

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 30 日現在

機関番号：34509

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590093

研究課題名（和文）レニン・アンジオテンシン系による血圧降下機構の解明

研究課題名（英文）The mechanism of hypotension by renin-angiotensin system

研究代表者

屋山 勝俊 (YAYAMA KATSUTOSHI)

神戸学院大学・薬学部・准教授

研究者番号：30248108

研究成果の概要（和文）：

血管応答調節の理解は、高血圧発症の予防という観点においても重要である。本研究において、血管内皮細胞内が酸性化状態になると、血管内皮細胞は血管弛緩物質を産生し血管は弛緩することを明らかにした。また、血管平滑筋に存在する酵素、チロシン脱リン酸化酵素を阻害すると血管は収縮すること、及びその収縮経路を明らかにした。加えて、血管がストレスを受けると、血管は収縮応答を示すことを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

Vasotone plays an important role in the development of hypertension. In these studies we showed that cell acidification induces the vasorelaxation through production of NO which is vasorelaxation factor. On the other hand, inhibition of the protein tyrosine phosphatases and hypertonic stress induce the vasoconstriction.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
2012年度	500,000	150,000	650,000
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：薬学・生物系薬学・薬理学

キーワード：Rho キナーゼ、アンジオテンシン

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、脳血管障害や腎不全などを引き起こす原因となることから、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かかわるが、特に 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、この系の中

心にある活性ペプチド、アンジオテンシン II (Ang II) に関して多くの研究がなされてきた。Ang II は、強力な血管収縮・細胞増殖・活性酸素産生・心筋細胞肥大等、高血圧症に関連する循環器疾患の発症・進行に深く関与している。これら Ang II の作用は、アンジオテンシントイプ 1 (AT1) 受容体を介する。さらに、Ang II および関連ペプチドの作用点として、アンジオテンシントイプ 2 (AT2) 受容体、アンジオテンシントイプ 3 受容体が存

在すること、そして、これら受容体への 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。加えて、プロレニン受容体の発見と Ang II を介さない RA 系の存在、Ang II の分解産物と考えられてきたアンジオテンシン 1-7 (Ang1-7) が AT3 受容体のリガンドである可能性等、Ang II-AT1 受容体系を中心とした RA 系の理解は、さらに大きく拡大しつつある。AT2 受容体に関する研究は、これら RA 系研究の重要な一角を占めるものである。1999 年、Tsutsumi 等は AT2 受容体を高発現させたトランスジェニックマウスにおいて、血管 AT2 受容体の活性化は細胞内酸性化を誘発し、組織カリクレイン活性化を介したブラジキニン (BK) 産生を亢進させ、その結果、Ang II は血管弛緩を起こすと報告した。また Cary 等も、腎血管系において、AT2 受容体刺激が BK-NO 系を介して血流調節に関与することを証明した。これら研究は、AT2 受容体シグナルがカリクレイン・キニン (KK) 系の活性化を起こす可能性を明らかにしたものである。しかしながら、血管局所において AT2 受容体シグナルがどのような機構により KK 系にリンクするのか、そして、細胞内酸性化により血管機能にどのような影響が及ぶかは不明であった。また、AT2 受容体シグナルは、プロテインホスファターゼを活性化すると報告されていたが、血管におけるプロテインホスファターゼの役割についても不明なままであった。

2. 研究の目的

申請者らは、これら知見に基づき、以下の項目を明らかにする目的で研究を進めた。即ち、(1) Ang II の AT2 受容体刺激がカリクレイン様酵素の活性化を起こすとの報告はあるものの、実際に BK の産生を亢進させるかは確認されていない。そこで、AT2 受容体刺激において、Ang II による AT2 受容体刺激が BK 産生を亢進させるか、(2) 血管 AT2 受容体への刺激が、実際に組織カリクレインの活性化を起こすか、(3) AT2 受容体シグナルが細胞内酸性化を亢進させ、そのことにおいても血管は弛緩すると考えられているが、どのような機構により細胞内酸性化が血管弛緩を惹起するか、(4) 血管 AT2 受容体への刺激は、チロシンホスファターゼ活性を亢進させることが報告されているが、チロシンホスファターゼの活性化あるいは阻害は、血管収縮、弛緩応答を惹起するのか、これら点を明らかにする目的で研究を開始した。

3. 研究の方法

(1) AT2 受容体を介した BK 並びに NO 産生の亢進について。

培養血管内皮細胞及び血管平滑筋細胞に

おける AT2 受容体発現は非常に低いため、AT2 受容体遺伝子を導入し AT2 受容体を高発現させた。これら細胞に AT2 受容体刺激を加えた後、培養上清中に BK、NO が産生されるかを検討した。また、eNOS のリン酸化がどのような細胞内情報伝達系を介して行われているかについてウエスタンブロット法を用いて検討した。

(2) 細胞内酸性化と情報伝達系。

細胞内 pH の変化は、蛍光色素 (BCECF) を用いた二波長蛍光スキャニング法によりけんとうした。また、細胞内酸性化等によりどのような情報伝達系が活性化されたかについては、ウエスタンブロット法を用いて検討した。

(3) 血管収縮、弛緩への細胞内酸性化、チロシンホスファターゼの関与。

細胞内酸性化を起こす Na^+/H^+ -antiporter 阻害薬あるいは塩化アンモニウムを用い、細胞内酸性化が血管収縮、弛緩にどのような影響を及ぼすかマグヌス法を用いて検討した。また、血管応答へのホスファターゼの関与については、ホスファターゼ阻害剤を用い、ホスファターゼの阻害が、血管収縮、弛緩にどのような影響を及ぼすかマグヌス法を用いて検討した。またこのサイドのようなシグナル系が活性化されるかについては、ウエスタンブロット法を用いて検討した。

4. 研究成果

培養血管内皮細胞及び血管平滑筋細胞に、リポフェクション法を用いて AT2 受容体遺伝子を導入し AT2 受容体を高発現させた。培養血管内皮細胞に AT2 受容体刺激を加えた後、培養上清中に BK、NO が産生されるかを、BK は ELISA 法にて、NO は、NO 特異的蛍光プローブを用いて検討した。しかしながら、BK、NO ともにその産生を検出することはできなかった。また、培養血管内皮細胞をアセチルコリンで刺激しても NO の産生が検出できなかったことから、これら方法で、血管内皮細胞からの NO 遊離を直接測定することは難しいと考え、レポーター細胞を用いた検討を行った。即ち RFL-6 細胞は、NO に応答し、細胞内 cGMP 含量を増加させることから、培養血管内皮細胞と RFL-6 細胞を共培養し、RFL-6 細胞における細胞内 cGMP 含量を測定した。その結果、AT2 受容体を高発現させた培養血管内皮細胞に AT2 受容体刺激を加えたものでは、cGMP 含量の増加を認めた。以上の結果から、血管内皮細胞の AT2 受容体刺激は、NO 産生を亢進させていると思われた。次に、AT2 受容体刺激が、eNOS を活性化するかについて

検討したところ、血管内皮細胞の AT2 受容体刺激は、eNOS リン酸化を亢進させ、その亢進には Akt 系が関与していることが明らかとなった。血管への AT2 受容体刺激は細胞内酸性化を誘導する可能性が指摘されているが、その詳細な機構、血管系細胞の細胞内産生化がどのような生理反応を惹起するかは不明である。そこでまず、血管組織酸性化により血管がどのような応答を示すかについて検討した。その結果、HEPES 緩衝化 Krebs 溶液により、pH 7.4 - 6.4 の範囲で pH の低下に依存した血管弛緩反応が認められた。この弛緩反応の約 50 % は NO 合成酵素阻害薬 L-NAME や血管内皮除去により抑制された。pH 低下による内皮依存性弛緩反応はカルモジュリン阻害薬カルミダゾリウムにより抑制され、またウシ血管内皮細胞を pH6.6 の培養液に暴露すると 30 秒以内をピークとする一過性の細胞内 Ca^{2+} 応答が見られたことより、pH 低下による内皮依存性弛緩反応は、 Ca^{2+} 依存性内皮型 NO 合成酵素活性化に基づくと考えられた。また、酸性 pH での血管弛緩応答は、内皮除去血管でも観察され、この応答は、電位依存性 K チャネル阻害薬 4-アミノピリジンにより完全に抑制された。さらに、ジメチルアミロライド添加による細胞内酸性化することにおいても血管弛緩反応が認められ、この弛緩反応は内皮除去や L-NAME、カルミダゾリウムによって完全に抑制されたことから、酸性 pH 暴露とは異なり、内皮のみに依存した反応であると考えられた。次に、アンジオテンシン II による AT2 受容体刺激が、血管内酸性化を誘導するかについてラット血管平滑筋細胞を用いて検討した。その結果、アンジオテンシン II により AT2 受容体刺激すると、刺激したアンジオテンシン II の濃度に依存した細胞内の酸性化が観察された。この酸性化にナトリウムプロトン輸送体が関与しているかについては不明である。

血管 AT2 受容体への刺激は、チロシンホスファターゼ活性を亢進させると報告されていることから、チロシンホスファターゼの活性化あるいは阻害が、血管収縮、弛緩応答を惹起するのかを明らかにする目的で研究を行った。まず、チロシンホスファターゼの阻害が、血管応答へどのような影響を及ぼすかチロシンホスファターゼ阻害薬オルトバナジン酸を用い検討を行った。ラット大動脈リング標本をオルトバナジン酸で刺激したところ、用量に依存した収縮反応が認められた。この収縮は NO 合成酵素阻害薬 L-NAME で増強され、Src ファミリー選択的阻害薬 PP2、あるいは Rho キナーゼ阻害薬 Y-27632 により強

く抑制された。一方、マウス大動脈はオルトバナジン酸単独による収縮反応を示さなかったが、L-NAME 存在下ではラット同様に用量依存性に収縮し、この収縮は PP2 及び Y-27632 で抑制された。フェニレフリン収縮下、オルトバナジン酸はラット大動脈を収縮させ、L-NAME 処置はそれを増強したが、逆にマウス大動脈は用量依存性の弛緩作用を示し、この弛緩反応は L-NAME により完全に抑制された。チロシンホスファターゼの選択的阻害薬 PTP inhibitor-I を用いて検討を加えたが、オルトバナジン酸と同様にラット大動脈を収縮させ、PP2 及び Y-27632 はこの収縮を完全に抑制した。次にチロシンホスファターゼの阻害がどのような機構を介し血管を収縮させるかについて検討したところ、チロシンホスファターゼの阻害は、Src/EGF 受容体/Rho/Rho キナーゼの活性化を介し、ミオシンホスファターゼの活性を抑制することで血管を収縮させていることが明らかとなった。

以上の結果より、チロシンホスファターゼの阻害は血管内皮細胞での NO 合成を刺激する一方、血管平滑筋細胞では、Src ファミリーチロシンキナーゼを活性化、それに続く Rho キナーゼの活性化を介して収縮を起こすものと考えられた。ラットとマウス大動脈でのオルトバナジン酸応答の違いは、内皮 NO 系の応答の差に基づくと考えられた。

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 5 件)

- ① Sasahara T, Yayama K, Matsuzaki T, Tsutsui M, Okamoto H. Na(+)/H(+) exchanger inhibitor induces vasorelaxation through nitric oxide production in endothelial cells via intracellular acidification-associated Ca^{2+} mobilization. *Vascul Pharmacol.* 58(4), 2013: 319-25. 査読 (有)
- ② Yayama K, Sasahara T, Funasaka A, Haramoto S, Okamoto H. Orthovanadate-induced vasoconstriction of rat aorta is mediated by the Src/EGFR/ROCK pathway. *J. Pharmacol. Sci.* 121 (1), 2013 239 査読 (無)
- ③ Yayama K, Sasahara T, Isomoto Y, Ohba H, Okamoto H. Vasodilating and Vasoconstricting Effects of Orthovanadate. *J. Pharmacol. Sci.* 118 (1) 2012, 197, 査読 (無)
- ④ Sasahara T, Yayama K, Okamoto H. Role

of NO and Kv Channels in the Aortic pH-Induced Vasorelaxation in Rat Aorta J. Pharmacol. Sci. 118 (1) 2012, 86 査読(無)

- ⑤ Andoh T, Fujimoto T, Sudo T, Fujita I, Imabori M, Moritake H, Sugimoto T, Sakuma Y, Takeuchi T, Kawabata S, Kirihata M, Akisue T, Yayama K, Kurosaka M, Miyatake S, Fukumori Y, Ichikawa H. Boron neutron capture therapy for clear cell sarcoma (CCS): biodistribution study of p-borono-L-phenylalanine in CCS-bearing animal models. Appl Radiat Isot. 69(12) 2011, 1721-4. 査読(有)

[学会発表] (計 22 件)

- ① 笹原智也、大庭久明、古賀大介、屋山勝俊、岡本博：組織酸性化による血管弛緩機構、2011年3月、日本薬学会第130年会、静岡
- ② 大庭久明、笹原智也、古賀大介、屋山勝俊、岡本博：オルトバナジン酸の血管作用、2011年3月、日本薬学会第130年会、静岡
- ③ Yayama K, Sasahara T, Ohba H, Koga D, Okamoto H : Vasodilation by the Na^+/H^+ -exchanger inhibitor. : 2011年3月、第84回日本薬理学会年会、横浜
- ④ 磯本稔匡、大庭久明、笹原智也、屋山勝俊、岡本博：オルトバナジン酸の血管作用、2011年10月、第61回日本薬学会近畿支部大会・総会、神戸
- ⑤ 小野寺章、屋山勝俊、田中敦士、諸澤瑛、久野秀太、岩崎綾香、田鍋奈美、根津菜摘、宝諸あい、福井健太郎、岡本博、米村重信、堤康央、河合裕一：生殖細胞および血管内皮細胞への非晶質ナノシリカの影響評価、2011年10月、第61回日本薬学会近畿支部大会・総会、神戸
- ⑥ Yayama K, Sasahara T, Isomoto Y, Ohba H, Okamoto H : Role of NO and Kv channels in the acidic pH-induced vasorelaxation in rat aorta.、2011年3月、第85回日本薬理学会年会、京都
- ⑦ Sasahara T, Yayama K, Okamoto H : Vasodilating and vasoconstricting effects of orthovanadate.、2011年3月、第85回日本薬理学会年会、京都
- ⑧ 笹原智也、古賀新太郎、屋山勝俊、岡本博： Na^+/H^+ 交換輸送系阻害薬の一酸化窒素依存性血管弛緩機構、2012年3月、日本薬学会第131年会、札幌
- ⑨ 屋山勝俊、笹原智也、磯本稔匡、舟坂綾佳、大庭久明、岡本博、オルトバナジ

ン酸の血管への作用、2012年3月、日本薬学会第131年会、札幌

- ⑩ 笹原智也、古賀新太郎、屋山勝俊、岡本博：細胞内酸性化による血管平滑筋の収縮機構、2012年10月、第62回日本薬学会近畿支部大会・総会、西宮
- ⑪ 古賀新太郎、笹原智也、屋山勝俊、岡本博：プロピオン酸による血管収縮機構、2012年10月、第62回日本薬学会近畿支部大会・総会、西宮
- ⑫ 舟坂綾佳、原本晋作、笹原智也、屋山勝俊、岡本博、オルトバナジン酸によるミオシン軽鎖ホスファターゼの不活性化機構：2012年10月、第62回日本薬学会近畿支部大会・総会、西宮
- ⑬ 諸澤瑛、小野寺章、屋山勝俊、田中敦士、久野秀太、岩崎綾香、田鍋奈已、根津菜摘、宝諸あい、岡本博、米村重信、堤康央、河合裕一：非晶質ナノシリカによる細胞内カルシウムイオンの動態変化、2012年10月、第62回日本薬学会近畿支部大会・総会、西宮
- ⑭ 田中敦士、小野寺章、屋山勝俊、諸澤瑛、久野秀太、岩崎綾香、田鍋奈已、根津菜摘、宝諸あい、岡本博、米村重信、堤康央、河合裕一：非晶質ナノシリカ暴露による摘出ラット胸部大動脈の弛緩作用、2012年10月、第62回日本薬学会近畿支部大会・総会、西宮
- ⑮ 諸澤瑛、小野寺章、屋山勝俊、田中敦士、久野秀太、岩崎綾香、田鍋奈已、根津菜摘、宝諸あい、岡本博、米村重信、堤康央、河合裕一：非晶質ナノシリカによる細胞内カルシウムイオンの動態変化、2012年10月、第62回日本薬学会近畿支部大会・総会、西宮
- ⑯ 田中敦士、小野寺章、屋山勝俊、諸澤瑛、久野秀太、岩崎綾香、田鍋奈已、根津菜摘、宝諸あい、岡本博、米村重信、堤康央、河合裕一：非晶質ナノシリカ暴露による摘出ラット胸部大動脈の弛緩作用、2012年10月、第62回日本薬学会近畿支部大会・総会、西宮
- ⑰ 屋山勝俊、笹原智也、舟坂綾佳、原本晋作、岡本博：オルトバナジン酸によるSrc/RGFR/ROCKを介した血管収縮機構、2013年3月、第86回日本薬理学会年会、福岡
- ⑱ 笹原智也、屋山勝俊、岡本博、松崎俊博、筒井正人： Na^+/H^+ 交換輸送系阻害薬は血管内皮細胞内の酸性化によるCa動員機構によりNO依存的に血管を弛緩させる、2013年3月、第86回日本薬理学会年会、福岡
- ⑲ 笹原智也、屋山勝俊、岡本博：高浸透圧刺激による血管収縮機構における Na^+/H^+ 交換輸送系の関与、2013年3月、

- 日本薬学会 133 年会.、横浜.
- ⑳ 屋山勝俊、原本晋作、舟坂綾佳、笹原智也、岡本 博：チロシンホスファターゼ阻害による血管収縮機構、2013 年 3 月、日本薬学会 133 年会.、横浜.
- ㉑ 古田拓也、小野寺 章、屋山勝俊、諸澤瑛、田中敦士、石井幸奈、太田舞子、本間安季、岡本 博、米村重信、堤 康央、河合裕一：非晶質ナノシリカは PI3K シグナルを介する血管弛緩を惹起する、2013 年 3 月、日本薬学会 133 年会、横浜
- ㉒ 石井幸奈、小野寺 章、屋山勝俊、諸澤瑛、本間安季、太田舞子、岡本 博、米村重信、堤 康央、河合裕一：ナノマテリアルによる細胞内遊離 Ca^{2+} の増加は細胞膜 Ca^{2+} チャンネルに依存する、2013 年 3 月日本薬学会 133 年会、横浜.

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・准教授

研究者番号：

30248108

(2) 研究分担者

岡本 博 (OKAMOTO HIROSHI)

神戸学院大学・薬学部・教授

研究者番号：

00028870