

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2007 ～ 2008
 課題番号：19791000
 研究課題名（和文） アンジオテンシン I I 2 型受容体の神経保護作用に注目した新しい神経疾患治療の研究
 研究課題名（英文） New Therapeutical Approach for Neural Disorders
 Focusing on Angiotensin II type 2 Receptor Signaling
 研究代表者 茂木 正樹 (MOGI MASAKI)
 愛媛大学・大学院医学系研究科・講師
 研究者番号：20363236

研究成果の概要：

脳卒中やアルツハイマー病などの神経疾患はこれからの超高齢化社会において克服すべき重要な病気ですが有効な治療法は確立されていません。最近高血圧調節ホルモンであるレニン・アンジオテンシン系を調節する降圧薬（ARB）の効果が注目されており、我々は本研究において、脳梗塞や認知機能に焦点を当てたマウスを用いた動物実験により、ARBが神経細胞の障害を抑制したり、血管細胞の老化を防いだり、脳梗塞後の生存率を上げるような治療が可能になることを見出しました。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,000,000	0	2,000,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	390,000	3,690,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・脳神経外科学

キーワード：

レニンアンジオテンシン系・脳梗塞・認知機能障害・メタボリックシンドローム・血管老化・アンジオテンシン II 2 型受容体・アンジオテンシン II 受容体ブロッカー・細胞治療

1. 研究開始当初の背景

昨今の大規模臨床試験により、アンジオテンシン II 1 型受容体ブロッカー（以下 ARB）が脳卒中の発症や、認知機能の低下を抑制する効果を持つことが示唆されているが、実験的なアプローチは殆どさ

れていない。我々の研究室ではこれまで、レニン・アンジオテンシン系（以下RAS）と脳血管障害との関係に注目し、マウスを用いた実験を行ってきた。その中で、アンジオテンシン II 受容体のサブタイプである 2 型受容体（AT₂）欠損マウスでは、脳梗塞後の梗塞巣の大きさが増大す

ること、また梗塞後の神経障害の程度が悪化することから、AT₂受容体からのシグナルが神経障害の抑制に影響を与えていることを見出した。その後の実験から、神経幹細胞 (neurosphere) にAT₂受容体刺激を加えると細胞の分化が促進し、神経成熟マーカーの発現が増強することがわかり、AT₂受容体からのシグナルが直接的に神経細胞分化・保護的作用を持つ可能性も次第にわかってきた。またAT₂受容体シグナル下流のメカニズムについても、ユビキチン・プロテアソーム系の蛋白の一つであるDNA修復に関連するMMS2という物質が関与していることを我々は見出した。マウスの脳梗塞後認知機能を検討したところ、認知機能低下がAT₂受容体欠損マウスでは著しく、野生型マウスで認められる梗塞巣でのMMS2の増加がAT₂受容体欠損マウスでは認められないことから、脳障害時にAT₂受容体を介したシグナルがMMS2を増加させ、神経保護的に働く可能性が示唆された。

AT₂受容体は胎児期で発現が多く、脳梗塞後などの病態発生時に発現が増強することが知られており、脳の発生・発達にも何らかの関与をしていると考えられている。また他研究施設からの遺伝子解析の結果からはヒトにおける精神遅滞の患者においてAT₂受容体の変異が認められることが報告された。我々の観察からもAT₂受容体欠損マウスはsocial interaction能力の低下を認めたり、薬物による痙攣発作が起きやすかったりすることから、AT₂受容体からのシグナルが神経の発生・発達や認知機能、高次機能の形成に関与することが示唆される。

こうした結果から、ARBを用いることでAT₁受容体をブロックしAT₂受容体を活性化するようなRASの制御により神経保護作用を誘導し、脳梗塞や認知機能低下や神経変性疾患などの難治性神経疾患に対する新しい治療につながるのではないかとこの着想を抱いた。

2. 研究の目的

- (1) 脳梗塞や認知機能に関する RAS の作用に着目した検討を行った。昨今メタボリックシンドロームの発症・進展に RAS が深く関与することがわかっている。またメタボリックシンドローム患者では将来的に認知機能の低下が危惧される報告が相次いでいる。こうしたことからモデルマウス (糖尿病マウス: KK_{Ay}、高食塩・

高脂肪食負荷マウス) を用いて認知機能を検討し ARB の効果を調べた。

- (2) 脳梗塞の 3 大原因の一つとしてアテローム血栓性脳梗塞があげられるが、動脈硬化の進展に RAS の関与が示唆されており、最近では RAS による血管老化も重要な働きを来していることが報告されている。こうしたことから、AT₂受容体からのシグナルが血管老化に与える影響について調べ、動脈硬化性の脳梗塞に対する予防的なアプローチに繋がらないかを検討した。
- (3) アルツハイマー病や多発性硬化症などの神経変性疾患における RAS の働きについてはこれまでほとんどわかっていなかった。そこで、臨床サンプルを使って神経変性疾患における RAS のコンポーネントの濃度を調べ、疾患発症のメカニズムや治療への応用の可能性について検討した。
- (4) 骨髄細胞を用いた神経保護を目的とした細胞治療が臨床試験に入っているが、骨髄細胞での発現が高い AT₂受容体が細胞治療に影響を与えるかどうかについて調べ、細胞治療に与える RAS の作用について検討した。

3. 研究の方法

- (1) 認知機能に関連した以下の検討を行う。メタボリックシンドロームのモデルマウス (糖尿病マウス: KK_{Ay}、高食塩・高脂肪食負荷マウス) を用いて、認知機能を検討。認知機能は電撃回避試験による回避率で評価した。また、脳内の炎症や酸化ストレスについてサイトカインの mRNA 発現や DHE 染色などで評価した。
- (2) 動脈硬化などの誘因になる血管老化について野生型マウスおよび AT₂受容体欠損マウスより抽出した血管平滑筋細胞を用いて検討する。アンジオテンシン II 刺激により誘導される細胞老化を両者で比較し、そのメカニズムに DNA 障害修復に関与する研究背景で示した MMS2 にも着目して検討を行う。また、in vivo の検討として野生型マウスと AT₂受容体欠損マウスに致死量の放射線照射を行い大動脈における老化細胞数についての比較を行った。
- (3) これまで愛媛大学老年科で集められた髄液サンプルを用いて髄液中のアンジオテンシン II やアンジオテンシン変換酵素などの RAS のコンポーネントの濃度を ELISA 法で検討した。
- (4) 骨髄ストローマ細胞を野生型および AT₂受容体欠損マウスの下肢骨より抽出し、中大脳動脈を閉塞したマウスのフィラメ

ントを抜く際に(虚血再還流モデル)、尾静脈より注入してその後のマウスの生存率や脳梗塞巣の大きさ、脳浮腫の度合いなどについて検討した。

4. 研究成果

- (1) 糖尿病のモデルマウスである KKAY マウスや高食塩・高コレステロール食を負荷した野生型マウスにおいて認知機能低下が誘導されることを示した。また、この認知機能低下の抑制にアンジオテンシン II 1 型受容体 (AT1) ブロッカー (ARB) の投与が有効であることを証明した。この ARB の効果の一部にアンジオテンシン II 2 型受容体 (AT2) の相対的活性化による MMS2 の活性化が関連していることが示唆された(論文 5, 18)。こうした結果から、RAS の制御はメタボリックシンドロームや糖尿病の発症・進展を抑制するだけでなく、こうした疾患に起因する認知機能障害も軽減する可能性が示唆された。
- (2) アンジオテンシン II を連日投与することにより血管平滑筋細胞で老化が観察されたが、この作用は AT1 シグナルによる促進作用だけでなく(論文 15)、AT2 の刺激により血管平滑筋細胞の MMS2 が活性化され老化を軽減する作用があることを *in vitro* および *in vivo* で見出し、ARB による血管老化抑制作用も示した(論文 16)。血管老化は間接的に脳神経系への老化(機能低下)にも結びつくものであり、こうした ARB による AT1、AT2 シグナルを介した血管老化の抑制効果は、アテローム血栓性の脳卒中や動脈硬化性の脳神経障害の抑制に繋がる発見と考えられる。
- (3) 臨床的な検討として、神経変性疾患患者の髄液中でのアンジオテンシン II 濃度について検討したところ、多発性硬化症再発患者の髄液中ではアンジオテンシン II 濃度の有意な低下が認められた(論文 8)。また、髄液中のアンジオテンシン変換酵素 (ACE 及び ACE2) の濃度も検討したところ、多発性硬化症患者では ACE が増加し、ACE2 が低下していることが観察された(論文 6)。さらに、筋萎縮性側索硬化症患者の髄液中でもアンジオテンシン II の有意な低下を認めた(論文 7)。上記の髄液中のアンジオテンシン II の低下は疾患の重症度と比例関係を認めており、RAS は血液脳関門の維持に働くことが報告されていることから変性疾患の進展に深く関与している可能性があり、今後検討を重ねていく予定である。
- (4) マウスの脳虚血再還流モデルに野生型の MSC を尾静脈から投与すると、48 時間後

の梗塞巣の縮小効果や脳浮腫の改善効果、ならびに脳内の TNF- α や MCP-1 などの炎症性サイトカインの低下が認められた。また野生型 MSC 投与により非投与群に比べ梗塞 1 週間後の生存率が著しく改善した (50%→80%)。しかし、AT₂ 受容体欠損マウスから抽出した MSC を投与すると野生型由来の細胞投与で認められた脳内の炎症抑制効果が消失し、脳梗塞巣や脳浮腫の減弱効果は認められず細胞治療の効果が消失し、脳梗塞後の生存率はむしろ悪化した (50%→20%)。また、AT₂ 受容体欠損マウス由来 MSC を投与した群では中大脳動脈閉塞側とは反対の非梗塞側でも炎症性サイトカインが増加していた。しかし、AT₂ 受容体欠損マウス由来 MSC をあらかじめアンジオテンシン II 受容体ブロッカー (ARB) のバルサルタンで 24 時間培養した後に投与すると脳保護効果が認められた。また、GFP マウスから抽出した MSC を投与することにより MSC の脳内のホーミングを検討した結果、GFP 陽性の MSC 由来の細胞は脳梗塞巣および梗塞周囲のペナンプラでは殆ど認められず、MSC は流血中で主に増殖因子や神経保護因子などのサイトカインカクテルを放出して脳保護効果を来したと考えられた。こうしたことから、AT₂ 受容体シグナルは脳梗塞後の MSC による細胞治療効果に影響し、AT₁ 受容体も含めて両者の効果的な制御が細胞治療の効率を増強できる可能性が示唆された(論文 10)。今後、ARB を用いた細胞治療への応用を進めたいと考えている。

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 25 件)

(海外論文)

1. Kawajiri M., M. Mogi, JI. Kira, *et al*:
Reduced angiotensin II levels in the cerebrospinal fluid of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neurol Scand.* 2009;**119**:341-344
査読：有
2. Kawajiri M., M. Mogi, JI. Kira, *et al*:
Angiotensin-converting enzyme (ACE) and ACE2 levels in the cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. *Mult Scler* 2009;**15**:262-265
査読：有
3. Mogi M, JM Li, M Horiuchi *et al*:
Telmisartan prevented cognitive decline partly due to PPAR-gamma activation. *Biochem Biophys Res Commun*

- 2008;**375**:446-449
査読：有
4. Mogi M., M. Horiuchi: New insight of angiotensin II receptor blocker treatment in cardiac dysfunction using angiotensin-converting enzyme 2-deficient mice. *Hypertens Res* 2008;**31**:1833-4
査読：有
 5. Mogi M., K. Walsh, M. Iwai, and M. Horiuchi: Akt-FOXO3a signaling affects human endothelial progenitor cell differentiation. *Hypertens Res* 2008; **31**: 153-159
査読：有
 6. Kawajiri M., M. Mogi, Ji. Kira, *et al*: Reduction of angiotensin II in the cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. *Mult Scler* 2008;**14**:557-560
査読：有
 7. Iwanami J., M. Mogi, M. Horiuchi, *et al*: Deletion of angiotensin II type 2 receptor attenuates protective effects of bone marrow stromal cell treatment on ischemia reperfusion brain injury in mice. *Stroke* 2008;**39**:2554-2559
査読：有
 8. Li J.M., M. Mogi, M. Horiuchi, *et al*: Temporary pretreatment with angiotensin II type 1 receptor blocker, valsartan, prevents ischemic brain damage via increase in capillary density *Stroke* 2008; **39**: 2029-2036
査読：有
 9. Min L. J., M. Mogi, M. Horiuchi, *et al*: Angiotensin II type 2 receptor deletion enhances vascular senescence by methyl methanesulfonate sensitive 2 inhibition. *Hypertension* 2008; **51**: 1339-1344
査読：有
 10. Tsukuda K., M. Mogi, M. Horiuchi, *et al*: Diabetes-associated cognitive impairment is improved by a calcium channel blocker, nifedipine. *Hypertension* 2008; **51**: 528-533
査読：有
 11. Tomono Y., M. Mogi, M. Horiuchi: Blockade of AT1 receptor improves adipocyte differentiation in atherosclerotic and diabetic models. *Am J Hypertens* 2008; **21**: 206-212
査読：有
 12. Iwai M., M. Mogi, M. Horiuchi, *et al*: Attenuation of focal brain ischemia by telmisartan, an angiotensin II type 1 receptor blocker, in atherosclerotic apolipoprotein E-deficient mice. *Hypertens Res* 2008; **31**: 161-168
査読：有
 13. Mogi M., M. Iwai, and M. Horiuchi: Emerging concepts of regulation of angiotensin II receptors: new players and targets for traditional receptors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007; **27**: 2532-2539
査読：有
 14. Mogi M., K. Tsukuda, J. M. Li, *et al*: Inhibition of cognitive decline in mice fed a high-salt and cholesterol diet by the angiotensin receptor blocker, olmesartan. *Neuropharmacology* 2007; **53**: 899-905
査読：有
 15. Gao X., M. Mogi, M. Horiuchi, *et al*: Attenuation of monocyte chemoattractant protein-1 expression via inhibition of nuclear factor-kappaB activity in inflammatory vascular injury. *Am J Hypertens* 2007; **20**: 1170-1175
査読：有
 16. Iwanami J., M. Mogi, M. Horiuchi, *et al*: Pretreatment with eplerenone reduces stroke volume in mouse middle cerebral artery occlusion model. *Eur J Pharmacol* 2007; **566**: 153-159
査読：有
 17. Li J. M., M. Mogi, M. Horiuchi, *et al*: Angiotensin II-induced neural differentiation via angiotensin II type 2 (AT2) receptor-MMS2 cascade involving interaction between AT2 receptor-interacting protein and Src homology 2 domain-containing protein-tyrosine phosphatase 1. *Mol Endocrinol* 2007; **21**: 499-511
査読：有
 18. Min L. J., M. Mogi, M. Horiuchi, *et al*: Cross-talk between aldosterone and angiotensin II in vascular smooth muscle cell senescence. *Cardiovasc Res* 2007; **76**: 506-516
査読：有
 19. Tsukuda K., M. Mogi, M. Horiuchi, *et al*: Amelioration of cognitive impairment in the type-2 diabetic mouse by the angiotensin II type-1 receptor blocker candesartan. *Hypertension* 2007; **50**: 1099-1105
査読：有
- (国内論文)
20. 茂木正樹、岩波純、堀内正嗣：アルドステロンと脳血管障害 *Mebio* 2008; **25**: 54-61
査読：無
 21. 茂木正樹、堀内正嗣：ARB と脳卒中 分子心血管病 2008;**9**:29-34
査読：無
 22. 茂木正樹、堀内正嗣：「特集 レニン・アンジオテンシン系」 脳梗塞と RAS 内

分泌・糖尿病科 2007;25:458-462

査読：無

23. 茂木正樹、堀内正嗣：「特集 脳から心血管障害を考える」 血圧調節因子による脳梗塞修飾 分子心血管病 2007;8:579-584
査読：無
24. 茂木正樹、堀内正嗣：「特集 降圧療法と脳血管障害」 高血圧によるラジカルストレスと脳血管系の傷害 分子脳血管病 2007;6:384-389
査読：無
25. 茂木正樹、堀内正嗣：「特集 アンチエイジングに迫る」 7. レニン・アンジオテンシン系はアンチエイジングの鍵分子か？ Life Science Medicine 2007;1:148-153
査読：無

[学会発表] (計 12 件)
(国際学会)

1. Mogi M.: Angiotensin II Type 1 Receptor-Associated Protein, ATRAP Suppresses Vascular Smooth Muscle Cell Senescence Partly due to an Inactivation of Calcineurin/nuclear Factor of Activated T Cells Pathway. (62nd Annual High Blood Pressure Research) 2008 (September, 17), Atlanta GA, USA
2. Mogi M.: Renin angiotensin system in cerebrospinal fluid of patients with neurodegenerative diseases. (18th Scientific meeting International Society of Hypertension) 2008 (June, 17), Berlin, Germany
3. Mogi M.: Effect of Renin Angiotensin System on Vascular Senescence; Roles of AT1 Receptor, AT2 Receptor, Mineralocorticoid Receptor and ATRAP. (18th Scientific meeting International Society of Hypertension) 2008 (June. 17), Berlin, Germany
4. Mogi M.: Angiotensin II Type 1 Receptor Blocker Telmisartan Prevented Cognitive Decline in Amyloid Beta-Injected Mice. (European Stroke Conference 2008) 2008, (May, 14), Nice, France
5. Mogi M.: Effect of renin angiotensin system in vascular senescence; roles of AT1 receptor, AT2 receptor, mineralocorticoid receptor and ATRAP. (Gordon Research Conference 2008 Angiotensin) 2008 (February, 26), Ventura CA, USA
6. Mogi M.: New protective role of AT2 receptor stimulation in vascular smooth muscle cell senescence involving methyl

methanesulfonate sensitive 2. (61st Annual High Blood Pressure Research) 2007 (September, 26), Tucson AZ, USA

(国内学会)

7. 茂木正樹：血管平滑筋細胞におけるアルドステロンと AT1 受容体の相互作用 (第 29 回日本臨床薬理学会年会 シンポジウム 9) 2008 (12 月 5 日) 東京
8. 茂木正樹：アンチエイジングとレニン・アンジオテンシン系－脳の老化とアンジオテンシン－ (第 12 回日本心血管内分泌学会 シンポジウム) 2008 (11 月 28 日) 熊本
9. 茂木正樹：基礎実験から見た脳卒中・認知機能低下への降圧療法の選択 脳内レニン・アンジオテンシン系の役割 (第 33 回日本脳卒中学会総会 シンポジウム) 2008 (3 月 20 日) 京都
10. 茂木正樹：脳神経疾患とアンジオテンシン (第 30 回日本高血圧学会学術総会 シンポジウム 1) 2007 (10 月 25 日) 沖縄
11. 茂木正樹：血管平滑筋細胞の老化におけるアンジオテンシン II 2 型受容体の役割についての検討－MMS 2 による DNA 修復機構の関与－ (第 49 回日本老年医学会学術集会) 2007 (6 月 22 日) 札幌
12. 茂木正樹：ACE 阻害薬と ARB の心血管イベント抑制効果 (第 80 回日本内分泌学会学術総会 シンポジウム) 2007 (6 月 16 日) 東京

[図書] (計 2 件)

1. 茂木正樹他：酸化ストレスと心血管病 「酸化ストレスとアンジオテンシン」(日本医学出版) 2007：107-111
2. 茂木正樹他：単行本『高血圧ナビゲーター』 第 4 章 発症機序・病態 4. AT₁ 受容体 (メディカルレビュー社) 2007：84-85

6. 研究組織

(1) 研究代表者

茂木 正樹(MOGI MASAKI)

愛媛大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：20363236