The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Apoptosis signal-regulating kinase 1 mediates cellular senescence induced by high glucose in endothelial cells
Author(s)	横井, 豊彦
Citation	大阪大学, 2006, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/47423
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

【５】

氏　　名	横　井　豊　彦（よこい とよひこ）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学　位　記　番　号	第　２０５８１　号
学 位 授 与 年 月 日	平成 18 年 4 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	Apoptosis signal-regulating kinase 1 mediates cellular senescence induced by high glucose in endothelial cells （内皮細胞において ASK1 は高血糖による細胞老化を仲介する）
論 文 審 査 委 員	（主査） 教　授　荻原　俊男 （副査） 教　授　祖父江憲治　　教　授　堀　　正二

論 文 内 容 の 要 旨

〔　目　　的　〕

糖尿病患者では老化が促進されることが知られているが、そのメカニズムは明らかでない。また加齢は動脈硬化の危険因子であり、心血管系疾患の発症は加齢とともに増加する。これまでに、動脈硬化巣における内皮細胞の老化が Senescence associated b-galactosidase（SA-β-gal）やテロメアの短縮などで示されてきた。しかし、高血糖条件下での血管内皮細胞の老化の分子生物学的機序は未だ不明な点も多い。

一方、MAPKinase 系の上流に存在し c-Jun NH2-terminal kinase（JNK）や p38 を活性化する、Apoptosis signal-regulating kinase 1（ASK1）は、ミトコンドリアにも局在し、MAPkinase 系の活性化以外の刺激でも cytochrome C の放出を促進する。またミトコンドリアは糖尿病や細胞老化においては要となっていることも報告されている。

そこで本研究では、高血糖条件下の培養内皮細胞、糖尿病誘導動物モデルを用い、内皮細胞老化における ASK1 の制御機構について検討を行った。

〔　方　　法　〕

培養内皮細胞：Human umbilical vein endothelial cell（HUVEC）を EBM-2（三光純薬）で培養、33mM のグルコースで刺激し、ウェスタンブロット法により経時的な Phospho-ASK1（活性型）、ASK1、PAI-1 の蛋白解析を行った。また下記に示すアデノウイルスベクターも用い、SA-b-gal 染色法で老化の確認、及び培養上清中の PAI-1 濃度の測定は ELISA 法にて行った。

糖尿病動物モデル：野生型マウス（C57BL/6）、ASK1 ノックアウトマウスを用いた。糖尿病誘導は streptozotocin（STZ：60 mg/kg）を腹腔内注射し、3 日後の血糖値＞30 mmol/L を基準とした。1 週間後に大動脈を切離し、SA-b-gal 染色による老化の確認を行った。また ELISA 法にて血中 PAI-1 濃度を測定した。

アデノウイルスベクター：constitutively active form of *ASK1* gene (CA-ASK1) and a dominant negative form of *ASK1* gene (DN-ASK1:mutant Lys 709 to Met)

〔結果〕

33mM グルコースで HUVEC を刺激したところ、ウエスタンブロット法では経時的に ASK1 蛋白の発現の亢進を認めた。（同浸透圧濃度のマンニトールでは亢進は認められなかった）また ASK1 の活性を反映する Phospho-ASK1 抗体を用いて検討したところ同様に活性の亢進が認められた。SA-b-gal 染色による検討では、33 mM グルコース刺激、或いはアデノウイルスベクターを用い CA-ASK1 を導入したところ老化が誘導され（同浸透圧濃度のマンニトールでは亢進は認められなかった）、DN-ASK1 を導入すると 33 mM グルコース刺激を加えても老化の誘導は減少した。次にマウス大動脈を用い SA-b-gal 染色による検討を行ったところ、糖尿病誘導野生型マウスでは大動脈内皮での老化が認められたのに対し、糖尿病誘導 ASK1 ノックアウトマウスでは認められなかった。

PAI-1 に関する検討では、アデノウイルスベクターを用い 33 mM グルコース刺激、或いは CA-ASK1 の導入により PAI-1 の蛋白発現が亢進し培養上清中の濃度は増加を認めたが、DN-ASK1 を導入すると 33 mM グルコース刺激を加えても老化の誘導は減少した。次にマウス糖尿病モデルを用いた検討を行ったところ、糖尿病誘導野生型マウスでは血中 PAI-1 濃度の増加が認められたのに対し、糖尿病誘導 ASK1 ノックアウトマウスでは認められなかった。

〔 総　　括 〕

ASK1 は培養内皮細胞において、高濃度グルコース刺激などにより活性が亢進した場合には PAI-1 の発現と老化を亢進させていた。また糖尿病誘導野生型マウスでは認められた血中 PAI-1 濃度上昇や大動脈内皮の老化が、ASK1 ノックアウトマウスを用いた検討では抑制された。これらの点から、糖尿病の血管合併症において ASK1 が重要な役割を果たしており、今後治療ターゲットとなりえる可能性が示唆された。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

糖尿病患者では老化が促進されることが知られているが、そのメカニズムは明らかでない。また加齢は動脈硬化の危険因子であり、心血管系疾患の発症は加齢とともに増加する。しかし、高血糖条件下での血管内皮細胞の老化の分子生物学的機序は未だ不明である。Apoptosis signal-regulating kinase 1（ASK1）は、ミトコンドリアにも局在し MAPkinase 系の活性化以外の刺激でも cytochrome C の放出を促進する。またミトコンドリアは糖尿病や細胞老化においては要となっていることも報告されている。本研究では内皮細胞老化における ASK1 の制御機構について検討を行った。高濃度グルコース刺激により、内皮細胞の ASK1 の活性は亢進し、PAI-1 の分泌、SA-b-gal 染色により老化が認められた。アデノウイルスベクターを用い CA-ASK1 を導入したところそれらは亢進し、DN-ASK1 を導入すると抑制された。マウス大動脈での SA-b-gal 染色による検討では糖尿病誘導野生型マウスでは大動脈内皮での老化が認められ、血中 PAI-1 濃度の増加が認められたのに対し、糖尿病誘導 ASK1 ノックアウトマウス（KO）では認められなかった。ASK1 は内皮細胞において高濃度グルコース刺激により活性亢進すると、PAI-1 の発現と老化を促進させており、KO では抑制された。この検討により、糖尿病の血管合併症において ASK1 が重要な役割を果たしていることが示された。本研究は糖尿病の血管合併症の機序を解明する上で重要な報告であり、学位授与に値するものである。