

## 論文の内容の要旨

論文題目 Glyoxalase I Ameliorates

Age-related Endothelial Dysfunction.

(グリオキシレース I は加齢に伴う

血管内皮機能障害を軽減する。)

氏名 城 愛理

動脈は、内側から内膜・中膜・外膜の3層から成る。内膜の血管腔と接する面は単層の血管内皮細胞で覆われており、血管壁を保護するとともに、血管平滑筋の収縮・弛緩を引き起こす様々な物質の産生、遊離を行っている。一酸化窒素(nitric oxide: NO)に代表される内皮由来弛緩因子と種々の収縮因子のバランスによって血管の緊張性が保たれている。ヒトおよびげっ歯類では、加齢に伴い大動脈の形態的変化および機能的変化が見られる。形態的変化としては内膜・中膜の肥厚があり(*Hypertension* 33:116-23, 1999)、超音波検査で測定される中膜内膜複合体厚(Intima Media Thickness: IMT)の増加はそれを反映したものとして知られている(*Vasc Surg.* 42:926-31, 2005. *Circulation* 121: e46-e215, 2010)。機能的変化としては、収縮期血圧や脈圧の上昇、内皮依存性弛緩の低下に代表される血管内皮機能に障害が見られる。近年、加齢に伴い通常みられる内皮機能障害が、動脈硬化などの心血管病の前段階であり、心血管病のリスクであると考えられるようになった(*Circulation* 107: 139-46, 2005)。

一方、加齢により全身で糖化が亢進し最終糖化産物(advanced glycation endproducts: AGEs)が蓄積することが知られている。AGEsは、糖と蛋白質が非酵素的に結合することにより、多くの複雑な段階を経て最終的に生成される産物の総称であり、この反応過程は糖化またはメイラード反応と呼ばれる。解糖系から生じるアルデヒドであるメチルグリオキサールは、生体内における代表的なAGE前駆体である。メチルグリオキサールは高反応性のカルボニル基(-C(=O)-)を持ち、蛋白や核酸などの様々な物質と非酵素的に反応する。生体内にはこの反応性に富むメチ

ルグリオキサールを消去する機構があり、この反応の律速酵素は glyoxalase 1(GLO-1)である。蛋白の糖化修飾は、その蛋白が本来持つ機能の変化・低下や、変性蛋白の分解の遅延を引き起こす。糖尿病性血管合併症、動脈硬化、アルツハイマー病やパーキンソン病などの加齢に伴って増加する疾患でも、病変部への糖化蛋白の沈着が報告されている(*Alzheimers Dis.* 24 Suppl 2:211-21, 2011. *Clin Chem Lab Med.* 49:385-91, 2011)ことから、**加齢に伴う生理現象や加齢に伴って増加する疾患の発症・進展に糖化蛋白が関与している可能性がある**。その機序については、糖尿病性血管合併症などの一部の疾患では研究が進んでいるものの、糖化蛋白の蓄積の病理・病態学的意義はよく分かっていない。糖尿病では持続する高血糖から血中の糖化蛋白が増加し、内皮機能障害をはじめとする心血管合併症が起こることが報告されている(*N Engl J Med* 325:836-42, 1991)が、高血糖を伴わない高齢者での血管内皮機能障害と糖化の因果関係は明らかになっていない。

これらの背景から、糖化の亢進と血管内皮機能障害は共に加齢とともに起こることが分かっている。加齢に伴う内皮機能障害の発症機序に蛋白の糖化の亢進が関与している可能性があるが、**生理的な加齢に伴う糖化と血管内皮機能障害の因果関係は明らかになっていない**。また、AGE 前駆体が、様々な生物種・細胞種に広く利用されているエネルギー生成系である解糖系に主に由来していることから、糖化は細胞内でも普遍的に起こっている現象であると考えられる。これまでの糖尿病モデルや加齢モデルを用いて AGEs と血管内皮機能障害の関連を示した研究では、AGEs が血管内皮細胞表面の AGE 受容体(RAGE)を介して内皮依存性弛緩を低下させるといった、細胞外 AGEs による作用が報告されている (*Aging Cell.* 9:776-84, 2010)が、生理的加齢に伴う血管内皮機能障害へは、細胞外 AGEs のみでなく細胞内の糖化亢進が大きく関与していると考えられる。**血管内皮細胞内での蛋白の糖化亢進やそれに伴う機能低下による血管内皮機能障害のメカニズムは明らかになっていない**。

血管内皮機能障害は心血管病の危険因子として重要であり、加齢に伴う血管内皮機能障害を抑制することで心血管病の予防に役立つと考えられる。そのメカニズムを明らかにすることで心血管病の予防への応用が期待される。

私は、血管における糖化が加齢に伴う内皮機能に及ぼす影響とその障害メカニズムを明らかにするため、AGEs 前駆体であるメチルグリオキサールの消去酵素 glyoxalase I (GLO-1)を高発現するラット(GLO-1 Tg)の胸部大動脈を用いて加齢による内皮機能変化を解析した。

若年群(13 週齢)と加齢群(48 週齢)ともに、**内皮機能に影響を与えることが分かっている因子である血圧や耐糖能、脂質代謝には、WT と GLO-1 Tg の間で差はなかった**。私は次に、血管における GLO-1 の発現部位と活性を調べるため、大動脈の GLO-1 の免疫染色と GLO-1 活性の測定を行った。免疫染色では、GLO-1 は内皮細胞にも発現していることが確認された。大動脈抽出蛋白の GLO-1 活性を測定したところ、**若年群・加齢群ともに GLO-1 Tg は WT の約 2 倍の大動脈 GLO-1 活性をもっていた**。次に私は、加齢に伴い血管内皮で糖化の亢進がみられるかどうか、

また、GLO-1 高発現によりそれが抑制されるかをメチルグリオキサール修飾蛋白(argpyrimidine)の免疫染色により確認した。WT では加齢により血管内皮細胞における糖化が亢進していたが、GLO-1 Tg では糖化の亢進が抑制された。なお、老化マーカーとして知られている老化関連βガラクトシダーゼ染色や p53, p21 の免疫染色では、加齢 WT と加齢 GLO-1 Tg の老化マーカーの発現レベルに差は見られず、老化マーカーに差の見られない段階でも内皮において糖化が亢進しており、それが GLO-1 により抑制されていると考えられた。

私はこれらの大動脈の機能の変化を見るため、大動脈リングを用いて薬物誘発性血管弛緩反応実験を行った。WT, GLO-1Tg とともに、加齢群では若年群に比べアセチルコリン(ACh)による内皮依存性弛緩およびニトロプルシドナトリウム(SNP)による内皮非依存性弛緩が減弱していた。加齢 WT と GLO-1 Tg の間で SNP 誘発性血管弛緩に差は見られなかったが、ACh 誘発性血管弛緩は加齢 GLO-1Tg では加齢 WT に比べて有意に高く保たれていた。これらの結果から、GLO-1 Tg では WT に比べて加齢による内皮依存性弛緩の低下が有意に抑制されると考えられた。また、内皮を剥離した動脈リングや NO 合成酵素(NOS)阻害剤を前投与した内皮温存大動脈ではアセチルコリン誘発性血管弛緩が完全に抑制されたことから、加齢に伴う ACh 誘発性血管弛緩低下および GLO-1 Tg での低下軽減の機序として血管内皮細胞で合成される NO が重要である可能性が考えられた。

血管内皮細胞における NO 合成は主に内皮型 NOS(eNOS)を介して行われる。合成された NO は血管平滑筋へ作用して cGMP を介したシグナル伝達により血管弛緩を引き起こす。NO が実際に血管平滑筋に達して作用する割合(NO 生体利用率)の低下の要因として、内皮細胞による NO 産生の低下と、合成された NO の酸化ストレスなどによる消去の亢進が考えられる。私は加齢に伴う NO 生体利用率の低下と GLO-1 による低下軽減の機序を明らかにするため、大動脈の酸化ストレスの評価、eNOS 二量体/単量体比による eNOS coupling/uncoupling の評価、ウェスタン・ブロッティングによる eNOS のリン酸化の評価を行った。まず、大動脈酸化ストレスの評価として、NO が活性酸素種と反応して消去される過程で生じる peroxynitrate による修飾チロシン残基である nitrotyrosine の免疫染色およびウェスタン・ブロッティングを行った。免疫染色における大動脈内皮の nitrotyrosine レベルは加齢 WT と GLO-1 Tg で同程度であり、大動脈抽出蛋白の nitrotyrosine レベルが加齢 WT と GLO-1 Tg で同程度であったことから、酸化ストレスの程度に差はないと考えられた。次に、eNOS coupling/uncoupling の評価として、eNOS の活性型二量体フォームと不活性型単量体の比を調べた。eNOS 二量体/単量体比は加齢 WT と GLO-1 Tg で同程度であり、eNOS uncoupling が主要なメカニズムではないと考えられた。最後に eNOS の翻訳後修飾による活性変化について調べた。eNOS は転写レベルのみでなくリン酸化やアシル化等の翻訳後修飾や蛋白間相互作用により活性調節を受ける。この中で私は、eNOS のリン酸化に着目し、代表的な活性型リン酸化部位であるセリン 1177 番(Ser 1177)と抑制性リン酸化部位であるスレオニン 495 番(Thr495)のリン酸化状態を western blotting により評価した。その結果、加齢 WT と GLO-1 Tg において eNOS(Ser1177) のリン酸化に差はなかったが、GLO-1 Tg での eNOS(Thr495)のリン酸化レベルは WT に比べて有意に低下しており、eNOS(Thr495)のリン酸化レベルの低下を介して eNOS の活性が保たれている可能性が考えられた。

以上より、加齢に伴い血管内皮細胞において糖化が亢進し、血管内皮機能障害を来していること、GLO-1 が糖化の亢進を抑制することにより血管内皮機能が維持されることが明らかとなった。また、そのメカニズムとして、抑制性リン酸化部位である Thr495 のリン酸化が関与していることが示唆された。GLO-1 の高発現により血管の糖化を抑制したラットで加齢に伴う内皮機能障害が軽減されること、更にそのメカニズムとして eNOS の翻訳後修飾が関与しているということを示したという点で本研究は意義深いと言える。糖化は血管老化の重要な要因であり、加齢に伴う心血管病変の予防のターゲットとして重要であると考えられる。