

平成21年 4月22日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18590945
 研究課題名（和文） 中枢神経系におけるアンジオテンシ II の制御機構とその影響の検討
 研究課題名（英文） The regulation mechanism of brain angiotensin II.
 研究代表者
 細見 直永（HOSOMI NAOHISA）
 香川大学・医学部・助教
 研究者番号：70363190

研究成果の概要：

ARB あるいは AT2 受容体拮抗薬の全身投与が脳組織アンジオテンシン II 濃度を低下させ、血中アンジオテンシン II の脳組織への移行はかなり限定されていることが示唆された。また ARB の全身投与による脳組織アンジオテンシン II 濃度の低下に脳組織 AGT、ACE mRNA の抑制が関与している可能性が示唆された。また、AT2 受容体拮抗薬（PD123319）投与によっても脳組織アンジオテンシン II 濃度の低下を軽度認めたが、これは、脳組織 AGT mRNA の抑制が関与していることが示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,600,000	0	1,600,000
2007年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	570,000	4,070,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・神経内科学

キーワード：脳・神経、血液脳関門、アンジオテンシン II、細胞間基質、インテグリン

1. 研究開始当初の背景

高血圧は脳に最も強い影響を及ぼす事が知られている。高血圧では特に脳梗塞、脳出血が起りやすくなるだけでなく、白質病変や痴呆を進行させる。このことは、適切な降圧により脳梗塞、脳出血が予防できる事に加え、レニン-アンジオテンシン系（RAS）降圧薬の使用により、血管性痴呆のみならずアルツハイマー型痴呆の進行が抑制されるとの報告からもされ、注目を集めている。

血液脳関門は組織学的には内皮細胞、線維性結合組織、アストロサイトによって構成されており、アストロサイトは血管と神経細胞をつなぎ、相互間の情報伝達や、神経細胞の栄養を行っていると考えられている。このアストロサイトにアンジオテンシン II (AngII) が働きその変性を引き起こしているという報告がなされている。また一方でアンジオテンシノーゲン (AGT) 欠損マウスでの検討では、AngII が血液脳関門の維持に関わってお

り、これはAT1受容体やAT2受容体を介していない事が示されている。我々の行った研究ではAngIIが虚血性脳血管障害後に脳組織中に増加し脳浮腫を増大しているが、その反応がAT1受容体阻害薬(ARB)にて抑制される事が示された。

2. 研究の目的

以上の背景より、

- (1) 脳組織 AngII の制御機構に及ぼす ARB、AT2 受容体拮抗薬の影響
- (2) 血中 AngII による脳組織 AngII 濃度への影響 (血液中の AngII が血液脳関門を通じて脳組織に入り込むのか)
- (3) AngII 存在下におけるアストロサイトの RAS 因子に及ぼす ARB の影響
- (4) AngII のアストロサイトの線維性結合組織との結合に及ぼす影響を解明する事を目的とする。

3. 研究の方法

In Vivo

- (1) 脳組織 AngII の制御機構に及ぼす ARB、AT2 受容体拮抗薬の影響

SD rat に ARB (candesartan; 10mg/kg/day) を 2 週間経口投与あるいは AT2 受容体拮抗薬 (PD123319; 3mg/kg/day) を 2 週間腹腔内投与し、これによる脳組織 AngII 濃度、RAS 因子 (AGT、アンジオテンシン変換酵素 (ACE)、renin) mRNA の発現を real time rt-PCR にて検討する。

- (2) 血中 AngII による脳組織 AngII 濃度への影響

SD rat に AngII (200ng/kg/min) を 2 週間持続皮下投与し、脳組織 AngII 濃度を Radioimmunoassay 法により測定する。また、SD rat に Val⁵-AngII (200ng/kg/min) を 2 週間持続皮下投与し、脳組織 Val⁵-AngII 濃度を High Performance Liquid Chromatography により測定する。

In Vitro

- (3) AngII 存在下におけるアストロサイトの RAS 因子に及ぼす ARB の影響

ヒトアストロサイト培養細胞にて AngII (100nM) 刺激を 24 時間加える。また AngII 刺激に加え ARB (CV11974; 100nM) による刺激を行う。この実験において、アストロサイトの RAS 因子 (AGT、ACE、renin、ATRAP) mRNA を real time rt-PCR で検討する。

- (4) AngII のアストロサイトの線維性結合組織との結合に及ぼす影響

ヒトアストロサイト培養細胞にて AngII (100nM) 刺激を 24 時間加える。また AngII 刺激に加え ARB (CV11974; 100nM) による刺

激を行う。この実験においてアストロサイトの形態変化 (線維結合組織との接合性)、アストロサイトの RAS 因子 (AGT、ACE、renin、ATRAP) mRNA を real time rt-PCR で検討する。

4. 研究成果

In vivo

正常 SD ラットに ARB (candesartan) あるいは AT2 受容体拮抗薬 (PD123319) 投与を行い、これによる脳組織 AngII 濃度の変化と、脳組織 RAS 因子発現の検討を行った。さらに、AngII 投与を行い、この AngII 負荷による脳組織 AngII 濃度の変化を検討した。

脳組織 AngII は検出可能であり、脳組織 AngII 濃度は血中 AngII 濃度の約 1/3 であった (図 1 上段)。ARB (candesartan) 投与により、AngII 投与の有無に関わらず脳組織 AngII 濃度は低下した。一方、AT2 受容体拮抗薬 (PD123319) の投与により、脳組織 AngII 濃度は低下する傾向が認められたが、軽度に留まった。さらに ARB と AT2 受容体拮抗薬を同時に投与した群では、ARB のみを投与した群と同程度までの脳組織 AngII 濃度の低下を示した。2 週間の Ang II 持続負荷 (200ng/kg/min) による、脳組織 AngII 濃度の検討を行った。AngII の負荷により血中 AngII 濃度は有意な上昇を認めた (図 1 下段) が、脳組織 AngII 濃度は AngII を負荷しなかった群に比して明らかな変化は認めなかった。また、脳組織 AngII 濃度への ARB (candesartan) あるいは AT2 受容体拮抗薬 (PD123319) の反応は AngII 負荷の有無に関係なく同様の変化を示した。

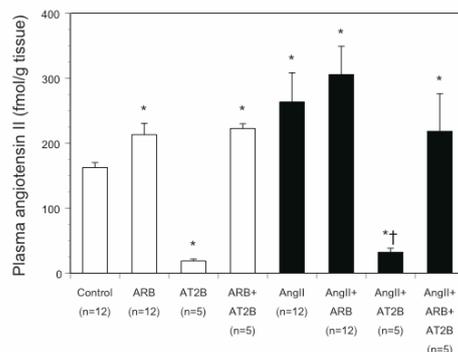
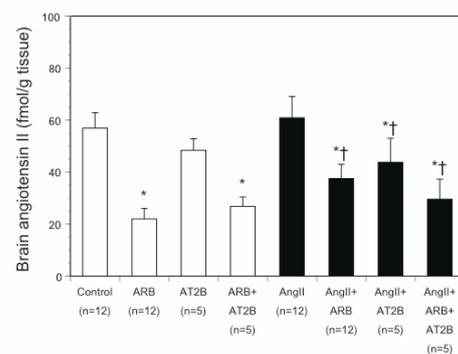


図 1. 血中と脳組織の AngII 濃度

* : p<0.001 control との比較
 † ; p<0.001 AngII 群との比較

血中 AngII 濃度は ARB (candesartan) の投与により、軽度の上昇傾向を認めた (図 1 下段)。一方、AT2 受容体拮抗薬 (PD123319) の投与により、血中 AngII 濃度は著大な低下を認めた。ARB と AT2 受容体拮抗薬を同時に投与した群では、AT2 受容体拮抗薬による血中 AngII 濃度低下作用はキャンセルされ、ARB のみを投与された群と同程度となった。

同様の方法にてラベルした AngII である Val⁵-AngII の負荷を行い、脳組織中の Val⁵-AngII の検出を行った。この結果、脳組織 Val⁵-AngII は検出不能であった。

この結果より、ARB (candesartan) あるいは AT2 受容体拮抗薬 (PD123319) の全身性投与が脳組織 AngII 濃度を低下させることが示唆された。また、血中 AngII の脳組織中への移行はかなり限られており、血中 AngII が脳組織 AngII へ移行し、脳組織 AngII 濃度の維持に関与している可能性は低いことが示唆された。

ARB 投与による脳組織 AngII 濃度低下のメカニズムを解明するため、脳組織 RAS (renin、ACE、AGT) の mRNA の発現を検討した。

脳組織 renin mRNA は AngII 負荷、ARB (candesartan) あるいは AT2 受容体拮抗薬 (PD123319) 投与にて変化を認めなかった (図 2)。

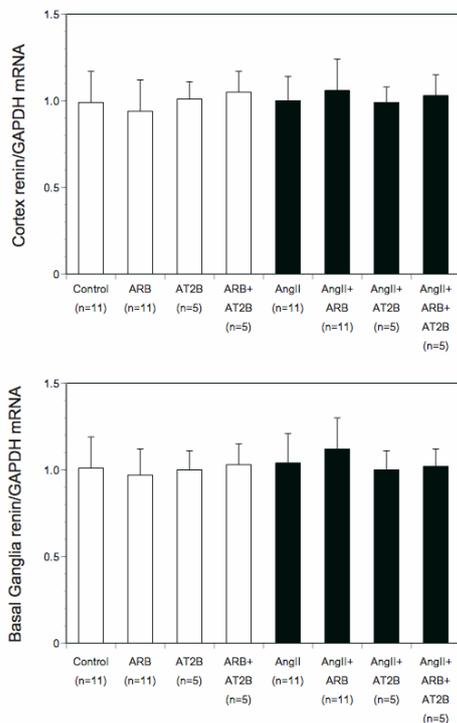


図 2. 脳組織 renin mRNA 発現

脳組織 ACE mRNA は AngII 負荷により変化を示さなかった (図 3)。しかしながら、ARB (candesartan) 投与により、ACE mRNA の低下を認めた。この ARB による ACE mRNA の低下は AT2 受容体拮抗薬 (PD123319) を加えても変化を認めず、AT1 受容体の下流の細胞内情報伝達系が関与していることが示された。また、AT2 受容体拮抗薬 (PD123319) 単独投与にては ACE mRNA に変化を認めなかった。

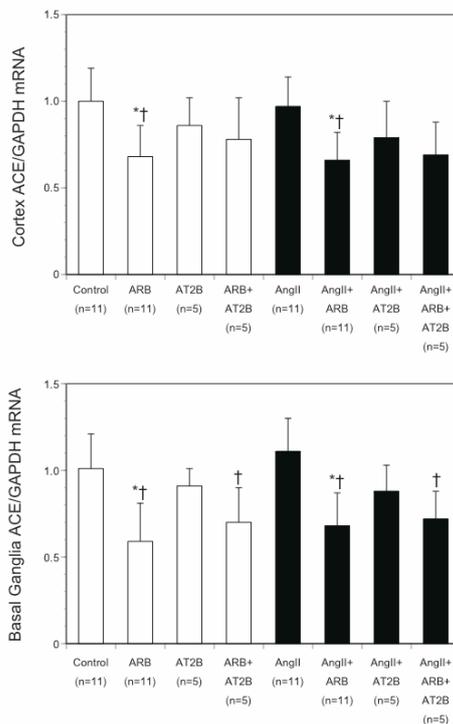


図 3. 脳組織 ACE mRNA 発現

* : p<0.001 control との比較
 † ; p<0.001 AngII 群との比較

脳組織 AGT mRNA は AngII 負荷により変化を示さなかった (図 4)。しかしながら、ARB (candesartan) 投与により、AGT mRNA の低下を認めた。また、AT2 受容体拮抗薬 (PD123319) 投与によっても AGT mRNA の低下を認めた。

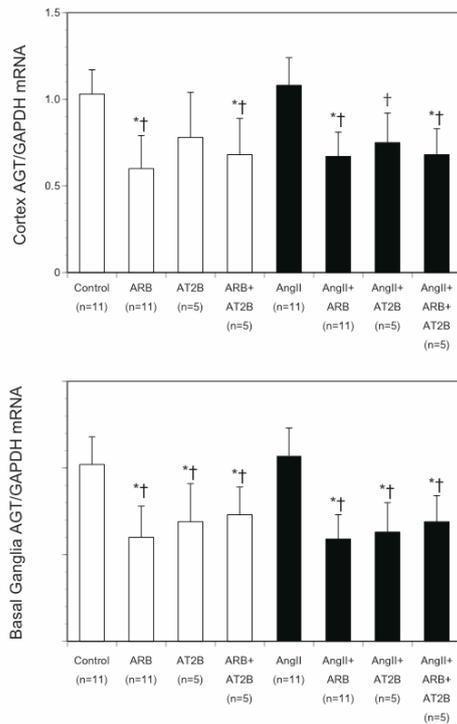


図4. 脳組織 AGT mRNA 発現

* : $p < 0.001$ control との比較

† ; $p < 0.001$ AngII 群との比較

この結果より、ARB (candesartan) の全身投与による脳組織 AngII 濃度の低下に脳組織 AGT、ACE mRNA の抑制が関与している可能性が示唆された。また、AT2 受容体拮抗薬 (PD123319) 投与によっても脳組織 AngII 濃度の低下を軽度認めたが、これは、脳組織 AGT mRNA の抑制が関与していることが示唆された。

In vitro

細胞培養系において、ヒトアストロサイトに及ぼす AngII の影響を検討した。ヒトアストロサイトに 24 時間 AngII (100nM) 刺激を加えたところ、AGT、ACE の mRNA レベルに明らかな変化は見られなかった。また、AngII 存在下における CV11974 あるいは PD123319 単独刺激によっても、AGT、ACE の mRNA レベルの明らかな変化は見られなかった。

この結果より、ARB (candesartan) あるいは AT2 受容体拮抗薬 (PD123319) による ACE mRNA あるいは AGT mRNA の発現抑制は、アストロサイトにおいて起こっている現象ではないことが示唆された。

さらに、ヒトアストロサイトへの AngII 刺激による integrin や MMP への影響を検討した。この結果、integrin $\alpha 3$ 、integrin $\beta 1$ mRNA は AngII 刺激により、明らかな発現の変化を

認めなかった (図 5)。一方、integrin $\alpha 5$ mRNA は AngII の 3 時間から 18 時間の刺激により、その発現が増強した。また MMP-2 mRNA は AngII の 18 時間から 24 時間の刺激により、その発現が増強した。

Angiotensin II stimulation on astrocyte

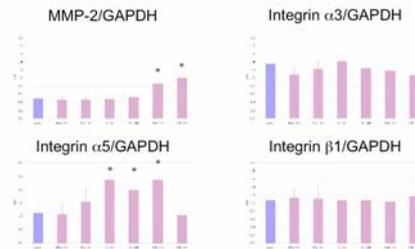


図5. ヒトアストロサイトへの AngII 刺激による細胞接着に関与する因子の変化。

ヒトアストロサイトへの AngII 刺激により MMP-2 mRNA の増強が確認されたので、zymography により MMP-2 自体の検出を行った。培養細胞における MMP-2 はその mRNA の発現が増強していた AngII 刺激 18 時間から 24 時間において、その蛋白自体も増加していることが確認された (図 6)。また、この zymography において MMP-9 は検出されなかった。

Zymography

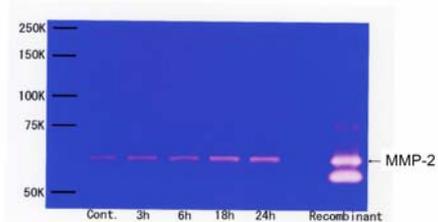


図6. アストロサイト zymography

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 9 件)

- ① Ueno M, Wu B, Nishiyama A, Huang C, Hosomi N, Kusaka T, Nakagawa T, Onodera M, Kido M, Sakamoto H. The expression of matrix metalloproteinase-13 (MMP-13) is increased in vessels with blood-brain barrier impairment in a stroke-prone hypertensive model. Hypertens Res. 2009. 査読有

- ② Masugata H, Senda S, Goda F, Yamagami A, Okuyama H, Kohno T, Hosomi N, Yukiiri K, Noma T, Kiyomoto H, Murao K, Nishiyama A, Kohno M. Tissue Doppler echocardiography for predicting arterial stiffness assessed by cardio-ankle vascular index. *Tohoku J Exp Med*. 2009;217:139-146. 査読有
- ③ 細見直永、河野雅和. Neurovascular Unit のアンチエイジングとRAS. *Angiotensin Research*. 2009;6:104-110. 査読無
- ④ Masugata H, Senda S, Goda F, Yamagami A, Okuyama H, Kohno T, Hosomi N, Imai M, Yukiiri K, Kohno M. Differences in left ventricular hypertrophy and dysfunction between patients with cerebral hemorrhage and those with cerebral infarction. *Tohoku J Exp Med*. 2008;215:159-165. 査読有
- ⑤ Miyata K, Hitomi H, Guo P, Zhang GX, Kimura S, Kiyomoto H, Hosomi N, Kagami S, Kohno M, Nishiyama A. Possible involvement of Rho-kinase in aldosterone-induced vascular smooth muscle cell remodeling. *Hypertens Res*. 2008;31:1407-1413. 査読有
- ⑥ Nishiyama A, Nakagawa T, Kobori H, Nagai Y, Okada N, Konishi Y, Morikawa T, Okumura M, Meda I, Kiyomoto H, Hosomi N, Mori T, Ito S, Imanishi M. Strict angiotensin blockade prevents the augmentation of intrarenal angiotensin II and podocyte abnormalities in type 2 diabetic rats with microalbuminuria. *J Hypertens*. 2008;26:1849-1859. 査読有
- ⑦ 細見直永、河野雅和. RASと虚血性脳血管障害. *Angiotensin Research*. 2007;4:241-248. 査読無
- ⑧ Rahman M, Nishiyama A, Guo P, Nagai Y, Zhang GX, Fujisawa Y, Fan YY, Kimura S, Hosomi N, Omori K, Abe Y, Kohno M. Effects of adrenomedullin on cardiac oxidative stress and collagen accumulation in aldosterone-dependent malignant hypertensive rats. *J Pharmacol Exp Ther*. 2006;318:1323-1329. 査読有
- ⑨ Fan YY, Baba R, Nagai Y, Miyatake A, Hosomi N, Kimura S, Sun GP, Kohno M, Fujita M, Abe Y, Nishiyama A. Augmentation of intrarenal angiotensin II levels in uninephrectomized aldosterone/salt-treated hypertensive rats; renoprotective effects of an ultrahigh dose of olmesartan. *Hypertens Res*.

2006;29:169-178. 査読有

[学会発表] (計10件)

- ① Pelisch N, 細見直永, 上野正樹, 西山成, 河野雅和. Role of ARB on blood-brain barrier permeability and cognitive disorders in Dahl salt sensitive rats. 第34回日本脳卒中学会. 2009.3.22 松江
- ② Pelisch N, 細見直永, 付華, 劉鋼, 西山成, 河野雅和. The regulation of brain renin-angiotensin system with systemic ARB treatment. 第34回日本脳卒中学会. 2009.3.22 松江
- ③ Pelisch N, 細見直永, 劉鋼, 大北弘幸, 納谷貴之, 向井麻央, 西山成, 河野雅和. Role of candesartan in the regulation of brain renin-angiotensin system. 第20回日本脳循環代謝学会総会. 2008.11.6 東京
- ④ Fu H, Hosomi N, Pelisch N, Liu G, Naya T, Ohkita H, Kobayashi H, Nishiyama A, Kohno M. Brain angiotensin II increased following focal cerebral ischemia. International symposium for the establishment of sustainable and recycling-based society. 2008.10.17 高松
- ⑤ Pelisch N, Hosomi N, Liu G, Fu H, Naya T, Ohkita H, Mukai M, Nishiyama A, Kohno M. Brain angiotensin II regulation with systemic angiotensin type 1 receptor blocker. International symposium for the establishment of sustainable and recycling-based society. 2008.10.17 高松
- ⑥ 付華, 細見直永, Pelisch Nicolas, 劉鋼, 納谷貴之, 大北弘幸, 向井麻央, 西山成, 河野雅和. 局所脳虚血後における脳組織アンギオンテンシンIIの変化. 第31回日本高血圧学会総会. 2008.10.10 札幌
- ⑦ Pelisch N, Hosomi N, Kobayashi S, Fu H, Liu G, Ohkita H, Naya T, Mukai M, Ueno M, Miyatake A, Nishiyama A, Kohno M. Role of candesartan in the regulation of brain renin-angiotensin system. 第31回日本高血圧学会総会. 2008.10.10 札幌
- ⑧ Hosomi N, Fu H, Pelisch N, Liu G, Naya T, Ohkita H, Kobayashi S, Nishiyama A, Kohno M. Brain angiotensin II expression increased following focal cerebral ischemia. 6th World Stroke Congress. 2008.9.25 ウィーン(オーストリア)

- ⑨ Pelisch N, Hosomi N, Kobayashi S, Fu H, Liu G, Ohkita H, Naya T, Miyake A, Ueno M, Nishiyama A, Kohno M. Role of candesartan in the regulation of brain renin-angiotensin system. 6th World Stroke Congress. 2008.9.25 ウィーン (オーストリア)
- ⑩ Hosomi N, Kobayashi S, Pelisch N, Fu H, Liu G, Ohkita H, Naya T, Nishiyama A, Kohno M. Effects of angiotensin II stimulation of astrocytes. 6th World Stroke Congress. 2008.9.25 ウィーン (オーストリア)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

細見 直永 (HOSOMI NAOHISA)
香川大学・医学部・助教
研究者番号：70363190

(2) 研究分担者

納谷 貴之 (NAYA TAKAYUKI)
香川大学・医学部・助教
研究者番号：80398031

河野 雅和 (KOUNO MASAKAZU)
香川大学・医学部・教授
研究者番号：20153489

西山 成 (NISHIYAMA AKIRA)
香川大学・医学部・教授
研究者番号：10325334

木村 正司 (KIMURA SYOUJI)
香川大学・医学部・教授
研究者番号：30253264