OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Forkhead reduces the production of oxidative stress in endothelial cells
Author(s)	門田, 真紀
Citation	大阪大学, 2006, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/46369
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	門田（椿本）真紀（もんた つばきもと まき）
博士の専攻分野の名称	博士（医学）
学位記番号	第 19923 号
学位授与年月日	平成18年2月20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	Forkhead reduces the production of oxidative stress in endothelial cells （Forkheadは内皮細胞の酸化ストレス産生を抑制する）
論文審査委員	（主査） 教授 荻原 俊男 （副査） 教授 谷口 直之　教授 下村伊一郎

論文内容の要旨

〔目的〕

酸素は好気性生物にとって必要不可欠なものであるが、一方でその還元反応の副産物としてスーパーオキシド（O_2^-）、過酸化水素（H_2O_2）、ヒドロキシラジカル（OH^-）などさまざまな活性酸素種を生じさせる。これらの活性酸素による生体への酸化ストレスは高血圧・2型糖尿病・アルツハイマー病・癌など様々な病態を引き起こし、その他循環器系の病態形成へも深く関わっている。また動脈硬化危険因子である高脂血症、高血圧、喫煙、糖尿病が存在する状況では体内で酸化ストレスが増大しており、血管内皮細胞が障害され動脈硬化に進展する。一方生体内にはスーパーオキシドジスムターゼ（SOD）、グルタチオンペルオキシダーゼ、カタラーゼ、ペルオキシレドキシンといった抗酸化酵素ならびにビタミンEやグルタチオンのようなといった低分子の抗酸化物質が存在し活性酸素を消去するのに役立っている。

Forkheadはアポトーシスの転写因子であるが、近年酸化ストレスへの耐性を誘導することや老化もしくは寿命をコントロールする研究が報告されている。今回われわれは、高グルコース・高インスリン血症の病態でのForkhead転写因子発現の検討を行い、またForkhead転写因子の抗酸化作用を同因子のisoformの中でも血管内皮に多く存在するFOXO3aを用いて検討した。

〔方法ならびに成績〕

ヒト臍帯静脈内皮細胞を通常培養条件でサブコンフルエントの状態まで培養し以下の実験を行った。

通常条件で培養した細胞を無血清培養培地へ交換し12時間後に50 ng/ml VEGFを添加した。無血清培養によりp-Akt、不活性型であるp-FOXO3aの発現は低下、MnSODの発現は増強したが、VEGF添加にてp-Akt, p-FOXO3aは回復を認めた。したがってMnSODの発現は活性型FOXO3aにより増強する可能性が考えられる。

高グルコースや高インスリン血症のFOXO3aやカタラーゼへの関与を検討するため33 mMグルコース、20 nMインスリンを添加した。添加後30分で高インスリン、高インスリン＋高グルコースの条件ではp-FOXO3aの発現は増加したが、24時間後には高インスリンでは低下、高インスリン＋高グルコースでは増加したままでありさらにカタラ

ーゼの発現が低下した。この結果は高インスリン＋高グルコースの状態では高インスリンだけの状態よりも不活性型FOXO3aが増加し、カタラーゼの発現低下が維持されることを示している。

Forkheadによる内皮細胞のMnSOD発現制御を確認するためForkhead遺伝子を組み込んだアデノウイルスを用いてForkheadの発現を増強させ、MnSODの発現量をウエスタンブロッティング法にて確認した。恒常的活性型であるAd-TM-FOXO3aの感染させた細胞ではコントロール細胞と比較してMnSODの発現は2倍以上増強されていた。また、Ad-WT-FOXO3aに関してはMOI数依存性にMnSODの発現は増加した。このことから活性型FOXO3aはMnSODの発現を増強させることが示唆される。

Forkheadによる抗酸化作用を確認するために細胞内peroxidesの測定と細胞のDihydroethidiumによる染色を行った。Angiotensin IIとH2O2による酸化ストレスは恒常的活性型であるTM-FOXO3aの発現により抑制された。この結果は活性型FOXO3aにより酸化ストレスが減少することを示している。

〔総括〕

インスリン抵抗性を反映する高グルコース・高インスリン条件での培養内皮細胞では、不活性型のFOXO3aの増加が維持され、活性酸素を消去する酵素の低下によって活性酸素が増強される可能性を示している。また活性型Forkheadは内皮を酸化ストレスから保護することが考えられる。

論文審査の結果の要旨

Forkhead転写因子（ヒトではFOXOタンパク）は細胞寿命・抗酸化機構・細胞増殖・細胞死・代謝を制御するタンパクとして近年様々な報告が相次いでいるが、血管内皮細胞における作用についてはまだ不明な点が多い。本研究では血管内皮細胞におけるForkhead転写因子のアイソフォームFOXO3aと高インスリン・高グルコースによる酸化ストレス産生の関係を検討したものである。また、アデノウイルスを用いた実験系により、FOXO3a過剰発現血管内皮細胞におけるMnSODの発現、細胞内peroxides、細胞内酸化ストレスについての解析を加えている。血管内皮細胞においてFOXO3aが活性化されるとカタラーゼ、MnSODのタンパク発現量は増加し、高グルコースはインスリン刺激によるFOXO3aのリン酸化を介した不活化を増強し、カタラーゼの発現を抑制した。アデノウイルスによるFOXO3a遺伝子の導入によって内皮細胞のMnSODのタンパク発現量が増加し、Angiotensin IIによる細胞内酸化ストレスの産生が抑制された。以上の結果より高インスリン、高グルコース状態の病態でFOXO3aを介して酸化ストレスが増大することを示唆するものである。本研究は動脈硬化の成因である内皮細胞障害に転写因子FOXO3aが関与することを明らかにしたものであり学位に値すると考える。