

ヘムオキシゲナーゼ1(HO-1)の多面的生理学的意義: HO-1欠損症からの学習

著者	小泉 晶一
著者別表示	Koizumi Shoichi
雑誌名	平成14(2002)年度 科学研究費補助金 基盤研究(B) 研究成果報告書
巻	2001-2002
ページ	9p.
発行年	2003-03
URL	http://doi.org/10.24517/00051049



は し が き

本研究の動機は、最近われわれが従来全く報告のない新しい疾患「ヘムオキシゲナーゼ1 (HO-1)欠損症」の症例を発見したことに端を発する。世界最初の症例である(Yachie, et al: J Clin Invest 103: 129, 1999)。患児は2歳頃から、反復する発熱、白血球増多、関節炎を伴う慢性炎症、肝腫大、赤ワイン色血清、赤血球破碎を伴う溶血性貧血を認め、さらに凝固、線溶系の異常亢進、フォンウイルブランド因子、トロンボモデュリン、血管内皮由来サイトカインの高値から毛細血管内皮細胞障害が疑われた。腎生検の電顕像では、血管内皮の剥離と異常物質の沈着が認められた。高血圧も認め、6歳で頭蓋内出血で死亡した。

本症例では重篤な溶血が存在するにもかかわらず、低ビリルビン血症、高ハプトグロビン血症がみられることから、ヘム代謝の異常が疑われ、HO-1欠損症の発見に繋がった。

HOはヘムをビリベルディン、遊離鉄、および一酸化炭素(CO)に代謝する律速酵素である。HO-1とHO-2の2つのアイソザイムが存在することは比較的早くに知られており、最近HO-3も報告されている。HO-2が脳、睾丸ほか全身に恒常的に発現しているのに対して、HO-1は感染、低酸素などのストレス曝露により、肝脾など網内系に強く誘導発現されることから、生体に対する酸化ストレス防御因子として重要であると考えられていた。さらにHO-1はCOを合成し、COは微小循環を確保し、毛細血管内皮の保護とその機能恒常性の維持に重要な役割を演じていることが最近知られるようになった。したがって、本症例にみられた多彩な病態は、HO-1欠損による全身の血管内皮細胞障害やストレス防御機構の破綻に起因する可能性が高いと思われた。さらに近年、HO-1は、成人の血管炎、動脈硬化などの血管病変やがんの浸潤、転移における血管新生などの病態の理解に意義深い物質と注目されてきている。

以上のような背景を基に、本研究では、以前の平成11年度～12年度における研究基盤研究(B)(2) (課題番号11470170)に継続して、世界に一例しか存在しないHO-1欠損症から多くを学びながら、HO-1の持つ多面的な生理学的意義を追求した。このように本研究は新しく発見された疾患から出発した萌芽的研究であり、従来のヘム代謝、CO代謝の理解のみならず、造血系細胞の機能、腎疾患、さらに新しい血管炎の概念の構築や血管新生など、極めて広範囲な臨床医学的、基礎生理学的研究領域の展開に大きな波及効果をもたらし、学術研究における先導的意義を有すると考えられる。

研究組織

研究代表者	小泉 晶一	金沢大学大学院医学系研究科教授
研究分担者	谷内江 昭宏	金沢大学医学部教授
研究分担者	笠原 善仁	金沢大学大学院医学系研究科助教授

研究分担者 太田 和秀 金沢大学医学部附属病院講師
研究分担者 犀川 太 金沢大学医学部附属病院講師

交付決定額 (配分額) (金額単位:千円)

	直接経費	間接経費	合計
平成13年度	14,700	0	14,700
平成14年度	1,900	0	1,900
総計	16,600	0	16,600

研究発表

(1) 学会誌等

1. ヘムオキシゲナーゼ1欠損症の発見. 鉄代謝および酸化ストレスによる血管内皮傷害とその防御に関する研究の新しい展開.
小泉晶一
日本小児科学会雑誌 102(12):1267-1270,1998
2. Oxidative stresses causes enhanced endothelial cell injury in human heme oxygenase-1 deficiency.
Yachie A, Niida Y, Wada T, Igarashi N, Kaneda H, Toma T, Ohta K, Kasahara Y, Koizumi S.
J Clin Invest 103: 129-135, 1999
3. 尿細管上皮細胞における heme oxygenase-1 機能の重要性
太田和秀, 谷内江昭宏, 小泉晶一
日本小児腎臓病学会誌 12(2): 119-126, 1999
4. ヘムオキシゲナーゼ1欠損症1家系における遺伝子異常ならびに細胞傷害機構の解析.
金田 尚
金沢大学十全医学会雑誌 108(1):91-102,1999
5. ヘムオキシゲナーゼ1欠損症発見の意義.
小泉晶一
日本醫事新報 3945:105, 1999
6. Heme oxygenase-1 欠損症と全身性血管内皮傷害: 世界第1例目の報告.
谷内江昭宏
医学のあゆみ 188(13): 1129-1130, 1999
7. ヘムオキシゲナーゼ1欠損症 -新しい血管炎の概念-
谷内江昭宏, 小泉晶一

8. Tubular injury as a cardinal pathological feature in human heme oxygenase-1 deficiency.
Ohta K, Yachie A, Fujimoto K, Kaneda H, Wada T, Toma T, Seno A, Kasahara Y, Yokoyama H, Seki H, Koizumi S.
Am J Kidney Dis 35(5): 863-870, 2000
9. ヒト heme oxygenase-1 欠損症とその腎病変.
太田和秀
医学のあゆみ 193: 47-52, 2000
10. Structural evidence of genomic exon-deletion mediated by *Alu-Alu* recombination in a human case with heme oxygenase-1 deficiency.
Saikawa Y, Kaneda H, Yue L, Shimura S, Toma T, Kasahara Y, Yachie A, Koizumi S.
Human Mutation 16(2): 178-179, 2000, Mutation in Brief #351, 2000, in Online
11. Heme oxygenase-1 欠損症の遺伝子解析: *Alu-Alu* 再構成によるエクソン2の完全欠損.
岳 麗杰, 犀川 太, 金田 尚, 谷内江昭宏, 小泉晶一
日本小児血液学会雑誌 14(6): 372-377, 2000
12. Heme oxygenase 1 欠損症の発見.
谷内江昭宏
Medical Technology 29(1): 19-20, 2001
13. ヘムオキシゲナーゼ1欠損症.
谷内江昭宏, 小泉晶一
日本臨床, 別冊, 領域別症候群シリーズ No. 33, 先天異常症候群辞典(上巻) p796-797, 2001
14. 酸化ストレス細胞障害に対するヘムオキシゲナーゼ1(HO-1)の機能的意義とHO-1欠損症に対する遺伝子治療の基礎的検討.
笠原善仁, 和田泰三, 東馬智子, 丸箸圭子
母子健康協会, 第12回医学助成研究報告書 P17-18, 2001
15. 末梢血単球による選択的ヘムオキシゲナーゼ1産生とその機能的意義.
市村昇悦
金沢大学十全医学会雑誌 110(5,6): 327-338, 2001
16. Cytoprotective role of heme oxygenase (HO) -1 in human kidney with various renal diseases.
Morimoto K, Ohta K, Yachie A, Yang Y, Shimizu M, Goto C, Toma T, Kasahara Y, Yokoyama H, Miyata T, Seki H, Koizumi S.
Kidney Intern 60(5): 1858-1866, 2001
17. Role of heme oxygenase-1 in cardiovascular diseases: a novel target for molecular intervention?
Ohta K, Yachie A

J Endovasc Ther 8: 444-446, 2001

18. Heme oxygenase-1 deficiency : the first autopsy case.
Kawashima A, Oda Y, Yachie A, Koizumi S, Nakanishi I
Hum Pathol 33(1): 125-130, 2002
19. 尿細管間質障害防御因子としての HO-1.
藤本佳代子, 太田和秀, 楊永紅, 谷内江昭宏, 小泉晶一
小児科 43 (2): 163-171, 2002
20. Gene transfection of H25A mutant heme oxigenase-1 protects cells against hydroperoxide-induced cytotoxicity.
Hori R, Kashiba M, Toma T, Yachie A, Goda N, Mikino N, Soejima A, Nagasawa T,
Nakabayashi K, Suematsu M
J Biol Chem 277(12): 10712-10718, 2002
21. ヘムオキシゲナーゼ 1 欠損症から学ぶもの。
谷内江昭宏
日本小児科学会雑誌 106(10):1380-1389,2002

(2) 口頭発表

1st International Symposium on Heme Oxygenase (HO/CO)
New York Marriott - World Trade Center,
New York City, July 14 - 17, 2000

• Oral Presentation

1. HO-1 expression by gene transfer reverses hemin-induced cell injury of lymphoid cell lines derived from a HO-1 deficient patient.
A. Yachie, T. Toma, S. Shimura, K. Ohta, Y. Kasahara and S. Koizumi
2. What did we learn from the first case of human heme oxygenase-1 deficiency?
A. Yachie, Y. Niida, T. Toma, S. Shimura, K. Ohta, K. Fujimoto, C. Goto, Y. Kasahara and S. Koizumi
Acta Haematol 103(suppl 1): 82, 2000
3. Differential role of heme oxygenase-1 (HO-1) in protection from endothelial cell death.
K. Maruhashi, Y. Kasahara, T. Toma, S. Sakazume, A. Yachie and S. Koizumi
Acta Haematol 103(suppl 1): 82, 2000

• Poster Session

4. Role of heme oxygenase-1 and bcl-2 in protection of hematopoietic cell lines from hemin-induced cell injury.
A. Yachie, T. Toma, S. Shimura, K. Ohta, Y. Kasahara and S. Koizumi

Acta Haematol 103(suppl 1): 82,2000

5. Monocyte specific induction of heme oxygenase-1 production and its clinical relevance.

T. Toma, S. Shimura, K. Ohta, Y. Kasahara, A. Yachie and S. Koizumi

Acta Haematol 103(suppl 1): 82, 2000

6. Renal pathology of human heme oxygenase-1 (HO-1) deficiency and important roles of HO-1 in the human kidney.

K. Fujimoto, K. Ohta, A. Yachie, C. Goto, S. Shimura, T. Toma, A. Seno, Y. Kasahara and S. Koizumi

Acta Haematol 103(suppl 1): 80, 2000

7. Structural evidence of genomic exon-deletion mediated by *Alu-Alu* recombination in a human case with heme oxygenase-1 deficiency.

S. Koizumi, Y. Saikawa, H. Kaneda, L. Yue, S. Shimura, T. Toma, Y. Kasahara and A. Yachie

Acta Haematol 103(suppl 1): 85, 2000

2nd International Conference on Heme Oxygenase (HO/CO)

Baia Verde Hotel, Catania, Sicily, Italy,

June 6-9, 2002

- Oral presentation

8. Heme Oxygenase-1 deficiency; a disease of monocyte dysfunction.

A. Yachie, T. Toma, N. Nakamura, K. Ohta, K. Morimoto, K. Ohta, Y. Saikawa, Y. Kasahara and S. Koizumi

- Poster Session

9. Heme Oxygenase-1 production by peripheral blood monocytes in acute febrile illnesses.

T. Toma, H. Maeba, R. Nishimura, K. Ohta, Y. Kasahara, A. Yachie and S. Koizumi

10. Characteristics of heme oxygenase-1 production within the lung tissue in childhood pulmonary hypertension.

N. Nakamura, T. Toma, K. Ohta, S. Sakazume, K. Ohta, Y. Kasahara, A. Yachie and S. Koizumi

11. Selective protection of renal tubular epithelial cells by heme oxygenase-1 during stress-induced injury.

K. Ohta, Y. Yang, M. Shimizu, T. Toma, Y. Kasahara, A. Yachie and S. Koizumi

(3) 出版物

1. Human HO-1 deficiency and cardiovascular dysfunction. *In* Carbon monoxide and cardiovascular dysfunctions.

Yachie A, Kawashima A, Ohta K, Saikawa Y, Koizumi S.

Edited by Dr. R. Wang, CRC Press, 2002, pp181-212

2. Human heme oxygenase (HO) -1 deficiency and the oxidative injury of vascular endothelial cells. *In* Heme oxygenase in biology and medicine.

Yachie A, Toma T, Shimura S, Yue L, Morimoto K, Maruhashi K, Niida Y, Ohta K, Kasahara Y, Saikawa Y, Koizumi S.

Edited by Abraham NG, Alam J, and Nath K, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, 2002, pp325-pp334

研究成果

本研究の研究成果の概略を以下に記載する。詳細は論文の別冊を参照されたい。

- 1) HO-1 に対する単クローン抗体を用いて生検肝組織の免疫組織染色を実施したところ、患児肝では HO-1 が全く染色されなかった。HO-2 は正常に染色された。
- 2) 患児末梢血細胞より EBV 芽球化細胞株 (LCL) を樹立し、それを用いてウエスタンブロッティング法を実施したところ、HO-2 は対照と同等に発現がみられたが、HO-1 蛋白はカドミウムや亜ヒ酸、ヘミンによるストレス刺激後でも全く発現がみられなかった。
- 3) HO-1 mRNA は PCR 法により、その発現が確認された。
- 4) 患児および両親の HO-1 遺伝子解析から、母親アリルにエクソン 2 の欠損、父親アリルではエクソン 3 に 2 塩基欠損があることがわかり、患児はその複合ヘテロ接合体であることが知れた。さらに母親の染色体遺伝子を検索したところ、エクソン 2 を含む 1,730bp におよぶ大きな欠損が証明された。さらに、エクソン 2 は Alu くり返し配列にはさまれる構造であることが知れ、本例のエクソン 2 欠損は Alu くり返し配列の相同的組み換えによる配列欠失の可能性が示唆された。
- 5) 以上より、本例は HO-1 欠損症と診断され、本疾患の概念が確立された。
- 6) 本症例の患児末梢血では単球の形態異常が著しく、また、患児の単球では細胞接着や貪食に関与する CD36, CD14, CD16 表面抗原が低下していた。そのことが、貪食能の低下などの機能障害を惹起しているものと思われた。
- 7) 正常ヒト末梢血単核細胞を、単球、リンパ球 (T, B 細胞) に画分し、それぞれの細胞画分で HO-1 蛋白発現をフローサイトメトリー法みると、HO-1 発現は正常単球で強く、T 細胞では逆に弱く、細胞系特異的な HO-1 発現調節機構の存在が示唆された。このことはウエスタン法でも確認された。単球は種々の感染症病態と深く関わっているため、種々の細菌性、ウイルス感染症、および血管性病変 (川崎病など) における血液細胞の HO-1 発現状態を比較検討した。種々の感染症の病態および感染症の時間的経

過を追って観察すると、HO-1 発現に変動がみられた。

- 8) 本症例における腎病変を 2 度の腎生検材料と剖検材料を用いて検討したが、特に、尿管におけるダメージが時間の経過とともに増悪した。電顕では血管内皮の剥離と異常物質の沈着が認められた。
- 9) 各種腎疾患における HO-1 発現を免疫組織染色法でさらに検討した結果では、ストレスがさほど重篤でないと思われる小児ネフローゼ症候群においても腎尿管における HO-1 発現は著しく、尿管には生理的にも常にストレスがかかっていると推察された。また、近位尿管における HO-1 発現が、尿蛋白や血尿と有意に関連していた。これらの結果を基に、数種のヒト近位尿管上皮細胞株とメサンギウム細胞株を培養し、HO-1 発現と腎組織のストレス抵抗性を *in vitro* で明らかにするべく検討中である。
- 10) HO-1 は CO 産生を介して肺高血圧症の病態に関与している可能性がある。本研究では、先天性心疾患に伴う肺高血圧症例や後天性の血管炎による肺高血圧症例における肺組織内の HO-1 発現を免疫組織染色、およびリアルタイム PCR 法を用いて検討した。HO-1 欠損症では HO-1 産生は全く観察されなかったが、正常肺では、肺泡マクロファージや気道上皮に HO-1 産生が認められた。血管炎に伴う肺高血圧症では、気道上皮、肺泡マクロファージの HO-1 発現は増強し、さらに、気道周囲や肺動脈壁に浸潤するマクロファージに強い HO-1 産生が観察された。一方、原発性肺高血圧症では HO-1 産生の増強は認められなかった。先天性心疾患の VSD では、肺高血圧を伴う例で肺組織の HO-1 mRNA 発現量が高かった。HO-1 遺伝子プロモーター領域の GT 反復配列には有意差を認めなかった。以上より、肺における HO-1 産生は日常的ストレスを反映しており、HO-1 がストレス防御と肺組織の機能恒常性維持に重要であることが示唆された。肺高血圧症においては、その成因により HO-1 の病態への関与が異なる可能性が示された。
- 11) 血管内皮細胞と HO-1 の関係を *in vitro* で検討するため、細胞株 ECV304 に HO-1 遺伝子をレトロウイルスベクターを用いてトランスフェクトし、HO-1 蛋白発現量が異なる細胞株を 10 種類程度えた。ただしこの HO-1 発現は恒常的で、生理的にみられるようなストレスで誘導されるものではなかった。低～中等度 HO-1 蛋白発現株では、ヘミンや過酸化水素などのストレスを負荷すると細胞障害の抑制が認められたが、高度 HO-1 蛋白発現株では、逆に細胞障害の増強がみられた。このことは、HO-1 蛋白発現量が多すぎても、決して防御的には働かず、かえって血管障害を増強する可能性を示唆した。将来の遺伝子治療において、HO-1 遺伝子発現を恒常的ではなく、生理的なストレス誘導性とする必要があることを示唆した。
- 12) 遺伝子治療にむけての基礎的研究では、正常 HO-1 遺伝子を含むレトロウイルスベクターを作成し、患児 LCL 細胞株への遺伝子導入に成功し、蛋白発現は *in vitro* で確認した。ただしこの場合でも HO-1 発現は恒常的で、生理的にみられるようにストレス誘導性ではなかった。

1 3) HO-1 欠損症は未だ1例しか発見されていない。本疾患の多様性を理解するためにも、第2例目、第3例目を発見する必要がある。慢性炎症性や溶血をともなう多くの症例をスクリーニングし、末梢血単球やLCL細胞株を用いたフローサイトメトリー法によりHO-1産生を定量的に測定しているが、まだ第2例目はみつからない。今後もこの方法でスクリーニングを継続する。