

## 学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士 (医 学) 氏名 門口 智泰

### 学位論文題名

Studies on the Development Process of Angiotensin II-Induced Skeletal Muscle Abnormalities and Role of NAD(P)H Oxidase 2

(アンジオテンシン II 誘発性骨格筋異常の進展過程と NAD(P)H oxidase 2 が及ぼす役割の検討)

【背景・目的】運動能力低下は、高齢者、糖尿病および心不全を始めとした慢性疾患において引き起こされ、これにはミトコンドリア機能障害、骨格筋線維型シフト、萎縮を含む骨格筋異常が重要な役割を果たしている。レニン・アンジオテンシン系 (RAS) の亢進は、多くの病態発症および進展に影響を及ぼす。それゆえ、アンジオテンシン II (Ang II) の増加が骨格筋異常の原因である可能性が考えられる。我々は、血圧上昇を引き起こさない低用量 (50 ng/kg/min) の Ang II 投与が骨格筋ミトコンドリア機能障害、ひいては運動能力低下を引き起こすことや Ang II 1 型受容体拮抗薬が 2 型糖尿病モデルのミトコンドリア機能障害および運動能力低下を改善することを報告した。加えて、他の研究により高用量 (500 ng/kg/min) の Ang II 投与によってユビキチンプロテアソーム系を介したタンパク分解が引き起こされ、骨格筋萎縮が起こることが示されている。これらの結果は、Ang II が骨格筋異常の進展において中心的な役割を果たしている可能性を示唆する。しかしながら、1 つのモデルで同時に全ての骨格筋異常を包括的に研究した報告はなく、さらに、骨格筋異常の表現型の経時的変化は不明である。NAD(P)H oxidase (Nox)、特に Nox2 は、活性酸素種 (ROS) であるスーパーオキシド ( $O_2^-$ ) の主要な産生源である。実際、Nox2 の亢進が加齢や心不全を始めとする慢性疾患の病態発症および進展に重要な役割を果たしている。また Ang II は Nox2 を介した  $O_2^-$  産生を促進する。これらの結果は、Ang II による Nox2 由来の  $O_2^-$  産生亢進が骨格筋異常および運動能力低下において中心的な役割を果たしている可能性を示唆する。したがって、本研究では、(1) 様々な病態で臨床的に観察される一連の骨格筋異常が Ang II により引き起こされるかどうかを経時的変化も含めて検討すること、(2) Nox2 欠損マウスにおいて骨格筋異常が抑制されるかどうかを検討することを目的とした。

【材料と方法】研究 1 では、10-12 週齢の雄性 C57BL/6J マウスを Vehicle (生理食塩水) 群および Ang II (1000 ng/kg/min) 群に分けて実験を実施した。Vehicle および Ang II は皮下に植え込んだ浸透圧ポンプを用いて持続的に投与し、1 および 4 週後に骨格筋異常 (ミトコンドリア機能、骨格筋線維型シフトおよび筋萎縮) を観察した。研究 2 においては、10-12 週齢の雄性 C57BL/6J マウスおよび Nox2 欠損マウスを用い、WT+Vehicle 群、KO+Vehicle 群、WT+Ang II 群および KO+Ang II 群の 4 群に分け、Ang II による骨格筋異常における Nox2 の役割を調べた。各々の解析には下肢骨格筋を用いた。

【結果】研究 1: 体重、下肢骨格筋重量および筋横断面積は、Ang II 投与 1 週後で既に低下

傾向があり、4週後で有意に低下した。骨格筋組織のクエン酸合成酵素（CS）活性および骨格筋組織より単離したミトコンドリアにおける電子伝達系複合体IおよびIII活性は、Ang II投与1週後で低下し、4週後においても持続的に低下した。骨格筋 type I 線維の割合は、Ang II投与1週後で有意に低下した。Akt および p70S6K リン酸化（タンパク合成指標）は Ang II投与1週後で低下傾向があり、4週後で有意に低下した。一方 MuRF-1 および atrogen-1（タンパク分解指標）の遺伝子およびタンパク発現は、4週後において有意に増加した。これらの変化は体重、下肢骨格筋重量および筋横断面積の結果と一致していた。NAD(P)H oxidase および O<sub>2</sub> 産生は、Ang II 投与1週後で有意に増加し、4週後も維持された。仕事量、走行時間および走行距離は、Ang II 投与1週後で低下傾向があり、4週後で有意に低下した（いずれも  $P < 0.05$ ）。**研究 2**：WT+Ang II 群における体重、下肢骨格筋重量および筋横断面積低下は、KO+Ang II 群で有意に抑制された。WT+Ang II 群における MuRF-1 および atrogen-1 遺伝子発現増加は、KO+Ang II 群で有意に抑制され、体重、下肢骨格筋重量および筋横断面積の結果と一致していた（いずれも  $P < 0.05$ ）。WT+Ang II 群におけるミトコンドリア機能および運動能力低下は、KO+Ang II 群で改善しなかった。

【考察】本研究では、マウスにおける Ang II 投与がミトコンドリア機能障害、骨格筋線維型シフト、骨格筋萎縮を含む骨格筋異常を引き起こし、さらに運動能力低下を引き起こすことを明らかにした。ミトコンドリア機能障害および骨格筋線維型シフトは Ang II 投与初期に出現し、骨格筋萎縮過程は後期に明らかとなった。したがって、Ang II は加齢や心不全を始めとする慢性疾患における骨格筋異常において中心的な役割を果たす可能性が示唆された。我々は、血圧上昇を引き起こさない低用量の Ang II をマウスに投与し、NAD(P)H oxidase 由来の O<sub>2</sub> 産生増加が骨格筋ミトコンドリア機能障害の原因であることを明らかにした。電子伝達系複合体は、ROS に対する感受性の高い鉄-硫黄中心を含んでいることから、ROS は直接的に電子伝達系複合体を障害する。したがって、ROS が Ang II 投与により初期に起こる骨格筋異常の変化と関連する可能性を示唆する。しかしながら、Nox2 欠損マウスを用いた研究では、骨格筋の ROS が完全に抑制されたにも関わらず、骨格筋ミトコンドリア機能は改善しなかった。この結果は、我々の以前の結果と矛盾するが、この原因は投与した Ang II の濃度が高濃度・長期間であったことが挙げられる。また、高濃度・長期間の Ang II 刺激による骨格筋ミトコンドリア機能障害は、ROS 以外の要因によるものと考えられる。過剰な ROS は、C2C12 筋管細胞において MuRF-1 の増加を引き起こす。また過酸化水素は、同細胞において MuRF-1 および atrogen-1 を増加させる。加えて、L6 筋幹細胞においては Ang II による NAD(P)H oxidase の活性化が Akt リン酸化を減少させ、またその減少が NAD(P)H oxidase の抑制剤や p47 siRNA により改善した。これらの知見は、ROS が Ang II 投与によって引き起こされる骨格筋異常の後期の変化と関連する可能性を示唆する。実際、Nox2 欠損マウスを用いた今回の研究では、骨格筋の ROS が完全に抑制されたことと並行して骨格筋萎縮が改善した。これらの結果から、Ang II による骨格筋異常、特に骨格筋萎縮の進展に Nox2 由来の ROS が関わっていることが示唆された。

【結論】本研究で用いた Ang II 投与モデルでは、加齢、心不全および腎不全において臨床的に観察される骨格筋異常および運動耐容能低下と表現型が一致していた。さらに Nox2 欠損マウスにおいて Ang II による骨格筋萎縮が抑制されたことから、Ang II の抑制や Nox2 由来 ROS を標的因子とした骨格筋異常の治療戦略につながる可能性がある。