

平成 19 年 4 月 1 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19790190
 研究課題名 (和文) レニン・アンジオテンシン系に関わる受容体依存性リガンド非依存性
 肥大心の解析
 研究課題名 (英文) Ligand independent activation of angiotensin II receptor
 研究代表者
 張 国興 (ZHANG GUO-XING)
 奈良県立医科大学・医学部・助教
 研究者番号：90444728

研究成果の概要：

申請者らは、ARB の腎保護効果についても活性酸素の関係から動物モデルを用いて証明してきた。本研究は、レニン-アンジオテンシン系の関連薬剤の薬理的解釈を深め、さらに臨床応用への基礎的根拠となるものである。本研究は、これらの結果をふまえてのもので、特に心不全病態下で血中あるいは組織局所での特異的受容体リガンドである ANGI II の増加が認められない場合においても、ARB がその特異的受容体遮断効果を通して多因子複合型である心肥大シグナルを抑制制御するという仮説を提唱し、またこの証明となるエビデンスを提示することができる。心血管系リモデリングに関わるアンジオテンシン受容体の働きについて、新たな視点から検討し、さらに全く新しい治療薬、治療効果の考え方を示すことができると考えている。併せてこれら病態モデルにおいて、心筋の肥大など心血管系リモデリングに大きく関与する ERK の制御因子、抑制性 small G タンパク質 Rap1 に焦点を当てた研究は過去に報告がなく、病態生理上の新たな評価方法を提示できると考えられる。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,700,000		1,700,000
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	480,000	3,780,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・薬理学一般

キーワード：(1) ARB (2)AT1R (3)MAPK (4)Cardiac Hypertrophy (5)alpha-, beta adrenergic receptor

1. 研究開始当初の背景

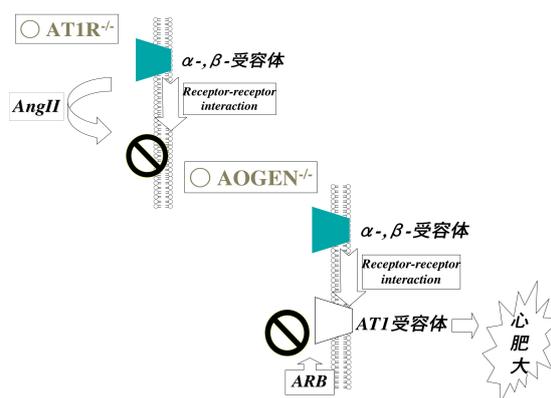
AT1受容体拮抗薬 (ARB) は、その降圧薬としての作用以上に臓器保護を期待して心筋梗塞後などのハイリスク患者に中心に用い

られているが、その臓器保護の作用メカニズムについては、リガンドであるアンジオテンシン (Ang) の血中あるいは局所濃度

の増減だけでは説明が不十分であり、不明な点が多い。Komuroらは¹⁾、細胞伸展刺激によるmitogen-activated protein kinase (MAPK)の活性化が、AT1受容体依存性かつAng非依存性に起こり得ることを報告している。またこのMAPKの活性化はARBによって抑制されることから、ARBの治療上の意義としてインバースアゴニストとしての一面を窺わせるものであるが、生体において再現されるものかどうかという実験的証拠は依然不足したままである。

申請者は、AngIIの血管・心臓組織でのMAPK細胞内シグナリング機序に活性酸素が重要であることをラット生体モデルを用いて明らかとしている²⁾。また α -アドレナリン受容体刺激薬であるフェニレフリン(PHE)あるいは β -刺激薬であるイソプロテレノール(ISO)も、その急性暴露によって酸化ストレスの増大を伴う左室心筋MAPKの活性化を起こすことを示してきた^{2, 3)}。また浸透圧ミニポンプを用いて慢性的にISOを皮下投与したラットにおいては、心筋の線維化によって拡張不全を生じており、これにラジカル消去薬を併用投与すると、心肥大には有意な変化はないものの心臓の線維化は軽減された³⁾。一方、 β 刺激によって腎傍糸球体細胞からレニンが分泌促進され、レニン・アンジオテンシン系が活性化されることはよく知られる。そこでISO暴露時の心筋MAPK活性化に対するARBの効果を検討したところ、ARBであるオルメサルタンの前投与によってERKにおいてはほぼ完全な活性化抑制を認めた(p38及びJNKについては50%程度の抑制であった)。またAT1a受容体欠失マウスを用いてもARBを前処置した場合と同様であることを確認している。さらにARB治療同様、AT1a受容体欠失マウスにおいても、慢性ISO暴露による心肥大が著明に抑制される。これらの結果から、

異なる受容体の刺激がAT1受容体からの細胞内情報伝達系を介して心肥大など引き起こす可能性が考えられるが、リガンドであるAngIIの作用増大に基づくものか、あるいは受容体相互関係によって引き起こされたものかは確定できていない。本研究の目的は、後者の受容体相互作用によって心肥大という表現系を呈しているかどうかを、受容体遺伝子欠失マウスとリガンド遺伝子欠失マウスを野生型と比較することにより明らかにすることである(下比較図参照)。



2. 研究の目的

研究期限内に、1) α -、及び β -アドレナリン受容体刺激あるいは容量負荷によって生じる急性、慢性心不全マウスモデルでARBによる治療効果と受容体-受容体 affinity (免疫共沈降法による)、MAPK 活性化、心筋エネルギー代謝、組織酸化ストレス、及びミトコンドリアが深く関係するアポトーシスを指標に解析する。2) 同様に AT1a 受容体遺伝子欠失 ($AT1aR^{-/-}$) マウス、アンジオテンシノーゲン遺伝子欠失 ($AOGEN^{-/-}$) マウスを用いて、アドレナリン受容体刺激による心不全病態を評価する。3) 特に $AOGEN^{-/-}$ マウスにおいて野生型と同様な

反応が見られる場合は、ARB による治療効果を判定する。4) MAPK 活性化機構の検討では、その上流の制御因子 small G protein である Rap1 (抑制性) と Ras (刺激性) の制御機構を明らかとする。試験的なデータではあるが、 β -アドレナリン受容体刺激に cAMP 依存性の Rap1 の活性化亢進を認め、これが ARB 治療時の ERK 抑制に必須であり、ひいては心肥大、心筋酸化ストレスの正常化を促す可能性を得ている。検討結果についての代替実験として、培養血管平滑筋細胞の実験系を平行して行うものとする。

- 1) Zou et al. Nat Cell Biol. (2004) 6:499-506.
- 2) Zhang et al. Hypertension. (2004) 431:117-124.
- 3) Zhang et al. Cardiovasc Res. (2005) 65:230-238.

3. 研究の方法

[慢性実験] カンデサルタンあるいはオルメサルタン (いずれも 2mg/kg/day) 処置下で、ISO, PHE, AngII を Alzet ミニポンプにて持続皮下投与し、経時的に心エコー法 (Aloka, SSD-2200) により心筋パフォーマンスを、またテイルカフ法により血圧を記録する。ISO 用量は 15mg/kg/day とする。ルシゲニン法による右心室筋活性酸素産生量、左室心筋凍結切片での DHE 蛍光像取得、生化学的には MAPK カスケードリン酸化、受容体 association、Rap-1/Ras 相互作用、各組織の NAD(P)H オキシダーゼ系コンポーネント (gp91phox, NOX1, NOX4, p22phox) の発現定量、コラーゲン量 (hydroxyproline)、組織学的検討 (HE・アザン染色及び TUNEL 法によるアポトーシス検出) を加える。

上記の生体心筋病態生理についての検討

の他、血管平滑筋細胞を胸部大動脈より分離培養し、in vitro 実験系としてアドレナリン受容体刺激に対する ARB の効果を検討する。検討項目は心臓に準じる。

心筋 Rap-1 活性、Ras 活性の比較定量

心筋における Rap-1 と Ras のそれぞれの total Raf binding affinity は、組織ホモネジネートを過剰量の GST-Ras binding domain fusion peptide とインキュベートした後、GST に吸着させたペレットを泳動し、特異抗体で検出する。組織での Raf binding affinity は、Raf 抗体による免疫共沈降物を Rap-1 と Ras の特異抗体で求める。前者は総 Raf 結合能を、後者は実際の Raf 結合量を反映している。

受容体-受容体 association

AT1 受容体と α -あるいは β 1,2-アドレナリン受容体の association は、組織ホモネジネートの抗 AT1 受容体抗体による免疫共沈降物を、抗 β 1-、 β 2-アドレナリン受容体抗体あるいは抗 α 1-受容体抗体でプロットすることによって求める。また、逆に抗 β -アドレナリン受容体抗体あるいは抗 α 1-受容体抗体の免疫共沈降物を抗 AT1 受容体抗体でもプロットする。

<平成 20 年度>

平成 20 年度は、遺伝子欠失マウスを用いて平成 19 年度と同様に野生型マウスに対するプロトコールを応用する。培養血管平滑筋においても、AT1aR^{-/-}及び AOPEN^{-/-}マウスから分離し、確立して行う。

4. 研究成果

(1) β 作動薬の慢性投与による左室肥大への AngII 受容体の役割

本実験の予備試験として、ISO の慢性投与による左室肥大モデルへの ARB の効果を検討した。ISO 誘導性の左室肥大あるいは

心筋断面積、心筋線維化などの増大をARBは著名に抑制した(図1)。その機序の一例として、ISOによる酸化ストレスの増大は、ARB投与によって抑制されることを明らかにした(図2)。次にAT1aR^{-/-}およびAOPEN^{-/-}マウスを用いて、ISOによる左室肥大への影響を検討した。ARBを用いた時と同様に、ISOによる酸化ストレス増大の抑制に伴う左室肥大や心筋線維化の有意な抑制を示した(図2)。

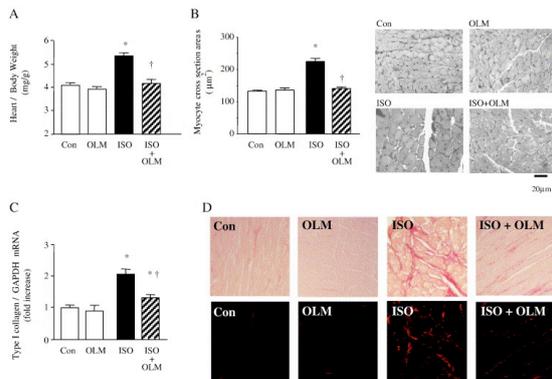


図1.ISOの慢性投与によるARBの効果

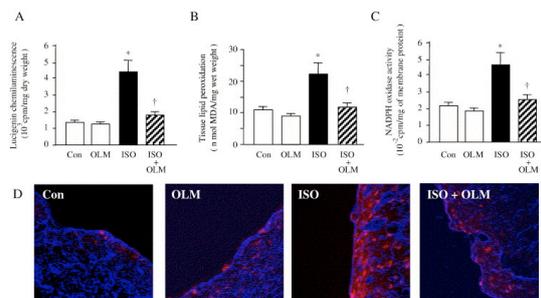


図2.ISOの慢性投与によるARBの酸化ストレスへの効果

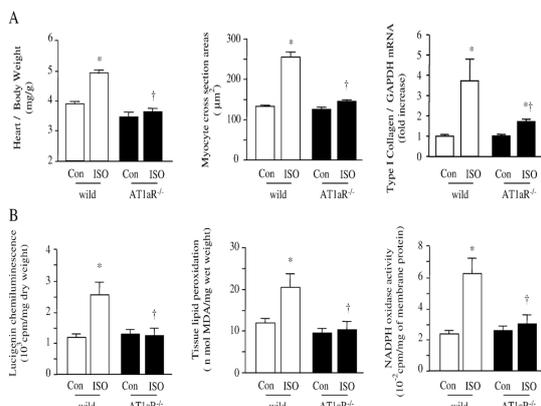


図3.AT1aR^{-/-}マウスへのISOの慢性投与による左室肥大への影響

(2) AngII受容体とそのシグナル伝達系における酸化ストレスの役割

AngII受容体からのシグナル伝達系において、酸化ストレスとNO産生およびMAPKカスケードの関与を調べた。その結果、AngII慢性投与による高血圧を発症したマウスへのNOS阻害薬であるL-NAMEの投与は有意な血圧の上昇を惹起した。しかし、MAPKであるERK1/2およびp38MAPKの活性化は抑制された(図4)。

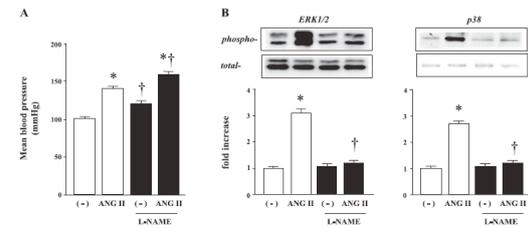


図4. AngII慢性投与によるNOS阻害薬であるL-NAMEの影響

AngIIと酸化ストレスの関係についてさらに詳細に解析するために、血管平滑筋細胞を用いて、nNOS阻害薬であるL-VNIO、ペルオキシ硝酸塩のスキャベンジャーであるFeTPPSおよびNAD(P)Hオキシダーゼ阻害薬であるApocyninによるMAPK(ERK1/2, p38MAPK, JNK)の活性化を調べた(図5)。

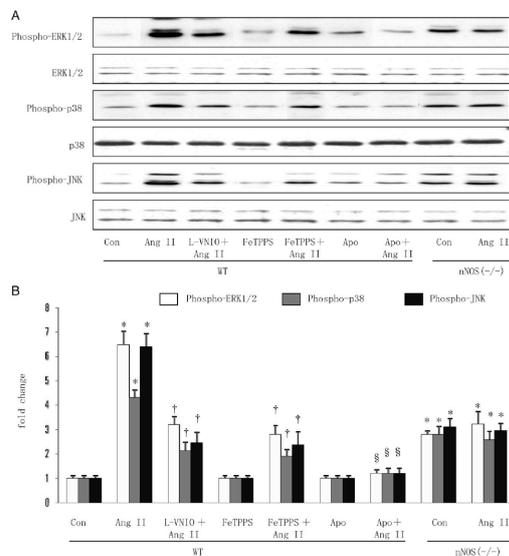


図5.AngIIによる酸化ストレスの誘導とMAPKの活性化

その結果、AngII による ERK1/2, p38MAPK, JNK の活性化の増大は、阻害薬の投与によって著明に抑制された。その抑制効果は apocynin が最も協力的であった。しかし、この AngII による MAPK の活性化は nNOS ノックアウトマウスにおいては一部抑制された。すなわち、AngII による酸化ストレスおよび MAPK の活性化の一部に、nNOS によって産生された NO の関与が示された。

(3) β 受容体シグナリングと AngII 受容体シグナリングにおける RAS, Rap-1 と MAPK の関係について

β -アドレナリン受容体と AngII 受容体の相互作用の可能性を検討するために、small G protein の Ras と Rap1 の活性化を調べた。その結果、 β 作動薬は、Rap1 の活性化を認め、CV で抑制された (図 6)。これは、ARB による治療時の ERK 抑制に関与していると考えられる。そこで、その両受容体のシグナル伝達系をまとめ、本研究により明らかになった相互作用を示した (図 7)。

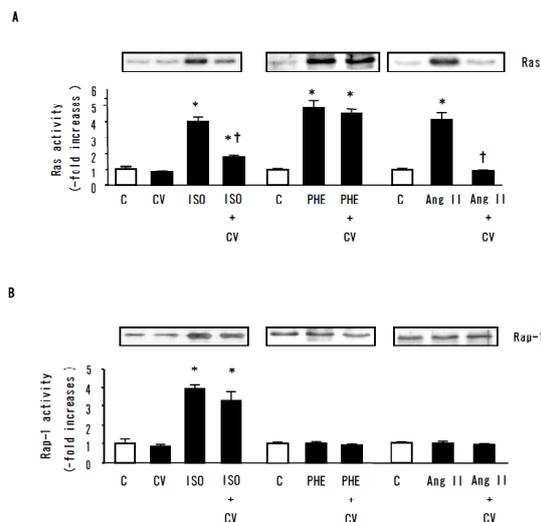


図 6. α , β 作動薬および AngII による Ras と Rap1 の活性化と CV(カンデサルタン)の効果

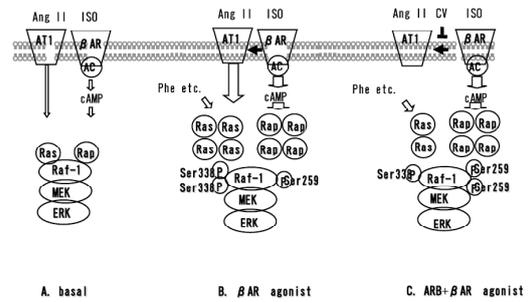


図 7. アドレナリン受容体および AngII 受容体のシグナル伝達系のまとめ

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 6 件)

- Zhang GX, Kimura S, Murao K, Shimizu J, Matsuyoshi H, Takaki M. Role of neuronal NO synthase in regulating vascular superoxide levels and mitogen-activated protein kinase phosphorylation. *Cardiovasc Res.* 2009; 81:389-99.
- 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; 31:1407-13.
- Diah S, Zhang GX, Nagai Y, Zhang W, Gang L, Kimura S, Hamid MR, Tamiya T, Nishiyama A, Hitomi H. Aldosterone induces myofibroblastic transdifferentiation and collagen gene expression through the Rho-kinase dependent signaling pathway in rat mesangial cells. *Exp Cell Res.* 2008; 314:3654-62.
- Zhang GX, Lu XM, Kimura S, Nishiyama A. Role of mitochondria in angiotensin II-induced reactive oxygen species

and mitogen-activated protein kinase activation. Cardiovasc Res. 2007; 76:204-12.

5. Zhang GX, Nagai Y, Nakagawa T, Miyanaka H, Fujisawa Y, Nishiyama A, Izuishi K, Ohmori K, Kimura S. Involvement of endogenous nitric oxide in angiotensin II-induced activation of vascular mitogen-activated protein kinases. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2007; 293:H2403-8.
6. Zhang GX, Ohmori K, Nagai Y, Fujisawa Y, Nishiyama A, Abe Y, Kimura S. Role of AT1 receptor in isoproterenol-induced cardiac hypertrophy and oxidative stress in mice. J Mol Cell Cardiol. 2007; 42:804-11.

[学会発表] (計 5 件)

1. Guo-Xing Zhang. Role of nNOS in basal and angiotensin II-induced vascular O₂ generation and MAPK phosphorylation. 第19回日本病態生理学会大会 2009/1/24-25 所沢
2. 竹下大輔. 心拍数の増加は、ラット左心室のアクチン-ミオシン架橋形成を減少させる第 19 回日本病態生理学会大会 2009/1/24-25 所沢
3. Guo-Xing Zhang. Opposite roles of nNOS in cardiac ischemia reperfusion-induced injury and in ischemia preconditioning-induced cardioprotection in mice. 第101回近畿生理学談話会 2008/9/13 国立循環器病センター
4. Guo-Xing Zhang. Involvement of endogenous nitric oxide in angiotensin II-induced activation of vascular mitogen-activated protein

kinases. 第30回日本高血圧学会総会 2007

5. 張 国興. NAO (10-N-nonyl acridine orang) は心筋虚血再還流時のミトクロムC漏出を抑制する. 第80回日本薬理学会年会 2007

6. 研究組織

(1) 研究代表者

張 国興 (ZHANG GUO-XING)

奈良県立医科大学・医学部・助教

(2) 研究協力者

○ 木村 正司 助教授 (香川大学医学部薬理学)

組織化学、酸化ストレス評価

○ 野間 貴久 助手 (香川大学医学部循環器内科)

マウス心エコー

○ 宮武 明 助教授 (香川大学総合生命科学実験センター)

組織高エネルギーリン酸、コラーゲン含有量 (ヒドロキシプロリン定量) の定量

○ 永井由起子教務職員 (香川大学総合生命科学実験センター)

リアルタイム PCR 法による RNA 比較定量

○ 藤澤良秀技術専門職員 (香川大学総合生命科学実験センター)

マウス手術、モニタリングなどの技術指導