The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Anti-Apoptotic Effect of Human Telomerase Reverse Transcriptase on Endothelial Cells under Oxidative Stress, Independent of Telomere Elongation and Telomerase Activity
Author(s)	木田, 岩男
Citation	大阪大学, 2013, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/34256
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

[Format-P02R]

論　文　内　容　の　要　旨
Synopsis of Thesis

〔論文題名：Thesis Title〕 Anti-Apoptotic Effect of Human Telomerase Reverse Transcriptase on Endothelial Cells under Oxidative Stress, Independent of Telomere Elongation and Telomerase Activity

（酸化ストレス下の内皮細胞におけるテロメア伸長及びテロメラーゼ活性とは独立したテロメラーゼ逆転写酵素の抗アポトーシス作用）

学位申請者 Name ： 木田　岩男

〔目　的(Purpose)〕

細胞分裂に伴う血管内皮細胞のテロメア長短縮は、内皮機能障害と関係しており、ひいては動脈硬化を引き起こす原因になると考えられている。また、血管内皮細胞には弱いながらもテロメラーゼ活性が存在しており、これがテロメア長の短縮を抑制していることが知られている。さらに、血管内皮細胞に対するテロメラーゼ逆転写酵素（hTERT）遺伝子導入はテロメラーゼ活性を亢進させ、酸化ストレスによって誘導されるアポトーシスを抑制することが報告されている。しかしながら、血管内皮細胞におけるhTERTの機能の詳細に関しては未だ不明な点が多い。そこで本研究では、血管内皮細胞にhTERTを過剰発現させると同時にテロメラーゼ活性を阻害することで、hTERTの有する抗アポトーシス作用について検討した。

〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕

［方法］　hTERTを高発現するプラスミドベクター（pEBc-hTERTn2）を作成し、初代培養ヒト臍帯静脈血管内皮細胞（HUVEC）に導入した。また同時に、テロメラーゼのサブコンポーネントの一つであるTEP-1に対するsiRNAを導入した。遺伝子導入後はテロメラーゼ活性を抑制するため培養液中にAZT（3'-azido-3'deoxythymidine）を添加し、24時間後にサザンブロッティングによるテロメア長の測定とSA-Gal染色による老化細胞数の定量を行った。また、遺伝子導入から24時間後にH_2O_2を添加し、その6時間後に、生細胞数の定量、Caspase-3活性の測定とフローサイトメトリーによるアポトーシス細胞数の定量、ウェスタンブロッティングによるp53、Bax及びBcl-xLの定量、NFκB活性の測定を行った。

［成績］　hTERTの過剰発現によって、H_2O_2刺激で誘導されるアポトーシスが抑制されることが、生細胞数の定量とフローサイトメトリーによって確認され、これはCaspase-3活性の有意な減少を伴っていた。その際、培養液中にAZTを添加することによってテロメア長や老化細胞数の有意な変化がみられなかったことから、hTERTの抗アポトーシス作用は、テロメア伸長を伴うテロメラーゼの酵素活性とは独立したものであることが示唆された。また、TEP-1の発現をsiRNAによってノックダウンしても同様の抗アポトーシス作用が認められたことから、hTERTの抗アポトーシス作用は酵素複合体であるテロメラーゼとしての機能ではないことが示唆された。さらに、hTERT過剰発現によって、p53/Baxの発現抑制と共にBcl-xLの発現亢進、NF-κBの活性化が確認された。

〔総　括(Conclusion)〕

本研究により、hTERTはテロメア伸長を伴うテロメラーゼ活性とは別に、それ自体が独立して酸化ストレス下にある血管内皮細胞の抗アポトーシス機能に関わっていることが明らかになった。また、hTERTの有するこの作用は、テロメラーゼのサブコンポーネントの一つであるTEP-1を必要としないことも明らかになった。さらに、血管内皮細胞におけるhTERTの有する抗アポトーシス作用は、p53/Baxの減少とNF-κBの活性化の２つの経路が関与していることが示唆された。

[Format-H07]

論文審査の結果の要旨及び担当者

（申請者氏名） 木田　岩男

		（職）	氏　名
論文審査担当者	主　査	大阪大学教授	桑木実実
	副　査	大阪大学教授	松村嘉忠
	副　査	大阪大学教授	下村伊一郎

論文審査の結果の要旨

血管内皮細胞に対するテロメラーゼ逆転写酵素（hTERT）遺伝子導入は、テロメラーゼ活性を亢進させ、酸化ストレスによって誘導されるアポトーシスを抑制することが報告されているが、血管内皮細胞におけるhTERTの機能の詳細に関しては未だ不明な点が多い。本研究では、hTERTはテロメア伸長を伴うテロメラーゼ活性とは別に、それ自体が独立して酸化ストレス下にある血管内皮細胞の抗アポトーシス機能に関わっていることが明になった。また、hTERTの有するこの作用は、テロメラーゼのサブコンポーネントの一つであるTEP-1を必要としないことも明らかになった。さらに、血管内皮細胞におけるhTERTの有する抗アポトーシス作用は、p53/Baxの減少とNF-κBの活性化の２つの経路が関与していることが示唆された。血管内皮細胞におけるhTERTの新たな機能を明らかにした本研究は、学位論文に値すると考えられる。