

博士學位論文

論文内容の要旨

および

論文審査の結果の要旨

東邦大学

吉川（南雲）彩子より学位申請のため提出した論文の要旨

学位番号乙第 2744 号

学位申請者： 吉川（南雲） 彩子

学位審査論文： Effect of 7-ketocholesterol on hyaluronic acid synthase2
in human aortic smooth muscle cells

(7-ケトコレステロールがヒト大動脈平滑筋細胞のヒアル
ロン酸合成酵素 2 に与える影響)

著者： Ayako Nagumo-Yoshikawa, Noriko Ishihara, Fusako Watanabe, Kohji Shirai,
Ichiro Tatsuno

公表誌： Toho Journal of Medicine 4 (2) : 74-80, 2018

論文内容の要旨：

[目的] ヒアルロン酸は動脈壁のソフトマトリックスの構成要素で、血管壁の弾性を担っている。しかしながら、動脈硬化の進展におけるヒアルロン酸の調整は十分に分かっていない。我々は、培養ヒト大動脈平滑筋細胞 (SMC) において酸化コレステロールである 7-ケトコレステロール (7-KCHO) がヒアルロン酸合成酵素 2 (HAS2) に与える影響について検討した。

[方法] 培養細胞は継代数 7~8 を用いた。実験にはプレートに細胞を播いたのち、HSG2 で 24 時間培養し、5%FBS 添加 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) に変更して 48 時間培養したものを使用した。細胞数の計測は、12 穴プレートに 5×10^4 個/穴の SMC を播き実験に用いた。5%FBS 添加 DMEM に変更後、7-KCHO (25、50、100 μ M) を添加した 5%FBS 添加 DMEM に変更して 24 時間培養し、トリプシン処理し PBS に浮遊させたものをセルカウンターにて細胞数を計測した。また、その細胞破碎液中のヒアルロン酸濃度を測定した。ヒアルロン酸の測定にはヒアルロン酸 ELISA キット (Quantikine®) を用い、吸光度の測定には、自動マイクロプレートリーダー (GloMax®-Multi Microplate Reader) を使用した。HAS2 発現については、Real Time RT-PCR で HAS2 mRNA、ウスタンプロットにて HAS2 蛋白の発現を検討した。細胞内 ROS (Radical oxygen species) の評価は、培養した SMC を 50 μ M の 2', 7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate で 30 分間培養し、トリプシン処理したものを PBS に浮遊させ、SMC 20,000 個の細胞内 ROS を蛍光活性化セルソーター (FACS) を用いて測定した。酸化ストレス阻害物質には、N-acetyl cysteine を用いた。

[結果] SMC に 7-KCHO 30 μ M 添加し、1、24、48 時間培養すると、細胞破碎液中のヒアルロン酸濃度は 7-KCHO によりコントロールと比較して 24、48 時間後で有意に低下した。また、7-KCHO の濃度の影響を評価するために、0、25、50、100 μ M の濃度の 7-KCHO を添加した SMC を 24 時間培養し培養液中のヒアルロン酸濃度を比較すると、コントロールと比較して、50、100 μ M の濃度の 7-KCHO を添加した SMC のヒアルロン酸は有意に低下していた。また、この時の細胞数は各群で有意差はなかった。7-KCHO の酸化ストレスによる影響と考えられ、細胞内 ROS を FACS で解析したところ、7-KCHO 添加群で濃度依存性に細胞内 ROS が増加した。一方、抗酸化剤の NAC と 7-KCHO を SMC に同時に添加し培養すると、ROS の発現は低下した。また、7-KCHO を添加し培養した SMC の培養液中のヒアルロン酸濃度は低下し、NAC 添加により改善した。7-KCHO が SMC のヒアルロン酸合成のどの部分に影響しているかを確認するために、HAS-2 mRNA の発現、HAS2 蛋白の発現を real time RT-PCR とウェスタンブロット法を用いて分析すると、7-KCHO 添加により SMC の HAS2 mRNA の発現および HAS-2 蛋白発現はいずれも変化しなかった。

[考察] 7-KCHO は SMC においてヒアルロン酸の合成を低下させるが、HAS-2 遺伝子発現や HAS-2 蛋白発現を介さず、ヒアルロン酸合成を調整していた。これは、7-KCHO は HAS-2 活性やヒアルロン酸を構成するグルクロン酸や N-アセチルグルコサミンの酵素への結合に影響しヒアルロン酸合成を調整していると考えられた。本研究により 7-KCHO がヒアルロン酸合成を介して血管弾性に関与している可能性が示唆された。

1. 学位審査の要旨および担当者

学位番号乙第 2744 号	氏 名	吉 川 (南雲) 彩 子
学位審査担当者	主 査	武 城 英 明
	副 査	盛 田 俊 介
	副 査	諸 井 雅 男
	副 査	杉 山 篤
	副 査	中 野 裕 康

学位審査論文の審査結果の要旨 :

ヒアルロン酸は動脈壁を構成する細胞外マトリックスであり血管壁の弾性機能調節に重要である。動脈硬化の進展においてヒアルロン酸は新生内膜の平滑筋細胞により産生され、その増殖や遊走を促進することで新生内膜を進展させるとの報告がある一方、血管壁のヒアルロン酸の低下は血管硬度（スティッフネス）を亢進させるとの報告があり、ヒアルロン酸の動脈硬化における意義は定まっていない。本研究は、このような背景のもと、動脈硬化におけるヒアルロン酸産生の調節機序を明らかにするため、酸化コレステロールである7-ケトコレステロール（7-KCHO）による血管平滑筋細胞（SMC）におけるヒアルロン酸産生への効果と機序を検討した。7-KCHO（30 μ M）添加細胞群の破砕液中のヒアルロン酸濃度は非添加群と比較して24、48時間後で有意に低下した。7-KCHO 添加24時間培養した細胞中のヒアルロン酸濃度を非添加群と比べると、50、100 μ M 濃度の7-KCHO を添加した細胞群で有意に低下していた（細胞数は各群で有意差はなかった）。この機序に7-KCHOにより惹起される酸化ストレスが関与する可能性を考え細胞内 ROS を解析したところ、7-KCHO 濃度依存性に細胞内 ROS が増加し、SMC に抗酸化剤 NAC を7-KCHO とともに添加すると低下した。そこで、NAC 添加による SMC の培養液中のヒアルロン酸濃度への効果を検討すると、7-KCHO（30 μ M）を添加したことによるヒアルロン酸濃度の低下は抑制された。SMC のヒアルロン酸合成に重要な酵素 HAS-2 への7-KCHO の作用を検討すると、7-KCHO（30 μ M）添加により HAS-2 mRNA および蛋白発現はいずれも有意に変化を示さなかった。以上の結果から、7-KCHO は SMC のヒアルロン酸の産生を抑制することが明らかになり、その機序は、ROS を介した HAS-2 発現は介さず、HAS-2 活性やヒアルロン酸代謝に影響する可能性がある。

2018年10月23日に行われた学位審査会では、動脈硬化におけるヒアルロン酸と酸化コレステロールの意義、ROS とヒアルロン酸代謝の関わり、7KCHO の SMC への作用機序と遺伝子調節、今回の培養細胞から得られた結果の臨床への応用など詳細な質疑が行われた。申請者は、一つ一つの質問に対して的確な回答を述べて結果の意義を考察した。本研究により明らかになった培養 SMC における7-KCHO によるヒアルロン酸の産生調節とその機序の検討は、動脈硬化症におけるヒアルロン酸の役割の解明に貢献し、たいへん意義のある研究と評価された。以上より、本研究は糖尿病・代謝・内分泌学分野において重要で新規な知見をもたらす十分に学位に値するものと判断された。