

Title	RECS1 deficiency in mice induces susceptibility to cystic medial degeneration
Author(s)	趙, 漢軍
Citation	大阪大学, 2006, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/46266">https://hdl.handle.net/11094/46266</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。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">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

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

Osaka University

氏名	趙 漢 軍
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 19919 号
学位授与年月日	平成 18 年 2 月 20 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学系研究科生体制御医学専攻
学位論文名	RECS1 deficiency in mice induces susceptibility to cystic medial degeneration (RECS1 ノックアウトは加齢マウスにおいて嚢胞性中膜壊死を促進する。)
論文審査委員	(主査) 教授 野島 博 (副査) 教授 堀 正二 教授 金田 安史

### 論文内容の要旨

#### 〔 目 的 〕

新規シアストレス感受性遺伝子 RECS1 の機能解析

#### 〔 方法ならびに成績 〕

**方法:** ヒト RECS1 (hRECS1) とマウス RECS1 (mRECS1) の塩基配列をもとにして、GST-hRECS1 N 末端および GST-mRECS1 N 末端融合蛋白を大腸菌で発現できるプラスミドなど各種コンストラクトを作製した。まず、大腸菌で発現させた GST-RECS1 融合蛋白質を用いて、anti-hRECS1 N 末端および anti-mRECS1 N 末端ポリクローナル抗体を作成した。ノーザンブロットで mRECS1 の組織発現を調べ、ウェスタンブロットで hRECS1 の細胞発現を調べた。細胞分画法と hRECS1-GFP 融合蛋白を HeLaS3 細胞に発現させることによって hRECS1 の細胞内局在を調べた。mRECS1 の遺伝子構造に基づいて targeting vector を設計し、RECS1 ノックアウトマウスを作成した。胚、若年および加齢マウス組織切片を観察し、その表現型を調べた。年齢ごとに血液生化学検査、血圧と心拍数測定を行った。特に大動脈を詳しく観察した。大動脈切片の Alcain Blue/PAS 染色、Elastic Van Gieson 染色、大動脈内周囲長測定を行った。大動脈組織抽出液の gelatin zymography、ウェスタンブロットおよび大動脈組織切片の in situ zymography を行った。anti-mRECS1 抗体及び anti-MMP-9 抗体を用いて大動脈組織の免疫染色を行った。その他、血漿の gelatin zymography を行った。マウス大動脈平滑筋細胞を分離し、Quantitative Real-time PCR 法及び gelatin zymography 法で MMP-9 の発現と蛋白合成を評価した。

**成績:** マウス RECS1 (mRECS1) は 309 アミノ酸の疎水性の高い 7 回膜貫通構造たんぱく質をコードし、ヒト RECS1 (hRECS1) 遺伝子と 88% の相同性を示すことが分かった。hRECS1 強制発現した HT1080 の細胞分画および hRECS1-GFP 融合蛋白を強制発現した HeLaS3 細胞の共焦点レーザー顕微鏡観察で、RECS1 がエンドソーム・ライソソームに局在することが分かった。hRECS1 は培養ヒト内皮細胞及び血管平滑筋細胞で発現していることを確認した。mRECS1 は胸腺、精巣および脾臓を除くすべての臓器組織に発現していた。ウェスタンブロット法でマウス心臓と肝臓における mRECS1 の発現を評価したところ、大動脈と肺で検出された 34.4 kDa の分子量とは異なり、

mRECS1 は心臓において 58 kDa、肝臓において 48、69、82 kDa の分子量として検出された。mRECS1 の転写産物は 2.2 kb しか見られないことから、RECS1 は心臓および肝臓において翻訳後修飾を受けていることを見出した。RECS1 ノックアウトマウス (RECS1-KO) 表現型を観察したところ、胚、3-6ヶ月の若齢マウスには異常見られなかったが、加齢 (14ヶ月以上) RECS1-KO マウスでは嚢胞性中膜壊死 (ムコ多糖類の沈着) 及び大動脈の軽度拡張が生じやすいことを見出した。HE 染色法、anti-リンパ球染色及び anti-マクロファージ染色で嚢胞性中膜壊死部位に炎症性細胞浸潤は認めなかった。嚢胞性中膜壊死部位に細胞減少も確認した。血液生化学検査、血圧検査をしたところ、若齢マウス (3-6ヶ月) および加齢 (14-17ヶ月) マウスにおいて野生型 (WT) と KO の間には差異はなかった。Gelatin zymography 法で検討した結果、RECS1-KO マウスにおいては生涯にわたって大動脈 pro-及び active-MMP-9、血漿 NGAL-及び active-MMP-9 レベルが WT マウスより高いことを見出した。加齢マウス大動脈連続凍結切片を anti-MMP-9 染色、Alcian Blue 染色及び in situ zymography で観察したところ、KO マウス大動脈 MMP-9 蛋白レベル及びゲラチナーゼ活性が WT マウスより高いことを確認した。また、増強した MMP-9 シグナルはムコ多糖類の沈着およびゲラチナーゼ活性と一致することも確認した。さらにマウス大動脈平滑筋細胞を分離した。RECS1<sup>-/-</sup>細胞が RECS1<sup>+/+</sup>細胞より MMP-9 蛋白分泌が高いことを確認したが、RECS1<sup>-/-</sup>細胞と RECS1<sup>+/+</sup>細胞の間に MMP-9 mRNA レベルには差異はなかったため、RECS1 は転写後レベルで MMP-9 の量を抑制することが分かった。以上のことから、RECS1 欠損は MMP-9 生産を増加させることによって、嚢胞性中膜壊死に貢献していることを示唆する。

我々はマウス大動脈および血漿中の MMP-9、大動脈 MMP-2 が加齢によって活性化が上昇することも見出した。さらに、マウス大動脈 active-MMP-2 と active-MMP-9 レベルを大動脈直径と比較したところ、大動脈直径の増加は active-MMP-2 レベルと一致したことから、active-MMP-2 レベルが大動脈拡張に直接関与することを見出した。若齢 KO マウスの大動脈 pro-及び active-MMP-2、血漿 pro-MMP-2 レベルが WT マウスより低く、逆に加齢 KO マウスの大動脈 pro-及び active-MMP-2、血漿 pro-MMP-2 レベルが WT マウスより高い結果を Gelatin zymography 法で確認したところ、若齢 KO マウスで代償性 MMP-2 の低下と加齢 KO マウスでの代償性 MMP-2 の高揚が示唆された。これらの結果から、RECS1 ノックアウトによる MMP-9 レベルの上昇と、加齢による大動脈 MMP-2 と MMP-9 の活性化増強および加齢 KO マウスにおける二次的な MMP-2 増加が、加齢した RECS1-KO にのみ大動脈の軽度拡張及び嚢胞性中膜壊死が見られた原因であると結論した。

#### [ 総 括 ]

本研究によって、新規シアストレス感受性遺伝子 RECS1 の機能を明らかにした。RECS1 は転写後レベルで MMP-9 生産を抑制することによって、病的血管リモデリングを抑制する機能を果たす重要な遺伝子である。本研究はまた以下の知見を得た。①MMP-2 と MMP-9 は大動脈拡張及に協力的に貢献するが、活性型 MMP-2 増加は不可欠である。②加齢によって、マウス大動脈及び血漿中のゲラチナーゼ合成は抑制されることに対し、活性化が増強する傾向がある。③年齢が大動脈拡張 (あるいは動脈瘤) の危険因子として知られているが、そのメカニズムには加齢によるゲラチナーゼの活性化増強が関与している。④ELISA 法で血中のゲラチナーゼと動脈瘤との関係を検討する際、加齢による血中ゲラチナーゼ合成及び活性化への反対的な影響を配慮しなければならない。

#### 論文審査の結果の要旨

本研究は、新規シアストレス感受性遺伝子 RECS1 の機能を明らかにするものである。

本研究において申請者は RECS1 ノックアウトマウスを作成し、加齢期において嚢胞性中膜壊死及び軽度の大動脈拡張を促進することを発見した。詳細な解析によって、以下の知見を得た。①RECS1 は MMP-9 生産を抑制した。②MMP-2、MMP-9 は両方とも大動脈拡張及に貢献したが、活性型 MMP-2 の増加は不可欠であった。③加齢によって、マウス大動脈及び血漿中のゲラチナーゼの合成は抑制されたが活性化が増強する傾向が見られた。④加齢が大動脈拡張 (動脈瘤) の危険因子として知られているが、そのメカニズムはゲラチナーゼの過剰な活性化が関与している

ことが示唆された。⑤ELISA法で血中のゲラチナーゼレベルと動脈瘤進展との関係を検討する報告はいくつかあるが、結論はさまざまである。本研究は、血中のゲラチナーゼと動脈瘤との関係を検討する際、加齢による血中ゲラチナーゼ合成及び活性への影響を配慮しなければならないことを示した。

本研究により、RECS1がMMP-9の抑制因子であることが見出された。今後、RECS1を標的した治療法開発が病的心血管病リモデリング改善に貢献できるものと考えられる。また、MMP-2とMMP-9の血管リモデリングにおける協調的關係と加齢によって血中のゲラチナーゼレベルが変動したという知見は臨床診断及び治療に役立てると考えられる。マウスにおける嚢胞性中膜壊死の報告は初めてのことである。また、加齢によるマウス大動脈のゲラチナーゼレベル変動の観察や哺乳類における加齢による血中のゲラチナーゼレベル変動の観察も初めてのことである。これらの成果から本研究は、博士（医学）の学位授与に値するものとする。