

論文内容の要旨

論文提出者氏名 本田 早潔子

論文題目

Cellular senescence promotes endothelial activation through epigenetic alteration, and consequently accelerates atherosclerosis.

論文内容の要旨

血管の老化と動脈硬化などの老化関連疾患は密接に関わっていると考えられているが、その直接的な関連を示した報告はほとんどない。また血管内皮細胞の老化が動脈硬化の進展にどのような役割を果たすのか、そしてそのメカニズムについてはほとんど解明されていない。本研究の目的は、動脈硬化の進展における血管内皮細胞老化の役割の解明である。

テロメア保護タンパクである TERC2 の dominant negative 変異体 (TERC2-DN) を過剰発現させると血管内皮細胞の premature senescence が誘導される。そこで Tie-2 promoter 制御下に TERC2-DN を過剰発現させ、血管内皮細胞が特異的に老化するマウスを作成した。このマウスから単離した肺や白色脂肪組織の血管内皮細胞では、老化関連 β ガラクトシダーゼ活性や老化関連遺伝子の発現が上昇しており、血管内皮細胞特異的に細胞老化が誘導されていることを確認した。このマウスを動脈硬化モデルマウスである ApoE-KO マウスと交配し、ApoE-KO/TERC2DN-Tg マウスを作成した。2 週間の高コレステロール食負荷を行った後に、enface で大動脈の動脈硬化を検討したところ、ApoE-KO/TERC2DN-Tg マウスでは ApoE-KO マウスに比べて動脈硬化性プラークが有意に増大していた。

造血細胞の老化の影響を否定するために、造血細胞ではほとんど発現していない血管内皮カドヘリン (VEcad) プロモーターを用いて異なる血管内皮特異的老化マウスを作成した。続いて ApoE-KO/VEcad-TERC2DN-Tg マウスを作成し、2 週間の高コレステロール食負荷を行った。その結果、ApoE-KO/Tie2-TERC2DN-Tg マウスと同様に動脈硬化の進展を認めた。

老化した血管内皮細胞が動脈硬化を進展させるメカニズムを調べるために、ヒト培養血管内皮細胞を用いて replicative senescence を起こした老化血管内皮細胞を作成した。動脈硬化の最初に発生するイベントは接着因子である VCAM-1 を介して誘導される血管内皮細胞への単球の接着である。そこで、若年および老化血管内皮細胞における VCAM-1 の発現を検討した。TNF- α と LPS を用いて比較的弱い炎症刺激を加えたところ、老化血管内皮細胞では若い内皮細胞に比べて著しい VCAM-1 発現の誘導が観察された。更に THP-1 ヒト単球細胞を用いて血管内皮細胞への単球接着を検討した結果、TNF- α 刺激後の単球接着が老化血管内皮細胞で有意に上昇していることが分かった。これら結果から、老化した血管内皮細胞は炎症刺激に対して過敏となっており、容易に VCAM-1 の発現が誘導される結果、単球の接着が亢進すると考えられた。

NO が動脈硬化の進展に深く関与していることや、老化した血管内皮細胞では NO の産生が障害されていることが報告されている。そこで、老化血管内皮細胞における炎症性の亢進

に NO が関与しているかを検討した。NO 産生酵素阻害薬である L-NAME を加えても炎症刺激による VCAM-1 発現誘導の亢進はほとんど変化せず、NO は血管内皮細胞の老化による易炎症性に関与しないと考えられた。また THP-1 の接着に関しても同様の結果であった。

NF- κ B は炎症刺激に応じて活性化され、IL-6 や TNF- α 、VCAM-1 などの発現を誘導する転写因子として働くタンパク複合体であるが、各種刺激による受容体からのシグナルで核内へ移行しこれらの遺伝子発現を誘導している。そこで老化血管内皮細胞の易炎症性のメカニズムに、NF- κ B のシグナル伝達が重要な役割を果たすのではないかと考えた。NF- κ B 阻害薬であるヘレナリンを用いて接着因子の発現誘導を検討したところ、老化血管内皮細胞における炎症性 VCAM-1 発現誘導の亢進は完全にキャンセルされた。これより、老化血管内皮細胞の易炎症性には NF- κ B シグナルの亢進が重要であると考えられた。次に、炎症刺激による NF- κ B の核内移行を検討したが、若い細胞と老化血管内皮細胞の間に有意な差は認めなかった。また核抽出物中の NF- κ B-p65 の核内蓄積をウェスタンブロット法で検討したが、同様に有意な差を認めなかった。また、炎症刺激による NF- κ B の活性化にも差を認めなかった。そこで、クロマチン免疫沈降アッセイを用いて NF- κ B の VCAM-1 プロモーターへのアクセスについて評価を行った。その結果、NF- κ B の VCAM-1 プロモーター領域への結合が老化血管内皮細胞で著明に上昇していた。NF- κ B の核内移行に差がないことから、NF- κ B の VCAM-1 プロモーター領域への結合増大にはエピジェネティックな変化が関与していると考えられた。クロマチンの閉鎖状態は標的遺伝子の転写因子への結合に重要な役割を果たしており、ヒストンのメチル化がその主要な調節因子の一つである。H3K4me3 はクロマチンの開放に、H3K27me3 は閉鎖に関連しているが、VCAM-1 遺伝子とそれぞれの関連を調べたところ、老化血管内皮細胞では H3K4me3 と VCAM-1 遺伝子の関連が顕著に増強しており、これら結果から老化血管内皮細胞では VCAM-1 プロモーター領域のクロマチンが解放状態となることで、NF- κ B がよりアクセスしやすくなっていると考えられた。

また動脈硬化の進展における老化血管内皮細胞の役割を調べるため、マウスに 8 週間の高コレステロール食負荷を行い、動脈硬化病変の更なる評価を行った。ApoE-KO/TERC2DN-Tg マウスではプラークエリアの増大を認めるだけでなく、プラークへのマクロファージ浸潤も増加していることがわかった。さらに ApoE-KO/TERC2DN-Tg ではプラーク内の壊死性コアも増大していた。これらの結果は、血管内皮細胞の老化が初期段階から動脈硬化を加速させ、動脈硬化が進行した段階ではプラーク特性に影響を与えることを示唆している。動脈硬化初期段階のプラーク表面の内皮細胞における VCAM-1 の発現を分析した結果、2 週間の高コレステロール食負荷後の ApoE-KO/TERC2DN-Tg マウスで VCAM-1 の発現増強を認めた。これらから、血管内皮細胞老化では炎症性が亢進する結果、VCAM-1 の発現誘導が増強され、単球接着・マクロファージの動員が促進され動脈硬化が進展すると考えられた。

今回の研究成果から、血管内皮細胞の老化は高齢者における動脈硬化病変の予防および治療に対する有望な治療標的であると考えられた。