

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 18 日現在

機関番号：13601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23790843

研究課題名(和文) ヒアルロン酸が動脈硬化進展に関与するメカニズムの解明

研究課題名(英文) Critical role of hyalurona derived from vascular smooth muscle cells after vascular injury in mice

研究代表者

嘉嶋 勇一郎 (KASHIMA, Yuichiro)

信州大学・医学部附属病院・助教(診療)

研究者番号：70545722

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、血管障害モデルにおける新生内膜肥厚形成にヒアルロン酸が深く関与することを示した。その機序として、ヒアルロン酸はCD44を介し血管平滑筋細胞に作用し、RhoA活性化により遊走能を高め、ERK1/2活性化により増殖能を高め、炎症性サイトカインや酸化ストレスの産生能を増加させることが考えられた。

研究成果の概要(英文)：Inhibition of HA synthesis using 4-methylumbelliferone markedly inhibited neointimal formation after injury. In vitro experiments revealed that low-molecular-weight HA (LMW-HA) induced vascular smooth muscle cells (VSMC) activation, including migration, proliferation, and production of inflammatory cytokines and reactive oxygen species (ROS). The migration and proliferation of VSMCs were mediated by the CD44/RhoA and CD44/ERK1/2 pathways, respectively. Because HA synthase 2 (HAS2) is predominantly expressed in injured arteries, we generated cTg mice that overexpress the murine HAS2 gene specifically in VSMCs (cHAS2/CreSM22 alpha mice) and showed that HA overexpression markedly enhanced neointimal formation after cuff-mediated vascular injury. Further, HA-overexpressing VSMCs isolated from cHAS2/CreSM22alpha mice showed augmented migration, proliferation, and production of inflammatory cytokines and ROS.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：ヒアルロン酸 血管平滑筋細胞 動脈硬化 マクロファージ ステンント内再狭窄

1. 研究開始当初の背景

ヒアルロン酸 (HA: hyaluronan) は、グリコサミノグリカンの一種であり、我々の身体を構成する細胞外マトリックスの主成分として、細胞の基本的な働きである増殖や移動などを調節し、様々な疾患において重要な役割を果たすことが知られている。循環器領域においては、動脈硬化血管の新生内膜肥厚部位や血管治療後のステント再狭窄部位に、HA が過剰に蓄積することが知られる。しかしながら、HA が動脈硬化や冠動脈形成術後ステント再狭窄の進展に關与する機序は、現在のところほとんど解明されていない。

2. 研究の目的

ヒアルロン酸は、正常血管でも障害モデルの血管でも、中膜の血管平滑筋細胞周囲にはほとんど発現が見られないが、血管障害モデルにおいては新生内膜部位の血管平滑筋細胞周囲に強い発現が見られることが特徴である。このことからヒアルロン酸は、重要な動脈硬化促進因子であるとともに、血管障害により血管平滑筋細胞がヒアルロン酸を過剰に産生するようになると考えられ、したがって血管平滑筋細胞には血管障害時に何らかのメカニズムにより phenotype を変換するメカニズムが存在することが示唆される。しかしながら、ヒアルロン酸の動脈硬化や冠動脈形成術後ステント再狭窄の進展に關与するメカニズムは、まったく解明されていない。従って、ヒアルロン酸の過剰産生や、異常なヒアルロン酸合成を正常化することで、動脈硬化の進展を阻止することが可能と考えられるため、ヒアルロン酸糖鎖合成を作用点とした抗動脈硬化治療薬、ステント再狭窄予防法を開発できる可能性が考えられる。

上記背景により、マウス血管障害モデルにおける、新生内膜肥厚部位の主要細胞成分である血管平滑筋細胞 (VSMCs: vascular smooth muscle cells) と、VSMCs より産生された HA が血管障害後の新生内膜肥厚形成に

關与する機序について研究を行った。

3. 研究の方法

まず、ヒト動脈硬化血管およびマウス血管障害モデルのいずれにおいても、新生内膜肥厚部位に HA が産生していることを確認した。さらに、HA の特異的合成素材剤である 4-methylumbelliferone (4-MU) を経口投与し、血管障害モデルを作製すると、新生内膜肥厚が著明に抑制された (内膜/中膜比: 2.10 ± 0.08 (非内服群) vs. 0.63 ± 0.03 (内服群), $p < 0.001$)。次に、野生型マウス (C57BL/6) の大動脈より血管平滑筋細胞を採取し、HA が VSMCs の遊走能に与える作用を、Trans-well chamber system およびスクラッチ・アッセイにて検討すると、HA 刺激により VSMCs の遊走能に著明な増加が見られた。CD44 に対する siRNA (CD44-siRNA) を使用し、VSMCs の CD44 発現を knock down させると、HA 刺激による VSMCs 遊走能増加は有意に抑制された。また、HA 刺激により VSMCs の RhoA 活性化が見られ、RhoA 活性化の特異的阻害剤である Y27632 使用により、HA 刺激による遊走能増加が抑制された。これらの結果より、HA は CD44-RhoA シグナル活性化により、VSMCs の遊走能を高めることが示された。引き続き、HA が VSMCs の増殖能に与える作用について検討した。HA 刺激により、VSMCs の ERK-1/2 の活性化が見られ、また、ERK-1/2 活性化の特異的阻害剤である U0126 使用すると、HA 刺激による VSMCs の増殖能が抑制された。さらに、HA 刺激による VSMCs の ERK-1/2 活性化は、CD44-siRNA 使用にて抑制された。以上より、HA は CD44 - ERK-1/2 シグナル活性化により、VSMCs の増殖能を高めることを確認した。また、野生型マウス由来の VSMCs に対し、HA により刺激を行うと、炎症性サイトカイン (IL-6, MCP-1) および酸化ストレス産生能が有意に増加した。HA は、HA 合成酵素 (HA synthase: HAS) により合成され、3 種類の isoform が知られている (HAS1, 2, 3)。血管障害部位から採取

した VSMCs では、HAS2 の発現が他の isoform より有意に増加していたため、最後に、HAS2 cre-lox conditional transgenic strategy により、VSMCs 特異的に HA 過剰産生モデル (cHAS/CreSM22) を作製し、血管障害後の新生内膜肥厚の作用について検討したところ、著明な新生内膜肥厚形成が見られた (内膜/中膜比: 1.45 ± 0.03 (cHAS/CreSM22) vs. 0.54 ± 0.07 (cHAS2) and 0.50 ± 0.04 (CreSM22), $p < 0.001$)。また、cHAS/CreSM22 の大動脈より採取した VSMCs は、コントロールのマウス (cHAS2、CreSM22) に比して、IL-6, MCP-1, 酸化ストレス産生能が有意に高いことが確認された。

4. 研究成果

本研究は、原著論文として報告済みである (PLoS ONE 8(3):e58760.)。ヒアルロン酸は、動脈硬化血管において、内膜肥厚部位の血管平滑筋細胞周囲に多量に存在し、また冠動脈形成術後のステント内狭窄部位にも多量に存在することが知られ、動脈硬化促進や、ステント再狭窄との強い関連性は示唆されてきたが、現在までにその現象あるいはメカニズムを詳細に検討した研究は知られていなかった。また、現在までの動脈硬化進展の研究は、血管内皮細胞や血管平滑筋、リンパ球、単球・マクロファージなど細胞成分を中心とした視点からのものであり、その支持組織である間質成分の存在の重要性は認識されていたものの、実際に間質成分からのアプローチによる詳細な動脈硬化進展に関わるメカニズムを検討した研究は非常に少なく、本研究の新規性は高いものと考えられる。

本研究は、血管障害モデルにおける新生内膜肥厚形成にヒアルロン酸が深く関与することを示した。その機序として、ヒアルロン酸は CD44 を介し血管平滑筋細胞に作用し、RhoA 活性化により遊走能を高め、ERK-1/2 活性化により増殖能を高め、炎症性サイトカイ

ンや酸化ストレスの産生能を増加させることが考えられた。今回の基礎的検討の結果をふまえ、さらなるヒアルロン酸の動脈硬化進展に関わる機序や、4-MU による動脈硬化進展の抑制の詳細な機序の検討を進めることで、HA 糖鎖合成を作用点とする、まったく新しい抗動脈硬化治療薬、ステント再狭窄予防法を開発できる可能性が考えられる。

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 2 件)

1. Kashima Y, Takahashi M, Shiba Y, Itano N, Izawa A, Koyama J, Nakayama J, Taniguchi S, Kimata K, Ikeda U. Crucial role of hyaluronan in neointimal formation after vascular injury. PLoS One. 8(3): e58760, 2013 査読有 doi:10.1371/journal.pone.0058760
2. Kasai H, Kashima Y, Izawa A, Tomita T, Miyashita Y, Koyama J, Takahashi M, Yoshio T, Yazaki Y, Higuchi M, Ikeda U. Immunoabsorption therapy reduces oxidative stress in patients with dilated cardiomyopathy. World Journal of Cardiovascular Diseases. 2;305-312,2012 査読有 doi: 10.4236/wjcd.2012.24048

[学会発表](計 10 件)

1. Kashima Y, Takahashi M, Kimata K, Itano N, Ikeda U. Critical role of hyaluronan derived from macrophages in neointimal formation after vascular injury in mice. AHA2013 アメリカ心臓協会.2013.11.16-11.20; ダラス(アメリカ)
2. Okada A, Tomita T, Kashima Y, Yoshie K, Takeuchi T, Ikeda U. Lv remodeling caused by persistent AF was associated with high cardiac hyaluronan in Cs vein. AHA2013 ア

- メリカ心臓協会.2013.11.16-11.20;ダラス
(アメリカ)
3. Kashima Y, Takahashi M, Itano N, Taniguchi S, Kimata K, Ikeda U. Crucial role of hyaluronan derived from macrophages in neointimal formation after vascular injury. ESC2013 欧州心臓学会議.2013.8.31-9.4 ; アムステルダム (オランダ)
 4. Kashima Y, Takahashi M, Shiba Y, Itano N, Kimata K, Izawa A, Ikeda U. Critical role of hyaluronan in neointimal formation after vascular injury in mice. AHA2012 アメリカ心臓協会.2012.11.3-7 ; ロサンゼルス (アメリカ)
 5. Okada A, Tomita T, Kashima Y, Oguchi Y, Takeuchi T, Aizawa K, Ikeda U. LV dysfunction caused by persistent atrial fibrillation was associated with high reactive oxidative metabolites in coronary sinus vein. ESC2012 欧州心臓学会議.2012.8.25-29 ; ミュンヘン (ドイツ)
 6. 岡田綾子、富田 威、嘉嶋勇一郎、小口泰尚、竹内崇博、相澤万象、池田宇一 . 心房細動の持続に伴う左室機能障害は、冠状静脈における酸化ストレスの上昇と関連性を認め、アブレーション治療後血中酸化ストレスは有意に改善する . 第 27 回日本不整脈学会学術大会 . 2012.7.5-7 ; パシフィコ横浜
 7. Gautam M, Izawa A, Shiba Y, Kashima Y, Koyama J, Hongo M, Sano K, Hayashi T, Ichikawa M, Ikeda U. Critical role of NF B p65 in pathogenesis of spontaneous in p50 deficient mice. 第 76 回日本循環器学会 . 2012.3.16 - 18 ; 福岡
 8. Kashima Y, Takahashi M, Hata T, Kawaguchi M, Izawa A, Itano N, Taniguchi S, Ikeda U. Critical Role of Hyaluronan Derived From Vascular Smooth Muscle Cells in Neointimal Formation After Vascular Injury. AHA2011 アメリカ心臓協会. 2011.11.12-16 ; オランダ (アメリカ)
 9. Kashima Y, Takahashi M, Hata T, Kawaguchi M, Izawa A, Itano N, Kimata K, Ikeda U. Specific Overexpression of Hyaluronan in Vascular Smooth Muscle Cells Augments Neointimal Formation after Vascular Injury in Mice. 第 75 回日本循環器学会.2011.8.3-8.4 ; 横浜
 10. Miyashita Y, Kashima Y, Kumazaki S, Aso S, Otagiri K, Saigusa T, Koyama J, Ikeda U. The impact of measurement of reactive oxygen species (ROS) and hydroxyl radicals (-OH) in the patients of peripheral artery disease. 第 20 回日本心血管インターベンション治療学会.2011.7.21-7.24 ; 大阪
- 6 . 研究組織
(1)研究代表者
嘉嶋 勇一郎 (KASHIMA, Yuichiro)
信州大学・医学部附属病院・助教(診療)
研究者番号 : 70545722