

平成30年6月29日現在

機関番号：11401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19013

研究課題名（和文）心腎連関における新規アペリン受容体リガンドの機能的意義の解明

研究課題名（英文）Dissecting the functional role of a novel ligand for APJ, ELABELA, in cardio-renal connection

研究代表者

佐藤 輝紀 (SATO, Teruki)

秋田大学・医学（系）研究科（研究院）・助教

研究者番号：30733422

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）：本研究においてまず、心機能調節における、新規APJリガンドELABELA(ELA)の機能的意義を明らかにした。APJ受容体のリガンドはこれまでApelinのみと考えられていたが、新規にELAが同定されたことを受け、そのペプチドを心不全モデルマウスに投与することによって心保護効果を発揮することを明らかにした。Apelin同様にレニンアンジオテンシン系の亢進を抑制する一方で、そのメカニズムはApelinと異なり、ACEを転写性に抑制することを解明した。さらに、腎集合管特異的なELA欠損マウスの作製、機能解析を行った。

研究成果の概要（英文）：In this study, we investigated the functional role of a novel ligand for APJ receptor, ELABELA, in controlling heart function. ELABELA has been identified as a second ligand for APJ receptor, while Apelin has been thought to be only ligand for APJ receptor. We showed that ELABELA-APJ axis protects from pressure overload-induced heart failure possibly via suppression of ACE expression. In addition, we analyzed the role of ELA in the renal collecting duct.

研究分野：循環器内科学

キーワード：ELABELA APJ 心不全 心腎連関

1. 研究開始当初の背景

Apelin ペプチド-APJ 受容体システムはレニン-アンジオテンシン系を負に調節し、心不全に対し心血管保護作用を示す。最近、ELABELA (ELA)ペプチドが、第2の APJ 受容体リガンドとして同定された。ELA 遺伝子は当初 non-coding RNA として見出されていたが、2013年、ELA が APJ 受容体の新規リガンドペプチドをコードする mRNA であることが発見された興味深いことに、ELA はヒトや野生型マウス成体の心臓においてはその発現量は低く、一方で腎臓に発現量が多いことが報告されており、私達のデータも同様であった。成体における内因性の ELA が腎臓においてどのような生理活性をもつか、心血管系にどのように作用するかは不明である。APJ 受容体のリガンドとしては Apelin が広く知られており、Apelin-APJ システムが多彩な生理活性を発揮することがこれまでに分かっている。実際、APJ 受容体の発現が多い心臓においては、Apelin による陽性変力作用、血管拡張作用、心筋梗塞後血管新生作用など、心血管治療のターゲットとして近年注目されている。また、Apelin の中枢神経系における作用として、摂食行動の変化や、水分調節に関与することも報告されている。私達の予備検討から、外因性の ELA はアンジオテンシン に拮抗的に作用し、心不全に対し Apelin 同様に心保護的に作用することが明らかになってきた。

2. 研究の目的

腎臓における内因性の ELA がどのような生理作用をもつかは未解明であり、心腎連関における意義は不明である。そこで、本研究では、心不全病態の心腎連関における ELA の心血管保護作用の機能的な役割・意義を解明し、新たな心不全治療戦略の応用開発につなげることを研究目的とした。

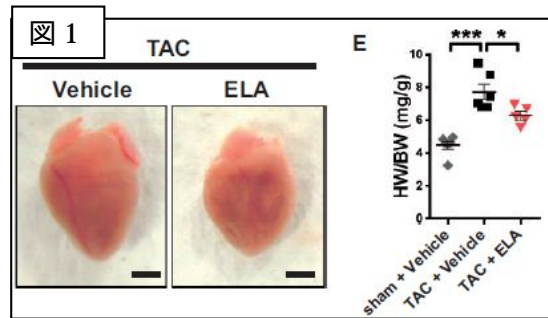
3. 研究の方法

腎臓由来の ELA が心血管保護的に作用するメカニズムを解析することを研究の主軸とする。全身性ならびに臓器特異的な ELA 欠損マウスを活用して、以下の4つの検討項目について、実験、解析を行うことにより研究目的を達成する。「1) 発生期ならびに出生後の ELA の役割の解明」、「2) 腎臓由来の ELA の機能的意義の解明」、「3) Apelin と ELA の相互作用の探索」、「4) 内因性の ELA の心血管系に対する作用機構の探索」。これらの成体の病態モデル、発生期の臓器における ELA の作用機構の解析を通じて、心腎連関における ELA の役割、意義の解明を目指した。

4. 研究成果

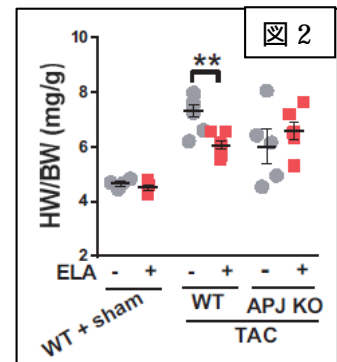
最初に、予備検討としていた ELA の心保護作用についてまとめた。

野生型マウスに ELA ペプチド投与実験(浸透圧ポンプ: 1 mg/kg/day)を行った。野生型マウスのベースラインにおいては心収縮能や心体重比に有意な変化を認めなかったが、横行大動脈縮窄術(TAC)による圧負荷モデルにおいては、Vehicle 群に比較して ELA 投与群では有意に心肥大や線維化が抑制された(図1)



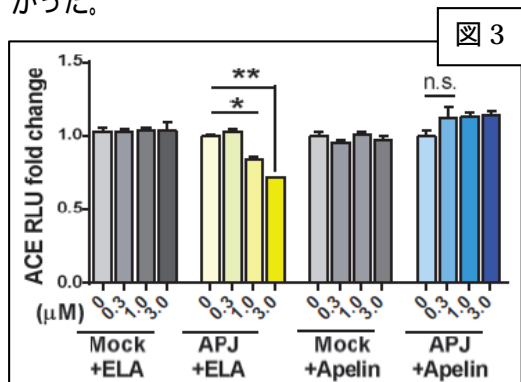
また、APJ KO マウスを用いて同様の TAC 実験を行った結果、APJ KO マウスにおいては、ELA による心保護効果を認めなかった(図2)。

つまり、ELA は APJ 受容体依存的に心保護効果を発揮していることが分かった。



ELA を投与したマウスの心臓において、アンジオテンシン変換酵素(ACE)の発現が有意に抑制されていたことから(図4)、ACE あるいは ACE2 のプロモーターのレポータープラスミドを発現させた培養細胞株を用いてレポーターアッセイを行ったところ、Apelin とは異なり、ELA は濃度依存性に ACE の転写活性を抑制した(図3)。

一方で、ACE2 の転写活性への影響は小さかった。



さらに、レニン-アンジオテンシン系と ELA-APJ 軸の相互作用を探索するため、アンジオテンシン II (Ang II) と ELA の同時投与実験を行ったところ、Ang II 投与にて誘導される心肥大や血圧の上昇は、ELA によって有意に抑制された(図 4)。それらの心肥大抑制効果は単離心筋細胞レベルでも再現されていた。

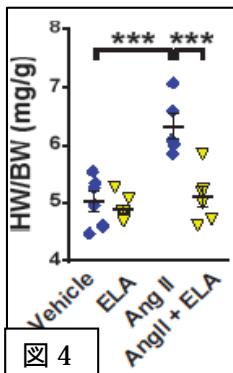


図 4

最後に、Apelin と ELA の違いについて検討した。近年、ACE と ACE2 を Brg1 と転写因子 FoxM1 が複合体を構成して二重支配しているという報告がなされた。そこで、TAC を行ったマウスに Apelin、

ELA それぞれを投与したところ、ELA 投与マウスの心臓においては、FoxM1 の発現が有意に抑制されていたのに対し、Apelin 投与マウスでは Vehicle 群同様に FoxM1 の発現が上昇していた。

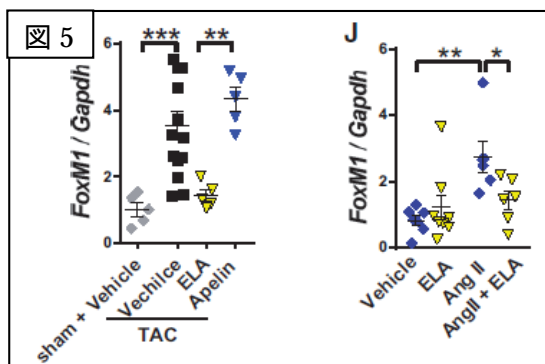


図 5

以上の結果から、ELA は ACE を転写的に制御し、RAS 系の亢進を抑制することで心保護効果を発揮することが明らかとなった。さらに、Apelin とは違ったシグナル経路で ELA は心保護的に作用することが示唆された(図 6)。

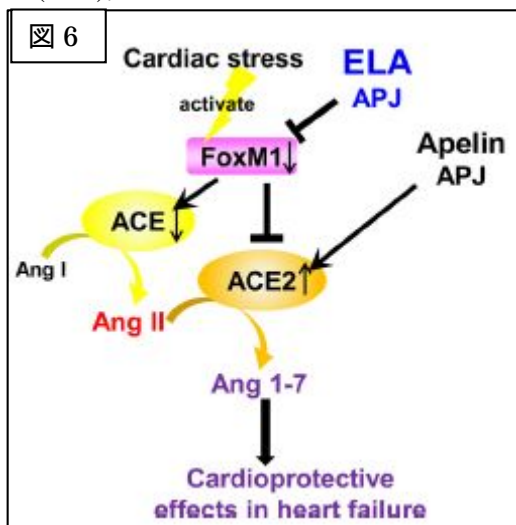


図 6

続いて、内因性の ELA の機能について遺伝子改変マウスを用いて検討を行った。まず、マウスの各臓器における ELA の mRNA 発現レベルを qRT-PCR で調べたところ、成長期のマウスでは心臓、腎臓において ELA の発現が認められたものの、3 か月齢以降の成体マウスでは、心臓における ELA の発現は消失し、腎臓においてのみ ELA が高発現していることが分かった。興味深いことに、In situ hybridization の解析から ELA mRNA の発現は腎臓の集合管に局在していることが分かった。そこで、全身性の ELA KO マウス、横紋筋特異的 KO マウス(MCK-Cre)、腎集合管特異的 ELA KO マウス(Aqp2-Cre)を用いて生理学的実験を行った。横紋筋特異的 ELA KO マウスに TAC をかけた 2 週間後の心機能や心体重比は、野生型に比較して有意差は認められなかった。また、腎集合管特異的 ELA KO マウスにおける心機能はベースライン、TAC 2 週間後においても野生型と比較して有意差を認めなかった。一方で、全身性の ELA KO マウスでは TAC 2 週間では心機能に差が見られなかったが、8 週間の長期間の圧負荷においては、ELA KO マウスの心機能は保持されている傾向が観察された。これまでの実験結果をまとめると、成体腎において発現している内因性の ELA を欠損させても、心機能に与える影響は小さいと考えられる。そこで、内因性の ELA の腎臓における作用を解析すべく、片腎摘出術や、尿管結紮腎不全モデルを作製している。腎不全モデルにおいて、腎機能や心機能を比較することで表現型を探索する。ELA の心保護効果や、Apelin の先行研究から、腎保護効果を発揮する可能性が予想でき、その作用機構を解明することを今後の課題として、研究を継続する予定である。

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)

(雑誌論文)(計 3 件)

1. Kuba K, Sato T, Imai Y, Yamaguchi T. Apelin and Elabela/Toddler; double ligands for APJ/Apelin receptor in heart development, physiology, and pathology. *Peptides*. 2018、査読あり

2. Yamaguchi T, Suzuki T. Sato T et al, The CCR4-NOT deadenylase complex controls Atg7-dependent cell death and heart function. *Science Signaling* 2018;11、査読あり

3. Sato T, Sato C, Kadowaki A, Watanabe H, Ho L, Ishida J, Yamaguchi T, Kimura A,

Fukamizu A, Penninger JM, Reversade B, Ito H, Imai Y, Kuba K. Elabela - APJ axis protects from pressure overload heart failure and angiotensin ii-induced cardiac damage. *Cardiovascular research*. 2017、査読あり

〔学会発表〕(計 7 件)

1.Teruki Sato, ELABELA, a novel APJ ligand, protects against pressure overload or Angiotensin II-induced cardiac remodeling, 第 1 回日本循環器基礎研究フォーラム (Basic CardioVascular Research)、2018 年 1 月 6 日～7 日、東京

2.佐藤輝紀、新規心不全治療標的としての Apelin/ELABELA -APJ 受容体システム、第 21 回日本心不全学会シンポジウム、2017 年 10 月 14 日、秋田

3.Teruki Sato, ELABELA, a novel APJ ligand, inhibits pressure overload- and Angiotensin II-induced cardiac remodeling, 第 21 回日本心不全学会、2017 年 10 月 14 日、秋田

4.佐藤輝紀、心臓リモデリングにおける CCR4-NOT deadenylase の機能解析、第 68 回日本薬理学会北部会、2017 年 9 月 15 日、山形

5.佐藤輝紀、心不全病態における新規 APJ リガンド ELABELA の機能的意義の解明、第 68 回日本薬理学会北部会、2017 年 9 月 15 日、山形

6.佐藤輝紀、心不全病態における新規 APJ リガンド ELABELA の機能的意義の解明、第 26 回日本循環薬理学会、2016 年 12 月 2 日、松本

7.Teruki Sato, Dissecting the functional role of ELABELA, a novel APJ ligand, in heart failure. 第 89 回薬理学会年会、2016 年 3 月 9 日、横浜

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

佐藤 輝紀(Sato Teruki)
秋田大学・医学部附属病院・助教
研究者番号:30733422

(2)研究分担者

()

研究者番号:

(3)連携研究者

久場 敬司(Kuba Keiji)
秋田大学・大学院医学系研究科 分子機能学・代謝機能学講座・教授
研究者番号: 10451915

(4)研究協力者

()