

早期老化の表現型を有するマウスを用いた動脈伸展性に関する検討

九州大学病院 消化器・総合外科

森崎 浩一

1. 諸言

ウェルナー症候群は世界の中でも日本人の患者が最も多く、20歳頃から老化徴候が現れ、早く老化が進むように見える早期老化症の一つである。大部分の患者に白髪や脱毛、白内障などが生じ、実際の年齢よりも加齢性変化が進んでいるように見える。このような加齢性変化は外見だけではなく、脂質異常症や、動脈硬化、悪性腫瘍などが進行しやすいことも良く知られている。加齢に伴って生じる身体の機能的な衰えはサルコペニアやフレイルといった脆弱性で示されることが多く、われわれは数多くの報告を行ってきた^{1)~4)}。近年は加齢性変化に対する予防、改善を目的とした抗加齢療法、抗老化療法、いわゆるアンチエイジングの概念が注目されてきている。これは生活の質といった観点から重要な課題であるが、加齢性変化の進行、制御に関するメカニズムは未だ不明瞭である。

われわれはこれまでに、細胞周期遺伝子 **BubR1** が動脈硬化や発癌と深く関与していることを報告してきた^{5)~6)}。細胞周期遺伝子である **BubR1** は M 期を制御し、この発現の低下は、マウスに白内障、亀背、皮下組織の萎縮といった早期老化に関する表現型の異常を引き起こす。われわれが作成した **BubR1** 低発現マウスにおいては、血管壁に対しては平滑筋細胞の減少⁷⁾、活性酸素の産生増加⁸⁾といった老年期に生じる異常を若年期より引き起こすことができる。また、加齢性変化を来したヒト動脈壁においても、正常動脈壁と比較して **BubR1** 発現量が低下していることが指摘されており^{9)~10)}、**BubR1** の発現はマウスのみならず、ヒトにおいても加齢性変化と動脈硬化進展に大きく関与している。

今回、われわれはこの早期老化の表現型を有する **BubR1** 低発現マウスを用いて、アンギオテンシン II による高血圧刺激が動脈壁の伸展にどのような影響を与えるかを検討し、動脈壁の加齢性変化についてのメカニズムを解明し、加齢性変化の制御を図る事を目的とした。動脈の加齢性変化の抑制は、臓器の血流維持、機能保持につながり、早期老化症を有する患者のみならず、有さない患者においても有用な研究であると考えられる。

2. 方法

2.1 **BubR1** 低発現マウスを作成し、皮下に infusion pump を埋め込み、pump からアンギオテ

ンシン II (angiotensin II : Ang II) を 4 週間投与した。

2.2.4 週間後に標本を採取し、BubR1 の発現状態と動脈壁の性状および全身の臓器への影響を観察した。

2.3 マウスから摘出した腎組織を用いて、アンギオテンシン 1 受容体 (angiotensin I receptor : AGTR1)、および、アンギオテンシン 2 受容体 (angiotensin II receptor : AGTR2) の免疫染色を行った。

2.4 ヒト腎近位尿細管細胞 (renal proximal tubular cell : RPTC) を用いた in vitro 実験を行った。RPTC (passage 4) に BubR1 siRNA を導入して、BubR1 発現を低下させた。アンギオテンシン II ($10 \mu\text{mol/L}$) を培地に添加して、24 時間のアンギオテンシン II 刺激を加えた。細胞からタンパクを抽出し、ウエスタンブロットで BubR1 および AGTR1 のタンパク発現を評価した。対照群は siBubR1 (BubR1 siRNA 導入 RPTC) と scramble (scramble siRNA 導入 RPTC) とした。

2.5 siBubR1 RPTC と scramble RPTC を用いて、Ang II 刺激を加えた。Nox4 およびリン酸化 JNK と JNK の割合 (pJNK/JNK) のタンパク発現を評価するため、細胞からタンパクを抽出し、ウエスタンブロットを行った。BubR1^{+/+} マウスと BubR1^{LL} マウスの腎組織を用いて免疫染色を行った。

3.結果

3.1 BubR1 正常発現マウス (BubR1^{+/+}) と比較して BubR1 低発現マウス (BubR1^{LL}) において、Ang II に対する血圧上昇が抑制された。組織レベルでは、心臓では Ang II 投与の有無により、線維化には有意差を認めなかった (図 1)。腎臓では腎血管周囲の線維化が BubR1^{LL} マウスにおいて有意に抑制された (図 2)。大動脈では中膜肥厚が BubR1^{LL} マウスにおいて有意に抑制された。

3.2 腎組織における BubR1 の発現は、BubR1 正常発現マウスに比して BubR1 低発現マウスで有意に発現レベルが低かった。BubR1 は腎では主に糸球体に発現していた。Ang II 投与後、AGTR1 の発現はどちらのマウスでも増加したが、BubR1 低発現マウスは BubR1 正常発現マウスと比較して AGTR1 の発現レベルは低かった (図 3)。AGTR2 発現に関しては、BubR1^{+/+} マウスと BubR1^{LL} マウスで有意な差は認めなかった。

3.3 siBubR1 処理 RPTC は正常細胞の約 40%に発現が低下していた。AGTR1 の発現はコン

トロールと siBubR1 処理の RPTC 間で同等であった。Ang II 刺激後は両細胞とも AGTR1 の発現が有意に増加したが、siBubR1 処理 RPTC は control RPTC に比して、反応性が有意に低かった (図 4)。

3.4 siBubR1 処理細胞では、正常発現細胞に比して Ang II 誘導性の Nox4 の発現増加が抑制された。BubR1 低発現により、総 JNK 発現増加も抑制されていた。pJNK/JNK には両群間で有意差を認めなかった (図 5)。

図 1

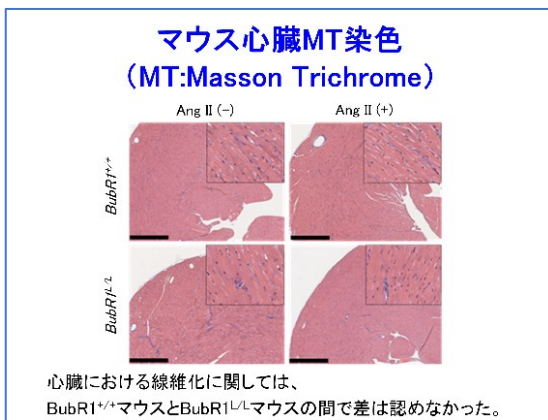


図 2

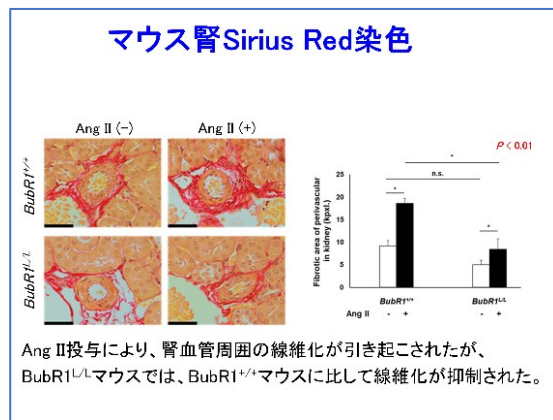


図 3

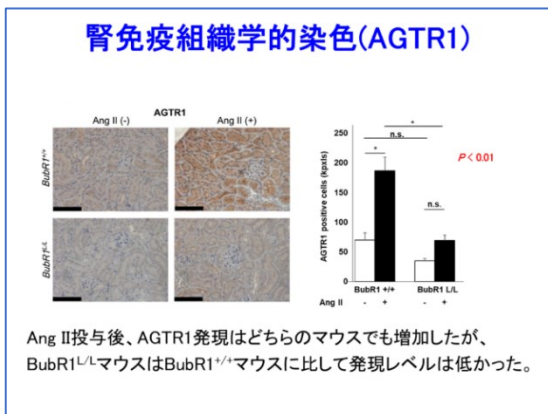


図 4

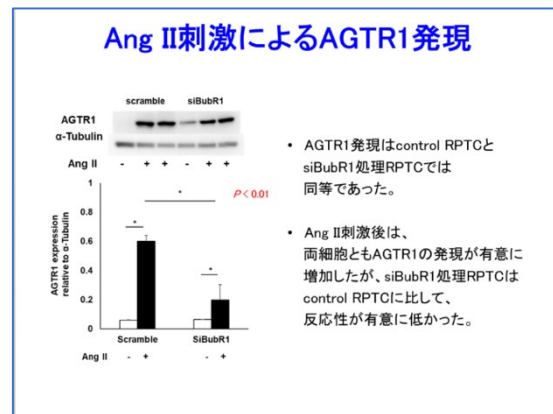
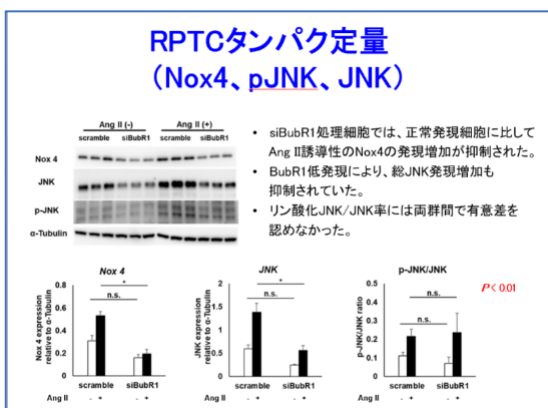


図 5



4.考察

BubR1 正常発現マウスと比較して BubR1 低発現マウスにおいて、アンギオテンシン II に対する血圧上昇が抑制されたことより、アンギオテンシン II による血圧上昇のシグナル伝達経路に BubR1 の関与が考えられた。BubR1 低発現マウスにおいて、アンギオテンシン II 刺激を行うと、特に腎組織への影響が大きかった(腎血管周囲の線維化が著明に抑制された)。高血圧の進行と臓器障害の主たる経路の一つにアンギオテンシン II-アンギオテンシン受容体経路があることより、腎臓におけるアンギオテンシン II 誘導性のアンギオテンシン受容体 1 とアンギオテンシン受容体 2 の発現を評価した。BubR1 低発現マウスの腎臓では、アンギオテンシン II 刺激によって引き起こされる AGTR1 の発現が抑制されており、その結果は細胞レベルでも同様であった。

アンギオテンシン II 刺激に対する細胞増殖は Nox 経路を介して行われることが報告されており、本研究の機序として Nox-ROS-JNK の経路が関与している可能性がある。本研究では BubR1 が Nox4 の活性化に関与している可能性が示唆されたが、JNK のリン酸化は確認できなかった。その他の経路として、MAPK や ERK などの経路が関与している可能性があるが、今後の検討課題である。

5.結語

Ang II 誘導性の血圧上昇は、BubR1 と Nox4 発現の上昇を介した腎臓における AGTR1 の過剰発現によって引き起こされている可能性がある。

6.文献

- 1) Matsubara Y, Matsumoto T, Aoyagi Y, Tanaka S, Okadome J, Morisaki K et al. Sarcopenia is a prognostic factor for overall survival in patients with critical limb ischemia. *J Vasc Surg.* 2015; 61(4): 945-50.
- 2) Matsubara Y, Matsumoto T, Inoue K, Matsuda D, Yoshiga R, Yoshiya K et al. Sarcopenia is a risk factor for cardiovascular events experienced by patients with critical limb ischemia. *J Vasc Surg.* 2017; 65(5): 1390-1397.
- 3) Morisaki K, Yamaoka T, Iwasa K, Ohmine T. Influence of frailty on treatment outcomes after revascularization in patients with critical limb ischemia. *J Vasc Surg.* 2017; 66(6): 1758-1764.
- 4) Morisaki K, Furuyama T, Yoshiya K, Kurose S, Yoshino S, Nakayama K et al. Frailty in patients with abdominal aortic aneurysm predicts prognosis after elective endovascular aneurysm repair. *J Vasc Surg.* 2020; 72(1): 138-143.
- 5) Tanaka S, Matsumoto T, Matsubara Y, Harada Y, Kyuragi R, Koga JI et al. BubR1 Insufficiency Results in Decreased Macrophage Proliferation and Attenuated Atherogenesis in Apolipoprotein E-Deficient Mice. *J Am Heart Assoc.* 2016; 5(9): e004081.

- 6) Kawakubo E, Matsumoto T, Yoshiya K, Yamashita S, Jogo T, Saeki H et al. BUBR1 Insufficiency Is Correlated with eNOS Reduction Experimentally In Vitro and In Vivo, and in Gastric Cancer Tissue. *Anticancer Res.* 2018; 38(11): 6099-6106.
- 7) Kyuragi R, Matsumoto T, Harada Y, Saito S, Onimaru M, Nakatsu Y et al. BubR1 insufficiency inhibits neointimal hyperplasia through impaired vascular smooth muscle cell proliferation in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2015; 35(2): 341-7.
- 8) Okadome J, Matsumoto T, Yoshiya K, Matsuda D, Tamada K, Onimaru M et al. BubR1 insufficiency impairs angiogenesis in aging and in experimental critical limb ischemic mice. *J Vasc Surg.* 2018; 68(2): 576-586.
- 9) Matsumoto T, Baker DJ, d'Uscio LV, Mozammel G, Katusic ZS, van Deursen JM. Aging-associated vascular phenotype in mutant mice with low levels of BubR1. *Stroke.* 2007; 38(3): 1050-6.
- 10) Guntani A, Matsumoto T, Kyuragi R, Iwasa K, Onohara T, Itoh H. Reduced proliferation of aged human vascular smooth muscle cells--role of oxygen-derived free radicals and BubR1 expression. *J Surg Res.* 2011; 170(1): 143-9.

7.成果発表