

平成 30 年 9 月 3 日現在

機関番号：34509

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07984

研究課題名(和文) アンジオテンシンIIのRhoキナーゼ系を介した血管収縮・弛緩機構の解明

研究課題名(英文) Angiotensin induces vasoconstriction and vasorelaxation via Rho-kinase.

研究代表者

屋山 勝俊 (Yayama, Katsutoshi)

神戸学院大学・薬学部・教授

研究者番号：30248108

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)：アンジオテンシンIIは、強力な血管収縮印紙であり高血圧発症に重要な役割を演じている。これまで、アンジオテンシンIIによる血管収縮は、アンジオテンシンIIが、アンジオテンシンタイプ1(AT1)受容体に結合し、細胞内のカルシウム濃度が上昇することによるミオシン軽鎖キナーゼの活性化が重要であるとされてきた。しかし、ミオシン軽鎖キナーゼの活性化に比べ、ミオシン軽鎖ホスファターゼの不活性化がより重要であることが明らかとなった。そして、このミオシン軽鎖ホスファターゼの不活性化は、AT1受容体、Src、EGF受容体、Erk1/2、Rho-キナーゼにより調節されていることも明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Angiotensin II (Ang II), the most active component of the renin-angiotensin system, is a multifunctional hormone that plays an important role in the cardiovascular physiology and pathology. The activation of the Ang II receptor mediates vasoconstriction and proliferation of vascular smooth muscle cell. The aim of this study was to determine the mechanism underlying Ang II-induced vasoconstriction of rat aorta. Ang II-induced constriction was significantly blocked by Rho kinase inhibitor, extracellular signal-regulated kinase 1 and 2 (Erk1/2) inhibitor, epidermal growth factor receptor (EGFR) inhibitor, and Src inhibitor. Phosphorylation of myosin phosphatase target subunit 1 (MYPT1, an index of Rho kinase activity) was abrogated by inhibitors of Src, EGFR, Erk1/2, and Rho kinase. These results suggest that Ang II induced vasoconstriction in rat aorta via Src, EGFR, MEK, and Erk1/2 activation, leading to the inactivation of myosin light chain phosphatase via phosphorylation of MYPT1.

研究分野：薬理学

キーワード：アンジオテンシン ミオシン軽鎖ホスファターゼ 血管収縮

1. 研究開始当初の背景

我が国における高血圧の患者数は推定4,000万人で、高齢化社会を反映しその患者数は年々増加している。高血圧症の放置は、心臓病、脳血管障害など致命的な疾患を引き起こすことから、早期に治療することが求められている。高血圧の発症には様々な要因が関与しているが、特にレニン・アンジオテンシン(RA)系は病態生理学あるいは薬理学的知見から高血圧発症に重要な役割を担うことが証明されている。このRA系の中心にある活性ペプチド、アンジオテンシンII(Ang II)は、血管収縮、アルドステロン産生の亢進を介した体液量の増加、神経終末からのノルアドレナリン遊離の亢進を介し、高血圧症の発症・進展に深く関与している。Ang IIのこれら作用は、アンジオテンシンタイプ1(AT1)受容体を介して発現する。

しかしながらAng IIには、AT1受容体以外にもアンジオテンシンタイプ2(AT2)受容体、タイプ3受容体が存在しており、これら受容体へのAng II、Ang II関連ペプチドの作用は、血管拡張・細胞増殖抑制作用等、AT1受容体に生理的に拮抗することが報告されている。AT2受容体の血管弛緩機構に関する研究は、1999年、Tsutsumi等がAT2受容体トランスジェニックマウスにおいて、血管AT2受容体の活性化がブラジキニン(BK)産生の亢進を介し、血管が弛緩するとの報告に始まる。さらに、Cary等も、腎血管系において、AT2受容体刺激がBK-酸化窒素(NO)系を介し、腎血流の調節に関与することを証明した。しかし、AT2受容体シグナルがどのような機構によりBK産生を亢進させているのか、また、このようなAT2受容体-BK系が高血圧等の循環器疾患においてどのような重要性を持つかは明らかではなかった。そこで、申請者らは高血圧時での血管AT1受容体、AT2受容体の機能を明らかにするべく研究を進め、以下の知見を得た。

1) 正常動物の心臓、血管ではAT2受容体の発現は認められないが、圧負荷を受けた心臓、血管(高血圧状態下)において、AT2受容体発現が誘導され、その発現亢進はAT1受容体シグナルにより調節されている。また、AT2受容体の発現亢進は、Ang IIによる血管収縮応答性を減弱させる。

2) 血管Ang IIによるAT2受容体を介した血管弛緩は、BK受容体、eNOSタンパク質量、血管内皮細胞型NO合成酵素(eNOS)のSer1177及びSer633位のリン酸化体増加を介したNO産生亢進による。

3) AT2受容体刺激によるeNOSリン酸化はAkt/PI3K、プロテインキナーゼA(PKA)を介する。

4) 血管平滑筋細胞へのAT1受容体刺激は、細胞内の酸性化を引き起こし、この酸性化により、Jak、Src、Rhoキナーゼ系が活性化し、細胞は収縮する。この収縮には、チロシンリ

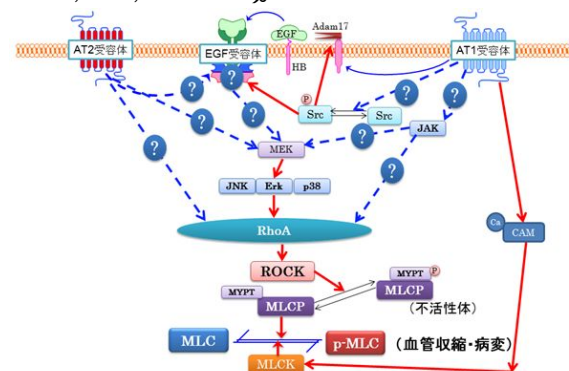
ン酸化酵素が重要な役割を演じている。

5) 正常動物から調製した血管リング標本にEGFを作用させても収縮応答は認められないが、高血圧動物から調製した血管リング標本にEGFを作用させると血管は収縮する。

このように、これまでAng IIを中心に血圧調節機構の一端を明らかにしてきたが、未だ正確な理解には至ってはいなかった。

2. 研究の目的

Ang IIのAT1受容体を介した血管収縮は、Ca-カルモジュリン系を介したミオシン軽鎖キナーゼ(MLCK)の活性化によるミオシンのリン酸化によると考えられてきた。しかしながら、Ang IIによる血管収縮はMLCKよりもRhoキナーゼを介したMLCPの不活化が重要であるとの報告がなされている(Nat. Med., 160; 183-189)。



アンジオテンシンIIによる血管収縮は、Ca/CAMによるMLCK活性化、それによるMLCリン酸化主な経路であると考えられてきた。しかし、近年アンジオテンシンIIによる血管収縮は、Ca/CAMによるMLCK活性化よりも、RhoキナーゼによるMLCP不活性化によるMLCリン酸化の経路の方が重要であることが示された(Nat. Med. 16: 183-189)。

しかしながら、AT1受容体からどのようなシグナル伝達系を介しRhoキナーゼを介したMLCPの不活化を誘導しているかについては不明点が多い。一方、血管平滑筋細胞ではAng IIのAT1受容体へのシグナルはAdam17を介しEGF受容体シグナル系を活性化し、mitogen-activated protein (MAP)キナーゼ系を活性化することも知られている。申請者らは、プロテインチロシンフォスファターゼ阻害はSrcを活性化し、その結果EGFトランスアクティベーションを介したEGF受容体-Rhoキナーゼ系の活性化が起こり血管は収縮することを明らかとした。これら事実より、Ang IIによるMLCPを介した血管収縮にEGF受容体、Src、MAPキナーゼ系が関与する可能性が考えられるがその詳細、生理的意義については不明である。そこで、その意義を明らかにする目的で検討を行った。

3. 研究の方法

Ang IIのAT1受容体を介した血管収縮にはRho-キナーゼ系が重要であることが明らかとなってきた。そこで、Ang IIのAT1受容体を介した血管収縮へのRho-キナーゼの関与をRho-キナーゼ阻害剤を用いて検討した。具体的には、5週齢の雄性Wistarラットの胸部大動脈からリング標本作製し、マグヌス装置を用いて検討した。また、Rho-

キナーゼの関与については、Rho-キナーゼ阻害剤を用いて検討を行った。その結果、Ang II は、血管に加えた用量に依存して収縮し、その収縮は、Rho-キナーゼ阻害剤の前処置によりほぼ完全に抑制された。さらに、抵抗血管であるラット腸間膜動脈を用い、同様の検討を行ったところ、Ang II による腸間膜動脈の収縮は、Rho-キナーゼ阻害剤の前処置により抑制された。血管平滑筋細胞では、Ang II の AT1 受容体への刺激が、EGF トランスアクティベーションを介し EGF 受容体の活性化、それに基づく MAP キナーゼ系の活性化を介し細胞は増殖する。そこで、血管の収縮に EGF 受容体の関与があるかについて検討を加えたところ、ラット胸部大動脈、腸間膜動脈における Ang II による血管収縮は、EGF 受容体阻害剤により抑制された。次に、ADAM17 を介した EGF トランスアクティベーションの系が収縮に関与するかについて検討したところ、Ang II による血管収縮は、胸部大動脈では、EGF トランスアクティベーション阻害剤で抑制されたのに対し、腸間膜動脈での収縮には何ら影響を認めなかった。さらに、Ang II による血管収縮に MAP キナーゼ系が関与しているかについて Extracellular Signal-regulated Kinase (Erk1/2)、c-Jun N-terminal kinase (JNK)、p38 MAP キナーゼ (p38) の阻害剤を用いて検討したところ、Ang II による血管収縮は、胸部大動脈では、Erk1/2、JNK、p38 阻害剤で抑制されたのに対し、腸間膜動脈での収縮は、Erk1/2 阻害剤のみで抑制された。このことから、Ang II による胸部大動脈の血管収縮は、AT1 受容体、EGF 受容体、Erk1/2、JNK、p38、Rho-キナーゼにより調節されている一方、腸間膜動脈の収縮は、AT1 受容体、EGF 受容体、Erk1/2、Rho-キナーゼにより調節されていることが明らかとなった。次に、EGF 受容体を介した血管収縮には、Src を介した系が存在すること、また、Rho-キナーゼの活性化に、Janus kinase (JAK) が関与していることが報告されていることから、Ang II による胸部大動脈の血管収縮に、Src、JAK が関与しているかを検討したところ、Ang II による胸部大動脈の血管収縮を、Src 阻害剤は収縮を抑制するが、JAK 阻害剤は収縮を抑制しないことが明らかとなった。

Ang II の AT1 受容体刺激による血管収縮には、EGF 受容体、Rho キナーゼ、MAP キナーゼの関与があることが明らかとなったことから、血管の AT1 受容体を Ang II で刺激した際、実際に EGF 受容体、その下流に位置する MAP キナーゼ系、Rho キナーゼ系に活性化が認められるかをラット培養平滑筋細胞を用い、ウエスタンブロッティング法により確認した。なお、Rho キナーゼの活性化は MLCP の構成サブユニットである MYPT のリン酸化で、MAP キナーゼ系の活性化は Erk1/2、JNK、p38 のリン酸化で、EGF 受容体については EGF 受容体のリン酸化体量を測定することによ

り検討した。Ang II の AT1 受容体刺激により、EGF 受容体のリン酸化大量が増加したが、この増加を、Erk1/2、JNK、p38、Rho キナーゼ阻害剤により抑制することはできなかった。次に、Erk1/2、JNK、p38 の Ang II によるリン酸化を検討したところ、Ang II 刺激によりこれらタンパク質のリン酸化は増加し、その増加は、EGF 受容体阻害剤に加え Erk1/2 は Erk1/2 阻害剤、JNK は JNK 阻害剤、p38 は p38 阻害剤で抑制されたが、Rho-キナーゼ阻害剤では影響を受けなかった。さらに、Ang II による MYPT のリン酸化体量を検討したところ、Ang II により MYPT のリン酸化体量は増加していた。そしてこの増加は、EGF 受容体阻害剤、Erk1/2 阻害剤、Rho-キナーゼ阻害剤により抑制された。このことから、Ang II により MYPT のリン酸化体を介した MLCP 不活性化による血管収縮には、EGF 受容体、Erk1/2、Rho-キナーゼが関与していることが明らかとなった。加えて、Src について検討したところ、Ang II により Src のリン酸化体量は増加するが、EGF 受容体阻害剤、Erk1/2 阻害剤、Rho-キナーゼ阻害剤は、Src のリン酸化を抑制しなかった。これとは逆に、Src 阻害剤は、Ang II による EGF 受容体、Erk1/2、MYPT のリン酸化を抑制した。

次に、圧負荷動物の血管において、正常血管と比べ収縮に変化が認められるかを検討したところ、圧負荷動物の血管の収縮は、Src 阻害剤で抑制された。しかし、その他の阻害剤では正常血管の間で大きな差は、認められなかった。

#### 4 . 研究成果

これら結果より、Ang II による血管の収縮には、これまでに報告されている MLCK の活性化に加え、MLCP の不活性化が大きく関わっていることが明らかとなった。

#### 5 . 主な発表論文等

・ Onodera A, Nishiumi F, Kakiguchi K, Tanaka A, Tanabe N, Honma A, Yayama K, Yoshioka Y, Nakahira K, Yonemura S, Yanagihara I, Tsutsumi Y, Kawai Y. Short-term changes in intracellular ROS localization after the silver nanoparticles exposure depending on particle size. *Toxicol Report*.2015; 2: 574-579

・ Sasahara T, Okamoto H, Ohkura N, Kobe A, Yayama K. Epidermal growth factor induces Ca(2+) sensitization through Rho-kinase-dependent phosphorylation of myosin phosphatase target subunit 1 in vascular smooth muscle. *Eur J Pharmacol*. 2015; 762: 89-95.

・ Sasahara T, Ohkura N, Shin M, Onodera A, Yayama K. Epidermal growth factor enhances orthovanadate-induced contraction via Src and myosin phosphatase target subunit 1 in rat

vascular smooth muscle. Pharmacol. Pharmacy. 2015; 6: 329-340.

・ Ito K, Matsuzaki M, Sasahara T, Shin M and Yayama K. Orthovanadate-Induced Vasoconstriction of Rat Mesenteric Arteries Is Mediated by Rho Kinase-Dependent Inhibition of Myosin Light Chain Phosphatase. Biol Pharm Bull. 2015; 38(11): 1-8.

・ Onodera A, Yayama K, Tanaka A, Morosaw H, Furuta T, Takeda N, Kakiguchi K, Yonemur S, Yanagihara I, Tsutsum Y, Kawai K. Amorphous nanosilica particles evoke vascular relaxation through PI3K/Akt/ eNOS signaling; Fundamental & Clinical Pharmacology., 30(5): 419-428, (2016)

・ Onodera A, Yayama K, Morosawa H, Ishii Y, Tsutsumi Y, Kawai Y. Reduction of Calcium Flux from the Extracellular Region and Endoplasmic Reticulum by Amorphous Nano-silica Particles owing to Carboxy Group addition on their surface; Biochemistry and Biophysics Reports., 9: 330-334, (2017)

〔学会発表〕(計 35 件)

日本薬学会第 138 年会(金沢)2018 年 3 月 (2 報)

・ラット圧負荷血管モデルにおけるアンジオテンシン II による血管収縮機構、寺田 侑加, 松田 和可子, 藤原 万里子, 岩本 遥, 屋山 勝俊、

・ラット 2K1C 高血圧モデル血管におけるアンジオテンシン II による血管収縮機構、岡田 瑞希, 米田 恭太, 荒木 理志, 寺田 侑加, 屋山 勝俊、

第 34 回日本毒性病理学会総会及び学術集会(沖縄) 2018 年 1 月(全 5 報)

・成熟マウスにおける自動車排出粒子に対する鼻腔免疫の雌雄での違いに関する検討、今村麗, 小野寺章, 屋山勝俊, 横山聖, 古賀のどか, 谷川千明, 大元知貴, 井上雅己, 角田慎一, 河合裕一、

・VEP で刺激された鼻腔上皮細胞のリンパ球サブセットへ及ぼす影響、 他

第 86 回日本衛生学会学術総会(旭川), 2016 年 5 月(全 7 報)

・酸化亜鉛ナノ粒子はレニン-アンジオテンシン系を介しマウスの高血圧を惹起する  
小野寺 章, 屋山 勝俊, 河合 裕一、

第 59 回日本糖尿病学会年次学術集会(京都), 2016 年 5 月

・eNOS 補酵素テトラヒドロピオプテリンの糖尿病腎症発症機序への関与の解明  
小栗靖生、藤田義人、古谷太志、松尾奈緒美、屋山勝俊、小原章央、Abulizi Abdukadier、

大橋晶子、長谷川宏幸、鶴山竜昭、細川雅也、稲垣暢也、

第 23 回日本免疫毒性学会学術年会(小倉), 2016 年 09 月

・ヒト鼻腔上皮細胞によるサイトカイン産生への自動車排出粒子の細胞内取込みの影響  
小野寺章、森川 ありさ、川崎 真司、谷口 甲介、屋山 勝俊、河合 裕一、

第 30 回プテリジン研究会(名古屋), 2016 年 11 月

・eNOS 補酵素テトラヒドロピオプテリンの糖尿病腎症発症機序への関与の解明  
小栗靖生、藤田義人、古谷太志、松尾奈緒美、屋山勝俊、小原章央、Abulizi Abdukadier、大橋晶子、長谷川宏幸、鶴山竜昭、細川雅也、稲垣暢也、

日本薬学会第 137 年会(仙台), 2017 年 3 月(全 8 報)

・アンジオテンシン II の p38 を介した血管収縮機構  
青木 柚子, 竹田 萌絵, 内海 遥, 屋山 勝俊、

・アンジオテンシン II による血管収縮は、ERK を介する  
深津 三美由, 岡田 瑞希, 松田 和可子, 屋山 勝俊、

・高血圧ラット大動脈のアンジオテンシン II による血管収縮は EGF 受容体、MAP キナーゼ系を介する  
岡田 瑞希, 松崎 麻衣, 米田 恭太, 屋山 勝俊、 他

日本生化学会近畿支部大会、2015 年 4 月、草津(全 3 報)

・酸化亜鉛ナノ粒子はレニン-アンジオテンシン系を活性化し高血圧を惹起する、小野寺章、屋山勝俊、河合裕一、

・非晶質ナノシリカは PI3K シグナルを介した血管の弛緩反応を惹起する、谷口甲介、小野寺章、森川ありさ、屋山勝俊、河合裕一、  
フォーラム 2015 衛生薬学環境トキシコロジー、2015 年 9 月、神戸

第 65 回 日本薬学会近畿支部総会・大会、2015 年 10 月、大阪

・アンジオテンシン II によるラット腸管膜動脈平滑筋細胞 Ca<sup>2+</sup>濃度上昇機構、竹内夏輝、岩本有季、吉澤希里子、屋山勝俊、

・プロテインチロシンホスファターゼ阻害剤、オルトバナジン酸による血管内皮細胞の増殖、隆杉航奈、吉艇加菜、屋山勝俊、

・プロテインチロシンホスファターゼ阻害剤、オルトバナジン酸による血管弛緩機構の解明、東尚毅、小艇絵梨子、屋山勝俊、

・Epidermal Growth Factor による血管収縮機構の解明、大倉菜摘、薬師 緑、小部亜紗美、屋山勝俊、

・ナノシリカによるラット血管平滑筋細胞内カルシウム濃度の上昇、宮川葉月、竹内夏輝、小野寺章、河合裕一、屋山勝俊、

6. 研究組織

(1) 研究代表者

屋山 勝俊 (Yayama Katsutoshi)

神戸学院大学・薬学部・教授

研究者番号：30248108

(2) 研究分担者

小野寺 章 (Onodera Akira)

神戸学院大学・薬学部・助教

研究者番号：40598380

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：

(4) 研究協力者

( )