

機関番号：22701

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590979

研究課題名 (和文) 心血管病増悪因子受容体の新規機能調節因子の生体での発現機序の解明と機能制御の試み

研究課題名 (英文) Functional analysis of Angiotensin Receptor Binding Protein in The Cardiovascular Regulation

研究代表者

田村功一 (TAMURA KOUICHI)

横浜市立大学・医学部・准教授

研究者番号：40285143

研究成果の概要 (和文)：

本研究では、(Angiotensin II Type 1 Receptor-Associated Protein) ATRAP について、現在までの予備的研究により得られた ATRAP の機能についての in vitro での研究成果をさらに発展させるために、『組織 ATRAP 発現量 / AT1 受容体発現量の低下 → 組織局所での ATRAP 発現低下による AT1 受容体情報伝達系活性の亢進 → 心血管系疾患、腎障害、メタボリック症候群の発症・進展』という仮説のもとに、病態モデル動物や生体内遺伝子導入法を用いて検討するとともに、研究代表者らが作製した全身性 ATRAP 過剰発現マウスおよび心・腎特異的 ATRAP 過剰発現マウスを用いて ATRAP の機能解析を総合的に行い、心肥大、心不全や動脈硬化、および高血圧などの心血管系疾患あるいは生活習慣病・メタボリック症候群における ATRAP の病態生理学的意義を生体レベルで明らかにした。

研究成果の概要 (英文)：

We hypothesized that a downregulation of the cardiac ATRAP to angiotensin II type 1 receptor ratio is involved in the pathogenesis of cardiac hypertrophy. To examine this hypothesis, we next generated transgenic mice expressing ATRAP specifically in cardiomyocytes under control of the  $\alpha$ -myosin heavy chain promoter. In cardiac-specific ATRAP transgenic mice, the development of cardiac hypertrophy, activation of p38 mitogen-activated protein kinase, and expression of hypertrophy-related genes in the context of angiotensin II treatment were completely suppressed, in spite of there being no significant difference in blood pressure on radiotelemetry between the transgenic mice and littermate control mice. These results demonstrate that cardiomyocyte-specific overexpression of ATRAP in vivo abolishes the cardiac hypertrophy provoked by chronic angiotensin II infusion, thereby suggesting ATRAP to be a novel therapeutic target in cardiac hypertrophy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・腎臓内科学

キーワード：高血圧学，分子心臓血管病態学

## 1. 研究開始当初の背景

研究代表者はこれまでレニン-アンジオテンシン系遺伝子発現調節機構とその病態生理学的意義に関する分子生物学的研究を行っており、レニンおよびアンジオテンシノーゲン遺伝子の発現調節における近位プロモーター領域の重要性、心血管系細胞・組織における特異的なレニンおよびアンジオテンシノーゲン遺伝子の発現調節機構、およびアンジオテンシノーゲン遺伝子欠損マウス由来心筋細胞を用いた系での gp130 蛋白を介するサイトカイン経路の重要性などについて明らかにしてきた。最近ではレニン-アンジオテンシン系の新規活性制御因子の探索とその機能解析を行っており、レニン遺伝子発現活性化に核受容体の一種 LXR が関与することや、AT1 受容体刺激による心血管系リモデリング促進遺伝子発現の増加に転写制御因子 AP1 が関与することを明らかにした(12)。今回 AT1 受容体に直接結合してその機能を調節している可能性が高い新規因子の遺伝子クローニングに成功し、これを ATRAP (Angiotensin II Type 1 Receptor-Associated Protein) と名付けた(13, 14)。ATRAP の機能および病態生理学意義については不明な点が多いが、研究代表者らは現在までに、ATRAP が細胞レベルにおいては AT1 受容体の internalization を促進して細胞表面の AT1 受容体を減少させることにより、AT1 受容体を介する心肥大反応や血管平滑筋細胞の動脈硬化反応を抑制する可能性を明らかにしている。

## 2. 研究の目的

レニン-アンジオテンシン系の生理活性物質アンジオテンシン II は主要な受容体である AT1 受容体に作用して下流の情報伝達系を活性化することにより、高血圧、心肥大、心不全、動脈硬化、腎障害などの心血管系疾患や社会的脅威となりつつある生活習慣病・メタボリック症候群の発症・進展に深くかかわっている。研究代表者らは、この AT1 受容体への新規結合因子 ATRAP (Angiotensin II Type 1 Receptor-Associated Protein) を世界で初めて報告した。本研究課題では、この ATRAP について、現在までの予備的研究により得られた ATRAP の機能についての *in vitro* での研究成果をさらに発展させるために、『組織 ATRAP 発現量 / AT1 受容体発現量の低下 → 組織局所での ATRAP 発現低下による AT1 受容体情報伝達系活性の亢進 → 心血管系疾患、腎障害、メタボリック症候群の発症・進展』という仮説のもとに、病態モデル動物や生体内遺伝子導入法を用いるとともに、研究代表者らが作製した全身性 ATRAP 過剰発現マウスおよび心・腎特異的 ATRAP 過剰

発現マウスを用いて ATRAP の機能解析を総合的に行い、心肥大、心不全や動脈硬化、および高血圧などの心血管系疾患あるいは生活習慣病・メタボリック症候群における ATRAP の病態生理学的意義を生体レベルで解明することを目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) 病態モデル動物での ATRAP の機能解析： 心血管系、腎、脂肪組織などの組織レニン-アンジオテンシン系は、血圧循環調節や水電解質代謝制御、あるいは、糖・脂質代謝制御における機能的意義が注目されている。組織で局所的に産生されたこの系の強力な生理活性物質アンジオテンシン II は主に AT1 受容体を介する情報伝達系を活性化するが、それに加えて、AT1 受容体は、高血圧などによる細胞や組織への進展刺激によっても受容体の立体構造変化による活性化を受けることが明らかにされている。この AT1 受容体の C 末端に特異的に結合する新規分子である ATRAP について、研究代表者らは現在までの予備的研究において、ATRAP が細胞レベルにおいては AT1 受容体の internalization を促進して細胞表面の AT1 受容体を減少させることにより、AT1 受容体を介する心肥大反応や血管平滑筋細胞の動脈硬化反応を抑制すること、およびマウス組織における内在性発現については種々の組織において ATRAP が高発現していることなどを確認している。

(2) Gain-of-function *in vivo* strategy に基づく発生工学的手法による ATRAP 過剰発現マウスの機能解析： 本研究の2年目以降は、『組織 ATRAP 発現量 / AT1 受容体発現量の低下 → 組織局所での ATRAP 発現低下による AT1 受容体情報伝達系活性の亢進 → 心血管系疾患、腎障害、メタボリック症候群の発症・進展』という仮説の検証のために、主に gain-of-function *in vivo* strategy により、ATRAP 機能を生体レベルで解明すべく、発生工学的手法により得られた全身性 ATRAP 過剰発現マウス、心・腎特異的 ATRAP 過剰発現マウス、および他の病態モデル動物を用いて、ATRAP 機能の心血管系リモデリングおよびメタボリック症候群における ATRAP の機能的意義についての生体レベルでの解析を行い、未知の部分が依然として多い ATRAP の機能を *in vivo* の面から明らかにする。

## 4. 研究成果

本研究では、発生工学的手法により得られた全身性 ATRAP 過剰発現マウス、心・腎特異的 ATRAP 過剰発現マウス、および他の病態モデル動物を用いて、ATRAP 機能の心血管系リモデリングおよびメタボリック症候群にお

ける ATRAP の機能的意義についての生体レベルでの解析を行い、未知の部分が依然として多い ATRAP の機能を *in vivo* の面から検討した。具体的には、研究代表者は、全身性 ATRAP 高発現トランスジェニックマウスを作製した。全身的な ATRAP の機能亢進が実際に食塩負荷、アンジオテンシン II 負荷、大動脈縮窄負荷において心血管病変を軽減させるか否か、および高脂肪食負荷において体重増加、肥満、高脂血症、インスリン抵抗性などのメタボリック症候群を改善させるか否かについて検討した。これの検討により、全身性の ATRAP 発現亢進の心血管系保護作用とメタボリック症候群改善が明らかにされた。

また、心臓特異的 ATRAP 高発現トランスジェニックマウスの作製と機能解析もおこなった。AT1 受容体系シグナルの活性化は、心肥大を惹起する主要な因子である。当研究室では AT1 受容体の C 末端に特異的に結合する低分子蛋白 ATRAP を単離同定し、心筋細胞や血管平滑筋細胞を用いた *in vitro* での検討結果から、ATRAP が AT1 受容体の constitutive な internalization を促進し、AngII を介した心肥大応答や動脈硬化反応を抑制することを明らかにした。そこで、*in vivo* において、心肥大における ATRAP の意義を明らかにするために、まず、AngII 投与が、野生種マウス (Wt) の心臓における内在性の ATRAP 発現量に与える影響について検討した。Wt を生食投与群、AngII 投与群、AngII+ARB 同時投与群の 3 群に分けて飼育し、左室における ATRAP および AT1 受容体発現量を検討した。次に、心臓特異的 ATRAP トランスジェニックマウス (Tg) を用いて、野生種のコントロールマウス (LC) および Tg に AngII を 2 週間投与した。Wt および LC の血圧を観血的に測定し、経胸壁心エコー検査を施行後、心臓を摘出し、心重量/体重比および左室での心肥大関連遺伝子 (BNP, ANP) 発現量を定量的 PCR 法により評価した。さらに、両群のマウスにおいて、AngII 刺激による心肥大応答に重要とされる左室 MAPK のリン酸化を評価した。その結果、野生種マウスへの AngII 投与により、心肥大の進行とともに、左室における内在性 AT1 受容体発現量は変化しないにもかかわらず、内在性 ATRAP 発現量の有意な減少がみられた。しかし、ARB 投与によって、AngII を介した心肥大は抑制され、ATRAP 発現量の減少も回復した。また、Tg では、AngII 投与によるテレメトリーによる観血的測定血圧の上昇の程度は LC マウスと同等であったにもかかわらず、心重量/体重比の増加、心エコー検査による壁肥厚、心肥大関連遺伝子発現量の増加、および左室 p38 MAPK 活性化の完全な抑制が観察された。以上の結果から、*in vivo* において、AngII 投与による心肥大の進行に、左室 ATRAP 発現量の減少が関与し

ている可能性が示唆された。さらに、心臓における ATRAP 発現量を持続的に増加させることにより、AngII を介した心肥大応答が完全に抑制されたことから、ATRAP が心肥大に対する新たな治療の分子標的となり得る可能性が明らかにされた。

以上の一連の研究成果については、2009 年に開催された第 32 回日本高血圧学会総会において高得点演題としてプレナリーセッションにて発表をおこない、また、米国心臓病協会誌 *Hypertension* に編集部コメント付き論文として掲載受理された。さらにこれらの研究成果について国内外の学会 (日本高血圧学会、日本腎臓学会、米国 AHA Scientific Sessions 2010 など)、および国際学術雑誌 (*Hypertension, Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, American Journal of Physiology Renal Physiology*) に研究成果の一部について発表した。

## 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 21 件)

1 Wakui H, Tamura K (他 14 名, 2 番目) (corresponding author and equal contributor), Minamisawa S, Umemura S, et al. Intrarenal suppression of angiotensin II type 1 receptor binding molecule in angiotensin II-infused mice. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2010 Aug 25. [Epub ahead of print]. (査読有)

2 Masuda S, Tamura K (他 18 名, 2 番目) (corresponding author and equal contributor), Umemura S, et al. Expression of angiotensin II type 1 receptor interacting molecule in normal human kidney and IgA nephropathy. *Am J Physiol Renal Physiol*. 299: F720-F731, 2010. (査読有)

3 Tsurumi-Ikeya Y, Tamura K (他 12 名, 2 番目) (corresponding author and equal contributor), Umemura S, et al. Sustained inhibition of oxidized low-density lipoprotein is involved in the long-term therapeutic effects of apheresis in dialysis patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 30: 1058-1065, 2010. (査読有)

4 Wakui H, Tamura K (他 18 名, 2 番目) (corresponding author), Horiuchi M, Minamisawa S, Umemura S, et al. Cardiac-specific activation of angiotensin II type 1 receptor-associated protein completely suppresses cardiac hypertrophy in chronic angiotensin

II-infused mice. Hypertension. 55: 1157-1164, 2010. (査読有) (\*Featured in Editorial Commentary: Hypertension. 55: 1086-1087, 2010).

5 Okano Y, Tamura K (他 5 名, 2 番目), Umemura S, et al. Effects of angiotensin II receptor blockers on the relationships between ambulatory blood pressure and anti-hypertensive effects, autonomic function, and health-related quality of life. Clin Exp Hypertens. 31: 680-689, 2009. (査読有)

6 Ozawa M, Tamura K (他 13 名, 2 番目) (corresponding author), Umemura S, et al. Blood pressure variability as well as blood pressure level is important for left ventricular hypertrophy and brachial-ankle pulse wave velocity in hypertensives. Clin Exp Hypertens. 31: 669-679, 2009. (査読有)

7 Min LJ, Mogi M, Tamura K (他 9 名, 3 番目), Horiuchi M. Angiotensin II type 1 receptor-associated protein prevents vascular smooth muscle cell senescence via inactivation of calcineurin/nuclear factor of activated T cells pathway. J Mol Cell Cardiol. 47: 798-809, 2009. (査読有)

8 Masuda S, Tamura K (他 9 名, 2 番目) (corresponding author), Umemura S, et al. Effects of angiotensin II type 1 receptor blocker on ambulatory blood pressure variability in hypertensive patients with overt diabetic nephropathy. Hypertens Res. 32: 950-955, 2009. (査読有)

9 Araki N, Tamura K (他 11 名, 9 番目), Umemura S, et al. Identification of NPC2 protein as interaction molecule with C2 domain of human Nedd4L. Biochem Biophys Res Commun. 388: 290-296, 2009. (査読有)

10 Mitsuhashi H, Tamura K (他 18 名, 2 番目) (corresponding author), Umemura S, et al. Effect of losartan on ambulatory short-term blood pressure variability and cardiovascular remodeling in hypertensive patients on hemodialysis. Atherosclerosis. 207: 186-190, 2009. (査読有)

11 Ozawa M, Tamura K (他 15 名, 2 番目) (corresponding author), Umemura S, et al. Identification of an increased short-term blood pressure variability on ambulatory blood pressure monitoring as a coronary risk factor in diabetic hypertensives. Clin Exp Hypertens. 31: 259-270, 2009. (査読有)

12 Okano Y, Tamura K (他 5 名, 2 番目), Umemura S, et al. Effects of angiotensin

II receptor blockers on relationships between 24-hour blood pressure, autonomic function, and health-related QOL. Clin Exp Hypertens. 31: 250-258, 2009. (査読有)

13 Shigenaga A, Tamura K (他 16 名, 2 番目) (corresponding author), Umemura S, et al. Effects of angiotensin II type 1 receptor blocker on blood pressure variability and cardiovascular remodeling in hypertensive patients on chronic peritoneal dialysis. Nephron Clin Pract. 112: c31-c40, 2009. (査読有)

14 Yoshida S, Tamura K (他 12 名, 8 番目), Umemura S, et al. Urinary oxidative stress markers closely reflect the efficacy of candesartan treatment for diabetic nephropathy. Nephron Exp Nephrol. 111: e20-e30, 2009. (査読有)

15 Ushio H, Tamura K (他 8 名, 5 番目), Umemura S, et al. Utility and feasibility of a new programmable home blood pressure monitoring device for the assessment of nighttime blood pressure. Clin Exp Nephrol. 13: 480-485, 2009. (査読有)

16 Tsurumi-Ikeya Y, Tamura K (他 10 名, 2 番目) (corresponding author), Umemura S, et al. Effect of LDL Apheresis on atherosclerosis is beyond its cholesterol lowering in hemodialysis patients: A Pilot Study. Jpn J Apheresis. 27: 231-235, 2008. (査読有)

17 Shigenaga A, Tamura K (他 12 名, 2 番目) (corresponding author), Horiuchi M, Umemura S, et al. Effect of olmesartan on tissue expression balance between angiotensin II receptor and its inhibitory binding molecule. Hypertension. 52: 672-678, 2008. (査読有)

18 Ozawa M, Tamura K (他 13 名, 2 番目) (corresponding author), Umemura S, et al. Ambulatory blood pressure variability is increased in diabetic hypertensives. Clin Exp Hypertens. 30:213-224, 2008. (査読有)

19 Hashimoto T, Tamura K (他 13 名, 13 番目), Umemura S, et al. Behçet's disease complicated by IgA nephropathy with nephrotic syndrome. Clin Exp Nephrol. 12: 224-227, 2008. (査読有)

20 Araki N, Tamura K (他 10 名, 6 番目), Umemura S, et al. Expression, transcription, and possible antagonistic interaction of the human Nedd4L gene variant: implications for essential hypertension. Hypertension. 51:773-777, 2008. (査読有)

21 Tamura K (他 13 名, 1 番目)

(corresponding author), Umemura S, et al. Ambulatory blood pressure and heart rate in hypertensives with renal failure: comparison between diabetic nephropathy and non-diabetic glomerulopathy. Clin Exp Hypertens. 30:33-43, 2008. (査読有)

[学会発表] (計 5 件)

1 Tamura K, et al. Angiotensin II Type 1 Receptor-Associated Protein Mediates a Novel Inhibitory Effect on Cardiac Hypertrophy In Vivo. Scientific Sessions 2010, American Heart Association (Chicago, IL), November 13-17, 2010.

2 田村功一, 他. AT1 受容体阻害薬は高血圧合併腹膜透析患者の血圧短期変動性を改善する. シンポジウム 4: 透析患者の心血管事故に及ぼす神経・内分泌因子の影響. 第 54 回日本透析医学会学術集会・総会 (横浜), Jun 5-7, 2009.

3 田村功一, 他. 血液透析患者における閉塞性動脈硬化症に対する LDL アフェレンシスの長期的作用機序における酸化ストレスの意義についての検討. ワークショップ 7: 透析患者に酸化的ストレスをどう抑えるか～薬剤から運動まで～. 第 54 回日本透析医学会学術集会・総会 (横浜), Jun 5-7, 2009.

4 田村功一, 他. AT1 受容体阻害薬は高血圧合併腹膜透析患者の血圧短期変動性を改善する. 第 54 回日本透析医学会学術集会・総会 (横浜), Jun 5-7, 2009.

5 Tamura K, et al. Effects of Angiotensin II Type 1 Receptor Blocker on Ambulatory Blood Pressure Profile in Hypertensive Patients with Overt Diabetic Nephropathy. The 63rd High Blood Pressure Research Conference in association with the Council on the Kidney in Cardiovascular Disease (Chicago, IL), September 23-26, 2009.

[図書] (計 1 件)

東 公一, 田村功一. 最新 高血圧診療学 (永井書店), p.241-p.252, 2010.

[その他]

ホームページ等

[http://www.yokohama-cu.ac.jp/amedrc/res/tamura\\_1005.html](http://www.yokohama-cu.ac.jp/amedrc/res/tamura_1005.html)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

田村功一 (TAMURA KOUICHI)  
横浜市立大学・医学部・准教授  
研究者番号: 4 0 2 8 5 1 4 3

### (2) 研究分担者

梅村 敏 (UMEMURA SATOSHI)  
横浜市立大学・医学研究科・教授  
研究者番号: 0 0 1 2 8 5 8 9

### (3) 連携研究者

堀内正嗣 (HORIUCHI MASATSUGU)  
愛媛大学・医学研究科・教授  
研究者番号: 4 0 1 5 0 3 3 8