

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591053

研究課題名(和文) 腹部大動脈瘤におけるCD44の分子病態制御機構の解明と新たな治療法の基礎確立

研究課題名(英文) The evaluation of CD44 in pathogenesis of abdominal aortic aneurysm and the development of new therapy

研究代表者

三好 亨 (MIYOSHI, Toru)

岡山大学・大学病院・講師

研究者番号：70444651

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト大動脈瘤組織におけるCD44の発現と細胞外マトリックス分解の関連の検討ならびに、腹部動脈瘤モデルを用いたCD44を介する炎症性遺伝子ネットワークの解明を行い、CD44が慢性炎症におけるヒアルロン酸分解産物によるシグナル伝達に重要な分子であることが明らかとなった。それによって、CD44を標的とした分子イメージングならびに薬物送達システム開発への基礎を固めることができた。

研究成果の概要(英文)：Immunohistochemical analysis of human abdominal aortic aneurysm revealed that the increased expression of CD44 and the degradation of hyaluronic acid were possibly involved in pathogenesis of abdominal aortic aneurysm. Experimental abdominal aortic aneurysm using CaCl<sub>2</sub>-induced model, the incidence of abdominal aortic aneurysm was significantly less in CD44 knockout mice compared to wild type mice. Liposome targeting CD44 was developed and the utility of its liposome is being studied.

研究分野：循環器内科学

キーワード：腹部大動脈瘤 CD44 炎症性遺伝子 動脈硬化 サイトカイン

1. 研究開始当初の背景

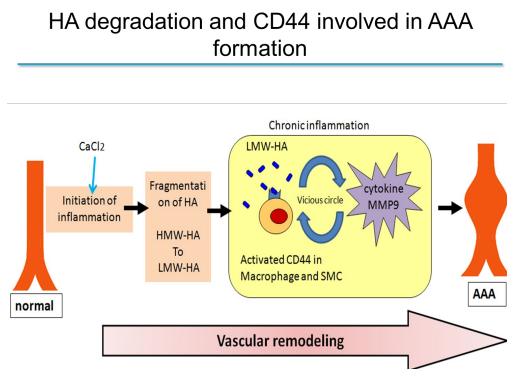
腹部大動脈瘤は偶然発見されてもその進展を完全に抑制することは临床上困難であり、さらに一旦破裂するとその予後はきわめて不良である。これまで、多くの研究者によって腹部大動脈瘤における炎症と細胞外マトリックス分解の関連が検討されてきたが、そのメカニズムは未だ十分解明されていない。

申請者らは動脈硬化に重要な慢性炎症に関する分子の探索、ならびにその病態への関与について基礎的検討を行い、その研究成果を発表してきた。さらに、申請者らは最近、CD44 が分解されたヒアルロン酸による炎症性サイトカインの産生に重要であることを発見し報告した (Glycobiology, 2009, 19:83-92.)。

腹部大動脈瘤は顕著な細胞外マトリックスの分解と炎症の慢性化が特徴である。動脈壁においも、CD44 は、分解されたヒアルロン酸を介して炎症性サイトカインを上昇させ、さらに炎症を増悪させる可能性のある分子と考えられる。以上のことから、CD44 が腹部大動脈瘤の進展に関与するのではないかと着想するに至った。

初期実験として行ったヒト腹部大動脈瘤組織における検討では、動脈径が拡大途中の部位でエラスチンの破壊と並行して CD44 の発現の上昇、炎症性細胞の強い浸潤が観察された。上記は、我々の仮説を支持する結果と考えられた。

仮説



2. 研究の目的

腹部大動脈瘤の進展には慢性炎症が深く関与する。最近申請者らは、単球表面の CD44 が細胞外マトリックス成分の一つであるヒアルロン酸の分解物の刺激によって炎症性サイトカイン産生を増加させることを見出した。さらに腹部大動脈瘤にも CD44 が多く発現しており、CD44 が動脈瘤の進展に関与するという仮説を立てた。本研究では CD44 の腹部大動脈瘤の進展における分子病態を明らかにし、CD44 を標的とした腹部大動脈瘤のイメージングや選択

的な遺伝子・薬物治療の基礎実験を行い、CD44 が腹部大動脈瘤における新規治療ターゲットになりうるかを検討する。

3. 研究の方法

1) ヒト大動脈瘤組織における CD44 発現と細胞外マトリックス分解の関連の検討

人工血管置換術後に得られたヒト手術標本を用いて、CD44 の発現レベル・部位ならびに炎症細胞、細胞外マトリックス分解との関連を解析する。

2) マウス腹部動脈瘤モデルを用いた CD44 経路に関与する遺伝子ネットワークの解明

CD44/ApoE 二重欠損マウスにてアンギオテンシン II 持続投与腹部大動脈モデルを作製し、ApoE 単独欠損マウスと遺伝子発現をアレイで比較し、CD44 を介する炎症性遺伝子を探索する。

3) CD44 を標的とした生体分子イメージングならびに大動脈瘤進展抑制療法の基礎的検討

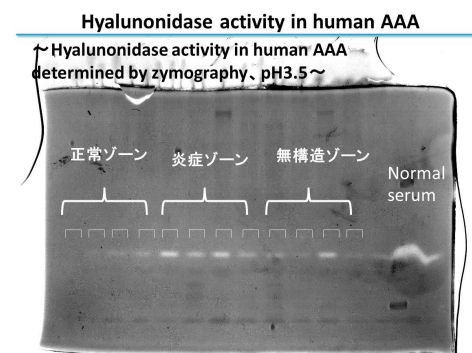
CD44 標的薬物送達システムによる腹部動脈瘤進展抑制の基礎的検討を、ヒアルロン酸コーティングリポソームを用いて行う。

4. 研究成果

結果 1

人工血管置換術の際に取り出した、腹部大動脈瘤の組織をシート状に展開した後、分割。“ほぼ正常ゾーン”、“炎症ゾーン”ならびに“無構造ゾーン”に分類し、各ゾーンにおける CD44、マクロファージ、リンパ球、マスト細胞を免疫組織学的に検討し、CD44 発現細胞を詳細に調べた。炎症ゾーンにはマクロファージ、リンパ球の浸潤が多く認められ、CD44 はマクロファージの発現と一致するものも多かったが、血管平滑筋細胞と思われる部位にも認められた。無構造ゾーンでは炎症細胞浸潤も乏しく、これらの部位での細胞を用いたヒアルロン酸ザイモグラフィでは、炎症ゾーンでのヒアルロニダーゼの活性増加を認めていた。(図 1)

図 1



これから、ヒト組織でも、CD44 の発現増加ならびに細胞外マトリックスであるヒアルロン酸の分解が促進している可能性が考えられた。

## 結果 2

表現系を詳細に検討するため CD44/ApoE 二重欠損マウスと ApoE 単独欠損マウスの両群間での大動脈瘤の進展や病変部での浸潤細胞、サイトカイン・マトリックス分解酵素の発現を検討したところ、CD44/ApoE 二重欠損マウスは ApoE 単独欠損マウスに比較して腹部動脈瘤の発生頻度・大きさが小さかった。(図 2) 炎症性サイトカインの発現をリアルタイム PCR で確認したところ、IL-6 などの発現は CD44/ApoE 二重欠損マウスで有意に低かった。(図 3)ゼラチンゼイモグラフィーでも MMP の活性は低いことが分かった。CD44 を介する炎症性遺伝子ネットワークの解明のため、両マウスを用いてマイクロアレイを行い、結果を解析中である。

図 2

Change in aorta in WT and CD44KO mice 8 weeks after treatment with saline or CaCl<sub>2</sub>

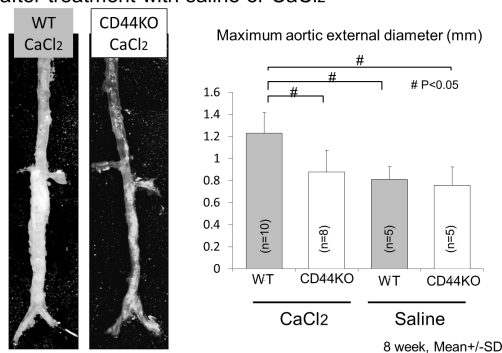
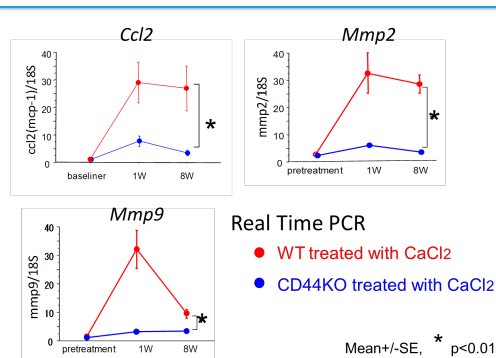


図 3

Reduced inflammation in CD44KO



現在、高分子ヒアルロン酸を表面にコートしたリポソームを作成し、in vivo モデルでの検討を行っているところである。

## 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 3 件)

1. Sakatani Y, Miyoshi T, Oe H, Noda Y, Ohno Y, Nakamura K, Saito Y, Osawa K, Morita H, Kohno K, Ito H. Pioglitazone prevents the endothelial dysfunction induced by ischemia and reperfusion in healthy subjects. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2014 Oct;64(4):326-31. doi:10.1097/FJC.000000000000124. 査読有
2. Miyoshi T, Doi M, Usui S, Iwamoto M, Kajiya M, Takeda K, Nosaka K, Nakayama R, Okawa K, Takagi K, Nakamura K, Hirohata S, Ito H. Low serum level of secreted frizzled-related protein 5, an anti-inflammatory adipokine, is associated with coronary artery disease. *Atherosclerosis* 233(2), April, 454-459, 2014. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2014.01.019. 査読有
3. Miyoshi T, Nakamura K, Yoshida M, Miura D, Oe H, Akagi S, Sugiyama H, Akazawa K, Yonezawa T, Wada J, Ito H. Effect of vildagliptin, a dipeptidyl peptidase 4 inhibitor, on cardiac hypertrophy induced by chronic beta-adrenergic stimulation in rats. *Cardiovasc Diabetol.* 2014 Feb 13;13:43. doi: 10.1186/1475-2840-13-43. 査読有

(学会発表)(計 3 件)

1. T Miyoshi, T Yonezawa, M Yoshida, S Akagi, Y Saito, K Nakamura, H Ito. Genetic Deletion of Integrin Alpha1beta1 Alleviates Aortic Rupture in Angiotensin II-induced Abdominal Aortic Aneurysm. *AHA2014.* 2014/11/15. Chicago, Illinois, USA
2. Y Noda, T Miyoshi, T Yonezawa, H Oe, N Toh, Y Oono, K Nakamura, H Morita, K Kusano, H Ito. Vildagliptin, a dipeptidyl peptidase-4 inhibitor, ameliorates the development of CaCl<sub>2</sub>-induced abdominal aortic aneurysm in mice via anti-inflammatory effects. *ESC CONGRESS 2013.* 2013/8/31. Amsterdam, Nederland

3. T Miyoshi. Hyaluronic acid metabolism is increased in human abdominal aortic aneurysm. ESC CONGRESS 2012. 2012/8/25. Munich, Germany

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

三好 亨 (MIYOSHI Toru)  
岡山大学・大学病院・講師  
研究者番号：7 0 4 4 4 6 5 1

##### (2)研究分担者

中村 一文 (NAKAMURA Kazufumi)  
岡山大学・医歯薬学総合研究科・准教授  
研究者番号：1 0 3 3 5 6 3 0

##### (3)研究分担者

米澤 朋子 (YONEZAWA Tomoko)  
岡山大学・医歯薬学総合研究科・助教  
研究者番号：3 0 3 0 4 2 9 9

##### (4)研究分担者

吉田 賢司 (YOSHIDA Masashi)  
岡山大学・医歯薬学総合研究科・助教  
研究者番号：7 0 5 3 2 7 6 1