

## 抗動脈内皮細胞で高発現している霊長類特異的遺伝子 *POTEE* は RAN シグナルを調整し NF $\kappa$ B の核外輸出を促進することで動脈硬化を抑制する

楠本 大

慶應義塾大学医学部 循環器内科

### 【研究の背景】

動脈硬化を基盤として発症する心血管疾患、脳血管疾患による死亡は、癌にも匹敵する数となる。現在動脈硬化に対する治療はリスク因子に対する介入が主体であり、根本的治療法の開発が期待されている。動脈硬化進行は、リスク因子の影響が多いが、患者の遺伝的素因にも大きく左右されることが知られている。臨床上、非常に大きなリスク因子を有しているにもかかわらず動脈硬化進行が全く認められない抗動脈硬化患者がおり、内因性の強力な抗動脈硬化機構が働いていると考えられる。患者から作成した iPS 細胞は遺伝的背景をそのまま有しており、実際には得ることが困難である様々な細胞に分化させることで、患者の内因性の機構を細胞レベルで解析を行うことができる。動脈硬化の進展には様々な細胞や因子が関与しているが、中でも血管内皮細胞はリスク因子により生じるストレスにより細胞老化し、炎症を周囲に惹起することで動脈硬化進行に大きな役割を果たしている。我々は抗動脈硬化患者から作成した iPS 細胞由来血管内皮細胞では、酸化ストレスに誘導される細胞老化、炎症が抑制されることを解明した。網羅的トランスクリプトーム解析にて、抗動脈硬化血管内皮では霊長類特異的遺伝子 *POTEE* が高発現していることを先行研究にて突き止め、内因性の抗動脈硬化機構の鍵となっていることが考えられた。

### 【目 的】

抗動脈硬化血管内皮細胞にて高発現している霊長類特異的遺伝子 *POTEE* が、血管内皮細胞において抗動脈硬化機構に重要な役割を果たしているかどうか細胞・動物レベルで検証を行い、そのメカニズムを追求し、新規の創薬に結び付けたいと考えた。

### 【方 法】

霊長類特異的遺伝子 *POTEE* を、培養血管内皮細胞である HUVEC に強制発現させ、酸化ストレスに誘導される細胞老化や炎症惹起が抑制されるかどうか検討を行った。細胞老化に起因する炎症惹起を誘導する重要な転写因子として NF $\kappa$ B が知られている。*POTEE* が NF $\kappa$ B 活性化を調整することで細胞老化や炎症惹起を抑制するかどうか免疫染色やレポーターアッセイなどを用いて検討した。*POTEE* は細胞質内で Ankryn ドメインを介してタンパク相互作用を介して機能を発揮していることが予想されている。そこで *POTEE* 結合蛋白を、免疫沈降により抽出し、質量分析法を用いて網羅的に解析を行った。また主要な結合蛋白が *POTEE* によりどのように機能が調整されているか詳細な検討を行った。次に動物モデルマウスを用いて *POTEE* が動脈硬化進展を抑制できるか検証を行った。マウスでは *POTEE* は発現していないことから、血管内皮細胞特異的 Tie2 プロモーター下で *POTEE* を強制発現させるマウス(*POTEE*-Tg)を作成し、大腿動脈カフモデルを用いて血管炎症を誘導した。さらに *POTEE*-Tg を APOE ノックアウトマウスと交配させ(*POTEE*-Tg/APOE<sup>-/-</sup>)、高脂肪食を投与して動脈硬化を誘導し、*POTEE* 強制発現により動脈硬化を抑制できるかどうか検討を行った。

## 【結 果】

POTEE を培養血管内皮細胞に強制発現させると、酸化ストレスに誘導される細胞老化や炎症を抑制し、炎症惹起転写因子である NF $\kappa$ B の活性化を抑制した。酸化ストレスだけでなく、TNF- $\alpha$  に誘導される NF $\kappa$ B の活性化も POTEE が抑制し、POTEE ノックダウンにより NF $\kappa$ B の活性化が促進することから、POTEE は NF $\kappa$ B の活性を直接抑制していると考えられた。POTEE の結合蛋白を網羅的に解析すると、低分子 G 蛋白である RAN 関連タンパクが強く相互作用していることが分かった。RAN は核内外へのタンパク質輸送に重要な役割を担っており、NF $\kappa$ B も核外へ輸出し不活性化を促進することが知られている。RAN 活性を定量すると POTEE は RAN 加水分解を制御することで RAN シグナルを促進することが判明した。RAN シグナルを抑制すると NF $\kappa$ B の活性が低下することを示し、POTEE は RAN シグナルの促進を介して NF $\kappa$ B 活性を抑制し、細胞老化や炎症を抑制していると考えられた。次に POTEE-Tg マウスに大腿動脈カフモデルを用いて血管炎症を誘導したところ、POTEE は血管内膜肥厚や炎症惹起を著明に抑制し、血管内皮細胞での炎症を抑制していると考えられた。さらに POTEE-Tg/APOE<sup>-/-</sup>マウスに高脂肪食を投与して動脈硬化を誘導すると、動脈硬化プラークが著明に減少し、POTEE は動脈硬化を抑制する新規治療法となりうることを示された。

## 【考 察】

今回 POTEE は RNA シグナルの活性化を促進する事で NF $\kappa$ B の作用を減弱し、細胞老化・炎症を抑制し、動脈硬化進展を抑制することが判明した。RAN は幅広い蛋白を核外に輸送していることから、POTEE により NF $\kappa$ B 以外の蛋白輸送を促進する可能性もある。あるいは NF $\kappa$ B 特異的に蛋白輸送を制御する機構の存在の可能性もあり、今後のメカニズム解明が期待される。また NF $\kappa$ B 制御のみで炎症惹起のみならず、細胞老化の鍵となる P21-P53 経路を抑制できたことは非常に興味深い。NF $\kappa$ B が直接的に P21-P53 を制御しているのか、あるいは SASP 抑制を介して周囲への炎症波及を抑制した結果、全体としての細胞老化も抑制可能となったのか、さらなる検討が必要である。動物実験の結果からは、POTEE は非常に強力な抗動脈硬化因子であり、臨床への応用が期待される。また血管内皮細胞が動脈硬化進展に重要な役割を果たしていることも同時に証明された。今後さらに詳細なメカニズムを追究し、臨床応用への道筋をつけていきたい。

## 【臨床的意義・臨床への貢献度】

近年、細胞老化に誘導される炎症の制御は、動脈硬化をはじめとした慢性炎症の病態を治療する非常に良いターゲットであると言われている。老化細胞を除去する、いわゆる「Senolytic drugs」が組織の老化を抑制する可能性が数多く示されており、創薬ターゲットとして細胞老化が注目されている。動脈硬化のみならず、糖尿病、心不全、癌など幅広い加齢関連疾患において細胞老化が病態進展に関与しており、細胞老化抑制は多くの疾患に共通した治療法となりうる。さらに、個体老化そのものに対する治療法ともなりうると考えられる。哺乳類は体重と寿命が相関関係にあることが古くから知られているが、霊長類は哺乳類の中でも特別寿命が長いことが知られており、霊長類特異的遺伝子の中に長寿を規定する遺伝子があることが予測されている。POTEE は RAN、NF $\kappa$ B という非常に保存されたシグナルに影響を及ぼし慢性炎症の病態に大切な細胞老化を抑制する事から、血管内皮細胞以外でも老化や炎症を抑制し、抗老化として作用する可能性があり、今後の治療法発展が期待される。