

Title	Upregulation of cAMP is a new functional signal pathway of Klotho in endothelial cells
Author(s)	楊, 進
Citation	大阪大学, 2003, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/43828">https://hdl.handle.net/11094/43828</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

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

Osaka University

氏名	楊 進
博士の専攻分野の名称	博士 (医学)
学位記番号	第 17616 号
学位授与年月日	平成 15 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学系研究科生体制御医学専攻
学位論文名	Upregulation of cAMP is a new functional signal pathway of Klotho in endothelial cells (内皮細胞での Klotho 蛋白による細胞内 cAMP 亢進は、新規の機能性情報伝達系である)
論文審査委員	(主査) 教授 荻原 俊男 (副査) 教授 谷口 直之 教授 高井 義美

#### 論文内容の要旨

##### 〔目的〕

klotho 遺伝子変異マウスは動脈硬化や骨粗鬆症、肺気腫など、ヒトの老化に類似した病態が促進されるモデルである。動脈硬化と関連して、klotho 遺伝子変異マウスは早期から血管内皮細胞機能が障害されるが、野生型マウスとの併体結合による液性因子の相互循環により機能障害が改善することが知られ、その他の内皮機能障害モデルに対しても *in vivo* での klotho 遺伝子導入によって内皮機能が改善することも示されている。このように、Klotho 蛋白は液性因子として機能発現していることが示唆される。しかし、Klotho 蛋白の機能は、細胞内情報伝達を含め未だ解明されていない。一方、Klotho 蛋白は、膜型と alternative splicing による分泌型の存在が知られるが、それぞれの機能についても明らかにされていない。本研究では、Klotho 蛋白の発現系を構築し、内皮細胞機能のひとつであるアンジオテンシン変換酵素 (ACE) 発現への影響を見るとともに、その発現調節機構の検討から Klotho 蛋白の細胞内情報伝達機構の解明を目的とした。

##### 〔方法〕

マウス膜型 Klotho 蛋白の cDNA を pCAGGS のチキン  $\beta$ -アクチンプロモーターとラビット  $\beta$ -グロビンポリ A 付加シグナルの間に挿入し Klotho 発現ベクターを作成した。発現ベクターは、リポソーム法にて COS1 細胞に導入した。pCAGGS ベクターのみ導入した COS1 細胞をコントロールとした。COS1 細胞ならびにその培養上清への Klotho 蛋白の発現は、抗 Klotho モノクローナル抗体である KM2076 (協和発酵工業より分与) を用いて Western blot 法により解析した。

内皮細胞に対する Klotho 蛋白の作用を検討する目的で、klotho 遺伝子導入 COS1 細胞の培養上清を用いてヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) を培養する方法と、両者を double chamber で共培養する方法を検討した。それぞれの条件での HUVEC について、内皮細胞機能の一つである ACE 活性を測定し、その発現調節に最も関連の深い細胞内情報伝達因子として cAMP を測定した。cAMP 特異的作用であることの確認に、cAMP-dependent PKA 阻害剤 (Rp-cAMP) 存在下での実験もおこなった。

細胞ホモジネートの ACE 活性は hippuryl-His-Leu を人工基質として産生される His-Leu を蛍光分析法により測定

し、細胞蛋白量で補正した。cAMP は、市販キットにて非アセチル化法により測定した。一部の実験では、感度を向上させるために IBMX (phosphodiesterase 阻害薬) を前処理した。

〔成績〕

マウス膜型 Klotho 遺伝子を導入した COS1 細胞のホモジネートならびに培養上清において、KM2076 を用いた Western 解析により検出できる約 130 Kda のバンドが確認された。pCAGGS のみを導入したコントロールの細胞とその培養上清では、バンドは検出されなかった。この蛋白サイズは、マウス膜型 Klotho 蛋白にほぼ合致した。

COS1 細胞の培養上清を用いた実験ならびに共培養実験のいずれにおいても、HUVEC の ACE 活性は 1.9~2.1 倍に亢進した。培養上清を用いた実験では、コントロールの COS1 細胞由来の培養上清との各種割合での混合液を作り、Klotho 蛋白含有培養上清による ACE 活性亢進が用量依存的であることを確認した。この ACE 活性亢進は cAMP 依存性の PKA 阻害剤 (Rp-cAMP、10  $\mu$  mol/L) により基礎値のレベルまで抑制された。

HUVEC の cAMP 産生については、Klotho 蛋白を含有した培養上清による刺激により 10 分を最大値とする一過性の上昇を認めた。IBMX 存在下では、60 分まで徐々に cAMP 含量が増加した。コントロールの COS1 細胞由来の培養上清を用いた場合との比較で、klotho 遺伝子導入 COS1 細胞由来の培養上清刺激により約 2.35 倍の cAMP 産生亢進を認めた。共培養でも同程度の cAMP 産生亢進を認めた。

〔総括〕

培養細胞において膜型 Klotho 蛋白が、細胞だけでなく培養上清にも発現される系をはじめて確立した。培養上清中に分泌された蛋白も膜型に相当する 130 kDa の蛋白であった。また、Klotho 蛋白が HUVEC の ACE 活性亢進作用を有すること、その作用機序に、細胞内 cAMP 産生亢進が関与することを示した。以上より、Klotho 蛋白の細胞内情報伝達に、内皮細胞においては cAMP-PKA 依存性経路が存在する可能性をはじめて明らかにできた。

#### 論文審査の結果の要旨

Klotho 遺伝子変異マウスは老化促進を示し、内皮機能障害モデルに対する *in vivo* での klotho 遺伝子導入は内皮機能を改善することが報告されている。しかし、Klotho 蛋白の機能は細胞内情報伝達を含め未だ解明されていない。本研究では、Klotho 蛋白と内皮細胞機能の関係について、アンジオテンシン変換酵素 (ACE) 発現とその発現調節にかかわる cAMP 活性の点から検討した。

本研究では、培養細胞において膜型 Klotho 蛋白が、細胞だけでなく培養上清にも発現される系をはじめて確立した。培養上清中に分泌された蛋白も膜型に相当する 130 kDa の蛋白であった。Klotho 蛋白を発現する COS 細胞と内皮細胞の共培養や、その培養上清を用いて内皮細胞への影響を見た実験により、Klotho 蛋白は内皮細胞の ACE 活性を亢進させることが明らかとなった。また、その作用機序に、細胞内 cAMP 産生亢進が関与することが示された。以上より、Klotho 蛋白の細胞内情報伝達に、内皮細胞においては cAMP-PKA 依存性経路が存在することを始めて明らかにできた。

本研究は、Klotho 蛋白細胞内情報伝達機構を解明する上で重要な知見であり、今後の Klotho 研究への貢献は大きく、学位授与に値するものと考えられる。