

平成23年4月27日現在

機関番号：13301  
 研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2008～2010  
 課題番号：20591275  
 研究課題名（和文） ヘムオキシゲナーゼ1の造血系および免疫系調節機構における生理的重要性  
 研究課題名（英文） Physiological importance of heme oxygenase-1 on hemopoiesis, inflammation and immunology system  
 研究代表者  
 小泉 晶一 (KOIZUMI SHOICHI)  
 金沢大学・子どものこころの発達研究センター・特任教授  
 研究者番号：50019973

## 研究成果の概要（和文）：

ヘムオキシゲナーゼ1 (HO-1) はヘムを一酸化炭素(CO)とビリルビンとフェリチン(Fe より誘導される)に代謝する律則酵素である。われわれが世界で初めて発見した「ヒトHO-1欠損」症例(1999)は2歳頃からの全身性慢性炎症が増悪し6歳で死亡した。本症例及びその後海外で発見された症例の詳細な病態解析と *in vitro* 実験的研究によって、HO-1欠損症の臨床病態が明らかにされるとともに、HO-1の造血系および感染免疫系調節機構における生理的重要性が強く認識された。

## 研究成果の概要（英文）：

Heme oxygenase-1(HO-1) is the rate-limiting enzyme that adds an oxygen molecule to the porphyrin ring of heme, thereby catalyzing to biliverdin, free iron (finally to bilirubin and ferritin, respectively) and carbon monoxide. In 1999, the first case of human HO-1 deficiency was reported by Yachie et al. at our Department of Pediatrics, Kanazawa University Hospital. The male patient suffered from generalized severe inflammation since the age of 2, and died at 6 years of age. Quite recently the 2nd case was discovered and reported. Aggressive clinical and patho-physiological studies about these two cases and some experimental investigations have shown detailed clinical findings of HO-1 deficiency and revealed that the HO-1 enzyme is crucial for development and growth of human beings on hematopoiesis, immunological system and the defense mechanism against inflammation and oxidative stresses.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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、炎症、血管炎、内皮細胞、ヘモグロビン

## 1. 研究開始当初の背景

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 (HO-1)欠損症」を発見した。金沢発世界初の症例である(Yachieら、1999)。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HO-1の広範な生理的重要性が初めて臨床的に確認された。症例を振り返ってみると、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、フォンウィルブランド因子、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、6歳時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、逆に高ハプトグロビン血症が認められることから、ヘム代謝の異常が疑われた。

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、C0 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、辜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、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 H0-1 は C0 を合成し、C0 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。患児で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が全身にわたって破綻したものと考えられた。平成11～12年度、13～14年度、17～19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、H0-1 が造血系、特に単球、腎尿細管、心血管系内皮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 欠損症はわれわれの1例のみで、H0-1 の生理的役割をさらに詳細に解明するためにはいかにも不十分であり、第2例目、第3例目を発見し、症例を蓄積することが是非とも必要である。

## 2. 研究の目的

以上の背景を踏まえて、本研究では、H0-1 の造血系および感染免疫系における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 欠損症はわれわれの症例1例のみであり、この疾患の全体像をつかみきかれてはいない。さらに第2例目、第3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食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) 単球系細胞の分画、分離には、CD14, CD16、その他種々の表面形質に対する単クローン抗体を使用する。

(4) 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。

(5) 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。

(6) 近年、悪性腫瘍性疾患の進行具合や転移などのメカニズムとして、単球とともに、制御性T細胞におけるH0-1 の発現が注目されている (Andersen ら、2009)。小児がんや白血病において動員されている細胞群のH0-1 発現を検討し、がんの進行度や悪性度との相関をみる。

(7) H0-1 は臓器移植において拒絶反応を抑制する働きがあること (Soares ら、1998) や、造血系細胞移植後の骨髄再生、免疫機能再構築に重要な働きを担っていることが示唆されている。本研究では、移植後の単球系細胞分画やT細胞分画の H0-1 発現を経時的に観察し、免疫機能再構築との関連を明らかにする。IL-6 や TNF-alpha、その他のサイトカインも測定し、H0-1 との関連性を検討する。

(8) 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最近報告されている (Zhao ら、2009) こともかんがみ、本研究では、血管発生、および生体発生にかかわる基本的な遺伝子群の発現と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、多量の抗体を使用した多カラーフローサイ

トメトリ法で単球を分画し、単球表面のHO-1発現の有無を観察することによる、より詳細なスクリーニング法を開発し、実施する。

(3) 小児感染症や腎疾患他、自己免疫性全身性炎症疾患を対象に、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法や免疫染色法でHO-1蛋白発現を検討し、疾患の病態制御とHO-1との相関を検討する。

(4) 小児がん組織や造血細胞移植後の骨髄細胞分画におけるHO-1発現をフローサイトメトリ法や免疫染色法で解析し、がんの制御や骨髄再生メカニズムへのHO-1の関与を解明する。

#### 4. 研究成果

下記の研究成果を得た。

(1) 患児の肝臓ほかの生検材料や、不死化リンパ球細胞株でHO-1の発現が認められないことと、そして下記のごとくのHO-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詳細に解析したところ、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。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。

尚、HO-1 mRNAの発現は確認された。

(3) HO-1欠損症の臨床特徴は、主として造血系単球と血管内皮細胞及び腎尿細管細胞の障害に起因する。

(4) HO-1欠損症では、外因性酸化ストレスによって、全身性炎症と凝固線溶系の著しい亢進を惹起し、ストレスが長期に継続すると、免疫系や凝固線溶系が消耗、破壊される。

(5) 単球細胞表面抗原の異常、食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HO-1誘導と強く相関することがわかった。

(6) 各種腎疾患の生検材料、及びin vitro細胞株の検討から、HO-1は腎尿細管上皮がストレス防御に有効に働いていることが強く示唆された。

(7) マウス骨髄移植実験で、IL-17ノックアウト(KO)マウス骨髄細胞と野生型(WT)マウス骨髄細胞を比較すると、IL-17KO細胞を移植した場合慢性GVHDが軽減された。即ち、IL-17細胞は移植中期から後期におけるGVHD病態形成に深く関与しており、IL-17を中和することによる慢性GVHDの予防・治療への応用が期待される。

(8) GM-CSFで大量培養した樹状細胞にPUVA

処置を施すことによって“制御性”樹状細胞への形質転換が容易に可能であることが示された。この制御性樹状細胞はリンパ球混合培養反応(MLR)を有意に抑制したことから、GVHD予防の臨床応用に期待が持たれる。

(9) 乳児白血病のCD10表面抗原陰性例では広範な遺伝子メチル化が関与していることが知れた。

(10) われわれの第1例発見から十年余を経てようやく第2例目が発見報告された(雑誌論文①)。この症例にはわれわれも遺伝子解析で協力した。エクソン2(R44X)の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いた。無脾症であることなど臨床症状に類似性が高い。ただし、軽症で15歳を超えて比較的元気で生存している。これは遺伝子変異箇所の違いによるのかもしれない。症例が複数になることでHO-1欠損症の症状が多様である可能性が示唆された。

今後、さらに新しい症例の発見に努め、HO-1欠損症の病態のより詳細な解明を進展させることにより、HO-1の生体における生理的重要性を明らかにしていきたい。

#### 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 Human heme oxygenase (HO)-1 deficiency presenting with hemolysis, nephritis and asplenia. Nita Radhakrishnan, Satya Prakash Yadav, Anupam Sachdeva, Praveen K Pruthi, Sujata Sawhney, Tarun Piplani, Taizo Wada, Akihiro Yachie (査読有)

J Pediatr Hematol Oncol 2011 Jan;33(1):74-81.

② Dense methylation of type 1 and type 2 regulatory regions of the CD10 gene promoter in infant acute lymphoblastic leukemia with MLL/AF4 fusion gene.

Ikawa Y, Sugimoto N, Koizumi S, Yachie A, Saikawa Y.

J Pediatric Hematology Oncology 32(1): 4-10, 2010 (査読有)

③ Long-term results of Japanese Childhood Cancer and Leukemia Study Group studies 811, 841, 874 and 911 on childhood acute lymphoblastic leukemia.

Tsurusawa M, Shimomura Y, Asami K, Kikuta A, Watanabe A, Horikoshi Y, Matsushita T, Kanegane H, Ohta S, Iwai A, Mugishima H, Koizumi S. Leukemia 24: 335-344, 2010 (査読有)

④ Hikata T, Takaishi H, Takito J, Hakozaki A, Furukawa M, Uchikawa S, Kimura T, Okada Y, Matsumoto M, Yoshimura A, Nishimura R, Reddy SV, Asahara H, Toyama Y. PIAS3 negatively

regulates RANKL-mediated osteoclastogenesis directly in osteoclast precursors and indirectly via osteoblasts. *Blood* 2009 5;113(10):2202-12. (査読有)

⑤ Detection of T lymphocytes with a second-site mutation in skin lesions of atypical X-linked severe combined immunodeficiency mimicking Omenn syndrome. Wada T, Yasui M, Toma T, Nakayama Y, Nishida M, Shimizu M, Okajima M, Kasahara Y, Koizumi S, Inoue M, Kawa K, Yachie A. *Blood* 112(5): 1872-1875, 2008 (査読有)

⑥ Lead-pipe colon revisited in chronic graft-versus-host disease.

Saikawa Y, Ikawa Y, Kagaya T, Koizumi S. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 46(5): 483, 2008 (査読有)

⑦ Right homonymous hemianopsia following allogeneic haematopoietic stem cell transplantation.

Saikawa Y, Horisawa T, Mase S, Araki R, Ikawa Y, Kuroda R, Nishimura R, Koizumi S. *Eur J Haematol*. 2008 Jun;80(6):551. (査読有)

⑧ Human heme oxygenase-1 deficiency: A lesson on serendipity in the discovery of the novel disease. Koizumi S. *Pediatrics International* 49(2):125-132, 2008 (査読有)

⑨ Nishimura R, Baker J, Beilhack A, Zeiser R, Olson JA, Segal EI, Karimi M, Negrin RS. In vivo trafficking and survival of cytokine-induced killer cells resulting in minimal GVHD with retention of antitumor activity. *Blood* 2008 15;112(6):2563-74. (査読有)

⑩ Beilhack A, Schulz S, Baker J, Beilhack GF, Nishimura R, Baker EM, Landan G, Herman EI, Butcher EC, Contag CH, Negrin RS. Prevention of acute graft-versus-host disease by blocking T-cell entry to secondary lymphoid organs. *Blood* 2008 1;111(5):2919-28. (査読有)

[学会発表] (計 15 件)

① Expansion of Liver-Infiltrating CTL Clone In Concert with the Development of Hepatitis-Associated AA.

Yasuhiro Ikawa, Ryosei Nishimura, Shintaro Mase, Rie Kuroda, Raita Araki, Hideaki Maeba, Masaki Shimizu, Taizo Wada, Tomoko Toma, Shoichi Koizumi, Akihiro Yachie

53rd annual meeting of the American Society of Hematology. 2010.12.10, San Diego Convention Center, USA

② Potent Strategy for Treatment of Gvhd and Autoimmune-Diseased by Infusion of Donor-Typed or Even Third-Party Tolerogenic Dendritic Cells by Psoralen Plus UVA Treatment. Hideaki Maeba, Ryosei Nishimura, Rie Kuroda, Raita Araki, Shintaro Mase, Yasuhiro Ikawa,

Akihiro Yachie, Shoichi Koizumi,

53rd annual meeting of the American Society of Hematology. 2010.12.10, San Diego Convention Center, USA

③ Cytokine-Induced Killer Cells Facilitate Immune Reconstitution After Allogeneic BMT In Mice.

Shintaro Mase, Ryosei Nishimura, Rie Kuroda, Hideaki Maeba, , Kazuhito Naka, Raita Araki, Yasuhiro Ikawa , Shoichi Koizumi, Akihiro Yachie

53rd annual meeting of the American Society of Hematology. 2010.12.10, San Diego Convention Center, USA

④ Role of IL-17 Varies at Different Periods After Hematopoietic Stem Cell Transplantation: Protection From Acute Graft-Versus-Host Disease and Exacerbation of Chronic Graft-Versus-Host Disease.

Rie Kuroda, Ryosei Nishimura, Katsuki Sato, , Hideaki Maeba, Kazuhito Naka, Shintaro Mase, Raita Araki, Yasuhiro Ikawa, Yoichiro Iwakura, Shoichi Koizumi, Akihiro Yachie

53rd annual meeting of the American Society of Hematology. 2010.12.10, San Diego Convention Center, USA

⑤ Strong Inhibition of Alloreaction by Newly Generated Tolerogenic Dendritic Cells by Psoralen Plus UVA Treatment.

Maeba H, Nishimura R, Kuroda R, Araki R, Mase S, Ikawa Y, Yachie A, Koizumi S.

52nd annual meeting of the American Society of Hematology. 2009.12.5, New Orleans Convention Center, USA

⑥ Promoter DNA methylation of CD10 in infant acute lymphoblastic leukemia with MLL/AF4 fusion gene.

Y. Ikawa, N. Sugimoto, S. Koizumi, A. Yachie, Y. Saikawa

2009 annual meeting of the American Society of Clinical Oncology, 2009.5.29, Orlando Convention Center, USA

⑦ Dense Methylation Patterns of CD10 Promoters in CD 10-Negative Infant Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL) with Mixed-Lineage Leukemia (MLL) Gene Rearrangements

Yasuhiro Ikawa, Naotoshi Sugimoto, Shintaro Mase, Rie Kuroda, Raita Araki<sup>1</sup>, Ryosei Nishimura, Toru Horisawa, Naoki Okada, Shoichi Koizumi, Akihiro Yachie, Yutaka Saikawa

100th annual meeting of the American Association of Cancer Research, 2009.4.18, Denver Convention Center, USA

⑧ Donor Bone Marrow Derived IL-17 Expressing Cells Exacerbate Chronic

Graft-Versus-Host Disease in a Murine Bone Marrow Transplantation

Rie Kuroda, Ryosei Nishimura, Katsuaki Sato, Hideaki Maeba, Kazuhito Naka, Yo Niida, Raita Araki, Yoichiro Iwakura, Shoichi Koizumi, Akihiro Yachie

51st annual meeting of the American Society of Hematology. 2008.12.5, San Francisco Convention Center, USA

[その他]

ホームページ等

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

<http://kodomokokoro.w3.kanazawa-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小泉 晶一 (KOIZUMI SHOICHI)  
金沢大学・子どものこころの発達研究センター・特任教授  
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・子どものこころの発達研究センター・特任准教授  
研究者番号：40293344

犀川 太 (SAIKAWA YUTAKA)  
金沢医科大学・医学系・教授  
研究者番号：60283107