

論文題目 Vascular senescence and SIRT1

血管老化と SIRT1

指導教員 大内尉義教授（東京大学大学院医学系研究科加齢医学講座）

東京大学大学院医学系研究科

平成 14 年 4 月入学

医学博士課程

生殖・発達・加齢医学専攻

小林 貴

高齢社会を迎えた日本で 3 大死亡原因となる脳、心疾患に極めて重要な基礎疾患となる動脈硬化について、血管老化という視点で検討を試みた。

Sir (silent information regulator) 2 は Nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) 依存性ヒストン脱アセチル化酵素であり、この酵素活性は酵母における silencing と ribosomal DNA 組み換え抑制に必要とされるばかりでなく、その寿命制御にとっても必須であることが明らかになった。Sir2 蛋白のファミリーはバクテリアからヒトに至るまで広く見出されており、進化的に共通した分子メカニズムと

考えられる。Sir2は核内の転写因子であり、NAD依存性に histone を de-acetylation することでニコチナマイドとアセチル ADP リボースを産生しクロマチン構造が変化を起こし、いわゆる不活性の構造をとる。つまり、NADによりあらわされる細胞のエネルギー代謝状態をゲノムのクロマチン制御状態に変換する“エネルギーセンサー”として機能している。

培養血管細胞の寿命は有限であり、一定期間の分裂増殖後、細胞老化 (cellular senescence) とよばれる分裂停止状態となる。細胞老化に伴う形質変化は、老化血管にみられる機能不全とよく似ており、また、老化した血管細胞は動脈硬化巣に特異的に認められ、内皮機能障害などの形質を示すことから生体内における細胞レベルの老化が動脈硬化形成に関与していると考えられている。

進行した動脈硬化病変部位では遊走した老化平滑筋細胞が内膜に認められ、中膜には老化した平滑筋細胞がほとんど認められないことが指摘されている。また、PCI (percutaneous coronary intervention) において冠動脈ステント治療の現在の最大の問題点は Neointima による再狭窄であり、これには主に血管平滑筋細胞増殖が関与しており、効果的な DES (drug-eluting stent) の開発が益々重要となっている。このように血管平滑筋細胞は動脈硬化現象において中心的な役割を果たしている。

以上の背景から Sir2 のオルソログであり最も代表的なヒト長寿遺伝子として

知られる SIRT1 によるヒト血管平滑筋細胞 (Human aortic smooth muscle cell: HASMC) の増殖がどのように制御されているか検討した。

方法として、SIRT1 阻害には、Sirtinol と small interfering RNA を使用した。細胞増殖は細胞数測定と 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) 取り込み反応で測定した。成長因子刺激には epidermal growth factor (EGF) を使用した。細胞老化の判定には SA- β -gal (senescence-associated β -galactosidase) activity を用いた。各種蛋白質発現は Western blotting analysis を施行した。

今回の研究で私はヒト長寿遺伝子 SIRT1 の働きを阻害することにより、HASMC が増殖抑制を示すことを確認した。また、その増殖抑制された細胞体は細胞老化様形質を伴っていることを確認した。その機序として癌抑制遺伝子 p53、および p53 の acetyl 化が中心的な役割を果たしていることを示し、下流の p21 の蛋白発現も上昇しているということから最終的に G1 期での Growth arrest が起きていることが考えられた。また、SIRT1 阻害により、成長因子である EGF 刺激に対する反応である mitogen-activated protein kinase (MAPK) (extracellular-regulated kinases 、 stress-activated protein kinase /Jun N-terminal kinase) の活性化低下が確認でき、老化様形質を伴った細胞体はシグナル伝達が抑制されていることが理解できた。以上のことから老化マーカーの指標として、SA- β -gal activity 、成長因子に対する MAPK の活性化低下に加え、SIRT1 を用いた評価法の可能性

が示唆された。これらのことは、加齢による死亡原因としてきわめて重大である動脈硬化性疾患による血管病治療の一助となる可能性を秘めている。