

小泉雅之より学位申請のため提出した論文の要旨

学位番号甲第 508 号

学位申請者 : 小 泉 雅 之

主 論 文 : Aryl hydrocarbon receptor mediates indoxyl sulfate-induced cellular senescence in human umbilical vein endothelial cells

(ヒト臍帯静脈内皮細胞においてアリル炭化水素受容体はインドキシル硫酸による細胞老化を仲介する)

著 者 : Masayuki Koizumi, Junko Tatebe, Ippei Watanabe, Junichi Yamazaki, Takanori Ikeda, Toshisuke Morita

公 表 誌 : Journal of Atherosclerosis and Thrombosis

論文内容の要旨 :

【背景】

慢性腎不全(chronic kidney disease: CKD)に伴う心血管病(cardiovascular disease: CVD)の発症、いわゆる心腎連関は広く認知されており、動脈硬化はその病態メカニズムの重要な役割を担っている。動脈硬化につながる血管細胞老化の促進に酸化ストレスは深く関与しており、NAD<sup>+</sup>合成の律速酵素である細胞内 Nampt (intracellular nicotinamide phosphoribosyltransferase: iNampt)の活性減弱に伴う NAD<sup>+</sup> (nicotinamide adenine dinucleotide)合成障害が惹起する NAD<sup>+</sup>依存性ヒストン脱アセチル化酵素 Sirt1 (sirtuin 1)の活性低下は、その重要なメカニズムである。

CKD 進行に伴って蓄積する尿毒症物質は CKD 患者でこの酸化ストレスを増強する原因のひとつとして重要である。食物蛋白質由来のトリプトファンが腸肝循環を経て生成される尿毒症物質インドキシル硫酸 (indoxyl sulfate: IS)は、有機アニオントランスポーターにより細胞内に取り込まれ、NADPH oxidase の活性化を介して細胞内酸化ストレスを増強することが報告されているが、細胞内に取り込まれた IS がどのようにして NADPH oxidase を活性化するかは不明であった。

アリル炭化水素受容体(aryl hydrocarbon Receptor: AhR)は、臓器発生や癌発生、薬物代謝に関与しているリガンド活性型の転写因子である。我々は最近、ISによるNADPH oxidaseの活性化がこのAhR依存性であり、酸化ストレスの増強を介してヒト臍帯静脈内皮細胞(human umbilical vein endothelial cells: HUVEC)の炎症反応を惹起することを報告している。本研究では、内皮細胞におけるAhRの新たな病態生理学的意義の解明を目指し、ISによる細胞老化への関与を検討した。

#### 【方法・結果】

内皮細胞老化に与えるISの影響を検討するため、IS 500  $\mu$ mol/L 共存下で24時間培養したHUVECに老化細胞の検出が可能であるSA- $\beta$  gal(senescence-associated beta-galactosidase)染色を施行し、陽性細胞と総細胞数の割合を評価した。その結果、ISで刺激したHUVECではコントロールと比較して有意にSA- $\beta$  gal陽性細胞の割合が増加しており、細胞老化が促進していた。さらに我々はそのメカニズムを解明するためにHUVECにおけるiNamt活性、細胞内NAD<sup>+</sup>、Sirt1活性への影響を比色法で評価した結果、ISによる細胞老化促進にはiNamt-NAD<sup>+</sup>-Sirt1系の障害が関与していることを見出した。

次に、このiNamt-NAD<sup>+</sup>-Sirt1系の障害にAhR依存的なNADPH oxidaseの活性化が関与するかをAhR阻害剤である $\alpha$ -naphthoflavone、CH223191とNADPH oxidase阻害薬であるapocyninを用いて検討した結果、これらの阻害薬で前処置されたHUVECではIS暴露による細胞老化とともにiNamt活性・NAD<sup>+</sup>合成・Sirt1活性の低下も有意に改善していた。以上により、ISによりAhR・NADPH oxidase依存的に障害されたiNamt-NAD<sup>+</sup>-Sirt1系が細胞老化を促進していることが明らかにされた。

最後にISによるNAD<sup>+</sup>合成低下が細胞老化を来したことを確認するために、NAD<sup>+</sup>の基質であるnicotinamide(NAM)投与下でのIS暴露の影響を評価した結果、NAMの投与はISにより低下したNAD<sup>+</sup>をコントロールレベルまで改善し、Sirt1活性低下と細胞老化を有意に抑制した。

#### 【考察】

本研究で我々はISによる内皮細胞老化のメカニズムがiNamt-NAD<sup>+</sup>-Sirt1系の障害を介すること、そしてそれがAhR依存性であることを初めて実証した。ISは心腎連関の促進におけるキープレーヤーであり、ISによるCVDの促進を予防するためには血中IS濃度を低下させるかISの作用をブロックすることが重要である。AST-120は現在、血中IS濃度を低下させ、CKDの進行を緩徐にする効果的な治療薬として使用されており、血管内皮障害や血管老化を減弱するという血管系への有用性も報告されている。本研究で我々はHUVECにおいてIS-AhR経路の障害がiNamt-NAD<sup>+</sup>-Sirt1系の障害を減弱し、細胞老化を抑制することを明らかにした。この結果はIS-AhR経路の遮断が心腎連関における新たな治療戦略となりうる可能性を示唆する。

#### 【今後】

現在、in vitroで得られたこれらの知見をin vivoでも証明するための腎障害動物モデルによる検証が進行中である。さらに心腎連関に対する新たな治療薬の開発を目指す。AhRシグナルはそのリガンドにより生体防御に働く転写因子Nrf2(NF-E2-related factor 2)の活性化にも関与しているため、完全なIS-AhR経路の障害は生体に悪影響を及ぼす可能性が示唆される。従って、内皮細胞に存在するAhRをターゲットとし、NADPH oxidase・

iNamt-NAD<sup>+</sup>-Sirt1 系を遮断する一方で、Nrf2 には影響を与えない partial antagonist もしくは partial agonist 作用を有する新たな物質を同定し、創薬開発へと繋げる計画である。

## 1. 論文審査の要旨および担当者

学位番号甲第 508 号	氏 名	小 泉 雅 之
論文審査担当者	主 査	杉 薫
	副 査	杉 山 篤
	副 査	川 合 眞 一
	副 査	赤 羽 悟 美
	副 査	中 野 裕 康
<p>論文審査の結果の要旨 :</p> <p>尿毒症物質の一種であるインドキシル硫酸(IS)は腎障害の進行に伴い蓄積し、酸化ストレスを増強することが知られている。増強した酸化ストレスは動脈硬化につながる血管細胞の老化や炎症を惹起し、心腎連関の促進に重要な役割を果たすことが示唆されている。著者らは以前にヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)において、IS がアリル炭化水素受容体(AhR)を活性化し、酸化ストレスの増強を介して内皮細胞に炎症性変化を惹起することを報告している。ダイオキシン受容体として知られる AhR は、悪性腫瘍・免疫・炎症反応に関与することが報告されているが、細胞老化との関係性は不明であった。そこで著者らは内皮細胞老化に与える IS の影響を検討するため、老化細胞の検出が可能である SA-β gal 染色を HUVEC に施行し、陽性細胞と総細胞数の割合を評価した。その結果、IS で刺激した HUVEC では SA-β gal 陽性細胞の割合が増加して細胞老化が促進していた。この機序を解明するために、HUVEC における iNamt 活性、細胞内 NAD<sup>+</sup>、Sirt1 活性への影響を比色法で評価した結果、IS による細胞老化促進には iNamt-NAD<sup>+</sup>-Sirt1 系の障害が関与していることを見出した。さらに AhR 阻害剤および NADPH oxidase 阻害薬で前処置された HUVEC では IS 暴露による細胞老化とともに iNamt 活性・NAD<sup>+</sup>合成・Sirt1 活性の低下も有様に改善しており、IS により AhR・NADPH oxidase 依存的に障害された iNamt-NAD<sup>+</sup>-Sirt1 系が細胞老化を促進していることが明らかにされた。最後に nicotinamide (NAM) 投与下で IS 暴露の影響を評価すると、NAM の投与は IS により低下した NAD<sup>+</sup>をコントロールレベルまで改善し、Sirt1 活性低下と細胞老化を有意に抑制した。IS による内皮細胞老化の機序は iNamt-NAD<sup>+</sup>-Sirt1 系の障害を介すること、そしてそれが AhR 依存性であることを著者らは初めて実証した。HUVEC において IS-AhR 経路の障害が iNamt-NAD<sup>+</sup>-Sirt1 系の障害を減弱し、細胞老化を抑制することを明らかにした論文であり、学位に値するものと考えられた。</p> <p>論文審査会では、in vitro で得られたこれらの知見を in vivo でも証明するための腎障害動物モデルによる検証が進行中で、心腎連関に対する新たな治療薬の開発を目指していることも報告された。審査委員からは老化の定義、老化と動脈硬化の関係、HUVEC は静脈で動脈血は通っているが動脈硬化との関係、CKD の病変部位に老化は生じているか、IS が NO<sub>x</sub> を活性化する機序、代謝が亢進すると寿命が短くなり、老化が促進するか?などの質問があり、今後の研究につながる討論がなされた。</p>		

