

論文の内容の要旨

論文題目 Regulation of endothelial function by aging suppressor gene klotho
和訳 老化抑制遺伝子 klotho による血管内皮機能制御

指導教官 永井 良三 教授

東京大学大学院医学系研究科
平成13年4月入学
医学博士課程
内科学専攻
氏名 水野 由子

背景

klotho 遺伝子はヒトの老化に関わる多彩な作用を持つ遺伝子であり、その発見は1997年にさかのぼる。トランスジーン挿入変異によりヒトの老化関連疾患様のフェノタイプを呈するマウスが発見され、その欠損遺伝子は klotho と名づけられた。当初より、本マウスでは Monckeberg 型動脈硬化が4週齢より観察され、更なる解析により、高血圧、動脈硬化、洞機能不全との関連が明らかとなっている。当研究室のこれまでの検討により、klotho 欠損マウスにおいて、アセチルコリン反応性動脈血管拡張が減弱すること、内皮細胞におけるスーパーオキシドの産生が増加すること、また Angiogenesis と Vasculogenesis の両者が阻害されること、更には、それらの血管新生障害が klotho アデノウィルスの補填により改善することが判っている。klotho 欠損マウスの尿中NO_xは野生型に比べて低い値を示すため、以上の一連の血管内皮機能障害は、血管内皮細胞でのNO産生低下に起因すると予測されてきたが、klotho 遺伝子とNO産生に関する詳細なメカニズムは未だ解明されていない。一方、近年 klotho 遺伝子とヒトの冠動脈疾患の関連が報告され、本年にはヒトの血清や脳脊髄液で klotho 蛋白の存在が確認できるようになり、本遺伝子のヒトにおける重要性が俄かに注目を浴

びつつある。

血管内皮細胞の産生する NO は、血小板凝集、接着分子発現を抑制し、また、血管平滑筋に働いて血管拡張、細胞増殖・遊走を抑制する。また、血管内皮細胞由来 NO の産生は加齢とともに低下し、その結果、血管内皮機能は阻害される。従って klotho 遺伝子が、動脈硬化の発生、進展に重要な役割を果たす NO を何らかの形で修飾することが予測される。

方法と結果

そこで本研究では、klotho の高発現ベクター pCAGGS-human klotho および human klotho センダイウイルスを作成し、血管内皮に於ける klotho の果たす役割に焦点を当てた。COS1、Hela 細胞及びヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC) に pCAGGS-human klotho を導入し、klotho に特異的な抗体でウェスタンブロットを実施したところ、COS1、Hela において、細胞のみならず培養上清においても、klotho 蛋白の発現が認められた。これは klotho が細胞内にとどまらず、培養上清中に分泌されていることを意味し、また、これらの培養上清を新たな細胞に添加したところ、細胞内で Akt のリン酸化が認められた。同様の実験を PI3-K の阻害剤 wortmannin を添加して実施したところ、Akt のリン酸化は阻害され、klotho による Akt リン酸化の特異性が確認された。他方、HUVEC においては、上述した高発現ベクター pCAGGS を用いて多種のトランスフェクション溶液にて遺伝子導入を試みたものの、十分なトランスフェクション効率を得られず、上清は勿論のこと、細胞においても klotho 蛋白の発現には至らなかった。しかし klotho 遺伝子と NO の関係を議論するには、血管内皮細胞での検討が不可避であるため、新たに klotho 遺伝子を搭載したセンダイウイルスを構築し、引き続き実験を行った。

まず始めに、センダイウイルスにて十分な感染効率が得られる条件を確立した。次に HUVEC に klotho センダイウイルスを感染導入し、ウェスタンブロットを行ったところ、感染強度に準じたリン酸化の増強が Akt および eNOS で認められ、klotho が血管内皮細胞において Akt を介し eNOS のリン酸化に関与していることが証明された。また klotho による eNOS シグナルの賦活化が、実際に血管内皮細胞に及ぼす影響を調べたところ、klotho センダイウイルスを導入した HUVEC において NO 及び cyclic GMP 産生の増強が認められ、それらの現象は PI3-K 阻害剤である Ly294002 および wortmannin により阻害された。よって、Akt 上流に PI3-K が存在することが予測され、klotho が血管内皮細胞における PI3-K/Akt/eNOS シグナル経路の発現に関与し、NO の産生を介して血管内皮保護的に働くことが示唆された。

血管内皮細胞の機能維持には、NO の産生のみならず、抗アポトーシス作用や、細

胞生存といった要素が深く関わる。よってそれらの作用につき klotho センダイウィルスを用いた検討を進めた。klotho 遺伝子を導入した HUVEC において、アポトーシスの最終的な現象である DNA の断片化を評価する検討では、コントロールに比べ DNA の断片化が有意に低下する現象が認められた。次にアポトーシスに関わる因子を網羅的に調べたところ、Bax 及び caspase 3 が klotho 遺伝子を導入した細胞で減弱していることが判明した。これらの結果より klotho 遺伝子と同ファミリーの関与が示唆された。Bcl-2 ファミリーは内皮細胞の抗炎症及び抗アポトーシス作用の要であり、その下流に caspase 3 が存在する。また、Akt の抗アポトーシス作用が Bad のリン酸化を介して発揮されることは、既に知られるところである。本研究でも klotho による Bad のリン酸化の有無につき検討を進めてきたが、未だその解明には至っていない。

次に、センダイウィルスにより klotho 遺伝子を導入した HUVEC の増殖速度を、コントロールと比較して観察した。ウィルス感染7日目まで klotho 群の細胞増殖速度が速く、klotho が何らかの形で細胞増殖を促進していることが示唆された。この詳細なメカニズムに関しては、現在、解明を進めているところである。

本研究の最後では、マウスの皮膚損傷モデルを作成し、klotho センダイウィルスを導入して治癒過程に及ぼす影響を調べた。7日目までの観察において klotho 投与マウス群での治癒促進が有意に促進され、新生血管のマーカーである PECAM/CD31 染色を実施した結果、コントロール群に比べて klotho 群で28%の血管新生の増加が認められた。これは、klotho 遺伝子が血管新生促進作用及び抗炎症作用を有することを示唆し、血管内皮細胞に於ける klotho 遺伝子の重要性を強調している。

考察

以上の報告より、klotho が PI3K/Akt/NO 経路を介して NO を産生し、血管内皮機能維持に関わること、更には抗アポトーシス作用、抗炎症作用、細胞増殖促進作用を持ち、幅広い維持機構を有することが明らかとなった。Akt のリン酸化は、eNOS のリン酸化を介して NO を産生する他、インスリン代謝、抗アポトーシス作用、細胞保護作用、抗炎症作用と、多彩な作用を発揮する。本研究での klotho の幅広い血管内皮機能維持作用も、おそらくこの Akt リン酸化を介するものであることが予測される。一方、klotho はかねてから、液性因子である可能性を指摘されてきた経緯がある。その理由は、klotho マウスで見られるアセチルコリン反応性動脈血管拡張の減弱が、klotho 欠損マウスと野生型のパラビオーシスで改善することや、klotho マウスに於ける老化関連疾患様フェノタイプが、klotho アデノウィルスの尾静脈投与により改善することなどを根拠としている。このたびの検討で、klotho 蛋白が細胞培養上清に分泌され、且つ分泌された klotho 蛋白は Akt シグナルの賦活化に関与することが判明した。これらのデー

タは、klotho がインスリン、IGF-1、VEGF、PDGF といった液性因子に類似した作用をもつことを示唆し、予測される klotho レセプターとしてチロシンキナーゼレセプターが候補の一つである。klotho 遺伝子の多様な血管内皮保護作用および液性因子としての詳細な現象を解明するには更なる研究が必要であるが、本遺伝子が高血圧、動脈硬化、血管新生といった血管内皮細胞障害に起因する病態の理解、更にはそれらの治療に役立つ可能性は高いといえる。