

総 説

ヘムオキシゲナーゼと生体防御機構；抗炎症治療のパラダイムシフト

谷内江昭宏

Heme oxygenase and its role in defense system ; Paradigm shift of anti-inflammatory therapy

Akihiro YACHIE

*Department of Clinical Laboratory Science, Division of Health Sciences,
Kanazawa University Graduate School of Medical Science*

(Received January 10, 2007)

summary

Heme oxygenase (HO) plays a central role in heme metabolism. At the same time, it protects cells from injury evoked by various oxidative stresses. A detailed analysis of the first human case of HO-1 deficiency revealed that HO-1 is involved in the protection of multiple tissues and organs. It is particularly important that *in vivo* HO-1 production is localized to selected cell types, e.g. renal tubular epithelium, reflecting the fact that HO-1 plays particularly important protective roles in these cells. In addition to renal epithelial cells and tissue macrophages, a minor subpopulation of circulating monocytes produced low, but significant levels of HO-1 and the number of these monocytes increased during episodes of acute inflammatory illnesses, indicating that monocytes play significant roles in controlling inflammation. On the other hand, excessive level of HO-1 induced by HO-1 gene transfection led to paradoxical susceptibility of the cells to oxidative injury. These results indicated that HO-1 expression is carefully controlled *in vivo* with regard to its location and the magnitude. Furthermore, it has been recently shown that HO-1 is involved in the immune regulation mediated by regulatory T cells. From these findings, it seems feasible to meticulously induce HO-1 protein *in vivo* as a novel therapeutic intervention to control various forms of inflammatory disorders.

Key words—Heme oxygenase-1; Oxidative stress; Inflammation; Regulatory T cell; Monocyte

抄 録

ヘムオキシゲナーゼ (heme oxygenase ; HO) はヘム代謝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である。HO の内、誘導酵素である HO-1 を欠損する症例の病態解析により、このような HO の働きが特定の細胞の保護にとどまらず、多様な組織や臓器における細胞保護に関与していることが示された。また、腎組織や腎由来細胞株を用いた検討では、HO-1 蛋白が特定の細胞に局在していること、それらの細胞では HO-1 産生が特に重要な意味を持つことが示唆された。さらに末梢血単球を用いた解析では、特定の単球亜群で恒常的に HO-1 蛋白が発現していること、これらの単球が急性炎症疾患で増加することが示され、単球/マクロファージによる HO-1 産生が炎症制御に重要な役割を果たすことが明らかとされた。一方で、HO-1 遺伝子導入により過剰に HO-1 蛋白を発現させた場合には、むしろ細胞傷害を促進する可能性があることも示され、生体内では HO-1 産生の局在や量が巧妙に制御されていることが示唆された。最近の報告では、HO-1 蛋白が制御性 T 細胞による免疫制御に深く関わっている可能性も示されており、HO-1 産生の誘導を標的とした介入が多様な炎症性疾患に対する新たな治療戦略の一つとして期待される。

I. はじめに

免疫応答は、生体が病原体や腫瘍細胞を排除しその機能恒常性を維持するために必須の防御機構である。ここ数年の免疫学の進歩は、このような免疫応

答が抗原特異的な獲得免疫のみではなく、抗原感作に依存しない自然免疫に依存するところが極めて大きいことを明らかにしてきた。さらに、自然免疫による免疫応答が獲得免疫の発達とその賦活化とに密接に関わっていることも理解されるようになった。なかでも、一群の toll like receptor (TLR) を介した病原体関連分子構造 (pathogen-associated molecular pattern ; PAMP) の認識^{1~3)}や、制御性

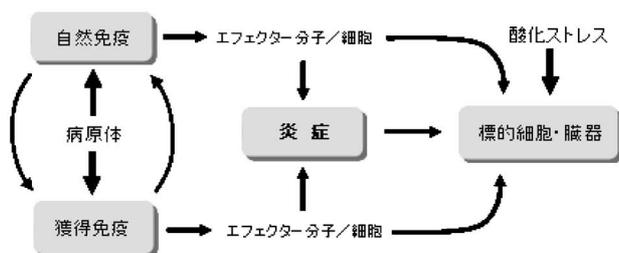


図1 免疫応答, 炎症と細胞傷害

T細胞 (regulatory T cell ; Treg) による免疫制御機構^{4~6)}が明らかにされたことは, 特筆すべき重要な進歩であると考えられる (図1)。

これらの免疫学の進歩と併せて, 我々の炎症性疾患に対する理解も変貌を遂げてきた。特に, 自己抗原に対する異常な免疫応答と考えられている「自己免疫疾患」発症の背景に, 免疫寛容機構やアポトーシス誘導機構の異常^{7,8)}, 炎症制御機構の異常^{9~12)}など, 生体防御機構のさまざまなレベルでの機能障害が存在することが分子レベルで明らかにされてきた。さらに, 炎症制御に関わる多様な遺伝子群の変異により発症する「自己炎症性疾患」は, 免疫応答を量的ならびに質的に調節する炎症調節機構の異常として理解されるようになってきた^{13,14)}。

一方, これらの「免疫応答」と「炎症反応」の結果として惹起される組織/臓器傷害については, 免疫学の観点から注目されることは少なかったように思える。生体防御反応の帰結として起こる生体へのダメージはある意味で不可避のものであり, このようなダメージを最小限にとどめる手段としては, 上流にある免疫応答を制御し, 炎症反応を抑制することが重要であると考えられてきた。したがって, 多くの難治性炎症疾患に対する治療的アプローチも免疫抑制剤や抗炎症剤を主体としたものとなり, 標的となる細胞や組織の保護を目的としたものは傍流にすぎない。しかし, 炎症性疾患を生体防御機構の異常と捉えた場合に, やみくもに生体防御機構の全てを抑制するのではなく, 本来有用であるはずの免疫応答や炎症反応の質的転換と標的臓器の保護を念頭においた, より洗練された治療の開発が望まれる。

我々の研究室が経験した「ヘムオキシゲナーゼ1欠損症; HO-1欠損症」は当初, 細胞の酸化ストレスに対する感受性の亢進と細胞傷害の蓄積により起こる炎症性疾患と理解されていた¹⁵⁾。我々自身, ヘムの蓄積とそれによる血管内皮細胞の傷害や単球/マクロファージの傷害が直接, 一次的に患児に特徴

的な炎症病態を惹起していると考えていた。しかし最近の知見の蓄積により, HO-1が組織や臓器を炎症によるストレスから保護すると同時に, それ自身が強力な炎症抑制分子として免疫応答と生体防御機構の一方の極に位置し, 炎症制御機構を理解する上で極めて重要な分子であることが明らかにされて来た。本稿では, HO-1欠損症の病態解説を通じて, この特異な分子の機能に関する最新の考え方を示すと同時に, 免疫応答から炎症制御, 細胞保護に至る, 一連の生体防御機構におけるHO-1の重要性和, 移植免疫や炎症性疾患治療戦略におけるHO-1産生誘導による治療的介入の可能性について述べてみたい。

II. ヘム代謝とHO-1欠損症

赤血球の崩壊により血中に遊離するヘモグロビン(Hb), およびその重要な構成成分であるヘムは極めて細胞毒性の強い蛋白である。したがって, 生体内には恒常的に産生されるヘムを速やかに代謝し無害なものとするための巧妙なしくみが存在している。血中の遊離Hbはハプトグロビン(Hp)と結合し, この複合体が貪食細胞表面に存在する受容体に結合, 細胞内に取り込まれる。取り込まれたHb・Hp複合体から遊離したヘムは分解酵素であるHOによりビリベルジン, 一酸化炭素(CO)ならびに遊離鉄となる¹⁶⁾。ビリベルジンはビリベルジン還元酵素により還元されてビリルビンとなる(図2A)。遊離鉄はフェリチン産生を誘導, 再利用サイクルに入る。COはガス状分子として多様な生理活性を発揮するとされている。誘導酵素であるHO-1はヘム代謝の鍵となる酵素として, 細胞毒であるヘムを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る^{17~19)}。このようなHO-1の特性から, HO-1が遺伝的に欠損する場合にはヘム代謝障害によるヘムの蓄積, 鉄代謝異常, ビリルビン生合成の障害, 貪食細胞の細胞傷害が惹起されることが予想される。しかし, HO-1欠損症患児に実際に起こったことはこのような特定の細胞に限定した異常ではなく, 広範な生体防御機構の機能異常と遷延性炎症, 多臓器障害を伴うものであった^{15,20,21)}。そしてこの事実は, HO-1が一次的なヘム代謝機能にとどまらない, 多様な役割を果たす酵素であることを示している。

我々が経験した症例を紹介する。患児は2才頃より発熱, 関節痛, 皮膚紅斑などの多様な炎症症状を

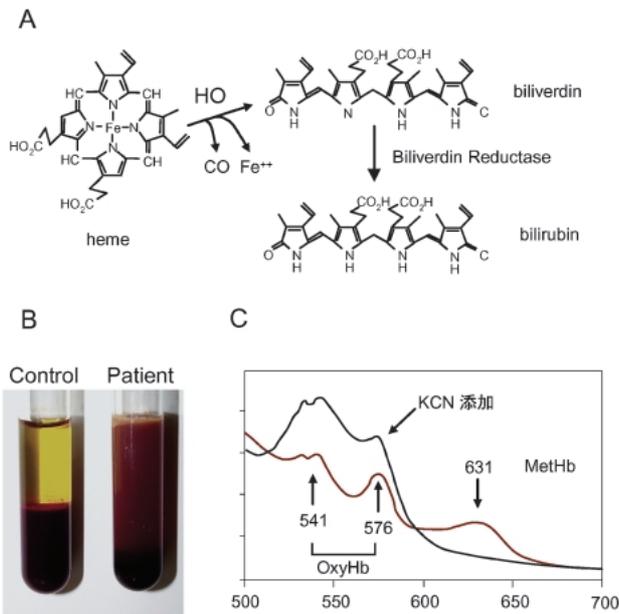


図2 ヘム代謝とHO-1欠損²⁰⁾

A；ヘムはHOによりCO，遊離鉄ならびに biliverdin に代謝される。Biliverdin は biliverdin reductase によりさらに bilirubin となる。B；患者血清は遠心直後から混濁した茶褐色を示し，上層には脂質が多量に認められる。C；血清吸光度スペクトラムを解析すると，OxyHb を示す 541 nm と 576 nm のピークに加え，MetHb を示唆する 631 nm のピークが認められる。MetHb のピークは KCN の添加により消失した。

示し，これらの症状が寛解，増悪を繰り返しながら遷延した。検査所見では，CRP，LDH，フィブリノゲンの高値が持続，さらにTAT，PIC，APTTなど凝固・線溶系の指標が著しい高値を示した。蛋白尿，貧血，血小板増加，白血球増加も持続し，末梢血液像では赤血球形態の異常が観察された。鼻根部の平坦化，眼瞼のリンパ浮腫などの特徴的な顔貌を示し，これらの所見は経過を経るにつれ，増強した。また，前述した臨床検査所見の著明な異常は多少の軽快・増悪をくり返しながら患児が死亡する6才時まで4年以上にわたり持続した。

患児の血清は採血直後から著しく混濁した茶褐色を示し，高脂血症を反映して厚い脂肪層が血清の上部に形成された(図2B)。末梢血液像では，破碎赤血球や赤芽球が認められ，凝固・線溶系異常と併せて，血管内皮傷害に基づく血管内容物の存在が強く示唆された。しかし，その一方で血清Hpは著しい高値を示し，血清ビリルビン値が常に低値を示した。

そこで，異常な血清の色調の本態を明らかにするために患児の血清の吸光度スペクトラムを解析すると，通常の酸化Hb(OxyHb)のピーク(541nmおよび576nm)以外にも，メトHb(MetHb)を示す631nmの部位に明らかなピークが観察された

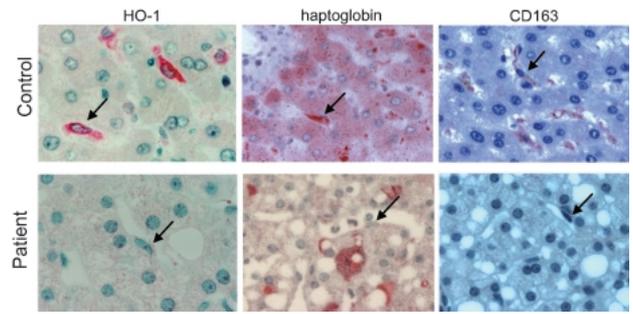


図3 肝におけるHO-1, haptoglobin, CD163発現
HO-1欠損症患者ならびに対照肝組織における抗原発現を免疫組織染色により比較した。対照ではKupffer細胞(矢印)でこれらの抗原の発現が強く認められたが，患者では全く検出されなかった。

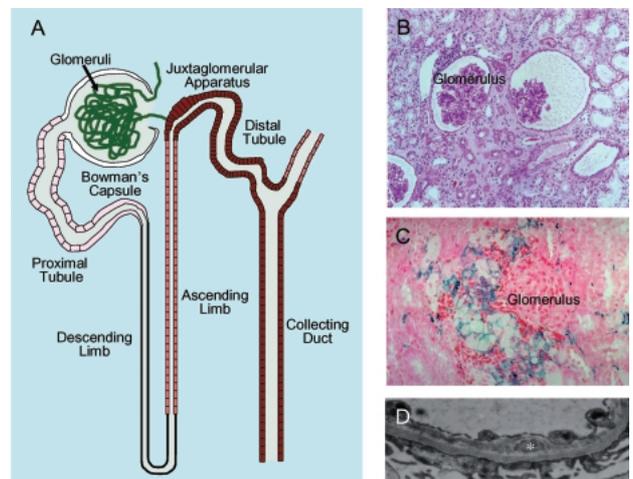


図4 腎におけるHO-1の分布とHO-1欠損症における腎傷害
A；正常ネフロンにおけるHO-1蛋白の分布。HO-1陽性細胞は赤く示してある。蛋白量が多いほど色を濃く示してある。正常腎では近位尿細管に比べ遠位尿細管ならびに集合管上皮により強くHO-1が発現している。B-D；HO-1欠損症の腎病理。尿細管上皮の傷害が著明(B)で，Bowman囊は二次的に拡張，尿細管上皮には鉄の沈着や空胞変性が認められた(C)。糸球体毛細血管内皮は基底膜から剥離し，内皮直下には沈着物(*)が認められた(D)。

(図2C)。その後の詳細な検討を経て，患児の血清中には多量のOxyHbならびにMetHbが同時に存在することが明らかになった。

しかし，このように多量の遊離Hb(OxyHbが全血の1%，MetHbは1.5%)が患児血清中に常に存在するためには，信じられないスピードで溶血が起こっているか，あるいはHbがなんらかの理由で血清中に蓄積しているのか，いずれかの機構を想定する必要があった。Hpを介したHb代謝は極めて早いことが知られており，それが正常に機能しているならば血清中に全体の数%にも及ぶHbが処理されずに残っている可能性は極めて低い。また，患児の血清中には驚くべき濃度(800~1,200mg/dl)の

Hp が検出されたことから、Hp による Hb 代謝に何らかの障害があると考えた方が良いと推定された。

このようなヘム蛋白の異常な蓄積を説明するもの一つとして、Hb 代謝経路の障害が候補となった。Hb の代謝に関わる酵素である HO とビリベルジン還元酵素の内、HO には 3 つのアイソフォームが存在することが知られており、その一つ HO-1 は酸化ストレスや活性化刺激によりその産生が強く誘導される。偶然にも、この時期ちょうど HO-1 ノックアウトマウスが作成され、その知見から HO-1 の欠損が鉄再利用障害による貧血、酸化ストレスによる細胞傷害の亢進、炎症の促進など、本症例で認められた症状の少なくとも一部と類似した所見を呈することが報告された^{22,23)}。ヘム代謝経路の中核に位置する HO-1 の欠損があれば、ヘムの蓄積や溶血と低ビリルビン血症の矛盾、持続する炎症、血管内皮傷害に基づく種々の異常が全て説明可能であることが予想された。

患児は 2 才の時に前医で診断を目的に開腹肝生検を施行されていた。正常肝を対照にして HO-1 免疫染色を施行すると、対照では Kupffer 細胞のみに強い HO-1 産生が観察された。一方、患児肝では Kupffer 細胞における HO-1 産生が全く欠如していることが確認された (図 3)。HO-2 は正常対照ならびに患児肝細胞に同様に発現が認められた。Hp は、正常対照肝では肝組織全体に認められ、Hb・Hp 複合体の貪食を反映して Kupffer 細胞では特に強く染色された。しかし、患児肝組織ではまばらに陽性細胞が確認されるのみであり、全般にその発現は低下していた。さらに Kupffer 細胞では全く Hp の存在は確認されなかった。また Hb・Hp 受容体である CD163 は正常対照肝の Kupffer 細胞では強く発現していたが、HO-1 欠損肝ではその発現は欠如していた。これらの所見は、HO-1 欠損症においては細胞内におけるヘム代謝の異常のみならず、特異的受容体の二次的な発現低下により Hb・Hp 複合体の細胞内取り込み自体も著しく制限されていたことを示唆する。

次に、正常対照ならびに患児の末梢血単核球を亜ヒ酸やカドミウムなどの重金属で刺激、酸化ストレス刺激による HO-1 産生誘導を試みた。正常対照の単核球では HO-1 産生が誘導されたが、患児の単核球では全く検出されなかった。さらに、正常対照ならびに患児の末梢血より B リンパ球を単離、

Epstein-Barr ウイルスを感染させることにより、LCL (lymphoblastoid cell line) を作成、これを種々の酸化ストレス刺激下で培養、HO-1 産生を免疫染色、フローサイトメトリーならびに immunoblotting にて検討した。患児 LCL では全く HO-1 産生が検出されなかった。これらの結果より、患児では遺伝的異常を背景に HO-1 産生が欠如していることが示唆された。HO-1 遺伝子解析により、母親由来の allele が第 2 exon を欠損、父親由来の allele では第 3 exon 内の二塩基欠失が認められ、患児は HO-1 遺伝子変異に関して複合ヘテロ接合体であることが示された。

III. HO-1 の局在と細胞保護

HO-1 欠損症患児においてみられた細胞傷害は全ての臓器や細胞にみられたわけではなく、血管内皮、腎尿細管上皮および単球など、特定の細胞や臓器に集中して観察された。このことに関しては、いくつかの理由が想定される。第一は、これらの細胞が恒常的に種々のストレスに曝されやすい、解剖学的、機能的特徴を有していることである。血管内皮は通常でも血流によるずり応力、血管内容血や pH の変化、低酸素などの環境変化に直接曝され、患児ではさらに異常なヘム蛋白の蓄積、高コレステロール血症、異常血球増加など、強い酸化ストレスに曝露されていたと考えられる。また、尿細管上皮は血尿、蛋白尿など、尿排泄に伴う種々の物質に曝露されることが予想される。さらに、単球、および臓器に局在するいわゆる resident macrophage は貪食機能を介して著しいストレスを処理する必要があると考えられる。第二は、他の細胞に比べこれらの細胞の酸化ストレスに対する感受性が特に高いということである。同レベルの酸化ストレスに曝露された場合、生体の他の細胞が比較的抵抗性があるのに対して、これらの細胞の感受性が有意に高く細胞傷害が誘導されやすい可能性がある。しかし、このような性質は必ずしも生体にとって不利なことではなく、選択された細胞集団が酸化ストレスのセンサーとしての特異な機能を果たしている可能性が示唆される。非日常的な酸化ストレスが加わった時にこれらの細胞は細胞傷害のリスクを賭けて生体の防御応答を惹起するために機能することが予想される。第三に、上記と密接に関連することだが、このような酸化ストレスセンサーとして機能する細胞群は、細胞傷害を軽減、あるいは抑制するための抗酸化ストレ

ス機構を選択的に有していると考えられる。HO-1はこれらの細胞においてストレス感受と細胞保護のために中心的役割を果たしていると考えられる。

正常腎組織で検討すると、ラットにおいてもヒトにおいても、腎固有細胞の内、尿細管上皮のみが選択的にHO-1を恒常的に発現していることが明らかにされている(図4A)。恒常的なHO-1発現は遠位尿細管優位であるが、血尿やタンパク尿を伴う腎疾患症例ではその程度に応じて近位尿細管におけるHO-1発現を誘導することも明らかにされた^{24,25)}。さらに、メサンギウム細胞、近位尿細管上皮などの腎固有細胞の早期継代細胞を用いた *in vitro* での検討でも、近位尿細管上皮細胞では酸化ストレス刺激により強くHO-1産生が誘導された²⁶⁾。メサンギウム細胞を用いた場合も有意なHO-1産生が観察されるが、その程度は近位尿細管上皮による蛋白産生にくらべ著しく低値に留まる。さらに、これらの細胞株の酸化ストレス感受性を比較すると、近位尿細管上皮ではHO-1誘導により細胞の酸化ストレスに対する抵抗性が著明に亢進すること、このようなHO-1の効果はメサンギウム細胞ではほとんど認められないことも示された。したがって、腎尿細管上皮細胞は酸化ストレスによるHO-1産生とHO-1による抗酸化ストレス機能の誘導という二重の意味で、HO-1機能に深く関連した細胞として分化していると考えられる。

このような事実を反映して、HO-1欠損症患児の腎では、近位尿細管上皮細胞の傷害と尿細管の狭小化、二次的なBowman嚢の拡張が顕著に認められた。糸球体の変化は尿細管の変化に伴う二次的なものと考えられた(図4B)²⁷⁾。さらに、近位尿細管上皮の一部は空胞変性を示しヘモジデリンの著しい沈着を示した(図4C)。糸球体の毛細血管は光学顕微鏡レベルでは顕著な変化が見られなかったが、電子顕微鏡では血管内皮と基底膜との間に広範な沈着物の蓄積が認められ、それに伴い内皮は基底膜より剥離していた(図4D)。これらの変化は著しい血管内皮機能の低下をもたらし、HO-1欠損症患児で見られた凝固・線溶系の異常や血球破壊と密接に関連していると考えられる。

IV. 単球によるHO-1産生と炎症制御

選択的HO-1産生は、末梢血単核球においても観察された。末梢血白血球を種々の酸化ストレス刺激の添加により培養すると、単球にのみ選択的に

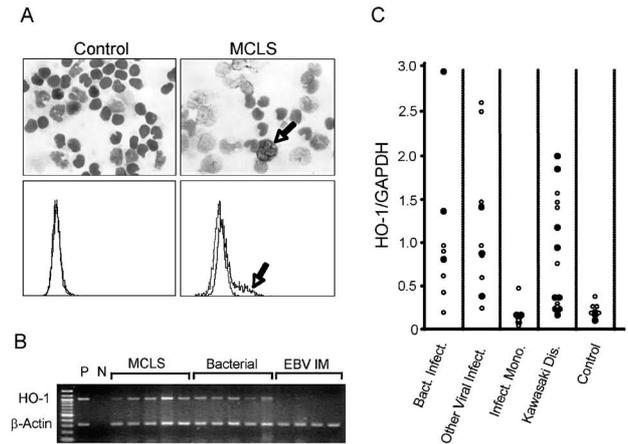


図5 末梢血単球によるHO-1発現³⁶⁾

A; 正常対照では末梢血白血球によるHO-1発現はほとんど観察されないが、川崎病急性期では単球の一部に強いHO-1発現を認めた。B; 多様な急性炎症性疾患において、HO-1 mRNA発現の増強が観察された。C; Real time PCR法による定量でも、急性炎症性疾患におけるHO-1 mRNA発現の増強が確認された。

HO-1産生が誘導され、リンパ球や顆粒球など、他の細胞にはその産生は認められなかった²⁸⁾。このことはmRNAレベルでも同様であり、単球には選択的にHO-1産生が誘導される機構が存在していると考えられた。血球細胞によるHO-1産生の特徴は、末梢血単球のみならず臓器局在マクロファージにおいても観察され、これまでに肺マクロファージ、肝Kupffer細胞、脾マクロファージで *in vivo* で恒常的に強くHO-1が産生されていることが明らかにされている²⁹⁾。

HO-1ノックアウトマウスと患児の症状、検査所見を比較してみると、マウスで記載されていない、種々の異常が本症の特徴的な所見として注目される。単球に関連した機能異常は、1) 単球の食食機能の障害に関連した異常と、2) 単球の炎症制御機能の障害に関連した異常に分けられる。前者に関しては、老化血球の増加、Hb・Hp複合体の蓄積、高脂血症などが単球によるこれらの処理能低下で説明できる可能性がある。患児末梢血単球を用いた検討では、スカベンジャー受容体の一つであるCD36発現が著明に低下していた²⁰⁾。我々は正常対照から得られた単球を用いた検討により、このような表面抗原の変化がHO-1遺伝子異常と直接関連したのではなく、血清中のヘムの異常蓄積に伴う二次的な異常であることを明らかにしている。また先に示したように、当時は明らかにされていなかったHb・Hp複合体の受容体、CD163分子の発現³⁰⁾を肝Kupffer細胞で検討すると、正常対照ではCD163

発現が強く認められるのに対して、患児肝組織の Kupffer 細胞では CD163 発現が欠如していた。このような食食に関わる受容体分子の発現低下ないし欠損は、それが一次的なものであるか二次的な変化であるかに関わらず、結果的に血清中の異常なヘム蓄積や血小板増加に深く関わっていたことが示唆される。

HO-1 が酸化ストレスによる細胞傷害から細胞を保護することは良く知られてきたが、より重要なことは HO-1 を介した炎症制御機構が生体防御機構全体に影響を与え、多様な免疫応答の局面で重要な役割を果たしていることである。単球/マクロファージ/樹状細胞はその局在、ストレスセンサーとしての役割から、このような HO-1 機能のメッセンジャーとして重要な機能を果たしていることが示唆される。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制御に強く関わっていることを示す報告がなされており、HO-1/CO が炎症性サイトカインの産生制御に直接影響を与えている可能性が示唆されている³¹⁾。残念ながら、患児が生存していた時にこのことに関して検討する機会は得られなかった。そこで、種々の急性炎症性疾患での単球 HO-1 産生を比較検討し、これらの疾患における単球 HO-1 産生の意義について考察した²⁸⁾。

免疫組織染色あるいはフローサイトメトリーによる検討では、正常対照の末梢血単球ではほとんど HO-1 産生は検出されなかった (図 5A)。一方、細菌性肺炎、川崎病などの急性炎症性疾患では、末梢血単球の一部に HO-1 産生が確認された。このような単球による HO-1 産生が新たな蛋白合成によるものであることを検討するために、これらの患者の末梢血単核球より cDNA を合成、HO-1 mRNA 発現を比較した。正常対照や伝染性単核症患者では HO-1 mRNA はほとんど検出されなかったが、川崎病ならびに急性感染症では明らかな HO-1 mRNA 発現の増強が観察された (図 5B)。さらに、末梢血単球による HO-1 発現を定量的に評価するために、GAPDH mRNA 発現を対照として、real time PCR 法を開発した。予想に反して、正常対照末梢血単核球を用いた検討でも HO-1 mRNA は低レベルながらも明らかに検出された。さらに、川崎病や種々の細菌感染症に加えて、ウイルス感染症の急性期でも HO-1 mRNA 発現は増強していた (図 5C)。

これらの観察より、HO-1 発現が酸化ストレスか

らの細胞保護や炎症抑制に重要な役割を果たしていることが推察された。したがって、何らかの方法により過剰な HO-1 発現を誘導し、酸化ストレスに曝されることによる細胞傷害を軽減する、あるいは細胞傷害により惹起された炎症病態を治療するという考えは一面で理にかなったものである^{31,32)}。実際に、炎症性血管病変や気道炎症性疾患に対する HO-1 を用いた遺伝子治療の試みもなされている^{33~36)}。しかし、基本的に HO-1 が誘導酵素であるという事実は、この蛋白の発現が量的にまた時間的に巧みに調節される必要があることを示唆している。さらに、これまで述べてきたように生体内での HO-1 産生が特定の細胞、あるいは臓器内の特定の部位に局在していることは、HO-1 産生を広範な細胞で誘導することに対する懸念を生じさせる。

V. HO-1 発現レベルの調節と細胞保護

HO-1 発現レベルと細胞傷害の関連を明らかにするために、正常対照ならびに HO-1 欠損症患児由来の LCL を種々の濃度のヘミンを添加して 24 時間培養し、細胞傷害の発現を比較した。細胞傷害の発現はサイトスピン標本を用いてその形態変化を比較すると共に、細胞サイズの変化や細胞表面の phosphatidyl serine 発現を FITC 標識 Annexin V 結合により検出、細胞死に至った細胞の比率をフローサイトメトリー法により定量した。正常 LCL ではヘミン添加培養後もほとんど細胞死が検出されなかったが、患児 LCL を用いた場合は、24 時間培養後に細胞形態は著しく変化、細胞傷害が認められた (図 6A)。HO-1 欠損 LCL ではヘミンにより誘導さ

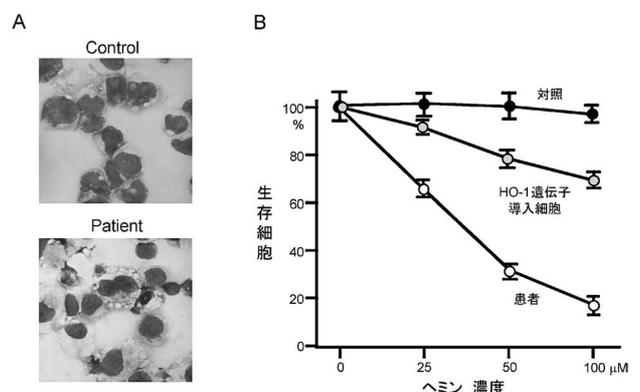


図6 ヘミンによる細胞傷害の誘導と HO-1 遺伝子導入^{15,20)}

A; HO-1 欠損 LCL ではヘミン添加により、細胞傷害が誘導された。B; このような細胞傷害は添加したヘミンの濃度依存性に増強したが、HO-1 遺伝子導入により著明に抑制された。

れる細胞傷害は濃度依存性に増加したが、正常対照 LCL では $100\ \mu\text{M}$ のヘミン添加によってもほとんど細胞死は観察されなかった。さらに、このような細胞死は患児 LCL に正常 HO-1 遺伝子を導入することにより著しく抑制され、ヘミンによる細胞傷害が直接 HO-1 欠損と関連していることが明らかにされた (図 6B)³⁷⁾。

一方で我々は、付着細胞である ECV304 を用いて、酸化ストレス (過酸化水素) により誘導される細胞傷害と HO-1 発現レベルとの関連を検討した³⁸⁾。ECV304 細胞は無刺激培養状態では HO-1 を低レベルでしか発現しないが、ヘミン刺激などにより容易に HO-1 発現が誘導される。非常に興味深いことに、低濃度ヘミンの共存により中等度の HO-1 蛋白が誘導された場合には ECV304 の酸化ストレスに対する感受性は低下したが、逆に高濃度ヘミンにより強い HO-1 誘導が惹起された場合には細胞傷害が亢進した。そこで、ECV304 に HO-1 遺伝子を導入、限界希釈法により多様なレベルの HO-1 発現を示すクローンを作成した。HO-1 蛋白過剰発現細胞では接着性が低下、培養フラスコへの付着性が低下するのみでなく細胞間接着も抑制された (図 7A)。このような細胞接着性の低下は細胞表面の $\alpha 5$ インテグリン発現の低下を反映していることが示された。 $\alpha 5$ インテグリン発現は HO-1 低発現クローンでは低下を認めなかった。さらに、HO-1 高発現クローンでは細胞接着性の低下に伴い、抗アポトーシス蛋白である Bcl2 発現も明らかに低下した。多数の HO-1 遺伝子導入 ECV304 クローンを用いて酸化ストレスによる細胞傷害の誘導と HO-1 蛋白レベルの関連を検討すると、低～中等度の HO-1 蛋白発現では細胞傷害が明らかに低下するのに対して、過剰に HO-1 蛋白が発現した場合にはかえって細胞傷害が亢進することが示された (図 7B)。

これらの結果は、HO-1 遺伝子が細胞を酸化ストレスによる傷害から保護するために重要であることを示すと同時に、これが適切な制御機構なしで細胞に導入された場合、過剰な HO-1 蛋白発現によって意図しない傷害が惹起される可能性を示している。HO-1 過剰発現による逆説的な細胞傷害が付着細胞に特徴的なことか、浮遊細胞にも共通して見られる現象であるかは不明である。しかしこのことは、HO-1 蛋白発現増強を目的とした遺伝子治療や、薬理的介入を試みる場合に銘記すべき事実である。

VI. 単球亜群と HO-1 産生

末梢血単球を標的として HO-1 産生の誘導を試みる場合に、単球亜群の存在とその機能的相違について知っておく必要がある。末梢血単球は CD16 抗原ならびに CCR2 抗原の発現やサイトカイン産生プロファイルから CD16^{high}CCR2⁻ ならびに CD16^{low}CCR2⁺ の 2 つの異なる亜群より構成されることが知られている³⁹⁾。川崎病などの急性炎症性疾患では少数亜群である CD16^{high} 単球が増加することが報告されている⁴⁰⁾。CD16^{high} 単球は他の急性炎症性疾患でも増加することが知られており、この亜群における IL-10 産生が欠如していることとあわせて、組織における炎症増悪と深く関わっているとする報告も多い^{41,42)}。しかし一方で、Geissman らはマウスを用いた細胞移入実験により、CD16^{high} CCR2⁻ 単球が臓器マクロファージに類似した機能を有し、臓器における炎症を制御し機能恒常性維持に関わることを、それに対して CD16^{low}CCR2⁺ 単球は炎症局所に活発に遊走し炎症性単球として組織傷害に関与する可能性を示している⁴³⁾。我々の検討でも、末梢血単核球における HO-1 mRNA の増強は、直接単球中 CD16^{high}CCR2⁻ 亜群の増加と関連していた。先に述べた川崎病やインフルエンザ感染などの急性感染症では、単球由来のサイトカイン濃度が増加すると同時に、これらの単球亜群の明らかな増加が認められた (図 8A)。さらに、末梢血単球亜群をセルソーターにより単離して比較すると、CD16^{high}CCR2⁻ 亜群においては恒常的に HO-1 mRNA の発現が認められ、これらの単球亜群が炎症性疾患で増加する事実は *in vivo* における恒常的な炎症制御に重要な役割を果たしていることを反映していると考えられた (図 8B)⁴⁴⁾。

一方、CD163 を介した Hb・Hp 複合体の結合と取り込みは、細胞内 IL-10 産生、HO-1 産生を誘導することが明らかにされており、このような貪食細胞によるスカベンジャー機能が直接炎症制御と関わっていることが示唆されている^{45,46)}。このような CD163 発現は末梢血単球亜群では CD16^{low}CCR2⁺ 単球に特徴的であり、CD16^{high}CCR2⁻ 亜群においては極めて低レベルの CD163 発現しか観察されない (図 8C)。我々の *In vitro* における検討では、末梢血単球の CD163 発現がステロイドにより著しく亢進すること、ステロイド処理後の単球は Hb・Hp 複合体を結合し、HO-1 産生が誘導されること

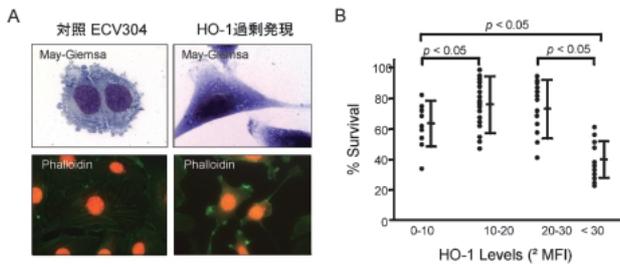


図7 HO-1 遺伝子導入と細胞傷害³⁵⁾

A; 対照 ECV304 と遺伝子導入により HO-1 を過剰発現した ECV304 の形態. HO-1 過剰発現により, ECV304 のアクチン分布の異常と細胞接着の低下が観察された. 図上は May-Giemsa 染色, 図下は phalloidin-FITC によりアクチン線維を染色, さらに propidium iodide で核をオレンジ色に染色した. B; 酸化ストレスに対する感受性は低レベルの HO-1 発現で低下したが, 過剰な HO-1 発現により感受性が亢進, 細胞死が促進した.

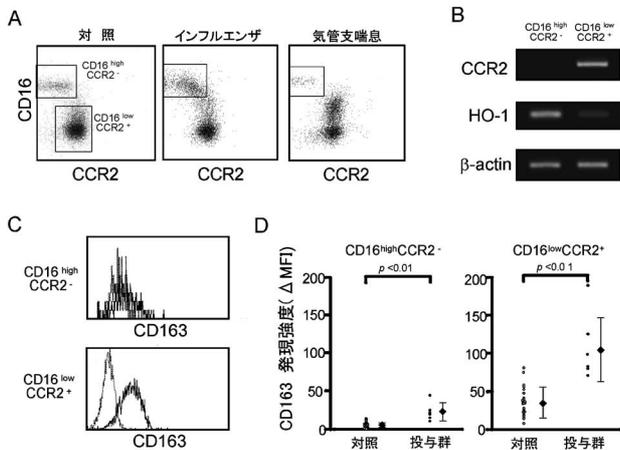


図8 単球亜群と HO-1 産生

A; 末梢血単球は $CD16^{high}CCR2^{-}$ の minor 亜群と $CD16^{low}CCR2^{+}$ major 亜群より構成されている. 急性炎症性疾患であるインフルエンザでは minor 亜群が著しく増加, 気管支喘息発作ではむしろ減少している. B; 異なる単球亜群による HO-1 mRNA 発現. PCR による検討では, $CD16^{high}CCR2^{-}$ 単球に選択的に HO-1 mRNA 発現が確認された. C; 異なる末梢血単球亜群による CD163 発現プロフィール. D; ストロイド剤投与患者ならびに対照の末梢血単球亜群の CD16 発現レベルを平均蛍光強度で示した.

が示された. *In vivo* においても, ステロイド剤投与中の患者では末梢血単球の CD163 発現が著しく亢進していることが示された (図 8D). したがって生体が極めて強いストレスに曝され, 内因性ステロイドが供給された場合, さらに溶血などによりヘム蛋白が一定レベル存在する状況では, Hb・Hp 複合体の CD163 への結合を介して $CD16^{low}CCR2^{+}$ 単球がむしろ強い炎症制御機能を発揮することが予想される. これらの事実は, 生体内で生理的刺激により恒常的に HO-1 を産生し, 感染や炎症によりその機能を増強させる $CD16^{high}CCR2^{-}$ 単球亜群と, 外傷や外科的侵襲など組織や臓器に対する極め

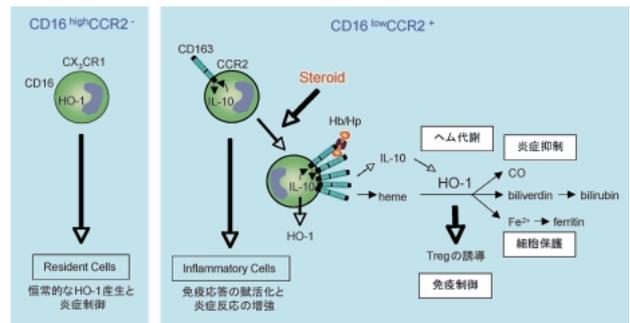


図9 末梢血単球の異なる亜群と炎症制御における機能的相違

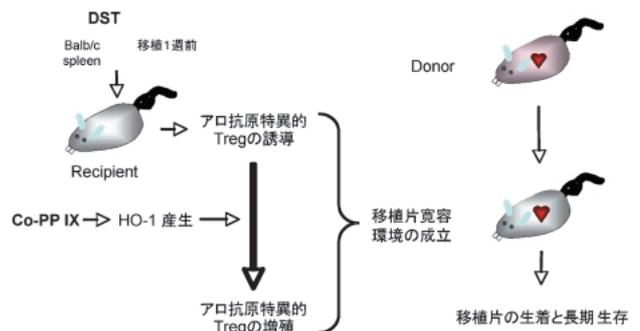


図10 HO-1 によるアロ抗原特異的 Treg の増殖誘導⁴⁴⁾

ドナー脾臓の移入によりあらかじめアロ抗原特異的 Treg を誘導した後, Co-PP IX 処理により HO-1 産生を誘導すると, Treg の活性化と増殖が惹起される. このような処置の後, 心移植の成績が著明に向上する.

て強い損傷の際に HO-1 産生が誘導される $CD16^{low}CCR2^{+}$ 単球亜群が, 明確に異なる役割を果たしている可能性を示している. したがって, HO-1 産生誘導を標的とした抗炎症戦略を考える場合, どのような細胞を標的とするか, どのような病態を対象とするかなどにより介入の方法が全く異なる可能性があり, 治療戦略を考える上では重要な課題となる (図 9).

VII. HO-1/CO システムと免疫制御

細胞保護や炎症抑制の他に HO/CO システムの役割として注目されているのは, それが直接免疫応答の制御に関与している可能性である. HO/CO システムと免疫制御が最も顕著な形で示されているのは, Harvard 大学の F. H. Bach を中心とした研究チームによる移植拒絶反応の制御に関わる HO/CO システムと Treg の関与に関する研究である^{47~49)}. 彼らの一連の研究から, HO/CO 産生の誘導により臓器移植が著明に抑制されること, そのような免疫寛容の誘導が HO/CO システムを介した IL-10 産生や, Treg 機能の亢進と密接に関連していること

が示唆されている。特に最近 Yamashita らは異なる系統のマウス間の心臓移植のシステムを用いて、アロ抗原特異的免疫寛容の誘導に HO/CO システムが重要な役割を果たすことを示している⁵⁰。彼らは移植術施行前にドナー脾細胞を投与することにより、レシピエントマウスにアロ抗原特異的 Treg を誘導した。さらに、レシピエントに Co-PP IX を投与することにより HO-1 産生を誘導、これによりアロ抗原特異的 Treg の著しい増殖と強い免疫寛容を誘導することに成功した (図 10)。しかしながら、このような HO/CO システムによる Treg の誘導に単球/マクロファージ/樹状細胞がどのように関与しているかについてはまだ十分な知見が示されておらず、今後の検討が必要である。一方で、血液幹細胞移植後において Treg は免疫機能再構築や GVHD の抑制、自己免疫疾患発症抑制など、正常な生体防御機構の確立に重要な役割を果たすことが示されている⁵¹⁻⁵⁴。これまでのところ、血液幹細胞移植における HO-1 の役割を直接示す報告はなされていない。しかし、化学療法や移植前処置に伴う臓器傷害が必須であり、免疫担当細胞の速やかな再構築が望まれる血液幹細胞移植においては、HO-1 を介した Treg 機能の増強が臓器移植における以上に重要であると考えられる。

VIII. おわりに

HO は当初、ヘム蛋白の蓄積による細胞傷害と、それにより惹起される二次的な炎症を防御する役割を有するヘム代謝酵素の一つにすぎないと考えられていた。しかしこれまでに述べてきたように、HO は多様な生理活性を介し生体防御の様々な側面に重要な影響を与えていることが明らかにされつつある。このような HO の働きを巧みに調節することにより、多様な炎症病態に対してこれまでとは異なる治療的アプローチが可能となると考えられ、今後の研究の発展が望まれる。

文 献

- 1) Akira, S. and Takeda, K. : Toll-like receptor signaling. *Nat. Rev. Immunol.* **4** : 499-511, 2004.
- 2) Ulevitch, R. J. : Therapeutics targeting the innate immune system. *Nat. Rev. Immunol.* **4** : 512-520, 2004.
- 3) Ehlers, M., Ravetch, J. V. : Opposing effects of Toll-like receptor stimulation induce autoimmunity or tolerance. *Trends. Immunol.* 2006 in press.
- 4) Jiang, H., Chess, L. : Regulation of immune responses by T cells. *N. Engl. J. Med.* **354** : 1166-1176, 2006.
- 5) Ziegler, S. F. : FOXP3 : Of mice and men. *Annu. Rev. Immunol.* **24** : 7.1-7.18, 2006.
- 6) Levings, M. K., et al. : Functional dynamics of naturally occurring regulatory T cells in health and autoimmunity. *Adv. Immunol.* **92** : 119-155, 2006.
- 7) Müllauer, L., et al. : Mutations in apoptosis genes : a pathogenetic factor for human disease. *Mut. Res.* **488** : 211-231, 2001.
- 8) Su, M. A. and Anderson, M. S. : Aire : an update. *Curr. Opin. Immunol.* **16** : 746-752, 2004.
- 9) Kastner, D. L. and O'Shea, J. J. : A fever gene comes in from cold. *Nat. Genet.* **29** : 241-242, 2001.
- 10) Inohara, N. and Nuñez, G. : NODS : Intracellular proteins involved in inflammation and apoptosis. *Nat. Rev. Immunol.* **3** : 371-382, 2003.
- 11) Tschopp, J., Martinon, F. and Burns, K. : NALPS : A novel protein family involved in inflammation. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **4** : 95-104, 2003.
- 12) Murray, P. J. : NOD proteins : an intracellular pathogen-recognition system or signal transduction modifiers? *Curr. Opin. Immunol.* **17** : 352-358, 2005.
- 13) Ogura, Y., Sutterwala, F. S. and Flavell, R. A. : The inflammasome : First line of the immune response to cell stress. *Cell* **126** : 659-662, 2006.
- 14) Mariathasan, S. and Monack, D. M. : Inflammasome adaptors and sensors : intracellular regulators of infection and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* **7** : 31-40, 2007.
- 15) Yachie, A., et al. : Oxidative stress caused enhanced endothelial cell injury in human heme oxygenase-1 deficiency. *J. Clin. Invest.* **103** : 129-135, 1999.
- 16) Maines, M. D. : Heme oxygenase : function, multiplicity, regulatory mechanism, and clinical applications. *FASEB. J.* **2** : 2557-2568, 1988.
- 17) Maines, M. D. : The heme oxygenase system : a regulator of second messenger gases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **37** : 517-554, 1997.
- 18) Okinaga, S., et al. : Regulation of human heme

- oxygenase-1 gene expression under thermal stress. *Blood* **87** : 5074-5084, 1996.
- 19) Cantoni, L., et al. : Interleukin-1 and tumor necrosis factor induce hepatic haeme oxygenase. *Biochem. J.* **279** : 891-894, 1991.
- 20) Yachie, A., et al. : Human HO-1 deficiency and the oxidative injury of vascular endothelial cells. Abraham, N. G., eds. Heme oxygenase in biology and medicine. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, pp325-341, 2002.
- 21) Kawashima, A., et al. : Heme oxygenase-1 deficiency : the first autopsy case. *Hum. Pathol.* **33** : 125-130, 2002.
- 22) Poss, K. D. and Tonegawa, S. : Heme oxygenase 1 is required for mammalian iron reutilization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **94** : 10919-10924, 1997.
- 23) Poss, K. D. and Tonegawa, S. : Reduced stress defense in heme oxygenase 1-deficient cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **94** : 10925-10930, 1997.
- 24) Morimoto, K., et al. : Cytoprotective role of heme oxygenase (HO)-1 in human kidney with various renal diseases. *Kidney Int.* **60** : 1868-1866, 2001.
- 25) Shimizu, M., et al. : Glomerular proteinuria induces heme oxygenase-1 gene expression within renal epithelial cells. *Pediatr. Res.* **58** : 666-671, 2005.
- 26) Yang, Y., et al. : Selective protection of renal tubular epithelial cells by heme oxygenase (HO)-1 during stress-induced injury. *Kidney Int.* **64** : 1302-1309, 2003.
- 27) Ohta, K., et al. : Tubular injury as a cardinal pathologic feature in human heme oxygenase-1 deficiency. *Am. J. Kidney Dis.* **35** : 863-870, 2000.
- 28) Yachie, A., et al. : Heme oxygenase-1 production by peripheral blood monocytes during acute inflammatory illnesses of children. *Exp. Biol. Med.* **228** : 550-556, 2003.
- 29) Goda, N., et al. : Distribution of heme oxygenase isoforms in rat liver. Topographic basis for carbon monoxide-mediated microvascular relaxation. *J. Clin. Invest.* **101** : 604-612, 1998.
- 30) Kristiansen, M., et al. : Identification of the haemoglobin scavenger receptor. *Nature* **409** : 198-201, 2001.
- 31) Willis, D., et al. : Heme oxygenase : a novel target for the modulation of the inflammatory response. *Nat. Med.* **2** : 87-90, 1996.
- 32) Ryster, S. W., Morse, D. and Choi, A. M. : Carbon monoxide and bilirubin : Potential therapies for pulmonary/vascular injury and disease. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 2006 in press.
- 33) Li, Y. X., et al. : Protection of human islets from induction of apoptosis and improved islet function with HO-1 gene transduction. *Chin. Med. J.* **119** : 1639-1645, 2006.
- 34) Liu, X., et al. : Heme oxygenase-1 (HO-1) inhibits postmyocardial infarct remodeling and restores ventricular function. *FASEB. J.* **20** : 207-216, 2006.
- 35) Shinohara, T., et al. : Adenovirus-mediated transfer and overexpression of heme oxygenase 1 cDNA in lungs attenuates elastase-induced pulmonary emphysema in mice. *Hum. Gene Ther.* **16** : 318-327, 2005.
- 36) Abraham, N.G. and Kappas, A. : Heme oxygenase and the cardiovascular-renal system. *Free Radical Biol. Med.* **39** : 1-25, 2005.
- 37) Yachie, A., et al. : Human HO-1 deficiency and cardiovascular dysfunction. Wang, R., eds. Carbon monoxide and cardiovascular functions. CRC Press, Boca Raton, pp181-212, 2002.
- 38) Maruhashi, K., et al. : Paradoxical enhancement of oxidative cell injury by overexpression of heme oxygenase-1 in an anchorage-dependent cell ECV304. *J. Cell. Biochem.* **93** : 552-562, 2004.
- 39) Frankenberger, M., et al. : Differential cytokine expression in human blood monocyte subpopulations. : a polymerase chain reaction analysis. *Blood* **87** : 373-377, 1996.
- 40) Katayama, K., et al. : CD14⁺ CD16⁺ monocyte subpopulation in Kawasaki disease. *Clin. Exp. Immunol.* **121** : 566-570, 2000.
- 41) Blumenstein, M., et al. : Cytokine production precedes the expression of CD16⁺ CD14⁺ monocytes in human sepsis : a case report of a patient with self-induced septicemia. *Shock* **8** : 73-75, 1997.
- 42) Kawanaka, N., et al. : CD14⁺ CD16⁺ blood monocytes and joint inflammation in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **46** : 2578-2586, 2002.
- 43) Geissman, F., et al. : Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity* **19** : 71-82, 2003.
- 44) Mizuno, K., et al. : Selective expansion of

- CD16^{high}CCR2⁻ subpopulation of circulating monocytes with preferential production of haem oxygenase (HO)-1 in response to acute inflammation. *Clin. Exp. Immunol.* **142** : 461-470, 2005.
- 45) Philippidis, P. et al. : Hemoglobin scavenger receptor CD163 mediates interleukin-10 release and heme oxygenase-1 synthesis. Antiinflammatory monocyte-macrophage responses in vitro, in resolving skin blisters *in vivo*, and after cardiopulmonary bypass surgery. *Circ. Res.* **94** : 119-126, 2004.
- 46) Abraham, M. G. and Drummond, G. : CD163-mediated hemoglobin-heme uptake activates macrophage HO-1, providing an anti-inflammatory function. *Circ. Res.* **99** : 911-914, 2006.
- 47) Soares, M. P., et al. : Expression of heme oxygenase-1 can determine cardiac xenograft survival. *Nat. Med.* **4** : 1073-1077, 1998.
- 48) Yamashita, K., et al. : Biliverdin, a natural product of heme catabolism, induces tolerance to cardiac allografts. *FASEB. J.* **18** : 765-767, 2004.
- 49) Bach, F. H. : Heme oxygenase-1 and transplantation tolerance. *Hum. Immunol.* **67** : 430-432, 2006.
- 50) Yamashita, K., et al. : Heme oxygenase-1 is essential for and promotes tolerance to transplanted organs. *FASEB. J.* **20** : 776-778, 2006.
- 51) Gerbitz, A., et al. : Induction of heme oxygenase-1 before conditioning results in improved survival and reduced graft-versus-host disease after experimental allogeneic bone marrow transplantation. *Biol. Blood Marrow Transplant.* **10** : 461-472, 2004.
- 52) Hess, A. D. : Modulation of graft-versus-host disease : role of regulatory T lymphocytes. *Biol. Blood Marrow Transplant.* **12** : 13-22, 2006.
- 53) Zorn, E. : CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells in human hematopoietic cell transplantation. *Semin. Cancer Biol.* **16** : 150-159, 2006.
- 54) Barrett, J. : Improving outcome of allogeneic stem cell transplantation by immunomodulation of the early post-transplant environment. *Curr. Opin. Immunol.* **18** : 592-598, 2006.