

最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 646 号	学位申請者	内門 義博
審査委員	主査	谷本 昭英	学位 博士 (医学・歯学・学術)
	副査	西尾 善彦	副査 宮田 篤郎
	副査	小賤 健一郎	副査 橋口 照人

主査および副査の5名は、令和4年1月21日、学位申請者 内門 義博 君に面接し、学位申請論文の内容について説明を求めると共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。

質問1) 免疫染色における共局在の評価方法は何か。

(回答) ピクセル単位の蛍光輝度の相対値を用いて、解析ソフト (Image J FIJI) で Pearson 係数を算出した。

質問2) ApoE KO マウスの役割および由来は何か。

(回答) C57BL/6 由来で脂質異常モデルとして使用した。

質問3) 各 imaging の染色はどのような原理か。

(回答) ①SA β -gal 染色：弱酸性下で非蛍光基質 X-gal は β -galactosidase によって加水分解されると青色の蛍光色素を呈するため、この性質を利用して老化細胞を検出した。②JC-1 染色：JC-1 は構造内にミトコンドリアと親和性の高いカオチン性の電位を持ち、ミトコンドリア膜電位に応じて色素がミトコンドリアへ蓄積する。蓄積された JC-1 の濃度が低い場合は緑の蛍光を発し、濃度が高い場合は赤色を呈する。③Mitotracker 染色：ミトコンドリアによって選択的に捕捉される塩基性蛍光色素で、ミトコンドリアの形態変化の評価に用いた。④MitoSOX Red 染色：ミトコンドリアへの選択性がある MitoSOX Red は、活性酸素により酸化され赤色蛍光を発し、ミトコンドリア由来の ROS を検出する。

質問4) 細胞増殖と老化は同義なのか、また本実験系と増殖は関係ないのか。

(回答) 老化の定義は加齢に伴い構造的、機能的変化を来した状態のことを指す。VSMC においては外的ストレスに伴い内膜へ migration し形質転換に伴う cell proliferation の結果、内膜が肥厚する。この細胞増殖に伴い老化は進行するが増殖速度は徐々に低下し、最終的に血管の内腔狭小化による血管弛緩性の低下した状態が血管老化と考えられている。細胞増殖は老化と同義ではないが、我々の pilot data では ox-LDL 投与は cell proliferation を起こすため老化が進行する初期段階であると考えた。

質問5) 他の増殖因子も ARB を介して阻害される可能性はあるのか。

(回答) Rat の VSMC において、骨形成タンパク質である BMP が血管の石灰化に関わっていることが知られており、AT1R 阻害はこの BMP2 の発現を抑制し、血管石灰化の軽減することが報告されている。

質問6) ミトコンドリアの fission は老化と関係していると考えていいのか。

(回答) ミトコンドリアは軽度のストレスでは fusion 化によりミトコンドリア機能低下を軽減する一方、過度のストレスでは fusion 化では処理しきれず、fission 化により異常ミトコンドリアを分裂させ、マイトファジーを誘導しミトコンドリア機能維持に努める。そのため fission 化はミトコンドリア機能が低下した結果生じるものであり、このミトコンドリア機能低下が老化を誘導するため、直接的に老化と関係しているわけではない。

質問7) ミトコンドリアが傷害されるメカニズムは何か。

(回答) ミトコンドリア DNA が傷つくと、プロトン濃度勾配によりミトコンドリア内膜に存在する膜電位が消失し、酸化的リン酸化を担う呼吸鎖の機能低下から ATP 合成が低下する。また ATP 産生に伴う副産物として活性酸素が出現するが、これらは SOD およびグルタチオンペルオキシダーゼやペルオキシレドキシシンなどの抗酸化酵素によって水へと還元される。ミトコンドリア機能が低下した状態では、この抗酸化酵素の発生が抑制されるため ROS 産生が増えることに繋がり、血管老化へとつながる。

質問8) LOX-1 や AT1R はカベオラにあるのか。

(回答) 細胞膜に存在する。

質問9) VSMC の増殖と老化は別に考えたほうがよいのではないか。

(回答) Cell proliferation については本論文では論じていない。p53 に関しては一般的に老化マーカーの1つとして考えられているため老化の表現型の1つとして記載した。

質問10) LOX-1 は内膜に遊走した SMC において発現しているのではないか。

最終試験の結果の要旨

(回答) In vivo において動脈の内膜および中膜の組織を採取し、それぞれの細胞を培養し構成型か分泌型なのか見る必要はあったと考えられる。今後の検討とさせていただきます。

質問 1 1) ox-LDL により H_2O_2 が増えるメカニズムについて、AT1R 刺激からの NADPH oxidase (以下 NOX) からの ROS 産生が増えるのではないかと。

(回答) 本実験における H_2O_2 production はミトコンドリア単離を行いミトコンドリア由来の ROS を測定している。既に回答 7 において ox-LDL によりミトコンドリア由来の ROS 産生が発生することについては説明した。AT1R 活性化に伴う NOX の upregulate により、 H_2O_2 production の増加に影響した可能性も十分考えられるが、 H_2O_2 production に関しては RAS signal による NOX upregulate による影響か、ミトコンドリア DNA 損傷による影響が先かは、NOX 阻害剤 + ox-LDL 投与下での H_2O_2 production 計測で判明するため、今後の検討とさせていただきます。

質問 1 2) AT1R と LOX-1 の動脈硬化機序で G protein pathway は動脈硬化に関わらないのではないかと。

(回答) G protein pathway は比較的早いプロセスであり、本論文においても AT1R から Drp1 までは western blot 上は 30 分で有意差が見られた。ox-LDL が LOX-1/AT1R を介した G protein pathway により血管内皮機能低下させることは既に報告されており、この血管内皮機能低下は NO 産生を抑制する。NO は SMC の遊走・増殖反応の抑制・抗酸化ストレス作用など、抗炎症・抗老化物質としての側面もあるため、血管内皮機能低下による NO 低下は組織リモデリングや血管老化進行の原因となり、長いプロセスでみるとこれが動脈硬化につながる。

質問 1 3) この実験で使った細胞は human の VSMC が 1 種類だけか。

(回答) VSMC に関しては 1 種類のみであるが、pilot 実験では HUVEC も用いて ox-LDL が Drp1 を活性化させ、ミトコンドリア機能低下および ROS 産生を増加させ、細胞老化を促進することは確認している。

質問 1 4) 老化に関して血管内皮、平滑筋の両方で進行していると考えてよいのか。

(回答) In vivo の実験では粗抽出材料で評価は困難だが、in vitro の実験においては HUVEC を用いて p53 および SA- β gal 染色での老化亢進を確認しており、両方で老化が進行すると考えられる。

質問 1 5) In vivo で見た時に病変の時間経過としてはどうなのか。

(回答) 本論文では老化に焦点を当てているため病変の推移は見えていない。ただし、動脈硬化の進展を確認する上では in vivo においてマウスの時間経過による推移を見ていく必要があるため、今後の検討とさせていただきます。

質問 1 6) ox-LDL は AT2R には影響しないのか。

(回答) LOX-1 と AT2R に関して in vitro では関連が報告されていないが、in vivo においては LDLR-KO マウスにおいて AT2R を overexpression させると LOX-1 発現が低下したとの報告があり、今後 LOX-1 と AT2R の関連が報告される可能性はある。

質問 1 7) In vivo において AT1R 阻害で粥腫も退縮しているように見えるが粥腫との関係はどうか。

(回答) 今回我々は動脈硬化の初期段階である老化のみの実験を行っており、粥状動脈硬化については評価していないため、老化が動脈硬化へつながるかは今後の実験でメカニズムを解決したい。尚、アテローム性動脈硬化に関しては LOX-1-AT1R- β -arrestin pathway が関与しており、今回の LOX-1-AT1R-G protein pathway は粥腫形成には関与していないため、本実験系とは関係ないと考えられる。

質問 1 8) LOX-1 はどのような細胞にあるのか。平滑筋の泡沫化に LOX-1 は関連しているのか。

(回答) SMC 以外に HUVEC やマクロファージに存在する。G protein pathway においてはマクロファージの LDL の貪食に関しては報告がなく、平滑筋の泡沫化との関連は今後の課題とさせていただきます。

質問 1 9) LOX-1 と AT1R の連関に関しては具体的にどのような molecular interaction を起こしているのか。

(回答) LOX-1 と AT1R は細胞内ドメインで細胞内の 3 番目のループの部位に S-S 結合でつながっており、ARB を投与するとこの構造変化が起きないため刺激が伝わらない。

質問 2 0) CRAF と AT1R の間にはなにか関係しているのか。また RAF についてはどこまで調べたのか。

(回答) H-Ras が CRAF の上流にあることを確認しているが、ミトコンドリアダイナミクスには関連するも、オルタナティブオートファジーには関与しなかった。Ras には、E-Ras、H-Ras、K-Ras、N-Ras、M-Ras、R-Ras があり、我々は H-Ras、K-Ras、R-Ras は阻害実験を行ったがオルタナティブオートファジーに影響がなく、N-Ras、M-Ras、R-Ras が関与している可能性がある。また Dabrafenib (BRAf および CRAF の阻害薬) 投与で ox-LDL による p-Drp1(Ser616)の活性化が抑制されたため、ARAF に関しては調べていない。p-BRAF、p-CRAF の発現を調べ、p-CRAF が本実験系に関与していたことは判明している。

以上の結果から、5 名の審査委員は申請者が大学院博士課程修了者としての学力・識見を有しているものと認め、博士 (医学) の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。