

氏名	かみの ひろき 加美野 宏樹
学位の種類	博士 (生命科学)
学位記番号	甲第39号
学位授与年月日	平成16年 3月16日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	Searching for genes involved in arteriosclerosis: proteomic analysis of cultured human umbilical vein endothelial cells undergoing replicative senescence (動脈硬化症に関与する遺伝子の検索：培養ヒト血管内 皮細胞の老化に伴い変化する蛋白の解析)
学位論文審査委員	(主査) 佐藤 建三 (副査) 箸本 英吉 押村 光雄

学位論文の内容の要旨

生体内において、血管内皮細胞の老化は細胞が持つ生理機能の低下・障害につながり、動脈硬化の要因、ひいては心筋梗塞、脳血管障害などの疾患の要因となりうる。これまでに血管内皮細胞の老化に伴い発現に変化を示す遺伝子の存在が示唆されてきたが、その詳細なメカニズムは明らかにされていない。本研究では、ディファレンシャルスクリーニングの方法として近年広まりつつあるプロテオーム解析を基としたアプローチを利用し、血管内皮細胞老化に関わる蛋白質と、細胞老化が関与していると考えられている動脈硬化に関わる蛋白質の網羅的探索を行った。

方法

ヒト臍帯静脈内皮細胞 (human umbilical vein endothelial cell: HUVEC) を長期継代培養し、PD (Population Doubling: 細胞倍加数) を計算した。継代初期細胞 (Early passage cells, 5PD)、増殖を停止し肥大化・扁平化を示した細胞寿命直前の細胞 (Late passage cells, 45PD) から蛋白質を抽出し、それぞれについて二次元電気泳動を行った。比較検討ののち、発現量に差異のある Spot を検出し、質量分析装置を用いてその蛋白質を同定した。そのうち cathepsin B と gp96 について、特異的抗体を用いてウェスタンブロットを行い、二次元電気泳動で得られた結果の再現性を検討した。また RNA レベルでの差異についても半定量 PCR 法を用いて検討した。また血管内皮細胞と他の細胞との差を見るため、同様の実験をヒト線維芽細胞で行った。

結果

ヒト血管内皮細胞を長期継代培養し、Early passage と Late passage の細胞を得た。回収した蛋白質を二次元電気泳動により泳動し、それぞれ約 1000 個の spot を分離した。そのうち発現量に差異のある 8 個の spot を検出し、5 個は Early passage で、3 個は Late passage で発現の上昇を認めた。一方、ヒト線維芽細胞を用いて同様の実験を行ったところ、差異は検出されなかった。これら 8 個の

蛋白質を同定したところ、細胞骨格に関与する蛋白質（vimentin, cytokeratin 8, Rho GDP dissociation inhibitor beta）、蛋白合成に関与する蛋白質（prolyl 4-hydroxylase alpha 1, alpha 2a）、分子シャペロン（gp96）、代謝や蛋白の分解に関わる蛋白質（HLA-B associated transcript-1, lysosomal proteinase cathepsin B）であることが明らかとなった。このうち cathepsin B 及び gp96 特異的抗体を用いてウェスタンブロット解析を行ったところ、cathepsin B は Late passage で高発現、gp96 は Early passage で高発現を示し、二次元電気泳動と同様の結果を得た。一方で RT-PCR により RNA レベルの発現量を調べたところ、顕著な差異は検出されなかった。

考 察

血管内皮細胞は加齢とともに機械的・免疫学的刺激・高血圧・高脂血症などの様々な刺激に暴露される。慢性的刺激の加わる血管部位では、障害により失われた内皮細胞周囲の血管内膜が露呈しないように細胞分裂が繰り返され、ついには血管内皮細胞の老化を引き起こす。そして細胞老化による内皮細胞障害が動脈硬化症発症の契機となると考えられている。今回我々は、プロテオーム解析を基盤としたディファレンシャルスクリーニングを行うことにより、ヒト血管内皮細胞老化とともに発現量に変化する蛋白質の同定に成功した。同じ蛋白質の発現変化がヒト線維芽細胞では見られなかったことから、今回検出された変化は血管内皮細胞の老化特異的であることが示唆された。Cathepsin B 及び gp96 については、ウェスタンブロットでも再現性が得られたことから、細胞内での発現量変化が確かなものであることが確認された。しかしながら RNA レベルでは発現量に顕著な差が認められないことから、この変化は転写後調節による現象であることが示唆された。近年 cathepsin B については動脈硬化モデルマウスの病変部位で発現の上昇が報告されている。また一方で、ヒトの動脈硬化病変部位において細胞老化特異的マーカーの高発現が報告されており、これらのことは cathepsin B と動脈硬化、そして細胞老化との関連性を示唆している。今回、老化した血管内皮細胞からこの蛋白質の高発現を認めたことより、培養系においても生体内と同じような老化現象を反映できる可能性が示唆されたと同時に動脈硬化に関与する遺伝子のスクリーニングという目的にも応用できたと考えられる。今回検出された他の蛋白質も、血管内皮細胞特異的の老化マーカーとしての利用や細胞老化により引き起こされる血管関連疾患への関与の可能性が考えられ、今後の研究による進展が期待される。

結 論

二次元電気泳動法を用いて、ヒト血管内皮細胞の老化に伴い発現量に変化の見られる蛋白質のスクリーニングを行ったところ、8 個の蛋白質を同定した。このうち cathepsin B は動脈硬化や細胞老化との関連性が示唆されており、培養系での細胞老化が生体内モデルとして使える可能性を示唆した。同時に二次元電気泳動を用いたディファレンシャルスクリーニングの有用性が示され、今後様々な方面での研究に応用されることが期待される。

論文審査の結果の要旨

本研究はプロテオーム解析を基盤として、ヒト血管内皮細胞の老化に伴い発現に差が見られる蛋白質の同定を目的としたものである。血管内皮細胞を継代培養し、early passage と late passage で比較した結果、前者で発現が高い蛋白質 5 個、後者で発現が高い蛋白質 3 個を同定した。これらの蛋白

質はヒト線維芽細胞の老化に伴っては変化しないことが確認され、今回得られた発現変化が血管内皮細胞特異的であることが判明した。また一部の蛋白質は **western blot** によって発現差の再現性が得られており、一方で **RT-PCR** の結果より **mRNA** の発現量に顕著な差が見られないことが明らかになった。カテプシンBに関しては、これまで動脈硬化や血管内皮細胞老化との関連性が示唆されており、本論文で同定された蛋白質は血管内皮細胞老化特異的分子マーカーとして有用である可能性を示唆するものである。血管内皮細胞の老化は動脈硬化を始め、血管関連疾患の原因として重要と考えられており、今回得られた結果は培養ヒト血管内皮細胞を生体内モデルとして利用できたと考えられ、明らかに学術水準を高めたものと認める。