

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 5 月 15 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22790729

研究課題名

血管平滑筋特異的（プロ）レニン受容体欠損が起こす著明な血管繊維化発症機構の解明

研究課題名

Physiological roles of (pro)renin receptor in vascular smooth muscle cells

研究代表者

三戸 麻子 (MITO ASAKO)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：20468474

研究成果の概要（和文）：我々は Cre-loxP システムを用いて平滑筋細胞特異的(プロ)レニン受容体{(P)RR}ノックアウトマウスを作成し、血管平滑筋細胞における(P)RR/ATP6AP2 の生理的役割について検討をおこなった。(P)RR ノックアウトマウスの腹部大動脈は著明な線維化を起こし、血管平滑筋細胞の細胞死がその病態の一因と考えられた。実験の結果、(P)RR は細胞内オルガネラ内部を酸性環境に維持する Vacuolar-H⁺ATPase を介し、正常な細胞機能維持に必須な役割を担う可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：This study is performed to examine the roles of (pro)renin receptor in the development and physiology of vascular smooth muscle cells. The smooth muscle cell-specific *Atp6ap2* conditional knockout (CKO) mice were generated by mating female *Atp6ap2*-floxed mice with male mice that expressed the Cre recombinase under the control of the myosin heavy chain (*Myh-11*) promoter. Histological examination revealed that the CKO mice exhibited the decreased number of vascular smooth muscle cells and increased number of fibroblasts in the aorta due to vascular muscle cell death. Our researches revealed that the (P)RR/ATP6AP2 physiologically plays an essential role in the cell survival of mouse vascular smooth muscle cells through contributing to assembly and function of vacuolar H⁺-ATPase.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	2,600,000	780,000	3,380,000

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：(1) (プロ)レニン受容体(2) 血管平滑筋細胞(3) 線維化 (4) V-ATPase

1. 研究開始当初の背景

血管平滑筋細胞に（プロ）レニン受容体 [(P)RR]は存在しているものの、その生理的役割は不明であった。

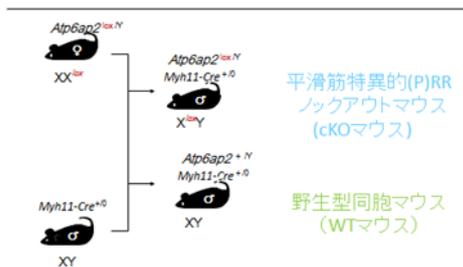
2. 研究の目的

血管平滑筋細胞における (P)RR の生理的役割を検討する。

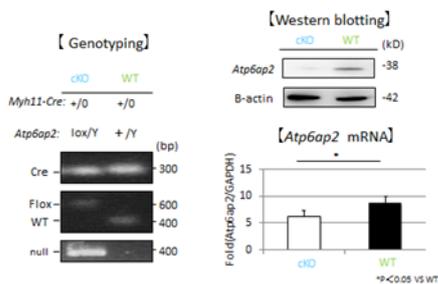
3. 研究の方法

Cre-loxP システムを用いて平滑筋細胞特異的 (P)RR ノックアウトマウス (cKO マウス) を作成し, *in vivo*, *in vitro* の両面から解析をおこなった。

平滑筋細胞特異的 (P)RR ノックアウトマウスの作成



(P)RR ノックアウトの証明 (腹部大動脈)

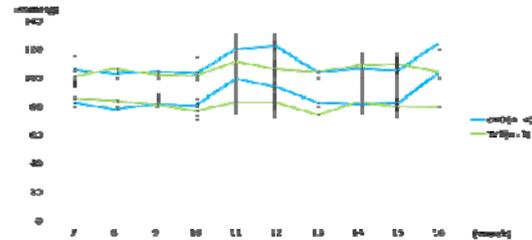


4. 研究成果

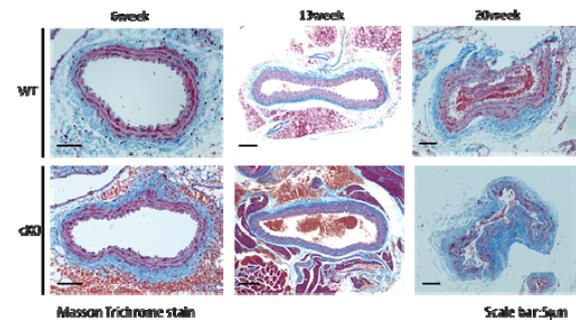
cKO マウス (n=4) および野生型同胞マウス (LM マウス, n=2) の頸動脈にテレメトリを挿入して自由行動下血圧測定を行ったところ, 生後 16 週齢までに両者に有意な血圧差は認めなかった. (Fig. 1) 腹部大動脈の経時的組織学的観察では, 生後 16 週齢の cKO マウスで中膜内の弾性板が断裂し, 平滑筋細胞数の著大な減少と大動脈の繊維化を認めた.

(Fig. 2) 電子顕微鏡による観察では, cKO マウスの血管平滑筋細胞内に空砲やリポフスチン様顆粒が過剰に沈着しており, 未消化のオルガネラを含む巨大化した autophagosome が多数認められた. (Fig. 3)

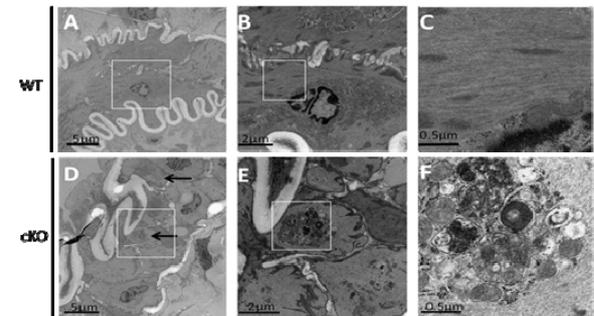
(Fig. 1) 頸動脈テレメトリによる血圧測定



(Fig. 2) マウス腹部大動脈



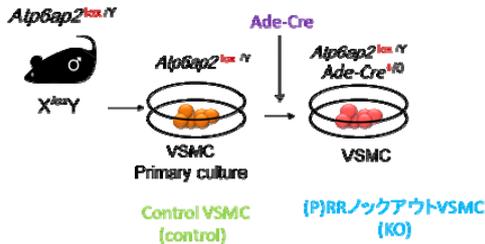
(Fig. 3) マウス血管平滑筋細胞 (電子顕微鏡)



次に, *in vitro* の実験として (P)RR floxed マウス由来の培養血管平滑筋細胞に cre アデノウイルスを感染させ (P)RR をノックアウトして解析を行った. (Fig. 4a, b) (P)RR ノックアウト VSMC では, 細胞内オルガネラの膜蛋白に存在する vacuolar H⁺-ATPase の subunit c の発現の低下, 細胞内オルガネラの酸性環境の障害, autophagosome の隔離膜に発現する LC3-II の発現増加が認められた. (Fig. 5) さらに血管平滑筋細胞における炎症性サイトカインの mRNA を定量評価したところ, MCP-1 と IL-6 が (P)RR ノックアウトによりそれぞれ 3 倍ずつ増加することが認められた. (Fig. 6) 以上より血管平滑筋細胞におい

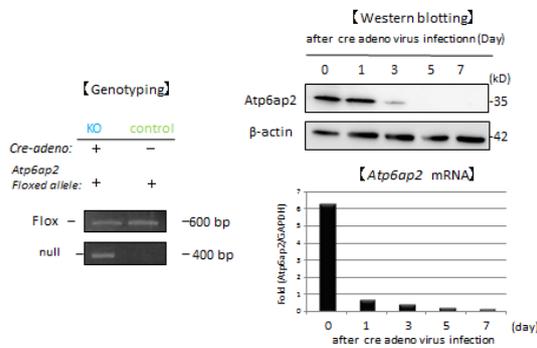
て(P)RR は正常な細胞機能維持に必要な役割を担い、また炎症性サイトカインの分泌を介して血管内皮細胞へ影響を及ぼしている可能性が示唆された

(Fig. 4a)



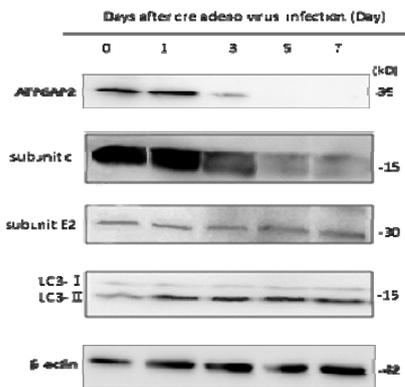
(Fig. 4b)

(P)RRノックアウトの証明(培養血管平滑筋細胞)

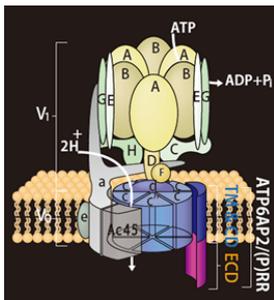


(Fig. 5)

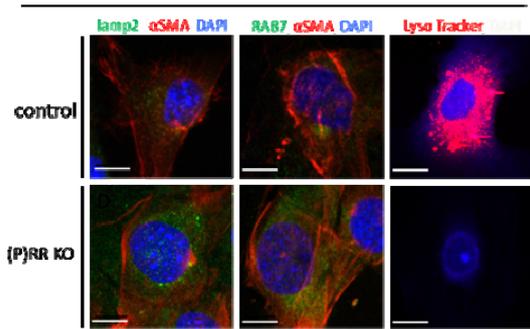
• V-ATPase subunit のウエスタンブロット



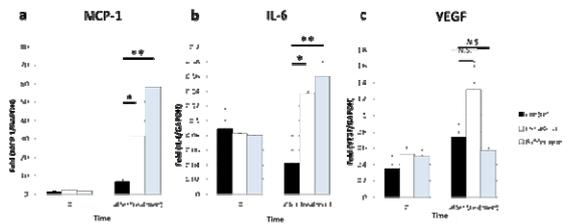
• V-ATPase/ (P)RR 模式図



• 血管平滑筋細胞免疫染色



(Fig. 6) 血管平滑筋細胞におけるケモカイン/サイトカイン mRNA



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 0 件)

〔学会発表〕 (計 5 件)

①日本高血圧学会 2011年10月22日 宇都宮東武ホテルグランデ 三戸 麻子 培養血管平滑筋細胞における(プロ)レニン受容体の生理学的役割

②American Heart Association High Blood Pressure council 2011.9.21. Orlando, Florida, USA Asako Mito Physiological roles of (pro)renin receptor/ATP6AP2 in vascular smooth muscle cells

③日本腎臓学会 2011年6月17日 パシフィコ横浜 三戸 麻子 血管平滑筋細胞内リサイクルシステムにおける(プロ)レニン受容体の役割

④日本内分泌学会 2011年4月21日 神戸国際会議場 三戸 麻子 平滑筋細胞特異的(プロ)レニン受容体ノックアウトマウスによるオートファジー障害

⑤World congress of nephrology 2011, 2011.4.10 Vancouver Canada Asako Kurauchi-Mito Physiological roles

of (pro)renin receptor/ATP6AP2 in
vascular smooth muscle cells

〔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

三戸 麻子 (MITO ASAKO)
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号：20468474