

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 27 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590296

研究課題名(和文)閉経後高血圧の新しい発症経路の解明：AT1受容体・RGS・SPLの相互作用解析

研究課題名(英文)Analysis of a novel mechanism responsible for postmenopausal hypertension

研究代表者

木村 定雄(KIMURA, Sadao)

千葉大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：40134225

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の結果から、(1)血管平滑筋にはRGS2およびSPLが共存すること、(2)AT1受容体の安定発現細胞ではRGS2はAT1受容体シグナルを強力に抑制すること、(3)RGS2のAT1受容体シグナルの抑制効果をSPLは強力に増強すること、(4)女性ホルモンであるエストロゲンは血管平滑筋のSPLの発現を亢進することが明らかになった。以上から、女性の閉経時にエストロゲンが急激に減少することにより、血管平滑筋のSPLの発現が減少し、平滑筋のAng II受容体-Gqシグナル経路による収縮を抑制していたRGS2の抑制作用が減少して、より強く血管を収縮させて高血圧が生じる可能性が強く示唆された。

研究成果の概要(英文)：This study showed that (1) RGS2 and spinophilin (SPL) are present in vascular smooth muscle cells, (2) RGS2 showed potent inhibitory effects on intracellular calcium responses induced by Ang II in HEK293T cells stably expressing AT1 receptors, (3) SPL strongly enhanced the inhibitory effects of RGS2 on AT1 receptor calcium signaling, and (4) estrogen increased the expression of SPL in vascular smooth muscle cells. These results strongly suggest that loss of circulating estrogen in blood decreases the expression of SPL in smooth muscle cells, and the decreased expression of SPL weakens the inhibitory effects of RGS2 enhanced by SPL, leading to the development of hypertension in postmenopausal women.

研究分野：医師薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・薬理学一般

キーワード：閉経後高血圧 アンジオテンシン アンジオテンシン受容体 RGS スピノフィリン

1. 研究開始当初の背景

アンジオテンシン II (Ang II)、エンドセリン-1 (ET-1)、ノルアドレナリンを初めとする血圧調節に重要なペプチドホルモン・神経伝達物質は、G 蛋白質共役受容体 (GPCR) に結合してその生理機能を発揮している。血圧は、(1) それらの個々の血管作動性ホルモン量 (とくに Ang II) の増減により、また、(2) それらの受容体 (GPCR) の血管平滑筋細胞上の発現量や受容体のリン酸化やインターナリゼーション機構による細胞膜上の受容体量 (とくにアンジオテンシン 1 受容体、AT1) の増減などにより変動することが知られている。さらに近年、細胞内の G 蛋白質シグナル調節蛋白質 (RGS) による血圧調節の重要性が明らかになりつつある。とくに、(3) Ang II により活性化された AT1 受容体シグナルが細胞内調節蛋白質 (RGS2) により大きく調節されることが後述するように遺伝子欠損マウスの研究より近年明らかになってきた。

RGS 蛋白質は、GPCR を介する情報伝達を抑制する細胞内調節因子ファミリー蛋白質で、分子内に約 120 アミノ酸残基からなる RGS ドメインを含む。RGS ドメインが活性型 (GTP 結合型) G サブユニットと結合して、G のもつ内在性 GTPase 反応を増強して GDP 結合型 G に加水分解して G を不活性化する。そして下流への情報伝達を抑制し、刺激に対する順応・脱感作 (G 蛋白質シグナルの強度および活性化時間を抑制) を引き起こす。多くの RGS 蛋白質の RGS ドメインは G_i、G_o、G_{q/11} サブユニットと結合して抑制活性を示す。

現在、約 40 種の RGS 蛋白質が知られている。R4 サブファミリーに属する RGS 蛋白質は、分子内に、短い N 末側と C 末側に RGS ドメインを持つ短い RGS 蛋白質の一群で、血管平滑筋には、RGS1、RGS2、RGS3、RGS4、RGS5、RGS16 などの発現が知られている。

R4 ファミリーに属する RGS2、RGS4 と RGS5 は G_q の GAP (GTPase activating protein) として特に心血管系の調節因子として注目を浴びている。強力な G_q の GAP として知られる RGS2 は、アンジオテンシン II やエンドセリン受容体シグナルを抑制することが知られている。RGS2 を欠損させたマウスは、ヘテロ欠損でもホモ欠損でも強度の高血圧を示す。

一方、同じ R4 ファミリーに属する構造のよく似た RGS5 欠損マウスはすこし低血圧であり、RGS4 欠損マウスでは血圧の変化はない。これは RGS2 が AT1 受容体と選択的に相互作用して平時より G_q シグナルをかなりの程度抑制していると推定される。現在、RGS2 は高血圧の原因遺伝子として、RGS2 遺伝子の点突然変異が見出だされ注目されている。また、RGS4 を心筋細胞特異的に発現させたトランスジェニックマウスでは、圧負荷により死亡率の増加・心肥大の抑制が見られ、RGS2 および RGS4 の欠損マウスでは圧負荷による心肥大・心不全と死亡率が増加している。

同じ血管平滑筋に存在し、RGS 蛋白質としてよく似た構造と特性を持つ RGS2、RGS4、RGS5 の各ノックアウトマウスの特徴が大きく異なることから、我々はアンジオテンシン AT1 受容体の情報伝達に対し、RGS2 が受容体選択的に強い抑制効果を持っている可能性を考えた。また、閉経後高血圧症はエストロゲンとの関連が指摘されており、発症機序は諸説が報告されている。RGS 機能の機能制御の例として、神経系で足場 (scaffold) 蛋白質である spinophilin (SPL) が RGS2 と受容体に結合すると RGS2 の抑制機能が促進され、類似の足場蛋白質である neurabin が結合すると逆に抑制されることが報告された。

2. 研究の目的

本研究は、その SPL による RGS2 の抑制機能の増強作用に注目し、血管平滑筋に存在して血圧上昇作用を持つアンジオテンシン AT1 受容体と、細胞内シグナル抑制因子 RGS2、足場蛋白質スピノフィリン (SPL) の 3 者がエストロゲンと深く関係して閉経後高血圧の発症に関与する可能性を考えた。そこで、上記の 3 者 (AT1 受容体、RGS2、SPL) の分子間相互作用を、関連蛋白質を遺伝子工学的に作製して生化学的・薬理的に解析することから、1) 血管に発現する他の RGS4・RGS5 と比べて RGS2 は特異的に AT1 受容体シグナルを抑制すること、2) SPL は RGS2 の抑制作用を増強すること、3) エストロゲンの存在は SPL 発現を増強させる因子であることを示して、新しい閉経後高血圧の発症機構の可能性を示すことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) RGS/SPL 発現細胞の細胞内 Ca 応答を指標とした増強効果の解析

AT1 および ETA 受容体発現細胞に RGS2 と SPL を共発現させ、Ang II と ET-1 に対する細胞内 Ca 応答変化を比較することにより、RGS2 の抑制効果を SPL が増強することを明らかにする。

(2) RGS2 の N 末端部分の役割の解析：細胞内 Ca 応答を指標とした実験

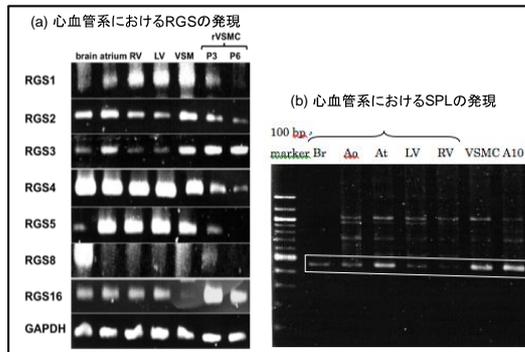
RGS2 は N 末端部と 1 個の RGS ドメインを含む C 末端部とからなる。SPL 結合部位を含む N 末端部を欠損すると、エストロゲン感受性 SPL の RGS 活性増強効果はなくなると予想している。N 末端を欠く RGS2 のドメイン部分と SPL を AT1 および ETA 受容体発現細胞に共発現させ、RGS2 の N 末端部分の機能的役割を検討する。

(3) 血管平滑筋に対するエストロゲン投与効果の検討

ラット初代培養血管平滑筋の AT1 受容体・RGS2・SPL の、エストロゲン投与による発現変動を、PCR 法および Western blotting により検討する。

4. 研究成果

(1) 血管平滑筋における RGS と SPL の PCR 法による発現解析



心筋・心房・血管平滑筋、培養血管平滑筋に RGS1、RGS2、RGS3、RGS4、RGS5、RGS16 が発現していた。RGS8 は弱く発現していた。また、SPL も同様に心筋・心房・血管平滑筋、血管平滑筋由来 A10 細胞に発現していた。

(2) AT1a 受容体を介する情報伝達に対する RGS の抑制効果

マウス AT1a 受容体を安定発現させた 293T 細胞に、RGS2、RGS4、RGS5 を一過性に発現させ、Fura-2 試薬を用いてアンジオテンシン刺激による細胞内 Ca^{2+} 濃度変化を測定し、AT1a 受容体を介する情報伝達に対する各 RGS の抑制効果について検討を行った。AT1a 受容体シグナルに対する抑制効果は、RGS2 が Ang II の全濃度において約 60% を抑制して一番強く、RGS4 と RGS5 は弱かった。

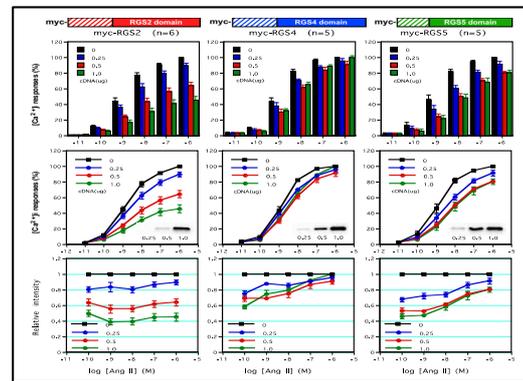
(3) エストロゲン処理による培養血管平滑筋中の SPL の発現変動の解析

培養血管平滑筋をエストロゲン処理し、ウェスタン法により SPL 蛋白質の発現を検討した結果、SPL は約 2 倍に発現が増加することが明らかになった。

(4) 細胞内 Ca 応答を指標とした RGS2 の抑制作用の SPL による増強効果の解析

AT1a 受容体を安定発現する HEK293T 細胞 (AT1a-293T) に RGS2 と SPL を共発現させ、Ang II に対する細胞内 Ca 応答変化を比較することにより、RGS2 の抑制効果を SPL が増強するかどうかを検討した。SPL 単独発現では Ang II 刺激による Ca 応答は変化しない。一方、RGS2 を低発現させた AT1a-293T 細胞は少し抑制されるが、SPL の共発現により、SPL の濃度依存的に RGS の抑制効果が増強した。神経系と同様に、SPL に類似の足場蛋白質である neurabin (NRB) の共発現ではほとんど RGS2 の抑制作用は変化がなかった。

図: AT1a 受容体シグナルに対する RGS の抑制効果 RGS2 は DNA 濃度依存的にカルシウム応答を約 20~60% 強く抑制する。一方、RGS4 と RGS5 は Ang II 低濃度はよく抑制するが、高濃度では抑制が弱い。

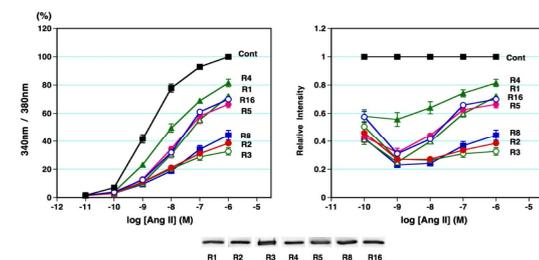


(5) 考察

本研究の結果から、血管平滑筋には RGS2 および SPL が共存すること、AT1 受容体の安定発現細胞では、RGS2 は AT1 受容体シグナルを強力に抑制すること、RGS2 の AT1 受容体シグナルの抑制効果を SPL は強力に増強すること、女性ホルモンであるエストロゲンは血管平滑筋の SPL の発現を亢進していることが明らかになった。以上のことから、女性の閉経時にエストロゲンが急激に減少することにより、血管平滑筋の SPL の発現が減少し、平滑筋の Ang II 受容体シグナル経路による収縮を抑制していた RGS2 の抑制作用が減少して、より強く血管を収縮させて高血圧が生じる可能性が強く示唆された。

(6) 追記

本研究は、AT1 受容体カルシウムシグナルに対する RGS2 の抑制効果を SPL が抑制効果を促進することを調べたものであるが、その他の R4 ファミリー蛋白質 (RGS1、RGS3、RGS4、RGS5、RGS8、RGS16) の抑制効果をほぼ等量を発現して調べたところ、RGS3 と RGS8 が RGS2 と同様に強力な抑制効果を示すことが判明した。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Matsuzaki N, Nishiyama M, Song D, Moroi K, Kimura S: Potent and selective inhibition of angiotensin AT1 receptor signalling by RGS2: roles of its N-terminal domain. Cellular Signalling. 査読有、Vol.23, No.6, 2011, 1041-1049 DOI: 10.1016/j.cellsig.2011.01.023

〔学会発表〕(計 3 件)

西山真理子、住宮菜弥香、木村定雄: 血

管作動性ペプチド受容体のカルシウム応答に対する RGS8 の強力な抑制効果：RGS ドメインの C 末端部分の必要性（第 87 回日本薬理学会総会、2014.3.20. 仙台）

宋丹、西山真理子、木村定雄：血管作動性ペプチド受容体のカルシウム応答に対する RGS2、RGS3、RGS8 の強力な抑制効果（第 85 回日本薬理学会総会、2012.3.14. 京都）

〔図書〕(計 1 件)

Nishiyama M, Ishii M, Hirose S, Yamasaki H, Kimura S. Academic Press, Chapter 239, In silico search for biologically active peptides. in "Handbook of the Biologically Active Peptides", 2nd edition, edited by Kastin AJ, 2013, pp1743-1748.

〔その他〕

<http://www.m.chiba-u.ac.jp/class/bunsis eitai/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木村 定雄 (KIMURA SADAŌ)
千葉大学・大学院医学研究院・教授
研究者番号：40134225

(2) 研究分担者

西山 真理子 (NISHIYAMA MARIKO)
千葉大学・大学院医学研究院・助教
研究者番号：00092081

碓井 宏和 (USUI HIROKAZU)
千葉大学・大学院医学研究院・講師
研究者番号：90375634