

令和 4 年 6 月 6 日現在

機関番号：32661

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K19418

研究課題名（和文）カドミウムによる動脈硬化発症・進展を促すデルマタン硫酸糖鎖伸長メカニズムの解明

研究課題名（英文）Clarification of dermatan sulfate elongation mechanism that promotes onset and progress of atherosclerosis by cadmium

研究代表者

原 崇人（HARA, Takato）

東邦大学・薬学部・講師

研究者番号：90805681

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）：カドミウムは動脈硬化症の危険因子である。動脈硬化血管壁に蓄積したデルマタン硫酸糖鎖は病変の進展を促進することが知られている。そこで、血管内皮細胞のデルマタン硫酸糖鎖にカドミウムが及ぼす影響を検討した。その結果、カドミウムによるデルマタン硫酸糖鎖の伸長が認められ、糖鎖伸長酵素であるCHSY1がPKCを介して誘導されることが示された。また、CHSY1がカドミウムによる内皮細胞毒性を増悪させることも明らかとなった。血管におけるデルマタン硫酸糖鎖がカドミウム毒性を修飾し、動脈硬化の進展を促進させることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

カドミウムは我々が日常生活で非意図的に曝露する重金属であり、動脈硬化症の危険因子である。動脈硬化の進展過程では、血管内皮細胞下層においてLDLコレステロールの蓄積と酸化が生じるが、血管壁に過剰に蓄積したデルマタン硫酸糖鎖はこれらの変化を促進する。本研究では、カドミウムが内皮細胞におけるデルマタン硫酸糖鎖伸長酵素の発現を増加させることを明らかにした。重金属の毒性学研究を通じて、動脈硬化進展の病理組織学的知見に対する分子基盤を理解する上で重要な知見を示し、人々の健康の維持増進に貢献する結果となったものとする。

研究成果の概要（英文）：The present study revealed that cadmium elongates the dermatan sulfate chain synthesized by vascular endothelial cells. Additionally, it was also revealed that CHSY1, dermatan sulfate synthase, is upregulated via PKC and exacerbates cadmium cytotoxicity. These results suggest that dermatan sulfate sugar chains in blood vessels modulate cadmium toxicity and promote the development of atherosclerosis.

研究分野：衛生薬学

キーワード：カドミウム 血管内皮細胞 デルマタン硫酸糖鎖 プロテオグリカン 動脈硬化 CHSY1

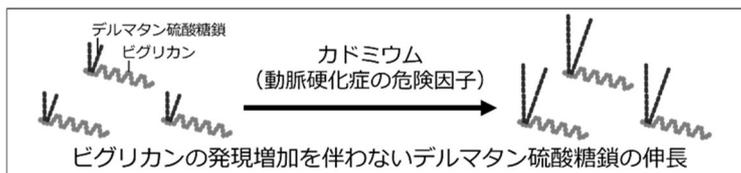
1. 研究開始当初の背景

カドミウムはコメやタバコなどを通じて我々が意図せずに曝露する重金属であり、脂質プラーク形成を伴う動脈硬化病変を発症させることが動物実験で示されている。それに加えて、疫学研究からもカドミウムは動脈硬化症の危険因子であることが報告されている。動脈硬化の進展過程で生じた脂質プラークは様々な心血管疾患を誘発するため、脂質プラーク形成を理解することは極めて重要である。脂質プラーク形成は LDL コレステロールが血管壁に蓄積し、酸化を受けることを発端とし、これらの変化は血管壁に過剰に蓄積したデルマトン硫酸糖鎖の存在下において促進される。そのため、デルマトン硫酸糖鎖は脂質プラーク形成を伴う動脈硬化を進展させる因子となる。

血管の内腔を覆う内皮細胞は、カドミウムが各種臓器に移行する際に必ず接触する標的細胞である。これまでに、内皮細胞から合成されるデルマトン硫酸糖鎖がカドミウムによって増加すること、およびカドミウムにより増加したデルマトン硫酸糖鎖がピグリカンタンパク質と結合して細胞外に分泌されること、を明らかにしていた。これより、ピグリカンの合成促進に伴いデルマトン硫酸糖鎖も増加することが、動脈硬化の増悪素因となると考えられていた。しかしながら、カドミウムは内皮細胞におけるピグリカンの発現に影響しないことが明らかとなり、これまでの予想と異なるデルマトン硫酸糖鎖が増加する機構の存在が示唆された。

2. 研究の目的

上記の研究背景から、「ピグリカンの発現増加を伴わないデルマトン硫酸糖鎖の伸長が脂質プラーク形成の分子基盤に存在するのではないか」と着想した。すなわち、カドミウムによる内皮細胞デルマトン硫酸糖鎖の伸長機構を明らかにすることが本研究の目的である。



3. 研究の方法

本研究目的の達成には、(1) カドミウムにより内皮細胞が合成するデルマトン硫酸糖鎖が伸長するのか (2) 内皮細胞が発現するデルマトン硫酸糖鎖の伸長酵素はどれか、その内の (3) どの酵素がカドミウムによりどのように変動するか、を明らかにする必要があった。デルマトン硫酸糖鎖の基本構造は、高度に硫酸化された N-アセチルガラクトサミンとグルクロン酸またはイズロン酸の直鎖二糖繰り返し構造である。そこで、この糖鎖長は、 $[^3\text{H}]$ グルコサミンと $[^{35}\text{S}]$ 硫酸で二重標識した血管内皮細胞、およびその培養上清への分泌物を陰イオン交換クロマトグラフィーとゲルろ過クロマトグラフィーで分離することで解析した。内皮細胞において発現するデルマトン硫酸糖鎖伸長酵素の探索、および発現調節機構の解析は、定量的 RT-PCR およびウェスタンブロット法にて行った。カドミウムによる内皮細胞傷害性は乳酸脱水素酵素の逸脱量を指標に測定した。これらの実験は、形質がヒトの内皮細胞と類似しており、既述の研究結果が蓄積されているウシ大動脈内皮細胞を用いて基礎的な解析を行った。結果の一部は、ヒト臍帯静脈内皮細胞株の EA.hy926 細胞でも確認することで、普遍性の検討も加えた。

4. 研究成果

はじめに、カドミウムがデルマトン硫酸の糖鎖長に及ぼす影響を検討した。コンフルエントの血管内皮細胞に対して、 $[^3\text{H}]$ グルコサミンと $[^{35}\text{S}]$ 硫酸を含む培地でカドミウムを曝露した。細胞層および培養上清を陰イオン交換クロマトグラフィーで分離したところ、先行研究と同様に 0.6 M NaCl 付近で溶出されるピークのうち、 $[^3\text{H}]$ グルコサミン由来のピークのみ増大が認められた (図 1A)。本分画を回収し、デルマトン硫酸の分解酵素であるコンドロイチナーゼ ABC で処理した後に、ゲル濾過クロマトグラフィーによる分離を行った。その結果、ピークのシフトが認められたことより、本ピークにデルマトン硫酸糖鎖が含まれることが明らかとなった (図 1B)。

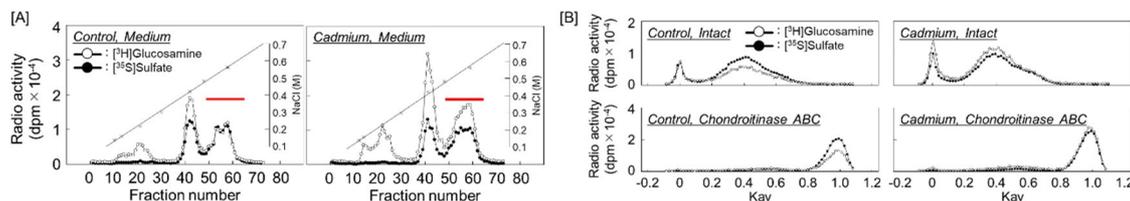


図 1 血管内皮細胞が分泌するデルマトン硫酸糖鎖はカドミウムにより増加する。コンフルエントの血管内皮細胞を $[^3\text{H}]$ グルコサミンと $[^{35}\text{S}]$ 硫酸の存在下、カドミウムを $2\mu\text{M}$ で 24 時間曝露し、細胞外に分泌された分子を [A] DEAE イオン交換クロマトグラフィーで分離・解析した。赤線で示した分画を回収し、一部をコンドロイチナーゼ ABC で消化した後、[B] Sepharose CL-4B クロマトグラフィーで分離・解析した。

また、図 1A で回収した分画に含まれるタンパク質をパパインで消化した後に、ゲル濾過クロマトグラフィーによる分離を行ったところ、カドミウム曝露群の方が早く溶出したことから、カドミウムがデルマタン硫酸糖鎖の分子サイズを増大させることが明らかとなった（図 2）。これらの結果から、カドミウムは内皮細胞のデルマタン硫酸糖鎖の硫酸化量は変化させることなく、糖鎖のみ伸長させることが明らかとなった。

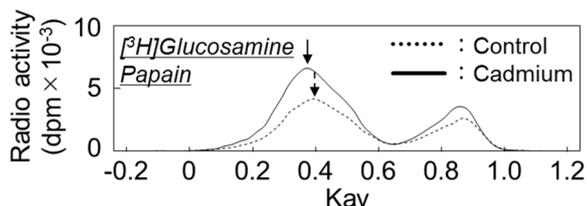


図 2 カドミウムは内皮細胞が合成するデルマタン硫酸糖鎖を伸長させる。図 1A の赤線で示した分画を回収し、一部をパパインで消化した後、Sepharose CL-6B クロマトグラフィーで分離・解析した。

そこで、現在までに報告されている 6 種類のデルマタン硫酸糖鎖の伸長に関わる酵素 (CHSY1, CHSY3, CHPF, CHPF2, CSGALNACT1, CSGALNACT2) について、内皮細胞における発現を検討したところ、これら全ての酵素の遺伝子が発現していることが明らかとなった。この中で、CHSY1 のみカドミウムの濃度および時間依存的な発現増加を示し（図 3A, B）、この傾向はタンパク質発現にも反映され、カドミウムの濃度依存的に CHSY1 タンパク質の増加が認められた（図 3C）。その一方で、デルマタン硫酸と類似した直鎖二糖繰り返し構造を持つヘパラン硫酸糖鎖の伸長酵素はカドミウムによる発現変動が認められなかった。この結果は、カドミウム曝露下におけるヘパラン硫酸の増加は、パールカンのコアタンパク質の合成増加によるもので、ヘパラン硫酸糖鎖の伸長を伴わないという既報 (Ohkawara *et al.*, *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 1997) の結果を支持するものである。

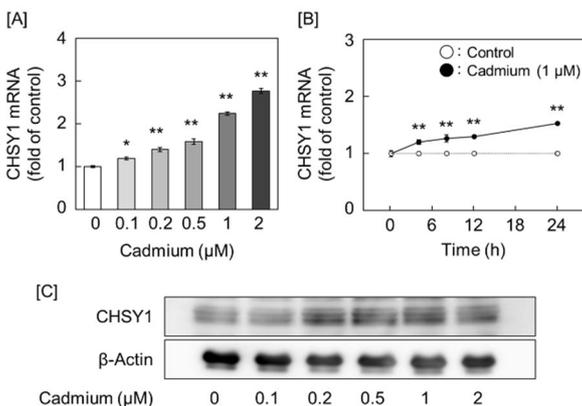


図 3 カドミウムはデルマタン硫酸糖鎖伸長酵素 CHSY1 の発現を誘導する。コンフルエントの血管内皮細胞にカドミウムを [A] 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2 μM で 24 時間または [B] 1 μM で 4, 8, 12, 24 時間曝露した。CHSY1 の mRNA 発現を定量的 RT-PCR で解析した。* $p < 0.01$ vs. Control. コンフルエントの血管内皮細胞にカドミウムを [C] 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2 μM で 24 時間曝露した。CHSY1 のタンパク質発現はウェスタンブロット法にて解析した。

次に、カドミウムによる CHSY1 の発現誘導機構を探索し、プロテインキナーゼ C (PKC) の広範な活性化能を有するホルボールエステル phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) の処理下において CHSY1 の mRNA およびタンパク質発現が誘導されることを見出した（図 4A, B）。その一方で、PKC の活性化能を持たないホルボールエステルである 4 α -phorbol 12,13-didecanoate (4 α -PDD) の処理下では CHSY1 の発現誘導は認められなかった（図 4C）。これより、PKC が CHSY1 を誘導することが示された。そこで、PKC サブクラスのうち PKC $\alpha/\beta/\gamma$ に対する阻害剤 GF109203X の前処理下においてカドミウムを曝露したところ、カドミウムによる CHSY1 の発現誘導が消失した（図 4D, E）。また、これら 3 種の PKC サブクラスのうち、内皮細胞において主に発現する分子種は PKC α であること、ならびに PKC α の発現抑制細胞ではカドミウムによる CHSY1 の発現誘導が顕著に抑制されることも明らかとなった。

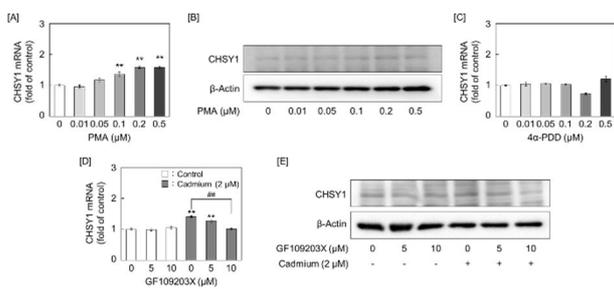


図 4 カドミウムによる CHSY1 の発現誘導は PKC を介する。コンフルエントの血管内皮細胞に [A, B] PMA および [C] 4 α -PDD を 0.01, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5 μM で 6 時間処理した。[D, E] コンフルエントの血管内皮細胞に GF109203X を 5, 10 μM で 2 時間前処理した後にカドミウムを 2 μM で 24 時間曝露した。* $p < 0.01$ vs. Control. # $p < 0.01$ vs. without GF109203X.

最後に、カドミウムによる内皮細胞傷害性に対する CHSY1 の影響を検討したところ、CHSY1 の発現を抑制するとカドミウムによる細胞傷害が減弱する一方で、CHSY1 を高発現させた内皮細胞においてはカドミウムによる細胞傷害が増強されることが明らかとなった（図 5）。このこ

とは、カドミウムによって内皮細胞において誘導された CHSY1 が、その毒性の増悪因子となることを示唆している。

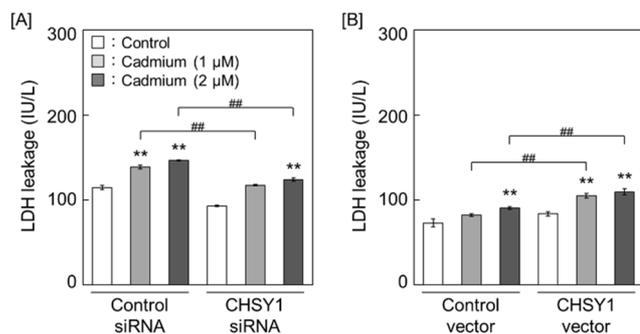


図5 CHSY1 はカドミウムによる細胞傷害を増強する。コンフルエントの血管内皮細胞に [A] CHSY1 siRNA および [B] CHSY1 強制発現ベクターを導入し、24 時間培養した後に、カドミウムを 1, 2 μM で 24 時間曝露した。細胞傷害性は培養上清に逸脱した乳酸脱水素酵素の活性で測定した。** $p < 0.01$ vs. Control. ## $p < 0.01$ vs. Control siRNA or vector.

本研究は、カドミウムが内皮細胞において PKC α を介して CHSY1 を発現誘導し、デルマタン硫酸糖鎖を伸長させること、および CHSY1 がカドミウム毒性の増悪因子となることを明らかにしたものである。糖鎖伸長酵素の発現調節シグナルに関する報告は極めて少なく、本研究は動脈硬化に係る内皮細胞の生物学と糖鎖生物学の両分野における重要な知見をもたらすものである。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Hara, T., Sato, A., Yamamoto, C., Kaji, T.	4. 巻 26
2. 論文標題 Syndecan-1 downregulates syndecan-4 expression by suppressing the ERK1/2 and p38 MAPK signaling pathways in cultured vascular endothelial cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BB Reports	6. 最初と最後の頁 101001
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrep.2021.101001	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 Takahashi, M., Kubota, A., Fujie, T., Shinkai, Y., Kumagai, Y., Nakano, T., Hara, T., Yamamoto, C., Kaji, T.	4. 巻 4
2. 論文標題 Fibroblast growth factor-2 upregulates reactive sulfur species production via ERK1/2 signal-mediated cystathionine γ -lyase induction in cultured bovine aortic endothelial cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BPB Rep.	6. 最初と最後の頁 175-181
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1248/bpbreports.4.6_175	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 Hara, T., Yabushita, S., Yamamoto, C., Kaji, T.	4. 巻 21
2. 論文標題 Cell density-dependent fibroblast growth factor-2 signaling regulates syndecan-4 expression in cultured vascular endothelial cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Int. J. Mol. Sci.	6. 最初と最後の頁 3698
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms21103698	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 Hara, T., Sakamaki, S., Ikeda, A., Nakamura, T., Yamamoto, C., Kaji, T.	4. 巻 45
2. 論文標題 Cell density-dependent modulation of perlecan synthesis by dichloro(2,9-dimethyl-1,10-phenanthroline)zinc(II) in vascular endothelial cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J. Toxicol. Sci.	6. 最初と最後の頁 109-115
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2131/jts.45.109	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 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 原 崇人, 鬼澤秀太, 鍛冶利幸, 山本千夏
2. 発表標題 CHSY1によるカドミウムの内皮細胞毒性の修飾
3. 学会等名 第48回日本毒性学会学術年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 畑純菜, 石井美穂, 原 崇人, 藤江智也, 鍛冶利幸, 山本千夏
2. 発表標題 血管内皮細胞のピグリカン発現にCREBが及ぼす影響
3. 学会等名 フォーラム2021 衛生薬学・環境トキシコロジー
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 原 崇人, 松浦将吾, 相川恵太, 鬼澤秀太, 吉田真衣, 鍛冶利幸, 山本千夏
2. 発表標題 CHSY1の発現誘導を介したカドミウムによる内皮細胞毒性の増強とピグリカン合成の変化
3. 学会等名 第47回日本毒性学会学術年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 原 崇人, 山本 千夏, 鍛冶 利幸
2. 発表標題 カドミウムは血管内皮細胞が合成するピグリカンのデルマトン硫酸糖鎖を伸長する
3. 学会等名 第46回日本毒性学会学術年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hara, T., Matsuura, S., Aikawa, K., Yoshida, M., Yamamoto, C., Kaji, T.
2. 発表標題 Cadmium elongates the dermatan sulfate chains of biglycan in vascular endothelial cells
3. 学会等名 Proteoglycan2019: 11th International Conference on Proteoglycans (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hara, T., Matsuura, S., Aikawa, K., Yoshida, M., Yamamoto, C., Kaji, T.
2. 発表標題 Cadmium elongates the dermatan sulfate chains of biglycan in vascular endothelial cells
3. 学会等名 Proteoglycans Future Leaders Symposium 2019 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 原 崇人, 山本 千夏, 鍛冶 利幸
2. 発表標題 カドミウムによる内皮細胞プロテオグリカン合成の攪乱-動脈硬化のシグナルトキシコロジー
3. 学会等名 メタルバイオサイエンス研究会2019 (招待講演)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

東邦大学衛生化学教室
<https://www.c-yamamoto.phar.toho-u.ac.jp/>

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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------