

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 26 日現在

機関番号：13601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26860550

研究課題名(和文)血管障害後の新生内膜肥厚形成におけるマクロファージ由来のヒアルロン酸の重要性

研究課題名(英文)Crucial role of hyaluronan derived from macrophages in neointimal formation after vascular injury.

研究代表者

嘉嶋 勇一郎 (KASHIMA, Yuichiro)

信州大学・学術研究院医学系(医学部附属病院)・助教

研究者番号：70545722

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：ヒアルロン酸は、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、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きた。循環器領域においては、動脈硬化血管や経皮的冠動脈治療後のステント再狭窄部位に、ヒアルロン酸が過剰に蓄積することが知られている。本研究では、マクロファージ由来のヒアルロン酸が、動脈硬化進展に関わるメカニズムについての基礎的検討を行い、マクロファージの遊走能やサイトカイン産生能を高めることを示した。

研究成果の概要(英文)：Hyaluronan (HA) is a primary component of the extracellular matrix of cells, and it is involved in the pathogenesis of atherosclerosis. HA was found to be expressed in neointimal lesions after wire-mediated vascular injury in mice. 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 macrophages activation, including migration and production of inflammatory cytokines, and reactive oxygen species (ROS). The migration of macrophages were mediated by the CD44/RhoA. Because HA synthase 2 (HAS2) is predominantly expressed in injured arteries, we generated cTg mice that overexpress the murine HAS2 gene specifically in macrophages (cHAS2/CreLys mice) and showed that HA overexpression markedly enhanced neointimal formation after cuff-mediated vascular injury. Macrophages-derived HA promotes neointimal formation after vascular injury.

研究分野：循環器内科

キーワード：ヒアルロン酸 新生内膜肥厚

### 1. 研究開始当初の背景

ヒアルロン酸は、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、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きた。循環器領域においては、動脈硬化血管や経皮的冠動脈治療後のステント再狭窄部位に、ヒアルロン酸が過剰に蓄積することが知られている。しかしながら、ヒアルロン酸が動脈硬化や冠動脈形成術後のステント再狭窄の進展に関与するメカニズムは、血管平滑筋細胞やマクロファージなどの細胞成分の研究に比して、ほとんど解明されていない。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、マクロファージ由来のヒアルロン酸が、動脈硬化進展に関わるメカニズムについての解明であり、ヒアルロン酸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やステント内再狭窄予防法の開発を最終目標とし、その基礎的検討を行うことである。

### 3. 研究の方法

本研究は、マクロファージ由来のヒアルロン酸が血管傷害後の新生内膜肥厚を増強させるメカニズムを解明するため、Cre-mediated activation により、マクロファージ特異的に HAS2 を強制発現させ、マクロファージ特異的にヒアルロン酸を過剰発現させる。また、このマクロファージのヒアルロン酸過剰産生マウスは、コントロール・マウスに比して、wire-mediated injury model による血管傷害モデルを作成すると、新生内膜肥厚は著明に増強されることを確認した。また、HAS2 conditional transgenic mice と CreLys mice をコントロールとし、マクロファージ特異的にヒアルロン酸を過剰発現させた HAS2/CreLys mice における新生内膜肥厚の程度を比較した。HAS2 は胎生致死となるためノックアウト・マウスの作成はできない。したがって、HAS によるヒアルロン酸合成を特異的に阻害することができる 4-methylumbelliferone を経口投与することで、ヒアルロン酸をノックダウンさせ、血管傷害後の新生内膜肥厚の程度を検討した。

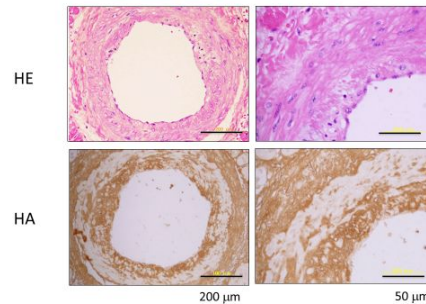
マクロファージ由来のヒアルロン酸が、血管障害モデル後の新生内膜肥厚を増強するメカニズムを検討するため、Invitro 実験を行った。4% Thiolycolate 溶液を腹腔内注射し、4 日後に腹腔マクロファージを採取する。マクロファージ特異的にヒアルロン酸を過剰発現させた HAS2/CreLys からのマクロファージを、交配前の HAS2、CreLys から通常のマクロファージをそれぞれのマウスから採取し、マクロファージの性質の差異について検討した。交配前の HAS2、CreLys から通常のマクロファージに対し、ヒアルロン酸による刺激を加え、その影響について検討

する。また、マクロファージにおけるヒアルロン酸によるシグナル伝達について、検討を行った。

### 4. 研究成果

まず、冠動脈病変のあるヒト剖検検体にて、新生内膜肥厚部位にヒアルロン酸の蓄積が見られることを確認した(図1)。

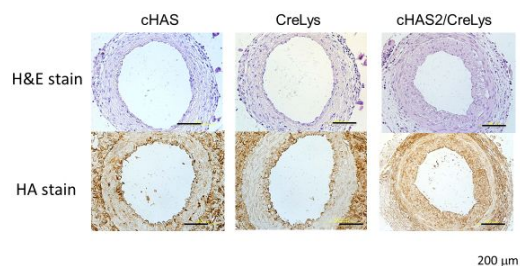
(図1) ヒト剖検例における冠動脈。H&E 染色およびヒアルロン酸免疫染色 (HA)。



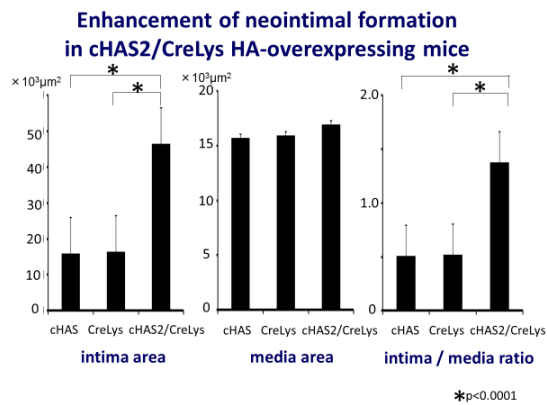
次に、Cre-mediated activation により、マクロファージ特異的に HAS2 を強制発現させ、マクロファージ特異的にヒアルロン酸を過剰発現させたモデル・マウスを作成した。このマクロファージにおけるヒアルロン酸過剰産生マウスは、コントロール・マウスに比して、cuff-mediated injury model による血管傷害モデルを作成すると、新生内膜肥厚は著明に増強された(図2、図3)。

(図2) マクロファージにおけるヒアルロン酸過剰産生モデル・マウスを使用した血管傷害モデル in Vivo 実験の結果。

#### HA-overexpression in macrophages enhances neointimal formation after curr-mediated vascular injury

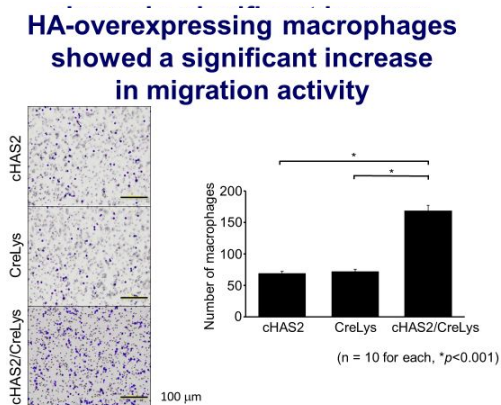


(図3) マクロファージにおけるヒアルロン酸過剰産生モデルにおける血管傷害モデル in Vivo 実験結果詳細。内膜中膜比を提示。



さらに、ヒアルロン酸過剰産生モデルより採取したマクロファージを用いて、Transwell cell migration assay testを行ったところ、(交配前マウスより採取したマクロファージをコントロールとした)、遊走能の増強が見られた(図4)。

(図4) ヒアルロン酸過剰産生モデルのヒアルロン酸遊走能の評価。

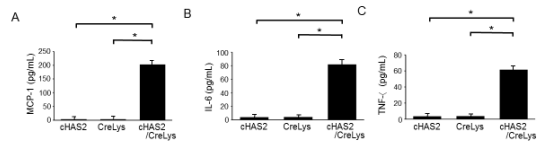


さらに、上記マクロファージを用いてサイトカイン産生能を調べたところ、炎症性サイトカイン(MCP-1, IL-6, TNF-アルファ)産

生能が増強していた(図5)。

(図5) ヒアルロン酸過剰産生モデルのマクロファージにおける炎症性サイトカイン産生能の評価。

### Production of Inflammatory cytokines in HA-overexpressing macrophages

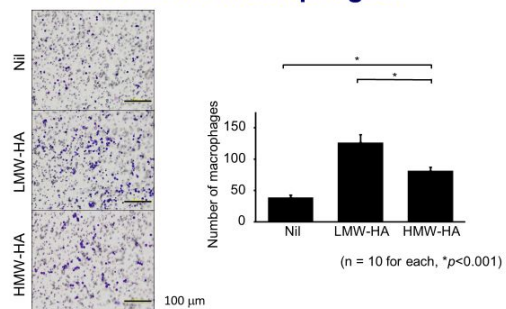


•1.0 × 10<sup>5</sup> cells were cultured using 24-well dish in 500 μl of RPMI medium (10% FBS) for 48 h  
 •Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) (A), Interleukin-6 (IL-6) (B), and tumor necrosis factor-α (TNF-α) (C) levels in the supernatants were measured.  
 •Data are expressed as mean ± SD (n = 10 for each, \*p<0.001).

ヒアルロン酸は、糖鎖の長さにより LMW-HA と HMW-HA の 2 種類が知られているが、その作用が異なることが知られている。Wild-type より採取したマクロファージを用いて、その差異について検討を行ったところ、LMW-HA の方が HMW-HA に比して、遊走能やサイトカイン産生能の増強作用が強いことを示すことができた(図6、図7)。

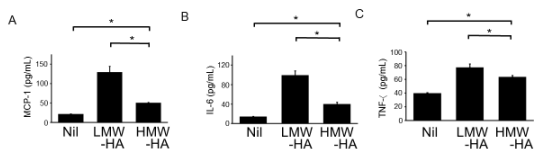
(図6) ヒアルロン酸の長鎖、短鎖によるマクロファージ遊走能の差異についての評価。

### HA stimulates migration activity in murine macrophages.



(図7) ヒアルロン酸の長鎖、短鎖によるマクロファージにおける炎症性サイトカイン産生能の差異についての評価。

## HA stimulates inflammatory cytokines production in macrophages.



•  $1.0 \times 10^5$  cells were cultured using 24-well dish in 500  $\mu$ l of RPMI medium (10% FBS) for 48 h

• Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) (A), Interleukin-6 (IL-6) (B), and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) (C) levels in the supernatants were measured.

• Data are expressed as mean  $\pm$  SD (n = 10 for each, \*p < 0.001).

以上より、ヒアルロン酸はマクロファージの遊走能および炎症性サイトカイン産生を増強させることで、動脈硬化進展に与していることが分かった。さらに、その作用は、マクロファージ表面にある CD44 を介してシグナル伝達していることを解明できた。

### 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)

[学会発表](計 2 件)

Yuichiro Kashima, Masafumi Takahashi, Naoki Itano, Shun-ichiro Taniguchi, Uichi Ikeda, Critical Role of Hyaluronan Derived From Macrophages in Neointimal Formation After Vascular Injury, 2016年11月12~16日 American Heart Association Scientific session (米国ニューオーリンズ)

Yuichiro Kashima, Masafumi Takahashi, Naoki Itano, Shun-ichiro Taniguchi, Uichi Ikeda, Critical Role of Hyaluronan Derived From Macrophages in Neointimal Formation After Vascular Injury 2013年11月16~20日 American Heart Association Scientific session (米国ダラス)

### 6. 研究組織

#### (1)研究代表者

嘉嶋 勇一郎 (KASHIMA, Yuichiro)

信州大学・学術研究院医学系(医学部附属病院)・助教

研究者番号: 70545722