

【要約】

Progerin impairs vascular smooth muscle cell growth
via the DNA damage response pathway

(プロジェリンは DNA 損傷応答経路を介して
血管平滑筋細胞の増殖を障害する)

千葉大学大学院医学薬学府

先端医学薬学専攻

(主任：岩間厚志教授)

木下 大輔

【目的・方法】

ハッチンソン・ギルフォード・プロジェリア症候群(HGPS)は、平均寿命 13 歳と重篤な早老症である。主な死因は心筋梗塞等の動脈硬化性疾患である。通常の動脈硬化とは異なり血管平滑筋細胞の変性を特徴とする。原因遺伝子はラミン A である。ラミン A は核膜の裏打ち構造である核ラミナを構成する中間径フィラメントタンパク質で、核膜の物理的な強度を保つ一方で、多様なタンパク質と相互作用し、DNA 複製および遺伝子の発現に関与することが知られている。HGPS 患者は 50 アミノ酸残基部分欠損した異常ラミン A である *progerin* を有しており、これが原因で発症する。原因遺伝子ならびにその変異は明らかにされているものの、血管平滑筋細胞特異的に変性が生じる詳細な分子機構は明らかにされておらず、根本的な治療法も存在しない。そこで血管平滑筋細胞特異的な傷害機構に迫るため、*progerin* による細胞内のグローバルな変化を相互作用タンパク網羅的解析とマイクロアレイ解析を行い検討した。

【結果・考察】

インタラクトーム解析

質量分析計を用いた野生型ラミン A および変異型ラミン A の相互作用タンパク質の網羅的な解析を行った。今回の解析では *progerin* に加えて、*atypical* ウェルナー症候群を引き起こす 2 つの変異体も用いた。その結果野生型ラミン A 新規相互作用タンパク質を同定するとともに、*progerin* においてその相互作用が消失するタンパク質が複数同定された。同定された相互作用タンパク質の Gene ontology 解析を行い、野生型や *atypical* ウェルナー症候群を引き起こす変異体には相互作用するが、*progerin* でのみ相互作用の消失するものに着目した。すなわち、*progerin* においてのみ、DNA 損傷応答ならびに筋肉といった Gene ontology が消失していた。なかでも DNA 損傷応答という term には DNA-PK が含まれていた。DNA-PK に着目した理由は次のようなものである。*progerin* により、DNA 損傷応答経路の異常が生じ、p53 依存性 signal の活性化、それに伴う老化が引き起こされることはすでに報告されていたが、*progerin* と p53 をつなぐ DNA 損傷応答異常の詳細なメカニズムは未解明であった。ラミン A が *progerin* に変異することで、本来あるはずの DNA-PK との相互作用が失われ、それが病態に関与しているのではないかという仮説が得られた。この仮説を実証するため、次のような実験を考えた。HGPS 患者は動脈硬化性疾患で亡くなることから、血管の細胞に *progerin* を導入すれば、それらが老化することが予測される。老化した細胞において、本実験により同定された DNA-PK、p53 をノックダウンして老化形質が改善されるか否かを検討することで、それらの病態への関与を調べるというものである。そこで、血管の細胞に *progerin* を導入

したところ、興味深い結果が得られた。

細胞増殖解析

中膜の血管平滑筋細胞(vascular smooth muscle cells(VSMC))に、progerin を過剰発現させたところ、形態異常を示すとともに、細胞が死んでしまい、増殖が停止した。しかし、それに対して、内膜の血管内皮細胞(Human Umbilical Vein Endothelial Cells(HUVEC))では、progerin を導入しても、正常と同様に増殖した。また、線維芽細胞および HEK293 細胞において、progerin を導入した場合も、HUVEC と同様に変化が認められなかった。この結果は、ハッチンソン・ギルフォード症候群患者において、通常の動脈硬化では傷害されている血管内皮細胞では顕著な異常が見られない、血管平滑筋細胞が著明に減少することが原因で心筋梗塞が起こる HGPS に特徴的な動脈硬化性疾患を実験上、再現することができた非常に興味深い結果であるといえる。傷害された VSMC において、当初の予定通り、病態との関与が予測される遺伝子をノックダウンすることで、その表現型を改善できるかどうか調べた。今回ノックダウンしたのは、質量分析により同定された DNA-PK ならびに p53 である。DNA-PK や p53 に加え、DNA 損傷応答経路の下流である p21、p16 の progerin による発現レベルの変化をウェスタンブロットによって調べた。VSMC において progerin 過剰発現に伴い、DNA-PK のリン酸化およびその発現レベルが上昇していることが確認された。また、その下流の p53 p21 p16 も同様に progerin 過剰発現によりその発現レベルが上昇していた。progerin を過剰発現した VSMC で、DNA-PK ならびに p53 をそれぞれノックダウンすると、control では細胞が死んでいるのに対し、ノックダウンしたものでは、細胞が増殖している様子が確認された。

マイクロアレイ解析

p53 を抑制した VSMC を用いたマイクロアレイ解析を行った。その理由は、VSMC に progerin を導入すると細胞死が引き起こされ、十分量のサンプルを得ることができないため、E6 を導入し p53 をノックダウンすることで、十分量のサンプルを得ようと考えた。加えて、p53 非依存的な経路の探索を行うことのできる実験系であると考えた。

Heatmap から野生型ラミン A と progerin で確かに差があることが確認された。また、野生型と progerin を比較し、progerin において上昇もしくは減少しているものを plot した。3 倍以上に上昇もしくは減少しているものを有意に上昇もしくは減少していると考えた。上昇または減少しているものをデータベースにより Gene Ontology 解析を行った。上昇している term として炎症、リン酸化、アポトーシス、増殖、血管が得られた。減少している term として、ホルモン、増殖、

炎症、代謝、ホメオスタシスが得られた。上昇・減少いずれにも認められる term として炎症・増殖があった。上昇・減少いずれにも認められるものは大きな変動があるものと考え、病態に重要と判断し、着目した。中でも、炎症の中には、progerin において著明に上昇する MMP3・GM-CSF も認められた。

炎症関連遺伝子群の発現レベルの検討

MMP3 や GM-CSF 等 progerin において誘導される炎症関連遺伝子群について、RT-PCR を用いて調べたところ、progerin によって、その発現レベルが確かに上昇していることが確認された。また、NF κ B 経路の RelA をノックダウンすることで、GM-CSF においてはその発現レベルが抑制されることが確認された。さらに、それに対して、その上流である DNA-PK をノックダウンしてもその発現レベルを抑制することはできなかった。以上より、progerin によって炎症関連遺伝子群が誘導され、それらは DNA-PK を上流とする DNA 損傷応答経路とは非依存的な経路であると考えられた。

【結論】

progerin に変異することで、本来あるはずの DNA-PK との相互作用が消失し、DNA 損傷応答経路が活性化される、また、progerin により p53 非依存的に、RelA を含む NF κ B 依存的に炎症関連遺伝子群が誘導されるという、2つの経路が早老症状を促進するという新たな知見が得られた。