

<研究課題> アンジオテンシン II 受容体阻害による健康寿命促進の機序解明

代表研究者 東京大学大学院医学系研究科 講師 赤澤 宏  
共同研究者 東京大学大学院医学系研究科 登録研究員 藪本 千鶴

【まとめ】

骨格筋の再生と修復における  $AT_1$  受容体-C1q 活性化の機序と役割を明らかにするために、マクロファージ特異的あるいは骨格筋特異的  $AT_1$  受容体ノックアウトマウスの作成を進め、さらにARBのドラッグエフェクトについて検討を行った。マクロファージ Raw264.7 細胞では Ang II 刺激により C1q の発現が亢進し、筋芽細胞 C2C12 細胞では C1q 刺激により速筋線維へと fiber type の変化が誘導された。

1. 研究の目的

加齢にともない様々な環境的因子や遺伝的因子によって、高血圧や動脈硬化、心不全、糖尿病、認知症、骨粗鬆症、がんなどのいわゆる老化関連疾患が併発しやすくなり、臓器障害や機能低下が病的に促進されて個体死の時期が早まる。わが国では高齢化が急速な勢いで進行し、高齢者に対する医療費が増大傾向にあることから、老化関連疾患の有効な予防法や治療法の確立が社会全体の急務となっている。

老化は慢性炎症を惹起し、老化関連疾患の発症において慢性炎症の重要性が示唆されており、慢性炎症は個体老化と老化関連疾患に共通する基盤病態であると考えられる。しかし、慢性炎症がどのようなメカニズムで個体老化の進行や老化関連疾患の発症に寄与しているのかはこれまで明らかではなかった。最近、マウスの併体結合の実験によって、Wnt シグナル活性化因子など血液中の液性因子が個体の老化を促進、あるいは抑制する作用を有することが明らかとなり、大きな注目を集めている。私たちは、老化にともなう骨格筋萎縮をきたす血中分子の探索を行い、炎症性蛋白であり自然免疫反応にも重要な役割を果たす補体分子 C1q が加齢にともない血中で増加し、老化にともなう骨格筋萎縮の原因となることを明らかにした。C1q はマクロファージで産生されて、C1r、C1s とともに C1 複合体を形成し、Wnt の共役受容体である LRP5/6 を切断することにより  $\beta$  カテニンシグナルを活性化し、骨格筋の再生能

低下を引き起こす。

一方、私たちはレニン・アンジオテンシン系が組織傷害因子として心血管リモデリングを悪化させることを報告してきたが、アンジオテンシン II (Ang II) タイプ 1 ( $AT_1$ ) 受容体ノックアウトマウスは老化にともなう骨格筋萎縮が軽度で、寿命が延長していることも見出した。さらに  $AT_1$  受容体シグナルの阻害によって C1q の発現が低下し、筋力の回復が促進し、線維化が抑制されることから、 $AT_1$  受容体-C1q 活性化のカスケードが老化関連疾患の発症や進展に関わっている可能性が示唆される。

加齢にともなう筋萎縮 (サルコペニア) は健康寿命を規定する大きな要因である。 $AT_1$  受容体-C1q 活性化の骨格筋の再生と修復における機序と役割にフォーカスをあてた研究を進めることで、サルコペニアの予防や治療、さらには健康寿命の促進を目指す。

2. 研究方法と経過

2-1 マクロファージ特異的  $AT_1$  受容体ノックアウトマウスおよび骨格筋特異的  $AT_1$  受容体ノックアウトマウスの作成

骨格筋の再生と修復における  $AT_1$  受容体-C1q 活性化の機序と役割を解明するために、骨格筋局所における  $AT_1$  受容体活性化の細胞特異的役割を検討する。マクロファージで Cre リコンビナーゼを特異的に発現する LysM-Cre マウスと  $AT_1$  受容体をコードする *Agtr1a* 遺伝子が flox 配列で挟まれた *Agtr1a* floxed マウスを交配し、マクロファージ特異的  $AT_1$  受容体コンディショナルノックアウトマウスを作成する。骨格筋で Cre リコンビナーゼを特異的に発現する Acta1-Cre マウスと *Agtr1a* floxed マウスを交配し、骨格筋特異的  $AT_1$  受容体コンディショナルノックアウトマウスを作成する。

2-2 ロサルタンとイルベサルタンによる骨格筋の再生と修復に対する治療効果の比較検討

私たちはイルベサルタンの投与により、マウス前脛骨筋の凍結傷害モデルにおいて、骨格筋

の再生と修復が有意に改善することを報告している。このような AT<sub>1</sub> 受容体ブロッカー (ARB) の作用が、ARB のクラスエフェクトなのか、あるいは同じ ABR でも作用が異なるドラッグエフェクトなのかは不明である。特に、イルベサルタンは組織移行性が高く、PPAR $\gamma$  活性化など AT<sub>1</sub> 受容体阻害以外の作用も報告されている。そこで、8 週齢の C57BL/6 雄マウスに対して、ロサルタン (20 mg/kg)あるいはイルベサルタン (20 mg/kg)を混餌で投与し、前脛骨筋の凍結傷害後の骨格筋の再生と修復を比較検討する。

### 2-3 マクロファージにおける C1q 発現の調節機構

マクロファージの培養細胞株 Raw264.7 細胞を用いて、Ang II 刺激によって C1q, C1r, C1s の遺伝子発現が誘導されるかを qRT-PCR 法によって検討する。さらに、C1q 遺伝子のプロモーター領域とルシフェラーゼ遺伝子を結合させたコンストラクトを Raw264.7 細胞にトランスフェクションし、Ang II 刺激および IL-4 による M2 化刺激による発現調節について検討を行う。

### 2-4 C1q による C2C12 筋芽細胞の筋分化に対する影響

C2C12 筋芽細胞は血清非存在下で培養することで筋分化を誘導することができる。この系に C1q を添加し、筋分化がどのような影響を受けるかを検討する。とくに、筋線維の fiber type に特異的な Myh7, Myh2, Myh1, Myh4 の遺伝子発現を qRT-PCR 法により検討する。

## 3. 研究の成果

### 3-1 マクロファージ特異的 AT<sub>1</sub> 受容体ノックアウトマウスおよび骨格筋特異的 AT<sub>1</sub> 受容体ノックアウトマウスの作成

LysM-Cre マウスと Agtr1a floxed マウスの交配、および Acta1-Cre マウスと Agtr1a floxed マウスの交配を行い、マクロファージ特異的および骨格筋特異的 AT<sub>1</sub> 受容体コンディショナルノックアウトマウスを作成している。共同研究者の藪本が大阪大学から東京大学へ異動したために、マウスも凍結受精卵保存から *in vitro* fertilization を行い、東京大学の飼育施設への移動を行っている。

### 3-2 ロサルタンとイルベサルタンによる骨格筋の再生と修復に対する治療効果の比較検討

ロサルタン (20 mg/kg)あるいはイルベサルタン (20 mg/kg)を混餌で投与し、前脛骨筋の凍結傷害後の骨格筋の再生と修復を比較検討したところ、イルベサルタン投与群の方がロサルタン投与群よりも骨格筋の再生が有意に良好で、線維化が有意に軽減していることが組織学的に明らかとなった。

### 3-3 マクロファージにおける C1q 発現の調節機構

マクロファージの培養細胞株 Raw264.7 細胞において、Ang II 刺激によって C1qa mRNA は増加したが、C1r, C1s の mRNA 発現は誘導されなかった。

C1q 遺伝子のプロモーター領域とルシフェラーゼ遺伝子を結合させたコンストラクトを Raw264.7 細胞にトランスフェクションしたところ、Ang II 刺激によるルシフェラーゼ活性の上昇は認められたが、IL-4 による M2 化刺激ではルシフェラーゼ活性の変化は認められなかった。

### 3-4 C1q による C2C12 筋芽細胞の筋分化に対する影響

C2C12 筋芽細胞の筋分化系において C1q を添加すると Axin2 mRNA の発現が上昇することから、C1q- $\beta$ -catenin 系が活性化することを確認した。さらに、Myh1, Myh4 の mRNA 発現が上昇したことから、速筋線維 (type II 線維) が優位となることが明らかとなった。この C1q による速筋線維への fiber type の変化は C1 阻害薬の C1-INH で抑制された。

## 4. 今後の課題

研究者の所属異動により、マクロファージ特異的および骨格筋特異的 AT<sub>1</sub> 受容体コンディショナルノックアウトマウスの作成が予定よりも遅れたが、今後はこれらのマウスを用いて前脛骨筋の凍結傷害モデルを作成し、骨格筋の再生と修復について解析を行う。具体的には、組織染色と免疫染色による再生と線維化の評価、flow cytometry による炎症細胞浸潤の評価、ELISA や qRT-PCR 法による C1q- $\beta$ -catenin 系の活性化の評価を行い、AT<sub>1</sub> 受容体活性化の細胞特異的役割について明らかにしていきたい。

ARB の骨格筋の再生と修復に対する作用は薬剤間で異なり、ドラッグエフェクトであることが明らかとなった。とくにイルベサルタンには PPAR $\gamma$  活性化作用が報告されている。イル

ベサルタンに PPAR $\gamma$  阻害薬である GW9662 を加えて投与した場合に、骨格筋の再生と修復を評価することで、イルベサルタンによる PPAR $\gamma$  活性化の役割を明らかにしたい。

Raw264.7 細胞を用いた実験では、Ang II 刺激による C1q の発現誘導が認められた。血管平滑筋においては Ang II 刺激により C1r, C1s の発現が誘導されて、大動脈局所で C1 複合体が形成されることを見出している。同様に、骨格筋でも Ang II 刺激により C1r, C1s の発現が誘導されるのかを検討したい。また、Ang II 刺激による C1q 遺伝子発現増加に関わるシグナルメディエーターについても今後解析を進めていきたい。

C1q が C2C12 筋芽細胞の筋分化系において、fiber type を速筋線維化にシフトさせることが明らかとなった。加齢や心不全における筋線維の変化にも C1q- $\beta$ -catenin 系の活性化が関与しているかを今後明らかにしていきたい。

#### 5. 研究成果の公表方法

日本循環器学会や日本分子生物学会、日本抗加齢医学会などの学術集会で発表し、原著論文にまとめて投稿を行う。

以上