマウスと欠損症患者を比較して注目すべき点は、ノックアウトマウスでは単球の機能異常、凝固・線溶系の異常や血管内皮傷害についての明確な記載がない点である。

さらに、HO-1 は末梢白血球の中で単球にのみ選択的に産生が誘導されることを見出した (Yachie A, et al; Exp Biol Med, 2003)。一方、単球はサイトカイン、エンドトキシンなどのストレス刺激により組織因子 (TF)、プラスミノゲンアクチベータ・インヒビター-1 (PAI-1) などの凝固・線溶系関連因子が発現し、血中や動脈硬化病変における血栓形成に重要な役割を果たすことが報告されている。

以上のことより、HO-1 欠損患者に特徴的な症状および検査所見と、さらには HO-1 と単球機能との密接な関連性を考え合わせると、HO-1 は単球あるいは血管内皮細胞上の血液凝固・線溶系因子の産生を調節し血栓形成を阻害する機能を有することが予想される。特に、最近 HO-1 が CO 産生を介して、MAP キナーゼ系による炎症性サイトカインの産生制御に直接関わっていることを示す報告がなされており、HO-1/CO が凝固・線溶系因子の発現調節も行っている可能性が考えられるが、その機序については今までのところ国内外において検討されていない。

2. 研究の目的

今回の研究の目的は、(1) HO-1 欠損患者末梢血単球より作成した Epstein-Barr ウイルス形質変換 B 細胞 (lymphoblastoid cell line,

LCL)、あるいは健常者末梢血単球および血管内皮細胞に様々なストレス刺激 (ヘム、TNF- α) を加え、HO-1 が凝固・線溶系因子の発現調節に及ぼす影響を *in vitro* で明らかにするとともに、(2) エンドトキシン刺激を加えたラットに HO-1 代謝産物である CO 放出剤を投与し、血中の凝固線溶系マーカーや肝・腎におけるフィブリン形成や凝固・線溶系因子の発現を評価することにより、HO-1 の血栓形成制御機構を *in vivo* においても検証することを目指した。

3. 研究の方法

(1) EB ウイルス形質転換 B 細胞株 (LCL) における検討

① LCL の樹立

正常対照ならびに HO-1 欠損患者の末梢血から単球分画を分離回収し、B95-8 細胞株培養上清を添加して LCL を樹立した。さらに、限界希釈法によりクローニングした。

② ヘミン添加が HO-1、TF、PAI-1 発現に及ぼす影響

健常者由来 LCL ならびに HO-1 欠損症患者由来 LCL に、酸化ストレスであるヘミンを添加し、6 時間培養後、HO-1 および凝固・線溶系因子の発現を以下の方法にて測定し、比較検討した。

(a) HO-1 : mRNA 発現量は RT-PCR、LCL 細胞内蛋白質量はウエスタンブロッティング (WB) にて測定した。

(b) 凝固・線溶系因子 : TF・PAI-1 mRNA 発現量は RT-PCR、蛋白発現量は WB にて測定した。

③ HO-1 遺伝子導入による TF、PAI-1 発現つぎに、HO-1 欠損症患者由来 LCL にヒト HO-1 遺伝子を導入後、ヘミン添加を行い、HO-1 発現が TF、PAI-1 の発現調節に関与するかどうか検討した。

(2) ヒト血管内皮細胞 (HUVEC) あるいはヒト単球を用いた研究

① クルクミン添加による HO-1 や凝固・線溶系因子への影響の検討

クルクミン 15 μ g/ml を HUVEC あるいは単球に添加し培養後、HO-1、血液凝固活性化因子である TF、PAI-1 の mRNA と蛋白発現量を定量した。次に、炎症性サイトカインである TNF- α 10 ng/ml を HUVEC あるいは単球に投与すると、TF や PAI-1 は著増し血栓傾向になるが、クルクミンの前投与がその血栓傾向を軽減するかについて、TF、PAI-1 などの mRNA 蛋白発現量を測定し検討した。さらに、HO-1 活性阻害剤である Tin proto-porphyrin IX (SnPP) を同時に投与し、TF、PAI-1 発現への影響を検討した。

② HO-1 代謝産物 CO による凝固・線溶系因子への影響の検討

CO 供与体である Dichlorotricarbonyl-ruthenium(II) dimer (CORM-2) を HUVEC に添加し、TF、PAI-1 mRNA および蛋白発現を定量した。さらに、CORM-2 をあらかじめ添加した後 TNF- α 10 ng/ml を添加し、TF、PAI-1 の VII 現抑制効果について検討した。

③ HUVEC におけるクルクミン、CO 添加による細胞内シグナル伝達系の解析

(a) クルクミンあるいは CORM をあらかじめ添加しておき、TNF- α 刺激 10 分、30 分、1 時間後の細胞内シグナル伝達系 p38MAPK、ERK1/2、JNK について、WB にて検討した。

(b) 次に、各種 MAPK インヒビター (SB203580: p38MAPK inhibitor, U-0126: ERK1/2 inhibitor, SP60012: JNK inhibitor) 10 ng/ml をそれぞれ添加し、TNF- α で刺激後 TF、PAI-1 蛋白の発現を WB にて検討した。

(c) クルクミンをあらかじめ添加しておき TNF- α で刺激後、細胞質と核を分離し細胞質内の I κ B- α の活性化ならびに核内への NF κ -B の移行を WB にて検討した。

(3) リポポリサッカライド (LPS) 誘発ラット敗血症 DIC モデルを用いた検討

① クルクミン投与による各種臓器での HO-1 誘導

Wister ラットにクルクミンを経静脈的に投与し、肝臓、腎臓、肺における HO-1 mRNA の発現量を検討した。

② LPS 誘発敗血症 DIC モデルラットに対するクルクミンあるいは CO 投与の影響
ラットにあらかじめ、クルクミンあるいは CO を前投与しておき、LPS を投与後血液と肝臓、腎臓、肺を採取し、血液では血算、凝固線溶系マーカー、肝腎機能、各種臓器では TF、PAI-1 などの mRNA 発現量を検討した。

4. 研究成果

(1) EB ウイルス形質転換 B 細胞株 (LCL) における検討

① 健常者由来 LCL ならびに HO-1 欠損症患者由来 LCL (HO-1 欠損 LCL) にヘミンを添加すると、HO-1 欠損 LCL では全く HO-1 mRNA は検出されなかった。

一方、HO-1 欠損 LCL は健常者由来 LCL に比較して、TF、PAI-1 mRNA 発現が有意に増加し、蛋白発現も同様の結果であった。

② HO-1 欠損 LCL にヒト HO-1 遺伝子を導入すると、ヘミン添加による TF、PAI-1 の mRNA・蛋白の増加が有意に抑制された (それぞれ $P < 0.05$) (図 1)。以上の結果より、HO-1 が TF および PAI-1 の発現調節に関与していることが示唆された。

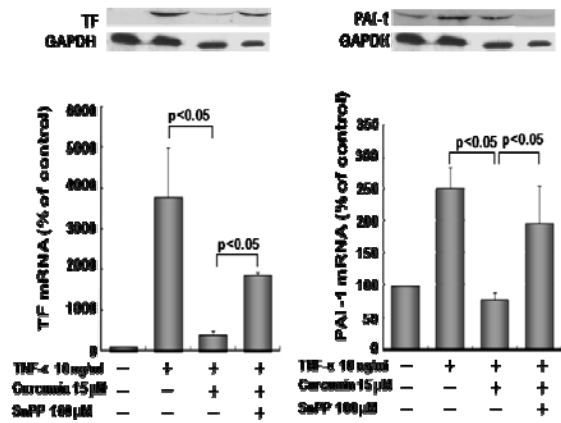


図 1. HO-1 遺伝子導入 LCL における TF、PAI-1 発現

(2) HUVEC および単球を用いた研究

① HUVEC にクルクミンを添加すると、HO-1 発現が著明に増加した。一方、TNF- α 単独刺では TF mRNA は著増、PAI-1 mRNA も 2.5 倍有意に増加したが、あらかじめクルクミンを添加しておくと TF mRNA は 1/10 程度に、PAI-1 mRNA は 1/3 程度に有意に増加が抑制された (それぞれ $P < 0.05$) (図 2)。さらに、HO-1 活性阻害剤 SnPP を同時に添加すると、再び TF、PAI-1 の増加が確認された (図 2)。

(2) 次に、HUVEC に CORM-2 のみを添加したところ、TF、PAI-1 発現はほとんど変化を示さ

なかった。一方、TNF- α を添加すると、TF、PAI-1 は有意に増加するが、CORM-2 をあらかじめ添加しておくと、TNF- α 単独添加に比べて TF mRNA は約 60%、PAI-1 mRNA は約 70% 増加が抑制され ($p < 0.05$)、タンパクも同様の結果を示した。

HUVEC で認められた同様の結果が、単球を用いた実験においても示された。

以上の①②の結果より、クルクミンおよび CO は、炎症で惹起される血管内皮細胞上あるいは単球における血栓傾向を改善する可能性が示された。

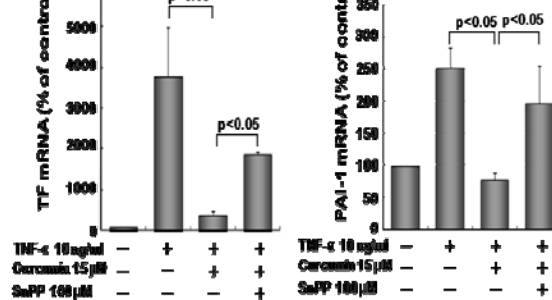


図 2. クルクミンが HUVEC における TF、PAI-1 発現におよぼす影響

③ HUVEC を TNF- α で刺激すると、10 分後に p-38MAPK と JNK が、30 分後に ERK1/2 が活性化されるが、あらかじめ CORM あるいはクルクミンを投与しておく、p-38MAPK、ERK、JNK の活性化が抑制された。(図 3)

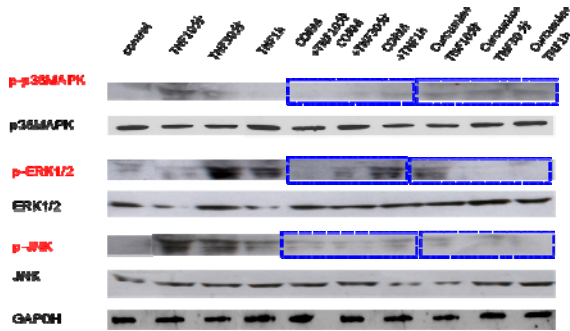


図 3. HUVEC におけるクルクミン、CORM 添加による細胞内シグナル伝達系の解析

次に、各種 MAPK インヒビターを添加し、TNF- α 刺激後の TF 蛋白発現を検討したところ、p38 MAPK インヒビターあるいは JNK インヒビター添加にて TF 発現が抑制された。一方、PAI-1 発現は、p38 MAPK、ERK1/2、JNK のそれぞれのインヒビターにより抑制された(図 4)。したがって、TF の発現調節には p38 MAPK、JNK が、PAI-1 の発現調節には p38 MAPK、ERK1/2、JNK が関与していることが示唆された。

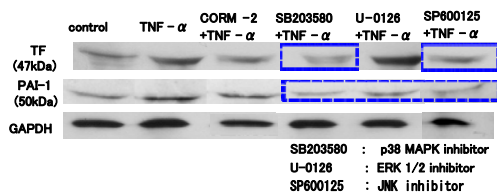


図 4. TNF- α 刺激 HUVEC における MAPK インヒビターの TF, PAI-1 発現への影響

HUVEC を TNF- α で刺激すると、細胞質内で I κ B- α が活性化され核内に NF- κ B が移行し NF- κ B レスポンス蛋白の DNA 合成が開始される。一方、クルクミンをあらかじめ添加しておく、I κ B- α の活性化が阻止され、NF- κ B の核内移行が阻害された(図 5)。

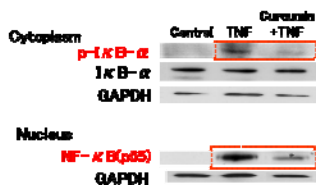


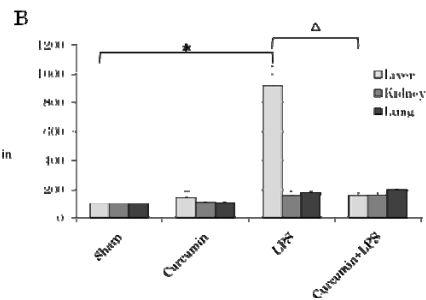
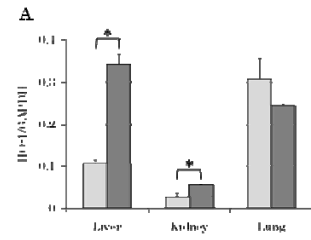
図 5. クルクミン添加が NF- κ B の核内移行におよぼす影響

上記の結果より、クルクミンおよび CORM は p38MAPK、ERK1/2、JNK の抑制および NF- κ B の核内移行阻害により TF、PAI-1 発現を抑制

していることが示された。

(3) LPS 誘発ラット敗血症 DIC モデルを用いた検討

① ラットに対してクルクミンを投与すると、肝臓、腎臓において HO-1 mRNA の有意な増加が認められた (p<0.05) が、肺では有意な変化は認められなかった(図 4A)。



血清クレアチニン、クルクミン投与群は、LPS 投与群と比較して有意な改善を認めなかったが、血清 ALT

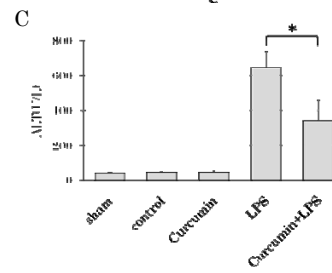


図 6. LPS 誘発ラット敗血症 DIC モデルにおけるクルクミンの効果

と比較してクルクミンを前投与した場合に有意な低下が認められた (p<0.05) (図 4C)。

以上の結果より、クルクミンの前投与は、炎症惹起後の肝機能の改善に有効であることが示された。

(4) 今後の展開

クルクミンおよび代謝産物の CORM には、抗血栓作用があることが今回の検討で示されたが、今後の展開としては、①クルクミンの動脈硬化性血栓性疾患の予防効果の検討、②クルクミン、CORM の体内への有効な摂取方法の検討、が必要である。クルクミンは、吸収効率が悪い、吸収効率の良い剤型の開発が必要であり、その点に関しては薬学系の分野との共同研究が必要である。一方 CORM は気体であり、吸入以外に経静脈的あるいは経口的に投与可能かどうか、毒性との関連の検討が必要となってくる。将来的には、サプリメント的に、抗血栓予防薬としてクルクミンあるいは CORM を利用できることを目指したい。

さらに、我々は骨髄幹細胞移植においてド

ナーの HO-1 濃度に影響するポリモルフィズムの違いによって、移植後合併症発現率が異なることを明らかにしている。今後、移植前に HO-1 濃度を増加させておくことが、移植合併症の軽減に寄与するかどうかについても検討したい。

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 12 件)

- ① Hayashi T, Kadohira Y, Morishita E, et al, A case of acquired FXIII deficiency with severe bleeding symptoms, Haemophilia, in press, 査読有
- ② Maruyama K, Kadono T, Morishita E, Plasma levels of platelet-derived microparticles are increased after anaerobic exercise in healthy subjects, J Atheroscler Thromb, in press, 査読有
- ③ Tsuda T, Jin X, Tsuda H, Ieko M, Morishita E, et al, New quantitative total protein S assay system for diagnosing protein S type II deficiency -clinical application of the screening system for protein S type II deficiency, Blood Coagul Fibrinolysis, 23(2012), 56-63, 査読有
- ④ Maruyama K, Morishita E, et al, Plasma levels of platelet-derived microparticles in patients with obstructive sleep apnea syndrome. J Atheroscler Thromb, 19(2012), 98-104, 査読有
- ⑤ Kawai T, Yachie A, et al, Multiple reversions of an IL2RG mutation restore T cell function in an X-linked severe combined immunodeficiency patient, J Clin Immunol, 30(2012), 査読有
- ⑥ Shimizu M, Yachie A, et al, Tocilizumab masks the clinical symptoms of systemic juvenile idiopathic arthritis-associated macrophage activation syndrome: the diagnostic significance of interleukin-18 and interleukin-6, Cytokine, 58(2012), 287-294, 査読有
- ⑦ Sekiya A, Morishita E, et al, Two case reports of inherited antithrombin deficiency: a novel frameshift mutation and a large deletion including all seven exons detected using two methods, Int J Hematol, 93(2011), 216-219, 査読有
- ⑧ Maeda A, Yachie A, et al, Effects of antithrombin III treatment in vascular in vascular injury model of mice, Pediatr Int, 53(2011), 747-753, 査読有
- ⑨ Radhakrishnan N, Yachie A, et al, Human heme oxygenase-1 deficiency presenting with hemolysis, nephritis, and asplenia, J Pediatr Hematol Oncol, 33(2011), 74-78, 査読有
- ⑩ Shimizu M, Yachie A, et al, Distinct cytokine profiles of systemic-onset juvenile idiopathic arthritis-associated macrophage activation syndrome with particular emphasis on the role of interleukin-18 in its pathogenesis, Rheumatology, 49(2010), 1645-1653, 査読有
- ⑪ Hayashi T, Morishita E, et al, Expression of annexin II in experimental abdominal aortic aneurysms, Int J Hematol, 90(2009), 336-342, 査読有
- ⑫ Kurosawa H, Morishita E, et al, Hemostatic management of surgery for imperforate anus in a patient with 13q deletion syndrome with combined deficiency of factors VII and X, Hemophilia, 15(2009), 398-400, 査読有

[学会発表] (計 8 件)

- ① Morishita E, Maruyama K, Takami A, et al, A genetic variation in the heme oxygenase-1 gene predicts the outcome of HLA-fully-matched unrelated bone marrow transplantation, 53rd American Society of Hematology Annual Meeting, 2011.12.10-13, San Diego Convention Center (USA)
- ② Maruyama K, Morishita E, Goto Y, et al, Curcumin prevents cytokine-mediated tissue factor pathway inhibitor down-regulation in human endothelial cells, 53rd American Society of Hematology Annual Meeting, 2011.12.10-13, San Diego Convention Center (USA)
- ③ Maruyama K, Morishita E, Torishima H, et al, Effects of fluvastatin on the expression of tissue factor pathway inhibitor in human umbilical vein endothelial cells, 53rd American Society of Hematology Annual Meeting, 2011.12.10-13, San Diego Convention Center (USA)
- ④ Morishita E, Torishima H, Maruyama K, et al, Effects of fluvastatin on the

expression of tissue factor pathway inhibitor in human umbilical vein endothelial cells, XXIII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, 2011.7.23-28, Kyoto International Conference Center (Kyoto)

- ⑤ Sekiya A, Morishita E, Maruyama K, et al, Two cases of type I protein S deficiency: Gene analysis and in vitro expression studies of mutant proteins, XXIII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, 2011.7.23-28, Kyoto International Conference Center (Kyoto)
- ⑥ Maruyama K, Morishita E, Yuno T, et al, Carbon monoxide-releasing molecule-derived co-regulates tissue factor in human endothelial cells and peripheral blood mononuclear cells, XXIII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, 2011.7.23-28, Kyoto International Conference Center (Kyoto)
- ⑦ Morishita E, Maruyama K, Asakura H, Ohtake S, Yachie A, Nakao S, Curcumin down-regulates cytokine-mediated tissue factor and plasminogen activator type 1 expression in human endothelial cells, 52nd American Society of Hematology Annual Meeting, 2010.12.4-7, Orange Convention Center (USA)
- ⑧ Maruyama K, Morishita E, Ohtake S, Yachie A, Nakao S, Carbon monoxide-releasing molecule-derived CORM regulates tissue factor, plasminogen activator inhibitor type 1, and thrombomodulin production by human endothelial cells, 52nd American Society of Hematology Annual Meeting, 2010.12.4-7, Orange Convention Center (USA)

[図書] (計5件)

- ① 森下英理子, 南江堂, わかりやすい血栓と止血の臨床: 血液凝固異常症の臨床と検査-血栓性素因の診断, 2011年, 284頁
- ② 森下英理子, 中外医学社, EBM 血液疾患の治療 2010-2011: von Willebrand 病に対する治療は?, 2011年, 454頁~458頁
- ③ 森下英理子, シスメックス, 血栓性素因と臨床検査, 2011年, 1頁~14頁
- ④ 森下英理子, メディックメディア, 抗リン脂質抗体症候群. 医療情報科学研究所 (編集) イヤーノート TOPICS 2012 第1

版, 2011年, 183頁~184頁

- ⑤ 森下英理子, 北國新聞社, 鼻血が出たら (下). 北國新聞社編集局編. 一丈夫がいね 血液の健康学—健康 BOOK シリーズ 16, 2009年, 58頁~59頁

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森下 英理子 (MORISHITA ERIKO)
金沢大学・保健学系・准教授
研究者番号: 50251921

(2) 研究分担者

谷内江 昭宏 (YACHIE AKIHIRO)
金沢大学・医学系・教授
研究者番号: 40210281

(3) 連携研究者

なし