

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 29 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462164

研究課題名(和文) 動脈硬化薬における老化制御遺伝子BubR1の役割とその分子機序の解明

研究課題名(英文) Role of age-associated BubR1 gene in atherogenesis and its molecular mechanism

## 研究代表者

松本 拓也 (Matsumoto, Takuya)

九州大学・大学病院・講師

研究者番号：20374168

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：細胞周期M期を制御するBubR1の低下は、老化様の血管病変を呈する。我々は、BubR1の低下したマウスと動脈硬化モデルのApoEノックアウトマウスを交配させ、BubR1低下の動脈硬化薬に対する影響を検討した。BubR1の低下により、宿主動脈細胞、また血球系の細胞の増殖能の低下をもたらした動脈硬化薬を抑制した。BubR1は、動脈硬化薬を制御する標的遺伝子になる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：BubR1 is an essential component of the spindle checkpoint. BubR1 insufficiency causes early aging-associated vascular phenotypes. We generated low-BubR1-expressing mutant (BubR1L/L) and apolipoprotein E-deficient (ApoE<sup>-/-</sup>) mice (BubR1L/L-ApoE<sup>-/-</sup> mice) to investigate the effects of BubR1 on atherosclerosis. 8W old male BubR1L/L-ApoE<sup>-/-</sup> mice and age-matched ApoE<sup>-/-</sup> mice were used. Atherosclerotic lesion development after being fed a high-cholesterol diet for 12 weeks was inhibited in BubR1L/L-ApoE<sup>-/-</sup> mice compared with ApoE<sup>-/-</sup> mice, and was accompanied by decreased accumulation of macrophages. To address the relative contribution of BubR1 on bone marrow-derived cells compared with non-bone marrow-derived cells, we performed bone marrow transplantation in ApoE<sup>-/-</sup> and BubR1L/L-ApoE<sup>-/-</sup> mice. Decreased BubR1 in bone marrow cells and non-bone marrow-derived cells decreased the atherosclerotic burden. BubR1 may represent a promising new target for regulating atherosclerosis.

研究分野：血管外科

キーワード：細胞周期 動脈硬化 マクロファージ 増殖

## 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となっている。近年、老化に伴う血管平滑筋細胞の機能異常に活性酸素(ROS)や細胞周期異常の関与が示唆されている。細胞周期M期(有糸分裂)を制御する紡錘体形成チェックポイント蛋白 BubR1(Budding uninhibited by benimidazole)の発現を低下させたマウスでは、発癌率の上昇に加えて、若年より平滑筋細胞の減少や ROS の産生増加といった老年期に起こる血管異常を認めている。

また、Matsumoto, Kyuragi らによる解析では、平滑筋細胞の減少は、BubR1 の発現量に依存することがわかっている。BubR1 の発現量が、25%程度に減弱したマウスでの表現系は、正常であるが、11%程度に減弱したマウスでは大動脈平滑筋細胞数の減少、大動脈の線維化、白内障などを認める。

また、Matsumoto, Guntani らによる解析では、ヒト大動脈動脈硬化巣では、正常大動脈に比べ BubR1 の発現量は低下していることが分かった。そこで今回我々は、動脈硬化を惹起する ApoE 欠損マウスと BubR1 の発現が低下しているマウスを交配させ、動脈硬化層への影響を検討する。

## 2. 研究の目的

“ヒトは、動脈とともに老いる; William Osler (1848-1919)”の格言のごとく老化は、動脈硬化を促進し心筋梗塞、脳血管障害など致死的な疾患の要因となる。しかし、未だ老化に対する治療法は皆無である。そこで老化に影響を与える遺伝子群の同定・解析・治療への応用は急務である。我々は、**平成16年度萌芽研究/研究代表、平成22~24年度基盤研究(C)**によって細胞周期遺伝子BubR1の低下は、老化現象を起こし、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。

**(Matsumoto, et al Stroke 38:1050-1056, 2007)**

**(Guntani, Matsumoto, et al J Surg Res 170, 143-149, 2011)**

今回は、BubR1 遺伝子の低下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

我々が既に構築し BubR1 発現量が 25% に低下した BubR1 hypomorphic mouse(BubR<sup>LL</sup> mice)と動脈硬化モデルである (apolipoprotein E-deficient mice; ApoE<sup>-/-</sup>) を交配させ、動脈硬化病変に対する BubR1 の分子機構を解析する。

5~6 週齢の雄のマウスに高脂肪食投与群と普通食投与群とで ApoE deficient mice との比較により BubR1 低下の動脈硬化病変に対する影響を、投与後 4 週、16 週目で組織学的に大動脈を含む各臓器を評価する。

マウス血清にて T-cholesterol を含む血清生化学的検討を行う。

大動脈に関しては、ズダン III 染色にて動脈硬化病変の占める割合を検討する。

マウス大動脈平滑筋または腹腔内マクロファージの分離及び in vitro での細胞増殖能及び遊走能の比較を行う。

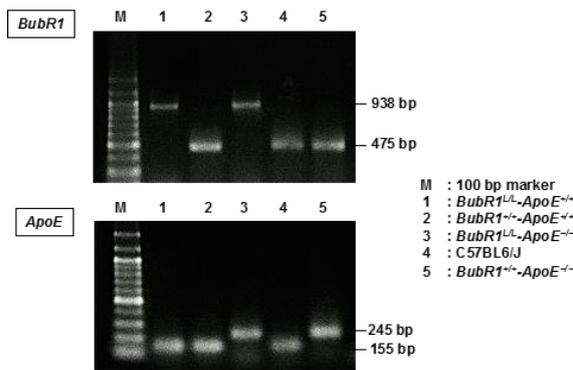
BubR1 遺伝子導入による表現型変化の検討を行う。

BubR1 遺伝子導入の影響を等尺性収縮法による血管内皮機能及び平滑筋機能評価で行う。

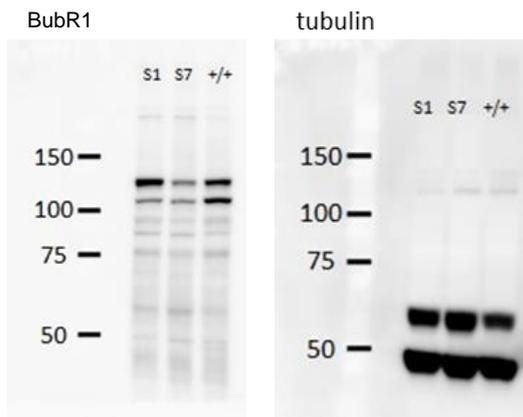
## 4. 研究成果

### (1) BubR1<sup>LL</sup>-ApoE<sup>-/-</sup> Mice の作成

BubR1<sup>LL</sup> と ApoE<sup>-/-</sup> Mice を交配させた。以前の報告と同じ primer を用いた。BubR1 の Mutant allele は、938bp で、Wild-type allele は、475bp で detect され、また ApoE の knockout allele は、245bp, Wild-type allele は 155bp として Detect した。これらの組み合わせにより産仔より BubR1<sup>LL</sup>-ApoE<sup>-/-</sup> Mice の確認した(図1)。Real time PCR で胸腺、大動脈、血球、心臓での BubR1 mRNA の発現を検討した。BubR1<sup>LL</sup>-ApoE<sup>-/-</sup> Mice での BubR1 mRNA の発現量は ApoE<sup>-/-</sup> Mice の BubR1 mRNA に比べ低下しており、胸腺では 19.9%、大動脈では 24.7%、血球では 24.6%、心臓では 20.3%であった。BubR1 タンパク量を Western blot 法により定量したところ胸腺では、21.9%と低下を認め、BubR1<sup>LL</sup>-ApoE<sup>-/-</sup> Mice における BubR1 の低発現を確認できた(図2)。



(図 1)



(図 2)

## (2) *BubR1<sup>L/L</sup>-ApoE<sup>-/-</sup>* Mice のプロフィール

*BubR1<sup>L/L</sup>-ApoE<sup>-/-</sup>* Mice の体重は、*ApoE<sup>-/-</sup>* Mice と変化なかった。また白血球分画も差異を認めなかった。*BubR1<sup>+/+</sup>* と *BubR1<sup>L/L</sup>* Mice では高コレステロール食を接種後も血清コレステロールの上昇は認めず、大動脈に動脈硬化巣も認めなかった。一方 *BubR1<sup>L/L</sup>-ApoE<sup>-/-</sup>* Mice と *ApoE<sup>-/-</sup>* Mice は、高コレステロール食を接種後血清コレステロールの上昇は認めたが有意差は認めず同様に上昇した。その他の LDL, HDL, TG も有意差を認めなかった。骨髄移植後も *BubR1<sup>L/L</sup>-ApoE<sup>-/-</sup>* Mice、*ApoE<sup>-/-</sup>* Mice では総コレステロール、LDL コレステロールの上昇を認めた。表現型、出生率についても差異を認めなかった。

## (3) *BubR1<sup>L/L</sup>-ApoE<sup>-/-</sup>* Mice の動脈硬化巣病変の ZudanIII 染色による評価

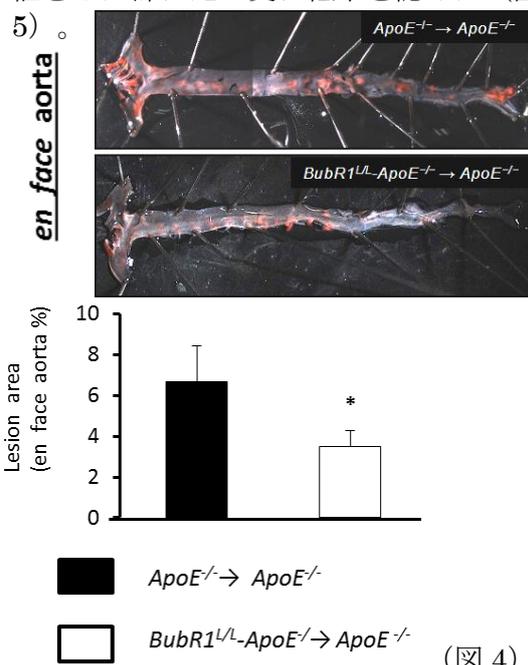
*BubR1<sup>L/L</sup>-ApoE<sup>-/-</sup>* Mice の大動脈での動脈硬化巣は、*ApoE<sup>-/-</sup>* Mice に比べ大動脈全体、大動脈弓部、下行大動脈で優位に低下していた (図 3)。



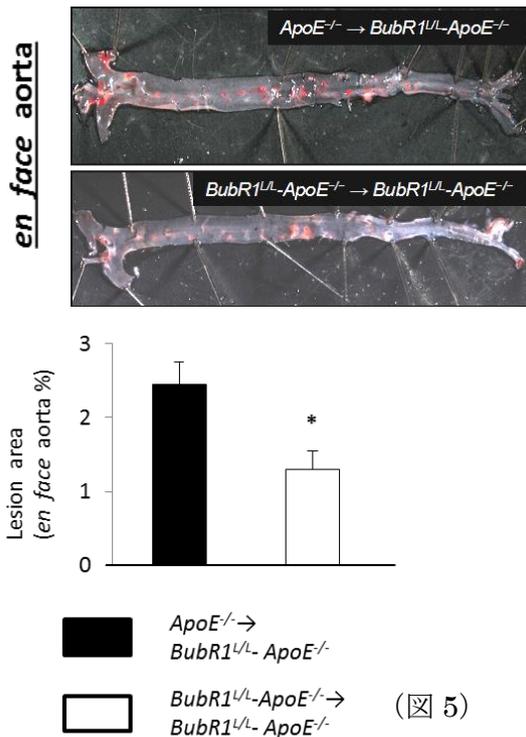
(図 3)

## (4) *BubR1<sup>L/L</sup>-ApoE<sup>-/-</sup>* Mice の骨髄移植による動脈硬化巣病変への影響

血球系での *BubR1* の低下が動脈硬化巣病変への与える影響のために *ApoE<sup>-/-</sup>* Mice、*BubR1<sup>L/L</sup>-ApoE<sup>-/-</sup>* Mice から *ApoE<sup>-/-</sup>* Mice へ骨髄移植を行い動脈硬化巣を ZudanIII 染色で評価したところ、*BubR1<sup>L/L</sup>-ApoE<sup>-/-</sup>* Mice の骨髄を移植した群で *ApoE<sup>-/-</sup>* Mice より骨髄移植をした群に比べ低下を認めた (図 4)。また宿主側での *BubR1* の低下が動脈硬化巣病変への与える影響のために *ApoE<sup>-/-</sup>* Mice、*BubR1<sup>L/L</sup>-ApoE<sup>-/-</sup>* Mice から *BubR1<sup>L/L</sup>-ApoE<sup>-/-</sup>* Mice へ骨髄移植を行い動脈硬化巣を ZudanIII 染色で評価したところ、*BubR1<sup>L/L</sup>-ApoE<sup>-/-</sup>* Mice の骨髄を移植した群で *ApoE<sup>-/-</sup>* Mice より骨髄移植をした群に比べ更に低下を認めた (図 5)。

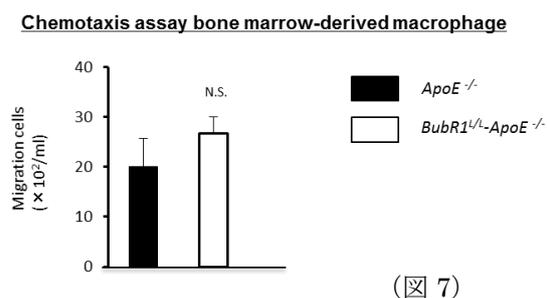
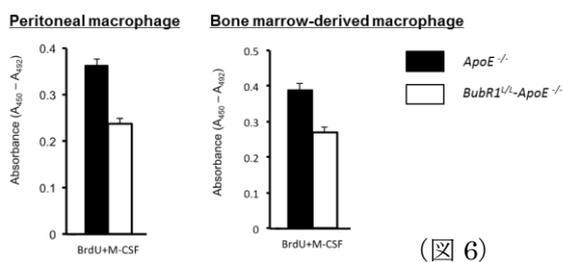


(図 4)



### (5) In vitro におけるマクロファージの遊走能、増殖能に対する BubR1 低下の影響

ApoE<sup>-/-</sup> Mice、BubR1<sup>LL</sup>-ApoE<sup>-/-</sup> Mice から腹腔内マクロファージ、骨髄マクロファージを採取し、増殖能を BrdU を用い M-CSF 刺激下で評価したところ BubR1<sup>LL</sup>-ApoE<sup>-/-</sup> Mice で優位に低下していた (図 6)。また遊走能に関しては Boyden Chamber 法により比較検討したところ有意差を認めず影響を与えなかった (図 7)。



### 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 9 件)

1. Matsumoto T, Kawakubo E, Matsuda D, Takano T, Okadome J, Morisaki K, Fukunaga R, Hu H, Kishimoto J, Ohkusa T, Onohara T, Maehara Y. Late Onset of Thoracic Aortic Disease Events after Abdominal Aortic Aneurysm Repair: Effect on Survival and Possible Associated Factors. *Angiol.* 2014;2(2):Open Access.
2. Matsumoto T, Tanaka S, Okadome J, Kyuragi R, Fukunaga R, Kawakubo E, Itoh H, Okazaki J, Shirabe J, Fukuda A, Maehara Y. Midterm outcomes of endovascular repair for abdominal aortic aneurysms with the on-label use compared with the off-label use of an endoprosthesis. *Surgery Today.* 2015;45(7):880-5.
3. Matsubara Y, Matsumoto T, Aoyagi Y, Tanaka S, Okadome J, Morisaki K, Shirabe K, Maehara Y. Sarcopenia is a prognostic factor for overall survival in patients with critical limb ischemia. *J Vasc Surg.* 2015;61(4):945-50.
4. Kyuragi R, Matsumoto T, Harada Y, Saito S, Onimaru M, Nakatsu Y, Tsuzuki T, Nomura M, Yonemitsu Y, Maehara Y. BubR1 insufficiency impairs vascular smooth muscle cell proliferation and inhibits neointimal hyperplasia in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2015;35(2):341-7.
5. Matsumoto T, Matsuda D, Honma K, Aoyagi Y, Okadome J, Morisaki K, Tanaka S, Saeki H, Oki E, Maehara Y. One-stage Procedure for Concomitant Abdominal Aortic Aneurysm and Gastric Cancer. *Anticancer Res.* 2015;35:6909-12.
6. Okadome J, Matsumoto T, Aoyagi Y, Matsuda D, Tanaka S, Kawakubo E, Kyuragi R, Morisaki K, Honma K, Iwasa K, Ohmine T, Guntani A, Fukunaga R, Maehara Y.

Long-Term Results of a Hybrid Revascularization Procedure for Peripheral Arterial Disease. Fukuoka Igaku Zasshi. 2015;106(9):254-61.

7. Morisaki K, Matsumoto T, Matsubara Y, Inoue K, Aoyagi Y, Matsuda D, Tanaka S, Okadome J, Maehara Y. Elective endovascular vs. open repair for abdominal aortic aneurysm in octogenarians. Vascular. 2015 Jul 28. pii: 1708538115594967. [Epub ahead of print].
8. Matsumoto T, Matsubara Y, Aoyagi Y, Matsuda D, Okadome J, Morisaki K, Inoue K, Tanaka S, Ohkusa T, Maehara Y. Radial force measurement of endovascular stents: Influence of stent design and diameter. Vascular. 2016 Apr;24(2):171-6.
9. Miyazaki Y, Furuyama T, Matsubara Y, Yoshiya K, Yoshiga R, Inoue K, Matsuda D, Aoyagi Y, Matsumoto T, Kato M, Maehara Y. Thoracic endovascular aortic repair for complicated chronic type B aortic dissection in a patient on hemodialysis with recurrent ischemic colitis. Surgical Case Reports. 2016 Dec;2(1):38.

[学会発表] (計 11 件)

1. 松本拓也、福永亮大、森崎浩一、岡留淳、田中慎一、青柳幸彦、松田大介、中野覚、江頭健輔、米満吉和、前原喜彦. 慢性重症虚血肢に対する最新の血管新生療法と展望 第44回日本心臓血管学会学術集会 (平成26年2月19-21日、熊本)
2. 田中慎一、松本拓也、青柳幸彦、松田大介、岡留淳、森崎浩一、福永亮大、前原喜彦. マウス動脈硬化化薬における細胞周期関連因子 BubR1 の機能解析 第114回日本外科学会定期学術集会 (平成26年4月3-5日、京都)
3. 松本拓也、福永亮大、森崎浩一、岡留淳、田中慎一、青柳幸彦、松田大介、前原喜彦.

ショートネック TEVAR に対する戦略、トラブルシューティングと遠隔期再手術

第42回日本血管外科学会学術総会 (平成26年5月21-23日、青森)

4. 松本拓也、松原裕、井上健太郎、青柳幸彦、松田大介、田中慎一、岡留淳、森崎浩一、米満吉和、前原喜彦. 慢性虚血肢に対する治療戦略のパラダイムシフト-内膜肥厚抑制効果と血管新生療法の最前線- 第55回日本脈管学会総会 (平成26年10月30-11月1日、倉敷)
5. 松本拓也、森崎浩一、岡留淳、田中慎一、松田大介、青柳幸彦、松原裕、井上健太郎、米満吉和、前原喜彦. PAD 治療の現状と展望 Alliance for Revolution and Interventional Cardiology Advancement (ARIA2014) (平成26年11月21-23日、福岡)
6. 松本拓也、森崎浩一、岡留淳、田中慎一、松田大介、青柳幸彦、松原裕、井上健太郎、前原喜彦. アクセス困難症例に対する TEVAR の機種選択と対策 Alliance for Revolution and Interventional Cardiology Advancement (ARIA2014) (平成26年11月21-23日、福岡)
7. 松本拓也、福永亮大、森崎浩一、岡留淳、田中慎一、青柳幸彦、松田大介、松原裕、井上健太郎、中野覚、江頭健輔、米満吉和、前原喜彦. 慢性重症虚血肢に対する革新的な血管新生療法の開発 第45回日本心臓血管外科学会学術総会 (平成27年2月16日-18日、京都)
8. 松本拓也、井上健太郎、青柳幸彦、松田大介、田中慎一、岡留淳、森崎浩一、松原裕、調憲、前原喜彦. 骨格筋減少症 sarcopenia による重症虚血肢患者予後の評価法と Bypass first-WIFI 分類との関連性- 第43回日本血管外科学会学術総会 (平成27年6月3日-6月5日、横浜)
9. 松本拓也、吉屋圭史、吉賀亮輔、青柳幸彦、松田大介、松原裕、井上健太郎、中野覚、江頭健輔、米満吉和、

前原喜彦.

末梢動脈疾患に対する革新的な血管  
新生療法の開発の現況と展望

第 56 回日本脈管学会

(平成 27 年 10 月 29-31 日 東京虎  
ノ門ヒルズフォーラム)

10. 松本 拓也、古山正、吉屋圭史、吉賀  
亮輔、青柳幸彦、松田大介、松原裕、  
井上健太郎、前原喜彦。

大動脈腸骨大腿動脈領域における外  
科的血行再建術

第 56 回日本脈管学会

(平成 27 年 10 月 29-31 日 東京虎  
ノ門ヒルズフォーラム)

11. 松本拓也、吉屋圭史、吉賀亮輔、青  
柳幸彦、松田大介、松原裕、井上健  
太郎、中野覚、江頭健輔、米満吉和、  
前原喜彦。末梢動脈疾患に対する革  
新的な血管新生療法の現況と展望

第 46 回日本心臓血管外科学会学術  
総会  
(平成 28 年 2 月 16 日-18 日、名古屋 )

[図書] (計 0 件)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

松本 拓也 (MATSUMOTO Takuya)

九州大学・大学病院・講師

研究者番号：20374168

### (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

古山 正 (FURUYAMA Tadashi)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：00419590

福永 亮大 (FUKUNAGA Ryota)

九州大学・大学病院・助教

(H25. 4. 1-H27. 3. 31 まで研究分担者)

研究者番号：00529860

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：