

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5 月 13 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591408

研究課題名（和文） 動脈硬化病変の進展における老化制御遺伝子（BubR1）の関与と新しい制御法の開発

研究課題名（英文） Role of oxygen-derived free radicals and BubR1 expression

## 研究代表者

郡谷 篤史（GUNTANI ATSUSHI）

九州大学・大学病院・特任助教

研究者番号：50364154

## 研究成果の概要（和文）：

細胞周期関連遺伝子 BubR1 (Budding uninhibited by benimidazole) の発現を低下させたマウスでは、早期に平滑筋細胞の減少や活性酸素の産生増加といった老化関連の血管異常を認めているが、本研究において、我々はヒト血管平滑筋細胞において老化と酸化ストレスが BubR1 発現に及ぼす影響を検証した。ヒト大動脈平滑筋細胞 (hAoSMC) を用い、細胞増殖能及び、Angiotensin II (AngII) や H2O2 で刺激した際の BubR1 発現を検討した。hAoSMC において、細胞増殖能は若年群と比較し老年群で有意に低く、AngII や H2O2 刺激は BubR1 発現を増加させ、BubR1 発現の増加は p38 MAPK 阻害剤や NADH/NADPH オキシダーゼ阻害剤により相殺された。また siRNA を用いて BubR1 発現を抑制することによって、細胞増殖能は低下し、ROS 産生は増加した。以上より、老化に関連した BubR1 遺伝子発現の低下により活性酸素に対する反応障害を認め、ヒト大動脈平滑筋細胞の増殖能の低下が起こりうることを示唆された。

## 研究成果の概要（英文）：

BubR1 expression and hAoSMC proliferative ability were significantly decreased in the aged hAoSMC. Angiotensin II and H2O2 upregulated BubR1 expression in young hAoSMC, and the upregulation was abrogated by a p38 MAPK inhibitor or an inhibitor of the NADH/NADPH oxidase. siRNA against BubR1 reduced proliferative activity and increased ROS production in hAoSMC.

These findings demonstrate BubR1 mRNA expression decreases along with proliferation in aged hAoSMC. Aging-related loss of BubR1 and subsequent impairment of reactivity to ROS may explain reduced proliferative capacity of aged smooth muscle cells.

These findings demonstrate BubR1 mRNA expression decreases along with proliferation in aged hAoSMC. Aging-related loss of BubR1 and subsequent impairment of reactivity to ROS may explain reduced proliferative capacity of aged smooth muscle cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般

キーワード：血管外科学

1. 研究開始当初の背景

多くの血管病変は、加齢とともにその罹患率が増加し、年齢そのものが重要な危険因子であると報告されている。老化した血管や動脈硬化病変では、血管平滑筋細胞の機能障害と細胞周期異常を認める。(Ageing Research Reviews 1 2002;167-179)

また活性酸素のみならず細胞周期が老化に伴う血管機能障害に関与しているとの報告がある。(Circ Res 1998;82,704-712)

老化に影響を与える遺伝子群の同定・解析・治療への応用を目的に、我々グループは、平成16年度萌芽研究によって細胞周期遺伝子 BubR1 の低下は、老化現象を起し血管系においても老化の原因になることを解明してきた。

これまでに細胞周期遺伝子 BubR1 の発現を減少させたマウスの表現形は、老化であることが明らかとなり、(Jan van Deursen et al. 2004 Nature genetics) その際 Nitric oxide synthase activity が低下することが明らかにされている。(Matsumoto, Jan vanDeursen, Katusic et al, 2007 Stroke)

2. 研究の目的

第一に、ヒト大動脈平滑筋および動脈硬化病変より分離した平滑筋を使い、細胞周期関連遺伝子 BubR1 遺伝子の発現の検討、およびその signaling pathway を解明する。さらに BubR1 遺伝子が動脈硬化病変にどのような影響を与えるかを検討し、その結果を踏まえた老化制御に対する治療法の開発を目指す。

3. 研究の方法

本研究は、ノックアウトマウスでの遺伝子の基礎解析及び臨床検体での feed back とその基礎解析を踏まえた臨床応用を目指した治療法の開発の2点の特徴とする。

前段階として、ヒト大動脈平滑筋細胞

(hAoSMC) を Cambrex Bio Science

(Walkersville, MD)より購入し、ヒト大動脈平滑筋細胞を使い、細胞周期関連遺伝子 BubR1 遺伝子の発現の検討を以下の方法で行った。

若年群(ドナー年齢17-30歳, n=3)あるいは老年群(ドナー年齢57-62歳, n=3)を適正使用方法に従い培養した。基本的には、培養液 SmGM-2 に5% fetal bovine serum (FBS) を加え、37°C、5% CO2 インキュベーターの条件下に培養した。細胞が培養フラスコの80-90%まで増殖した時点で0.05% trypsin/EDTA を用いて継代した。実験には5-10継代を使用した。

細胞増殖能を評価するための細胞カウントは、ヒト大動脈平滑筋細胞(hAoSMC)を6wellプレートにそれぞれ3.5 x 10<sup>3</sup> cells/wellの密度で播種、培養した。翌日にFBS添加なしの培養液(SmGM-2 + 0.5% FBS)に交換し、24時間飢餓状態とした。その後FBS添加ありの培養液(SmGM-2 + 10% FBS)に交換し、0、2、4、6日で顕微鏡下に Neubauer chamber を用いて直接細胞数をカウントした。

Reverse Transcriptase PCR (RT-PCR)を用いて遺伝子発現の評価を行った。ヒト大動脈平滑筋細胞(hAoSMC)を100-mmディッシュで培養し、FBS添加なしの培養液(SmGM-2 + 0.5% FBS)にて24時間の飢餓状態にした後に、試薬(H202、AngII、AngII + DPI、AngII + SB203580)を添加した。HAoSMC(約2.5 x 10<sup>6</sup>個)よりRNeasy kit(Qiagen, Valencia, CA)を用いてRNAを抽出した。2.5 μgのRNAはoligo-dT 18-mer primerを使用し、SuperScript II Reverse

Transcriptase(Invitrogen, Carlsbad, CA)を用いてfirst-strand cDNAを作成した。PCR増幅はPerkin-Elmer Gene Amp PCR system 9600(Wellesley, MA)を使用し、温度条件は1 cycle (94°C、4 min)、28 cycles(94°C、30 sec)、(56°C、30 sec)、(72°C、30 sec)、1 cycle (72°C、5 min)に設定した。PCRプ

ライマーはそれぞれ human BubR1 5' -GAGCACTGGCACAAGAATCTG-3', 5' -CTTCTGAAATATCGCATCTG-3', human Bub3 5' -TAACGAGTTCAAGCTGAACC-3', 5' -GCATACTTCTTCTTCTGTACC-3' を用いた。コントロールとして、young ドナーと aged ドナーで発現レベルが変わらない Bub3 を使用した。PCR 増幅サンプルは 1.2% ゲル上で電気泳動し、RAS-3000 densitometer (Loats Associates, Westminster, MD) で評価した。それぞれのサンプルでの相対的発現量は GAPDH を用いて補正した。RNA Interference として二本鎖 RNAs (21ヌクレオチド) は、5' -AAGGGAAGCCGAGCUGUUGAC-3'、1281-1301 in human BubR1 (accession number AF068760 GenBank) を目的配列とし、Genenet へ委託生産したものを使用した。コントロールとして luciferase mRNA (accession number X65324)、the firefly (*Photinus pyralis*) を使用した。Double nucleotides (dTdT) をそれぞれの塩基配列の 3' 末端に加えた。Lipofectamine (Invitrogen) を用いて RNA をヒト大動脈平滑筋細胞 (hAoSMC) または HeLa 細胞へトランスフェクションした。活性酸素 Reactive Oxygen Species (ROS) の測定は以下の方法で行った。若年群ドナーおよび老年群ドナーのヒト大動脈平滑筋細胞 (hAoSMC) より産生される ROS を発光試薬 L-012 を用いて測定した。ルミノール誘導体である L-012 は ROS と反応することにより化学発光し、高感度に ROS を検出可能である。hAoSMC を培養し、FBS 添加なしの培養液 (SmGM-2 + 0.5% FBS) にて 24 時間の飢餓状態にした後に、Angiotensin II (AngII) を添加した。トリプシン処理にて細胞を回収し、細胞浮遊液 (5 x 10<sup>4</sup> cells/ml) は Krebs-HEPES buffer を添加しインキュベーター (37°C, 5 min) した。L-012 (50 μmol/L) を添加し、さらにインキュベーター (37°C, 5 min) の後に、発光量をルミノメーター (Lumat LB 9507, Berthold Technologies, Oak Ridge, TN) にて計測した。発光量はピーク値 [counts per minute (cpm)] と chemiluminescence intensity curve (integral chemiluminescence) を用いて判定した。

#### 4. 研究成果

(1) ヒト大動脈平滑筋細胞 (hAoSMC) は young 群あるいは aged 群を Cambrex Bio Science (Walkersville, MD) より購入し、適正使用方法に従い培養した。基本的には、培養液 SmGM-2 に 5% fetal bovine serum (FBS) を加え、37°C、5% CO<sub>2</sub> インキュベーターの条件下に培養した。細胞が培養フラスコの 80-90% まで増殖した時点で 0.05%

trypsin/EDTA を用いて継代した。

(2) ヒト大動脈平滑筋細胞 (hAoSMC) において、siRNA 導入 (Lipofectamine 法) にて BubR1 発現を抑制し、細胞増殖および ROS 産生を検討した。

siRNA 導入によって、BubR1 発現が抑制されたヒト大動脈平滑筋細胞 (hAoSMC) では細胞増殖は低下していることが確認された。

siRNA 導入によって BubR1 発現が抑制されたヒト大動脈平滑筋細胞 (hAoSMC) では活性酸素の産生が増加していることが確認された。若年と老年ドナーからのヒト大動脈平滑筋細胞を用いて、老化に伴う細胞周期遺伝子 BubR1 発現の減少と Nitric oxide synthase activity の低下を確認した。

(3) マウス (C57BL6) は週齢により 2 群に分けた。若年群、老年群のそれぞれのマウスから胸腺、大動脈を摘出し、RNA を抽出した。Real-time PCR 法により Bub1b 遺伝子の発現を定量し、若年群と老年群での違いを検討した結果、野生型マウス (C57BL6) の胸腺では、若年群と比べ老年群では有意に Bub1b 遺伝子発現が低下していることが確認された。一方で、野生型マウス (C57BL6) の大動脈では、若年群と老年群で Bub1b 遺伝子発現に差を認めなかった。

動脈硬化性病変において、内皮細胞の傷害などを契機に平滑筋細胞が分裂、遊走を繰り返すことによって Bub1b 遺伝子発現は低下し、細胞の増殖能の低下につながると考察した。以上より、若年と老年マウスにおいては、老化に伴う細胞周期遺伝子 BubR1 発現の減少が確認できた。

(4) 血管平滑筋細胞での、細胞周期関連遺伝子群の発現を検討することによって、平滑筋の増殖制御機構を明らかにするため、動脈硬化性病変と対照群の手術標本および病理解剖標本における細胞周期関連遺伝子群の発現程度を検討した。

九州大学病院で病理解剖を受けるものうち、倫理委員会の審査、了承を得て、採取した、動脈硬化血管および正常大動脈血管を用いた。

血管壁は液体窒素内にて瞬間凍結し、RNA を抽出し、RT-PCR 法をもちいて細胞周期関連遺伝子群の領域を増幅し、その遺伝子発現の程度を検討した。

病理解剖標本より提供された、動脈硬化血管および正常大動脈血管を用いて、動脈硬化に伴う細胞周期遺伝子 BubR1 発現の減少を確認した。

(5) ノックアウトマウス

(BubR1 hypomorphic mouse, BubR1-ApoE double knockout mouse) の作製及び分子機構の解明及び動脈硬化病変に対する影響の解析を行っている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

- ① A Guntani et. al.、Reduced Proliferation of Aged Human Vascular Smooth Muscle Cells -Role of Oxygen-Derived Free Radicals and BubR1 Expression、査読有、J Surg Research 170、2011、143-149  
doi:10.1016/j.jss.2011.03.024

[学会発表] (計 1 件)

- ① 郡谷 篤史等、6th Annual Academic Surgical congress、平成23年、アメリカ

6. 研究組織

(1) 研究代表者

郡谷 篤史 (GUNTANI ATSUSHI)  
九州大学大学病院 血管外科 特任助教  
研究者番号：50364154

(2) 研究分担者

前原 喜彦 (MAEHARA YOSHIHIKO)  
九州大学 医学 研究院 教授  
研究者番号：80165662