

論文の内容の要旨

論文提出者氏名	嘉 嶋 勇 一 郎
論文審査担当者	主 査 菅野 祐幸 副 査 天野 純・瀧 伸介
論文題目 Crucial Role of Hyaluronan in Neointimal Formation after Vascular Injury (血管傷害後新生内膜肥厚におけるヒアルロン酸の重要性)	
(論文の内容の要旨) <p>【目的】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関与する機序は、現在のところほとんど解明されていない。そこで、マウス血管傷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 が血管傷害後の新生内膜肥厚形成に関与する機序について研究を行った。</p> <p>【方法と結果】まず、ヒト動脈硬化血管およびマウス血管傷害モデルのいずれにおいても、新生内膜肥厚部位に HA が産生されていることを確認した。さらに、HA の特異的合成阻害剤である 4-methylumbelliferone (4-MU) を経口投与し、血管傷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)。血管傷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/CreSM22α) を作製し、血管傷害後の新生内膜肥厚的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/CreSM22α) vs. 0.54 ± 0.07 (cHAS2) and 0.50 ± 0.04 (CreSM22α), $p < 0.001$)。また、cHAS/CreSM22α の大動脈より採取した VSMCs は、コントロールのマウス (cHAS2、CreSM22α) 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。</p>	

【考察】本研究は、血管傷害モデルにおける新生内膜肥厚形成に HA が深く関与することを示した。その機序として、HA は CD44 を介し VSMCs 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 HA 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新たな抗動脈硬化治療薬、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。