

平成 21 年 5 月 15 日現在

研究種目：基盤研究 (C)
研究期間：2006～2008
課題番号：18590265
研究課題名 (和文) テロメラーゼ制御技術の確立と再生医療への応用
研究課題名 (英文) The establishment of telomerase control technology and application for medical regeneration
研究代表者
石川 一彦 (ISHIKAWA KAZUHIKO)
大阪大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：60379245

## 研究成果の概要：

長期発現ベクター-pEBc にテロメラーゼサブユニットである hTERT 遺伝子を組み込み、血管内皮細胞に導入する事で、長期に遺伝子発現が維持され、強い抗老化、抗酸化ストレス作用を有する細胞を得た。また hTERT 遺伝子が、テロメラーゼ活性の変化を介さずに、直接的に細胞接着因子の発現や NF- $\kappa$ B 活性を上昇させ、抗アポトーシス効果を発揮している事が明らかとなった。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	1,500,000	0	1,500,000
2007 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2008 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	600,000	4,100,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：hTERT, テロメア、血管内皮細胞、老化、テロメラーゼ

## 1. 研究開始当初の背景

現在、血管内皮前駆細胞や骨髄細胞を用いた血管新生療法や心筋組織再生が国内外で注目されている。しかし、生産性に大きな課題がある。また抗老化酵素であるテロメラーゼの機能が、解明されつつあり、テロメラーゼの細胞への応用が、再生医療に有利である

可能性が考えられている。

## 2. 研究の目的

本研究は、pEBc という遺伝子長期発現ベクターを用いて hTERT (テロメラーゼ主要触媒サブユニット) の発現を亢進させ、染色体末端のテロメアを伸長する酵素であるテロメラーゼの機能を利用することで、末梢血より

採取した血管内皮前駆細胞（あるいは骨髄単核球：以下血管内皮前駆細胞等とする）の細胞分裂回数増加による目的細胞の大量産生及び移植後の生着性の向上を狙い、組織再生医療（自家細胞移植法）の進展に必要な基礎技術の確立を目指す。最終的には再生医療における移植用細胞供給システムの生産性向上を目的とする。

### 3. 研究の方法

EBウイルスのEBNA-1及びOriPを有するプラスミドベクターにテロメラーゼの触媒サブユニットであるhTERTを組み込んだpEBc-hTERTを作成し、血管内皮細胞に導入して、hTERT発現の効率をmRNA定量、蛋白定量により測定する。チップによる遺伝子解析で、pEBc-hTERT導入細胞での遺伝子発現のプロファイリングを行う。次に導入細胞の老化、アポトーシス、酸化ストレス、細胞分裂、血管新生に対する機能を、マーカーを用いて検討する。pEBc-hTERTを実験動物に導入し、個体での発現、臓器に対する影響を調べる。最終的には、導入細胞を生体に移植し、血管新生に対する効果を、虚血モデル動物を用いて検討する。

### 4. 研究成果

#### (1) pEBc-hTERT作成と血管内皮細胞(HUVEC)への導入

EBウイルスのEBNA-1及びOriPを有するプラスミドベクターpEBcにテロメラーゼの触媒サブユニットであるhTERTを組み込んだpEBc-hTERTを用いた。pEBc-hTERTをHUVEC(ヒト臍帯静脈内皮細胞；4継代)にLipofectin法により導入したところ、対照の発現ベクター(pCDNA-hTERT)に比べ、pEBc-hTERTの方が高いhTERT発現が認められた(Real-time RT-PCR、ウェスタンブロットによる定量)。さらに、8継代を経ても高いhTERT発現が維持されていた。

#### (2) pEBc-hTERT導入血管内皮細胞の遺伝子発現解析

pEBc-hTERTによるhTERT過剰発現HUVEC

において、テロメラーゼサブユニットであるTEP1発現には変化が認められなかった。しかし、細胞接着因子であるVCAM-1及びICAM-1の発現が亢進(共に約2倍)していた。継代を進めると対照群と同レベルにまで低下した。また、Klotho蛋白の発現の亢進(約1.5倍)も認められた。

#### (3) pEBc-hTERT導入血管内皮細胞の老化マーカー検討

老化マーカーとしてSA $\beta$ -galactosidase染色性を検討した。遺伝子導入時の4継代細胞ではSA $\beta$ -galactosidase染色性(陽性細胞数)に差がなかったが、その後継代を繰り返すとpEBc-hTERT導入HUVECで陽性細胞数が有意的に少なかった。

(1)、(2)、(3)の結果から、長期発現プラスミドpEBc-hTERTが、通常のベクターに比し、長期に効果が得られる事、血管内皮細胞に対して抗老化作用を発揮する事が分かった。またhTERTにより、細胞接着因子の発現亢進が亢進する事が示唆された。

#### (4) 血管内皮細胞におけるhTERTの役割

細胞の加齢、分裂回数の増加に伴い、hTERTの発現が増加した。hTERTが検出された細胞においては、過酸化水素刺激により、hTERTの発現低下(コントロールに比し、約80%)が認められた。過酸化水素刺激によるhTERTの発現低下は、プロブコールの添加によりコントロールレベルにまで回復した。

#### (5) テロメラーゼ高発現ベクター

##### pEBc-hTERTの血管内皮細胞における効果

hTERT導入細胞において、eNOSの発現亢進が認められた。酸化ストレスに対して、hTERT導入細胞は、コントロール細胞に比し、生存細胞数が約20%多かった。酸化ストレスに対して、hTERT導入細胞は、コントロール細胞に比し、エンドセリン-1分泌が、約25%減少していた。

(4)、(5)の結果から、細胞分裂の進展や酸化ストレスは、テロメラーゼ活性の低下を導き、これが血管内皮の老化促進因子となる事が示唆された。hTERTは、テロメアを伸長する以

外にも、酸化ストレスなどの刺激に対して、防御的機能を有する事が示唆された。hTERT遺伝子導入による内皮の防御機能獲得には、eNOSが関与している可能性が、示唆された。

#### (6) pEBc-hTERTの実験動物への導入

pEBc-hTERTの長期発現効果のマウスへの影響を調べるために、尾静脈への急速静注を行い、肝臓において約3週間に渡る発現が維持された。大腿の筋肉への注射では、有意な長期発現が得られなかった。

#### (7) 血管内皮細胞のアポトーシスにおけるhTERTの役割

hTERTを導入した、血管内皮細胞(HUVEC)においては、アポトーシスが有意に減少していた。この減少時に、テロメア長に差があればSA-βガラクトシダーゼの染色性に差が見られるはずであるが、実際はそうでなく、テロメア長に非依存性なアポトーシスの減少である事が分かった。この事から、hTERTのテロメラーゼ活性としてではなく、直接抗アポトーシス作用を有している可能性が示唆された。

#### (8) hTERTによるNF-κBの活性化

HPV感染細胞でテロメラーゼ活性上昇とともにNF-κBの活性化を通じた炎症反応が見られる。この事からhTERT導入HUVECにおけるNF-κB活性をルシフェーラスアッセイで測定し、その亢進が確認された。同じ条件下で、ICAMやVCAMの発現亢進も明らかになった。

(7)、(8)の結果から、hTERTが、NF-κBの活性化を通して抗アポトーシス機能を発揮している可能性が示唆された。Bcl-xL系を抑制した場合、hTERTによる抗アポトーシス作用が減弱しており、今後は他の系も抑制して確認作業を行う。またhTERTをHUVECに導入した際の、細胞内での部位別なhTERT発現を調べた所、核内でのhTERT増加に有意な差は見られないが、細胞質では明らかな差が見られた。

以上の事から、血管内皮細胞において、核内に移行しないhTERTが細胞質内に留まり、NF-κBを活性化する事でBcl-xLを活性化、抗アポトーシス機能を発揮する可能性が高い。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

- (1) Maekawa Y, Ishikawa K, Rakugi H et al. Klotho Suppresses TNF-α-Induced Expression of Adhesion Molecules in the Endothelium and Attenuates NF-κB Activation. *Endocrine*. 2009. 有. (in press)
- (2) H Rakugi, Ishikawa K, Ogihara T et al. Anti-oxidative effect of Klotho on endothelial cells through cAMP activation. *Endocrine*, 31(1): 82-87, 2007. 有.
- (3) Ohta J, Rakugi H, Ishikawa K, Ogihara T et al. Klotho gene delivery suppresses oxidative stress in vivo. *Geriatrics & Gerontology International*, 7(3): 293-299, 2007. 有.
- (4) Chihara Y, Rakugi H, Ishikawa K, Ogihara T et al. Klotho protein promotes adipocyte differentiation. *Endocrinology*, 147(8): 3835-3842, 2006. 有.
- (5) Ikushima M, Rakugi H, Ishikawa K, Ogihara T et al. Anti-apoptotic and anti-senescence effects of Klotho on vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 339(3): 827-832, 2006. 有.

[学会発表] (計 3 件)

- (1) 木田 岩男 「血管内皮細胞におけるhTERTの抗アポトーシス作用」

第 49 回日本老年医学会学術集会、2007 年 6 月 22 日、札幌

(2) Ishikawa K 「The effect of aging and oxidative stress on hTERT expression of vascular endothelial cells」

The 21<sup>st</sup> Scientific Meeting of the International Society of Hypertension、2006.10.17、福岡

(3) 石川一彦 「血管内皮細胞における hTERT の新規機能解明」

日本老年医学会学術総会、2006 年 6 月 9 日、金沢

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

石川 一彦 (ISHIKAWA KAZUHIKO)  
大阪大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号：60379245

##### (2) 研究分担者

樂木 宏実 (RAKUGI HIROMI)  
大阪大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号：20252679  
萩原 俊男 (OGIHARA TOSHIO)  
大阪大学・大学院医学系研究科・名誉教授  
研究者番号：60107042

##### (3) 連携研究者

なし