

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：16301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19974

研究課題名(和文) 脳内AT2受容体およびHDAC2の相互作用による認知機能への影響

研究課題名(英文) Improvement of cognitive decline by cerebral AT2 receptor and HDAC2 inhibition

研究代表者

岩波 純 (Iwanami, Jun)

愛媛大学・医学系研究科・助教

研究者番号：90624792

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：認知機能に脳内ヒストン脱アセチル化酵素2(HDAC2)が関与していることが報告されており、我々はアンジオテンシンII2型受容体(AT2)刺激も認知機能向上に関与していることを報告してきたが、AT2とHDAC2の脳での関わりについては明らかでない。そこで、AT2とHDAC2の認知機能への影響について検討した。HDAC2の発現は野生型マウスに比べAT2KOマウスで増加していた。認知機能は血管性認知症モデルにHDAC阻害剤を投与し検討した。野生型マウスでの改善効果に比べAT2KOでの改善効果が強かったことから、AT2受容体がHDAC2の発現に関与しており、認知機能低下を抑制することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Cerebral histone deacetylase (HDAC) 2 has been highlighted in terms of epigenetic modulation of cognitive function. We recently reported that angiotensin II type 2 (AT2) receptor stimulation improved cognitive decline in the mouse model (BCAS) of vascular dementia. These results led us to examine the effects of HDAC on AT2 receptor-mediated improvement of cognitive decline. HDAC2 protein level in the hippocampus did not differ between WT and AT2KO mice at 10 weeks of age, whereas HDAC2 of AT2KO mice at 20 weeks of age was higher compared with that of WT mice. Cognitive impairment after BCAS was more marked in AT2KO mice. Treatment with HDAC inhibitor attenuated BCAS-induced prolongation of escape latency in the Morris water maze test both in WT and AT2KO mice; however this effect of HDAC inhibitor was more marked in AT2KO mice. We speculate that modulation of cerebral AT2 receptor could be new therapeutic tool to prevent cognitive impairment via epigenetic abnormalities.

研究分野：医歯薬学

キーワード：認知機能 血管性認知症 レニン・アンジオテンシン系 エピジェネティクス アンジオテンシンII2型受容体 ヒストン脱アセチル化酵素2

### 1. 研究開始当初の背景

生活習慣病が認知症に関連することが疫学的に報告されてきているが、生活習慣病の発症・進展に深く関わるレニン・アンジオテンシン系 (RAS) はその鍵因子ではないかと考えられる。生活習慣病は慢性疾患でありエピジェネティック異常を引き起こすことが報告されている。

我々はこれまでに脳障害時における RAS の影響について、アンジオテンシン II 1 型 (AT1) 受容体は炎症、酸化ストレスの増加を誘導し神経障害を拡大し、もう一つの受容体である 2 型 (AT2) 受容体は血流量増加、炎症・酸化ストレスの抑制により神経保護に働くことや、AT2 受容体シグナルが神経細胞の分化・保護作用を持つことなどを報告してきた。最近の疫学試験からは、RAS 抑制薬使用患者では、その他の循環器薬使用患者よりもアルツハイマー病および全ての認知症の発症が抑制されること、さらにアンジオテンシン変換酵素 (ACE) 阻害薬よりも AT1 受容体ブロッカー (ARB) 使用患者でより抑制効果が認められたことから AT1 受容体の阻害効果あるいは AT2 受容体の相対的な刺激効果が重要であることが報告されている。

一方、最近の報告から、神経疾患の発生にエピジェネティクスの関与が示唆されており、高血圧や糖尿病などの慢性の生活習慣病により、後天的な遺伝子発現異常が誘導され認知症を引き起こす可能性が考えられている。特にヒストン脱アセチル化酵素である HDAC2 が認知症において注目されている。HDAC2 の過剰発現では認知機能が低下すること、一方で HDAC2 欠損マウスでは認知機能が向上することがこれまでに報告されている。そのメカニズムとして、HDAC2 が BDNF や Fos など記憶にかかわる遺伝子の脱アセチル化を誘導し、その発現を制御するメカニズムが報告されている。

RAS と HDAC2 に関しては、これまでにアンジオテンシン II 投与による心肥大モデルマウスにおける HDAC2 の発現の増加が報告されているものの、認知症における RAS と HDAC2 との関わりについては現在までの報告はされていない。

### 2. 研究の目的

そこで、本研究ではアンジオテンシン II 受容体、特にこれまで我々が研究を進めてきた AT2 受容体の認知機能改善効果におけるエピジェネティクスの影響について詳しく検討し、認知症を抑制する新たなメカニズムを解明することを目的とした。

### 3. 研究の方法

まず、AT2 受容体と HDAC2 の関係を明らかにするために、10 および 20 週齢の雄性 C57BL/6 (WT) および AT2 受容体欠損マウス (AT2KO) の海馬サンプルを採取し、HDAC2 の発現をウェスタンブロット法にて検討した。

次に認知機能における関与を検討するために慢性脳低灌流モデルを作成して検討した。

慢性脳低灌流モデルは、10 週齢の雄性 WT および AT2KO の両総頸動脈に極小コイル (内径 0.18mm) を留置し、両総頸動脈狭窄術 (BCAS) を行うことで作成した。BCAS から 6 週間後にモリス水迷路試験を用いて空間認知機能への影響を検討した。また、認知機能低下における HDAC2 の影響について明らかにするために、BCAS 作成 4 週間後から HDAC 阻害剤 (SAHA) を 2 週間投与した。

(1) 認知機能については、モリス水迷路試験を用いて検討した。直径 120cm のプールの隠れたプラットフォームを探索する試験で、1日5回、20分おきにプールに入れ、プラットフォームを見つけるトレーニングを行い、泳動時間をビデオトラッキングシステムにより記録した。このトレーニングを5日間連続で試行し、1日の泳動時間の平均を算出し、プラットフォームまでの到達時間を認知機能として評価した。

(2) 血圧への影響については Tail Cuff 法にて検討した。

(3) 血流量への影響について、脳表層の血流を 2 次元レーザー Doppler 血流計を用いて検討した。

(4) タンパク質の発現変化について、脳血流量測定後、PBS 灌流を行った後脳サンプルを採取し、ウェスタンブロット法にて検討した。

### 4. 研究成果

#### ・加齢による海馬 HDAC2 発現変化

10 週齢における海馬における HDAC2 の発現は WT、AT2KO では同程度であり、変化が認められなかった。20 週齢の WT では増加傾向が認められたが、有意差はなかった。20 週齢では WT に比べて AT2KO での発現が増加していた (Fig. 1)。

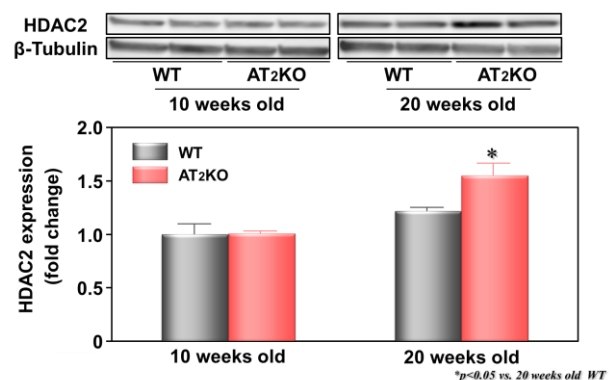


Fig. 1 加齢による WT および AT2KO の海馬における HDAC2 の発現

・慢性脳低灌流モデルによる認知機能への影響

BCAS および SAHA の投与による血圧、体重および脳重量への影響は認められなかった。

モリス水迷路試験において、WT-BCAS 群は WT-sham 群に比べてプラットフォームへの到達時間の遅延が認められたが、SAHA 投与群で改善していた (Fig. 2)。AT2KO においても、BCAS で低下していた認知機能は、SAHA 投与により改善していたが、その改善効果は WT に比べて強かった (Fig. 3, 4)。

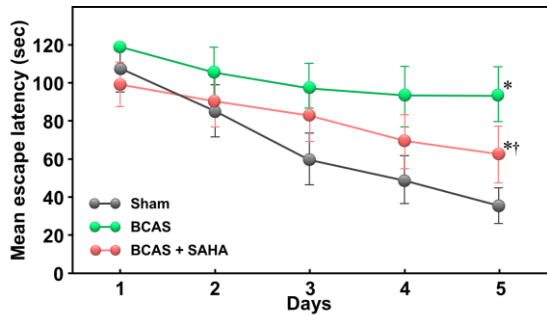


Fig. 2 WT における BCAS および SAHA の影響

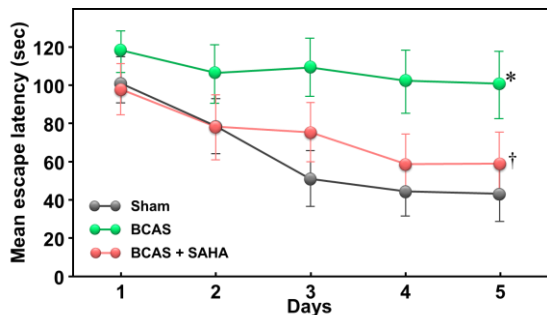


Fig. 3 AT2KO における BCAS および SAHA の影響

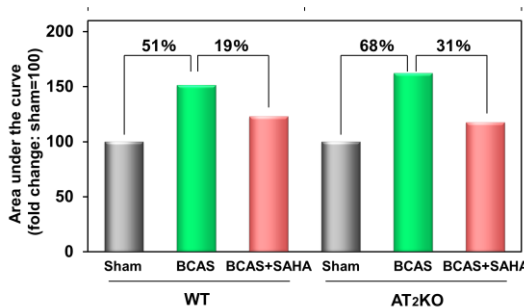


Fig. 4 モリス水迷路試験における WT および AT2KO での BCAS、SAHA の認知機能への影響の比較

脳血流量は、WT および AT2KO ともに BCAS により低下したが、SAHA 投与による改善効果は認められなかった (Fig. 5, 6)。

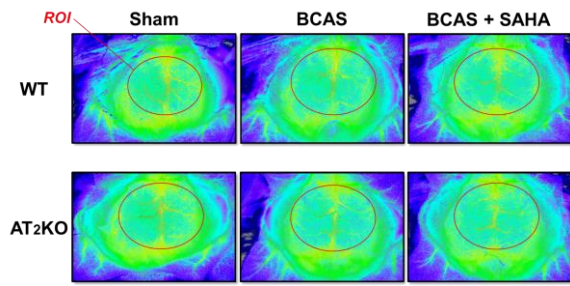


Fig. 5 レーザードップラー血流系による脳表層血流量の測定

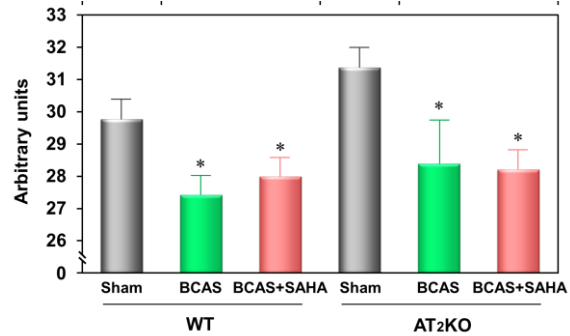
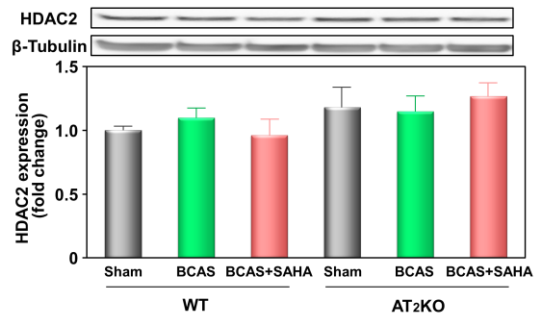


Fig. 6 BCAS および SAHA による脳表層血流量への影響

海馬における HDAC2 mRNA の発現は、WT に比べ AT2KO で増加傾向があり、その増加は BCAS および SAHA 投与群でも認められた。WT では BCAS により増加傾向があり、SAHA の投



与により Sham 群レベルまで低下する傾向があった (Fig. 7)。

Fig. 7 BCAS および SAHA による HDAC2 の発現

次に HDAC2 により発現が制御されている遺伝子の発現変化について検討した。認知機能に関与することが知られている NMDA 受容体のサブユニット B2 の発現は、WT に比べて増加していた。WT では BCAS および SAHA 投与で発現に変化は認められなかったが、AT2KO では BCAS で減少、SAHA 投与によりその低下がキャンセルされる傾向が認められた (Fig. 8)。

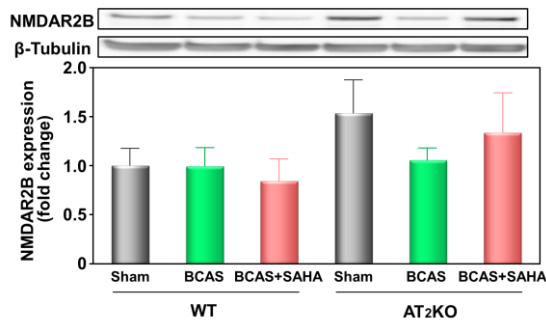


Fig. 8 BCAS および SAHA 投与による NMDA 受容体サブユニット B2 の発現

次に認知機能に関連する神経成長因子である BDNF の発現を検討した。BDNF の発現は、WT、AT2KO において差が認められず、また、BCAS および SAHA 投与による変化も認められなかった (Fig. 9)。

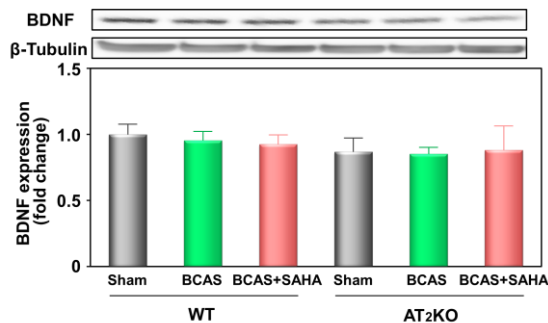


Fig. 9 BCAS および SAHA 投与による BDNF の発現

以上の結果から、脳内 AT2 受容体が HDAC2 の発現に関与しており、エピジェネティック異常を改善することで認知機能低下を抑制することが示唆された。

#### 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)

①Kukida M, Mogi M, Ohshima K, Nakaoka H, Iwanami J, Kanno H, Tsukuda K, Chisaka T, Min LJ, Wang XL, Bai HY, Shan BS, Higaki A, Yamauchi T, Okura T, Higaki J, Horiuchi M. Angiotensin II Type 2 Receptor Inhibits Vascular Intimal Proliferation With Activation of PPAR $\gamma$ . *Am J Hypertens.* 2016;29(6):727-36. doi:10.1093/ajh/hpv168. (査読有)

②Bai HY, Mogi M, Nakaoka H, Kan-No H, Tsukuda K, Wang XL, Shan BS, Kukida M, Yamauchi T, Higaki A, Min LJ, Iwanami J, Horiuchi M. Synergistic Inhibitory Effect of Rosuvastatin and Angiotensin II Type 2 Receptor Agonist on Vascular Remodeling. *J Pharmacol Exp Ther.* 2016 Aug;358(2):352-8. doi:10.1124/jpet.116.233148. (査読有)

③Iwanami J, Mogi M, Tsukuda K, Wang XL, Nakaoka H, Kan-no H, Chisaka T, Bai HY, Shan BS, Kukida M, Horiuchi M. Direct angiotensin II type 2 receptor stimulation by compound 21 prevents vascular dementia. *J Am Soc Hypertens.* 2015 Apr;9(4):250-6. doi:10.1016/j.jash.2015.01.010. (査読有)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 4 件)

①Jun Iwanami, Masaki Mogi, Kana Tsukuda, Xiao-Li Wang, Akinori Higaki, Masanori Kukida, Hiroto Nakaoka, Toshifumi Yamauchi, Hui-Yu Bai, Bao-Shuai Shan, Li-Juan Min and Masatsugu Horiuchi. Possible Epigenetic Modulation of Cerebral Angiotensin Type 2 Receptor in the Cognitive Function in Vascular Dementia. International STROKE Conference 2016. 2016年2月17-19日 ロサンゼルスコンベンションセンター (ロサンゼルス・アメリカ)

②岩波純、茂木正樹、佃架奈、王小俐、中岡裕智、檜垣彰典、莖田昌敬、山内俊史、白蒼鈺、単宝帥、関莉娟、堀内正嗣。脳内 AT2 受容体と HDAC2 阻害による認知機能低下抑制効果。第 38 回日本高血圧学会総会 2015 年 10 月 9-11 日 ひめぎんホール (愛媛県・松山市)

③Jun Iwanami, Masaki Mogi, Kana Tsukuda, Xiao-Li Wang<sup>1</sup>, Hiroto Nakaoka<sup>1</sup>, Akinori Higaki, Masayoshi Kukida, Toshifumi Yamauchi, Hui-Yu Bai, Bao-Shuai Shan, Li-Juan Min and Masatsugu Horiuchi. Improvement of cognitive decline by HDAC2 inhibition involving AT2 receptor. The 38th Annual Scientific Meeting of the Japanese Society of Hypertension. 2015 年 10 月 9-11 日 ひめぎんホール (愛媛県・松山市)

④岩波純、茂木正樹、佃架奈、王小俐、中岡裕智、檜垣彰典、莖田昌敬、山内俊史、白蒼鈺、単宝帥、関莉娟、堀内正嗣。血管性認知症モデルマウスにおける脳内 AT2 受容体と HDAC2 阻害による改善効果。第 6 回日本脳血管・認知症学会 2015 年 9 月 19 日 東京ファッションタウン (東京・江東区)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]  
ホームページ等  
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩波 純 (Iwanami, Jun)  
愛媛大学・大学院医学系研究科・助教  
研究者番号：90624792

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力

なし