

平成 26 年 6 月 21 日現在

機関番号：22701

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2013

課題番号：24890189

研究課題名(和文) 動脈硬化促進因子受容体への結合蛋白に着目した動脈硬化抑制療法の検討

研究課題名(英文) Therapeutic potential of LDL apheresis including activation of receptor-interacting molecule in the management of peripheral artery disease

研究代表者

池谷 裕子 (IKEYA, Yuko)

横浜市立大学・附属病院・指導診療医

研究者番号：60453049

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円、(間接経費) 720,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、動脈硬化を増悪させる1型アンジオテンシンII(Ang II)受容体(AT1受容体)に結合する低分子蛋白(AT1 receptor-associated protein; ATRAP)に焦点を当て、分子生物学的・発生源工学的手法によるATRAP発現制御細胞・動物を用いたATRAPによる動脈硬化の改善効果の分子機序について解析するとともに、重症動脈硬化症に対するLDLアフェレシス療法による長期的動脈硬化改善の分子機序へのATRAPの関与についての解析も行い、組織・細胞でのATRAP制御を介した、重症動脈硬化性疾患に対する新規分子標的治療法開発の可能性について検討した。

研究成果の概要(英文)：Cardiovascular disease (CVD) is a major cause of death in patients with chronic kidney disease (CKD). Patients with CKD are reported to have a significant greater risk of CVD-associated mortality than that of the general population. Low-density lipoprotein (LDL) apheresis is a potentially valuable treatment applied to conventional therapy-resistant hypercholesterolemic patients with coronary artery disease and peripheral artery disease (PAD). Although previous and recent studies have suggested that LDL apheresis exerts beneficial effects on the peripheral circulation in dialysis patients suffering from PAD, probably through a reduction of not only serum lipids but also of inflammatory or coagulatory factors and oxidative stress, the precise molecular mechanisms underlying the long-term effects of LDL apheresis on the improvement of the peripheral circulation remains unclear and warrants further investigation, including a possible role of Ang II receptor-interacting molecule, ATRAP.

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：シグナル伝達 脂質 循環器・高血圧 生体分子 トランスレーショナルリサーチ

### 1. 研究開始当初の背景

最近では種々の病的刺激に対する生体の反応における内在性の要因によって組織局所での酸化ストレスの増加や炎症反応の亢進が引き起こされ動脈硬化などの生活習慣病が発症する機序が注目されている。中でも LDL コレステロール、特に酸化 LDL は血管壁のマクロフォージに貪食され、動脈硬化初期の反応として NLRP3 (NALP3 or cryopyrin) inflammasomes を直接活性化して血管壁の免疫・炎症反応、酸化ストレス産生を促進し、動脈硬化病変を引き起こす (Düvel P, et al. Nature 464: 1357-1361, 2010; Rajamaki K, et al. PLoS One 5: e11765, 2010; Freigang S, et al. Eur J Immunol 41: 2040-2051, 2011)。そして、R-A 系は「血管壁局所における AT1 受容体系の過剰活性化」によって、血管壁細胞・組織の免疫・炎症反応、酸化ストレス産生を促進し、LDL コレステロール、特に酸化 LDL などとともに、動脈硬化の病態を増悪させる (Ferder L, et al. Curr Hypertens Rep 8: 191-198, 2006)、例えば AT1 受容体欠損マウスでは野生型マウスに比べて長寿化が認められ、AT1 受容体系抑制による組織での免疫・炎症反応や酸化ストレス・老化の抑制がこの長寿化に関与している可能性が報告されている (Benigni A, et al. J Clin Invest 119: 524-530, 2009)。しかしこれらの詳細な分子機序については未だ解明されていない。

### 2. 研究の目的

本研究課題では、動脈硬化を増悪させる 1 型アンジオテンシン II (Ang II) 受容体 (AT1 受容体) に結合する低分子蛋白 (AT1 receptor-associated protein; ATRAP) に焦点を当て、分子生物学的・発生工学的的手法による ATRAP 発現制御細胞・動物を用いた ATRAP による動脈硬化の改善効果の分子機序について解析するとともに、重症動脈硬化症に対する LDL アフェレンス療法による長期的動脈硬化改善の分子機序への ATRAP の関与についての解析も行い、組織・細胞での ATRAP 制御を介した、重症動脈硬化性疾患に対する新規分子標的治療法開発の可能性について検討する。

組織局所でのレニン-アンジオテンシン系 (R-A 系) の AT1 受容体系の過剰活性化は動脈硬化性疾患の発症・進展に深く関与している。したがって、動脈硬化性疾患の発症・進展において、Ang II=動脈硬化増悪因子、AT1 受容体=動脈硬化増悪因子受容体として捉えることができる。一方 AT1 受容体に直接結合する低分子蛋白 (AT1 receptor-associated protein; ATRAP) は、細胞や組織表面に存在する AT1 受容体の細胞内取り込み (internalization) を持続的に促進し、AT1 受容体情報伝達系に対して抑制的に作用し

動脈硬化性疾患を改善できる可能性がある (図 1)。また、本年 4 月には維持血液透析施行中の慢性腎不全に合併した従来治療抵抗性閉塞性動脈硬化症に対する、高コレステロール血症に限定せず LDL アフェレンス療法を施行する治療法が横浜市立大学附属病院における高度先進医療として認められたが (図 2)、本治療法による長期的な動脈硬化改善の分子機序に血管壁や血球系細胞での ATRAP 活性化が関与している可能性がある。そこで、本研究では、動脈硬化と ATRAP の発現・活性制御との関連について多面的に検討し、ATRAP の動脈硬化における病態生理学的意義の解明、および ATRAP に着目した新規分子標的治療法の開発に向けた検討を行う。

### 3. 研究の方法

本研究では、研究協力者の横浜市立大学医学部・附属病院教員 2 名および横浜市立大学医学研究科大学院生 1 名による協力のもと、『AT1 受容体情報伝達系の病的刺激による過剰活性化に対する内在性抑制機序を担う受容体結合分子』として機能している可能性がある ATRAP に着目して、以下の検討を行う。(1) 発生工学的的手法を用いた全身性・血管特異的 ATRAP 過剰発現モデルおよび ATRAP 欠損モデルでの動脈硬化の病態の検討、(2) 重症動脈硬化症に対する LDL アフェレンス療法による長期的動脈硬化改善の分子機序への ATRAP の関与についての検討、が主な研究計画である。

まず、本研究の 1 年目は、研究分担者の田村、金岡とともに、(1) 発生工学的的手法を用いた全身性・血管特異的 ATRAP 過剰発現モデルおよび ATRAP 欠損モデルでの動脈硬化病態の検討を行った。

gain-of-function strategy として、作製済みの全身性 ATRAP 高発現マウス、および現在作成中の血管平滑筋特異的 ATRAP 高発現マウスを用いた。また、loss-of-function strategy として、gene targeting 法を用いて ATRAP の機能上重要なエクソン 3, 4, 5 を欠失させることにより作製済みの全身性 ATRAP 欠損マウスを用いる。これら発生工学的 ATRAP 発現制御マウスを用いて、圧負荷、Ang II 負荷、高食塩食負荷、高脂肪食負荷、カフによる血管障害負荷などの病的刺激を加え、動脈硬化性病変の発症・進展に与える影響について検討した。研究の結果では、ATRAP 高発現および欠損マウスともに、定常状態では野生型マウスとの間に血圧や腎機能等特に異常を認めないが、病的刺激下においては動脈硬化性疾患の発症に関して興味深い知見が得られた。例えば、ATRAP 高発現血管平滑筋細胞での Ang II 刺激による酸化ストレス産生や増殖反応の抑制、あるいは全身性 ATRAP 高発現マウスでの Ang II 刺激による血管壁酸化ストレス産生や血管壁肥厚の抑制などである。

本研究の2年目は、(2) 重症動脈硬化症に対する LDL アフェレシス療法による長期的動脈硬化改善の分子機序への ATRAP の関与についての検討を開始した。この項目の研究では、対象を維持血液透析中の従来治療抵抗性閉塞性動脈硬化症患者に限定した上で、デキストラン硫酸カラムを用いた LDL アフェレシスによる内皮細胞活性化療法を以下の条件をすべて満たす場合に、説明と患者の文書同意取得後に施行する。満たすべき条件;1.年齢 20 歳以上 80 歳未満の者、2.Fontaine 分類 II 度以上の症状を呈する者、3.膝窩動脈以下の閉塞 又は広範な閉塞部位を有する等外科的治療が困難で、かつ従来の薬物療法では十分な効果を得られない者。なお、当該療法の実施回数は、一連につき 3 ヶ月間に限って 10 回を限度として行う (初回施行時のみ要入院治療)。そして、LDL アフェレシスの長期的な治療効果について血管機能を中心に解析を開始するとともに、患者白血球での遺伝子発現解析や in vitro の培養細胞レベルでの検討も着手した。

1) 治療前後での患者血液中の白血球での遺伝子発現解析と ATRAP 発現:酸化ストレス関連因子 (p22-phox, NOX1, Rac 1 など)R-A 系構成要素(レニン, アンジオテンシノーゲンなど), AT1 受容体とその結合因子 ATRAP の mRNA 発現レベルについて, LDL アフェレシス初回の前後, 10 回 目の前, 及び LDL アフェレシス治療終了 3 カ月経過時点の計 4 回, real-time RT-PCR 法による測定をおこなう。

2) 治療前後での患者血清による培養ヒト血管系細胞の機能解析と ATRAP 発現:市販されているヒト血管系細胞に対して LDL アフェレシスの施行前後の患者血清を添加して, 酸化ストレス関連因子 (p22-phox, NOX1, Rac 1 など), R-A 系構成要素(レニン, アンジオテンシノーゲンなど), Ang II 受容体とその結合因子 ATRAP, 成長因子(TGF- $\beta$ , FGF)発現量, 細胞外基質 (fibronectin, collagen) 発現量, および炎症反応物質 (IL-6, TNF- $\alpha$ , CRP) 産生能, 血管新生因子 (VEGF) 産生能, 細胞増殖能の解析を開始した。これらの研究結果結果では, LDL アフェレシスによるヒト血管内皮細胞活性化の分子機序や閉塞性動脈硬化症改善におけるヒト血管内皮細胞活性化の重要性について明らかにした。

3) ATRAP 制御が患者血清培養下の培養ヒト血管系細胞の機能に与える影響についての検討では, ATRAP 高発現用アデノベクター, ATRAP 発現抑制用 siRNA を用いて, LDL アフェレシス治療前後のヒト血管系培養細胞の細胞機能や動脈硬化性変化が細胞内での ATRAP 発現制御によってどのような影響を受けるかについて検討した。

#### 4. 研究成果

組織局所でのレニン-アンジオテンシン系

(R-A 系)の AT1 受容体系の過剰活性化は動脈硬化性疾患の発症・進展に深く関与しており, 動脈硬化性疾患の発症・進展において, Ang II=動脈硬化増悪因子, AT1 受容体=動脈硬化増悪因子受容体として捉えることができる。研究代表者らは, これまでに AT1 受容体に直接結合する低分子蛋白(AT1

receptor-associated protein; ATRAP)は, 細胞や組織表面に存在する AT1 受容体の細胞内取り込み(internalization)を持続的に促進し, AT1 受容体情報伝達系に対して抑制的に作用し動脈硬化性疾患を改善できる可能性を明らかにした。その結果を受けて, 国内外の学会および国内外の学術雑誌に研究成果を発表している。組織局所でのレニン-アンジオテンシン系(R-A 系)の AT1 受容体系の過剰活性化は動脈硬化性疾患の発症・進展に深く関与している。

2012 年度は, 本研究において, 動脈硬化を増悪させる 1 型アンジオテンシン II (Ang II) 受容体(AT1 受容体)に結合する低分子蛋白(AT1 receptor-associated protein; ATRAP)に焦点を当てて, 分子生物学的・発生工学的的手法による ATRAP 発現制御細胞・動物を用いての ATRAP による動脈硬化の改善効果の分子機序について解析するとともに, 重症動脈硬化症に対する LDL アフェレシス療法による長期的動脈硬化改善の分子機序への ATRAP の関与についての解析も行い, 組織・細胞での ATRAP 制御を介した, 重症動脈硬化性疾患に対する新規分子標的治療法開発の可能性について検討した。1) 発生工学的的手法を用いた全身性・血管特異的 ATRAP 過剰発現モデルおよび ATRAP 欠損モデルでの動脈硬化病態の検討では, 発生工学的 ATRAP 発現制御マウスを用いて, 圧負荷, Ang II 負荷, 高食塩食負荷, 高脂肪食負荷, カフによる血管障害負荷などの病的刺激を加え, 動脈硬化性病変の発症・進展に与える影響について検討した。

2013 年度は, 2) 重症動脈硬化症に対する LDL アフェレシス療法による長期的動脈硬化改善の分子機序への ATRAP の関与についての検討を中心として研究を展開した。LDL アフェレシスの対象を維持血液透析中の従来治療抵抗性閉塞性動脈硬化症患者に限定した上で, デキストラン硫酸カラムを用いた LDL アフェレシスによる内皮細胞活性化療法を以下の条件をすべて満たす場合に, 説明と患者の文書同意取得後に施行した。そして, LDL アフェレシスの長期的な治療効果について血管機能を解析するとともに, 患者白血球での遺伝子発現解析や in vitro の培養細胞レベルでの検討を行い, 新規知見を報告した。

心血管系組織や腎組織における「AT1 受容体機能活性化に対する内在性抑制機構」としては, 従来からは AT2 受容体や ACE2, Ang-(1-7), mas 受容体が挙げられるが, AT1

受容体への直接結合因子として、同受容体の C 末端に特異的に結合する低分子蛋白 ATRAP が単離・同定された(Daviet L, et al. J Biol Chem 274: 17058-17062, 1999; Cui T, et al. Biochem Biophys Res Commun 279: 938-941, 2000; Lopez-Illasaca M, et al. Mol Biol Cell 14: 5038-5050, 2003). 申請者らは、ATRAP が AT1 受容体と同様に、腎、心、血管などの組織に分布していることや、細胞や組織表面に存在する AT1 受容体の細胞内取り込み(internalization)を持続的に促進し、病的な AT1 受容体情報伝達系活性化を抑制することを明らかにした。また、研究代表者は、LDL アフェレシス療法が維持血液透析中の従来治療抵抗性閉塞性動脈硬化症患者において安全で良好な長期的治療効果(歩行距離、ABI の改善)をもたらすこと、および、LDL アフェレシス療法の長期的治療効果(歩行距離、ABI の改善)が療法開始時の血中総コレステロール値や LDL コレステロール値に依存せず、酸化ストレス抑制作用、血液凝固因子・炎症因子除去作用による内皮特異的 NO 合成酵素機能改善を介した血管内皮細胞機能活性化機序によりもたらされることを明らかにした。

本研究は、動脈硬化に対する、動脈硬化増悪因子受容体への直接結合性機能制御因子(ATRAP)を足がかりとした病態解明および新規治療開発を目指した研究である。予備的研究結果においては、ATRAP には AT1 受容体 internalization を促進することにより、定常状態の同受容体情報伝達系活性化には影響を与えず病的刺激による AT1 受容体系情報伝達系の過剰活性化を抑制する作用が認められている。したがって、ATRAP は『AT1 受容体情報伝達系の病的刺激による過剰活性化に対する内在性抑制機序を担う受容体結合分子』である可能性がある(Tamura K, Tsurumi Y, et al. Curr Hypertens Rep 9: 121-127, 2007; Mogi M, et al. Arterioscler Thromb Vasc Biol 27: 2532-2539, 2007; Aplin M, et al. Trends Cardiovasc Med 18: 305-312, 2008; Aplin M, et al. J Mol Cell Cardiol 46: 15-24, 2009; Zhang Z, Dzau VJ. Hypertension 55: 1086-1087, 2010)。

本研究は動脈硬化増悪因子受容体への直接結合分子による受容体活性制御機能に着目した独創性の高い研究であり、本研究の研究成果により、動脈硬化における ATRAP の発現・活性制御と病態生理学的意義が詳細に明らかになると考えられる。また、ATRAP 発現制御マウスは、動脈硬化の新たな病態モデル動物として今後の動脈硬化の病態生理の解析や新薬開発の研究に有用であると期待される。さらに、本研究成果が、受容体直接結合性機能制御因子 ATRAP を創薬標的とした、動脈硬化に対する新規分子治療薬開発に結びつく可能性がある。

## 5. 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計 10 件)

Ohsawa M, Tamura K, Wakui H, Maeda A, Dejima T, Kanaoka T, Azushima K, Uneda K, Tsurumi-Ikeya Y, Kobayashi R, Matsuda M, Uchida S, Toya Y, Kobori H, Nishiyama A, Yamashita A, Ishikawa Y, Umemura S. Genetic deletion of the angiotensin II type 1 receptor-associated protein enhances renal sodium reabsorption and exacerbates angiotensin II-mediated hypertension. *Kidney Int*, in press. 査読有

DOI: 10.1038/ki.2014.95.

Maeda A, Tamura K, Wakui H, Ohsawa M, Azushima K, Uneda K, Kanaoka T, Kobayashi R, Ohki K, Matsuda M, Tsurumi-Ikeya Y, Yamashita A, Tokita Y, Umemura S. Effects of the angiotensin receptor blocker olmesartan on adipocyte hypertrophy and function in mice with metabolic disorders. *BioMed Res Int*, in press. 査読有

DOI: 10.1155/2014/946492

Matsuda M, Tamura K, Wakui H, Maeda A, Ohsawa M, Kanaoka T, Azushima K, Uneda K, Haku S, Tsurumi-Ikeya Y, Toya Y, Maeshima Y, Yamashita A, Umemura S. Upstream stimulatory factors 1 and 2 mediate the transcription of angiotensin II binding and inhibitory protein. *J Biol Chem*, 288: 19238-19249, 2013. 査読有

DOI: 10.1074/jbc.M113.451054

Tamura K, Ohsawa M, Kanaoka T, Maeda A, Azushima K, Uneda K, Wakui H, Azuma K, Tsurumi-Ikeya Y, Umemura S. What can we expect from the binding characteristics of azilsartan, a newly available angiotensin II blocker, in hypertension? *Hypertens Res*, 36: 107-108, 2013. 査読有

DOI: 10.1038/hr.2012.166.

Tamura K, Tsurumi-Ikeya Y, Wakui H, Maeda A, Ohsawa M, Azushima K, Kanaoka T, Uneda K, Haku S, Azuma K, Mitsunashi H, Tamura N, Toya Y, Tokita Y, Kokuho T, Umemura S. Therapeutic potential of low-density lipoprotein apheresis in the management of peripheral artery disease in patients with chronic kidney disease. *Ther Apher Dial*, 17: 185-192, 2013. 査読有

DOI:

10.1111/j.1744-9987.2012.01149.x.

Wakui H, Tamura K, Masuda S, Tsurumi-Ikeya Y, Fujita M, Maeda A, Ohsawa M, Azushima K, Uneda K, Matsuda M, Kitamura K, Uchida S, Toya Y, Kobori

H, Nagahama K, Yamashita A, Umemura S. Enhanced Ang receptor-associated protein in renal tubule suppresses Ang-dependent hypertension. Hypertension, 61: 1203-1210, 2013. 査読有  
DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.00572.  
Tamura K, Wakui H, Maeda A, Dejima T, Ohsawa M, Azushima K, Kanaoka T, Haku S, Uneda K, Masuda S, Azuma K, Shigenaga A, Koide Y, Tsurumi-Ikeya Y, Matsuda M, Toya Y, Tokita Y, Yamashita A, Umemura S. The physiology and pathophysiology of a novel angiotensin receptor-binding protein ATRAP/Agtrap. Curr Pharm Des, 19: 3043-3048, 2013. 査読有  
DOI: 10.2174/1381612811319170010  
Ohsawa M, Tamura K, Kanaoka T, Wakui H, Maeda A, Dejima T, Azushima K, Uneda K, Kobayashi R, Tsurumi-Ikeya Y, Toya Y, Fujikawa T, Umemura S. Addition of aliskiren to Angiotensin receptor blocker improves ambulatory blood pressure profile and cardiorenal function better than addition of benazepril in chronic kidney disease. Int J Mol Sci, 14: 15361-15375, 2013. 査読有  
DOI: 10.3390/ijms140815361.  
Kanaoka T, Tamura K, Wakui H, Ohsawa M, Azushima K, Uneda K, Kobayashi R, Fujikawa T, Tsurumi-Ikeya Y, Maeda A, Yanagi M, Toya Y, Umemura S. L/N-type calcium channel blocker cilnidipine added to renin-angiotensin inhibition improves ambulatory blood pressure profile and suppresses cardiac hypertrophy in hypertension with chronic kidney disease. Int J Mol Sci, 14: 16866-16881, 2013. 査読有  
DOI: 10.3390/ijms140816866.  
Tamura K, Maeda A, Uneda K, Wakui H, Dejima T, Mitsuhashi H, Yamaguchi S, Tsurumi-Ikeya Y, Tokita Y, Umemura S. An increase in perfusion pressure and activation of the renin-angiotensin system in the pathogenesis of hypertension and injury: strain vessels and the cerebrovascular-renal connection. Hypertens Res, 35: 972-974, 2012. 査読有  
DOI: 10.1038/hr.2012.108.

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等:

<http://www.yokohama-medicine.org>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

池谷 裕子 (IKEYA, Yuko)

横浜市立大学・附属病院・指導診療医

研究者番号: 60453049

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号:

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号: