

令和 3 年 6 月 2 日現在

機関番号：17102

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K23829

研究課題名（和文）老化マウスモデルを用いた下肢虚血状態における血管内皮機能の働きの検討

研究課題名（英文）Endothelium function under limb ischemia condition of aging mouse model

研究代表者

川久保 英介（KAWAKUBO, Eiske）

九州大学・医学研究院・共同研究員

研究者番号：50644754

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：BubR1野生型マウス(BubR1+/+)とBubR1低発現マウス(BubR1L/-)を用いて下肢虚血モデルマウスを作製し、虚血下肢の筋肉・血管におけるBubR1の発現量およびeNOS発現・活性およびNO産生能を評価・検討を試みた。今回、BubR1+/+マウスおよびBubR1L/-マウスを用いて下肢虚血肢マウスモデルを作製し、虚血肢血流の経時変化からモデルの再現性・妥当性およびBubR1+/+に比べてBubR1L/-の虚血肢血流回復が低い、すなわち血管新生が抑制されていることを確認した。今後、下肢虚血肢におけるeNOS、NO産生とBubR1発現の関連を追加検証していく。

研究成果の学術的意義や社会的意義

老化と動脈硬化に関連するBubR1およびeNOSに関する研究の足がかりとなった。下肢虚血肢モデルマウスを確立し、BubR1の発現量が下肢虚血後の血管新生に関連することを確認し、細胞周期関連遺伝子BubR1が血管内皮機能と関連するメカニズムを解明する一歩となり得る。より詳細な分子学的検討を追求していくための基盤ができたと考えられる。

研究成果の概要（英文）：We tried to reveal the relation between BubR1 expression and eNOS expression or NO production, using mouse ischemic limb model. In this study, We estimated mouse ischemic limb model of BubR1 normal expression mouse and BubR1 low expression mouse. In BubR1 low expression mouse, the recovery of limb blood perfusion after limb ischemia was less than in BubR1 normal expression mouse. This result suggested that BubR1 low expression, which was caused by aging, inhibits angiogenesis. This is the basic of further study to reveal the relation of BubR1 and eNOS or NO.

研究分野：医学

キーワード：加齢 BubR1 eNOS 下肢虚血

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我が国の死因の第一位は悪性新生物、第二位・第三位は心疾患、脳血管疾患であり、加齢と血管新生のメカニズムの解明がこれらの疾患の制御ならびに生命予後改善の観点にとって重要である。しかし、老化の進行、制御に関するメカニズムはいまだ不明瞭である。

BubR1 (budding uninhibited by benzimidazole-related 1) は細胞の有糸分裂における紡錘体チェックポイントに重要な分子である。これまでの研究では、正常の約 10%程度に BubR1 発現を抑制させたマウスにおいては、老化の表現形および加齢初期に特異的に関連する血管表現形が観察された。さらに、これらのマウスでは、BubR1 不全は血管新生を傷害し、VEGF 発現の抑制を介して下肢虚血による下肢喪失を引き起こす。

一方、内皮型一酸化窒素合成酵素 (eNOS) は血管内皮細胞由来の NO 産生に寄与し、過去の研究では、eNOS の発現および活性のいずれもが加齢により減少しており、加齢による活性酸素生成の増加は、NO 喪失に対する最も有力な機構として説明されている。

ここで、この BubR1 と eNOS の関連もしくは相互作用はこれまで研究されていなかったが、我々は細胞モデル、動物モデル、およびヒト胃癌組織において、BubR1 発現低下が eNOS の発現を抑制することを報告し、その抑制が VEGF-PI3K/Akt 経路と異なることを示唆した。

BubR1 低発現マウスにおける下肢虚血モデルでは血管新生が抑制され VEGF 発現も抑制されていたが、一方で BubR1 発現抑制によって eNOS 発現は低下するものの VEGF との関連は明確化されていない。

2. 研究の目的

前述のとおりこれまで我々は、細胞老化に関連する遺伝子 BubR1 について複数の報告を行ってきたが、本研究の目的は、BubR1 低発現マウスにおける下肢虚血モデルにおける eNOS 発現や VEGF 発現・応答性を調べることによって、BubR1 が血管内皮機能の低下に関与していることを明確化することである。

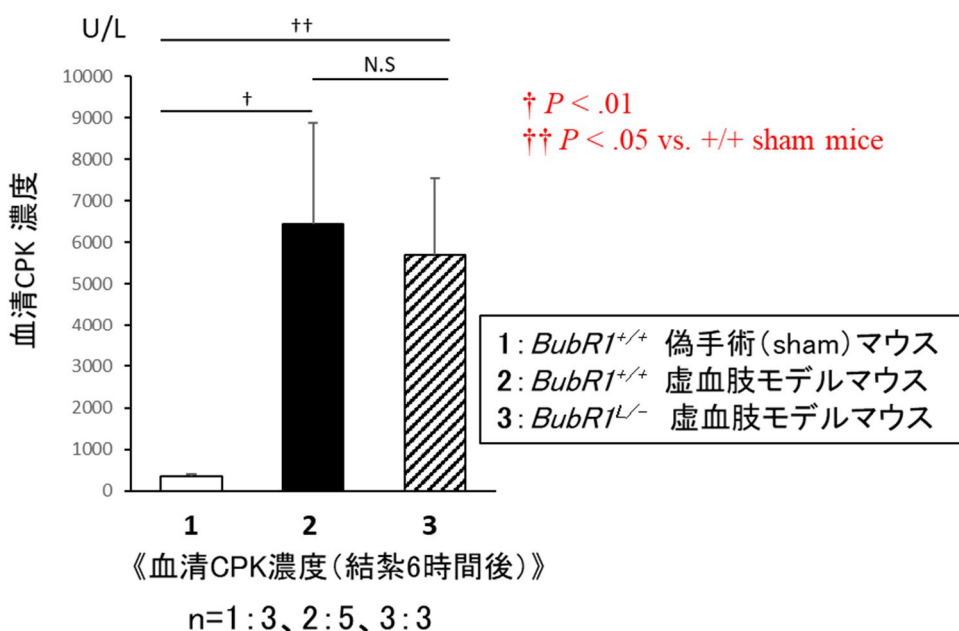
3. 研究の方法

BubR1 野生型マウス (BubR1^{+/+}) と BubR1 低発現マウス (BubR1^{L/-}) を用い、それぞれのマウスの左下肢の総大腿動脈から内・外伏在動脈までを、伴走静脈と共に除去して下肢虚血モデルマウスを作成した。

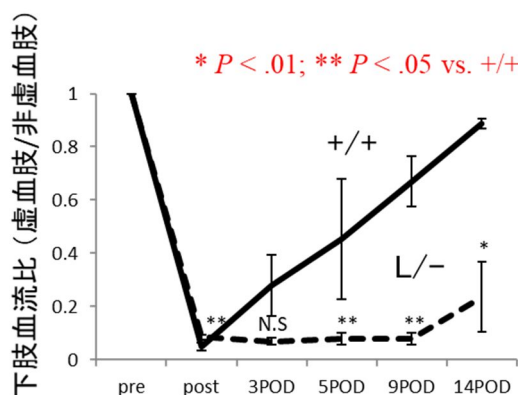
虚血術前、術後 1, 4, 7, 10 日目に採血を行い血液検体から cGMP を測定し NO 産生能として評価することを試みた。また虚血術前、術後 1, 4, 7, 10 日のマウスの左側の腓腹筋および胸腺を採取し、各々からタンパク抽出し、PI3K, Akt, p-Akt, eNOS, p-eNOS, BubR1 および p38, p-p38 の発現量をウエスタンブロットで評価することを試みた。

4. 研究成果

まず、下肢虚血モデルを作製した。今回の実験において作成した下肢虚血モデルの妥当性を検討した。結紮 6 時間後の血清 CPK 値は BubR1^{+/+} マウス、BubR1^{L/-} マウスいずれも上昇を認め、虚血直後に組織障害が惹起されることを確認した。



次に虚血肢作成後の血流回復をレーザードップラー(LDPI)で評価したところ、BubR1+/+マウスでは経時的に虚血肢の血流が回復したが、BubR1L/-マウスの下肢血流比は有意に回復が乏しかった。虚血肢作成後の血流回復は、血管新生による側副血行路の発達を意味しており、このことより、BubR1 低発現下では血管新生が阻害されることが示唆された。



《虚血肢作製術後におけるLDPIを用いた血流回復の経時的評価》

n=6 (each)

以上により今回作成のマウス下肢虚血肢モデルの妥当性を確認したため、今後は頭書の計画に基づき、BubR1+/+マウスと BubR1L/-マウスの飼育および標本(血液、胸腺、腓腹筋)の採取を継続する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------