

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：24405

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K15695

研究課題名（和文）老化・肥満で増加する血中小分子ヒアルロン酸による肝臓の炎症・線維化誘導機構の解明

研究課題名（英文）The role of increased low-molecular-weight hyaluronan in hepatic inflammation and fibrogenesis

研究代表者

高杉 征樹（Takasugi, Masaki）

大阪公立大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：30711965

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）：血中小分子ヒアルロン酸の生体内における役割を解析するため、小分子ヒアルロン酸を徐放する浸透圧ポンプをマウスの生体内に埋め込み、一週間に渡り生体内の血中ヒアルロン酸レベルを倍化させ、その影響を特に受ける事が予想される肝臓、腎臓、そして脾臓についてトランスクリプトーム解析を実施した。結果、血中だけでなく肝臓でもヒアルロン酸レベルが倍化していたにも関わらず、全くと言って良いほどこれらの臓器の遺伝子発現パターンには影響が認められない事がわかった。したがって、加齢や肥満に伴い血中に増加する小分子ヒアルロン酸には為害性がないかあっても極めて小さい事が強く示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果は、主にin vitroの解析から炎症促進作用が報告されている小分子ヒアルロン酸が、in vivoではそのような効果をあまり発揮しない事、ひいては加齢や肥満で増加する血中小分子ヒアルロン酸が治療のターゲットとしてはあまり期待できない事を示唆している。一方で近年、高分子ヒアルロン酸の生体内における有益性が注目されつつあり、本研究成果は生体内で高分子ヒアルロン酸を増加させた際に副次的に増加する小分子ヒアルロン酸が大きな為害性を発揮しない事も示唆しており、この点に関して当該分野の今後の研究にインパクトを及ぼす可能性が期待される。

研究成果の概要（英文）：In order to investigate the role of low-molecular-weight hyaluronan in blood, we implanted a capsule that gradually release low-molecular weight hyaluronan in mouse. This doubled the levels of hyaluronan in blood over a week. We then performed transcriptomic analysis of liver, kidney, and spleen, which metabolize low-molecular-weight hyaluronan. Although hyaluronan levels were doubled not only in blood but also in the liver, almost no gene expression changes were observed in these tissues. These results suggest that, age- or obesity-related increase in blood low-molecular-weight hyaluronan levels do not have major deleterious effects.

研究分野：老化

キーワード：ヒアルロン酸 老化 肥満

1. 研究開始当初の背景

ヒアルロン酸は直鎖状のグリコサミノグリカンで細胞外マトリックスの主要な構成要素の一つであり、高分子ポリマーとして主に皮膚・筋肉・支持組織中に存在している。これらの高分子ヒアルロン酸は構造的な役割を有するだけでなく、細胞に対しても炎症抑制や生存シグナルの亢進といった保護的な作用を示す事が知られている。組織中の高分子ヒアルロン酸は一部局所で完全に分解され、また一部は部分的な分解を受けて低分子ヒアルロン酸として血中に遊離する。低分子ヒアルロン酸の細胞に対する作用は高分子ヒアルロン酸とは大きく異なり、炎症に促進的である事が多く報告されている。このように潜在的に有害な血中の低分子ヒアルロン酸は通常、肝臓において類洞内皮細胞の細胞膜上に発現する Stab2 を介しエンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれ、速やかに血中から除去されると共に細胞内においてリソソームにて完全に分解される。しかしながら、老化や肥満に伴い血中ヒアルロン酸濃度は劇的に増加する。これまで、血中ヒアルロン酸は肝臓の線維化の指標として有用とされながらも、類洞内皮細胞を介した血中ヒアルロン酸の肝臓への影響は調べられてこなかった。すなわち、肝臓は血中ヒアルロン酸の除去に重要な役割を有する事が知られていたものの、肝臓のヒアルロン酸含量は非常に少ないこともあり、肝臓におけるヒアルロン酸の役割については注目されてこなかった。実際には、全身から血流に流れ出るヒアルロン酸は半減期数分という速さで常に類洞内皮細胞により分解され続けている。したがって、肝臓ではヒアルロン酸の蓄積こそないものの、多量の流入が起こっている。特に老化や肥満といった、種々の肝疾患のリスクが増加した状態においては血中ヒアルロン酸濃度が大幅に上昇しているにも関わらず、それが肝臓にどのような影響を及ぼすのかについては解析がなされてこなかった。

2. 研究の目的

これまで、ヒアルロン酸合成酵素 HAS2 を全身性に過剰発現するマウスを用いた解析からヒアルロン酸の増加が肝臓において炎症、線維化、および細胞老化に関連する遺伝子群の発現を増加させる事を示すデータを得ている。細胞老化は DNA 傷害を伴う様々なストレスに対して引き起こされる自律的かつ不可逆的な細胞増殖の停止であり、老化や肥満に際しても細胞老化を起こした細胞が肝臓を含む多数の組織で蓄積する事が知られている。細胞老化を起こした老化細胞では細胞老化随伴分泌現象と呼ばれる炎症性サイトカイン等の分泌亢進が起こる。したがって、過剰なヒアルロン酸による肝臓内での炎症関連遺伝子の発現上昇は類洞内皮細胞の細胞老化随伴分泌現象によるものである可能性が考えられる。さらに、肝臓内の炎症は肝星細胞を活性化させ、コラーゲン産生を促し線維化の原因となる事から、細胞老化随伴分泌現象により誘導される炎症が過剰なヒアルロン酸による肝臓内での線維化関連遺伝子の発現上昇の原因である可能性が考えられる。本研究ではこの仮説を中心として、老化や肥満に伴う血中ヒアルロン酸濃度上昇の生理的・病理的な意義を明らかにし、肝疾患の予防法の開発へと繋げていく事を目指した。

3. 研究の方法

血中小分子ヒアルロン酸の生体内における役割を解析するため、小分子ヒアルロン酸を徐放する浸透圧ポンプをマウスの生体内に埋め込み、一週間に渡り生体内の血中ヒアルロン酸レベルを倍化させ、その影響を特に受ける事が予想される肝臓、腎臓、そして脾臓についてトランスクリプトーム解析を実施した。また、血中ヒアルロン酸レベルを長期にわたり増加させ、全身的な健康状態を長期に渡りモニターし、さらに肝臓、腎臓、脾臓に限らずに主要組織に生じる影響を広範に調べるため、ヒアルロン酸合成酵素 (HAS2) の BAC トランスジェニックマウスを作出した。全身でトランスジーンを強力には発現してしまう通常のトランスジェニックマウスと異なり、BAC トランスジェニックマウスを用いる事で HAS2 を発現する細胞・組織についてのみ HAS2 レベルを 1.5 倍から数倍までの幅で上昇させる事が可能となり、より自然な条件に近い状態で解析を進める事ができる。さらにヒアルロン酸の作用が CD44 を介したものであるかについての知見を得るため、併せて CD44 BAC トランスジェニックマウスも作出した。

また、これまでヒアルロン酸の作用を調べる研究のほとんどが、精製されたヒアルロン酸を培養細胞の培地に添加する事によりなされてきたが、過去の研究においては特定の遺伝子の発現や細胞の特定の表現型に対するヒアルロン酸の作用のみ評価されており、異なるポリマー長のヒアルロン酸が細胞のトランスクリプトームにどのような影響を及ぼすのか、網羅的な評価がなされてこなかった。これまでの様々な研究が、異なる規格のヒアルロン酸を異なるプラットフォームで評価してきた事により、ヒアルロン酸のポリマー長依存的な機能を正しく把握する事が困難となってしまっている。例えばポリマー長依存的なヒアルロン酸の作用として代表的なものに低分子ヒアルロン酸による炎症誘導作用が挙げられ、これについても今現在多くの

疑問が投げかけられている。低分子ヒアルロン酸が TLR2 を介し炎症シグナルを活性化する事を報告した論文 (Scheibner et al., 2006, J Immunol) は今なお頻繁に引用されるものの、当該研究を含めた多数の類似研究がエンドトキシンを含む純度の低い HA を使用している。一方で驚くべき事に、低分子ヒアルロン酸による炎症誘導作用が、実際にはコンタミネーションによるアーティファクトである事が今では複数の論文で証明されている (Lyle et al., 2010, J Biomed Mater Res A; Baeva et al., 2014, J Biomed Mater Res A; Dong et al., 2016, Sci Rep)。ヒアルロン酸が TLR2 のリガンドではない事も既に報告されている (Ebid et al., 2014, ISRN Nephrol)。さらに、TLR2 を介した炎症誘導能が特に良く調べられている超低分子ヒアルロン酸 (oligo-HA) は生体内の細胞外領域には極めて低いレベルでしか存在しないにも関わらず、過去の報告では高濃度の oligo-HA を用いた実験が繰り返されてきた。そこで、本研究ではヒアルロン酸のポリマー長依存的な作用を正確に捉え直すため、50kDa 前後の低分子ヒアルロン酸、100-500kDa 前後の中分子ヒアルロン酸、1,000-4,000kDa 前後の高分子ヒアルロン酸、そして 6,000kDa 以上の超高分子ヒアルロン酸を用意し、すべてについて近年開発されたヒアルロン酸用のエンドトキシン除去処理 (Dong et al., 2016, Sci Rep) を施し、コントロール、及び CD44 を過剰発現させたヒト正常線維芽細胞 IMR90 に対し、これらのヒアルロン酸を生理的な濃度 (20 µg/ml) で処理し、6 時間後に細胞を回収して RNA-Seq により遺伝子発現プロファイルを解析した。

4. 研究成果

小分子ヒアルロン酸を徐放する浸透圧ポンプをマウスの生体内に埋め込み、一週間に渡り生体内の血中ヒアルロン酸レベルを倍化させ、その影響を特に受ける事が予想される肝臓、腎臓、そして脾臓についてトランスクリプトーム解析を実施したところ、血中だけでなく肝臓でもヒアルロン酸レベルが倍化していたにも関わらず、驚いたことに全くと言って良いほどこれらの臓器の遺伝子発現パターンには影響が認められない事がわかった。したがって、加齢や肥満に伴い血中に増加する小分子ヒアルロン酸には為害性がないかあっても極めて小さい事が強く示唆された。本研究成果は、主に *in vitro* の解析から炎症促進作用が報告されている小分子ヒアルロン酸が、*in vivo* ではそのような効果をあまり発揮しない事、ひいては加齢や肥満で増加する血中小分子ヒアルロン酸が治療のターゲットとしてはあまり期待できない事を示唆している。一方で近年、高分子ヒアルロン酸の生体内における有益性が注目されつつあり、本研究成果は生体内で高分子ヒアルロン酸を増加させた際に副次的に増加する小分子ヒアルロン酸が大きな為害性を発揮しない事も示唆しており、この点に関して当該分野の今後の研究にインパクトを及ぼす可能性が期待される。本研究を通じて作出した HAS2/CD44 BAC トランスジェニックマウスを用いた解析においては、特に高分子ヒアルロン酸の生体内における有益性に注目をしていく。また、最近 CD44 がヒアルロン酸非依存的に細胞のストレス抵抗性を上昇させる作用を発揮する知見を得ており、この作用がどのようなメカニズムによっているのか、またその作用が生体内においてどのように重要であるのかについても検証を進めていく予定である。

一方で *in vitro* で IMR90 細胞を用いてヒアルロン酸受容体 CD44 とヒアルロン酸のポリマー長依存的な作用を調べた解析からは、まず CD44 の過剰発現が 100 個程度の遺伝子の発現を変化させ、さらに同様な遺伝子発現変化が程度は比較的小さいながらもコントロール細胞に対する低・中・高分子ヒアルロン酸の処理によっても誘導される事が明らかになった。中・高分子ヒアルロン酸による CD44 依存的遺伝子発現変化の誘導の程度には差がなかったものの、低分子ヒアルロン酸による影響は中・高分子ヒアルロン酸よりも小さかった。興味深い事に、CD44 を過剰発現した細胞では低・中・高分子ヒアルロン酸の作用は大きく減弱するか消失し、ヒアルロン酸を加えない状態であっても過剰の CD44 発現により CD44 シグナルが飽和しうる事が示された。超高分子ヒアルロン酸は低・中・高分子ヒアルロン酸のいずれとも全く異なり、CD44 シグナルを負に制御し、その作用は CD44 を過剰発現した状態で一層強く認められた。超高分子ヒアルロン酸は他のヒアルロン酸と比較し作用が強く、CD44 シグナルの下流で制御される遺伝子とは別の多くの遺伝子が超高分子ヒアルロン酸による影響を受ける事が明らかになった。このような一見 CD44 非依存的である超高分子ヒアルロン酸のターゲット遺伝子のうち、抑制を受ける遺伝子の中には有意に p53 のターゲット遺伝子が濃縮されていた。一方で申請者は既に、超高分子ヒアルロン酸が CD44 依存的に p53 のターゲット遺伝子を抑制する事を報告しており (Takasugi et al., 2020, Nat Commun) 従って超高分子ヒアルロン酸の特異かつ強い作用は CD44 を介した細胞への結合を必要とするものの、必ずしも CD44 シグナルを介していない可能性を示唆している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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