

cAMP シグナルを標的にしたヒアルロン酸産生制御メカニズムの研究

横浜市立大学大学院医学研究科

石川 義弘、横山 詩子

Hyaluronic acid is a kind of mucopolysaccharide and exists abundantly as extracellular matrix in skin, article, lens and other organs. Skin folding as seen with aging is shown to be related to a decrease in the content of hyaluronic acid in skin. Supplemental uptake of hyaluronic acid and addition to cosmetic ointment as well as direct skin injection of hyaluronic acid itself have been commonly employed. Further, in the treatment of article inflammation or lens injury, hyaluronic acid has been used widely in medicine. It has been known that stimulation of G protein-coupled receptors is necessary to produce hyaluronic acid, leading to increased cell migration or proliferation. However, the exact molecular mechanism of this signal transduction in cells has remained undetermined. We have investigated the molecular mechanisms of hyaluronic acid production through cAMP signal in our laboratory. We have demonstrated that the activation of cAMP signal is essential and resulting increase in hyaluronic acid synthase enzyme expression follows. Because cAMP is produced by adenylyl cyclase, a membrane-bound enzyme that is activated by Gs protein, leading to the conversion of ATP to cAMP, it is necessary to investigate the molecular mechanisms of adenylyl cyclase activation that leads to increased hyaluronic acid production. Adenylyl cyclase enzyme has many isoforms, from type I to IX, which show distinct tissue distribution and biochemical properties. Because the hyaluronic acid production has been best demonstrated in vascular smooth muscle cells in our laboratory, we examined adenylyl cyclase isoforms that are responsible for hyaluronic acid production. We also examined the effect of stimulating these adenylyl cyclase isoforms in an isoform-specific manner using forskolin derivatives that have increased specificity to these isoforms. We also examined the effect of overexpressing adenylyl cyclase isoforms in these cells to explore changes in intracellular cell signaling as well as changes in hyaluronic acid production. Accordingly, we found that specific isoforms of adenylyl cyclase are more responsible for hyaluronic acid production and thus cell migration thereafter, and that these isoforms play an important role in not only hyaluronic acid production, but regulating vascular function such as vasodilatation or endothelial thickening. Our results have indicated that it is important to understand the role of each adenylyl cyclase to regulate hyaluronic acid production. Pharmacological stimulation of a specific isoform of adenylyl cyclase may enable us to enhance the production of hyaluronic acid specifically. Development of such specific stimulator of adenylyl cyclase may be used in the treatment of conditions where decrease in hyaluronic content is involved. Indeed, our results have suggested that such strategy is pharmacologically feasible.

1. 緒 言

ヒアルロン酸はムコ多糖の一種であり、皮膚をはじめとして関節や硝子体などにおける細胞外器質として豊富に存在する。加齢に伴う皮膚のたるみやシワではヒアルロン酸含有量の低下が関与しており、近年では健康補助食品としての摂取や、化粧品の添加物としての使用、さらには美顔術としてのヒアルロン酸注入が行われている。これ以外にも関節炎や角結膜上皮障害における治療など、幅広く医療に利用されている。ヒアルロン酸の産生にG蛋白共役型のホルモン刺激が関与することは以前より知られていたが、その詳細なメカニズムは不明であった。G蛋白共役型のホルモン刺激によってヒアルロン酸産生の亢進とともに、細胞増殖や遊走が亢進することが報告されてきたが、これらの細胞機能の特異的に制御することが可能なのか、あるいは

はその細胞内シグナルの制御は独立して行われているのかは不明であった。

我々の研究室では、G蛋白共役型ホルモンによるcAMPシグナルの分子メカニズムを長年にわたって研究してきたが、最近の成果によればヒアルロン酸の産生制御にはcAMPシグナルの活性化が必要であり、平滑筋細胞や繊維芽細胞においてヒアルロン酸産生酵素の一つであるHas2の転写レベルでの亢進が重要な役割を果たしていることがわかった¹⁾。さらにcAMPシグナルの標的酵素として、従来考えられていたプロテインキナーゼA以外に、Epacと呼ばれるG蛋白質調節因子が細胞遊走の調節に重要な役割を果たしており、プロテインキナーゼAとEpacに機能分担が存在することがわかってきた^{2,3)}。このことは、ヒアルロン酸産生と細胞遊走の制御メカニズムが異なる可能性を示唆する。

本申請では、G蛋白共役型ホルモンによるアデニルシクラーゼの活性化が引き起こすcAMPシグナルがヒアルロン酸産生を如何に制御するかを検討し、血管平滑筋細胞を含めて細胞外器質の産生を特異的に制御する酵素サブタイプを含めた検討をおこなった。さらに特定のアデニルシクラーゼサブタイプの制御剤が、将来的な薬物開発の対象となりうるかについて検討した。



Regulation of hyaluronic acid production via cAMP signal

Yoshihiro Ishikawa*, Utako Yokoyama
Yokohama City University Graduate
School of Medicine

2. 実 験

HAS 発現の定量

トータルRNA はプールされたラット組織から抽出した。cDNAの合成およびRT-PCRは過去の文献に記載された方法を用いた。PCR増幅に用いたプライマーの塩基配列はラットのものを用い、遺伝子バンクからの配列を元に合成した。定量的なRTPCR反応においては、それぞれのテンプレートは少なくとも3回の定量を行い、再現性を検討した。それぞれの遺伝子の定量に当たってはGAPDHをコントロールとして用いた。GAPDHの定量に当たっては、市販のキットであるTaqMan Rodent GAPDH control reagent kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) を用いた。

細胞培養

Wisterラットの血管平滑筋細胞を初代培養して使用した。ラット胎生期21日を中心に採取した。組織片は切り刻まれ、800 μ lのcollagenase/dispase enzyme mixture を添加し、37度にて15分間の消化をおこなった。細胞浮遊液を遠心し、培養液を4collagenase mixture IIに変えてさらに37度において12分間おこなった。細胞浮遊液はgrowth media mixtureに移され、35 mmのPoly-L-Lysin皿を用いて培養を行った。培養期待は5% CO₂の条件であり、37度にて施行した。細胞はそれぞれ4-6回の継代培養中に使用し、alpha-smooth muscle actinの発現が99%以上に見られることを確認して使用した。

ヒアルロン酸の定量

ヒアルロン酸は細胞培養液中に放出された量を定量した。牛軟骨から抽出されたヒアルロン酸結合蛋白をラテックスにラベルし、凝集を指標として定量することで行った (LPIA Ace, Fujirebio Inc, Tokyo)。ヒアルロン酸の定量はduplicateで製造者のプロトコールに基づいて行い、Hitachi 7070 analysis system (Hitachi, Tokyo) を用いて800nmにおける吸光度分析をおこなった。

siRNA 実験

二重鎖siRNAをアデニル酸シクラーゼ2、5、および6型の塩基配列から特定部分を選択しておこなった。コントロールにはQIAGENにて作製されたものを用いた。製造者の推奨するプロトコールに基づいて、siRNA (300 pmol)、Lipofectamin RNAiMAX (Invitrogen, San Diego, CA) を用いた。

アデノウイルス実験

ラット2型アデニル酸シクラーゼ全長cDNAをシャトルベクターに組み込んで、同サブタイプを発現するアデノウ

イルスを作製した。作成に当たってはAdenoX adenovirus construction kit (Clontech, Tokyo, Japan) を用いた。6型アデニル酸シクラーゼを発現するアデノウイルスにおいては、サイトメガロウイルスプロモーターを用いた。作成に当たってはhomologous recombination methodを用いた。

cAMP 産生能の検討

細胞を24穴プレートにおいて培養し、24時間の血清無添加条件のあとにcAMP産生を定量した。定量に当たっては事前に0.2 mM IBMXを添加し20分間のpreincubationをおこなった後に、各試薬を加えてさらに10分間incubateした。産生反応は培養液を除去し、400 μ lのice-cold trichloroacetic acid (7.5%) を各穴に加えて終了させた。サンプルは10 μ l acetyl anhydride, 20 μ l triethylamine (Sigma) を加えてアセチル化させた。これらのサンプルを50 μ l取り出し、12,000 cpm ¹²⁵I-cAMP (Perkin Elmer, Waltham, MA) 50 μ lウサギ血清 anti-cAMP 抗体 (diluted 1:3000, Millipore, Billerica, MA) と4度の条件で一晩incubationをおこなった。50 μ lヤギ抗ウサギ抗体 (magnetic bead coated, QIAGEN, Tokyo) を加えて室温条件化で揺らしながら1時間incubateした。Bound from freeの分離においては、Milliporeフィルターを用いておこなった。残存した放射能活性を測定し、標準曲線と対比することによりcAMP産生量の定量をおこなった。cAMP産生量は蛋白濃度で補正した。

PKA 活性

PKA活性はアッセイキットを用いて測定した (StressGen Biotechnologies, Ann Arbor, MI)。測定法の詳細は製造者のプロトコールに従った。

3. 結 果

PGE-EP4 シグナルによるヒアルロン酸産生の制御

我々はヒアルロン酸の産生能力を、これまでに検討してきた血管平滑筋細胞を用いて調べた。これまでの研究結果から、動脈管などから採取された血管平滑筋細胞におけるヒアルロン酸産生能力が高いことがわかっている。プロスタグランジン刺激によって、ヒアルロン酸産生が亢進することは従来の結果からも示唆されているが、はたしてどのようなサブタイプによる産生が最も強いのかを検討した。PGE1, PGE2, およびEP4アゴニストであるONO-AE1-329を用いて刺激したところ、容量依存性にヒアルロン酸産生が増加した。最終的な増加は48時間後の定量において判断した。PGE1刺激によるヒアルロン酸の産生はEP4アンタゴニストであるONO-AE3-208によって阻害された。一方でEP1およびEP3に対する拮抗剤を使用しても抑制は見られていなかった。これらの結果からEP4による刺激

がヒアルロン酸の産生を引き起こすことが推測された。

cAMP 産生を介したヒアルロン酸産生の制御

上記の結果から、ヒアルロン酸産生においてEP4の刺激が重要であることが推測された。そこで、EP4の選択的な刺激剤であるONO-AE1-329を用いて、血管平滑筋を刺激し、用量依存性と時間依存性を検討することにより、ONO-AE1-329によるヒアルロン酸産生効果を確認することとした(図1)。容量依存的なEP4アゴニストによるヒアルロン酸産生の検討として、血管平滑筋細胞を培養条件下でEP4の選択的なアゴニストであるONO-AE1-329を48時間に渡って添加し、ヒアルロン酸の産生を比較した。培養液中に浸出するヒアルロン酸を凝集法を用いて定量した。いずれも容量依存性にヒアルロン酸産生が増加していることがわかった。さらに、時間依存的なEP4アゴニストによるヒアルロン酸産生を検討した。上記と同様にEP4アゴニストであるONO-AE1-329を用いて、血管平滑筋細胞

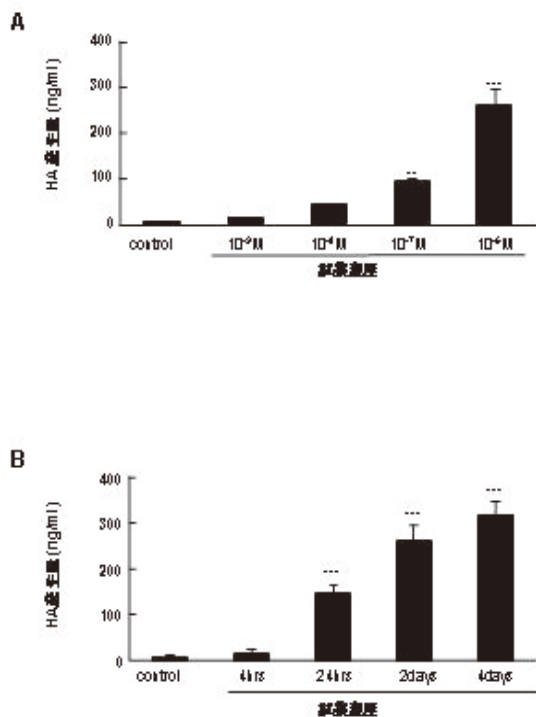


図1. EP4 アゴニストによるヒアルロン酸産生制御

- A. 容量依存的な EP4 アゴニストによるヒアルロン酸産生。
血管平滑筋細胞を培養条件下で EP4 の選択的なアゴニストである ONO-AE1-329 を 48 時間に渡って添加し、ヒアルロン酸の産生を比較した。培養液中に浸出するヒアルロン酸を凝集法を用いて定量した。いずれも容量依存性にヒアルロン酸産生が増加している。
- B. 時間依存的な EP4 アゴニストによるヒアルロン酸産生。
EP4 アゴニストである ONO-AE1-329 を用いて、血管平滑筋細胞を培養し、刺激をおこなった。4、24、2日、4日間におけるヒアルロン酸の産生を比較した。

を培養し、刺激をおこなった。4、24、2日、4日間におけるヒアルロン酸の産生を比較したところ、時間依存性にヒアルロン酸産生が増加することがわかった。さらにEP4アゴニストによるヒアルロン酸産生は、PKAの選択的阻害によって抑制されたことから、EP4刺激がcAMPの産生を上昇させ、PKAシグナルを賦活化することによってヒアルロン酸産生を上昇させるメカニズムが確認された。

ヒアルロン酸産生の分子メカニズム

ヒアルロン酸の産生に当たっては、これまでに3種類のヒアルロン酸産生酵素の存在が知られている。そこで、EP4を介したシグナル系において、どのサブタイプが関与しているのかを検討した。検討に当たっては、制御メカニズムとしてもっとも基本的な転写調節レベルでの制御が想定されたため、まずはRT-PCRを用いて、mRNAの定量をおこなった。HAS1, HAS2, HAS3の三つのサブタイプに特異的なプライマーを用いてRT-PCRによる、それぞれの定量をおこなった。EP4選択的な刺激剤であるONO-AE1-329を10⁻⁶Mの濃度において、血管平滑筋を刺激した後にRNAを抽出し、選択的なプライマーを用いて定量をおこなったところ、HAS1およびHAS3に比較して、HAS2発現の圧倒的な増加が観察された(図2)。さらにこの結果を確認するために、時間依存的なHAS2 mRNA発現量の変化で観察した。ONO-AE1-329, TGFb、PDGF-BBのそれぞれを、10⁻⁶M, 10ng/ml, 10ng/mlの濃

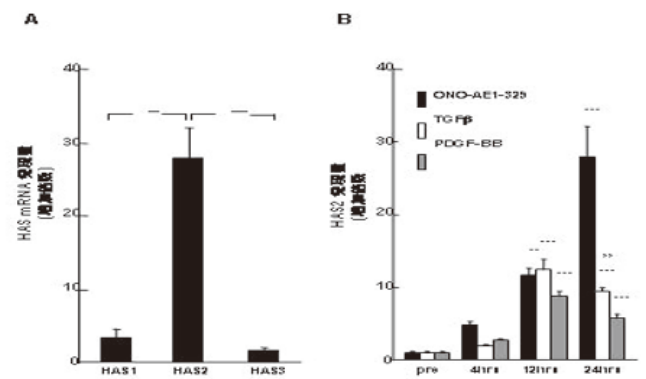


図2. EP4 アゴニストによるヒアルロン酸産生酵素発現の変化

- A. RT-PCR によってヒアルロン酸産生酵素のサブタイプ (HAS1, HAS2, HAS3) の mRNA 発現を定量した。EP4 選択的な刺激剤である ONO-AE1-329 を 10⁻⁶M の濃度において、血管平滑筋を刺激した後に RNA を抽出し、選択的なプライマーを用いて定量をおこなった。HAS1 および HAS3 に比較して、HAS2 発現の圧倒的な増加が観察された。
- B. 時間依存的な HAS2 mRNA 発現量の変化で観察した。ONO-AE1-329, TGFb、PDGF-BB のそれぞれを、10⁻⁶M, 10ng/ml, 10ng/ml の濃度で刺激し、HAS2 の発現を RT-PCR において定量した。いずれも時間依存的に発現を増加させたが、ONO-AE1-329 による増加効果が最も強力であった。

度で刺激し、HAS 2 の発現を RT-PCR において定量した。いずれも時間依存的に発現を増加させたが、ONO-AE1-329 による増加効果が最も強力であることがわかった。

以上の結果から、ヒアルロン酸産生増強の分子メカニズムとして、EP4 刺激を介して PKA の活性化がおこり、これによる HAS2 の選択的な転写促進がおこり、最終的に血管平滑筋細胞におけるヒアルロン酸分泌が促進されるメカニズムが想定された。

平滑筋におけるアデニル酸シクラーゼサブタイプの発現

EP4 刺激は G 蛋白質共役型受容体の活性化をへて、Gs 蛋白質の活性化、および引き続くアデニル酸シクラーゼの活性化を経て cAMP 産生を引き起こす。この下流に存在する PKA 刺激が HAS 2 の転写促進因子として働くことがわかった。しかるに血管平滑筋には多数のアデニル酸シクラーゼサブタイプが発現している。我々は特定のアデニル酸シクラーゼサブタイプがこのプロセスに重要な役割を果たす仮説をたてた。そこで定量的な RT-PCR 法を用いて、どのアデニル酸シクラーゼサブタイプが血管平滑筋細胞に多く発現するかを検討した。

RT-PCR の結果から、平滑筋細胞には 1 および 8 型を除くすべてのサブタイプの発現が検出された。この中ではとくに 2 および 6 型の発現がおおいことがわかった。そこで 2 および 6 型のそれぞれの関与を検討するために、siRNA の手法を用いて、それぞれのアデニル酸シクラーゼサブタイプの欠損実験をおこなった。いずれのサブタイプの欠損においても PGE 1 を介した cAMP 産生能は顕著な低下を示した。このことから両サブタイプは、いずれも PGE1 刺激の下流に存在することが推測された。そこでこれらのサブタイプによるヒアルロン酸産生を比較したところ、6 型サブタイプの欠損時においてヒアルロン酸産生能が低下するが、2 型ないし 5 型の欠損時にはそのような産生低下はみられないことがわかった。

さらにアデノウイルスをもちいて、2 型および 6 型サブタイプの過大発現をおこしたところ、2 型サブタイプの過大発現においてはヒアルロン酸産生は上昇しなかったが、6 型サブタイプの過大発現によってヒアルロン酸産生が顕著に増加することがわかった。以上の結果から、血管平滑筋細胞に発現する多数のアデニル酸シクラーゼサブタイプの中でも、6 型サブタイプが EP4 刺激によるヒアルロン酸産生に重要な役割を果たしていることが想定された。

さらに 2 型および 6 型に選択的な刺激薬を用いた実験からは、アデノウイルスによるアデニル酸シクラーゼ蛋白発現と同等の効果が、アデニル酸シクラーゼ選択的的刺激薬によって得られることがわかった。このことは、アデノウイルスを使うことなく、薬理的な手法を用いることにより、ヒアルロン酸産生を制御できる可能性を示唆する。

4. 考 察

ヒアルロン酸は細胞外器質として様々な作用を持つことが知られているが、その発現調節は十分わかっていない。我々は少なくとも血管平滑筋細胞によるヒアルロン酸産生には EP4 刺激が重要な役割をはたし、EP4 によるアデニル酸シクラーゼの活性化およびヒアルロン酸産生酵素の転写刺激を介して、ヒアルロン酸の産生が上昇することを示した。

これまでの実験で得られた結果で重要と考えられることは、これらの刺激が細胞内シグナル系をへて発揮されるが、関与する酵素サブタイプが特定されたことである。受容体レベルでは EP4 が主要な役割を果たし、その下流にあるアデニル酸シクラーゼのサブタイプに関しては 6 型サブタイプが重要な役割をになっている。さらに大切なことはヒアルロン酸産生酵素サブタイプであり、3 種のサブタイプの中でも 2 型のみが EP4 刺激によって転写活性が増強され、ヒアルロン酸産生を亢進させることがわかった。これらの結果から、ヒアルロン酸産生の分子メカニズムとして、高度に分化した特定のサブタイプを通じたシグナル伝達系が細胞内で構築されている可能性がしめされた。

細胞内には多数の酵素が存在し、その酵素サブタイプには複数存在することが知られている。シグナル伝達の過程においては、異なったサブタイプが相補的に作用し、同じような結果を生む場合と、それぞれのサブタイプが異なった機能を担っている場合がある。PGE 刺激によるヒアルロン酸産生に関しては後者の可能性が考えられる。EP4、アデニル酸シクラーゼ 6 型、およびヒアルロン酸産生酵素 2 型のそれぞれが機能的に共役していることがわかったが、その共役を可能とするメカニズムは不明である。いわゆるカベオリンなどのスカフォールド蛋白質などを通じて、特定のサブタイプ蛋白が重合している可能性も考えられる。そのような検討に当たっては免疫沈降法や細胞における免疫染色法を用いた検討が必要であると考えられ、今後の検討課題である。また、今回の研究結果から、特定のアデニル酸シクラーゼサブタイプを制御する活性薬理物質が、ヒアルロン酸欠乏組織などにおけるヒアルロン酸産生促進に応用できる可能性が示された。皮膚科学や整形外科分野を含めて、今後どのような分野において活用できるのかを検討する必要がある。

(引用文献)

- 1) Yokoyama U, Minamisawa S, Hong Q, Segi-Nishida E, Ghatak S, Iwasaki S, Iwamoto M, Misra S, Tamura K, Hori H, Yokota S, Tool BP, Sugimoto Y, and Ishikawa Y: Chronic activation of the prostaglandin receptor EP4 promotes hyaluronan-mediated

- neointimal formation in the ductus arteriosus. *J. Clin. Invest.* 116; 3026-3034, 2006
- 2) Ulucan C, Wang X, Baljinnyam E, Bai Y-Z, Okumura S, Sato M, Minamisawa S, Hirotani S, and **Ishikawa Y**: Developmental changes in gene expression of Epac and its upregulation in myocardial hypertrophy. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 293; H1662-72, 2007
- 3) Yokoyama U, Minamisawa S, Quan H, Akaike T, Suzuki S, Jin M, Jiao Q, Watanabe M, Otsu K, Iwasaki S, Nishimaki S, Sato M, and **Ishikawa Y**: PGE2-activated Epac promotes neointimal cushion formation of the rat ductus arteriosus by a process distinct from that of PKA. *J. Biol. Chem.* 283; 28702-28709, 2008