

# 審査の結果の要旨

氏名 水野 由子

本研究は、ヒトの老化関連疾患様のフェノタイプを呈する klotho 欠損マウスにおいて血管内皮機能が障害されるという既存の事実に着目し、老化抑制遺伝子 klotho が液性因子であるとの予測のもと、同遺伝子が血管内皮機能の恒常性に関わるメカニズムを解明すべく、NO に焦点を当てたシグナルの解析を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. klotho の高発現ベクターpCAGGS-human klotho を作成し、COS1 細胞および Hela 細胞に遺伝子導入した結果、培養上清に klotho 蛋白が分泌されることが判明した。同培養上清を新たな細胞 (COS1, HUVEC) に添加すると、遺伝子導入をしていない細胞であるにも関わらず、細胞内に klotho 蛋白が発現している現象が捉えられ、klotho が細胞外に分泌され、且つ他の細胞に影響を及ぼす事実が示された。
2. klotho 蛋白を含む培養上清 (COS1 細胞由来) を、新たな COS1 細胞に添加し、短時間のタイムコースで Akt の挙動を観察したところ、klotho 刺激による Akt リン酸化の増強が確認された。同様の実験を PI3-K 阻害剤 wortmannin 添加のもと実施したところ、Akt のリン酸化は阻害され、本現象への PI3-K の関与が示唆された。以上より、細胞外の klotho が PI3-K/Akt シグナルを賦活化する事実が示された。
3. 上述の高発現ベクターpCAGGS を用いても血管内皮細胞への遺伝子導入は不可能であったため、新たな手段として klotho 遺伝子を搭載したセンダイウィルスを構築し、引き続き実験を行った。ヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC) に klotho センダイウィルスを感染導入したところ、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 のリン酸化に関与することが証明された。また klotho による eNOS のリン酸化が、実際に血管内皮細胞に及ぼす影響を調べたところ、klotho センダイウィルスを感染導入した HUVEC において NO 及び cyclic GMP の産生増強が認められ、2. と同様

に PI3-K 阻害剤の Ly294002 および wortmannin を添加することで阻害された。以上より、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 産生を介した血管内皮機能保護の働きを持つ事実が示された。

4. klotho 遺伝子を感染導入した HUVEC において、抗アポトーシス作用と細胞増殖促進作用が観察された。klotho 遺伝子導入により Bax 及び caspase 3 の発現が減弱していることより、抗アポトーシス効果の責任カスケードに Bcl-2 ファミリーが含まれることが予測された。一方、klotho を感染導入した HUVEC はコントロールに比し増殖速度が亢進していた。以上より klotho が(おそらく)Akt を介し、NO 産生のみならず、抗アポトーシス作用や、細胞保護作用を発揮し、血管内皮細胞の機能維持に寄与している事実が示された。
5. マウスの皮膚損傷モデルを作成し、klotho センダイウイルスを感染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。これにより、klotho が血管新生促進作用を有し、血管内皮細胞機能維持に於いて重要な役割を果たす事実が示された。

以上、本論文は老化抑制遺伝子 klotho が PI3K/Akt 経路を介し血管内皮機能維持に幅広く関わることを明らかにした。また特筆すべきは、分泌された klotho 蛋白が細胞外から Akt シグナルの賦活化に関与する事実であり、液性因子 klotho に特異的なレセプターの存在が推測される。本研究は、これまで未知に等しかった、老化抑制遺伝子 klotho の血管内皮機能に関わる詳細なメカニズムを解明し、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更なる理解に重要な貢献をなし、また同遺伝子の治療薬への布石をうったことより、学位の授与に値するものと考えられる。