

総説

ヘムオキシゲナーゼ (heme oxygenase; HO), 一酸化炭素 (carbon monoxide; CO) 研究に おける最近の動向

吉川 敏一*, 高木 智久**, 内藤 裕二***

要 旨

生体内において一酸化窒素合成酵素 (nitric oxide synthase: NOS) により一酸化窒素 (nitric oxide: NO) が, さらには Heme Oxygenase (HO) から誘導される一酸化炭素 (carbon monoxide: CO) がガス状メディエーターとして様々な生理機能を発揮し, 多くの病態にも重要な役割を担っていることが明らかになってきた. 特に, CO に関するここ数年の知見は顕著であり, 興味深い報告が相次いでいる. 本稿では HO ならびに HO から誘導される CO の役割に関して概説し, ヒト疾患における病態の解明・新規治療への応用に関して触れたい.

はじめに

Gas Biology とは最も基本的な生理現象である呼吸をはじめとして, 我々の生体環境内外に存在するガス分子を科学する病態生化学であるが, 近年, 飛躍的な進歩が見られる分野である. 生体が利用する最もよく知られたガス分子は分子状酸素であり, その多くは細胞内のミトコンドリアにおいてエネルギーの生成に利用され, その過程において水になる. 残りの分子状酸素の一部は, 生体内において L-arginine を基質として一酸化窒素合成酵素 (nitric oxide synthase: NOS) により一酸化窒素 (nitric oxide: NO) の合成や Heme を基質とした

Heme oxygenase (HO) による一酸化炭素 (carbon monoxide: CO) 生成などに利用されている. これら酸素原子を含む生理活性ガス分子に関しては最近著しい研究の進展が見られ, ガス分子状ラジカルである NO は血管収縮弛緩制御作用, 血小板凝集能などを持ち合わせる極めて多彩な機能を有することが明らかとなっており, 酸素分子や活性酸素種と反応し様々な活性窒素種を生じ, 組織, 細胞障害に関与することが理解されている. 一方, CO に関しても, ここ 10 年ほどの間に生体内において生成され多彩な生物作用を示すことが明らかになってきた. 非ラジカル性ガス分子である CO は化学窒息性の有毒ガスとして広く認識されているのは周知の事実であり, 暖房器具による CO ガス中毒や若者の集団自殺などの社会現象は記憶に新しいところである. これは CO が hemoglobin との結合を生じ, その結合力は酸素の約 240 倍ともいわれ, それが故に CO 分圧が低くても容易に中毒をきたし, 酸素輸送能力を失わせることにより生命的な危機をもたらすものである. この CO が生体内で HO を介して生成され, 多彩な生物作用を発揮することが, ここ 10 年ほどの間に理解されるようになってきた. 本稿では, この HO-CO 系に焦点を当て, その生物学的な役割に関して, これまでに理解が及んでいる範囲を確認し, さらに, 治療応用への展望までに踏み込んでいきたい.

Heme Oxygenase (HO) とは

非ラジカル性ガス分子である CO は生体内では Heme oxygenase (HO) を介して生成される. HO は Heme 蛋白の補欠分子族である protoheme IX を基

*京都府立医科大学大学院大学医学研究科
生体機能制御学

**京都府立医科大学生体安全医学講座

***同 生体機能分析医学講座

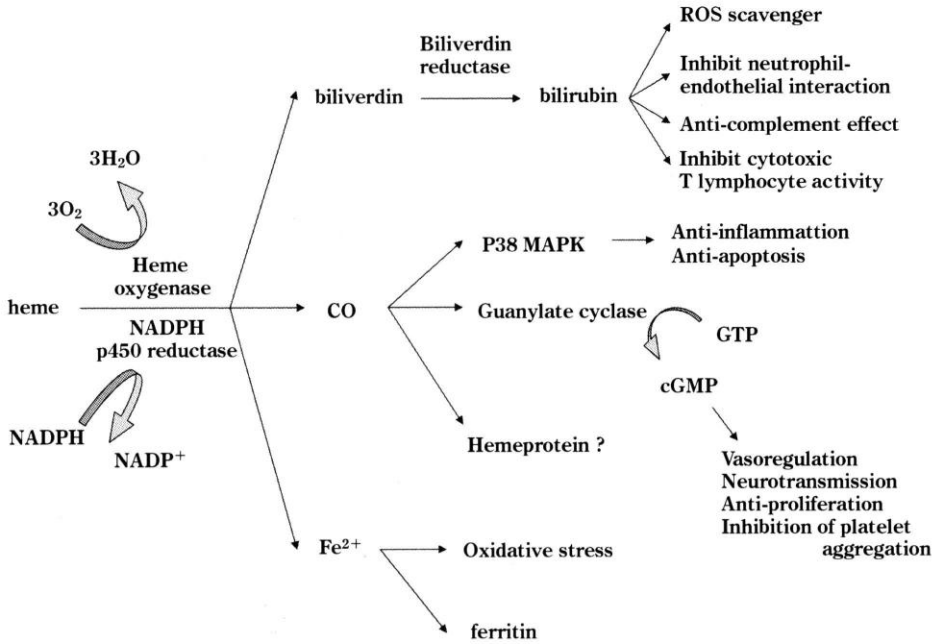


図1 Heme oxygenase とその生成物(文献⁵⁾より引用)

質として Heme と等モルの CO と還元鉄(Fe²⁺), ビリベルジンを生成する酵素であり(図1), Heme の毒性を緩和する酵素として知られている. この酸化分解反応には NADPH-cytochrome P450 reductase が電子供与体として関与する^{1,2)}. これらの反応産物はそれぞれが多彩な作用を持つが, ビリベルジンは還元酵素によりビリルビンになり非常に高い抗酸化能を示し, 細胞, 組織を酸化障害から保護しており, 鉄の産生は酸化障害を惹起する可能性があるものの, 実際にはその結合蛋白質であるフェリチンの翻訳/合成効率を高めて, 無毒化し, 最終的に細胞外に鉄を排泄することが知られている. また, CO は soluble guanylate cyclase の heme に結合し, 活性化することで cGMP の合成を促進し, 様々なシグナル伝達に関わっている. 当初より, この HO は細菌や植物においてもその存在が知られており, ある種の病原性細菌では蛋白質性毒素の産生に必須の鉄を獲得するために, また, 植物では赤色光の吸収に関与するビリベルジンを供給するためであると考えられており, Heme の解毒にとどまらず, 非常に幅広い生理機能が想定された. 実際に, その予想に違わず, HO ならびに HO を介した生成物には実に様々な生理活性を持つことが明らかとなりつつある.

Heme Oxygenase (HO) の役割

HO には哺乳類では 2 つのアイソザイムが知られており, 各種ストレスで誘導される誘導型 HO である分子量 32kD の HO-1 と分子量 36kD の構成的に発現する HO である HO-2 がある. HO-1 には Heat shock protein 32 の別名がある通り, 温熱変化や重金属, サイトカイン刺激や低酸素状態, 紫外線, さらに細胞にかかる撞断応力など, 実に様々なストレスで誘導されることが知られている. HO-1 と HO-2 は同じ Heme 分解機構を有するが, 各々の deficient mouse での表現型が異なることから, その生理機能は違うことが推察されている. すなわち, HO-1 deficient mouse では極端に出生率が低く, 血中の鉄含有量が低く, その反面, 肝臓, 腎臓における鉄沈着の亢進が認められ, HO-1 が鉄の再利用に重要であることが明らかになっている³⁾. 一方で, HO-2 deficient mouse では, 出生には問題を生じないものの, 腸管における食物の輸送能力が低いことが確認されており, これは non-adrenergic non-cholinergic 神経からの CO 生成低下によって腸管弛緩が減弱することで説明されており⁴⁾, 同様の機序で勃起不全も説明されている.

HO-1 が抗炎症効果をもたらすことも報告されており、様々な病態で HO-1 の阻害が炎症病態を悪化させ、HO-1 誘導が炎症病態を改善させることが明らかになっている。我々もマウスに Dextran sodium sulfate (DSS) を自由飲水させることでヒト潰瘍性大腸炎類似腸炎を発症させる実験腸炎モデルにおいて腸炎の発症とともに大腸粘膜に発現亢進してくる HO-1 が炎症制御的に作用することを報告してきた⁵⁻⁷⁾。興味深いことに、この HO-1 による炎症制御は Th1/Th2 サイトカインバランスを維持することによってもたらされることが示唆されている。これらの効果は HO-1 蛋白そのものによるものか、もしくは HO-1 により誘導される先述の CO、ビリベルジン、鉄のいずれかにもとづくものかは十分に明らかではない。最近 CO に関する話題が沸騰しており、CO の抗炎症効果も盛んに議論されている。しかし、実際のところ HO-1 発現に伴う抗炎症効果の発揮にはビリベルジンの抗酸化作用が主役を担っているとする論文も多く認められ、実際にビリベルジン、ビリルビンの強力な抗酸化作用には疑う余地もなく、HO-1 の抗炎症作用に関してこれらの物質が複合して効果を発揮しているものと思われる。

HO-CO 系の役割

CO が NO 依存性の血管拡張反応に対して抑制的に作用し、血管収縮物質として作用する可能性が示された。これは、この 2 つのガス状メディエーターが soluble Guanylate Cyclase (sGC) という共通の second messenger を持ち、ともにその heme 位

に結合するが、その活性化の度合いが NO の方がはるかに高いことに起因している^{8,9)}。sGC は α, β の 2 つのサブユニットを持つヘテロダイマーであるが、この β サブユニット上に sGC 活性化に重要なヘム補欠分子内の鉄イオンが配されている。NO、CO がこの還元型ヘム鉄に結合する際に sGC の構造変化の度合いが NO の方が大きく、この現象が sGC の活性化メカニズムに重要な調節機能をもたらすものと考えられている¹⁰⁾。

HO-CO 系の血圧調節にという観点において HO-1, 2 を介して生成された CO が血管平滑筋や血管内皮細胞に作用し cGMP の上昇を引き起こし、内皮依存性の血管弛緩作用をもたらす。すなわち、CO は血管弛緩反応を介して血圧を低下させる作用を持っているが、その一方で、NO 依存性の血管弛緩反応は CO により抑制される。この調節機構により NO による過度の sGC 活性化を CO が制御すると考えられている¹¹⁾ (図2)。実際に、血管平滑筋に特異的に HO-1 を過剰発現させたマウスでは、内皮型 NOS 遺伝子発現が亢進しているにもかかわらず、野生型マウスに比較して血圧の上昇を示しており、CO は NO 依存性の血圧低下作用を減弱させていた¹²⁾。

Gas Biology 研究の先駆けとなった末松らのグループはストレスが負荷されていない正常時においても HO 活性が高い臓器である肝臓において CO が類洞血管を恒常的に弛緩させ血流維持に寄与していることを証明し、肝臓組織における定常血流を保つためには NO ではなく CO が主体になっていることを報告している¹³⁻¹⁵⁾。我々も先述のマウ

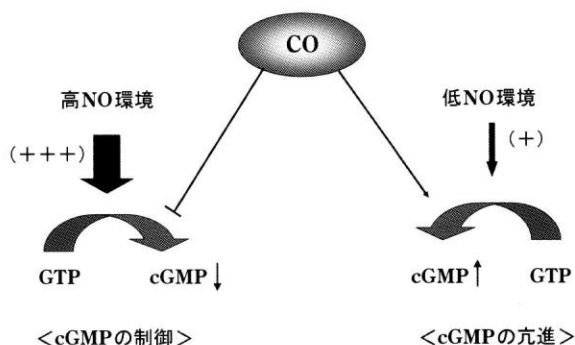


図2 NO と CO の相互作用

ス DSS 大腸炎モデルにおいて大腸炎の進展に伴い腸管粘膜において iNOS や HO-1 の発現が亢進し、iNOS 由来の NO が炎症進展における増悪因子として作用し、CO がこの NO による sGC 活性を制御するように作用することを報告しており、HO-1 を阻害する Zinc Protoporphyrin IX (ZnPP) を投与すると、CO の産生が阻害され、腸炎は増悪することを報告してきた^{5~7)}。

また、最近、sGC に依存しない CO の生理作用も知られており、CO が K channel の開口確率を sGC 非依存性に増加させること¹⁶⁾や、酸素濃度の低下に際し頸動脈小体において HO-CO 系における CO 生成がそのシグナル伝達を行っているという報告¹⁷⁾があり興味深い。今後の研究成果が期待される。

他に、精巣における造精機能における HO-CO 系の役割も検討されている。精巣は様々なストレス刺激に対して脆弱な面を持っており、間質のマクローファージや Leydig 細胞や精細管における Sertoli 細胞に発現する HO-1 がストレス刺激に応じて誘導され、これより生成される CO が減数分裂前の精細胞にアポトーシスを誘導することが報告されている¹⁸⁾。これは、正常な精巣機能を維持する

ために、すなわち、異常形質を次世代に伝えないという重要不可欠なメカニズムであると考えられている。

CO と炎症制御

さらに興味深いことに、近年、CO が強力な抗炎症効果を発揮することが報告されている。これは、CO が p38 MAP kinase を活性化することにより TNF- α 、IL-1 β をはじめとする炎症性サイトカインの産生を抑制するとともに、抗炎症性サイトカインである IL-10 産生を誘導し、抗炎症効果が発揮されることが報告¹⁹⁾されたことに始まり、いくつかの知見が報告されている(表1)。また、Endothelin などの細胞増殖因子や E2F-1 などの細胞周期関連遺伝子の抑制作用^{20,21)}が存在することも明らかになっており、細胞増殖にも関与していることが想定されている。

となると、当然 CO の投与による病態の改善が目されるが、CO の治療への応用という観点に関しては、最近、興味深い報告が相次いでおり(表2)、様々な治療分野への応用が期待されている。動物実験レベルではあるが肝臓、小腸などの虚血再灌流傷害モデルでの効果は移植医療を意識したもの

表1 In vivo 動物モデルに対する CO ガス吸入の有効性

Animal	Organ	Model	Carbon monoxide		Efficacy	Year	Authors
			Conc.	Duration			
Rat	Lung	Hyperoxic injury	250ppm	56h	Effective	1999	Otterbein et al.
Mice	Lung	Inflammation by aeroallergen	250ppm	48h	Effective	2001	Chapman et al.
Rats	Lung	Hyperoxic lung injury	50-500ppm	60h	No change	2001	Clayton et al.
Rat	Intestine	Ischemia/Reperfusion	250ppm	1hr	Effective	2003	Nakao et al.
Rat	Intestine	Graft motility	250ppm	25h	Effective	2003	Nakao et al.
Mice	Intestine	Postoperative ileus	250ppm	24h	Effective	2003	Moore et al.
Mice	Lung	Airway Hyperresponsiveness	250ppm	1h/day, 5day	Effective	2003	Ameredes et al.
Rat	Heart	Ischemia/Reperfusion	1000ppm	30min	Effective	2004	Fujimoto et al.
Rat	Kidney	Ischemia/Reperfusion	250ppm	25h	Effective	2004	Neto et al.
Mice	Lung	Acute injury, ARDS	500ppm	1h	No change	2005	Ghosh et al.
Rat	Liver	Ischemia/Reperfusion	100ppm	25h	Effective	2005	Kaizu et al.
Rat	Intestine	Necrotizing enterocolitis	250ppm	1h/day, 3day	Effective	2005	Zuckerbraun et al.
Mice	Multiple organ	Hemorrhagic shock	250ppm	1h	Effective	2005	Zuckerbraun et al.
Rat	Intestine	Postoperative ileus	250ppm	24h	Effective	2005	Moore et al.
Mice	Intestine	IL-10-deficient colitis	250ppm	24h	Effective	2005	Hegazi et al.
Rat	Heart	Myocardial infarction	500ppm	3week	Worsen	2005	Mirza et al.
Mice	Liver	Ischemia/Reperfusion	250ppm	1h	Effective	2005	Ott et al.
Pig	Lung	Endotoxin shock	250ppm	1h	Effective	2005	Mazzola et al.
Rat	Heart	Allograft survival	20ppm	14-100days	Effective	2006	Nakao et al.
Rat	Kidney	Allograft nephropathy	20ppm	30days	Effective	2006	Neto et al.

表2 CO による抗炎症, 組織保護作用のメカニズム

Inhibition of chemokines and chemokine receptors
Inhibition of ICAM-1
Inhibition of iNOS expression and NO production
Inhibition of Th1 type cytokines (IL-2, IFN γ)
Inhibition of proinflammatory mediators (IL-1 β , TNF α , IL-6, COX-2)
Augmentation of IL-10
Heme oxygenase-1-dependent pathway
Nuclear factor- κ B-independent pathway
Soluble guanylyl cyclase (sGC)-dependent pathway
p38MAPK pathway-dependent
Akt-eNOS pathway-dependent

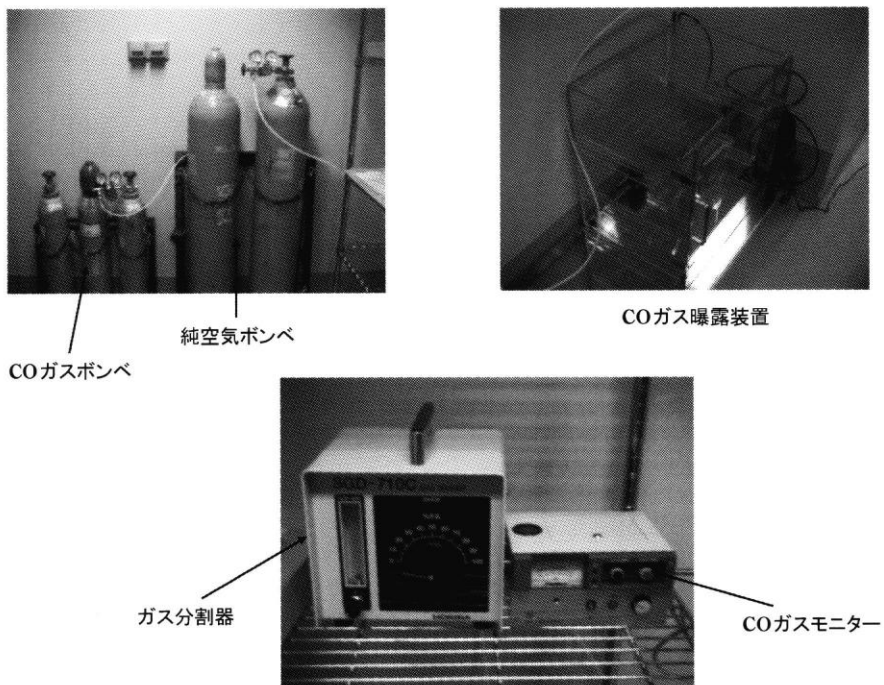


図3 CO 曝露装置

であろうし, 腸炎モデルや心筋梗塞モデルでの病態改善効果なども将来的には臨床応用される日が来るかもしれない。しかしながら, CO 吸入に関しては, その多くの実験的検討が 200-500ppm と高濃度であり, 現実的にはヒトが吸入するには副作用が問題となる濃度であり, 臨床応用には多くのハードルがある。もっとも, 最近の報告では 20-50ppm といった低濃度 CO ガスでの臓器保護効果も見いだされており, 臨床応用の可能性も近い可能性がある。我々も独自に CO 吸入装置を設計し (図3), 炎症病態を中心にその効果を検討しており,

いくつかの炎症モデルにおける治療効果を見いだしている。今後の展開が期待される場所である。

おわりに

最近, 注目を浴びている生体内ガス状メディエーターである CO を中心に NO を含めて最近の知見を述べた。HO-CO 系に着目した循環制御, 炎症制御は今後ますます発展していく分野であると思われる。本稿が読者の興味を引くことができたなら望外の幸せである。

文 献

- 1) Maines MD: Heme oxygenase: function, multiplicity, regulatory mechanisms, and clinical applications. *FASEB J* 1988; 2: 2557-68.
- 2) Sassa S: Biological Implications of Heme metabolism. *J Clinical Biochemistry and Nutrition* 2006; 38: 138-55.
- 3) Poss KD, Tonegawa S: Heme oxygenase 1 is required for mammalian iron reutilization. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 10919-24.
- 4) Burnett AL, Johns DG, Kriegsfeld LJ, et al: Ejaculatory abnormalities in mice with targeted disruption of the gene for heme oxygenase-2. *Nat Med* 1998; 4(1): 84-7.
- 5) Naito Y, Takagi T, Yoshikawa T: Heme oxygenase-1: a new therapeutic target for inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2004 Jul; 20 Suppl 1: 177-84.
- 6) Naito Y, Takagi T, Tomatsuri N, et al: Role of heme oxygenase-1 in dextran sulfate sodium-induced intestinal inflammation in mice. *Gastroenterol* 2003; 124 (Suppl.): A-490.
- 7) Takagi T, Naito Y, Katada K, et al: Heme Oxygenase regulates the balance of inflammatory cytokines in dextran sulfate sodium-induced colitis. *Gastroenterol* 2004; 126 (Suppl.): A-564.
- 8) Zhao Y, Schelvis JP, Babcock GT, et al: Identification of histidine 105 in the beta1 subunit of soluble guanylate cyclase as the heme proximal ligand. *Biochemistry*. 1998 Mar 31; 37(13): 4502-9.
- 9) Zhao Y, Brandish PE, Ballou DP, et al: A molecular basis for nitric oxide sensing by soluble guanylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999 Dec 21; 96(26): 14753-8.
- 10) Koesling D, Friebe A: Soluble guanylyl cyclase: structure and regulation. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 1999; 135: 41-65.
- 11) Kajimura M, Goda N, Suematsu M: Organ design for generation and reception of CO: lessons from the liver. *Antioxid Redox Signal* 2002 Aug; 4(4): 633-7.
- 12) Imai T, Morita T, Shindo T, et al: Vascular smooth muscle cell-directed overexpression of heme oxygenase-1 elevates blood pressure through attenuation of nitric oxide-induced vasodilation in mice. *Circ Res* 2001 Jul 6; 89(1): 55-62.
- 13) Suematsu M, Kashiwagi S, Sano T, et al: Carbon monoxide as an endogenous modulator of hepatic vascular perfusion. *Biochem Biophys Res Commun* 1994 Dec 15; 205(2): 1333-7.
- 14) Suematsu M, Goda N, Sano T, et al: Carbon monoxide: an endogenous modulator of sinusoidal tone in the perfused rat liver. *J Clin Invest* 1995 Nov; 96(5): 2431-7.
- 15) Goda N, Suzuki K, Naito M, et al: Distribution of heme oxygenase isoforms in rat liver. Topographic basis for carbon monoxide-mediated microvascular relaxation. *J Clin Invest* 1998 Feb 1; 101(3): 604-12.
- 16) Kaide JI, Zhang F, Wei Y, et al: Carbon monoxide of vascular origin attenuates the sensitivity of renal arterial vessels to vasoconstrictors. *J Clin Invest* 2001 May; 107(9): 1163-71.
- 17) Prabhakar NR, Dinerman JL, Agani FH, et al: Carbon monoxide: a role in carotid body chemoreception. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995 Mar 14; 92(6): 1994-7.
- 18) Ozawa N, Goda N, Makino N, et al: Leydig cell-derived heme oxygenase-1 regulates apoptosis of premeiotic germ cells in response to stress. *J Clin Invest* 2002 Feb; 109(4): 457-67.
- 19) Otterbein LE, Bach FH, Alam J, et al: Carbon monoxide has anti-inflammatory effects involving the mitogen-activated protein kinase pathway. *Nat Med* 2000; 6(4): 422-8.
- 20) Morita T, Kourembanas S: Endothelial cell expression of vasoconstrictors and growth factors is regulated by smooth muscle cell-derived carbon monoxide. *J Clin Invest* 1995 Dec; 96(6): 2676-82.
- 21) Morita T, Mitsialis SA, Koike H, et al: Carbon monoxide controls the proliferation of hypoxic vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 1997 Dec 26; 272(52): 32804-9.