

3. エンドトキシン誘発急性肝障害ラットモデルにおける肝ヘム代謝関連蛋白の動態

高橋 徹

岡山県立大学保健福祉学部

はじめに

2016年、敗血症が新たに「感染に対する宿主生体反応の調節不全で生命を脅かす臓器障害」と定義された¹⁾。敗血症の宿主生体反応の調節不全として、感染により免疫系の正常な制御を逸脱した全身性炎症反応があげられる。この過剰な全身性炎症反応により惹起された酸化ストレスが多臓器不全を引き起こし、しばしば致死的原因となる。

ヘムは、ヘモグロビン、ミオグロビン、チトクロームなど生体が生きていく上で必須のヘム蛋白の補欠分子である。しかし、ヘム蛋白から遊離したヘムは炎症細胞のパターン認識受容体 (pattern-recognition receptor: PRR) によって認識され、炎症反応を惹起する傷害関連分子パターン (damage-associated molecular patterns: DAMPs) の一つであると提唱されている²⁾。また、遊離ヘムは脂溶性の鉄であることから、酸化ストレスを増幅することにより、実質細胞を障害することが知られている²⁾。実際、盲腸結紮穿孔 (cecal ligation and puncture: CLP) によるマウス敗血症モデルで、遊離のヘムが病態の悪化に大きな役割を果たしていることが報告されている³⁾。

一方、生体には過剰な遊離ヘムを分解するための生体防御機構が備わっている。これがヘム分解の律速酵素 Heme Oxygenase-1 (HO-1) である⁴⁾。ヘムは HO-1 によって分解される過程で、CO、鉄を遊離しビリベルジンに変換される。ビリベルジンはビリベルジン還元酵素によってビリルビンにただちに交換される。また、鉄はフェリチンによって取り込まれる。HO-1 の分解によって生成された微量の CO、生理的範囲内のビリルビンは抗炎症・抗酸化・抗アポトーシス作用を有することから、HO-1 は pro-oxidant であるヘムを分解し、CO、ビリルビンなど生体防御的に働く物質を生成するストレス蛋白の一つに位置付けられている⁴⁾。

Bach1 は HO-1 の抑制性転写因子であり、遊離ヘムが増加するとヘム-Bach1 複合体が形成され核外に汲み出され、その結果 HO-1 が誘導されることが *in vitro* の系を用いて明らかにされている⁵⁾。しかし、*in vivo* のヘム増強性の酸化ストレス下における HO-1 の誘導調節

機構については、完全に明らかになっているとは言い難い。

そこで、本稿では、敗血症の重症化に遊離ヘムが果たす役割について概説した後、エンドトキシン (lipopolysaccharide: LPS) 誘発急性肝障害ラットモデルにおける肝 Bach1 の動態を遊離ヘムと関連させて検討した私たちの研究について述べる。

1. 敗血症の重症化に遊離ヘムが果たす役割

1-1. 遊離ヘムの生成と動態²⁾

敗血症では少なからず溶血が発生し、赤血球からヘモグロビンが遊離する。ヘモグロビンのヘム鉄は二価から三価に酸化され、メトヘモグロビンになる。さらに、メトヘモグロビンからヘム分子は遊離し、酸化還元反応活性化能を有する遊離ヘムが生ずる。細胞外のヘモグロビン、遊離ヘムは、血漿中のハプトグロビン、ヘモペキシンによってそれぞれ、捕捉される。ハプトグロビン/ヘモグロビン複合体、ヘモペキシン/ヘム複合体は、CD163、CD91 受容体を介してマクロファージに取り込まれ、マクロファージ内に誘導された HO-1 によって分解、無害化される。一方、著しい溶血が発生し、ハプトグロビンとヘモペキシンの除去能を上回るヘモグロビン・ヘムが生じると遊離ヘムは血漿中に蓄積し、炎症反応増強作用を有する DAMPs、また、酸化ストレス増幅作用を有する pro-oxidant として、病態増悪化に貢献する。

1-2. 遊離ヘムの炎症反応増強作用²⁾

ヘム蛋白から遊離したヘムは炎症反応増強作用を有する。ヘムは Toll-like receptor-4 (TLR4) のアゴニストであることが報告されている。ヘムは TLR4 を介して、好中球を活性化し、その遊走能を増強し、neutrophil extracellular traps (NETs) の生成を促進する。マクロファージにおいては、ヘムは TLR4-MyD88 経路を介して tumor necrosis factor (TNF) の分泌促進作用を示す。また、NLRP3 インフラマソームを介して、IL-1 β の分泌を促進する。さらに遊離ヘムは、LPS 刺激によるマクロファージのサイトカイン産生を増強することが報告されている。血管内皮細胞に対して、ヘムは TLR4

を介して、血管透過性を亢進させる。これらのヘムの作用は適度であれば感染に対して生体保護的に働くが、その反応が過剰となった場合、過剰な炎症反応・凝固反応を引き起こし、敗血症の重篤化に寄与する。

1-3. 遊離ヘムの酸化ストレス増幅作用²⁾

遊離ヘムは炎症反応を増幅するのみならず、Reactive Oxygen Species (ROS) の産生を増強することにより、実質細胞に障害を与える。ヘムは、ヘム蛋白のヘムポケットに収まっている間は、生体の維持に重要な働きをしている。しかし、ヘム蛋白から遊離したヘムは、疎水性蛋白であるため、細胞膜のリン脂質のような非極性分子と相互反応を起こしやすい。例えば、TNFでprimingされた細胞では、発生した過酸化水素から反応性に富むヒドロキシラジカルを産生するフェントン反応を触媒することにより、ROS産生を促進し、細胞膜の脂質過酸化を引き起こす。その結果、細胞はアポトーシスに陥る。すなわち、遊離ヘムは酸化ストレスをpro-oxidantとして増幅することにより、実質細胞に対して細胞毒増幅因子として作用する。

2. 敗血症性肝障害におけるヘム関連蛋白の動態

2-1. 敗血症性肝障害における遊離ヘムの増加

先述したように敗血症は「感染に対する宿主生体反応の調節不全で生命を脅かす臓器障害」がその本態である。肝臓は生体にとって必須物質である栄養素の合成・代謝、薬物・毒物の解毒、さらには免疫応答にもかかわっていることから、敗血症による肝障害はその重篤化の大きな要因となる。われわれは、雄性SDラットにエンドトキシン (Lipopolysaccharide : LPS : 10 mg/kg) を静脈内投与しエンドトキセミアで特徴づけられる敗血症モデルを作製した。本モデルではLPS投与後、血清AST・ALT値が有意に上昇し、組織学的にも巣状壊死をともなう肝傷害像が認められた。また、LPS投与後HO-1 mRNAの発現増加とヘム合成の律速酵素：デルタアミノレブリン酸合成酵素 (δ -aminolevulinic acid synthase : ALAS1) mRNAの発現抑制が認められた。細胞内の遊離ヘムはpro-oxidant、炎症増強因子として実質細胞にとっても有害であることから、恒常状態では、細胞内で極めて低レベルに保たれており、その調節はALAS1とHO-1によって行われている⁴⁾。すなわち、ヘムによってALAS1の発現は低下し、HO-1の発現は上昇する⁴⁾。したがって、LPS投与後、HO-1の発現増加とALAS1の発現抑制がみられたことは、肝細胞内の遊離ヘムが増加したことを示唆している。肝細胞内で遊離ヘムを供給するヘム蛋白は明らかでない。しかし、肝臓内では薬物代謝酵素チトクロームP450が主要なヘム蛋白であり、薬物性の肝障害では薬物の代

謝にもなっておりチトクロームP450が崩壊することが報告されていることから⁴⁾、LPSによって障害を受けたチトクロームP450のヘムが遊離ヘムの増加に関与している可能性が考えられる。

2-2. 敗血症性肝障害におけるHO-1抑制性転写因子：Bach1の動態

Bach1はヘムによって調節されるHO-1遺伝子の抑制性転写因子である⁵⁾。すなわち、Bach1は恒常状態ではHO-1の転写調節領域にあるmaf recognition element (MARE) 配列に小maf蛋白とともに結合し、HO-1の転写活性化を抑制している。一方、細胞内の遊離ヘム濃度が上昇するとヘムとBach1は結合し、その複合体は核外に運びだされ、代わりに、転写因子Nrf2と小maf蛋白が二量体を作りMARE配列に結合しHO-1の転写が開始される。このBach1を介するヘムによるHO-1遺伝子の転写調節化のメカニズムは*in vitro*の系を用いた実験で明らかにされた。

われわれは、敗血症急性肝障害モデルにおけるBach1の動態を明らかにするために、LPS投与後の肝細胞の核分画のBach1蛋白発現の変化をWestern blot法を用いて経時的に検討した。核Bach1蛋白は無処置のラットでは有意な発現が認められていたが、LPS投与ラットでは、投与1時間後にその発現は著明に低下した。LPS投与1時間後の核Bach1レベルを生食投与による対照ラットの1時間後の核Bach1レベルと比べると前者は後者の10%以下であった。その後、核Bach1蛋白の発現は急激に回復し、3時間後には、ほぼ無処置ラットのレベルに復した。このLPSによる核内Bach1発現低下における遊離ヘムの関与を検討するために、ラットに50 mg/kgのヘム単独投与を行い、1時間後に肝細胞の核Bach1蛋白レベルを検討した。その結果、興味深いことに、ヘム単独投与によっても核Bach1蛋白レベルは、顕著に低下した。ヘム投与1時間後の核Bach1レベルを生食投与による対照ラットの1時間後の核Bach1レベルと比べるとLPS投与と同様に前者は後者の10%未満であった。この事実は、間接的ではあるが、LPS投与後の核Bach1レベルの一過性の低下に肝細胞内に増加した遊離ヘムが関係することを示唆している。

LPS投与は肝臓の核Bach1蛋白の発現に顕著な影響を及ぼしたので、肝Bach1 mRNAの発現に及ぼす効果を検討した。無処置のラット肝ではBach1 mRNAの発現はほとんど認められなかったが、LPS投与ラットでは1時間後にBach1 mRNAレベルは有意に増加し、3時間後に最大値となり、その後急激に減少し、12時間後には最大値の50%となり、24時間後には元のレベルに復した。

3. 敗血症性急性肝障害における肝の核 Bach1 蛋白発現低下と Bach1 mRNA 誘導の生物学的意義

3-1. Bach1 の動態変化の分子生物学的意義

LPS 投与後の肝細胞内 HO-1 発現上昇・ALAS1 発現低下と、核 Bach1 蛋白発現低下、Bach1 mRNA の誘導を総合的に考察し敗血症性急性肝障害モデルにおける肝ヘム代謝の動態について以下のような仮説を立てることができる。LPS により肝の主要ヘム蛋白：チトクローム P450 が傷害され、ヘムが遊離する。肝細胞で増加した細胞内遊離ヘムは、MARE 配列上にある Bach1 と結合して核外に汲み出される。一方、MARE 配列には Bach1 の代わりに転写因子 Nrf2 が結合し、その結果、HO-1 の転写が活性化される。すなわち、LPS 投与後に認められた核 Bach1 蛋白減少はヘムによる HO-1 誘導過程を反映していることが推察される。ヘムが HO-1 の primary inducer であり、ヘム単独投与で肝の核 Bach1 発現が急激に低下したことからも、LPS 投与後の HO-1 誘導にこのヘム-Bach1-Nrf2 メカニズムが関与していることがうかがわれる。一方、Bach1 mRNA の誘導は、核内に枯渇した Bach1 蛋白を補うために引き起こされたと考えられる。われわれは、四塩化炭素肝障害の動物モデルにおいて肝のヘム蛋白から遊離したヘムが酸化ストレスを増幅することにより肝障害を増悪化させることを示し、このモデルにおいても Bach1 mRNA が誘導され、その増加が核に枯渇した Bach1 蛋白を補うための代償反応であることを示唆した⁶⁾。

3-2. Bach1 の動態変化の病態生理学的意義

げっ歯類敗血症モデルで、HO-1 は pro-oxidant である遊離ヘムを分解し、生体保護的に働くことが報告されている³⁾。また、Bach1 ノックアウトマウスを用いた研究で、冠動脈の虚血再灌流モデルの急性増悪期において、Bach1 の欠損は HO-1 の過発現を介して臓器保護的に働くことが報告されている⁷⁾。過剰な遊離ヘムが生体に負荷される敗血症性臓器障害の急性期においてヘム分解酵素である HO-1 の誘導は、生体にとって有益である。しかし、過剰なヘムの分解が終了した回復期において HO-1 の過剰発現が続くと、生体機能の維持にとって必須のヘム蛋白をむしろ傷害してしまう可能性がある。したがって、エンドトキセミア誘発性急性肝障害における Bach1 の動態は、ヘム分解のための HO-1 の一過性誘導とその役目が終了した HO-1 発現抑制を介して細胞内ヘム代謝の微妙な調節に貢献していると推測される。

おわりに

敗血症にともない発生する血管内溶血によって生ずるヘモグロビンから遊離したヘムは、炎症反応増強作用、酸化ストレス増幅作用により敗血症の増悪化に寄与する。また、敗血症性急性肝障害により、細胞内に増加した遊離ヘムも膜脂質を障害することにより、肝細胞障害性に働くと考えられる。肝細胞内の過剰の遊離ヘムは、ヘムによって誘導される HO-1 によって無毒化される。敗血症性急性肝障害における HO-1 誘導は、*in vitro* と同様、ヘムによる HO-1 転写抑制因子 Bach1 の核外移行によって誘導されることが示唆される。一方、HO-1 の過剰発現によるチトクローム P450 など、肝細胞にとって必要なヘム蛋白の分解を防ぐために、回復期には HO-1 の誘導は収束されねばならない。この HO-1 発現抑制に必要な Bach1 蛋白を核内に補充するために、Bach1 mRNA が誘導されると考えられる。Bach1-ヘム経路による HO-1 誘導のメカニズムの解明は、新たな敗血症性急性肝障害に対する治療戦略の開発につながる可能性がある。

謝 辞

本研究の遂行に多大なご支援をいただいた岡山大学大学院医歯薬学総合研究科麻酔蘇生学分野の皆様へ深謝致します。

文 献

- 1) Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, et al.: The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA* 315: 801-810, 2016
- 2) Soares MP, Bozza MT: Red alert: labile heme is an alarmin. *Curr Opin Immunol* 38: 94-100, 2016
- 3) Larsen R, Gozzelino R, Jeney V, et al.: A central role for free heme in the pathogenesis of severe sepsis. *Sci Transl Med* 2: 51ra71, 2010
- 4) Takahashi T, Shimizu H, Morimatsu H, et al.: Heme oxygenase-1: a fundamental guardian against oxidative tissue injuries in acute inflammation. *Mini Rev Med Chem* 7: 745-53, 2007
- 5) Igarashi K, Sun J: The heme-Bach1 pathway in the regulation of oxidative stress response and erythroid differentiation. *Antioxid Redox Signal* 8: 107-118, 2006
- 6) Tanioka T, Shimizu H, Takahashi T, et al.: Induction of hepatic Bach1 mRNA expression by carbon tetrachloride-induced acute liver injury in rats. *Biomed Rep* 2: 359-363, 2014
- 7) Yano Y, Ozono R, Oishi Y, et al.: Genetic ablation of the transcription repressor Bach1 leads to myocardial protection against ischemia/reperfusion in mice. *Genes Cells* 11: 791-803, 2006