

主 論 文 要 旨

論文提出者氏名：高山 卓

専攻分野：高度臨床医育成コース（内科学）

指導教授：柴垣 有吾

主論文の題目：

Angiotensin II Type 1a Receptor Deficiency Alleviates Muscle Atrophy after Denervation

（アンジオテンシンⅡ受容体（AT1a）欠損は、除神経後の骨格筋萎縮を軽減する。）

共著者：Kazuho Inoue, Yuji Ogura, Seiko Hoshino, Takeshi Sugaya, Keiichi Ohata, Hitoshi Kotake, Daisuke Ichikawa, Minoru Watanabe, Kenjiro Kimura, Yugo Shibagaki, Atsuko Kamijo-Ikemori

緒言

高齢者において有病率が高い腎疾患や心疾患は、骨格筋量の減少および筋力低下を認めるサルコペニアの高リスク疾患である。サルコペニアは、容易にフレイルへと進行し、生命予後を悪化させることから、サルコペニアの予防や進行抑制に配慮した腎疾患治療、心疾患治療が重要である。

レニン・アンジオテンシン系（Renin-angiotensin system: RAS）活性化により生じるアンジオテンシンⅡ（Angiotensin Ⅱ: Ang Ⅱ）は、Ang Ⅱ type 1 (AT1) 受容体を介して腎疾患、心疾患を悪化させるため、AT1 受容体拮抗薬(ARB)は、これらの疾患の治療薬として使用されている。近年、ARB の骨格筋への好影響が報告されているが、腎疾患や心疾患で認められる慢性的かつ進行性の骨格筋萎縮に対する ARB の有用性は明らかでないことから、本研究では、AT1 受容体欠損マウスを使用

し、AT1 受容体欠損が、除神経による骨格筋萎縮を抑制するかいなかそのメカニズムについて検討した。

方法・対象

ヒト AT1 受容体に相当するマウス AT1a 受容体を欠損させたオスマウス (AT1a^{-/-}) と、遺伝的背景が同じオス C57BL/6J 野生型マウス (AT1a^{+/+}) を使用した。吸入麻酔下で、両側の坐骨神経を切除し、3、7、21 日後に後肢筋 (腓腹筋、前脛骨筋、ヒラメ筋) を摘出した。同様に sham 群は 21 日後に摘出した。筋重量および筋線維横断面積を評価した。筋線維横断面積は、免疫染色により速筋線維 (type IIb) と遅筋線維 (type I) に分けて、それぞれの面積を測定した。AT1a 欠損による筋萎縮抑制効果が最も認められた腓腹筋において、遺伝子、蛋白を抽出し、Real time PCR、Western blot、ELISA 法で分子の発現解析を行った。また、TdT-mediated dUTP nick-end-labeling (TUNEL) 法でアポトーシス、免疫染色 (F4/80 および CD206) で M1/M2 マクロファージ浸潤および極性を評価した。

統計手法は平均値±標準誤差で表し、統計学的有意差は $p < 0.05$ に設定した。Kruskal-Wallis test で一元配置分析、グループ間の比較に Student-t 検定を用いた。

なお本研究は、聖マリアンナ医科大学動物実験委員会の承認を得たものである (認可番号: TG210517-1, TG220518-1)。

結果

AT1a^{-/-}および AT1a^{+/+}の両群において、腓腹筋、前脛骨筋、ヒラメ筋の筋重量および type IIb、type I 筋線維横断面積は除神経 7 日後および 21 日後で減少した。腓腹筋では、筋重量の減少率が 21 日後 (AT1a^{-/-} 55.5%, AT1a^{+/+} 62.5%)、type IIb 筋線維横断面積の減少率が 7 日後 (AT1a^{-/-} 14.4%, AT1a^{+/+} 36.1%) および 21 日後 (AT1a^{-/-} 58.7%, AT1a^{+/+} 72.8%) で、AT1a^{-/-}で AT1a^{+/+}と比較し有意に抑制された ($P < 0.01$)。前脛骨筋では、筋重量は、AT1a^{-/-}と AT1a^{+/+}で同程度であったが、7 日後および 21

日後の type II b 筋線維横断面積の減少率は、AT1a^{-/-}で AT1a^{+/+}と比較し有意に抑制された (P<0.01)。ヒラメ筋については、7 日後の筋重量および type I 筋線維横断面積の減少率が、AT1a^{-/-}で AT1a^{+/+}と比較し有意に抑制されたが (P<0.05)、21 日後では同程度であった。

腓腹筋における筋蛋白分解系については、筋特異的ユビキチンリガーゼの muscle RING-finger protein-1 (MuRF1) と muscle-specific F-box protein (Atrogin-1) の遺伝子発現、これらの分子の発現調節に関与する Forehead box subgroup 01 (Fox01) の蛋白発現が、除神経 7 日後において、AT1a^{-/-}では AT1a^{+/+}と比較し有意に低下した (P<0.05)。

腓腹筋におけるアポトーシスについては、アポトーシス促進因子である Bcl-2 associated X protein (Bax) の遺伝子発現が、除神経 7 日後に、アポトーシスを認める核が、除神経 21 日後に、AT1a^{-/-}では AT1a^{+/+}と比較し有意に抑制された (P<0.05)。

また、マクロファージには、炎症に促進的な M1 マクロファージと抑制的な M2 マクロファージがあり、その極性がアポトーシスに関連することが知られている。そこで、除神経 21 日後の腓腹筋における M1 と M2 マクロファージの極性について検討した結果、AT1a^{-/-}では AT1a^{+/+}と比較し M1 マクロファージが有意に減少し (P<0.05)、M2 マクロファージは有意に増加していた (P<0.05)。

さらに、除神経後の急性期(3 日後)において、腓腹筋における Nuclear factor- κ B (NF- κ B) の活性化および単球・マクロファージを遊走させ炎症を誘起させる monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) の発現を検討した。その結果、これらの分子の発現は、AT1a^{-/-}で AT1a^{+/+}と比較し有意に抑制されていた (P<0.05)。

考察

AT1a 欠損は、除神経 21 日後の腓腹筋の筋委縮 (筋重量と type II b 筋線維横断面積の抑制) を抑制することが示された。その機序として、①

E3 ユビキチンリガーゼ活性化による筋蛋白分解系の抑制 (MuRF1 および Atrogin-1 発現の抑制、これらの分子の上流に位置する NF- κ B および FoxO1 の活性化抑制)、②アポトーシスの抑制 (Bax 発現抑制およびその上流分子である FoxO1 活性化抑制)、③抗炎症作用 (NF- κ B 活性化抑制、MCP-1 発現抑制、M1/M2 マクロファージの極性変化) が考えられた。

AT1a 受容体は、骨格筋線維以外にマクロファージにおいても発現を認める。しかし、本研究では、全身性に AT1a 受容体が欠損したマウスを使用しており、どの部位の AT1a 欠損が除神経後の骨格筋萎縮の抑制に強く関与したのか、については明らかでない。今後は、組織特異的に AT1a 受容体が欠損したマウスを使用しての検討が必要である。

結論

AT1a 受容体欠損は、筋蛋白分解系の抑制、アポトーシスの抑制、抗炎症作用を介して、骨格筋萎縮を軽減したことが示された。