

審査の結果の要旨

氏名 城 愛理

本研究は、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、糖化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ものであり、以下の結果を得ている。

1. 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、脂質代謝は、若年群(13週齢)と加齢群(48週齢)ともに、野生型ラット(WT)と GLO-1 高発現ラット(GLO-1 Tg) の間で差はなかった。
2. 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。大動脈の GLO-1 活性は、若年群・加齢群ともに GLO-1 Tg は WT の約 2 倍であった。
3. 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。
4. 加齢による内皮機能の変化と GLO-1 高発現による影響を見るため、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-1 Tg 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-1 Tg では加齢 WT に比べ有意に高く保たれていた。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。これらの結果より、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、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。
5. GLO-1 による加齢に伴う内皮機能低下の軽減の機序を明らかにするため、産生された NO の消去について大動脈の酸化ストレスの評価、eNOS による NO 産生について 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による NO 消去の評価として、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。大

動脈 nitrotyrosine レベルは加齢 WT と GLO-1 Tg で同程度であり、酸化ストレスの程度に差はないと考えられた。

6. 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。
7. 最後に eNOS の活性化状態の評価のため、eNOS の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、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を明らかにした。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を示唆した。本研究は、糖化が血管老化の重要な要因であることを示し、糖化抑制の加齢に伴う心血管病変の予防ターゲットとしての応用に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。