The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Anti-apoptotic and anti-senescence effects of Klotho on vascular endothelial cells
Author(s)	生島, 雅士
Citation	大阪大学, 2006, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/46192
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、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

氏　　名　生島雅士（いくしま まさし）

博士の専攻分野の名称　博　士（医　学）

学位記番号　第　20091　号

学位授与年月日　平成18年3月24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　Anti-apoptotic and anti-senescence effects of Klotho on vascular endothelial cells
（血管内皮細胞におけるKlothoの抗アポトーシス作用と抗老化作用）

論文審査委員　（主査）
教　授　荻原　俊男

（副査）
教　授　堀　　正二　　教　授　辻本　賀英

論文内容の要旨

〔　目　　的　〕Klotho遺伝子欠損マウスは、動脈硬化を含め不妊や皮膚萎縮、骨粗鬆症、肺気腫、異所性石灰化など人間の老化に見られる多彩な表現形を呈し、Klotho蛋白高発現マウスはInsulin/IGF-1 signalを抑制することにより寿命の延長を呈することが報告されている。しかしながらKlotho遺伝子欠損マウスでの動脈硬化進展の機序は、現在のところ明らかにはされていない。動脈硬化進展には、血管内皮細胞のアポトーシスや老化が密接に関係しているとされることから、Klothoが動脈硬化進展に関連するか否かをヒト臍静脈血管内皮細胞（HUVEC）のアポトーシスと老化に対するKlotho蛋白の影響を観察することにより検討した。

〔　方法ならびに成績　〕pCAGGSベクターのEcoRIサイトに膜型klotho遺伝子を組み込み細胞内に導入することにより、細胞内でKlothoを過剰発現させた。Klotho蛋白はPCAGGS-klotho plasmidにHis-tagを挿入し、COS-1細胞で大量発現させた後、ニッケルカラムで吸着させることにより精製した。細胞に対し過酸化水素、エトポシドを用いてアポトーシスを誘導し、アポトーシスの頻度をフローサイトメトリーにて、caspase3,9の活性は発光法にて測定した。COS-1細胞においてklotho遺伝子導入はエトポシドによるアポトーシスを40%から18%、過酸化水素によるアポトーシスを35%から21%と有意に抑制した。次にJurkat細胞においてklothoの遺伝子導入とHis-Klotho精製蛋白の効果を検討したところ、過酸化水素によるアポトーシス誘導は遺伝子導入群で37%から21%へ、蛋白導入群で42%から28%へと同様に有意な抑制を認めた。そのためklotho蛋白は細胞内過剰発現と同様の効果を有し、細胞での抗アポトーシス作用を有することが示唆された。血管内皮細胞は動脈硬化の進展に重要な役割を果たしているためHUVECにおけるKlothoの効果を検討した。Klotho蛋白はエトポシドで惹起されるアポトーシスを37%から18%へと、過酸化水素で惹起されるアポトーシスを27%から18%へとそれぞれ有意に抑制した。Caspase3とCaspase9の活性もKlotho蛋白群で有意に低値であり、血管内皮細胞においてもアポトーシスをKlothoが抑制するという結果となった。

またHUVECにおいて、過酸化水素刺激によるprematureな細胞老化（senescence-associated β-galactosidase（SA-βgal）染色陽性）を誘導したところKlotho蛋白群でSA-βgal陽性細胞数が57%から39%へと有意に抑制さ

れており、細胞老化に関与すると報告されている p53、p21 の発現は klotho 蛋白群で低値であった。

〔 総　　括 〕血管内皮細胞において Klotho は抗アポトーシス、抗老化作用を呈することを明らかにした。Klotho が insulin シグナル抑制を介して、酸化ストレスを抑制することが近年報告されており、本研究での過酸化水素によるアポトーシス抑制もこの経路で抑制されていると考えられる。また Klotho がエトポシドによるアポトーシスを抑制したことより、Klotho はインスリン経路の抑制以外の系を介してアポトーシスを抑制する可能性が考えられた。内皮細胞では、Akt の活性化が老化を促進することが報告されており、Klotho による内皮細胞の老化抑制の機序として insulin シグナルの下流にある Akt の活性化を klotho が抑制することが示唆される。更に細胞老化に関わるとされる p53、p21 も関与していると考えられた。以上の結果から Klotho 遺伝子欠損マウスで見られる動脈硬化の機序の一つとして内皮細胞での caspase3,9 の活性化や p53、p21 の発現亢進に対する抑制系としての Klotho の作用が消失していることがアポトーシスを誘導しやすくしている可能性が示された。

論文審査の結果の要旨

Klotho 遺伝子欠損マウスは、動脈硬化を含め、骨粗鬆症、肺気腫など人間の老化に見られる多彩な表現形を呈し、Klotho 蛋白高発現マウスは Insulin シグナルを抑制することにより寿命延長を呈することが報告されている。また、動脈硬化進展には、血管内皮細胞のアポトーシスや老化が密接に関係しているとされることから、本論文では血管内皮細胞のアポトーシスと老化に対する Klotho 蛋白の影響を観察することにより検討している。今回の論文において Klotho が抗アポトーシス効果を有し、動脈硬化の重要な舞台である血管内皮細胞で抗アポトーシス作用、抗老化作用を呈することを明らかにした。この研究により klotho が動脈硬化の抑制薬として、更に抗老化薬として応用できる可能性が考えられる。その点においても当論文は今後の老化制御、高血圧や生活習慣病に対する戦略の一つの可能性を提示するものであり学位の授与に値すると考えられる。