

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26430086

研究課題名(和文) 受容体間相互作用を介した血管平滑筋APJ受容体による血管狭窄メカニズムの解明

研究課題名(英文) Cooperative action of APJ and alpha1A-adrenergic receptor in vascular smooth muscle cells induces intensive vasoconstriction

研究代表者

石田 純治 (ISHIDA, Junji)

筑波大学・生命領域学際研究センター・講師

研究者番号：30323257

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：血圧調節に重要な血管の平滑筋細胞で、7回膜貫通型受容体APJを過剰発現するマウス・SMA-APJを作製し、APJ受容体が α 1アドレナリン受容体(α 1-AR)と機能的に相互作用することで血管の強縮や血圧上昇、心臓冠動脈の狭窄を誘導することを見出した。本研究では、血管平滑筋APJ活性化による血管の収縮反応をマウス心臓で直接証明し、また、APJが α 1-ARと物理的に相互作用すること、さらに、細胞内シグナルや血管異常収縮にてAPJは α 1-ARと最も強い協調的な増強反応を示すことが判明し、生体内での血管収縮制御におけるAPJと α 1-ARとの機能的相互作用の重要性を初めて明らかにした。

研究成果の概要(英文)：APJ is a G protein-coupled receptor and highly expressed in various cardiovascular tissues. Although the physiological function of APJ on vascular endothelial cells was identified as a hypotensive system, its action on vascular smooth muscle cells (VSMCs) is still unclear. To examine the physiological role of APJ on VSMCs, we generated transgenic mice expressing APJ specifically in VSMCs, called SMA-APJ. Interestingly, I found sustained bradycardia and the development of coronary stenosis in SMA-APJ following apelin administration. An ex vivo assay using the Easy Magnus System revealed that the aorta of SMA-APJ was contracted intensively when co-stimulated with apelin and noradrenaline, a ligand of α 1-adrenergic receptor (α 1-AR).

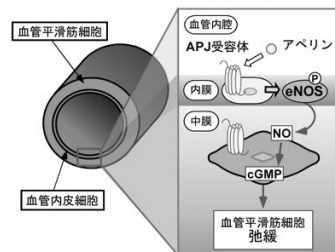
研究分野：生化学 発生工学

キーワード：APJ受容体 血管収縮 アドレナリン受容体 トランスジェニックマウス ノックアウトマウス シグナル伝達 受容体間相互作用

1. 研究開始当初の背景

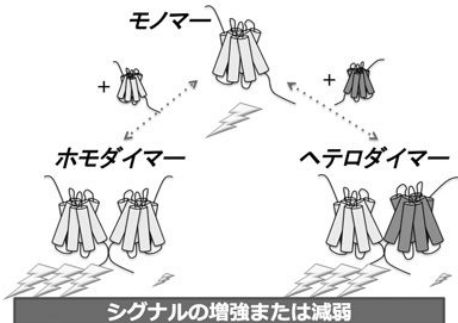
生体恒常性において、正常血圧の維持は必須であり、血管の収縮制御は極めて重要である。血管の緊張性は、「収縮」と「弛緩」のバランスで調節され、これには、7回膜貫通型受容体を中心としたホルモン受容体系が大きな役割を担っている。この、血管の緊張性制御の破綻は、高血圧や心臓冠動脈の血管狭窄による狭心症などの重篤な疾患へと繋がるが、高血圧の分子基盤は未だ不明な点が多く、虚血性心疾患の原因分子については特定されていない。

APJ 受容体は、血管や心臓等の循環器系で発現し、内在リガンドとしてアペリンが同定されている。申請者は、APJ 受容体欠損マウスを世界に先駆けて開発し、APJ は血圧降下作用を有する新規血圧制御系であり、この血圧降下作用には内皮細胞の eNOS 活性化を介すことを明らかにしてきた(下図、J. Biol. Chem., 2004)。一方、血管内皮細胞に隣接し、血管の収縮に重要な血管平滑筋細胞においても APJ が発現していることを申請者は明らかにしている(未発表)。APJ 受容体は、その他、脂肪組織や骨格筋組織、脳を含めた中枢神経系にも発現して多彩な生体内作用を有することが予想されているが、その機能解明は始まったばかりである。



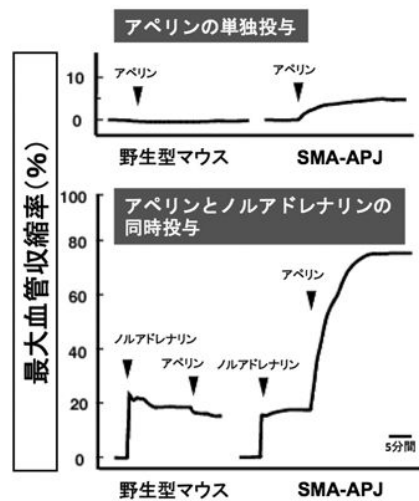
図：内皮細胞APJによる血管弛緩機序

近年、生体内における受容体を介したシグナル作用は、単一の受容体による作用に加えて、複数の受容体間の機能的、物理的な相互作用が重要であることが示唆されつつある(下図)。APJ 受容体に関して、最近、AT1 受容体と物理的にヘテロダイマーを形成し AT1 による動脈硬化を抑制すること、オピオイド受容体とヘテロダイマーを形成し細胞増殖を促進することが報告されたが、生体恒常性における役割は殆ど解明されておらず、血管の緊張性制御メカニズムにおける受容体間相互作用の解明は大きな意味を持つ。



図：ダイマー形成による受容体の機能制御

申請者は、これまで血圧制御に重要なホルモン受容体系である、レニン・アンジオテン



図：大動脈リング標本を用いた血管収縮力解析シンス系の研究に携わり、慢性高血圧モデルマウスや妊娠高血圧マウス等を開発し循環器疾患における本系の病態生理学的意義を解明してきた。その後、申請者は新規ホルモン受容体 APJ が血圧降下作用を有する新しい血圧制御系であることを明らかとした。近年、APJ のリガンドであるアペリンが血管平滑筋収縮の指標であるミオシン軽鎖をリン酸化すること、また、内皮細胞を剥離した血管を収縮させることが報告された。これらのことから申請者は、血管平滑筋上 APJ の血圧制御に関与する可能性を考え、血管平滑筋細胞特異的 APJ 遺伝子導入マウス (SMA-APJ) を作製した(未発表)。SMA-APJ マウスでは、アペリンにより一過性の血圧上昇が認められ、この昇圧反応と血管収縮との関連を検討するため単離血管リング標本を用いた収縮力測定を行ったところ、SMA-APJ マウスの血管において、アペリンの単独投与では収縮は認められないものの、ノルアドレナリンとアペリンの同時投与により血管が異常な収縮を起こすこと(上図)。この反応には主に APJ と 1 アドレナリン受容体 (1-AR) との協調作用によることを突き止めている(未発表)。また、SMA-APJ マウスでは、アペリン投与により心臓の冠動脈狭窄が誘導されることが判明している(未発表。下図)。



図：アペリンによる心冠血管の狭窄

2. 研究の目的

本研究は、血管平滑筋上の APJ と 1-AR との間には機能的な相互作用が存在すると考え、『受容体間相互作用を介した血管平滑筋 APJ 受容体の血管狭窄メカニズム』の解明を目指した。

3. 研究の方法

本研究では、以下の3点に焦点を絞り『受容体間相互作用を介した血管平滑筋 APJ 受容体の血管狭窄メカニズム』を目指した。

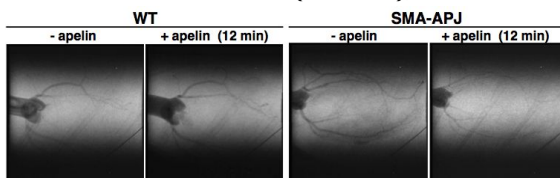
- (1) 血管平滑筋 APJ シグナルによる、in vivo における血管収縮反応を確認した
- (2) APJ 受容体と 1-AR との機能的相互作用の分子メカニズムを解析した
- (3) 遺伝子改変マウスを用いた、血管収縮、血圧制御に対する APJ 受容体と 1-AR との機能的相互作用を検証した

4. 研究成果

(1) 血管平滑筋 APJ シグナルによる、in vivo における血管収縮反応の確認 (SPring-8 を用いた、アペリン刺激による SMA-APJ マウスの冠動脈収縮の in vivo イメージング):

血管リング標本を用いた ex vivo 解析や、マイクロフィル法による心臓の冠動脈の造影解析を行い、SMA-APJ マウスの血管はアペリンの刺激により強い収縮反応 (心臓では冠動脈の狭窄) を呈することを確認した (前頁右下図)。一方で、これらの観察は臓器を摘出した後に解析に供した結果であるため、in vivo の生理的条件下にて実際にアペリンによる血管収縮反応が惹起されるのか観察することとした。そのためには、高輝度放射光による超高分解能の血管造影法が必要であると考へ、国立循環器病研究センター心臓生理機能部の白井幹康部長のご指導の下、生体組織の造影解析が行える「高輝度光科学研究センター SPring-8」で、アペリンによる SMA-APJ マウスの冠動脈の収縮変化を観察した。

アペリン投与前は、野生型マウス (WT) と SMA-APJ の冠動脈の内径に大きな違いは認められなかったもの (下図: WT および SMA-APJ の各左パネル)。アペリン投与後 12 分において WT にて 10% 程度の血管拡張が認められたのに対し (下図: WT の右パネル。血管拡張により血管の走行が濃く見える)、SMA-APJ マウスにおいては、血管の内腔が 20% 減少し、冠動脈は収縮することを確認している (下図: SMA-APJ の右パネル (12 min)。血管収縮により血管の走行が不明瞭となっている)。このことは、血管平滑筋上の APJ 受容体が実際に in vivo において血管収縮作用を有することを証明した成果である (未発表)。



(2) APJ 受容体と 1-AR との機能的相互作用の分子メカニズムの解析:

APJ と 1-AR との機能的相互作用には、受容体間の直接的な相互作用が存在すると思へ、両受容体に対する抗体を用いた共免疫沈降法にて、両者のダイマー形成の評価を試み

た。しかし、APJ を選択的に認識する抗体は確立済みであったが、1-AR に対する抗体が機能せず、免疫沈降法での検証は困難であると判断した。そこで、代案として準備していた、生細胞内での分子間相互作用を視覚的に検出できる Bi-molecular Fluorescent Complementation (BiFC) assay (下図) を起ち上げ、APJ と 1-AR (各サブタイプや欠損変異体を含む) のヘテロダイマー形成を、直接細胞を観察することで検証した。

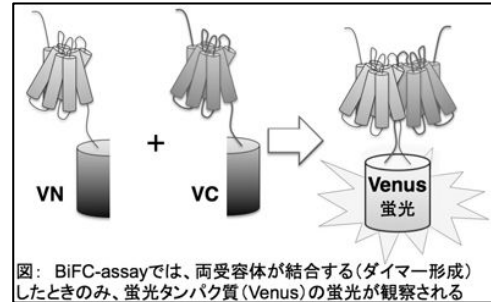
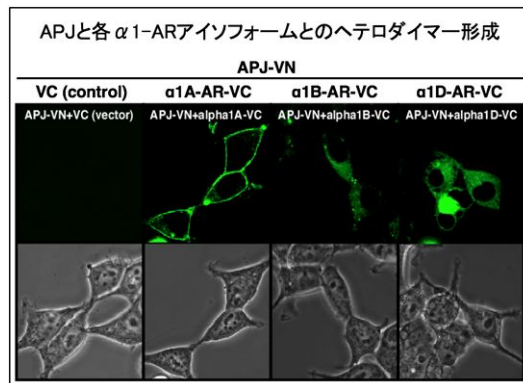


図: BiFC-assayでは、両受容体が結合する(ダイマー形成)したときのみ、蛍光タンパク質(Venus)の蛍光が観察される

HEK293 細胞へ Venus 断片と接続した APJ と 1-AR の各アイソフォームを導入し、ヘテロダイマーを蛍光観察したところ、APJ は 1-AR の全てのアイソフォーム (1A, 1B, 1D) とヘテロダイマーを形成することが判明した (下図)。また、APJ と 1A-AR の組み合わせのみで、細胞膜上でヘテロダイマーを示す強いシグナルが観察された (未発表、下図)。そこで、HEK293 細胞へ APJ と 1-AR の各アイソフォームを導入し、アペリンとアドレナリンで細胞を刺激し際の、細胞内カルシウム濃度を測定したところ、APJ と 1A-AR の組み合わせでのみ、細胞内カルシウムイオン濃度が顕著に増加した (未発表)。



3) 遺伝子改変マウスを用いた、血管収縮、血圧制御に対する APJ 受容体と 1-AR との機能的相互作用の検証:

マウス個体内において、SMA-APJ マウスで見られるアペリン誘導性の血圧上昇に対して、1A-AR が関与しているのかを検証するため、ゲノム編集技術を用いて 1A-AR ノックアウト (1A-AR-KO) マウスを作製した。得られた 1A-AR-KO マウスに 1A-AR 特異的リガンドと投与しても血圧上昇は惹起されないことで 1A-AR の欠損を確認した。そこ

で、1A-AR-KO マウスと SMA-APJ マウスと交配することで、1A-AR を持たない SMA-APJ マウスを作出し、アペリンに対する応答性を検証した。アペリン投与により、SMA-APJ マウスでは一過性の強い血圧上昇が確認された。一方で、SMA-APJ/ 1A-AR-KO マウスでは、血圧の上昇が緩慢であり、また、その持続時間も短縮することが判明した(未発表)。このことは、血管平滑筋上の APJ 活性化により認められる血圧上昇反応に、1A-AR が深く関与していることを示している。

血管異常収縮は高血圧症や脳梗塞、心筋梗塞等の重篤な疾患の原因であるが、個体レベルにおける有効な解析モデルが存在せず、血管の異常収縮を誘発する刺激の正体や攣縮のメカニズムなどは、ほとんど解明されていない。本研究は、未だ不明な点が多い血管収縮制御や狭心症の発症メカニズムに着目しており、血圧制御の要である血管の収縮制御の新規制御系として、APJ と 1A-AR との機能的相互作用の重要性を初めて明らかにした。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 17 件)

1. Ishimaru, T., Ishida, J., Kim, J.D., Mizukami, H., Hara, K., Hashimoto, M., Yagami, K.I., Sugiyama, F., and Fukamizu, A. Angiodysplasia in embryo lacking protein arginine methyltransferase 1 (PRMT1) in vascular endothelial cells. *J. Biochem.* 161, 255-258 (2017) 査読有り
2. Kawasaki, S., Kako, K., Nagashima, Y., Kanou, A., Ishida, J., and Fukamizu, A. Hydralazine is involved in tele-methylhistamine metabolism by inhibiting monoamine oxidase B in pregnancy-associated hypertensive mice. *J. Biochem.* 161, 155-158 (2017) 査読有り
3. Ushiki, A., Matsuzaki, H., Ishida, J., Fukamizu, A., and Tanimoto, K. Long-Range Control of Renin Gene Expression in Tsukuba Hypertensive Mice. *PLoS One.* 11, e0166974 (2016) 査読有り
4. Egashira, Y., Takase, M., Watanabe, S., Ishida, J., Fukamizu, A., Kaneko, R., Yanagawa, Y., and Takamori, S. Unique pH dynamics in GABAergic synaptic vesicles illuminates the mechanism and kinetics of GABA loading. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113, 10702-10707 (2016) 査読有り
5. Sasaki, T., Tanaka, Y., Kulkeaw, K., Yumine-Takai, A., Tan, K.S., Nishinakamura, R., Ishida, J., Fukamizu, A., and Sugiyama, D. Embryonic Intra-Aortic Clusters Undergo Myeloid Differentiation Mediated by Mesonephros-Derived CSF1 in Mouse. *Stem Cell Rev.* 12, 530-542 (2016) 査読有り
6. Murata, K., Ishida, J., Ishimaru, T., Mizukami, H., Hamada, J., Saito, C., and Fukamizu, A. Lactation is a Risk Factor of Postpartum Heart Failure in Mice with Cardiomyocyte-specific Apelin Receptor (APJ) Overexpression. *J. Biol. Chem.* 291, 11241-11251 (2016) 査読有り
7. Shimbo, M., Kudo, T., Hamada, M., Jeon, H., Imamura, Y., Asano, K., Okada, R., Tsunakawa, Y., Mizuno, S., Yagami, K.I., Ishikawa, C., Li, H., Shiga, T., Ishida, J., Hamada, J., Murata, K., Ishimaru, T., Hashimoto, M., Fukamizu, A., Yamane, M., Ikawa, M., Morita, H., Shinohara, M., Asahara, H., Kiyama, T., Akiyama, N., Sasanuma, H., Yoshida, N., Zhou, R., Wang, Y., Ito, T., Kokubu, Y., Noguchi, T., Ishimine, H., Kurisaki, A., Shiba, D., Mizuno, H., Shirakawa, M., Ito, N., Takeda, S., and Takahashi, S. Ground-based assessment of JAXA mouse habitat cage unit by mouse phenotypic studies. *Exp. Anim.* 65, 175-187 (2016) 査読有り
8. Hashimoto, M., Murata, M., Ishida, J., Kanou, A., Kasuya, Y., and Fukamizu, A. Severe hypomyelination and developmental defects are caused in mice lacking protein arginine methyltransferase 1 (PRMT1) in the central nervous system. *J. Biol. Chem.* 291, 2237-2245 (2016) 査読有り
9. Kim, J.D., Park, K.E., Ishida, J., Kako, K., Hamada, J., Kani, S., Takeuchi, M., Namiki, K., Fukui, H., Fukuhara, S., Hibi, M., Kobayashi, M., Kanaho, Y., Kasuya, Y., Mochizuki, N., and Fukamizu, A. PRMT8 as a phospholipase regulates Purkinje cell dendritic arborization and motor coordination. *Science Adv.* 1, e1500615 (2015) 査読有り
10. Kako, K., Nakamura, A., Nagashima, Y., Ishida, J., and Fukamizu, A. Detection of ethanolamine altering in fetuses of pregnancy-associated hypertensive mice treated with vasodepressors by using UPLC and MALDI-TOF/MS. *J Chromatogr. B* 1006, 93-98 (2015) 査読有り
11. Murata, K., Baasanjav, A., Kwon, C., Hashimoto, M., Ishida, J., and Fukamizu, A. Angiotensin II accelerates mammary

gland development independently of high blood pressure in pregnancy-associated hypertensive mice. *Physiol. Rep.* 3, e12542 (2015) 査読有り

12. Kato, H., Ishida, J., Matsusaka, T., Ishimaru, T., Tanimoto, K., Sugiyama, F., Yagami, K., Nangaku, M., and Fukamizu, A. Erythropoiesis and blood pressure are regulated via AT1 receptor by distinctive pathways. *PLoS One* 10, e0129484 (2015) 査読有り

13. Hamada, J., Baasanjav, A., Ono, N., Murata, K., Kako, K., Ishida, J., and Fukamizu, A. Possible involvement of downregulation of the apelin-APJ system in doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 308, H931-941 (2015) 査読有り

14. Tanimoto, K., Kanafusa, S., Ushiki, A., Matsuzaki, H., Ishida, J., Sugiyama, F., and Fukamizu, A. A mouse renin distal enhancer is essential for blood pressure homeostasis in BAC-rescued renin-null mutant mice. *J. Recept. Signal Transduct.* 34, 401-409 (2014) 査読有り

15. Amano, H., Murata, K., Matsunaga, H., Tanaka, K., Yoshioka, K., Kobayashi, T., Ishida, J., Fukamizu, A., Sugiyama, F., Sudo, T., Kimura, S., Tatsumi, K., and Kasuya, Y. p38 Mitogen-activated protein kinase accelerates emphysema in mouse model of chronic obstructive pulmonary disease. *J. Recept. Signal Transduct.* 34, 299-306 (2014) 査読有り

16. Yasuda, SI., and Ishida, J. GPR39-1b, the 5-transmembrane isoform of GPR39 interacts with neurotensin receptor NTSR1 and modifies its function. *J. Recept. Signal Transduct.* 34, 307-312 (2014) 査読有り

17. Mizuno, S., Tra, DT., Mizobuchi, A., Iseki, H., Mizuno-Iijima, S., Kim, JD., Ishida, J., Matsuda, Y., Kunita, S., Fukamizu, A., Sugiyama, F., and Yagami, K. Truncated Cables1 causes agenesis of the corpus callosum in mice. *Lab Invest.* 94, 321-330 (2014) 査読有り

〔学会発表〕(計 48 件)

1. 権 哲源、永野 克将、石田 純治、深水 昭吉 1A-AR は血管平滑筋 APJ を介した血圧制御に参与する、第 20 回 日本心血管内分代謝学会、2016 年 12 月 16 日、東京コンベンションホール、東京都 中央区

2. 石田 純治、村田 知弥、石丸 友博、水上 早瀬、濱田 樹理、齋藤 千明、深水 昭吉、心筋特異的 APJ 過剰発現マウスにおける授乳依存的な周産期心筋症の発症、第 37 回 日本妊娠高血圧学会、2016 年 10 月 7 日、大宮ソニックシティ、埼玉県 大宮市

3. 石田 純治、野口 和之、石丸 友博、川崎 祥平、権 哲源、金 俊達、山縣 邦弘、深水 昭吉、ヒスタミンの H3 受容体を介した心腎病態の保護的作用、第 89 回 日本生化学会、2016 年 9 月 26 日、仙台国際センター、宮城県 仙台市

4. Chulwon Kwon, Junji Ishida, Katsumasa Nagano, Tomohiro Ishimaru, Akiyoshi Fukamizu. Apelin-induced blood pressure elevation in mice overexpressing APJ on vascular smooth muscle cells. The 17th International SHR Symposium, Sep 23, 2016, UDX Gallery, 東京都 千代田区

5. 権 哲源、永野 克将、石田 純治、深水 昭吉、1A-AR は APJ 活性亢進による血圧上昇に参与する、第 7 回 Molecular Cardiovascular Conference、2016 年 9 月 2 日、東京ドームホテル、東京都 文京区

〔図書〕(計 1 件)

1. 石田 純治、水上 早瀬、権 哲源、深水 昭吉 循環器系の表現型解析 実験医学別冊、マウス表現型解析スタンダード、2016、177-183

〔産業財産権〕

無し

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ:

<http://akif2.tara.tsukuba.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石田 純治 (ISHIDA, Junji)

筑波大学・生命領域学際研究センター・講師

研究者番号: 30323257

(2) 研究分担者

無し

(3) 連携研究者

八神 健一 (YAGAMI, Ken-ichi)

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号: 40166476

杉山 文博 (SUGIYAMA, Fumihiro)
筑波大学・医学医療系・教授
研究者番号： 90226481

(4)研究協力者
無し