

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：16101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670190

研究課題名(和文)術後性肺静脈狭窄症の分子病態解明：外膜出血関連酸化ストレス制御を目指して

研究課題名(英文)Approach to mechanism for post-operative pulmonary vein stenosis: experimental trials for adventitial hemorrhage-associated oxidative stress regulation

研究代表者

坂下 直実 (SAKASHITA, Naomi)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部・教授

研究者番号：90284752

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：ヘムオキシゲナーゼ1(HO-1)機能不全による術後性肺静脈狭窄誘導を検証するため培養平滑筋細胞を用いて実験を行った。ヘム添加後の平滑筋細胞は酸化ストレス誘導、ERK、NF- κ B、STAT3活性化、細胞増殖/遊走、HO-1誘導を示した。術後性肺静脈狭窄病変は酸化ストレス陽性だがHO-1陽性細胞は認められなかった。ヘム暴露に対するHO-1機能不全が内膜肥厚をもたらすことを検証するためHO-1阻害実験を行ったが平滑筋増殖能に変化はなかった。仮説が検証できなかったため粥状動脈硬化におけるHO-1発現の意義を検討した。粥腫内泡沫化マクロファージのHO-1誘導能は障害され粥腫を不安定化していると思われた。

研究成果の概要(英文)：We examined neointimal proliferation under situation of hemeoxygenase-1 (HO-1) insufficiency. Smooth muscle cell with hemin treatment showed oxidative stress, temporal overexpression of ERK, NF- κ B, STAT3, HO-1 and smooth muscle cell proliferation/migration. Immunohistochemistry revealed strong immunoreactivity of oxidative stress marker, 8OHdG, to the proliferated neointima of the post-operative stenosed pulmonary vein. However, no HO-1 was detected in pulmonary vein. These data suggest that HO-1 expression in pulmonary vein prevented hemin-induced oxidative stress and smooth muscle proliferation. To address this hypothesis, effect of HO-1 inhibitor ZnPP on hemin-induced smooth muscle proliferation was examined but ZnPP exerted no effect on smooth muscle cells proliferation. Because our hypothesis did not confirmed, we next examined role of HO-1 on atherosclerosis. We found foamy transformed macrophages in atheromatous plaque failed to express HO-1 and may promote plaque rupture.

研究分野：病理学

キーワード：ヘムオキシゲナーゼ1 平滑筋 酸化ストレス マクロファージ 粥状動脈硬化

1. 研究開始当初の背景

総肺静脈還流異常症 (TAPVR) は肺静脈血が右心系に還流する先天性心疾患であり、根治療法として開胸血行動態修復術が行われる。しかし、この根治術後に外科的に吻合した肺静脈が狭窄して致死的肺高血圧症をもたらす合併症 (術後性肺静脈狭窄症) が発生することがある。この合併症は TAPVR 根治術を受けた患児の 10% に出現するがその原因は不明であり治療法も存在しない。われわれは TAPVR 根治術後に肺高血圧症を来して死亡した患児の病理解剖を通して本疾患に出現する異常な増殖内膜内の平滑筋細胞は酸化ストレスマーカー陽性であることを見いだした。さらに術後性肺静脈狭窄症類似病変を呈した椎骨動脈解離性動脈瘤患者 (くも膜下出血の既往あり) の病理解剖解析によりこれらの内膜肥厚性病変には以下の特徴が存在することを見いだした。血行修復術やくも膜下出血などの既往病変 (外膜出血) が存在する。肥厚内膜には中膜平滑筋の遊走と弾性板破壊を伴う血管リモデリングが認められる。病変内膜のみならず中膜平滑筋も酸化ストレスマーカー陽性を示す。以上の所見より外膜出血を契機として活性酸素傷害と中膜平滑筋の活性化/内膜遊走が生じ、術後性肺静脈狭窄症が発生する可能性が示唆された。

2. 研究の目的

本研究の目的は手術操作等によって生じた血管外膜出血が活性酸素傷害と炎症反応を介して内膜肥厚性病変をもたらすことを証明することである。外膜出血と活性酸素傷害/炎症反応を結びつける分子はヘムである。赤血球内に存在するヘモグロビンは血腫内に浸潤するマクロファージによって処理される。この際、ポルフィリン骨格を有するヘムはヘムオキシゲナーゼ 1 (HO-1) によって抗酸化物質であるビリベルジンと一酸化炭素に分解される。上述の内膜肥厚を示す肺静脈/椎骨動脈の組織学的検討よりこのような内膜肥厚性病変では病変内にマクロファージが浸潤しているが HO-1 の発現はほとんど認められないことが明らかとなった。これらの観察結果に基づいて HO-1 誘導不全による酸化ストレス誘導と炎症反応亢進が術後性肺静脈狭窄症の原因であることを病理学的に証明する。また、酸化ストレスの抑制による内膜肥厚性病変の抑制が可能かどうかを実験的に検証する。

3. 研究の方法

培養平滑筋細胞にヘムを添加して酸化ストレスに反応して活性化するシグナル伝達因子 ERK と転写因子 NF- κ B の活性化を検討する。また、ヘム消去酵素 HO-1 の発現も併せて検討する。ヘム処理後の平滑筋細胞増殖能と遊走能を *in vitro* において検討すると同時に HO-1 阻害剤を添加して細胞増殖能と

遊走能の変化を検討する。外膜出血誘発性内膜肥厚性病変について組織学的検討 (細胞外マトリックスの解析) を行う。また、HO-1 欠損マウスを用いて外膜出血誘発性内膜肥厚モデルを作成し、マウスモデルをヒト内膜肥厚性病変と比較検討する。さらにラジカルスカベンジャーなどの薬剤を用いて内膜肥厚の抑制効果を検討する。

なお、本研究では予定通りの研究成果が得られなかったため脂質代謝異常を背景に内膜増殖性病変を形成する粥状動脈硬化症についての検討を行った。

4. 研究成果

培養マウス平滑筋細胞 (P53LMAC01) を用いた実験では 10 μ M のヘム添加 5 分後をピークとして ERK 活性化が認められた。また、15 分後をピークとして NF- κ B が活性化していた。細胞増殖/遊走能の検討ではヘム処理 48 時間後に有意な細胞増殖と遊走が生じることが明らかとなった。一方、ヘムに暴露された平滑筋細胞は STAT3 活性化を介して HO-1 を誘導することが明らかとなった。遊離ヘムは細胞に対して NADPH オキシダーゼ活性化を通じて強力な酸化ストレスを誘導する。このためヘム暴露を受けた平滑筋細胞は ERK/NF- κ B の活性化を通じて増殖と遊走を示す一方で STAT3 の活性化を通して HO-1 を誘導し、ヘムの細胞毒性から自らを保護していると考えられた。

「研究開始当初の背景」に記した TAPVR 術後肺静脈狭窄症ならびに椎骨動脈解離性動脈瘤患者に見られた内膜肥厚性病変には多数の平滑筋が遊走するとともに膠原線維と弾性線維の沈着が認められた。内膜内の平滑筋細胞は酸化ストレスマーカー (8-OHdG) 陽性像を示していたが HO-1 陽性細胞は認められなかった。従って術後性肺静脈狭窄症をはじめとする外膜出血誘発性内膜肥厚性病変には平滑筋細胞の HO-1 誘導不全が存在すると考えられた。この考えを検証するために HO-1 阻害剤 ZnPP ならびに SnPP を用いて細胞増殖能/遊走能の検討を行ったがコントロール群との差を認めなかった。また、siRNA を用いて平滑筋細胞の HO-1 ノックダウンを試みたが不成功に終わった。HO-1 機能抑制実験が予想に反した結果に終わったことから当初の予定通りに実験を遂行することは難しいと判断した。そこで、高脂血症病態を背景として内膜増殖性病変を形成する粥状動脈硬化症に着目して HO-1 の機能不全について検討を行った。

まず、粥状動脈硬化症病変における HO-1 陽性細胞の分布を免疫組織化学染色によって確認すると HO-1 陽性細胞のほとんどは粥腫内に浸潤したマクロファージであった。HO-1 の基質であるヘムはヘモグロビン由来することから粥腫内の HO-1 陽性マクロファージの分布をヘモグロビン受容体 (CD163) 陽性マクロファージの分布と比較した。免疫

二重染色を用いた検討の結果、粥腫周囲のマクロファージはH0-1/CD163 二重陽性を示していたが粥腫内の泡沫化マクロファージにはH0-1 陰性 CD163 陽性マクロファージやH0-1 発現低下を示すCD163 陽性マクロファージが認められた。これらのデータより泡沫化に伴ってH0-1 の誘導不全がもたらされる可能性が示された。

泡沫化に伴うH0-1 誘導不全の可能性を検証するために培養ヒトマクロファージを用いた *in vitro* 実験を行った。ヒト末梢血単球をGM-CSF とM-CSF 存在下に培養し、IL-10 で刺激してCD163 陽性マクロファージを得た。さらにCD163 陽性マクロファージをmethyl- β -cyclodextrin コレステロール複合体で処理してCD163 陽性泡沫化マクロファージを得た。CD163 陽性マクロファージをヘモグロビン-ハプトグロビン複合体 (Hg-Hp 複合体: CD163 のリガンド) で処理すると強いH0-1 の誘導が認められたがCD163 陽性泡沫化マクロファージではヘモグロビンを取り込んだ後も十分なH0-1 の誘導は認められなかった。これらのデータより泡沫化マクロファージではCD163 を介してヘモグロビンを取り込んでもH0-1 を十分に誘導できず、酸化ストレス誘導と炎症性サイトカインの過剰発現が生じる可能性が示唆された。

H0-1 誘導不全を示す泡沫化マクロファージにおける炎症性サイトカイン過剰発現の可能性を検討するためリアルタイムPCR を用いた検討を行った。Hg-Hp 複合体で処理したCD163 マクロファージに炎症性サイトカイン (TNF、IL-1、IL6) メッセンジャーRNA に大きな変動は見られなかった。一方、CD163 陽性泡沫化マクロファージではこれらのサイトカインの発現上昇が認められた。

以上のデータから粥状動脈硬化病変に出現する泡沫化マクロファージはCD163 を介して取り込まれたヘモグロビン由来のヘムを効率的に消去できず、酸化ストレスと炎症性サイトカイン過剰産生をもたらして粥腫の破綻を促進している可能性が示唆された。

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9件)

1. Uchida T, Tamaki Y, Ayaki T, Shodai A, Kaji S, Morimura T, Banno Y, Nishitsuji K, Sakashita N, Maki T, Yamashita H, Ito H, Takahashi R, Urushidani M: CUL2-mediated clearance of misfolded TDP-43 is paradoxically affected by VHL in oligodendrocytes in ALS. *Scientific Reports (in press)*, 2016 (査読有り)
2. Takechi-Haraya Y, Nadai R, Kimura H, Nishitsuji K, Uchimura K, Sakai-Kato K, Kawakami K, Shigenaga A, Kawakami T, Otaka A, Hojo H, Sakashita N, Saito H: Enthalpy-driven interactions with sulfated glycosaminoglycans promote cell membrane penetration of arginine peptides. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1858(6): 1339-1349, 2016 (査読有り)
3. Nakajima H, Nishitsuji K, Kuwabara K, Kawashima H, Uchimura K, Akaji K, Kashiwada Y, Saito H, Sakashita N: The polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate prevents apoA-IIowa amyloidosis *in vitro* and protects human embryonic kidney 293 cells against amyloid cytotoxicity. *Amyloid*, 23(1):17-25, 2016 (査読有り)
4. Kuwabara K, Nishitsuji K, Uchimura K, Hung SC, Mizuguchi M, Nakajima H, Mikawa S, Kobayashi N, Saito H, Sakashita N: Cellular Interaction and Cytotoxicity of the Iowa Mutation of Apolipoprotein A-I (ApoA-IIowa) Amyloid Mediated by Sulfate Moieties of Heparan Sulfate. *Journal of Biological chemistry*, 290(40): 24210-24221, 2015 (査読有り)
5. Ohmoto T, Nishitsuji K, Yoshitani N, Mizuguchi M, Yanagisawa Y, Saito S, Sakashita N: K604, a specific acyl-CoA:cholesterol acyltransferase inhibitor, suppresses proliferation of U251-MG glioblastoma cells. *Molecular Medicine Reports*, 12(4): 6037-6042, 2015 (査読有り)
6. Ohmoto T, Yoshitani N, Nishitsuji K, Takayama T, Yagagisawa Y, Takeya M, Sakashita N: CD44-expressing undifferentiated carcinoma with rhabdoid features of the pancreas: molecular analysis of aggressive invasion and metastasis. *Pathology International*, 65(5): 264-270, 2015 (査読有り)
7. Yamashita S, Sakashita N, Yamashita T, Tawara N, Tasaki M, Kawakami K, Komohara Y, Fujiwara Y, Kamikawa M, Nakagawa T, Hirano T, Maeda Y, Hasegawa M, Takeya M, Ando Y: Concomitant accumulation of α -synuclein and TDP-43 in a patient with corticobasal degeneration. *Journal of Neurology*, 261(11), 2209-2217, 2014 (査読有り)
8. Sakashita N, Lei XF, Kamikawa M, Nishitsuji K: Role of ACAT1-positive late endosomes in macrophages: Cholesterol metabolism and therapeutic applications for Niemann-Pick disease type C. *Journal of Medical Investigation*, 61(3-4): 270-277, 2014 (査読有り)
9. Kamikawa M, Lei XF, Fujiwara Y, Nishitsuji K, Mizuta H, Takeya M,

Sakashita N: ACAT1-associated Late Endosomes/Lysosomes Significantly Improve Impaired Intracellular Cholesterol Metabolism and Survival of Niemann-Pick Type C Mice. Acta Histochemica et Cytochemica, 47(2): 35-43, 2014 (査読有り)

[学会発表](計14件)

1. 亀山泰和、西辻和親、小林典裕、斎藤博幸、坂下直実 . ApoA-I アミロイドーシスにおけるオートファジー・リソソーム系の役割。日本病理学会第61回秋期特別総会 平成27年11月5-6日(東京大学、東京都文京区)
2. 坂下直実、山下太郎、中川雄伸、安東由喜雄、竹屋元裕 . 肝移植後に著明なステロイド関連心筋肥大を呈した家族性アミロイドポリニューロパチーの症例解析。第3回アミロイドーシス研究会 平成27年8月21日(KKRホテル東京、東京都千代田区)
3. 桑原香織、西辻和親、山下太郎、小林典裕、内村健治、安東由喜雄、斎藤博幸、坂下直実 . AApoA1 アミロイドーシスにおけるヘパラン硫酸多硫酸化ドメインの役割。第3回アミロイドーシス研究会 平成27年8月21日(KKRホテル東京、東京都千代田区)
4. 吉谷信幸、中川雄伸、菰原義弘、竹屋元裕、坂下直実 . 肺病変。第117回中国四国スライドカンファレンス 平成27年6月27日(鳥取大学医学部、米子市、鳥取県)
5. 西辻和親、桑原香織、小林典裕、内村健治、坂下直実、斎藤博幸 . ApoA-I アミロイドの毒性に対するヘパラン硫酸糖鎖の影響。膜学会37年会 平成27年5月14-15日(早稲田大学、東京都新宿区)
6. 桑原香織、西辻和親、小林典裕、内村健治、斎藤博幸、坂下直実 . apoA1 アミロイドの毒性に対するヘパラン硫酸糖鎖の影響。第104回日本病理学会総会 平成27年4月30-5月2日(名古屋国際会議場、名古屋市、愛知県)
7. 坂下直実、大本卓司、吉谷信幸、中須千春、柳澤悠登、西辻和親 . ACAT1 陽性後期エンドゾーム陽性腫瘍(ACAT1⁺/CD44⁺高悪性度腫瘍)は ACAT 酵素活性依存性に増殖する。第104回日本病理学会総会 平成27年4月30-5月2日(名古屋国際会議場、名古屋市、愛知県)
8. 桑原香織、西辻和親、小林典裕、内村健治、坂下直実、斎藤博幸 . ApoA1 アミロイドの毒性に対するヘパラン硫酸の影響。第36回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム 平成26年11月20-21日(徳島大学大塚講堂、藤井節郎記念医科学ホール、徳島市、徳島県)
9. 桑原香織、西辻和親、小林典裕、内村健治、堀口英久、坂下直実、斎藤博幸 . ApoA1 アミロイドの毒性に対するヘパラン硫酸の影響。第2回日本アミロイドーシス研究会学術集会 平成26年8月22日(KKRホテル東京、東京都千代田区)
10. 佐藤綾、小浪裕幸、西辻和親、堀口英久、坂下直実 . 血管外膜出血誘発性血管リモデリングの分子病理学的解析：内膜肥厚形成における Heme Oxygenase 1 の意義。第46回日本動脈硬化学会総会 平成26年7月10-11日(京王プラザホテル、東京都、新宿区)
11. 中須千春、堀口英久、坂下直実 . 頸部皮下腫瘍。第114回中国四国スライドカンファレンス 平成26年6月14日(高知大学医学部臨床講義棟第三講義室、南国市、高知県)
12. 坂下直実 . 代謝制御細胞としてのマクロファージ：粥状動脈硬化、異物貪食、C型 Niemann-Pick 病、外膜出血誘発性内膜狭窄。第54回日本リンパ網内系学会総会特別講演(招待講演) 平成26年6月19-21日(山形国際ホテル、山形市、山形県)
13. 佐藤綾、小浪裕幸、西辻和親、堀口英久、坂下直実 . 血管外膜出血誘発性血管リモデリングの分子病理学的解析：内膜肥厚形成における Heme Oxygenase 1 の意義。第103回日本病理学会総会 平成26年4月24-26日(広島国際会議場、広島市、広島県)
14. 大本卓司、吉谷信幸、堀口英久、坂下直実 . ラブドイド分化を示す腭末分化癌の症例解析：悪性形質獲得の分子病態とコレステロール代謝制御療法の可能性。第103回日本病理学会総会 平成26年4月24-26日(広島国際会議場、広島市、広島県)

6. 研究組織

(1)研究代表者

坂下 直実 (SAKAHITA, Naomi)
徳島大学・大学院医歯薬学研究部・教授
研究者番号：90284752

(2)研究分担者

堀口 英久 (HORIGUCHI, Hidehisa)
徳島大学・大学院医歯薬学研究部・准教授
研究者番号：40304505
平成26年8月6日研究分担者から削除

西辻 和親 (NISHITSUJI, Kazuchika)
徳島大学・大学院医歯薬学研究部・助教
研究者番号：40532768