

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 5 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591531

研究課題名(和文) ヒトヘムオキシゲナーゼ(HO) - 1欠損症の第2例目発見：HO - 1の機能的本質

研究課題名(英文) The discovery of the second case of human heme oxygenase-1 deficiency: biological evidence of HO-1 enzyme

研究代表者

小泉 晶一 (KOIZUMI, SHOICHI)

金沢大学・その他部局等・名誉教授

研究者番号：50019973

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：ヘムオキシゲナーゼ1(HO-1)はヘム代謝における律速酵素で、生体に対する抗酸化作用を示す。1999年にわれわれは世界で初めて「ヒトHO-1欠損」症例を発見したが、その後2011年に第2例目、さらに本研究期間に入って、3例の追加症例報告があった。5例とも全身性炎症、無脾症、血管内皮障害、高血圧を発症し、溶血性貧血、低ビリルビン血症、血小板増加、腎障害を認めた。以上から、HO-1欠損症は新たな全身性炎症疾患概念を確立するものであることを示唆する。

研究成果の概要(英文)：Heme oxygenase-1(HO-1) is the rate-limiting enzyme to metabolize heme, showing antioxidant effects. In 1999, we reported the first case of human HO-1 deficiency. After the 2nd case was discovered in 2011, the 3 subsequent cases have been reported so far. All 5 patients with HO-1 deficiency were characterized by recalcitrant systemic inflammation, asplenia, microangiopathy and hypertension. Clinical data show hemolytic anemia with low serum bilirubin, thrombocytosis and evidences of renal tissue injury. From these data we would like to introduce HO-1 deficiency as a novel autoinflammatory disease.

研究分野：小児血液感染免疫学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：ヘムオキシゲナーゼ、ヘムオキシゲナーゼ1欠損症、炎症、血管炎、腎尿細管、溶血性貧血、血管内皮細胞、ビリルビン代謝

1. 研究開始当初の背景

ヒトヘムオキシゲナーゼ (H0) はヘムをビリベルディンを経てビリルビンに代謝する律速酵素である。その間、CO と鉄を遊離する。H0 は H0-1 と H0-2 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いた。H0-2 が脳、睾丸ほか全身に恒常的に発現しているのに対して、H0-1 は感染、低酸素などのストレス暴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、主にヘムの生体に対する酸化ストレスを防御する因子として重要であると考えられていた。さらに H0-1 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知られている。

1998 年にわれわれは従来全く報告のない新しい疾患「ヒトヘムオキシゲナーゼ 1 (H0-1) 欠損症」を発見した。(Yachie ら、1999)。H0-1 欠損症の致死的な臨床病態は下記に示すごとくであるが、それによってノックアウトマウスなどの動物では明らかであったものの、ヒトでは証明されていなかった H0-1 の広範な生理的重要性が初めて臨床的に確認された。その後十余年を経て、2011 年、ようやくインドから第 2 例目が発見報告された。この 2 症例を振り返ってみると、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傷害が疑われた。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、いずれも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、ビリルビンの上昇が全くみられず、低ビリルビン血症を呈し、さらに血中ハプトグロビンが低下せず、逆に高値が認められた。

ことからヘム代謝の異常が疑われ、その代謝経路上の律速酵素である H0-1 に焦点があてられたわけである。患児で認められた異常な症状は、本酵素の欠損によって種々のストレスに対する防御機構、特に過剰に蓄積したヘムの酸化毒性が、主に全身の血管内皮細胞を破綻させたことによるものと考えられた。平成 11～12 年度、13～14 年度、17～19 年度、20～22 年度にわたる基盤研究および萌芽的研究によって明らかになったことは、生体では H0-1 が造血系、特に単球、そして腎尿細管、心血管系内皮細胞等の生理的機能発現とその恒常性の維持に極めて重要であるということである。

しかしながらこれまでは、ヒト H0-1 欠損症は 2 例に過ぎず、H0-1 の生理的役割を詳細に解明するためにはいかに不十分であり、さらに第 3 例目、第 4 例目を発見し、症例を蓄積することが是非とも必要であった。

2. 研究の目的

以上の背景を踏まえて、本研究では、H0-1 の生理的意義をより深く解明するために、下記の研究を行うことを目的とした。

(1) ヒト H0-1 欠損症は 2 症例のみであり、この疾患の全体臨床像をつかみきれてはいない。さらに第 3 例目、第 4 例目を発見して症例を蓄積し、ヒトにおける H0-1 欠損症の臨床病態を検討し、よって H0-1 の生理機能面における本質的意義を明らかにする。

(2) さらに症例を発見するためのスクリーニング法としては、これまでの研究から、末梢血の単球をターゲットとし、新しい方法として、多次元表現フローサイトメトリー法での単球の分画を試み、単球におけるストレス誘導性の H0-1 発現をチェックする。単球をターゲットとする理由は、われわれの第 1 例において、H0-1 を欠損する単球では細胞接着や貪食に関与する表面抗原が低下しており、そのことが機能障害を惹起しているものと思われたからである。

(3) 小児感染症において、細菌性感染症や、インフルエンザなどのウイルス疾患、さらに血管性病変である川崎病、自己免疫性疾患、自己炎症性疾患における末梢血単球の H0-1 発現の差異を検討することにより、種々の炎症性疾患の病態の特異性と防御機構を解明する。

(4) H0-1 欠損は腎疾患の病態にも極めて深刻な影響を及ぼすことはわれわれの第 1 例目で明らかであった。これまでに引き続いて本研究では、各種腎炎やネフローゼなどの病態における H0-1 の重要性を研究する。

(5) これまで発見された H0-1 欠損症の 2 例とも無脾症が証明された。極めて特異的な臨床的表現形質であり、そのメカニズムの解明が期待される。H0-1 は胎生期の胎盤成熟にも重要であることが推測されていることもかんがみ、本研究では、血管発生、および臓器の分化成熟における H0-1 遺伝子の発現の関連性を探り、H0-1 に関する本研究を総括する。

3. 研究の方法

(1) H0-1 欠損症の臨床像の詳細な検討と、生体材料の提供を受けて、臓器組織別に H0-1 の蛋白発現を免疫染色法で明らかにする。

(2) H0-1 欠損症の新しい症例発見のために、多種の抗体を使用した多カラーフローサイトメトリー法で単球を分画し、単球表面の H0-1 発現の有無を観察することで、より詳細なスクリーニング法を開発し、実施する。

(3) 以上のテクニークで、世界中の研究機関と協力しながら更なる新しい症例発掘に努めた。その結果が第 3, 4, 5 例目の発見につながったものと思われた。

(4) 小児感染症や腎疾患他、自己免疫性疾患、全身性自己炎症疾患を対象に、血液単球および生検組織材料を使用して、フローサイトメトリー法や免疫染色法で H0-1 蛋白発現を検討し、疾患の病態制御と H0-1 との相関を検討する。

(5) 発見された H0-1 欠損症の末梢血を用いて H0-1 遺伝子解析を実施し、遺伝子変異と臨床病態との相互関係を検討する。

4. 研究成果

下記の研究成果を得た。

(1) われわれの発見した第 1 例目患児 (男児) の肝臓ほかの生検材料や、不死化リンパ球細胞株で H0-1 の発現が認められないことと、そして下記のごとくの H0-1 遺伝子変異から本疾患が確立された。

(2) 患児および両親の H0-1 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詳細に解析したところ、エクソン 2 を含む 1730bp におよぶ大きな欠損が証明された。そして、エクソン 2 は Alu くり返し配列には含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。なお H0-1 mRNA の発現は確認された。

(3) われわれの第 1 例発見から十年余を経てようやく第 2 例目 (女児) がインドから発見報告された。無脾症であることなど臨床症状に類似性が高い。本例は軽症で 15 歳を超えて比較的元気で生存していたが、その後第 1 例目と同様に全身性炎症、腎障害、溶血性貧血が進行し、結局頭蓋内出血、多臓器不全で死亡した。この症例の遺伝子解析もわれわれの研究室で実施した。エクソン 2 の R44X ミスセンス変異がホモでみられストップコドンとなっており第 1 例目とは異なっていた。症例が複数になることで H0-1 欠損症の症状と遺伝子異常の多様性が明らかになってきた。

(雑誌論文)

(4) 第 3, 4, 5 例目はいずれもインドで発見された。第 3 例目 (男児) は生後 6 か月ころから反復する発熱があり、結核の治療がなされたが効果はなかった。腎障害、白血球

増多、血小板増多、血管内溶血、溶血性貧血が増悪し、2歳ころ死亡した。遺伝子異常はR44Xのホモである。(学会発表)

(5) 第4例目(男児)は10歳で1~2か月続く発熱、コカコーラ色の尿で気付かれた。溶血性貧血、白血球増多、有核赤血球、血小板増多、ビリルビン正常値などの特徴が認められている。遺伝子異常はR44Xのホモである。

(6) 第5例目(女児)は7歳ころより発熱が持続した。溶血性貧血が遷延し、腎障害を認めている。現在9歳で軽度の発育障害がみられる。超音波とCT検査で無脾症が確認された。遺伝子異常はR44Xのホモである。

(7) 以上のこれまでに発見報告された5例のH0-1欠損症の病態像を列挙すると次のようになる。長期に遷延する反復性の発熱、

無脾症(心臓疾患を伴わない)、重篤な溶血性貧血、しかしビリルビン上昇を認めない腎障害に伴う血尿と蛋白尿、高血圧、および脳出血、顔貌の異常:額の突出、白血球増多、および血小板増多、血清フェリチン高値、LDHおよび肝逸脱酵素高値(AST>>ALT)、全身性炎症マーカーの上昇、などである。

(8) in vitro 研究からは、単球細胞表面抗原の異常、貪食能の低下が認められた。また、単球のHb/Hp/CD163コンプレックスがH0-1誘導と強く相関することがわかった。

(9) 各種腎疾患の生検材料、及びin vitro 細胞株の検討から、特に腎尿細管上皮におけるH0-1発現が各種腎病態で異なっていた。すなわち、腎尿細管上皮がH0-1を介してストレスを効率的に防御していることが示唆された。(雑誌論文)

(10) また、腎生検によらずに、尿沈査細胞におけるH0-1発現を免疫染色法で観察することで、腎疾患の重症度を推定することができることが知れた。(雑誌論文)

(11) 全身性若年性特発性リウマチ患者

(JIA)でCD163/H0-1系統を検討した。これは自己免疫性疾患および自己炎症性疾患におけるマクロファージ活性化と密接な関連が示唆されるが、H0-1はJIAの活動期のみならず比較的沈静期においても高値であった。他のバイオマーカーと比較することによりJIAの重症度判定にH0-1が有用であることがわかった。(雑誌論文)

(12) 以上、H0-1欠損症患者の臨床像の詳細な観察、およびin vitro 研究から、H0-1欠損症では全身性炎症、血管内皮細胞障害による多臓器組織障害が引き起こされていることが認識され、このことからH0-1欠損症は新しい自己炎症性疾患概念の確立を示唆するものであり、よって新しい治療戦略が求められることになろう。これらの研究成果は特にヨーロッパ先天性免疫不全症会議(ESID 2012)で発表され大きな反響を得られた。(学会発表)

今後はさらに臨床症例の発見に努め、臨床病態像の詳細を明らかにするとともに、その背景の複数の遺伝子異常との関連を検討しなければならない。本症の特徴の一つに無脾症がある。私信だが、アメリカでは新たなるH0-1遺伝子欠損マウスの作成が試みられており、その目的はヒトの胎生期に、脾臓の発生がH0-1遺伝子に依存している可能性を探ろうとするものである。この遺伝子操作実験が、無脾症とH0-1欠損の関連を明らかにしてくれるかもしれない。一方、Casanovaらは先天性心疾患のない無脾症単独症例を20~30症例見つけており、その原因遺伝子としてRPSAを検索している。H0-1遺伝子とRPSA遺伝子との関連も研究しなければならない。

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11件)

Ikawa, Y., Nishimura, R., Kuroda, R.,

Mase, S., Araki R., Maeba, H., Wada, T.,

Toma, T., Koizumi, S., Yachie, A.,
Expansion of a liver-infiltrating cytotoxic
T-lymphocyte clone in concert with the
development of hepatitis-associated
aplastic anemia, 査読有, Brit J
Haematol, 161(4), 2013, 599-602
Shimizu, M., Niida, Y., Koizumi, S.,
Yachie, A., An infant with recurrent
convulsive seizures of 3 weeks duration:
Questions, 査読有, Pediatr Nephrol
published online: 13 September 2013
DOI 10.1007/s00467-013-2615-4
Shimizu, M., Niida, Y., Koizumi, S.,
Yachie, A., Long-term follow-up of a case
of hypomagnesemia with secondary
hypocalcemia caused by novel TRPM6
mutation, 査読有, Pediatric Nephrology,
in press
Sugimoto, N., Matsuzaki, K., Ishibashi, H.,
Tanaka, M., Sawaki, T., Fujita, Y.,
Kawanami, T., Masaki, Y., Okazaki, T.,
Sekine, J., Koizumi, S., Yachie, A., Shido,
O., Upregulation of aquaporin
expression in the salivary glands of
heat-acclimated rats, 査読有, Scientific
Reports, 3: 1763, 2013
Shimizu M., Yachie, A.,
Compensated inflammation in
systemic juvenile idiopathic arthritis:
role of alternatively activated
macrophages, 査読有, Cytokine,
60(1), 2012, 226-232
Radhakrishnan, N., Yadav, S.P.,
Sachdeva, A., Pruthi, P.K., Sawhney, S.,
Piplani, T., Wada, T., Yachie, A., Human
Heme oxygenase (HO)-1 deficiency
presenting with hemolysis, nephritis and
asplenia, 査読有, J Pediatr Hematol
Oncol, 33(1), 2011, 74-78
Yokoyama, T., Shimizu, M., Ohta, K.,

Yuno, T., Okajima, M., Wada, T., Toma, T.,
Koizumi, S., Yachie, A., Urinary heme
oxygenase-1 as a sensitive indicator of
tubulointerstitial inflammatory damage in
various renal diseases, 査読有, Am J
Nephrol, 33, 2011, 414-420

[学会発表] (計 20件)

Araki, R., Nishimura, R., Maeba, H.,
Kuroda, R., Fujii, T., Mase, S., Koizumi,
S., Yachie, A., Protective role of host
mast cells against acute graft-versus-host
disease, 55th Annual Meeting of
American Society of Hematology,
2013, 12, 7-10, New Orleans (USA)
Mase, S., Nishimura, R., Kuroda, R.,
Fujii, T., Araki, R., Maeba, H., Koizumi, S.,
Yachie, A., IFN-gamma-mediated
elimination of host DCs by cytokine
induced killer cells leads to less GVHD,
55th Annual Meeting of American Society
of Hematology, 2013, 12, 7-10, New
Orleans (USA)
Kuroda, R., Nishimura, R., Mase, S., Fujii,
T., Araki, R., Maeba, H., Koizumi, S.,
Yachie, A., Monitoring of CD4+ T-cell
receptor repertoire helps manage the
patients with prolonged GVHD, 55th
Annual Meeting of American Society of
Hematology, 2013, 12, 7-10, New
Orleans Convention Center (USA)
Yachie, A., Yokoyama, T., Shimizu, M.,
Ohta, K., Toma, T., Wada, T.,
Radhakrishnan, N., Sachdeva, A., Yadav,
S.P., Heme oxygenase-1 deficiency : a
novel autoinflammatory disease,
associated with systemic inflammation,
accelerated tissue injury and endothelial
dysfunction, 15th Biennial Meeting of
the European Society of
Immunodeficiencies (ESID 2012),

2012,10,3-6, Florence Convention Center
(Italy)

Mase,S., Kuroda,R., Maeba,H., Araki,R.,

Fujiki,T., Koizumi,S., Yachie,A.,

Nishimura,R., Allogeneic

cytokine-induced killer cells kill dendritic

cells efficiently resulting in less

graft-versus-host disease, 38th Annual

meeting of the European group for blood

and marrow transplantation (EBMT),

2012,4,1-4, Geneva Convention Center

(Switzerland)

Morishita,E., Maruyama,K., Takami,A.,

Onizuka,M., Kawase,T., Morishima,Y.,

Fukuda,T., Kodera,Y., Ohtake,S.,

Yachie,A., Nakao,S., A genetic variation

in the heme oxygenase-1 gene predicts the

outcome of HLA-fully-matched unrelated

bone marrow transplantation, 53rd Annual

Meeting of American Society of

Hematology, 2011,12,9-11, San Diego

Convention Center (USA)

[その他]

ホームページ等

<http://web.kanazawa-u.ac.jp/~med2>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

小泉 晶一 (KOIZUMI SHOICHI)

金沢大学・名誉教授

研究者番号：50019973

(2)研究分担者 なし

(3)連携研究者

谷内江 昭宏 (YACHIE AKIHIRO)

金沢大学・医学系・教授

研究者番号：40210281

和田 泰三 (WADA TAIZOU)

金沢大学・医学系・講師

研究者番号：30313646

西村 良成 (NISHIMURA RYOUSEI)

金沢大学・医学系・講師

研究者番号：50324116

杉本 直俊 (SUGIMOTO NAOTOSHI)

金沢大学・医学系・准教授

研究者番号：80272954

大田 邦雄 (OHTA KUNIO)

金沢大学・医学系・准教授

研究者番号：00303280

新井田 要 (NIIDA YO)

金沢大学・金沢医科大学・准教授

研究者番号：40293344

清水 正樹 (SHIMIZU MASAKI)

金沢大学・医学系・講師

研究者番号：10401902