93　下肢壊疽に対する老化遺伝子BubR1の分子機序の解明	松本　拓也

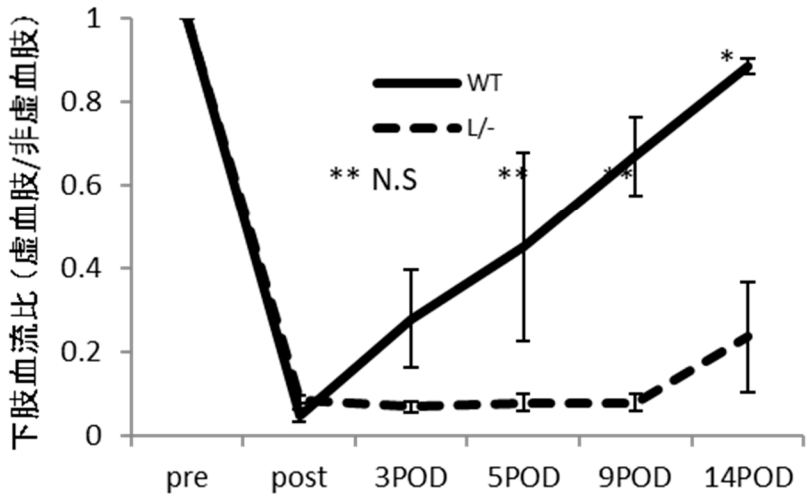
【背景】BubR1（budding uninhibited by benzimidazole-related 1）は有糸分裂における染色体の分離不全と異数体形成を防ぐ紡錘体形成チェックポイント機構において重要な役割を担う分子の一つである。BubR1 の発現が通常より10%まで低下したマウスは、早期より老化の表現型を示すことが明らかにされているが、血管疾患や血管新生においてBubR1 が果たす役割は、これまで明らかにされていない。血管新生における BubR1 の影響を評価する目的で、我々は15%程度まで BubR1 の発現を低下させた、外観上は異常を示さないマウス（*BubR1*$^{L/-}$）を作製し、検討を行った。

【方法】血管新生における BubR1 の役割を明らかにするために、我々は週齢を揃えた *BubR1*$^{L/-}$および野生型（*BubR1*$^{+/+}$）マウスを用いて、虚血肢モデルを作製し、実験に使用した。血管新生における BubR1 の病理学的影響を評価する目的で、我々は虚血肢を誘導するための手術前後での血流を評価し、典型的な血管新生因子の発現を *in vivo* において評価した。

【結果】*BubR1*$^{+/+}$マウスにおいては、虚血導入後の下肢の血流は徐々に回復し、手術 14 日後には約 80%まで回復を認めた。一方で、*BubR1*$^{L/-}$マウスにおいては、約 30%までの回復にとどまった（$p < 0.01$、下図）。手術 14 日後の *BubR1*$^{L/-}$マウスの大腿、下腿筋においては、組織学的に再生筋繊維、肉芽組織、炎症細胞の浸潤が、*BubR1*$^{+/+}$マウスのそれに比べ、著明であった。*BubR1*$^{+/+}$マウスは、虚血導入後 14 日間で下肢の脱落は認めなかったが、*BubR1*$^{L/-}$マウスにおいては、約 70%で下肢の脱落を認めた（$p < 0.05$）。*BubR1*$^{L/-}$マウスにおける、虚血肢側の下腿筋内の血管内皮増殖因子（VEGF；vascular endothelial growth factor）蛋白の発現は、*BubR1*$^{+/+}$マウスに比べ、有意に低下していた（$p < 0.05$）。

【考察】BubR1 の発現低下は、虚血誘導後の下肢において、血管新生を減弱させ、下肢の脱落をもたらした。BubR1 は重要な血管新生因子であり、虚血肢の治療において有用なものとなる可能性が示唆された。

BubR1$^{+/+}$マウス群（実線）、*BubR1*$^{L/-}$マウス群（破線）の虚血肢における下肢血流比の経時的変化



93. 下肢壊疽に対する老化遺伝子 BubR1 の分子機序の解明

松本　拓也

国際医療福祉大学 医学部 血管外科学講座

Key words：重症虚血肢，血管新生因子，BubR1，老化，細胞周期遺伝子

緒　言

加齢は血管新生を減弱させ、血管内皮細胞の機能低下を引き起こし、高齢者において、心血管疾患の罹患率と後遺症を増加させ、生命や肢の予後を悪化させる［1］。この現象は 50 年以上前より報告されているが、加齢に伴う血管新生能力低下に関しての分子的機序は、これまで十分には明らかにされていない。BubR1（budding uninhibited by benzimidazole-related 1）は、有糸分裂において姉妹染色体が正しく分裂しているかどうかを観察する、紡錘体形成チェックポイント機構の中心的な構成要素の一つである［2］。BubR1 の発現を低下させたマウスにおいては、染色体の異数性形成、白内障、亀背、皮下脂肪の減少、創傷治癒遅延、短命、不妊等、加齢を示す表現型を早期から呈することが明らかにされている［3］。しかしながら、血管疾患や血管新生において BubR1 が果たす役割は、これまで明らかにされていない。

血管新生は複数の血管新生因子を含めた、種々の細胞による多様の遺伝子産物が関与した複雑な過程である。血管内皮増殖因子（VEGF : vascular endothelial growth factor）、肝細胞増殖因子（HGF : hepatocyte growth factor）、繊維芽細胞増殖因子（FGF-2 : fibroblast growth factor-2）は強力な血管新生調節因子である［4］。我々は以前 *in vivo* での実験で、虚血肢モデルマウスにおいて、FGF-2 が VEGF と HGF の発現を増加させることを示した［4，5］。虚血は低酸素状態をもたらし、VEGF や他の血管新生因子の分泌を刺激し、新生血管を誘導する［6］。BubR1 の血管新生に対する生理学的関連性は、まだ明らかにはされていない。従って本研究で我々は、血管新生における BubR1 の役割を明らかにするために BubR1 の発現を低下させたマウス（*BubR1*$^{L/-}$）を作製し、実験を行った。

方　法

1. 実験動物

BubR1 のヘテロ接合性欠損（*BubR1*$^{+/-}$）を持つマウスを Jackson 社より購入した。我々の研究室で、C57BL/6J および 129/SvJ を遺伝的背景として、BubR1 のヘテロ接合性低発現マウス（*BubR1*$^{L/-}$）を作製し、7 回戻し交配した。129/SvJ 由来の ES 細胞と C57BL/6J マウスを用いて、*BubR1*$^{+/+}$、*BubR1*$^{L/-}$、*BubR1*$^{L/+}$、*BubR1*$^{L/-}$の 4 種類のマウスを作製した。

全ての実験には同腹仔の *BubR1*$^{+/+}$、*BubR1*$^{L/-}$を用いた。BubR1 の mRNA 発現は経時的定量 PCR 法とウェスタンブロティングで計測した。若年（6～8 週齢）のオスの *BubR1*$^{L/-}$と *BubR1*$^{+/+}$のマウスを用いて体重測定と虚血肢モデルの実験を行った。高齢（40、50、60 週齢）のオスの *BubR1*$^{L/-}$と *BubR1*$^{+/+}$のマウスを用いて下肢脱落の評価を行った。若年（6～8 週齢）のオスの C57BL/6J のマウスは虚血肢における BubR1 タンパクの経時的な発現量の計測に用いた。全てのマウスは通常食を与え空調管理と明暗調整をされた部屋で飼育された。全ての手術手技は 0.3 mg/kg の塩酸メデトミジンと 4 mg/kg のミダゾラムと 5 mg/kg のブトルファノールで十分な麻酔下に行った。全てのマウスの取り扱いと安楽死は国際的なガイドラインに従った。また、動物実験承認番号は A28-154-0 である。

2. 遺伝子判定

麻酔下マウスの尻尾を 3 mm 切除し、0.05 M 塩化ナトリウム液 500 μl で 95℃、30 分溶解した。T トリス-エチレンジアミン四酢酸液（1 M トリス-塩化水素［pH 8.0］、10 mM エチレンジアミン四酢酸）を加え撹拌した。5 分間 15,000 回転の遠心分離後に DNA を含む上清を *BubR1*$^{L/*}$の遺伝子発現の確認のために用い、以下のプライマーで増幅した。

フォワードプライマー3, 5'-CCTTCCCGCTTCAGTGACAAC-3'

リバースプライマー2, 5'-AGAATCCTGCCGCATCTACCC-3'

フォワードプライマー1, 5'-AGTTCTGGCCCTCGGAATACC-3

また、*BubR1*$^{-/*}$の遺伝子発現の確認のために用い、以下のプライマーで増幅した。

フォワードプライマー5′-GGGAGGATCGAGGAGGTCG-3′

リバースプライマー5′- CTGTTCGCCTTCAGTGCTCAAAATGGTAGTCG-3′

フォワードプライマー5-AAATGGCGTTACTTAAGCTAGCTTGC-3′

増幅は、94℃、30 秒間の初期変性、94℃、4 分間、55℃、1 分間、72℃、1 分間を 35 サイクル、72℃、5 分間の最終伸長により行った。PCR 産物は、1.0%アガロースゲルの電気泳動によって分離し、GelRed（Biotium、Hayward、CA、USA）で同定した。

3. 重症虚血肢モデル

全ての手術手技は前述の麻酔下で行った。虚血肢モデルの作製は既報に基づいて作製した［4, 5］。大腿・膝窩・伏在動静脈を結紮しその全てを切除した。その理由は単純な大腿動脈の結紮のみでは十分な虚血性変化を引き起こすことができないとされているからである［7］。虚血が誘導されているかを確認する目的で、術 6 時間後に標本検体として下大静脈より採血を行い、血清 CPK（クレアチンホスフォキナーゼ）を計測した。レーザードップラーを用いて術前、術直後、3、5、9、14 日目に健側（右）に比した虚血（左）の血流比を測定した。測定前に測定の妨げになる体毛を除去した。レーザードップラー比は既報の如く、健側（右）に対する虚血（左）に対する比としてあらわした［5］。我々は下肢壊死病変の程度は、下肢救済スコアを用いて 4 段階に評価した。下肢救済スコア 4：完全な救肢、下肢救済スコア 3：踵以下の壊死、下肢救済スコア 2：膝下の壊死、下肢救済スコア 1：膝上の壊死、下肢救済スコア 0：鼠径部以下の下肢脱落。我々は下肢救済スコア 1～3 も下肢脱落とした。

4. 組織学的評価

組織標本は術後 14 日目の大腿と下腿筋を採取した。5 μm のパラフィン包埋切片を用いた。筋肉の壊死・肉芽・炎症細胞の浸潤をヘマトキシリン・エオジン（HE）染色にて評価した。組織学的所見は二人の異なる病理学者で評価した（Y.Y、O.M）。抗マウスポリクローナル PECAM1 抗体（1：400、sc-1506、Santa Cruz、Dallas、TX、USA）を用い免疫組織学的染色を行い、毛細血管数を計測した。2 次抗体としてはヤギ IgG 抗体（1：800、sc-2028、Santa Cruz）を用いた。各サンプルの大腿筋中央から任意の 3 視野を用いて計測した。3 視野の平均毛細血管数を記載した。

5. ウェスタンブロッティング

マウス精巣を 4×Laemmli sample buffer（C3228、Sigma-Aldrich Ireland Limited、Arklow、reland）によって均質化した。全ての検体は 7 週齢のマウスから採取した。マウスの下腿筋の蛋白は、CellLytic MT Cell Lysis Reagent（c3228、Sigma-Aldrich、St. Louis、MO、USA）で抽出した。組織を溶解した後、タンパクを SDS-PAGE を用いて分離しナイロン膜に転写した。転写後に以下の一次抗体を用いて分離した：抗 BubR1（1：1000、NBP1-19555、Novus Biologicals、Littleton、CO、USA）、内因性コントロールとして抗ウサギαチューブリン抗体（1：600、ab4074、Abcam、Cambridge、MA、USA）を用いた。二次抗体は HRP 標識抗ウサギ IgG 抗体（1：5,000、NA934V、GE Healthcare、Pittsburgh、PA、USA）を用いた。抗体に標識された蛋白は ECL prime（GE Healthcare）で化学発光させ、LAS4010（GE Healthcare）にて撮影を行った。

6. 免疫学的測定法

マウスの下腿の筋における成長因子は、ネズミ VEGF、HGF、FGF2（MMV00、MHG00、MFB00、R&D Systems）の定量的免疫学的測定法を、説明書通りに用いて測定した。測定した成長因子のレベルは下腿筋の重さを標準化し、ng/g protein 表記で表した。

7. 定量的 PCR 法を用いた mRNA の定量評価

総 RNA 抽出は、ISOGEN（Nippon Gene、Tokyo、Japan）を用いて説明書通りに行った。RNA から cDNA への逆転写は、PrimeScript RT Reagent Kit（Takara Bio Inc., Shiga、Japan）を用いて行った。cDNA の合成後、mRNA 発現は、Premix Ex Taq（Perfect Real Time；RR039A；Takara Bio Inc., Shiga、Japan）を用いて、TaqMan フルオロジェニック法による、定量的リアルタイム PCR で定量した。BubR1 の mRNA の発現は、BubR1 TaqMan probe mix（Mm00437811_m1；Thermo Fisher Scientific）により測定し、それぞれの試料はβアクチン（Mm02619580_g1; Thermo Fisher Scientific）で標準化した。すべての行程は、StepOne Real-Time PCR System（Thermo Fisher Scientific）を用いて説明書通りに施行した。増幅効率を確認した後、標的とする遺伝子の相対的 mRNA 発現はΔΔCt 法を用いて定量した［8］。

8. 統計学的解析

解析結果は平均値±標準誤差で表記した。LDPI の解析以外は、全ての 2 群間の比較は対応のないスチューデントの t 検定を使用した。LDPI の解析は、反復測定分散分析（repeated measures ANOVA）を使用した。P 値が 0.05 以下を統計的に有意であると定義した。

結　果

1. BubR1 の遺伝子判定の確認

BubR1$^{+/+}$マウスと *BubR1*$^{L/-}$マウスの尾から採取した DNA を、neo 遺伝子、neo 遺伝子の上流、下流の各々にアニールする 6 種類のプライマーを用いてポリメラーゼ連鎖反応（PCR）を行った。*BubR1*$^{+/+}$マウスの DNA は、イントロンを標的としたプライマーにより増幅され、*BubR1*$^{L/*}$マウスの DNA は、イントロンと neo 遺伝子を標的としたプライマーにより増幅された。*BubR1*$^{-/*}$マウスの DNA は、*BubR1*$^{-/*}$遺伝子を同定する目的で、イントロンと neo 遺伝子を標的としたプライマーにより増幅された。*BubR1*$^{L/L}$マウスは生後 6～20 週齢において、*BubR1*$^{+/+}$マウスと比べ、体重が有意に減少していた（10、12、14、16、18 週齢：$P < 0.01$、6、8、20 週齢：$P < 0.05$、対 *BubR1*$^{+/+}$マウス）。ウェスタンブロッティング法による、精巣における *BubR1*$^{L/L}$マウスの BubR1 の蛋白レベルでの発現は、*BubR1*$^{+/+}$マウスに比べ、16.8%と有意に低下を認めた（$P < 0.01$）。加えて、定量的 PCR 法による、精巣における *BubR1*$^{L/L}$マウスの mRNA レベルでの発現は、*BubR1*$^{+/+}$マウスに比べ、42.7 %と有意に低下を認めた（$P < 0.01$）

2. 重症虚血肢モデルの特徴

BubR1 の発現の低下は、血管系への影響を報告されており［9, 10］、C57B/L6 由来の虚血肢における BubR1 の発現量は、無処置のマウスと比べて術後 1 日目には低く、5 日目には高かった。虚血状態の確認のために術後 6 時間後の血清 CPK（クレアチンホスフォキナーゼ）値を測定した。CPK の上昇は無処置のマウス（354.7±54.5）に比べて、*BubR1*$^{+/+}$マウス（6437±2438.8、$P < 0.01$）および、*BubR1*$^{L/L}$マウス（5710±1820.4、$P < 0.05$）の虚血肢において有意に高かった。虚血肢の誘導により低下した血流の改善状態の評価を、レーザードップラーで計測した。虚血の手術後は、健側（左）に比して、虚血肢（右）は約 10%まで血流は低下した。*BubR*$^{+/+}$マウスでは、虚血肢誘導術後、徐々に血流は改善し、術 14 日後には約 80%まで虚血肢の血流は改善した。対照的に、*BubR1*$^{L/L}$マウスではせいぜい 30%までの回復にとどまった（術 14 日後：$P < 0.01$、術直後、術 5 日後、術 9 日後：$P < 0.05$、（図 1）。術前の *BubR1*$^{+/+}$マウスと *BubR1*$^{L/-}$マウスの大腿・下腿筋においては、病理学的な有意な差は認めなかった。術 14 日目での *BubR1*$^{L/-}$マウスの大腿・下腿筋においては、再生筋繊維（図 2 矢印）と肉芽組織と炎症細胞の浸潤（図 2 矢頭）が *BubR1*$^{+/+}$マウスと比べて顕著であった。

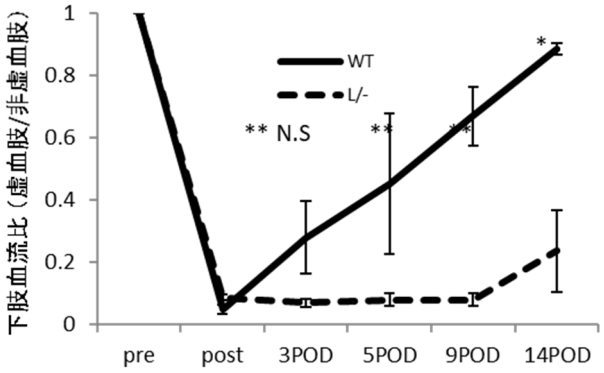


図 1. *BubR1*$^{+/+}$マウス群（実線）、*BubR1*$^{L/-}$マウス群（破線）の虚血肢における下肢血流比の経時的変化

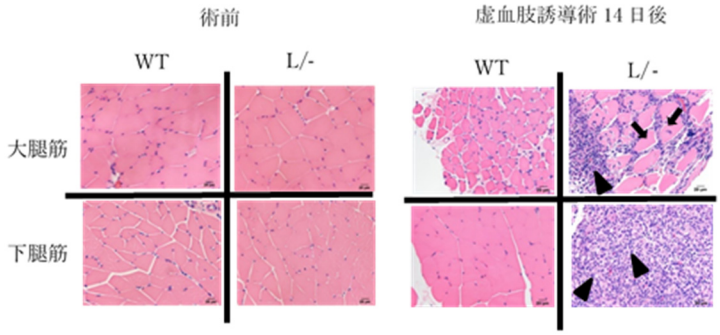


図 2. 大腿・下腿筋 虚血肢誘導前後の組織学的評価

3. マウス虚血肢モデルにおける BubR1 の救肢効果

全ての *BubR1*$^{+/+}$マウス（n＝6、6～8 週齢）は、虚血肢誘導後、観察期間の 14 日間で、完全に救肢された状態で（下肢救済スコア 4 点）あった。しかし *BubR1*$^{L/-}$マウス（n = 6、6～8 週齢）においては、約 70%において、下肢の脱落を認めた（図 3）。その中で、2 匹が膝上で壊死を認め（下肢救済スコア 1 点）、2 匹が踵より下での壊死を認め（下肢救済スコア 3 点）残り 2 匹は完全に救肢可能であった（図 3、右、$P < 0.05$）。14 日間の観察期間の間、死亡したマウスはいなかった。さらに我々は、高齢マウス（40、50、60 週齢）の *BubR1*$^{L/-}$マウスにおいて、虚血肢誘導術後、完全に下肢が脱落することを示した（n＝3）。

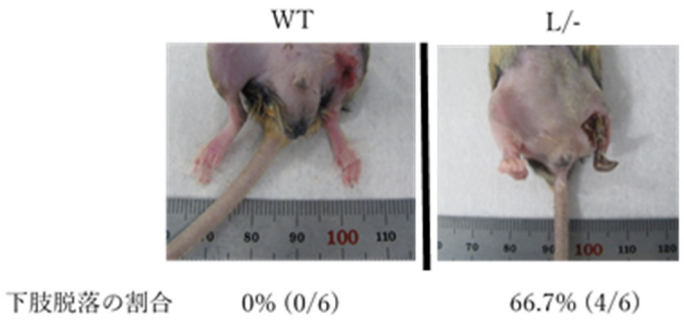


図 3. *BubR1*$^{+/+}$マウスと *BubR1*$^{L/-}$マウスにおける下肢虚血手術 14 日後の虚血肢の写真

4. 下肢虚血誘導後の血管形成における BubR1 低発現の効果

下肢虚血誘導術後の虚血肢において、血管数の増加を評価する目的で、我々は術後 14 日目に、内皮細胞のマーカーである CD31 陽性細胞を計測することで、組織学的に血管密度を計測した。血管の数は、無処置のマウス同士においては、*BubR1*$^{+/+}$マウスと *BubR1*$^{L/-}$マウスの間において、有意な差を認めなかった。血管数は、*BubR1*$^{+/+}$マウス、*BubR1*$^{L/-}$マウスともに、無処置群と比べ、虚血肢モデル群では有意に増加を認めたが、術 14 日後の時点で、両マウスにおける虚血肢モデル群間では、有意な差は認めなかった。

5. 虚血肢における BubR1 の低下による VEGF 増加の抑制

BubR1$^{+/+}$マウス、*BubR1*$^{L/-}$マウスのどちらにおいても、下肢虚血術 2 日後の虚血肢の筋肉中の VEGF、HGF、FGF-2 蛋白の発現量は、偽手術群と比して有意に増加していた（$P < 0.05$、下肢虚血術群 対 偽手術群）。加えて、虚血肢の筋肉における VEGF の増加は、*BubR1*$^{L/-}$マウスでは *BubR1*$^{+/+}$マウスと比べて抑制された（$P < 0.05$、下肢虚血術群における *BubR1*$^{L/-}$マウス　対　*BubR1*$^{+/+}$マウス）。このことから、BubR1 の発現量の低下は、虚血肢において、HGF（$P > 0.05$、虚血肢誘導群における *BubR1*$^{L/-}$マウス　対　*BubR1*$^{+/+}$マウス）や FGF-2（$P > 0.05$、虚血肢誘導群における *BubR1*$^{L/-}$マウス　対　*BubR1*$^{+/+}$マウス）ではなく、VEGF の発現を選択的に低下させる可能性が示唆された

考　察

以前の研究で、BubR1 の発現の低下は血管系に影響を及ぼす、との報告を認める［9, 10］。今回我々は、BubR1 の発現の低下が血管新生を減弱させ、結果として虚血肢において下肢の脱落を引き起こすことを示した。本研究のポイントは、1. 精巣での BubR1 の発現を通常の 16.8%まで低下させた、外観上は有意な所見を認めない、新規の *BubR1*$^{L/-}$マウスを作製した。2. *BubR1*$^{L/-}$マウスにおいて、BubR1 の発現の低下は、虚血肢における下肢の脱落をもたらす。3. *BubR1*$^{L/-}$マウスにおける虚血肢の下腿筋においては、VEGF 蛋白発現の上昇が抑制された。と、要約される。

BubR1 の発現が通常より 10%まで低下したマウスは、早期より老化の表現型を示すことが明らかにされている［3］。そのため、そのような BubR1 の発現を極端に低下させたマウスにおいて、BubR1 の発現の低下の病的な影響を評価することは不可能であった。この問題を解決する目的で、我々は以前、精巣での BubR1 の発現を通常の 40%まで低下させたマウスを作製した（*BubR1*$^{L/L}$マウス）。*BubR1*$^{L/L}$マウスにおいては、重症下肢虚血モデルにおいて、下肢の脱落は認めなかった。従って我々は、より BubR1 の発現を低下させたマウスを新たに作製し（*BubR1*$^{L/-}$マウス）、40 週齢において、重症虚血肢誘導後、下肢が完全に脱落することを発見した。本研究は、BubR1 の血管新生への関与を示した初めての報告である。作製した *BubR1*$^{L/-}$マウスは、早老症、不妊、短命など明らかな異常は示さず、通常の状態で、異常な発育は示さなかった。*BubR1*$^{+/+}$マウスと比べ、*BubR1*$^{L/-}$マウスにおいては、虚血肢導入後の血清 CPK の上昇の程度に有意な差は認めなかった。*BubR1*$^{+/+}$マウスと *BubR1*$^{L/-}$マウスの間で、虚血肢導入前の大腿・下腿筋の色調・形態に外観上、有意な差は認めなかった。病理学的に有意な差は認めなかったものの、筋のサイズや筋重量に関しては、*BubR1*$^{L/-}$マウスは *BubR1*$^{+/+}$マウスに比べ小さい傾向であった。

本研究では、*BubR1*$^{L/-}$マウスにおいて、虚血肢導入後早期より血流の回復が減弱しており、結果として血管新生が減弱し、救肢率に低下を認めている（図 1）。加えて我々は、虚血肢導入後の *BubR1*$^{+/+}$マウスと *BubR1*$^{L/-}$マウスの大腿筋を、内皮細胞のマーカーである CD31 抗体で染色し、陽性数を数えることで、血管形成能力の評価を行った。*BubR1*$^{+/+}$マウス、*BubR1*$^{L/-}$マウスともに、虚血肢導入後 14 日目における虚血肢においては、虚血非導入下肢に比べ、血管数は有意に増加を認めたが、*BubR1*$^{+/+}$マウス、*BubR1*$^{L/-}$マウスにおける虚血肢同士の比較では、*BubR1*$^{L/-}$マウスにおいて、虚血肢導入後の血流の回復が減弱し、救肢率が低下していたにも関わらず、両群間に有意な差は認めなかった。この所見は、*BubR1*$^{L/-}$マウスにおいては、未熟な新生血管が形成されている可能性が考えられる。

高齢マウス（40～60 週齢、各 3 匹）間を比較すると、虚血肢導入後、*BubR1*$^{+/+}$マウスではすべて救肢されたが、*BubR1*$^{L/-}$マウスにおいては、虚血肢導入後 3～5 日の間で、すべての観察マウスにおいて、鼠径靭帯以下の下肢脱落を認めた。

BubR1$^{+/+}$マウスにおいては、卵巣、脾臓、精巣において、週齢依存的にBubR1の発現が低下することが明らかにされている［3］。重症虚血肢モデルにおける、前述の下肢の完全な脱落は、BubR1の発現量の低下の割合に寄与している可能性があるが、詳細な機序は不明であり、更なる研究が必要である。

BubR1と血管新生との関連性を明らかにするために、我々は代表的な血管新生因子である、VEGF、HGF、FGF-2蛋白の発現を*in vivo*と*in vitro*の両方で評価した。虚血肢における下腿筋においては、BubR1の低下は選択的にVEGF蛋白発現の上昇を抑制したが、予期せぬことに、HGFとFGF2においては同様の所見は認めなかった。

本研究は、BubR1が血管新生における鍵となる因子であり、虚血性の疾患に対して治療学的な標的となる可能性を示した。BubR1の発現の低下は、虚血肢におけるVEGF蛋白の発現を低下させ、下肢の救肢率も低下させており、BubR1は、救肢率を改善させる重要な役割を果たす可能性があることが示唆される。加齢に伴いBubR1の発現が低下した際に、VEGFなどの虚血に対峙する血管新生因子の発現の低下のために、血管新生の減弱がもたらされる。よって、BubR1の発現の低下は血管新生を遅らせ、下肢の脱落という結果をもたらすことになりうると考えられる。

本研究にはいくつかの限定事項が存在する。HGFやFGF2ではなく、VEGFの発現のみを選択的に調整するような、BubR1を含んだシグナル伝達経路が十分に解明されていないことに加え、新生血管形成時に、BubR1の発現の低下によって、未熟な血管がどれくらいの割合で誘導されているかが、はっきりとしないままであることである。

慢性、または急性の下肢虚血患者に対する、BubR1の発現の低下の影響を明らかにするためには、更なる研究が必要である。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、九州大学大学院消化器・総合外科（第二外科）の岡留淳、吉屋圭史、松田大介、山口大学医学部大学院医学系研究科免疫学の玉田耕治、九州大学大学院形態機能病理学の鬼丸満穂、九州大学循環器病未来医療センターの中野覚、九州大学循環器病未来医療センターの江頭健輔、九州大学大学院薬学研究院革新的バイオ医薬創成学講座の米満吉和、九州大学大学院消化器・総合外科（第二外科）の前原喜彦である。（順不同、敬称略）

今回の研究で補助を頂いた各氏に感謝の意を表する。

文　献

1) Ouriel K, Veith FJ. Acute lower limb ischemia: determinants of outcome. Surgery. 1998 Aug;124(2):336–341; discussion 341-342. PMID: 9706157
2) Cahill DP, Lengauer C, Yu J, Riggins GJ, Willson JK, Markowitz SD, Kinzler KW, Vogelstein B. Mutations of mitotic checkpoint genes in human cancers. Nature. 1998 Mar;392(6673):300–303. PMID: 9521327
3) Baker DJ, Jeganathan KB, Cameron JD, Thompson M, Juneja S, Kopecka A, Kumar R, Jenkins RB, de Groen PC, Roche P, van Deursen JM. BubR1 insufficiency causes early onset of aging-associated phenotypes and infertility in mice. Nat Genet. 2004 Jul;36(7):744-749. PMID: 15208629
4) Onimaru M, Yonemitsu Y, Tanii M, Nakagawa K, Masaki I, Okano S, Ishibashi H, Shirasuna K, Hasegawa M, Sueishi K. Fibroblast growth factor-2 gene transfer can stimulate hepatocyte growth factor expression irrespective of hypoxia-mediated downregulation in ischemic limbs. Circ Res. 2002 Nov;91(10):923–930. PMID: 12433837
5) Masaki I, Yonemitsu Y, Yamashita A, Sata S, Tanii M, Komori K, Nakagawa K, Hou X, Nagai Y, Hasegawa M, Sugimachi K, Sueishi K. Angiogenic gene therapy for experimental critical limb ischemia: acceleration of limb loss by overexpression of vascular endothelial growth factor 165 but not of fibroblast growth factor-2. Circ Res. 2002 May;90(9):966–973. PMID: 12016262
6) Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. Nat Med. 2003 Jun;9(6):653–660. PMID: 12778163

7) Goto T, Fukuyama N, Aki A, Kanabuchi K, Kimura K, Taira H, Tanaka E, Wakana N, Mori H, Inoue H. Search for appropriate experimental methods to create stable hind-limb ischemia in mouse. Tokai J Exp Clin Med. 2006 Sep;31(3):128–132. PMID: 21302240
8) Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta C(T)) Method. Methods. 2001 Dec;25(4):402–408. PMID: 11846609
9) Kyuragi R, Matsumoto T, Harada Y, Saito S, Onimaru M, Nakatsu Y, Tsuzuki T, Nomura M, Yonemitsu Y, Maehara Y. BubR1 insufficiency inhibits neointimal hyperplasia through impaired vascular smooth muscle cell proliferation in mice. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2015 Feb;35(2):341–347. PMID: 25524773
10) Matsumoto T, Baker DJ, d'Uscio LV, Mozammel G, Katusic ZS, van Deursen JM. Aging-associated vascular phenotype in mutant mice with low levels of BubR1. Stroke. 2007 Mar;38(3):1050–1056. PMID: 17272762