



Title	Klotho Suppresses TNF- α -Induced Expression of Adhesion Molecules in the Endothelium and Attenuates NF- κ B Activation
Author(s)	前川, 佳敬
Citation	大阪大学, 2009, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/54161
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

【1】

氏名	前川 佳敬
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 23263 号
学位授与年月日	平成21年4月16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	Klotho Suppresses TNF- α -Induced Expression of Adhesion Molecules in the Endothelium and Attenuates NF- κ B Activation (クロトーは血管内皮細胞においてTNF- α によって誘導された接着因子の発現を抑制しNF- κ Bの活性を減弱する)
論文審査委員	(主査) 教授 楽木 宏実 (副査) 教授 祖父江憲治 教授 森下 竜一

論文内容の要旨

〔目的〕

老化抑制蛋白であるクロトーはマウスで遺伝子過剰発現をさせると寿命が延長し、変異マウスの血管において動脈硬化や内皮機能異常を呈する。また既報によると、クロトー蛋白が酸化ストレスに対して内皮細胞の保護効果を示してアポトーシスや細胞老化を抑制する事が明らかとなっている。本研究では、内皮細胞におけるクロトー蛋白の血管炎症、特に接着因子の発現に対する効果を明らかにする目的で、血管内皮細胞と単球系細胞を用いた培養細胞実験を行った。

〔方法ならびに成績〕

クロトー蛋白はマウスのクロトーcDNAを発現ベクターに組み込んでCOS-1細胞に導入し、産生されたクロトー蛋白をHISタグ抗体を用いて回収した。

クロトー蛋白の内皮細胞における細胞接着因子発現調節に対する影響を観察するために、組織壊死因子(TNF- α 、10pg/ μ l)刺激下ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)の細胞内接着因子(ICAM-1)及び血管細胞接着因子(VCAM-1)のmRNA量をRT-PCR法で、蛋白量をウエスタンプロット法で測定して、クロトー蛋白(200pM)前処置の有無により比較検討した。ICAM-1及びVCAM-1のmRNAおよび蛋白量は、TNF- α 刺激によって強い発現亢進が認められたが、クロトー蛋白前処置により発現が有意に抑制された。さらにルシフェレースアッセイによってICAM-1及びVCAM-1の転写因子で

あるNF- κ Bの活性を測定した。その結果TNF- α 刺激によって惹起されたNF- κ Bの活性亢進をクロトー蛋白は50%程度の活性亢進に抑制した。またNF- κ Bの活性を亢進させるI κ Bリン酸化もTNF- α 刺激によって亢進しクロトー前処置によって抑制された。これらの接着因子発現やNF- κ B活性のクロトー蛋白付加による抑制の一因として、一酸化窒素(NO)の関与の可能性を考えてeNOSのリン酸化をウエスタンプロット法で測定した。その結果TNF- α 刺激によってeNOSのリン酸化は減弱したが、クロトー蛋白前処置によりeNOSリン酸化の減弱は消失した。

次に、接着因子発現による単球の内皮細胞への接着に対する影響を観察する目的で、FITCで標識されたヒトの単球細胞(THP-1)とHUVECを用いて蛍光測定法により細胞接着を測定した。THP-1のHUVECへの接着率は、TNF- α 刺激で約3倍亢進したが、クロトー蛋白によりこの接着亢進は有意に抑制された。

さらに、Sprague-Dawleyラットの腹部大動脈を摘出後直ちにTNF- α 含有培養液で4時間インキュベーションしICAM-1及びVCAM-1の発現に対するクロトー蛋白前処理の影響を組織学的手法で検討した。抗ICAM-1抗体および抗VCAM-1抗体および内皮細胞マーカーとしてF8抗体を用い大動脈切片を作成して免疫染色を行った。TNF- α のみの培養液ではF8抗体陽性内皮細胞にICAM-1とVCAM-1の強発現が認められたがクロトー蛋白を前処置するとICAM-1とVCAM-1共に発現の減弱が認められた。

〔総括〕

動脈硬化進展には血管の炎症が一つの要因であることが近年重要視されている。本研究では、合成クロトー蛋白が血管内皮細胞において、TNF- α 刺激により亢進したICAM-1発現、VCAM-1発現、NF- κ B活性化、I κ Bリン酸化を抑制することを明らかにした。また、クロトー蛋白は、TNF- α 刺激によるeNOSリン酸化阻害も抑制したが、これは、クロトー変異マウスで認められる内皮機能障害やNO産生低下に、クロトーの直接作用だけでなく炎症に関連した系の抑制も関与していることを示す。さらにクロトー蛋白の接着因子発現抑制効果は、培養細胞のみならずラット大動脈の切片を用いた組織学的検討でも認められ、実際に単球細胞と血管内皮細胞の接着抑制に関与することも明らかとした。

以上、本研究では、合成クロトー蛋白が血管内皮細胞において接着因子やNF- κ B、eNOSの系を介して抗炎症に働くことを示したが、いずれもクロトー過剰発現による成績であり、生理的にも同様な役割を果たしているかについては今後の検討を要する。

論文審査の結果の要旨

老化関連蛋白として発見されたクロトートーは、内皮細胞においてアボトーシスや細胞老化に対する抑制作用を有することが知られる。本研究は、さらにクロトートーの血管炎症、特に接着因子の発現に対する影響を明らかにすることを目的としたものである。ヒト臍帯静脈由来内皮細胞において、TNF- α 刺激により亢進したICAM-1発現、VCAM-1発現、NF- κ B活性、I κ Bリン酸化、ならびに阻害されたeNOSリン酸化を精製クロトートー蛋白が抑制した。クロトートーの接着因子発現抑制効果は、ラット大動脈の切片を用いた組織学的検討でも確認された。更にTNF- α 刺激による単球細胞と血管内皮細胞の接着をクロトートーは抑制した。以上のことから、クロトートーは血管内皮細胞において、接着因子やNF- κ B、NOの系を介した抗炎症作用を有すると考えられる。本研究は、クロトートーの血管に対する新しい機能とその経路を明らかにしたものであり、学位の授与に値すると考える。