

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年3月31日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21390242

研究課題名（和文） 血管老化におけるアンジオテンシンII受容体新規調節物質の病態生理学的意義

研究課題名（英文） Roles of Angiotensin II Receptor-Associated Protein in Vascular Senescence.

研究代表者 堀内 正嗣 (HORIUCHI MASATSUGU)

愛媛大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：40150338

研究成果の概要（和文）：血管老化の発症、進展予防が社会的にも重要な課題である。アンジオテンシンIIタイプ1受容体(AT1受容体)とタイプ2受容体(AT2受容体)は互いに拮抗して血管老化を調節していることを報告してきたが、本研究では、我々がクローニングした新規アンジオテンシンII受容体サブタイプ特異的結合調節物質が主としてAT1受容体、AT2受容体の機能を調節することで、血管老化調節に関与していることが見出された。

研究成果の概要（英文）：Angiotensin II mediates various effects through complex signaling pathways on binding to its G-protein-coupled receptors (GPCRs), the angiotensin II type 1 (AT1) receptor and type 2 (AT2) receptor. These receptors are regulated by GPCR-interacting proteins such as AT1 receptor-associated protein (ATRAP), and AT2 receptor-interacting protein (ATIP), which we have cloned. In this study, we demonstrated that ATRAP and ATIP negatively regulated vascular smooth muscle cell (VSMC) senescence in concert with the cross-talk of each angiotensin II receptor subtype.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
2010年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
2011年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
年度			
年度			
総計	13,500,000	4,050,000	17,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：血管老化、アンジオテンシン、受容体

## 1. 研究開始当初の背景

抗加齢医学の分野が注目されているが、動脈硬化、血管リモデリングなどが心血管病の発症、脳血管障害の発症の重要な要因であることを考えると、血管老化の予防が社会的にも最重要な課題の一つである。高血圧が動脈硬化をはじめ、血管の機能異常さらに最近では血管老化に関与していることが次第に明らかにされてきた。ヒト動脈硬化病変に老化した細胞が多くみられるという所見も報告されており、血管病変と血管老化の関係が脚光を集めてきている。レニン・アンジオテンシン系 (RAS) は、重要な血圧調節系として知られているが、心血管リモデリングにも重要な役割をになっている。最近、アルツハイマー病などにも血管障害の関与が示唆されており、RAS の血管に及ぼす影響からアルツハイマー病への関連性も示唆されるが、アミロイドβの蓄積においてもRASの関与を示唆する報告があり、我々もアンジオテンシン II タイプ1受容体(AT1受容体)ブロッカー(ARB)投与にて血流増加によりアミロイド沈着を抑制することを報告している。加えて、血管性の認知機能障害にもRAS系の関与が指摘されている。即ち、血管保護が認知機能低下抑制にも重要であることが次第に明らかになってきており、血管老化を抑制することが高齢化社会に向けて、大きな最重要課題である。

アンジオテンシンIIの作用は、主として、AT1受容体を介するものと理解されてきたが、申請者の堀内等がクローンしたアンジオテンシンIIタイプ2受容体(AT2受容体)が、血管障害、心筋梗塞後の心血管リモデリング等に、特異的に発現上昇することが知られてくるに従い、AT1受容体とAT2受容体の発現バ

ランスが、これら病態にとって、重要であると考えられるようになってきた。以上の結果は、AT1受容体だけでなく、AT2受容体の作用が血管病変に重要であることを強く示唆している。さらに我々は、本研究申請の主要な目的である血管平滑筋細胞の老化に関して、AT1受容体、AT2受容体が拮抗して作用し、主として酸化ストレスを調節することにより老化を調節していることも併せて報告している。加えて、AT1受容体、AT2受容体サブタイプの新規活性化機構に加えて、本研究の主要目的である、新規アンジオテンシンII受容体調節物質の存在が報告され、その作用機構が注目されてきていた。

## 2. 研究の目的

本研究においてはアンジオテンシン II 受容体サブタイプだけでなく、新規アンジオテンシン II 受容体サブタイプ特異的結合調節物質による血管老化調節機構を解明することに焦点を絞る。上記のように、AT1受容体、AT2受容体サブタイプの新規活性化機構に加えて、本研究の主要目的である、新規アンジオテンシン II 受容体調節物質の存在が報告されている。我々はAT1受容体のC-末端に特異的に結合する ATRAP(AT1 Receptor Associated Protein)をクローニングし、ATRAPはAT1受容体の作用を減弱していることを細胞レベルで報告してきたが、動物レベルではATRAPは血管傷害時に減少し、AT1受容体の活性化を減弱し血管リモデリングを改善している事、アンジオテンシン II による昇圧反応が減弱し、心肥大を抑制している事も併せて報告している。さらにフランスの Dr Nahmias のグループとの共同研究により

AT2 受容体の C-末端に特異的に結合する新規シグナル伝達調節物質 ATIP(AT2 Receptor-Interacting Protein)をクローニングし、血管平滑筋細胞においても増殖因子である増殖作用を AT2 受容体の作用を増強することにより、阻害する可能性、神経文化の促進作用を報告している。興味深いことに AT2 受容体による抗老化作用にはユビキチンコンジュゲイティングエンザイムバリエントである、MMS2(methyl methanesulfonatesensitive 2)が関与していることを報告しており、従って、本研究目的の1つとして AT2 受容体による血管平滑筋細胞における MMS2 の老化への作用、MMS2 発現機構の詳細な解析を含んでいる。

以上のことより、RAS の血管系に作用する作用は、従来のアンジオテンシン II 濃度、AT1 受容体、AT2 受容体の発現などだけでは、解釈ができないことが次第に明確になってきた。従って本研究申請においては我々がクローニングした新規アンジオテンシン II 受容体調節物質 ATRAP, ATIP の血管平滑筋細胞の老化に対する作用の動物レベル、細胞レベル、分子レベルでの解明を主たる目的としている。これらの研究は、加齢に伴う血管病変進展の解明だけでなく、新規薬剤の開発につながるものと考えている。

### 3. 研究の方法

具体的には (1) 動物実験として野生型マウス、ApoE ノックアウト (KO) マウス、既に作成済みの ApoE/AT1 受容体ダブル (KO) マウス、ApoE/AT2 受容体ダブル KO マウス、ATRAP トランスゲニック (Tg) マウス、ATIPTg マウスを用い、血管平滑筋細胞を中心に加齢に伴う老化細胞の検出、DNA 損傷細胞の検出を行い、AT1 受容体、AT2 受容体、ATRAP, ATIP の血管老化に関する意義を中心に検討する。加えて、放射線照射にて誘導される DNA 損傷と、血管老化の関係を、AT1 受容体、AT2 受容体、ATRAP, ATIP との関連においても検討する。次に細胞レベルの研究として (2) ATRAP, ATIP

の血管平滑筋細胞老化における役割を検討するため、上記マウスモデルより、調整した血管平滑筋細胞を用いて、酸化ストレス、炎症、MMS2 を中心に ATRAP, ATIP の役割を検討する。さらに、ATRAP, ATIP が関与する血管平滑筋細胞老化に関するシグナル伝達機構についても検討する。加えて ATIP は AT2 受容体シグナルの下流で重要な働きをしている因子であり、癌の抑制遺伝子に密接に関連していることから、細胞の癌化と細胞老化との間の Key Molecule である可能性もある。

(3) ATRAP, ATIP 発現機構、活性化調節機構 (リン酸化、脱リン酸化など)、さらに AT1 受容体、AT2 受容体以外の ATRAP, ATIP への他の結合因子、リガンドがあるとすれば、その同定も行っていくことを計画。

### 4. 研究成果

新規 AT1 受容体機能調節物質 ATRAP の血管老化への関与を検討したところ、ATRAP 過剰発現マウスより調整した血管平滑筋細胞では、アンジオテンシン II 投与による老化が阻害され、ATRAP による AT1 受容体のインターナリゼーション促進、p53 や p21 の発現抑制に加え、calcineurin/NFAT(nuclear factor of activated T cell)経路をブロックすることにより、血管平滑筋の老化を減弱していることを報告した。一方、新規 AT2 受容体機能調節物質 ATIP 過剰発現マウスに X 線照射を与え、ATIP 過剰発現マウスでは野生型マウスに比べ、酸化ストレスによる細胞傷害マーカーである 8-OHdg の低下とともに、SA- $\beta$ -gal 染色陽性細胞数が有意に少なく、ATIP が重要な役割を担っていることが示唆された。さらに、AT2 受容体による抗老化作用に関して MMS2 の作用を報告してきたが、AT2 受容体機能調節物質 ATIP 過剰発現マウスでは、MMS2 の発現が増加していることを認めている。野生型血管平滑筋細胞においてアンジオテンシン II の連日刺激により時間依存性に老化細

胞数や総細胞数における老化細胞の割合が増強したが、ATIP-Tg 血管平滑筋細胞では、老化が有意に抑制された。同様の結果は、酸化ストレスによる DNA 損傷の指標である 8-OHdG の細胞内レベルでも観察された。また、ATIP-Tg 血管平滑筋細胞では SHP-1 の活性化とともに、MMS2 の発現の増加が認められた。以上の結果より、ATIP が血管平滑筋細胞の老化を抑制する可能性が示唆された。この ATIP の血管老化抑制作用に少なくとも SHP-1 の活性化による、MMS2 の発現増加が関与していると考えらる。マウス大腿動脈にポリエチレンチューブをカフとして巻きつける血管リモデリングモデルにても、ATIP-Tg では新生内膜形成を抑制することを観察している。さらに、ATIP の糖代謝に与える影響に着目し、ATIP-Tg における糖代謝の解析と糖尿病マウスの血液細胞を置換することにより ATIP の血液系を介した作用が糖代謝にどのように影響しているかを検討したところ、ATIP は糖代謝を改善する作用を有する可能性が示唆された。また、血球細胞での ATIP の発現増加により炎症性細胞が減弱し、脂肪細胞の分化が改善されることで糖代謝を改善するメカニズムも関連していることが示された。さらに経口投与可能な AT2 受容体刺激薬 Compound21 (C21) が開発され、我々は、C21 がマウスにおいて認知機能を増加させることを報告している。

#### 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 10 件)

1. Min LJ, Mogi M, Horiuchi M, et al. Angiotensin II type 2 receptor-interacting protein prevents vascular senescence. J Am Soc Hypertens. 2012 (in press) 査読有
2. Horiuchi M, Iwanami J, Mogi M. Regulation of angiotensin II receptors beyond classical pathway. Clin Sci. 2012 (in press) 査読有
3. Jing F, Mogi M, Horiuchi M, et al. Direct stimulation of angiotensin II type 2 receptor enhances spatial memory. J Cereb Blood Flow Metab. 32: 248-255, 2012. 査読有
4. Okumura M, Iwai M, Horiuchi M, et al. Possible involvement of AT(2) receptor dysfunction in age-related gender difference in vascular remodeling. J Am Soc Hypertens. 5: 76-84, 2011. 査読有
5. Horiuchi M, Mogi M, Iwai M. The angiotensin II type 2 receptor in the brain. J Renin Angiotensin Aldosterone Syst. 11:1-6, 2010. 査読有
6. Min LJ, Mogi M, Horiuchi M, et al. Angiotensin II type 1 receptor-associated protein prevents vascular smooth muscle cell senescence via inactivation of calcineurin/nuclear factor of activated T cells pathway. J Mol Cell Cardiol. 47: 798-809, 2009. 査読有
7. Sakata A, Mogi M, Horiuchi M, et al. Sex-different effect of angiotensin II type 2 receptor on ischemic brain injury and cognitive function. Brain Res. 1300: 14-23, 2009. 査読有
8. Tsukuda K, Mogi M, Horiuchi M, et al. Cognitive deficit in amyloid-beta-injected mice was improved by pretreatment with a low dose of telmisartan partly because of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activation. Hypertension. 54: 782-7, 2009. 査読有
9. Fujita T, Mogi M, Horiuchi M, et al. Attenuation of Cuff-Induced Neointimal Formation by Overexpression of Angiotensin II Type 2 Receptor-Interacting Protein 1. Hypertension. 53: 688-93, 2009. 査読有
10. Min LJ, Mogi M, Iwai M, Horiuchi M. Signaling mechanisms of angiotensin II

in regulating vascular senescence.  
Ageing Res Rev. 8:113-21, 2009.  
査読有

[学会発表] (計6件)

1. 岩波純、茂木正樹、関莉娟、堀内正嗣 他  
慢性脳低灌流モデルマウスの認知機能  
低下における新規AT2受容体アゴニスト  
の作用  
(第34回日本高血圧学会総会)  
2011年10月20日、栃木、日本.
2. 関莉娟、茂木正樹、岩波純、堀内正嗣 他  
アンジオテンシンII2型受容体関連タン  
パク、ATIPによる血管老化抑制作用  
(第34回日本高血圧学会総会)  
2011年10月22日、栃木、日本.
3. Iwanami J, Mogi M, Horiuchi M et al.  
Effect of Direct AT2 Receptor  
Stimulation by Compound 21 on  
Cognitive Decline in Mouse Chronic  
Cerebral Hypoperfusion Model  
(High Blood Pressure Research 2011  
Scientific Sessions)  
2011年9月21日、Orlando, USA.
4. 堀内正嗣  
高血圧と認知機能障害  
(日本脳卒中学会総会)  
2011年7月30日、京都、日本.
5. 堀内正嗣  
認知症に対するアンチエイジング  
(第11回日本抗加齢医学会)  
2011年5月28日、京都、日本.
6. Horiuchi M.  
Roles of angiotensin II type 2  
receptor and its associated protein,  
ATIP in anti-aging.  
(14<sup>th</sup> International Congress of  
Endocrinology)  
2010年3月28日、Kyoto, Japan.

[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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

堀内 正嗣 (HORIUCHI MASATSUGU)

愛媛大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：40150338

(2) 研究分担者

岩井 将 (IWAI MASARU)

愛媛大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：00184854

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

(3) 連携研究者

なし