

Title	アンジオテンシンII受容体シグナルの骨格筋の修復と再生における多面的役割
Author(s)	藪本, 千鶴
Citation	大阪大学, 2014, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/34399
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

論文内容の要旨

氏 名 (藪 本 千 鶴)	
論文題名	アンジオテンシンII受容体シグナルの骨格筋の修復と再生における多面的役割
論文内容の要旨	
<p>近年、アンジオテンシンII(angiotensin II : AngII)の産生あるいは作用の長期的な抑制が老化現象や個体寿命に影響することが動物レベルで報告されており、レニン・アンジオテンシン系 (renin-angiotensin system:RAS)の抑制を軸としたアンチエイジングや長寿への効果が期待されている。AngIIは体循環系において血圧や水・電解質の恒常性維持に中心的な役割を果たす一方で、心血管系細胞の増殖や肥大、線維化を促進するなど、組織傷害因子として老化関連疾患のさまざまな病態に深く関与している。AngIIには7回膜貫通型のG蛋白質共役型受容体(G protein-coupled receptor:GPCR)ファミリーに属するタイプ1(AT₁)受容体と反対の作用をきたすタイプ2(AT₂)受容体が存在するが、大部分はAT₁受容体を介して心血管リモデリングを促進し、高血圧、心肥大、心不全などの病態形成に関わる。また、AT₁受容体欠損マウスは、野生型マウスと比べて寿命が延長している。一方で、げっ歯類においてアンジオテンシン変換酵素阻害薬 (angiotensin converting enzyme inhibitor : ACEI) やアンジオテンシンII受容体拮抗薬 (angiotensin receptor blocker : ARB) の長期投与によっても寿命が延長することが報告されている。最近、AT₁受容体ノックアウトマウスで寿命が延長する原因として酸化ストレスが軽減し、ミトコンドリア数の減少が抑制され、<i>Nampt</i>, <i>Sirt3</i>遺伝子発現の増加することが報告されている。</p> <p>さらに、AT₁受容体欠損マウスは野生型マウスと比べて加齢に伴う筋力や協調運動、巧緻性などの運動機能の低下が軽減している。骨格筋は修復と再生を繰り返して恒常性が維持されていることから、その原因として骨格筋における再生システムがAT₁受容体によって制御されている可能性が考えられる。しかし、どのようにしてAT₁受容体が骨格筋の再生に関与しているか、そのメカニズムは不明である。</p> <p>そこで、本研究では野生型マウスに急性傷害モデルを作成し、ARBを投与し骨格筋の修復と再生におけるAT₁受容体シグナルの役割を検討した。凍結傷害モデルは野生型C57BL/6Jを用いてVehicle群とARB群の2群に分け、ARBとしてイルベサルタンを使用した。凍結傷害は、マウスの前頸骨筋を液体窒素で冷却し作成した。その結果、ARB群では再生骨格筋重量が増加し、トレッドミルの走行距離が延長し筋力回復が促進した。また、抗eMHC抗体 (embryonic myosin heavy chain) を用いた免疫染色を行ったところ、ARB群では幼若な再生筋線維の数および面積が増加し、著明な再生促進を認めた。一方で、ARB群は細胞外基質遺伝子 (<i>Col3a1</i>, <i>Postn</i>など) 発現低下やMasson trichrome 染色による線維化領域が減少し、組織線維化の抑制が確認された。さらに、炎症性細胞の浸潤について、FACSを用いて解析を行った。ARBはマクロファージをM2化させることが示唆された。</p> <p>次に、ARBの再生促進効果のメカニズムを解明するために、マクロファージが産生する老化促進因子 C1q の検討を行った。補体 C1q は加齢に伴い血中で増加し、古典的補体経路を介さず、C1r, s を介して、Wnt 共受容体である LRP6 を切断することで骨格筋の Wnt/β-Catenin シグナルを活性化し、骨格筋再生能低下をひき起こし、線維化を促進することが最近報告されている。ARB は、組織において C1q を産生するマクロファージの培養細胞株 RAW264.7 において、IL-4 刺激で M2 化したマクロファージにおける <i>C1q</i> の遺伝子発現を減少させた。次に、傷害後に見られる血清 C1q 濃度の上昇は ARB によって抑制された。さらに、ARB 群は傷害後の骨格筋において上昇する <i>C1q</i> 遺伝子発現の抑制が認められ、C1q のタンパク発現量も低下しており、Wnt -β-catenin シグナルの下流遺伝子 <i>Axin2</i> の遺伝子発現も低下した。そのことは、<i>Axin2</i>-LacZ マウスを用いた X-gal 染色で LacZ 陽性細胞の数の減少でも確認された。このことから、ARB は C1q による Wnt/β-Catenin シグナル活性化を抑制することが明らかになった。そこで、ARB の再生促進効果に C1q の遺伝子発現低下が及ぼす影響を C1q タンパクの局所投与で評価した。C1q タンパクの局所投与は ARB による傷害後の骨格筋再生促進効果を阻害した。C1q は Wnt シグナルを活性化し ARB の筋再生促進を阻害し線維化を促進することが考えられた。</p> <p>以上より、ARBは筋線維の成長を促進し、マクロファージをM2化し、C1qを低下させWnt/β-Cateninシグナルの活性</p>	

化を抑制することが明らかになった。このことからAT₁受容体シグナルは、炎症性の微小環境に影響を与え、筋線維の成長を阻害し、マクロファージM1/M2の極性バランスを変化し、老化促進に作用するC1q/Wnt β -cateninシグナルの活性化を促進し、骨格筋の修復と再生において多面的役割を果たしている可能性が示唆された。Wnt/ β -cateninシグナルは、胎児が成長するときや人の幹細胞の機能維持に重要であるが、しかし、また癌や心不全などの原因になることも知られている。本研究の結果から加齢にともない老化を促進する補体分子C1qが、細胞の中でWnt/ β -cateninシグナルを活性化し老化現象の一つである筋肉の再生能低下を引き起こすことをARBが抑制することにより、老化に伴う疾患の予防や治療の標的となることが期待される。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (藪 本 千 鶴)	
	(職) 氏 名
論文審査担当者	主 査 教 授 上 島 悦 子
	副 査 教 授 辻 川 和 丈
	副 査 教 授 橋 本 均
	副 査 教 授 藤 尾 慈

論文審査の結果の要旨

本論文では野生型マウスに急性傷害モデルを作成し、ARBを投与し骨格筋の修復と再生におけるAT₁受容体シグナルの役割を検討した。凍結傷害モデルは野生型C57BL/6Jを用いてVehicle群とARB群の2群に分け、ARBとしてイルベサルタンを使用した。凍結傷害は、マウスの前頸骨筋を液体窒素で冷却し作成した。その結果、ARB群では再生骨格筋重量が増加し、トレッドミルの走行距離が延長し筋力回復が促進した。また、抗eMHC (embryonic myosin heavy chain) 抗体を用いた免疫染色を行ったところ、ARB群では幼若な再生筋線維の数および面積が増加し、著明な再生促進を認めた。一方で、ARB群は細胞外基質遺伝子 (*Col3a1*, *Postn*など) 発現低下やMasson trichrome 染色による線維化領域が減少し、組織線維化の抑制が確認された。さらに炎症性細胞の侵潤について、FACSを用いて解析を行った。ARBはマクロファージをM2化させることが示唆された。

次に、ARB の再生促進効果のメカニズムを解明するために、マクロファージが産生する老化促進因子C1qの検討を行った。補体C1qは加齢に伴い血中で増加し、古典的補体経路を介さず、C1r, sを介して、Wnt 共受容体であるLRP6を切断することで骨格筋のWnt/ β -Cateninシグナルを活性化し、骨格筋再生能低下をひき起こし、線維化を促進することが最近報告されている。ARBは組織においてC1qを産生するマクロファージの培養細胞株RAW264.7において、IL-4刺激でM2化したマクロファージにおけるC1qの遺伝子発現を減少させた。次に、傷害後に見られる血清C1q濃度の上昇はARBによって抑制された。さらに、ARB群は傷害後の骨格筋において上昇するC1q遺伝子発現の抑制が認められ、C1qのタンパク発現量も低下しており、Wnt- β -cateninシグナルの下流遺伝子*Axin2*の遺伝子発現も低下した。このことは、*Axin2-LacZ*マウスを用いたX-gal染色でLacZ陽性細胞の数の減少でも確認された。これにより、ARBはC1qによるWnt/ β -Cateninシグナル活性化を抑制することが明らかになった。そこで、ARBの再生促進効果にC1qの遺伝子発現低下が及ぼす影響をC1qタンパクの局所投与により評価した。C1qタンパクの局所投与はARBによる傷害後の骨格筋再生促進効果を阻害した。C1qはWntシグナルを活性化しARBの筋再生促進を阻害し線維化を促進することが考えられた。

以上より、AT₁受容体シグナルは傷害後の骨格筋の再生において、

1. 筋線維の成長を阻害し、線維化を促進する。
2. マクロファージM1/M2の極性バランスを変化させる。
3. 老化促進に作用するC1q/Wnt/ β -cateninシグナルの活性化を促進する。

など、炎症性の微小環境に影響を与え、骨格筋の修復と再生において多面的役割を果たしている可能性が示唆された。

以上の成果は博士(臨床薬学)の学位論文として十分に価値があるものと認められる。