

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 25 年 6 月 10 日現在

機関番号：24303
 研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2010 年度～2012 年度
 課題番号：22590706
 研究課題名（和文）
 一酸化炭素による腸管炎症制御・粘膜損傷治癒効果の分子機構解明
 研究課題名（英文）
 The effect of carbon monoxide in the intestinal inflammation
 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）・講師
 研究者番号：70405257

研究成果の概要（和文）：

潰瘍性大腸炎やクローン病などの難治性炎症性腸疾患に対する新規治療法の開拓を課題として、一酸化炭素(Carbon monoxide: CO)による腸管炎症抑制効果・粘膜治癒促進効果を検証した。まず、安全かつ安定なCO供給源として、高濃度CO (50%)をバブリングすることにより溶解液を作成し、実験動物（ラット・マウス）を対象としてCO溶解液を経肛門的投与した。本投与方法ではCO中毒は惹起されず、COの毒性を克服しうる安全性の高い投与方法であることを明らかにした。さらに、ラット実験腸炎モデルを用いた検討において、CO溶解液の経肛門的投与により、大腸炎の発症・進展が抑制されることを見出した。また、大腸炎発症後にCO溶解液を投与する治療実験においても大腸粘膜損傷治癒が促進されることを明らかにし、この粘膜損傷治癒促進効果にはCOによる腸管上皮細胞の遊走促進作用が関与することを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

An abundance of recent data on the cytoprotective and anti-inflammatory effect of carbon monoxide (CO) supports that CO is a promising therapeutic gas for various diseases. In the present study, we investigated whether the enema with CO-saturated saline as a novel therapeutic strategy was effective against intestinal inflammation. CO-saturated solution was made by bubbled 50% CO gas into saline. In results, the intrarectal administration of CO-saturated solution ameliorated TNBS-induced colitis and accelerated the healing of the colonic ulceration. Moreover, CO-saturated medium enhanced the migration of intestinal epithelial cells. Thus, the rectal administration of CO-saturated solution protected from the intestinal inflammation and accelerated the colonic ulcer healing. Based on these data, CO may represent a novel therapeutic approach for the treatment of inflammatory bowel disease.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・下部消化管学（小腸・大腸）

キーワード：一酸化炭素、潰瘍性大腸炎、クローン病、炎症性腸疾患、抗炎症作用、粘膜治癒

1. 研究開始当初の背景

ガスバイオロジー、特に CO による病態改善効果に関しては、肺障害、心筋傷害、小腸移植、腎移植などの実験動物モデルにおいて CO 吸入による抗炎症・臓器保護効果が明らかにされ、多岐にわたる病態における効果が検証されている。国内からも、心虚血再灌流障害モデルや肝移植モデルでの CO による病態改善効果に関する報告があり、我々も関節炎モデル(Takagi T. Inflammation. 2009)が CO によって炎症病態が改善することを報告してきた。今回の研究課題である腸管炎症に対しても、IL-10 欠損大腸炎モデルにおいて CO 曝露が腸炎抑制効果を示すことが報告されており、強力な抗炎症効果を有する CO の臨床応用が期待されている。

我々は継続して腸管炎症における CO の治療効果を検討し、臨床応用を模索しており、平成 18-19 年度科学技術研究費補助金(基盤 C:課題番号 18590694)において、「一酸化炭素(CO)ガス吸入・曝露装置の開発と実験腸炎におけるその有用性」に関して検討を行った。本検討は、現在でも病因が解明されておらず難治性・再発性を示すヒト炎症性腸疾患患者(潰瘍性大腸炎・クローン病)をはじめとした炎症性腸疾患に対する革新的な新規治療法の開発の試みとして CO 吸入曝露装置を開発し、CO ガス吸入療法の効果を検討した。その結果、自作した CO 曝露装置を用いて、1000ppmCO ガスを純空気で分割希釈することによる独自の投与濃度調節システムを確立し、持続的に安定した一定濃度の CO ガス曝露が可能になった。本装置を用いたマウス実験腸炎における検討において CO が強力な抗炎症効果を有することを明らかにし、この抗炎症効果は大腸粘膜内の好中球浸潤や炎症性サイトカイン(TNF- α , IFN- γ)産生の抑制によりもたらされることを証明した。また、他の炎症性疾患として慢性関節リウマチモデルにおいても同様の効果を見出し報告してきた(Takagi T. Inflammation. 2009)。

我々はこれらの研究に先んじて、ストレス応答蛋白である HO-1 が腸炎の発症とともに大腸粘膜に発現誘導され大腸炎症粘膜に対して保護的に作用し (Takagi T. APT. 2006)、この大腸粘膜保護作用には HO-1 から誘導される CO が重要な役割を担っていることを明らかにしており(Takagi T. JGH. 2009)、CO の重要性に着目するに至った。

2. 研究の目的

上述のような背景から、COの強力な抗炎症効果に着目し、COによる腸管炎症制御を目標として本研究課題を提案した。これまでにCOガス吸入曝露により腸管炎症が抑制されるこ

とを示してきたが、COガスは生体における治療閾と中毒閾が近接しており、COガス吸入療法は安全性が担保された治療法としては課題が残る。そこで、本研究では全身投与であるCOガス吸入曝露ではなく、より安全に炎症局所に到達可能なCO投与法の構築・改良を目指すこととした。既に予備的検討を行っている自作したCO溶解液を用いた注腸投与では血中CO濃度上昇を来さないことが示唆されており、有力な候補と考えられる。

本研究の目的は、副作用なく炎症局所に到達可能な CO の Delivery System を構築し、その腸管炎症制御・粘膜治癒促進効果の評価を行い、さらには詳細な分子機構を解明し臨床応用可能な新規治療法への発展を目指していくことである。

3. 研究の方法

本研究課題では、下記の研究計画を立案し実施するものとした。

- ① 研究計画 1 : 安全・安定な CO 供給源としての CO 溶解液作成法の確立
- ② 研究計画 2 : CO 溶解液投与時の生理的变化に関する検討
- ③ 研究計画 3 : CO(局所)投与による実験腸炎における有用性の評価
- ④ 研究計画 4 : CO による各種細胞株を用いた炎症制御、損傷治癒促進効果に関する検討

4. 研究成果

- ① 安全かつ安定な CO 供給源として、高濃度 CO (50%)をバブリングによって封入した溶解液を作成した。実験動物(ラット/マウス)を用いた検討において、CO 溶解液の経肛門的投与により血中 CO 濃度は影響を受けないことが明らかにし、CO 溶解液の経肛門的投与が毒性を克服しうる安全性の高い投与方法であることを明確にした。
- ② クローン病類似モデルであるラット Trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS)腸炎モデルを用いた検討において、上述の CO 溶解液を経肛門的に投与することにより大腸粘膜内の炎症性サイトカイン産生や好中球浸潤を抑制することにより TNBS 腸炎の発症・進展が抑制されることを見出した。また、TNBS 腸炎発症後に CO 溶解液を投与する治療実験においても大腸粘膜損傷治癒が促進されることを明らかにした。
- ③ CO による粘膜損傷治癒促進効果に関する分子機構の解明にも取り組み、ラット正常腸管上皮細胞株を用いた wound healing assay では、CO 溶解培養液下で腸管上皮細胞の遊走促進作用がもたらされ、CO が損傷

治癒に寄与することを明らかにした。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 14 件)

1. Harusato A, Naito Y, Takagi T, Uchiyama K, Mizushima K, Hirai Y, Higashimura Y, Katada K, Handa O, Ishikawa T, Yagi N, Kokura S, Ichikawa H, Muto A, Igarashi K, Yoshikawa T. BTB and CNC homolog 1 (Bach1) deficiency ameliorates TNBS colitis in mice: Role of M2 macrophages and heme oxygenase-1. **Inflamm Bowel Dis**. 2013 Mar-Apr;19(4):740-53. doi: 10.1097/MIB.0b013e3182802968. 査読有.
2. Aoi W, Naito Y, Takagi T, Tanimura Y, Takanami Y, Kawai Y, Sakuma K, Hang LP, Mizushima K, Hirai Y, Koyama R, Wada S, Higashi A, Kokura S, Ichikawa H, Yoshikawa T. A novel myokine, secreted protein acidic and rich in cysteine (SPARC), suppresses colon tumorigenesis via regular exercise. **Gut**. 2013 Jun;62(6):882-9. doi: 10.1136/gutjnl-2011-300776. Epub 2012 Jul 31. 2013 Mar-Apr;19(4):740-53. doi: 10.1097/MIB.0b013e3182802968. 査読有.
3. Higashimura Y, Naito Y, Takagi T, Mizushima K, Hirai Y, Harusato A, Ohnogi H, Yamaji R, Inui H, Nakano Y, Yoshikawa T. Oligosaccharides from agar inhibit murine intestinal inflammation through the induction of heme oxygenase-1 expression. **J Gastroenterol**. 2012 Nov 28. [Epub ahead of print] (<http://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2Fs00535-012-0719-4.pdf>) 査読有.
4. Takagi T, Naito Y, Uchiyama K, Okuda T, Suzuki T, Tsuboi H, Mizushima K, Handa O, Yagi N, Ichikawa H, Yoshikawa T. Colonic insufflation with carbon monoxide gas inhibits the development of intestinal inflammation in rats. **Med Gas Res**. 2012 Sep 3;2(1):23. doi: 10.1186/2045-9912-2-23. 査読有.
5. Takagi T, Naito Y, Okada H, Takaoka M, Oya-Ito T, Yamada S, Hirai Y, Mizushima K, Yoshida N, Kamada K, Katada K, Uchiyama K, Ishikawa T, Handa O, Yagi N, Konishi H, Kokura S, Ichikawa H, Yoshikawa T. Hemopexin is upregulated in rat intestinal mucosa injured by indomethacin. **J Gastroenterol Hepatol**. 2012 Apr;27 Suppl 3:70-5. doi: 10.1111/j.1440-1746.2012.07076.x. 査読有.
6. Naito Y, Uchiyama K, Takagi T, Yoshikawa T. Therapeutic potential of carbon monoxide (CO) for intestinal inflammation. **Curr Med Chem**. 2012;19(1):70-6. Review. (<http://www.eurekaselect.com/75561/article>) 査読有.
7. Takagi T, Naito Y, Uchiyama K, Okuda T, Mizushima K, Suzuki T, Handa O, Ishikawa T, Yagi N, Kokura S, Ichikawa H, Yoshikawa T. Rebamipide promotes healing of colonic ulceration through enhanced epithelial restitution. **World J Gastroenterol**. 2011 Sep 7;17(33):3802-9. doi: 10.3748/wjg.v17.i33.3802. 査読有.
8. Takagi T, Naito Y, Uchiyama K, Suzuki T, Hirata I, Mizushima K, Tsuboi H, Hayashi N, Handa O, Ishikawa T, Yagi N, Kokura S, Ichikawa H, Yoshikawa T. Carbon monoxide liberated from carbon monoxide-releasing molecule exerts an anti-inflammatory effect on dextran sulfate sodium-induced colitis in mice. **Dig Dis Sci** 2011 Jun;56(6):1663-71. doi: 10.1007/s10620-010-1484-y. Epub 2010 Nov 18. 査読有.
9. Harusato A, Naito Y, Takagi T, Uchiyama K, Mizushima K, Hirai Y, Yamada S, Tuji T, Yoriki H, Horie R, Inoue K, Fukumoto K, Handa O, Ishikawa T, Kokura S, Minamiyama Y, Ichikawa H, Muto A, Igarashi K, Yoshikawa T. Suppression of indomethacin-induced apoptosis in the small intestine due to Bach1 deficiency. **Free Radic Res**. 2011 Jun;45(6):717-27. doi: 10.3109/10715762.2011.574287. Epub 2011 Apr 8. Erratum in: **Free Radic Res**. 2012 Nov;46(11):1420-1. 査読有.
10. Naito Y, Takagi T, Uchiyama K, Yoshikawa T. Heme oxygenase-1: a novel therapeutic target for gastrointestinal diseases. **J Clin Biochem Nutr**. 2011 Mar;48(2):126-33. doi: 10.3164/jcbrn.10-61. Epub 2011 Feb 26. 査読有.
11. Hirata I, Naito Y, Takagi T, Mizushima K, Suzuki T, Omatsu T, Handa O, Ichikawa H, Ueda H, Yoshikawa T. Endogenous hydrogen sulfide is an anti-inflammatory molecule in dextran sodium sulfate-induced colitis in mice. **Dig Dis Sci**. 2011 May;56(5):1379-86. doi: 10.1007/s10620-010-1461-5. Epub 2010 Oct 28. 査読有.
12. Takagi T, Naito Y, Mizushima K, Akagiri S, Suzuki T, Hirata I, Omatsu T, Handa O, Kokura S, Ichikawa H, Yoshikawa T. Inhalation of carbon monoxide ameliorates TNBS-induced colitis in mice through the inhibition of TNF-alpha expression. **Dig Dis Sci** 55: 2797-2804, 2010. doi: 10.1007/s10620-009-1112-x. Epub 2010 Jan 22. 査読有.
13. Takagi T, Naito Y, Uchiyama K, Yoshikawa T. The role of heme oxygenase and carbon monoxide in inflammatory bowel disease. **Redox Rep**. 2010;15(5):193-201. doi: 10.1179/174329210X12650506623889.

Review. 査読有.

14. Uchiyama K, Naito Y, Takagi T, Mizushima K, Hayashi N, Harusato A, Hirata I, Omatsu T, Handa O, Ishikawa T, Yagi N, Kokura S, Yoshikawa T. Carbon monoxide enhance colonic epithelial restitution via FGF15 derived from colonic myofibroblasts. **Biochem Biophys Res Commun**. 2010 Jan 1;391(1):1122-6. doi: 10.1016/j.bbrc.2009.12.035. Epub 2009 Dec 11. 査読有.

[学会発表] (計 5 件)

- 1, Takagi T, Naito Y, Uchiyama K, Okuda T, Hirata I, Omatsu T, Mizushima K, Hayashi N, Handa O, Ishikawa T, Yagi N, Kokura S, Yoshiakwa T. Carbon monoxide (CO)-saturated sodium enema ameliorates trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis in rats. The 6th International Conference on the Biology, Chemistry, and Therapeutic Applications of Nitric Oxide. 2010 June 14; Kyoto.
- 2, Takagi T, Naito Y, Harusato A, Yamada S, Fukumoto K, Inoue K, Horie R, Mizushima K, Omatsu T, Hirata I, Yoshida N, Uchiyama K, Uchiyama K, Ishikawa T, Handa O, Konishi H, Wakabayashi N, Yagi N, Kokura S, Ichikawa H, Muto A, Igarashi K, Yoshikawa T. The role of BACH1 in Dextran Sodium Sulfate (DSS)-Induced Colitis in Mice. The 111th Annual Meeting of the AGA Institute. Digestive Disease Week. 2010. 2010 May 2; New Orleans, USA.
- 3, 高木智久, 内藤裕二, 春里暁人, 辻 俊史, 寄木浩行, 堀江隆介, 内山和彦, 堅田和弘, 水島かつら, 平井泰子, 半田 修, 八木信明, 市川 寛, 武藤哲彦, 五十嵐和彦, 吉川敏一. シンポジウム 1「炎症性腸疾患の免疫病態 -Bench&Bedside-」 Heme oxygenase-1 発現制御性転写因子 Bach1 の抑制は腸管炎症を改善する. 第 48 回日本消化器免疫学会総会. 2011 7. 21-22; 金沢
- 4, 高木智久, 内藤裕二, 吉川敏一. ベーシックサイエンス企画 シンポジウム 1「抗酸化環境応答と加齢」消化管炎症における抗酸化環境応答. 第 11 回日本抗加齢医学会総会. 2011 5. 27; 京都.
- 5, 高木智久, 内藤裕二, 内山和彦, 吉川敏一. シンポジウム 5「炎症制御とガスバイオロジーの接点」一酸化炭素(Carbon monoxide: CO)による腸管炎症制御. 第 32 回日本炎症・再生医学会. 2011 6. 3; 京都.

[図書] (計 3 件)

- 1, Takagi T, Naito Y, Yoshikawa T. Free radicals in inflammatory bowel disease. In: Naito Y, Suematsu M, Yoshikawa T, editors. Free

Radical Biology in Digestive Diseases. Karger, Basel: 128-136, 2011.

- 2, Naito Y, Uchiyama K, Takagi T, Yoshikawa T. CO and its application to Gastrointestinal disease. In: Yoshikawa T, Naito Y, editors. Gas Biology Research in Clinical Practice. Karger, Basel: 35-42, 2011.
- 3, Takagi T, Naito Y, Hirata I, Yoshikawa T. Role of hydrogen sulfide in colitis. In: Yoshikawa T, Naito Y, editors. Gas Biology Research in Clinical Practice. Karger, Basel: 73-80, 2011.

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年月日 :
国内外の別 :

[その他]

特記事項なし

6. 研究組織

(1) 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) 講師
研究者番号 : 70405257

(2) 研究分担者

内藤 裕二 (Naito Yuji)
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 : 00305575

半田 修 (Handa Osamu)
京都府立医科大学
医学 (系) 研究科 (研究院) 講師
研究者番号 : 90381970