

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 9 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25293310

研究課題名(和文) アンジオテンシンIIタイプ2受容体機能調節物質を軸とした体系的認知機能増加制御

研究課題名(英文) Systematic Approach for the Enhancement of Cognitive Function by the Activation of Angiotensin Type 2 receptor Associated Protein

研究代表者

堀内 正嗣(Horiuchi, Masatsugu)

愛媛大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：40150338

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：血管性認知症マウスモデルを用い認知機能を調べたところ、アンジオテンシンIIタイプ2受容体(AT2受容体)欠損マウスでは、認知機能が障害されていた。AT2受容体機能調節タンパクATIP(AT2 Receptor-Interacting Protein)過剰発現マウスでは、認知機能低下が野生型マウスに比べ軽度である事、アンジオテンシン変換酵素2欠損マウスでは、認知機能低下が著名である事を観察している。これらの結果はレニン・アンジオテンシン系の保護軸が認知機能向上に作用することを示唆している。ATIPが転写調節因子作用している可能性も示唆された。

研究成果の概要(英文)：We observed that cognitive impairment after bilateral common carotid artery stenosis (BCAS), as a model of vascular dementia, was more marked in angiotensin type 2 (AT2) receptor knockout (KO) mice compared with that in wild-type (WT) mice, and that the overexpression of AT2 receptor interacting protein (ATIP) could protect cognitive impairment after BCAS. We also reported that angiotensin converting enzyme (ACE2) KO mice exhibited significant impairment of spatial cognitive function. These results suggest that protective arm of renin-angiotensin system (RAS) could attenuate cognitive decline after ischemic brain damage. Moreover, we proposed a new mechanism by which ATIP could play an important role in neurons and vascular smooth muscle cells as transcription factor as a member of protective arm of RAS.

研究分野：分子心血管・薬理学、心血管リモデリング、脳血管疾患におけるレニン・アンジオテンシン系

キーワード：アンジオテンシン 受容体 認知機能

### 1. 研究開始当初の背景

脳におけるレニン・アンジオテンシン (RA) 系研究は、従来、主として血圧調節に焦点が絞られてきたが、動物実験データだけでなく、RA 系の抑制が脳卒中の重症化も抑制すること、アルツハイマー病を含む認知機能障害発症を予防すること等が臨床的にも相次いで報告されてきている。加えて、RA 系は古典的経路としての”アンジオテンシン変換酵素 (ACE; angiotensin converting enzyme)/アンジオテンシン II/アンジオテンシン II タイプ 1 (AT1)受容体軸”に対し、アンジオテンシン II タイプ 2 受容体(AT2 受容体)、“ACE2/アンジオテンシン (1-7)/Mas 受容体軸”が RA 系の”Protective Arm” (保護軸)として作用する可能性が注目されている。従って、RA 系は従来考えられてきたように、単に昇圧、酸化ストレス、炎症などを介して臓器障害に作用するだけでなく、AT2 受容体刺激も含め、臓器保護的に作用する側面も有していることが明らかにされてきている。虚血性脳血管障害に対してアンジオテンシン-(1-7)は抑制的に働き、脳保護効果を有する可能性が報告され、脳血管障害に起因する認知機能障害の発症・進展抑制にも ACE2/アンジオテンシン-(1-7)/Mas 系が効果的に働く可能性が示唆されている。海馬領域にも Mas 受容体が発現していることは知られているが、認知機能に ACE2/アンジオテンシン-(1-7)/Mas 系に関しての詳しい報告は殆どなく、脳における作用解明が待たれる。従って、脳 RA 系の作用の詳細な解明が臨床的にもますます重要な課題となってきている。

### 2. 研究の目的

RA 系が血管性認知症、アルツハイマー病発症に深く関わっている可能性、AT1 受容体ブロック (ARB)が脳卒中の発症、重症化を抑制し、認知機能障害発症、進行を予防することも臨床的にも報告されている。この効果は、ACE 阻害薬より、ARB の方が有効であるとの報告もあり、脳内 RA 系の作用の詳細な解明が実臨床においても重要である。本研究においては、我々がクローニングした AT2 受容体機能調節タンパク ATIP (AT2 Receptor-Interacting Protein) が RA 系の”Protective Arm”へ与える作用を中心に解明し、RA 系阻害より進んで RA 系調節による認知機能増加・改善作用を明らかにすることを主たる目的とする。

### 3. 研究の方法

動物実験、培養細胞実験を並行して行い相補的にデータを構築することにより体系的な実験を進行する。動物実験として、両側総頸動脈に極小コイルを留置する両総頸動脈狭窄術 (BCAS)による血管性認知症マウスモデルを用いる。野生型マウス、AT2 受容体欠損マウス、ATIP 過剰発現マウスに BCAS を施工し、モリス

水迷路試験等にて認知機能獲得の経過を観察する。これらマウスモデルに AT2 受容体刺激薬、AT2 受容体拮抗薬を投与し、ATIP が AT2 受容体を介さないで認知機能に影響する可能性を検討する。同時に、脳血流、酸化ストレス、炎症等について測定することにより作用機構解明につなげる。ACE2/アンジオテンシン-(1-7)/Mas 系への影響と認知機能との関連について、Mas 受容体欠損マウス、ACE2 欠損マウスにて同様の実験を行う。細胞実験として、上記マウス海馬より調整した神経細胞を用い、AT2 受容体刺激とは独立した ATIP の神経分化・保護作用、ATIP による AT2 受容体/Mas 受容体ダメージ形成への影響、アンジオテンシン-(1-7)による AT2 受容体刺激等について検討する。

### 4. 研究成果

(1) 両側総頸動脈に極小コイルを留置する両総頸動脈狭窄術 (bilateral common carotid artery stenosis, BCAS)による認知症マウスモデルを主として用い、モリス水迷路試験で空間認知機能を調べたところ、AT2 受容体欠損マウスでは、野生型マウスに比べ障害されていた。同時に脳血流低下、酸化ストレス亢進、炎症反応亢進を観察した。AT2 受容体刺激薬 (compound 21 ; C21)投与により野生型マウスでは BCAS 後の空間認知能力の向上を認めた。加えて、C21 投与にて、脳梗塞後の虚血性障害が減弱することも報告している。(J Am Soc Hypertens, 9: 250-256, 2015)

(2) 中大脳動脈狭窄による脳血管障害に対しても、C21 投与は急性期投与でも脳保護効果が認められた。(Am J Hypertens. 27: 1036-1044, 2014)

(3) ATIP 過剰発現マウスでは、BCAS 後の認知機能低下が野生型マウスに比べ軽度である事。C21 による認知機能改善作用が ATIP 過剰発現マウスでは野生型マウスに比べ、強力である事を観察している。(論文投稿準備中)

(4) アンジオテンシン変換酵素 2 (ACE2) 欠損マウスでは、空間認知機能低下が著名である事を観察している。これらの結果はレニン・アンジオテンシン系の Protective Arm が認知機能向上に作用することを示唆している。(論文投稿中)

(5) AT1 受容体ブロックにより ACE2/アンジオテンシン-(1-7)/Mas 受容体系の亢進とアンジオテンシン-(1-7)が AT2 受容体を刺激し、血管リモデリングを効果的に抑制することを報告している。(Hypertension. 63: e53-9, 2014) さらに、C21 による直接的 AT2 受容体刺激は PPAR $\gamma$  活性化を一部介して血管リモデリングを改善する可能性が示唆され、培養血管平滑筋細胞でそのメカニズムを検討したところ、AT2 受容体機能調節物質である、ATIP (AT2 Receptor Interacting Protein) が転写調節因子あるいは、Co-factor として作用していることが観察された。(Am J Hypertens (in press) 2016)

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 20 件)

1. Schwengel K, Namsolleck P, Lucht K, Clausen BH, Lambertsen KL, Valero-Esquitino V, Thöne-Reineke C, Müller S, Widdop R E, Denton KM, Horiuchi M, Iwai M, Boato F, Dahlöf B, Hallberg A, Unger T, Steckelings UM. Angiotensin AT2-receptor stimulation improves survival and neurological outcome after experimental atroke in mice. *J Mol Med*. 2016. 査読有  
DOI: 10.1007/s00109-016-1406-3 2016.
2. Kukida M, Mogi M, Ohshima K, Nakaoka H, Iwanami J, Kanno H, Tsukuda K, Chisaka T, Min LJ, Wang XL, Bai HY, Shan BS, Higaki A, Yamauchi T, Okura T, Higaki J, Horiuchi M. Angiotensin II type 2 inhibits vascular intimal proliferation with activation of PPAR $\gamma$ . *Am J Hypertens* (in press)2015. 査読有  
<http://ajh.oxfordjournals.org/content/early/2015/10/14/ajh.hpv168.long>
3. Fukuoka T, Hayashi T, Hirayama M, Maruyama H, Mogi M, Horiuchi M, Takao M, Tanahashi N. Platelet-endothelial cell interaction in brain microvessels of angiotensin II type-2 receptor knockout mice following transient bilateral common caroyid artery occlusion. *J Thromb Thrombolysis*. 40: 401-402, 2015. 査読有  
DOI: 10.1007/s11239-015-1254-y.
4. Bai HY, Mogi M, Nakaoka H, Kan-no H, Tsukuda K, Chisaka T, Wang XL, Kukida M, Shan BS, Yamauchi T, Higaku A, Iwanami J, Horiuchi M. Pre-treatment with LCZ696, an orally active angiotensin receptor neprilysin inhibitor, prevents ischemic brain damage. *Eur J Pharmacol*. 762: 293-298, 2015. 査読有  
DOI: 10.1016/j.ejphar.2015.05.059.
5. Iwanami J, Mogi M, Tsukuda K, Wang XL, Nakaoka H, Kan-No H, Chisaka T, Bai HY, Shan BS, Kukida M, Horiuchi M. Direct angiotensin II type 2 receptor stimulation by compound 21 prevents vascular dementia. *J Am Soc Hypertens*, 9: 250-256, 2015. 査読有  
DOI: 10.1016/j.jash.2015.01.010.
6. Min LJ, Mogi M, Tsukuda K, Jing F, Ohshima K, Nakaoka H, Kanno H, Wang XL, Chisaka T, Bai HY, Iwanami J, Horiuchi M. Direct stimulation of angiotensin II type2 receptor initiated after stroke ameliorates ischemic brain damage. *Am J Hypertens*. 27: 1036-1044, 2014. 査読有  
DOI: 10.1093/ajh/hpu015.
7. Mogi M, Kawajiri M, Tsukuda K, Matsumoto S, Yamada T, Horiuchi M. Serum levels of renin-angiotensin system components in acute stroke patients. *Geriatr Gerontoi Int*. 14: 793-798, 2014. 査読有  
DOI: 10.1111/ggi.12167.
8. Iwanami J, Mogi M, Tsukuda K, Wang XL, Nakaoka H, Jing F, Ohshima K, Chisaka T, Bai HY, Kanno H, Min LJ, Horiuchi M. Role of angiotensin-converting enzyme 2/angiotensin-(1-7)/Mas axis in the hypotensive effect of azilsartan. *Hypertens Res*. 37: 616-620, 2014. 査読有  
DOI: 10.1093/ajh/hpu015.
9. Ohshima K, Mogi M, Nakaoka H, Iwanami J, Min LJ, Kanno H, Tsukuda K, Chisaka T, Bai HY, Wang XL, Ogimoto A, Higaki J, Horiuchi M. Possible role of angiotensin-converting enzyme 2 and activation of angiotensin II type 2 receptor by angiotensin-(1-7) in improvement of vascular remodeling by angiotensin II type 1 receptor blockade. *Hypertension*. 63 : e53-9, 2014. 査読有  
DOI:10.1161/HYPERTENSIONAHA.113.02426.
10. Iwanami J, Mogi M, Tsukuda K, Jing F, Ohshima K, Wang XL, Nakaoka H, Kanno H, Chisaka T, Bai HY, Min LJ, Horiuchi M. Possible synergistic effect of direct angiotensin II type 2 receptor stimulation by compound 21 with memantine on prevention of cognitive decline in type 2 diabetic mice. *Eur J Pharmacol*. 724: 9-15, 2014. 査読有  
DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.113.02426.

11. Jing F, Mogi M, Min LJ, Ohshima K, Nakaoka H, Tsukuda K, Wang XL, Iwanami J, Horiuchi M.  
Effect of angiotensin II type 2 receptor-interacting protein on adipose tissue function via modulation of macrophage polarization.  
*PLoS One*. 8: e60067, 2013.  
査読有  
DOI: 10.1371/journal.pone.0060067.

〔学会発表〕(計 107 件)

1. Iwanami J, Mogi M, Tsukuda K, Wang XL, Higaki A, Kukida M, Nakaoka H, Yamauchi T, Bai HY, Shan BS, Min LJ, Horiuchi M.  
Possible epigenetic modulation of cerebral angiotensin type 2 receptor in the cognitive function in vascular dementia.  
INTERNATIONAL STROKE CONFERENCE 2016  
17 Feb 2016, Los Angeles, USA
2. Iwanami J, Mogi M, Wang XL, Tsukuda K, Higaki A, Kukida M, Nakaoka H, Yamauchi T, Bai HY, Shan BS, Min LJ, Horiuchi M.  
Deficiency of angiotensin converting enzyme 2 causes deterioration of cognitive function.  
INTERNATIONAL STROKE CONFERENCE 2016  
17 Feb 2016, Los Angeles, USA
3. Horiuchi M.  
Roles of angiotensin II type 2 receptor in cognitive function.  
第 38 回日本高血圧学会総会  
2015 年 10 月 9 日「ひめぎんホール」愛媛、日本
4. Horiuchi M.  
Stroke, Cognitive Function and Renin Angiotensin System.  
11<sup>th</sup> Asia Pacific Congrass of Hypertension 2015  
5 June 2015, Bali, Indonesia
5. Horiuchi M.  
Vascular Remodelling: Roles of Preotective Arm of Renin Angiotensin Syste.  
11<sup>th</sup> Asia Pacific Congrass of Hypertension 2015  
5 June 2015, Bali, Indonesia
6. 堀内正嗣.  
レニン・アンジオテンシン系 Protective Arm と血管保護  
第 15 回日本抗加齢医学会総会  
2015 年 5 月 30 日「福岡国際会議場」福岡、日本
7. Iwanami J, Mogi M, Tsukuda K, Wang

XL, Kukida M, Nakaoka H, Chisaka T, Bai HY, Shan BS, Horiuchi M.  
Direct angiotensin II type 2 receptor stimulation by compound 21 prevents vascular dementia.  
(INTERNATIONAL STROKE CONFERENCE 2015  
11 Feb 2015, Nashville, USA

8. Wang XL, Iwanami J, Mogi M, Tsukuda K, Nakaoka H, Bai HY, Kukida M, Chisaka T, Shan BS, Horiuchi M.  
Effect of interferon regulatory factor-1 on vascular dementia using mouse chronic cerebral hypoperfusion model.  
(INTERNATIONAL STROKE CONFERENCE 2015  
12 Feb 2015, Nashville, USA
9. Horiuchi M.  
Roles of activation of angiotensin II type 2 receptor in cognitive function.  
Joint Meeting ESH-ISH HYPERTENSION ATHENS 2014  
15 June 2014, ATHENS, GREECE
10. Ohshima K, Mogi M, Nakaoka H, Iwanami J, Min LJ, Kan-no H, Tsukuda K, Chisaka T, Bai HY, Wang XL, Ogimoto A, Higaki J, Horiuchi M.  
Angiotensin II type2 receptor interacting protein inhibits vascular remodeling with activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma.  
Joint Meeting ESH-ISH HYPERTENSION ATHENS 2014  
16 June 2014, ATHENS, GREECE

〔図書〕(計 2 件)

1. Horiuchi M, Mogi M.  
Roles of AT2R in cognitive function, in; Unger T, Stecklings UM, dos Santos RAS, (Eds.), The protective arm of the renin-angiotensin system. Functional aspects and therapeutic implications. First ed. Elsevier, Amsterdam. pp. 67-71, 2015.
2. Mogi M, Horiuchi M.  
Animal models with a genetic alteration of AT2 expression. The protective arm of the renin-angiotensin system. Functional aspects and therapeutic implications. First ed. Elsevier, Amsterdam. pp. 17-22, 2015.

〔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

<http://www.m.ehime-u.ac.jp/school/biochem1/>

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

茂木 正樹 (Mogi, Masaki)  
愛媛大学・大学院医学系研究科・准教授  
研究者番号：20363236

岩波 純 (Iwanami, Jun)  
愛媛大学・大学院医学系研究科・助教  
研究者番号：90624792

(3) 連携研究者

大島 弘世 (Ohshima Kousei)  
愛媛大学・医学部附属病院・医員  
研究者番号：10598626