

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 11 日現在

機関番号：33920

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009 年度～2011 年度

課題番号：21570147

研究課題名（和文） SHAP による CD44-ヒアルロン酸相互作用の制御と炎症における役割の解析

研究課題名（英文） Regulation of CD44-hyaluronan interaction by SHAP and its role in inflammation

研究代表者

卓 麗聖 (LISHENG ZHUO)

愛知医科大学・医学部・准教授

研究者番号：00399031

研究成果の概要（和文）：

CD44 とそのリガントであるヒアルロン酸は炎症細胞浸潤に関与する接着分子として注目される。我々は、血清タンパク質 SHAP がヒアルロン酸に共有結合し、CD44 陽性細胞の結合を増強することを見出した。本研究は、SHAP 欠損マウスを用いて、生体内の様々の炎症反応過程を解析したところ、SHAP は重要な役割を果たしていることを明らかにした。その役割は多様であり、急性肝障害モデルでは、炎症の発生機序に関与するが、気道過敏性や脳出血モデルでは、炎症の収束機序に関与する。

研究成果の概要（英文）：

CD44 and its ligand hyaluronan emerge as important adhesion molecules for leucocyte infiltration in inflammatory response. We have found that the serum protein SHAP binds covalently to hyaluronan and enhances the adhesion of CD44-positive cells to hyaluronan. In this project, we reveal that SHAP plays significant roles in *in vivo* inflammatory responses by using SHAP-deficient mice. Depending on the affected organ and disease model, the role of SHAP varies, either being inflammatory (such as in acute liver injury model) or being anti-inflammatory (such as in airway hyper-responsiveness model and intracerebral hemorrhage model).

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学、機能生物化学

キーワード：糖鎖生物学

1. 研究開始当初の背景

細胞浸潤は炎症反応の重要な要素であり、浸潤細胞と内皮細胞や患部組織細胞の表面に存在する細胞接着分子に依存する。細胞接着分子として、インデグリンとセレクチン

などが有名だが、他にも多数存在している。最近、CD44 とそのリガントであるヒアルロン酸 (hyaluronan, HA) が最も注目される。

HA は GlcA と GlcNAc が重合した長い直鎖状糖鎖分子で、主に細胞外マトリックスの成分

として存在する。炎症や悪性腫瘍病態において、内皮細胞や患部組織細胞で HA の合成が活発となり、細胞表面に HA に富む細胞外マトリックスが形成され、細胞の増殖・運動・形態の制御に関与することが知られている。

CD44 は多くの白血球細胞に発現する細胞膜タンパク質で、HA 分子レセプターであることから、炎症や悪性腫瘍における解析が盛んに行われた。90 年代後半に CD44 遺伝子欠損マウスが作製されたことによって、細胞浸潤における CD44-HA 相互作用の機能的な重要性が確立された。また、細胞生物学の解析により、CD44 を介した HA の信号伝達経路もほぼ解明されている。

近年の CD44-HA 相互作用についての研究は、分子修飾による結合能の調節制御機構を中心に展開している。CD44 遺伝子は一つであるが、20 種類以上ものバリエーションフォームを産生し、さらにリン酸基、硫酸基、パルミトイル基及び糖鎖などの翻訳後修飾を受け、膜上で会合してオリゴマーを形成し、実に構造多様性に富む分子である。一方、HA は単純な分子構造を持ち、修飾も受けず、長さ以外に構造の多様性がないと思われた。その結果、分子修飾による結合調節についての研究は CD44 分子に偏り、リガンドである HA についてはほとんど研究例がない状況になった。

我々は、現在同定された 20 種類超の HA 結合分子の中、唯一 HA にエステル共有結合するタンパク質分子、SHAP (Serum-derived Hyaluronan Associate Protein) を発見し、それは血清成分の inter- α -trypsin inhibitor (ITI) ファミリー分子の重鎖サブユニット (Heavy Chain, HC) そのものであることも明らかにした。ITI 中の HC は軽鎖サブユニットであるビクニン (bikunin) のコンドロイチン硫酸 (CS) 側鎖にエステル共有結合している。2 価金属イオン要求性酵素因子 α が触媒するエステル結合交換反応で、HC が CS からそのまま HA に転移され、SHAP-HA 複合体が形成される。SHAP-HA 複合体の形成不能のノックアウトマウスは、卵細胞の周囲にある卵丘 HA リッチマトリックスの形成不全が原因で、排卵と受精が障害され、重度な雌性不妊症になった。細胞培養実験系から、SHAP が HA の CD44 に対する親和性を増加させる作用を見出した。これらの結果は、HA の長い構造上の特性から、様々な分子と相互作用して高次構造体をつくることで、高次構造体に特有な機能を持つ可能性を示唆した。HA の単独の分子機能の解析に始終していた従来の研究では、このような機能を見出すことは不可能である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、SHAP-HA 複合体の形成

機構の解明とともに、CD44-HA 相互作用の関与する各炎症反応過程において、SHAP の関与とその役割の解明にある。

3. 研究の方法

SHAP-HA 複合体の形成不能のノックアウトマウスを用いて、各炎症性疾患モデルを作製し、野生型マウスの表現型と比較しながら、解析する。

- (1) 肝疾患モデル：マウスにリポ多糖エンドトキシン (LPS) / D-ガラクトサミン (GalN) を投与し、急性肝障害を惹起する。生存率や経時的に行う血液生化学検査や組織学解析などにより、肝損傷発生機序の各段階における SHAP の関与を詳細に評価する。また、好中球の肝臓類洞表面への接着を、生体顕微鏡 (Intravital microscopy) 法で観察する。
- (2) 肺疾患モデル：卵白アルブミン刺激によるマウスに喘息様病態を引き起して、Penh 値を測定し、気道抵抗の変化を評価する。また、肺洗浄液中細胞外マトリックス関連分子や炎症性メディエーターなどの分子の動態を解析する。肺組織病理学の解析も同時に行う。
- (3) 脳出血モデル：脳基底核にコラーゲンナーゼを注入し、脳出血モデルを作製する。注射後 8 時間、24 時間、72 時間にマウスの運動能を採点し、神経損傷程度を評価する。脳を摘出し、乾燥法を用いて水含量を測定する。さらに、脳組織切片を作製し、損傷部の大きさと組織変化を解析する。

4. 研究成果

- (1) 肝疾患モデル：野生型マウスに比べて、SHAP 欠失マウスの肝臓損傷は顕著に軽症であった。まず、LPS/GalN 投与後の生存率は顕著に高かった (野生型マウスの 0~20% に対し、SHAP 欠失マウスは 90% もあった)。次に、血液生化学指標 (ALT 濃度) や肝臓組織の病理学検査においても、SHAP 欠失マウスは軽症であることが認められた。TUNEL 染色による肝実質細胞のアポトーシスを調べたところ、SHAP 欠失マウスでは有意に低下したことが判明した。さらに、肝臓類洞内皮に SHAP-HA 複合体の沈着を確認し、好中球細胞の類洞内皮への接着は SHAP 欠失マウスでは 4 割程度低下したことを見出した (図 1)。これらの結果は、SHAP-HA 複合体が類洞内皮に存在し、接着分子として好中球細胞の粘着や浸潤を促進し、LPS 肝障害の発症に関与することを示唆した。また、培養細胞実験系において CD44 バリエーションフォームの CD44H と CD44E の接着性を比較したところ、CD44E がより強い接着活性を示した。HA 以外に、E-selectin も CD44E のリガンドである。CD44E 陽性細胞は E-selectin 処理表面にローリングする挙動

を示すが、HA 処理表面に粘着する。HA との親和能が高いことが示唆された。

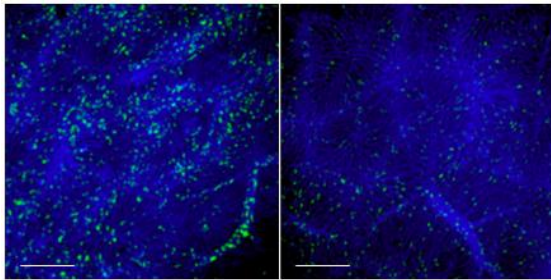


図1 LPS/GaIN 投与後の肝類洞内皮へ好中球細胞（緑色）の接着（左：野生型マウス、右：SHAP 欠損マウス）

(2) 肺疾患モデル：卵白アルブミンによる喘息モデルでは、SHAP 欠損マウスの気道過敏性が、野生型マウスより亢進したことを見出した（図2）。SHAP 欠損マウスでは、肺洗浄液中の IL12 と sTNFR1 の濃度が低下していた（図3）。IL12 は Th1 細胞を活性化し、気道過敏性を抑制的に働くことが報告されている。一方、sTNFR1 が TNF α のシグナル伝達を阻断する作用がある。これらの抑制因子の濃度低下は、Th2 優位のアレルギー反応である気道過敏性を亢進させたと推測する。

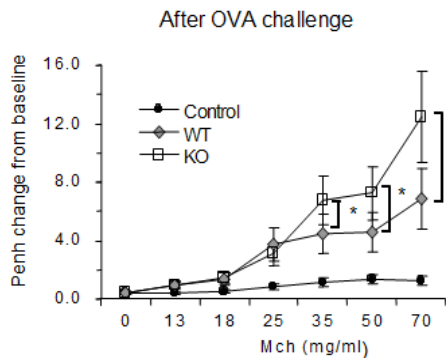


図2 卵白アルブミンによる喘息モデルでは、SHAP 欠損マウスの気道過敏性が亢進する（WT：野生型マウス、KO：SHAP 欠損マウス）

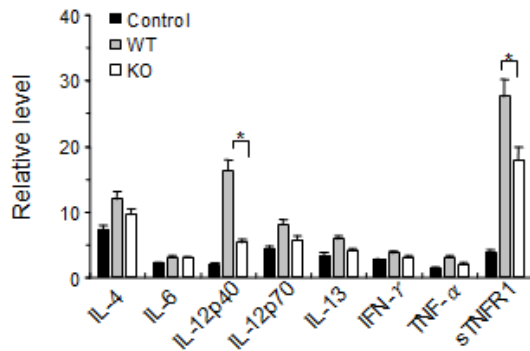


図3 卵白アルブミン感作後、肺洗浄液中各サイトカイン因子の含量（WT：野生型マウス、KO：SHAP 欠損マウス）

また、SHAP 欠失マウスでは気道上皮の修復が遅れていた。損傷後気道上皮の修復には、Vitronectin 分子が必要であることが報告されている。本研究は、生化学手法により、Vitronectin と SHAP と相互作用することを確認できた（図4）。SHAP のもう一面の生理機能を明らかにした。さらに、臨床応用研究として、喘息患者の気道組織を用いて、アトピー素因のない肺野型肺癌患者の気道組織を対照に、ヒアルロン酸や SHAP の局在と病態との関連について検討した。気道上皮分泌腺周囲における SHAP 量は対照群より少なかった。また、喘息発症後、病程が長い程、分泌腺周囲の HA 量が少ない傾向があった。ヒアルロン酸や SHAP はヒト喘息における病態進展の抑制に関与している可能性が示唆された。

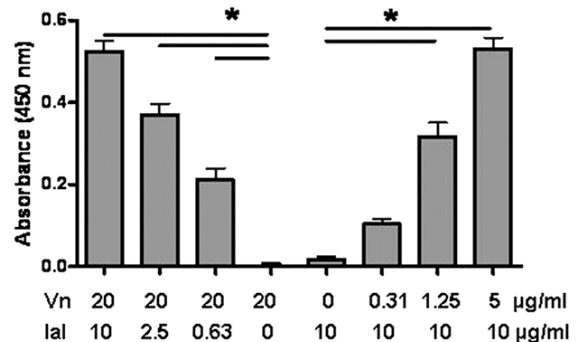


図4 SHAP と Vitronectin の結合分析。96 板に Vitronectin を固相化し、ITI (SHAP) 溶液と保温した後に、抗 ITI 抗体を用いて結合した ITI を検出した。

(3) 脳出血モデル：脳組織に HA が豊富に存在する。基底核へコラゲナーゼ注射によるマウスの脳出血モデルでは、SHAP-HA 複合体が、出血前に殆ど存在しないが、出血後に顕著に増加したことを確認した。手術後 1 日目には、野生型マウスに比べて、SHAP 欠損マウスの脳の水含量が有意に高かった。3 日後の行動解析による神経障害評価では、SHAP 欠損マウスの障害が有意に重かった（図5）。解剖所見でも、SHAP 欠損マウスが脳内血塊の容積が有意に大きかった（図6）。ヒアルロン酸合成酵素 1 (HAS1) 欠損マウスの脳 HA 含量が約 2 割低下したが、コラゲナーゼモデルでは、野生型マウスと有意な差を観察できなかった。しかし、損傷度の低い尾状核へ自家血注射による脳出血モデルでは、HAS1 欠損マウスでは、HA の含量低下と低分子が顕著で、神経障害も有意に高かった。これらの結果は、脳出血における HA や SHAP の抑炎作用と神経細胞保護作用を示唆する。

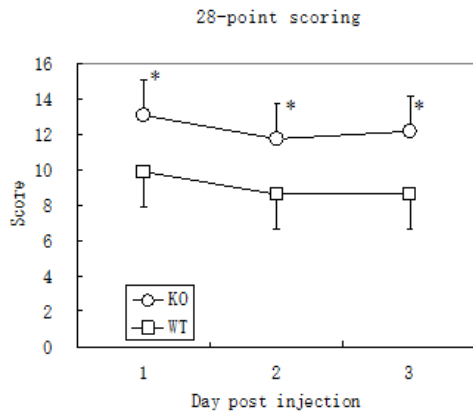


図5 行動解析による神経障害評価結果。WT: 野生型マウス、KO: SHAP 欠損マウス、*: $p < 0.05$

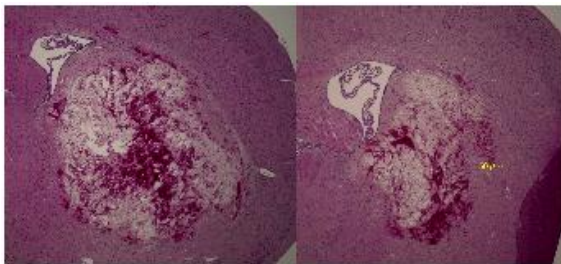


図6 脳基底核へコラゲナーゼ注射後 24 時間の脳内血塊 (左: SHAP 欠損マウス、右: 野生型マウス)

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 8 件)

- ① Urakawa H, Nishida Y, Wasa J, Arai E, Zhuo L, Kimata K, Kozawa E, Futamura N, Ishiguro N. Inhibition of hyaluronan synthesis in breast cancer cells by 4-Methylumbelliferone suppresses tumorigenicity in vitro and metastatic lesions of bone in vivo. *Int J Cancer*. 査読有、2012, 130(2):454-66. DOI: 10.1002/ijc.26014.
- ② Yabushita H, Iwasaki K, Kanyama K, Obayashi Y, Zhuo L, Itano N, Kimata K, Wakatsuki A. Clinicopathological role of serum-derived hyaluronan-associated protein (SHAP)-hyaluronan complex in endometrial cancer. *Obstetrics and Gynecology International*, 査読有、2011, 2011:739150.
- ③ Arai E, Nishida Y, Wasa J, Urakawa H, Zhuo L, Kimata K, Kozawa E, Futamura N, Ishiguro N. Inhibition of hyaluronan

retention by 4-methylumbelliferone suppresses osteosarcoma cells in vitro and lung metastasis in vivo. *Br J Cancer*. 査読有、2011, 105(12):1839-49. DOI: 10.1038/bjc.2011.459.

- ④ Zhuo L, Kimata K. Serum level of SHAP as a disease marker: in comparison with hyaluronan. *Trends Glycosci Glyc*, 査読有、2010, 22(124):80-88.
- ⑤ Zhu L, Zhuo L, Kimata K, Yamaguchi E, Watanabe H, Aronica M, Hascall VC, Baba K. Deficiency of the SHAP-hyaluronan complex enhances airway hyperresponsiveness in a murine model of asthma. *Int Arch Allergy Imm*, 査読有、2010, 153(3):223-233.
- ⑥ Kanyama K, Yabushita H, Obayashi Y, Noguchi M, Zhuo L, Itano N, Kimata K, Wakatsuki A. Role of hyaluronan synthase, hyaluronan and serum-derived hyaluronan-associated protein (SHAP)-hyaluronan complex in endometrial cancer. *J Aichi Med Univ Assoc*, 査読有、2010, 38:29-42.
- ⑦ Garantziotis S, Li Z, Potts EN, Kimata K, Zhuo L, Morgan DL, Savani RC, Noble PW, Foster WM, Schwartz DA, Hollingsworth JW. Hyaluronan mediates ozone-induced airway hyperresponsiveness in mice. *J Biol Chem*. 査読有、2009, 284(17):11309-17.
- ⑧ Adair JE, Stober VP, Sobhany M, Zhuo L, Roberts JD, Negishi M, Kimata K, Garantziotis S. Inter-alpha -trypsin inhibitor promotes bronchial epithelial repair after injury through vitronectin binding. *J Biol Chem*. 査読有、2009, 284(25):16922-30.

[学会発表] (計 19 件)

- ① Stober V, Lim YP, Zhuo L, Peddada S, Kimata K, Garantziotis S. Inter-a-Trypsin Inhibitor Ameliorates Endothelial Injury In Sepsis. American Thoracic Society conference (ATS), Denver, Colorado, USA, 2011.5
- ② Nishimura M, Baba K, Yamaguchi E, Zhuo L, Kimata K. Localization of hyaluronan in airways of patients with cough variant asthma. Annual Congress of European Respiratory Society (ERS), Barcelona, Spain, 2010.9.
- ③ Zhuo L, Zhu L, Zhu L, Baba K, Yamaguchi E, Kimata K. Mechanism of the protective role of the SHAP-hyaluronan complex in the murine model of airway hyperresponsiveness. The 25th

- International Carbohydrate Symposium, Tokyo, Japan, 2010. 8.
- ④ Kanamori A, Zhuo L, Kimata K, Kannagi R. Characterization of influence of glycans on CD44 variant form (CD44v8-10) for cell adhesion mediated by E-selectin. The 25th International Carbohydrate Symposium, Tokyo, Japan, 2010. 8.
- ⑤ Zhuo L, Nakamura T, Zhu L, Yang Q, Hamamaoto T, Kimata K. Evidence for the presence of a novel SHAP transferase. HA2010, Kyoto, Japan, 2010. 6.
- ⑥ Urakawa H, Nishida Y, Wasa J, Arai E, Zhuo L, Kimata K, Kozawa E, Futamura N, Ishiguro N. Inhibition of hyaluronan synthesis in breast cancer cells suppresses tumorigenicity in vitro and metastatic lesion of bone in vivo. HA2010, Kyoto, Japan, 2010. 6.
- ⑦ Nishida Y, Wasa J, Urakawa H, Arai E, Shinomura T, Zhuo L, Kimata K, Knudson W, Knudson C, Ishiguro N. Hyaluronan plays significant roles not only in maintenance of musculoskeletal systems but also in tumorigenicity of musculoskeletal malignant tumors. HA2010, Kyoto, Japan, 2010. 6.
- ⑧ 西村眞樹, 馬場研二, 河合聖子, 田中博之, 横江徳仁, 高橋大輔, 八木健郎, 久保昭仁, 山口悦郎, 卓麗聖. 咳喘息の病態における気道内ヒアルロン酸 (HA) の意義について. 第 22 回日本アレルギー学会春季臨床大会, 国立京都国際会館 2010. 5.
- ⑨ Zhuo L, Zhu L, Kimata K, Yamaguchi E, Baba K. Role of SHAP-hyaluronan complex in ovalbumin-induced airway hyperresponsiveness in mice. 20th International Symposium on Glycoconjugate. Glycans: From Molecules to Structures to Therapeutics. Puerto Rico, 2009. 11.
- ⑩ 西村眞樹, 馬場研二, 河合聖子, 田中博之, 横江徳仁, 高橋大輔, 八木健郎, 山口悦郎, 塩野裕之, 卓麗聖. 咳喘息患者の気管支粘膜におけるヒアルロン酸の局在について. 第 59 回日本アレルギー学会秋季学術大会, 秋田キャッスルホテル, 2009. 10.
- ⑪ Zhuo L, Zhu L, Baba K, Yamaguchi E, Kimata K. Formation of SHAP-hyaluronan covalent complex prevents the development of airway hyperresponsiveness in mice. 第 82 回日本生化学会大会, 神戸, 2009. 10.
- ⑫ Kanamori A, Zhuo L, Kimata K, Kannagi R. Investigation of influence of glycans on CD44 variant forms for cell adhesion mediated by selectin. 第 82 回日本生化学会大会, 神戸国際会議場, 2009. 10.
- ⑬ 卓麗聖, 横地高志, 木全弘治. マウス肝障害における好中球細胞の浸潤は SHAP-ヒアルロン酸複合体を要求する. 糖鎖科学名古屋拠点第 7 回若手のカフェーラム, 名古屋, 2009. 9.
- ⑭ Zhuo L, Yokochi T, Kimata K. SHAP-hyaluronan complex-null mutation enfeebles D-Galactosamine/bacterial lipopolysaccharide-induced liver injury. 6th International Conference on Proteoglycan. Aix les Bains, France, 2009. 9.
- ⑮ Lord MS, Youssef P, Zhuo L, Watanabe H, Day A, Whitelock J. Variability in the chondroitin sulfate linkage structures of bikunin-A potential biological role. 6th International Conference on Proteoglycan. Aix les Bains, France, 2009. 9.
- ⑯ Zhuo L, Zhu L, Baba K, Yamaguchi E, Kimata K. SHAP-hyaluronan complex suppresses the airway hyperresponsiveness in mice. 21st IUBMB & 12th FAOBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology, Shanghai, 2009. 8.
- ⑰ Zhuo L, Zhu L, Kimata K, Yamaguchi E, Baba K. Ovalbumin-induced Airway Hyperresponsiveness is increased in SHAP-hyaluronan complex deficient Mice. Joint Conference of 8th PPCTSS, 41st Annual Meeting of JSCTR, 56th Annual Meeting of JMC, and YICCM, Shonan Village Center, Kanagawa, Japan 2009. 6.
- ⑱ Stober V, Kornepati A, Siryaporn E, Lim Y, Zhuo L, Kimata K, Garantziotis S. Inter-alpha-trypsin inhibitor ameliorates endotoxin-induced endothelial injury. American Thoracic Society (ATS) 2009. 5.
- ⑲ Adair J, Stober V, Zhuo L, Roberts J, Kimata K, Garantziotis S. Inter- α -trypsin inhibitor promotes epithelial recovery after injury through vitronectin binding. American Thoracic Society (ATS) 2009. 5.

〔図書〕（計 1 件）

- ① 卓麗聖、木全弘治. 「ますます重要になる細胞周辺環境の科学技術-細胞の生存、増殖、機能のコントロールから再生医療まで」(遺伝子医学 MOOK 別冊). 田畑泰彦編、株式会社メディカルドゥ, p195-200, 2009.

〔産業財産権〕

○取得状況（計 1 件）

名称：ピクニン遺伝子のターゲティング用 DNA

発明者：卓麗聖、米田雅彦、木全弘治

権利者：生化学工業株式会社

種類：特許

番号：特許第 4565531 号

取得年月日：2010. 8. 13

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

卓麗聖 (LISHENG ZHUO)

愛知医科大学・医学部・准教授

研究者番号：00399031

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

木全弘治 (KOJI KIMATA)

愛知医科大学・名誉教授

研究者番号：10022641

馬場研二 (KENJI BABA)

愛知医科大学・医学部・教授

研究者番号：80211499