

令和 6 年 6 月 19 日現在

機関番号：32622

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2023

課題番号：19K08690

研究課題名(和文) 内皮グリコキリックス強化を戦略とする新たな血管保護療法の開発

研究課題名(英文) Strategy of vascular protection by augmentation of endothelial glycocalyx

研究代表者

本田 一穂 (Honda, Kazuho)

昭和大学・医学部・教授

研究者番号：10256505

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：内皮グリコキリックス(GCX)は血管内皮の恒常性維持に重要な役割を果たしている。我々は抗癌剤ゲムシタピンによる *in vitro* の内皮傷害モデルを確立し、GCXの可視化とGCX中シアル酸に着目した内皮機能の変化を明らかにした。傷害時には糖鎖末端のシアル酸が減少とシアル酸転移酵素(ST6Gal1)の発現低下があり、PECAMやVEGFR2の発現が低下していた。さらに内皮のIL-1^β、IL-6 mRNAの発現が増加した。GCX中の糖鎖修飾の変化がサイトカインの産生を介して、血管傷害を促進する可能性が示唆された。これらの知見は内皮GCXのシアル酸修飾の強化が血管保護療法の開発になることを示している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

抗癌剤ゲムシタピンによる *in vitro* の内皮傷害モデルを確立し、内皮GCXの構成要素ををレクチン(WGA、SNA、RCA-1)染色で可視化する方法を用いて、内皮傷害に関与する機能分子とその糖鎖修飾の重要性が明らかとなった。また、シアル酸修飾にはシアル酸転移酵素ST6Gal1と分解酵素NEU1の調節機構が今後の研究課題として重要であるさらに、内皮が産生するIL-1^βやIL-6などの炎症性サイトカインが内皮傷害促進因子として重要であることが明らかとなった。これらの知見は、内皮傷害を背景とする動脈硬化、糖尿病、敗血症、薬剤性腎障害など多くの疾患の予防や治療に役立つ学術的ならびに社会的意義が大きい。

研究成果の概要(英文)：The thin layer of glycoproteins on the endothelial surface, called glycocalyx (GCX), plays an important role in maintaining the homeostasis of the vascular endothelium. We established an *in-vitro* endothelial injury model induced by the anticancer drug gemcitabine, and clarified changes in endothelial function by visualizing GCX and focusing on sialic acid in GCX. Lectin staining revealed that sialic acid at the end of sugar chains decreased during injury, and the expression of functional molecules such as PECAM and VEGFR2 decreased. The decrease in sialic acid was associated with decreased expression of sialyltransferase (ST6Gal1), and was accompanied by increased expression of endothelial IL-1^β and IL-6 mRNA. It was suggested that changes in glycosylation in GCX may promote vascular injury through the production of inflammatory cytokines. These findings indicate that enhanced sialic acid modification of endothelial GCX may provide a clue to the development of vasoprotective therapy.

研究分野：腎病理学

キーワード：血管内皮 グリコキリックス シアル酸 ゲムシタピン 糸球体内皮傷害 血栓性微小血管症 炎症性サイトカイン

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

研究課題：内皮グリコカリックス強化を戦略とする新たな血管保護療法の開発 (19K08690)

1. 研究開始当初の背景

内皮細胞の表面にはグリコカリックス(GCX)と呼ばれる糖蛋白の薄層が存在し、細胞膜に結合するコアタンパク質(シンデカン、グリピカンなど)、コアタンパク質に結合するグリコサミノグリカン(GAG)(ヘパラン硫酸、コンドロイチン硫酸など)、ヒアルロン酸などから構成されている(1)。また、内皮細胞膜に結合する種々の機能分子(PECAM や VEGFR2 など)も糖鎖修飾され、GCX 中に存在している。したがって GCX は、内皮の細胞間接着、病原体感染、細胞内輸送、血管新生などを調節していると考えられ、注目を集めている(2,3)。(図1)。

一方、動脈硬化や糖尿病に背景には血管内皮傷害が存在すると考えられている。また、敗血症や血管炎、薬剤性糸球体傷害である血栓性微小血管症(TMA)も内皮傷害が重要な病態である。しかし、いずれの場合もその詳細なメカニズムは分かっていない。そこで、今回我々は、抗癌剤であるゲムシタピン(GEM)の内皮傷害を研究対象として、内皮 GCX に着目した内皮傷害のメカニズムを検討した。

2. 研究の目的

血管内皮傷害における内皮 GCX の変化を明らかにし、内皮傷害における GCX の意義と内皮機能に対する影響を解明する。これらの知見から、内皮傷害の予防あるいは治療に役立つ、内皮 GCX に着目した新たな治療戦略(血管保護療法)を開発するための糸口を見出すことを研究目的とする。

3. 研究の方法

培養ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)を用い、GEM 曝露後の細胞増殖と細胞形態、特に GCX に注目して、GEM による内皮傷害のメカニズムを解析した。コンフルエント期の HUVEC に GEM(5~100 μ M)を 48 時間曝露した。MTT アッセイで細胞の生存率について解析し、さらに、細胞形態、内皮 GCX の末端シアル酸の結合性をレクチン(WGA、SNA、RCA-1)染色で、細胞接着因子は PECAM や VEGFR2 の免疫組織化学で評価した。また、シアル酸転移酵素 2,6-シアリルトランスフェラーゼ(ST6Gal1)、分解酵素シアリダーゼ(NEU1)、および IL-1 および IL-6 の mRNA 発現を RT-PCR 法を用いて評価した。

4. 研究成果

5 μ M の GEM 曝露では、細胞の生存率は保持されていたが、PECAM および VEGFR2 のわずかな発現低下を伴う細胞収縮と細胞間離開を誘発した。また、GEM により PECAM および VEGFR2 の mRNA の発現が低下した(図2)。レクチン染色では SNA(末端シアル酸を認識)の減弱、RCA-1(脱末端シアル酸を認識)の増強が観察され、内皮 GCX の末端シアル酸の減少が示された(図3)。一方、シアル酸分解酵素 NEU-1 の mRNA 量は変化せず、シアル酸転移酵素 ST6Gal1 の mRNA 量は低下した(図4)。さらに、内皮からの IL-1 および IL-6 mRNA の発現は、極低濃度(0.01 μ M)の GEM 曝露より有意に増加した(図5)。

この研究により、GEM が内皮 GCX の末端シアル酸を減少させることが明らかとなった。この末端シアル酸の減少は、シアル酸の分解酵素である NEU-1 の増加によるものではなく、シアル酸の転移酵素である ST6Gal1 の発現低下によるものであった。また、GEM は細胞接着に重要な PECAM-VEGFR2 複合体の発現を低下させ、そのシグナル伝達を障害した可能性がある(4)。血管内皮 GCX における末端シアル酸の破壊は、血管内皮の重要な機能的役割を著しく低下させ、重度の内皮機能障害につながる可能性を示唆している。さらにこのような GCX のシアル酸の減少が GEM 曝露による顕著な炎症性サイトカイン産生に関与し、内皮傷害を増強していることが疑われた(5)。

以上より、GEM は ST6Gal1 発現阻害を通じて内皮 GCX のシアル酸を減少させ、内皮細胞から炎症性サイトカインの産生を引き起こし、TMA につながる内皮傷害を誘導する新たな知見が示された。これらの知見は、内皮の生理的機能を維持して、内皮傷害を抑制するためには、内皮 GCX の糖鎖修飾、特に末端シアル酸を維持することが重要であること、そして、内皮自らの炎症性サイトカイン産生が内皮傷害を促進する主因であり、その制御も内皮傷害の予防や治療の標的因子であることが明らかとなった。これらの研究成果は、*Med Mol Morphol.* 2023; 56:128-137. に掲載された(6)。

図1: 内皮 GCX の構造と構成要素 (文献 6)

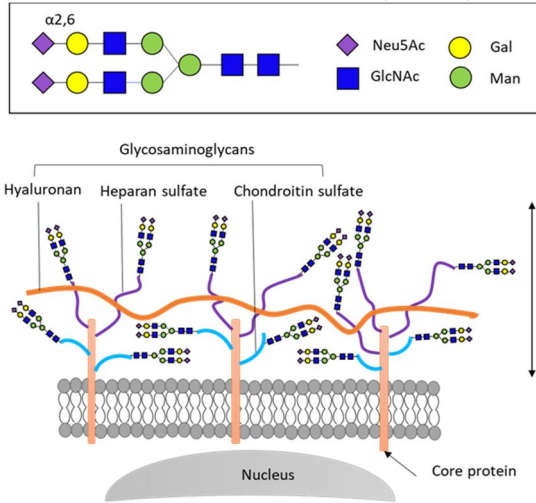


図2: GEM による PECAM および VEGFR2 mRNA の発現低下 (文献 6)

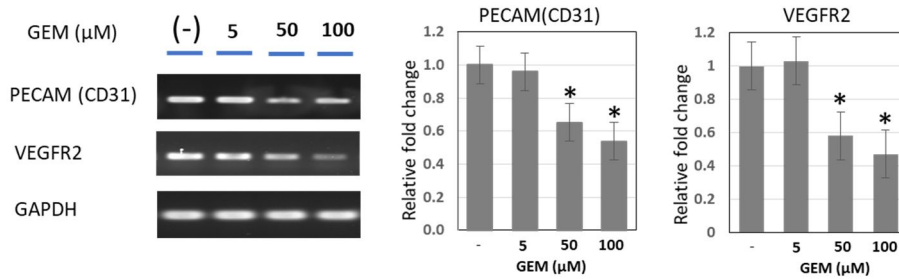


図3: GEM による GCX 末端シアル酸 (SNA) の減少と脱シアル酸 (RCA) の増加 (文献 6)

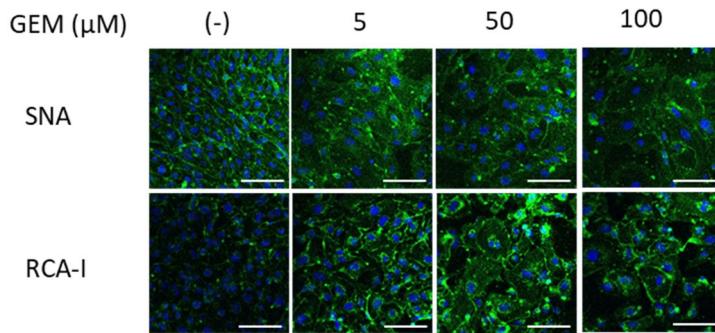


図4: GEM によるシアル酸分解酵素 NEU-1 とシアル酸転移酵素 ST6Gal1 の mRNA 量の変化 (文献 6)

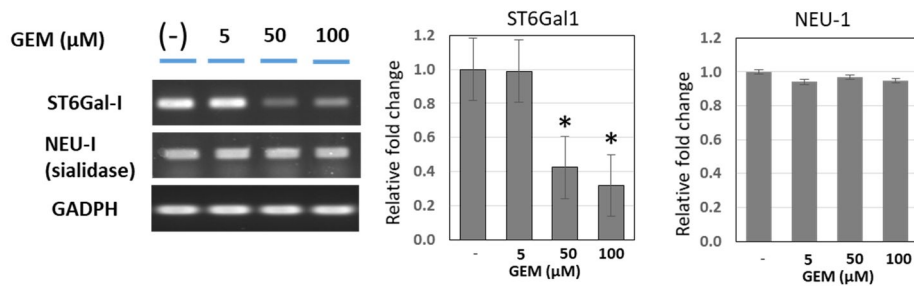
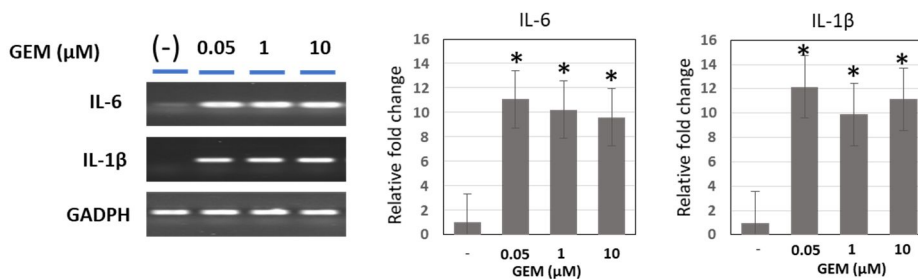


図5: GEM による IL-1 および IL-6 mRNA の発現増加 (文献 6)



参考文献

- 1) Reitsma S, Slaaf DW, Vink H, Zandvoort MAMJv, Egbrink MGAo. The endothelial glycocalyx: composition, functions, and visualization. *Pflugers Arch* 2007; 454:345-359.
- 2) Kitazume S, Imamaki R, Ogawa K, Taniguchi N. Sweet role of platelet endothelial cell adhesion molecule in understanding angiogenesis. *Glycobiology* 2014 ; 24:1260-1264.
- 3) Kitazume S, Imamaki R, Kurimoto A, Ogawa K, Kato M, Yamaguchi Y, Tanaka K, Ishida H, Ando H, Kiso M, Hashii N, Kawasaki N, Taniguchi N. Interaction of platelet endothelial cell adhesion molecule (PECAM) with 2,6-sialylated glycan regulates its cell surface residency and anti-apoptotic role. *J Biol Chem* 2014; 289:27604-27613.
- 4) Imamaki R, Ogawa K, Kizuka Y, Komi Y, Kojima S, Kotani N, Honke K, Honda T, Taniguchi N, Kitazume S. Glycosylation controls cooperative PECAM-VEGFR2-3 integrin functions at the endothelial surface for tumor angiogenesis. *Oncogene* 2018; 37:4287-4299.
- 5) Krick S, Helton ES, Easter M, Bollenbecker S, Denson R, Zaharias R, Cochran P, Vang S, Harris E, Wells JM, Barnes JW. ST6GAL1 and 2-6 Sialylation Regulates IL-6 Expression and Secretion in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Front Immunol* 2021; 12:693149.
- 6) Gunji M, Sawa C, Akiyama M, Mukai S, Takaki T, Kang D, Honda K. Gemcitabine alters sialic acid binding of the glycocalyx and induces inflammatory cytokine production in cultured endothelial cells. *Med Mol Morphol.* 2023; 56:128-137.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Gunji M, Sawa C, Akiyama M, Mukai S, Takaki T, Kang D, Honda K.	4. 巻 9
2. 論文標題 Gencitabine alters sialic acid binding of the glycocalyx and induces inflammatory cytokine production in cultured endothelial cells.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Med Mol Morphol	6. 最初と最後の頁 1 - 10
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00795-022-00347-4.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Honda K, Takaki T, Kang D	4. 巻 42
2. 論文標題 Recent advances in electron microscopy for the diagnosis and research of glomerular diseases.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Kidney Research and Clinical Practice	6. 最初と最後の頁 155 -165
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.23876/j.krcp.21.270.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Mukai Shumpei, Takaki Takashi, Nagumo Tasuku, Sano Mariko, Kang Dedong, Takimoto Masafumi, Honda Kazuho	4. 巻 54
2. 論文標題 Three-dimensional electron microscopy for endothelial glycocalyx observation using Alcian blue with silver enhancement	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Medical Molecular Morphology	6. 最初と最後の頁 95 ~ 107
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00795-020-00267-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 高木孝士, 本田一穂	4. 巻 13
2. 論文標題 腎病理 3) 電子顕微鏡からの新しい展開	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 腎臓内科	6. 最初と最後の頁 417 ~ 423
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 高木孝士, 坂上万里, 中村 恵, 康 徳東, 本田一穂
2. 発表標題 病理3-4: FFPE切片とLV-SEMを用いた免疫電顕法の検討
3. 学会等名 第50回日本腎臓学会東部学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐野真理子, 澤智華, 本田一穂, 他
2. 発表標題 PP-060: ゲムシタピンによる血管内皮細胞傷害のメカニズムの検討
3. 学会等名 第126回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 澤 智華, 佐野真理子, 本田一穂, 他
2. 発表標題 PP-150: 細胞外核酸による血管内皮細胞に対する影響
3. 学会等名 第126回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐野真理子, 澤智華, 康德東, 高木孝士, 本田一穂
2. 発表標題 培養系球体内皮細胞を用いたゲムシタピンの腎障害機序の検討
3. 学会等名 第125回日本解剖学会総会・学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 向井俊平、高木孝士、南雲佑、佐野真理子、康德東、本田一穂、瀧本雅文
2. 発表標題 P-191: FFPE 切片を用いた LV-SEM による腎血管内皮の Glycocalyx の新たな可視化法の確立
3. 学会等名 第125回日本解剖学会総会・学術集会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	康 徳東 (Kang Dedong) (00571952)	昭和大学・医学部・講師 (32622)	
研究 分担者	高木 孝士 (Takaki Takashi) (10774820)	昭和大学・大学共同利用機関等の部局等・准教授 (32622)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------