

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23590467

研究課題名(和文)骨・血管連関と新しいヒスタミンの機能：閉経後の動脈硬化石灰化と骨粗鬆症

研究課題名(英文)Role of histamine in atherosclerosis and osteoporosis

## 研究代表者

谷本 昭英 (Tanimoto, Akihide)

鹿児島大学・医歯(薬)学総合研究科・教授

研究者番号：10217151

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：ヒスタミンの合成酵素(HDC)欠損マウスでは、粥状硬化が減少する。同マウスでは卵巣摘出後の骨粗鬆症が抑制され、低エストロゲン状態での骨粗鬆症と動脈硬化の促進は、ヒスタミンの骨血管の病変形成への関連を示唆する。同マウス動脈硬化モデルに卵巣摘出を行い、骨血管病態とヒスタミンの関わりを検討した。HDC欠損とH2R欠損マウスにおいては、海綿骨の狭小化、密度の低下が見られた。HDC欠損による骨密度低下は報告されており、H2Rを介したシグナルと骨密度維持の関連が推定された。ヒスタミン代謝が骨量の維持に関連する可能性を示したが、動脈硬化病変の進展との関連は明瞭には指摘できなかった。

研究成果の概要(英文)：Histidine decarboxylase (HDC) deficient mice show decreased atherosclerotic lesions. The HDC-KO mice also exhibit suppression of osteoporosis after ovariectomy. Therefore, histamine metabolism would be related to both the pathogenesis of vascular and bone lesions in low estrogen condition such as menopausal women. When HDC or H2R deficient mice fed high fat diet after ovariectomy, the density of bone trabeculae was decreased in the femur. This indicated that histamine H2R signaling would regulate the maintenance of bone volume, however, in this study, no exact relation to the atherogenesis was noted.

研究分野：動脈硬化

キーワード：粥状動脈硬化 骨粗鬆症 マウスモデル ノックアウトマウス ヒスタミン

## 1. 研究開始当初の背景

女性の平均寿命の延長に伴う閉経後のQOL維持は重要な課題である。閉経後のエストロゲン低下は、高脂血症や血管機能の障害を引き起こし、動脈硬化を促進させる。また、エストロゲンは破骨細胞の活性を抑制し、骨吸収を防いでいることから、エストロゲン減少は破骨細胞の活性化をもたらす骨粗鬆症の要因となる。骨粗鬆症では動脈硬化を来しやすく、動脈硬化症例では骨粗鬆症を発症しやすいことが知られており、女性の老年期疾患である骨粗鬆症と動脈硬化には、共通の病態メカニズムの存在(骨・血管連関)が推定されている(Cir Res 2010; 107: 466)。

慢性炎症性疾患である動脈硬化巣には組織球、リンパ球などの炎症細胞が浸潤し、内皮や血管平滑筋などの反応と相まって、動脈硬化の形成・進展を規定している(業績6, 7, 10, 12, 14, 15)。動脈硬化巣の炎症反応はこれらの細胞から分泌されるサイトカインや炎症物質のネットワークにより調節されている。ヒスタミンは古典的炎症物質であり、申請者らは、動脈硬化巣の組織球がヒスタミンを合成するヒスチジン脱炭酸酵素(Histidine decarboxylase; 以下HDC)を発現することを見いだした(Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2005; 25: 430, [Tanimoto et al.](#))。動脈硬化巣では組織球が慢性的にヒスタミンを供給し、単球、内皮、平滑筋の遺伝子発現を調整し、HDC欠損マウスを用いた動脈硬化モデルでは、ヒスタミン欠損により動脈硬化が軽減することを示した(Cir Res. 2005; 96: 974, [Tanimoto et al.](#))。一方、卵巣摘出による骨粗鬆症は、HDC欠損マウスで軽減することが報告され(PNAS 2003; 100: 6027)、ヒス

タミンは動脈硬化と骨粗鬆症の病態に関連することが示唆される。実際の臨床症例で、血中ヒスタミン濃度と動脈硬化の程度は比例し、骨塩量と反比例することも示されている(J Cell Mol Med 2002; 6: 583, J Biol Chem 2005; 280: 29011)。細胞学的にも骨と血管には共通性があり、骨芽細胞と平滑筋細胞は間葉系幹細胞を起源とし、破骨細胞と組織球は造血幹細胞に由来する。ヒスタミンは組織球分化と関連するだけでなく、破骨細胞分化もヒスタミンを介したReceptor Activator of Nuclear Factor-KappaB Ligand (RANKL)の作用で起こる(BBRC 2002; 298: 240, Am J Pathol 2009; 174: 1426)。RANKLによる破骨細胞の活性化による骨粗鬆症や動脈硬化巣の石灰化にも血管壁の骨芽細胞様あるいは破骨細胞様の細胞が関与し、RANKLによる制御を受けている(Cir Res 2004; 95: 1046)。RANKLシステムは、骨では骨代謝を、血管では石灰化を制御している。しかしながら、血管壁での骨芽細胞様あるいは破骨細胞様の細胞への分化メカニズムおよび血管壁石灰化の機構も詳細は不明である。

申請者らは、骨と血管の細胞学的共通性と、ヒスタミン作用の類似性から、血管においてもヒスタミンがRANKLを介し、血管構成細胞の骨芽細胞様あるいは破骨細胞様細胞への分化を誘導し石灰化を制御しているという仮説を立てた。つまり、ヒスタミンによる、動脈硬化の石灰化と骨粗鬆症に共通する病態メカニズムが存在すると推定している。

## 2. 研究の目的

血管壁におけるヒスタミンの新しい機能を探るために、エストロゲン低下状態での動脈硬化の進展と石灰化におけるヒスタミン

の役割を解明する。具体的には、粥状動脈硬化を発症する apolipoprotein E (apoE)欠損マウスにHDCやヒスタミン受容体の遺伝子欠損を導入した2重欠損マウスを作製後、卵巣摘出による低エストロゲン状態を再現し、動脈硬化の石灰化とヒスタミンの関連を明らかにする。

### 3. 研究の方法

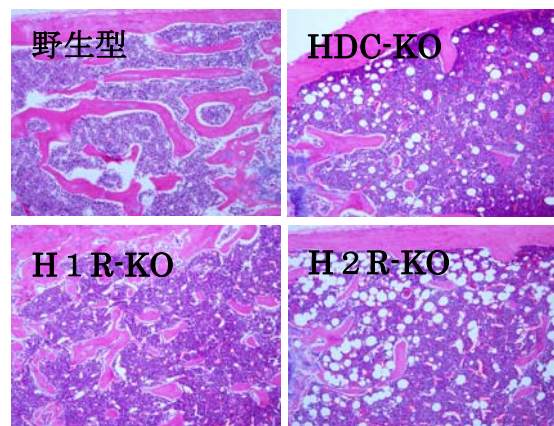
1) apoE 欠損マウスとヒスタミン合成酵素 (HDC) 欠損マウスを交配し、2重遺伝子欠損マウス (apoE<sup>-/-</sup>HDC<sup>-/-</sup>) を作製する。遺伝子型は耳より採取したゲノム DNA を用いて PCR 法にて確認する。同様に apoE とヒスタミン1型受容体 (H1R)、2型受容体 (H2R) の2重遺伝子欠損マウス (apoE<sup>-/-</sup>H1R<sup>-/-</sup>および apoE<sup>-/-</sup>H2R<sup>-/-</sup>) を作製する。

2) 各2重欠損マウスと apoE<sup>-/-</sup>マウスを卵巣摘出後、高コレステロール食 (1.25%) で6週間飼育し、以下の検索に用いる。経時的にマウスを屠殺後、大動脈を取り出しホルマリン固定パラフィン切片を作製する。H&E 染色、EVG 染色、Azan 染色を行い、石灰化の有無は von Kossa 染色で検討する。骨粗鬆症の程度を組織学的方法で検索する。

### 4. 研究成果

粥状動脈硬化病変に浸潤する単球由来の組織球 (泡沫細胞) は種々のサイトカインに加えてヒスタミンを産生する。この、ヒスタミンは組織球自身や血管平滑筋などの血管を構成する細胞に作用し、動脈硬化巣での炎症性サイトカイン、細胞外マトリックス分解酵素、酸化LDL受容体等の動脈硬化を促進する遺伝子の発現を制御している。ヒスタミン産生酵素 (Histidine decarboxylase: HDC) の欠損

マウスを用いた動脈硬化モデルでは、高脂肪食負荷による粥状硬化病変が減少する。同マウスでは卵巣摘出後の骨粗鬆症が抑制されることも報告されており、ヒスタミンが骨と血管の両方の病変形成と進展に関連する可能性が示唆されている。閉経後の低エストロゲン状態では、骨粗鬆症と動脈硬化が促進することが知られており、骨・血管連関として共通のメカニズムが想定される。HDC欠損マウスを用いた動脈硬化モデルに卵巣摘出を行い、閉経後における骨・血管連関の病態メカニズムとヒスタミンの関わりを検討した。具体的には、粥状動脈硬化を自然発症する apolipoprotein E (apoE)欠損マウスにHDCあるいはヒスタミン受容体の遺伝子欠損を導入した2重欠損マウスを作製後、卵巣摘出による低エストロゲン状態を再現して、粥状動脈硬化病変の石灰化メカニズムと骨粗鬆症との関連を検索した。HDC欠損、H1R欠損 (ヒスタミン1型受容体欠損)、H2R欠損 (ヒスタミン2型受容体欠損) の各遺伝子改変マウスに卵巣摘出を施した。組織学的にHDC欠損とH2R欠損マウスにおいては、野生型マウスと比較して、海綿骨の狭小化、密度の低下が見られたが (下図)、成長板を含む軟骨形成部分では差違は確認されなかった。



また骨髄に著変はみられない。H1R欠損マウ

スでは野生型と同等の骨密度であった。ヒスタミン欠損による骨密度の低下はすでに報告されており、今回の結果からヒスタミン2型受容体を介したシグナルが骨密度の維持に関連していることが推定された。卵巣摘出群との差違は確認出来なかった。同様に、apoE欠損マウスを対照群として、apoE/H2R欠損およびapoE/HDC欠損（ただしHDC欠損はhetero）マウスの卵巣を摘出し、高cholesterol diet (0.1% cholesterol添加)で6週間の飼育を行ったところ、apoE/HDC-KOに優位な骨組織の減少は見られなかった。これは、今回のapoE/HDC欠損のHDC遺伝子についてはヘテロ欠損であり、完全にヒスタミンの産生が抑制されていないためと考えられる。軟骨形成や成長板、骨髄組織には差違は認めなかった。また、apoE欠損マウスでは、野生型と比較して著明な変化はなかった。apoE/H1R欠損およびapoE/H2R欠損マウスは、著明な繁殖率の低下のため十分な頭数が実験に用いることができず、詳細な検討は困難であった。

ヒスタミン代謝が骨量の維持に関連する可能性を示したが、動脈硬化病変の進展や石灰化の程度との関連は明瞭には指摘できなかった。

#### 引用文献

1) Yamada S, Wang KY, Tanimoto A, Fan J, Shimajiri S, Kitajima S, Morimoto M, Tsutsui M, Watanabe T, Yasumoto K, Sasaguri Y. Matrix metalloproteinase 12 is a factor that accelerates the initiation of atherosclerosis and stimulates the progression of fatty streaks to fibrous plaques in transgenic rabbits. *Am J Pathol.* 2008; 172: 1419-1429.

2) Tanimoto A, Murata Y, Wang KY, Tsutsui M, Kohno K, Sasaguri Y. Monocyte Chemoattractant Protein-1 Expression is Enhanced by Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor via Jak2-Stat5 signaling and inhibited by atorvastatin in human monocytic U937 cells. *J Biol Chem.* 2008; 283: 4643-4651.

3) Tanimoto A, Wang KY, Murata Y, Kimura S, Nomaguchi M, Nakata S, Tsutsui M, Sasaguri Y. Histamine upregulates the expression of inducible nitric oxide synthase in human intimal smooth muscle cells via histamine H1 receptor and NF- $\kappa$ B signaling pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007; 27: 1556-1561.

4) Koide S, Okazaki M, Tamura M, Ozumi M, Takatsu H, Kamezaki F, Tanimoto A, Tasaki H, Sasaguri Y, Nakashima Y, Otsuji Y. PTEN reduces cuff-induced neointimal formation and proinflammatory cytokines. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007; 292: H2824-H2831.

5) Liang J, Liu E, Yu Y, Kitajima S, Koike T, Jin Y, Morimoto M, Hatakeyama K, Asada Y, Watanabe T, Sasaguri Y, Watanabe S, Fan J. Macrophage metalloelastase accelerates the progression of atherosclerosis in transgenic rabbits. *Circulation* 2006; 113: 1993-2001.

6) Tasaki H, Yamashita K, Tsutsui M, Kamezaki F, Kubara T, Tanaka S, Sasaguri Y, Adachi T, Nakashima Y. Heparin-released extracellular superoxide dismutase is reduced in patients with coronary artery atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2006; 187: 131-138.

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〕

○出願状況（計0件）

○取得状況（計0件）

〔その他〕

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

谷本 昭英 (TANIMOTO, Akihide)

鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号：10217151

(2) 研究分担者

笹栗 靖之 (SASAGURI, Yasuyuki)

研究者番号：60140648

産業医科大学・医学部・教授

(3) 連携研究者 なし