

# 論文内容要旨

論文題目

Raloxifene upregulates telomerase activity in human umbilical vein endothelial cells

(ラロキシフェンの血管内皮細胞におけるテロメラーゼ活性についての検討)

責任講座：発達生体防御学講座女性医学分野 講座

氏名：土信田雅一

## 【目的】

選択的エストロゲン受容体調節薬の1つであるラロキシフェン (Ral)は閉経後の骨粗鬆症治療薬として使用されている。Ral は子宮内膜、乳腺組織ではエストロゲンに拮抗し、乳がんを減少させると報告されており、また、血管に対してはエストロゲン様に作用することから、現在、心血管系疾患に対する予防効果について大規模臨床試験が進行中である。動脈硬化症の発症に血管内皮細胞の老化が関与することが知られている。細胞の老化は染色体末端のテロメア長と関連し、この長さはテロメラーゼより制御されている。今回、Ralのヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC)の増殖とテロメラーゼ活性に対する作用とその分子機構について検討した。

## 【方法】

1) Ral が、テロメラーゼ活性の中心となる human telomerase reverse transcriptase (hTERT) mRNA 発現に与える効果を RT-PCR で検討した。2) Ral が hTERT を介して HUVEC を増殖させるか否かを、HUVEC に hTERT の阻害剤である AZT 添加して検討した。また、hTERT に特異的な small interfering RNA (siRNA) を HUVEC に導入後、MTS assay で検討した。3) Ral によるテロメラーゼ活性化に、エストロゲン受容体(ER)/phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt 経路、および転写因子である NF- $\kappa$ B が関与するか否を、各種阻害剤(ER 拮抗剤 (ICI182780)、PI3K 阻害剤 (LY294002)、Inhibitor of  $\kappa$ B (I- $\kappa$ B) リン酸化阻害剤(BAY-11-7082)、NF- $\kappa$ B 核移行阻害剤 (SN50))を投与した上で、テロメラーゼ活性を quantitative stretch PCR 法で解析した。4)Akt、hTERT のリン酸化を western blotting で解析した。5) Ral の作用が ER $\alpha$ 、 $\beta$ いずれを介するのかを ER $\alpha$ 、 $\beta$  それぞれに特異的な siRNA を導入後、quantitative stretch PCR 法で解析した。

## 【成績】

1) Ral は HUVEC の hTERT mRNA の発現を促進した。2) Ral は HUVEC の増殖を促進し、この促進効果は AZT 添加、または hTERT 特異的 siRNA の導入により抑制された。3) Ral は HUVEC のテロメラーゼを活性化し、この作用は各種阻害剤 (ICI182780、LY294002、BAY-11-7082、SN50) で抑制された。4) Ral は、30 分で HUVEC の Akt、hTERT のリン酸化を誘導した。5) Ral によって活性化したテロメラーゼ活性は、ER $\alpha$ および $\beta$ 特異的 siRNA の導入により抑制された。

## 【結論】

Ral は、ER $\alpha$ 、 $\beta$ を介する hTERT 産生促進、および ER/PI3K/Akt 経路を介した hTERT のリン酸化、および NF- $\kappa$ B を介した hTERT の核内移行を誘導することで、血管内皮細胞のテロメラーゼを活性化して細胞増殖を促進することが示された。動脈硬化の発生過程には血管内皮細胞の傷害が関与することから、内皮細胞の増殖を促す Ral は、血管保護的に作用を有する可能性が示唆された。




山形大学大学院医学系研究科長 殿

## 学位論文審査結果報告書

申請者氏名： 土信田 雅一

論文 題目： Raloxifene upregulates telomerase activity in human umbilical vein endothelial cells

(ラロキシフェンの血管内皮細胞におけるテロメラーゼ活性についての検討)

審査 委員： 主査 後藤 薫   
副査 比中 千史   
副査 小谷直樹 

審査終了日：平成18年1月30日

### 論文審査結果要旨

ラロキシフェン (Ral) は選択的エストロゲン受容体 (ER) 調節薬の1つであり閉経後の骨粗鬆症治療薬として使用されているが、心血管系疾患に対する予防効果については未だ明らかにされていない。土信田君は本研究において、ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) を用いて Ral の細胞増殖およびテロメラーゼ活性に対する作用とその分子機構について検討した。

その結果、以下の知見を得た：

(1) Ral はテロメラーゼ活性の中心となる human telomerase reverse transcriptase (hTERT) mRNA の発現を促進した。

(2) Ral は HUVEC の増殖を促進し、この促進効果は AZT 添加、または hTERT 特異的 siRNA の導入により抑制された。

(3) Ral は HUVEC のテロメラーゼを活性化し、この作用は各種阻害剤 (ER 拮抗剤 (ICI182780)、PI3K 阻害剤 (LY294002)、I- $\kappa$ B リン酸化阻害剤 (BAY-11-7082)、NF- $\kappa$ B 核移行阻害剤 (SN50)) で抑制された。

(4) Ral は30分でHUVECのAkt、hTERTのリン酸化を誘導した。

(5) Ral によって活性化したテロメラーゼ活性は、ER $\alpha$  および  $\beta$  特異的 siRNA の導入により抑制された。

以上の結果より土信田君は、Ral が ER $\alpha$ 、 $\beta$  を介する hTERT 産生促進、および ER/PI3K/Akt 経路を介した hTERT のリン酸化、および NF- $\kappa$ B を介した hTERT の核内移行を誘導することにより、血管内皮細胞のテロメラーゼを活性化して細胞増殖を促進する可能性を提示した。動脈硬化の発生過程には血管内皮細胞の傷害が関与することを考慮すると、内皮細胞の増殖・再生過程を促進する Ral は、血管保護作用を有することが示唆される。

本研究は、これまで明らかにされていなかったラロキシフェンの細胞内分子機構の解明に大きく貢献していると考えられるので、学位審査委員会は本研究が博士 (医学) の授与に値するものと判定した。