

平成 21 年 5 月 15 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19890169
 研究課題名（和文）プロアンジオテンシン-12の単離精製および役割と生成変換機構の解明
 研究課題名（英文） Proangiotensin-12:discovery, mechanism of action and pathophysiological role.
 研究代表者
 永田 さやか（NAGATA SAYAKA）
 宮崎大学・医学部・研究員
 研究者番号 00452920

研究成果の概要：プロアンジオテンシン-12(proang-12)は、12個のアミノ酸(Ang I-Leu-Tyr)からなる強力な昇圧作用を有する新しい生理活性ペプチドである。これまで proang-12 は、血中より組織中に多いことから、組織レニン・アンジオテンシン系の因子である可能性が高いと考えられてきた。しかし、その生成・変換機構、病態生理学的意義は明らかとなっていない。そこで本研究では、様々の疾患における proang-12 の役割を明らかにして、疾患の治療や診断への臨床応用への可能性を検索すべく、基礎研究を展開した。その結果、レニンに依存する血中 RA 系と proang-12 を介する組織中のレニン非依存性のアンジオテンシン産生経路が相互に独立して存在する可能性が明らかとなった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,290,000	0	1,290,000
2008年度	1,310,000	393,000	1,703,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,600,000	393,000	2,993,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：循環器内科学

キーワード：プロアンジオテンシン-12、組織レニン・アンジオテンシン系、
 生理活性ペプチド、循環器、高血圧、ラジオイムノアッセイ

1. 研究開始当初の背景

レニン・アンジオテンシン系(RA系)は体液量や血圧の調節システムとして知られており、高血圧、動脈硬化、心筋梗塞、心不全など種々の循環器疾患の発症や進展において重要な役割を果たしている。また RA 系の研究は、基礎医学から大規模臨床試験まで幅広く行われてきたが、組織 RA 系の生成経路や役割については未だに十分解明されてい

ない。また現在、組織 RA 系を評価する方法や組織 RA 系のみを特異的に阻害する手段はない。そこで組織中の未知の RA 系関連ペプチドや関連酵素を探索し単離同定することにより、組織 RA 系における Ang II 生成経路を明らかにし、組織 RA 系の病態生理学的役割と作用機序の解明を試みた。その中で研究代表者は2006年に組織 RA 系の因子と考えられるプロアンジオテンシン-12(proang-12)を

ラット小腸より単離・同定した。proang-12はアンジオテンシン I (Ang I) の C 末端に 2 個のアミノ酸が付加した 12 個のアミノ酸 (Ang I-Leu-Try) からなる内在性のペプチドであり、ラットの摘出血管を収縮させ、強い昇圧作用を示した。これらの作用は、ACE 阻害剤であるカプトリルやアンジオテンシン受容体ブロッカー (ARB) である CV-11974 で抑制されたことから、proang-12 が、Ang II に変換され、血管収縮及び昇圧活性を發揮すると考えられた。proang-12 は、小腸、腎臓、肝臓、心臓などの組織中に広く検出され、多くの組織で Ang I、Ang II よりも高濃度に存在している。レニンアンジオテンシノーゲンから Ang I に変換する特異性の高い酵素であることを考慮すると、proang-12 の発見は、レニン非依存性の Ang II 生成経路の存在を示唆している。しかし proang-12 の生成・変換機構および病態生理学的意義は、明確となっていない。さらに RA 系阻害薬は臨床的に広く使用されていることを考慮すると、ヒトでの関連ペプチドの単離・同定および proang-12 の病態生理学的意義を明確にするための基礎研究が重要であると考えられる。

2. 研究の目的

本研究は、proang-12 の生合成と Ang II への変換機構および生体内での proang-12 の病態生理学的役割を解明しようとするものである。そのため本研究の目的は以下の 3 点とする。(1) ヒト proang-12 を単離・同定し、さらにアンジオテンシン関連ペプチドの系統的探索を行う；(2) 様々な疾患における proang-12 の病態生理学的意義を検討する；

(3) proang-12 の生合成および Ang II への変換機構を解明する。これら一連の研究により、組織 RA 系因子としての proang-12 の生合成や変換機構を解明し、様々な疾患における proang-12 の役割を明らかにして、疾患の治療や診断への臨床応用の可能性を検索する。

3. 研究の方法

(1) ヒト proang-12 の単離・同定および RA 系関連ペプチドの系統的探索

複数のアンジオテンシン関連ペプチドを認識できるような Ang II の N 末に特異的なラジオイムノアッセイ (RIA) を用いて、胎盤、尿より、ヒト proang-12 および関連ペプチドの単離・精製を行った。さらに質量分析装置 (LC/MS/MS) とプロテインシーケンサーを用いて精製したペプチドのアミノ酸配列の決定を試みた。さらにヒト胎盤または剖検検体、培養細胞もしくはラット組織より組織中の RA 系関連ペプチドの系統的探索も行った。

(2) 様々な疾患における proang-12 の病態生理学的意義の検討

高血圧自然発症ラット (SHR)、脳卒中ラット (SHRSP) 等のモデル動物を用いて組織中および血中の proang-12 を含めたアンジオテンシン関連ペプチド濃度を比較した。さらに 12 週齢の雄性 Wistar ラットを、1 週間、0.3% NaCl (低塩食) または 8% NaCl (高塩食) で飼育し、食塩摂取の違いによる RA 系因子の評価を行った。また 15 週齢の雄性高血圧自然発症ラットに 1 週間アンジオテンシン受容体拮抗薬 (ARB) ロサルタン (30mg/kg/day) または ACE 阻害薬イミダプリル (20mg/kg/day) をそれぞれ経口投与し、RA 系阻害薬における RA 系因子の評価を行った。その際、血中、組織中の proang-12、アンジオテンシン I (Ang I)、Ang II の濃度をラジオイムノアッセイにて測定した。また血中のレニン活性、アルドステロン濃度、アンジオテンシノーゲン濃度も比較し、さらにアンジオテンシノーゲン、レニンの遺伝子発現を定量的 PCR にて評価した。

4. 研究成果

(1) 複数のアンジオテンシン関連ペプチドを認識できるような Ang II の N 末に特異的なラジオイムノアッセイ (RIA) を用いて、胎盤、尿より、ヒト proang-12 および関連ペプチドの精製を行った。ゲル濾過法、イオン交換クロマトグラフィー、逆相 HPLC で精製し、さらにアフィニティ精製を繰り返し、関連ペプチドの単離・精製を完了した。精製ペプチドは、質量分析装置 (LC/MS)、プロテインシーケンサーを用いてアミノ酸配列の決定を行っている。さらにラット組織中の RA 系関連物質の系統的探索を行ったところ、他にも活性のある分画が存在していることが分かった。

(2) 高血圧自然発症ラット (SHR)、脳卒中ラット (SHRSP) 等のモデル動物を用いて組織中および血中のアンジオテンシン関連ペプチド濃度を比較した。その結果、SHR はコントロール群と比較して proang-12 が小腸・胃・脳において有意に低く、SHRSP においても小腸・胃・副腎・脾臓で proang-12 濃度が低い傾向にあった。血圧が高い場合、組織中で proang-12 の濃度が減少することより、proang-12 が血圧の維持に関与している可能性が低いと考えられた。これらより血中 RA 系と proang-12 を介した組織 RA 系が独立して作用している可能性が示唆された。

(3) RA 系阻害薬を投与した高血圧自然発症ラット (SHR) における RA 系因子の血中、組織中の変化を検討した。15 週齢雄性 SHR に 1 週

間、アンジオテンシン受容体拮抗薬 (ARB) ロサルタンと ACE 阻害薬イミダプリルを、それぞれ経口投与し、血中、組織中の proang-12、アンジオテンシン I (Ang I)、Ang II の濃度を測定した。薬剤投与の両群において血中のレニン活性、Ang I、Ang II の濃度は上昇したが、アンジオテンシノーゲン、proang-12 濃度には、変化がなかった。一方、組織中では、薬剤投与の両群において proang-12、Ang II 濃度は減少傾向にあった。これらの結果より proang-12 の生成に血中のレニン活性が関与しない可能性が明らかとなり、さらにレニンに依存する血中 RA 系と proang-12 を介したレニン非依存性の組織アンジオテンシン産生経路が独立して存在している可能性が示唆された。

(4) NaCl 摂取量の違いにおける血中と組織中 proang-12 および RA 系因子の変化を検討した。12 週齢オスの Wistar Rat に 1 週間、8% NaCl (高塩食) と 0.3% NaCl (低塩食) を含む食事を与えたそれぞれの群において血中、組織中の proang-12、アンジオテンシン I (Ang I)、Ang II の濃度を測定した。その結果、低塩食においては、血中のレニン活性、アルドステロン濃度が上昇し、それに伴い Ang I、Ang II 濃度も上昇した。一方でアンジオテンシノーゲン、proang-12 の血中濃度には高塩食・低塩食で変化がなかった。さらに組織中においても低塩食で Ang I、Ang II 濃度は上昇傾向にあったが、proang-12 の濃度に変化はなかった。これらの結果より proang-12 の生成に血中のレニン活性が影響しないことが判明し、さらにレニンに依存する RA 系と proang-12 が関与すると考えられるレニン非依存性の RA 系が独立して存在している可能性が示唆された。

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 3 件)

- ① Ferrario CM, Varagic J, Habibi J, Nagata S, Kato J, Chappell MC, Trask AJ, Kitamura K, Whaley-Connell A, Sowers JR: Differential regulation of angiotensin-(1-12) in plasma and cardiac tissue in response to bilateral nephrectomy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2009; 296: H1184-H1192 (査読有り)
- ② Jessup JA, Trask AJ, Chappell MC, Nagata S, Kato J, Kitamura K, Ferrario CM: Localization of the novel angiotensin peptide, angiotensin-(1-12), in heart and kidney of hypertensive and

normotensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2008; 294: H2614-H2618 (査読有り)

- ③ Nagata S, Kato J, Sasaki K, Minamino N, Eto T, Kitamura K: Isolation and identification of proangiotensin-12, a possible component of the renin-angiotensin system. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 350: 1026-1031 (査読有り)

[学会発表] (計 8 件)

- ① 永田さやか、加藤丈司、北村和雄: NaCl 摂取量の違いにおける血中と組織中プロアンジオテンシン-12 (proang-12) およびレニン・アンジオテンシン (RA) 系因子の変化 第 82 回日本内分泌学会学術総会 2009 年 4 月 25 日 群馬
- ② Sayaka Nagata, Johji Kato, Kazuo Kitamura, Jasmina Varagic, Mark C. Chappell, Aaron J. Trask, Javad Habibi, James Sowers, Carlos M. Ferrario: Augmented Cardiac Content of Proangiotensin-12, Ang-(1-12), in Nephrectomized Rats 第 73 回日本循環器学会総会 2009 年 3 月 21 日 大阪
- ③ Sayaka Nagata, Johji Kato, Kenji Kuwasako, Kazuo Kitamura: Plasma and tissue levels of proangiotensin-12 in spontaneously hypertensive rats (SHR) treated with or without inhibitors of the renin-angiotensin system 第 73 回日本循環器学会総会 2009 年 3 月 21 日 大阪
- ④ 永田さやか、加藤丈司、北村和雄: レニン・アンジオテンシン系の新たなペプチド proangiotensin-12 の単離同定と組織濃度の検討 第 11 回日本心血管内分代謝学会 2007 年 11 月 16 日 東京
- ⑤ 永田さやか、加藤丈司、江藤胤尚、北村和雄: レニン・アンジオテンシン系の新規ペプチド proangiotensin-12 の単離同定および血中と組織中濃度 第 30 回日本高血圧学会総会 2007 年 10 月 25 日 沖縄
- ⑥ 永田さやか、加藤丈司、南野直人、江藤胤尚、北村和雄: 組織アンジオテンシンの分子型の検討と proangiotensin-12 の発見 第 80 回日本内分泌学会学術総会 2007 年 6 月 15 日 東京
- ⑦ Sayaka Nagata, Johji Kato, Kazuki Sasaki, Naoto Minamino, Tanenao Eto, Kazuo Kitamura: Proangiotensin-12: A New Member of Peptide for the Renin-Angiotensin System American Society of Hypertension 22nd Annual Scientific Meeting and Exposition 2007 年 5 月 20 日 USA Chicago
- ⑧ Sayaka Nagata, Johji Kato, Naoto

Minamino, Tanenao Eto, Kazuo Kitamura: Proangiotensin-12: a new member of peptide for the renin-angiotensin (RA) system 第71回日本循環器学会総会 2007年3月15日 兵庫

〔産業財産権〕

○出願状況 (計1件)

①発明の名称「昇圧作用を有する新規ポリペプチド」

発明者：北村和雄、加藤丈司、永田さやか

出願人：国立大学法人宮崎大学

出願番号：特願 2006-181709

出願日：平成 18 年 6 月 30 日

〔その他〕

○総説 (計2件)

①永田さやか、加藤丈司、北村和雄：アンジオテンシン関連の新たな内在性ペプチド：プロアンジオテンシン-12. 循環器科；2008 64 (5)：496-502

②永田さやか、加藤丈司、北村和雄：プロアンジオテンシン-12. 分子心血管病；2008 vol.9 no.3:66(288)-70(292)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

永田 さやか (NAGATA SAYAKA)

宮崎大学・医学部・研究員

研究者番号：00452920