

学 位 論 文 の 要 約
(研 究 成 果 の ま と め)

氏 名 莖田 昌敬

学位論文名 アンジオテンシン II 2 型受容体 (AT₂) 刺激は一部 ATIP を介した
PPAR γ の活性化により血管リモデリングを抑制する

学位論文の要約

Angiotensin II type 2 受容体(AT₂)受容体と AT₂受容体の細胞内 C 末端に特異的に結合する AT₂ receptor-interacting protein (ATIP)は血管リモデリングにおいて保護的に働く因子として重要なものである。また近年, 経口投与可能な AT₂受容体直接刺激薬である compound 21 (C21)が開発され, 臨床治験が始まった。最近, 我々は C21 による直接的 AT₂受容体刺激は PPAR γ 活性化を一部介して 2 型糖尿病マウスのインスリン抵抗性を改善する可能性について報告した。そこで今回我々は AT₂受容体直接刺激や ATIP が血管リモデリングを改善する可能性, さらにはそれらのメカニズムについて検討をおこなった。

はじめに 10 週齢の雄性野生型 C57BL/6J(WT)マウスを用いた血管障害モデルを作製し *in vivo* の実験を行った。血管障害モデルはマウスの大腿動脈にポリエチレンカフを留置して作製し, 以下の 4 群に分類した。1) Control 群, 2) C21 (10 μ g/kg/day)投与群, 3) C21+GW9662 投与群, 4) GW9662 投与群。カフ留置 2 週後にエラスチカ・ワンギーソン染色により新生内膜を評価し, カフ留置 1 週後に Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA)免疫染色により細胞増殖を, リアルタイム PCR 法により mRNA 発現量をそれぞれ評価した。結果, C21 投与群では血压の変化を認めず, Control 群と比べてカフ留置側の新生内膜面積は減少を認め, MCP-1, TNF- α および IL-1 β の炎症性サイトカインの mRNA 発現の増加は減弱させた。これらの効果は GW9662 併用群では減弱していた。いずれの群においても, カフ留置側では非留置側に比べ AT₂受容体の mRNA の発現が増加していた。また同サンプルから核抽出液を採取し, PPAR γ DNA-binding 活性を測定したところ, C21 投与により PPAR γ DNA-binding 活性は増加し, GW9662 併用投与によりこの効果は減弱した。

次に、AT₂受容体が平滑筋細胞（VSMC）に特異的に過剰発現している8週齢の雄性 smAT₂ トランスジェニックマウス（smAT₂-TG）より VSMC を採取し、*in vitro* での検討を行った。C21 を投与し24時間後の dual-luciferase reporter assay で PPAR γ の活性化を検討した。またゲルシフトアッセイ(EMSA)を用いて C21 投与による PPAR γ DNA binding 活性を検討し、更に PPAR γ を活性化する因子についても検討した。VSMC から抽出した蛋白を細胞膜、細胞質、核内成分に分離し Western Blot で検討した。また VSMC から mRNA を抽出し RT-PCR 法にて解析した。結果、smAT₂TG-VSMC を用いた dual-luciferase assay では C21 刺激後に PPAR γ の活性化を認めた。EMSA の検討から PPAR γ DNA binding 活性は C21 投与15分後には上昇し4時間後まで維持された。C21 刺激後の各抽出液と特異的抗体を用いた EMSA の検討から PPAR γ を活性化するコンプレックスの一部に retinoid X receptor (RXR) α , p300 の他、AT₂ receptor-interacting protein(ATIP)が含まれると考えられた。さらに smAT₂TG-VSMC を ATIP-siRNA で処理すると C21 投与による PPAR γ 活性化は減弱した。C21 投与により ATIP の mRNA 発現、蛋白発現量はそれぞれ3時間、6時間をピークとして増加した。また、元々細胞膜上に多く存在する ATIP が、C21 投与後に核内にトランスロケーションされる可能性も示唆された。

最後に ATIP 過剰発現マウス（ATIP-TG）を用いてマウスの大腿動脈にポリエチレンカフを留置して血管障害モデルを作製したところ、ATIP-TG マウスは WT（C57B/L6）マウスと比較して新生内膜面積は減少を認めた。この新生内膜面積の減少は C21 投与によりさらに減少したが、この効果は GW9662 の同時投与により著明に抑制された。また ATIP-TG の GW9662 単独投与群においても無治療群の ATIP-TG に比べて著明な新生内膜の形成が認められた。

以上から、我々は AT₂ 受容体の刺激が一部 PPAR γ の活性化を介して血管保護的に作用し、AT₂ 受容体の刺激による PPAR γ の活性化において ATIP が重要な役割を担っている可能性があることが示唆された。なお、この学位論文の内容は、以下の原著論文に既に採択済である。

主論文：Masayoshi Kukida, Masaki Mogi, Kousei Ohshima, Hirotomo Nakaoka, Jun Iwanami, Harumi Kanno, Kana Tsukuda, Toshiyuki Chisaka, Li-Juan Min, Xiao-Li Wang, Hui-Yu Bai, Bao-Shuai Shan, Akinori Higaki, Toshifumi Yamauchi, Takafumi Okura, Jitsuo Higaki, Masatsugu Horiuchi : Angiotensin II Type 2 Receptor Inhibits Vascular Intima Proliferation with Activation of PPAR γ American Journal of Hypertension. 29(6):727-36, 2016 DOI: 10.1093/ajh/hpv168.