

(第7号様式)

## 学位論文審査結果の要旨

氏名	莖田 昌敬
審査委員	主査 望月 輝一 副査 今村 健志 副査 伊賀瀬 道也 副査 青戸 守 副査 菊川 忠彦

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 $\gamma$  の活性化により血管リモデリングを抑制する

### 審査結果の要旨

#### 【背景】

Antiotensin 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。近年、AT2 受容体直接刺激薬である compound 21 (C21)が開発され、臨床治験が行われている。申請者らは先行研究で C21 による AT2 受容体刺激は一部 PPAR $\gamma$  活性化を介して 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を報告した。

#### 【目的】

本研究では AT2 受容体刺激や ATIP が血管リモデリングを改善する可能性とメカニズムについて検討を行う。

#### 【方法と結果】

まず 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* 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、4 群に分類した。1) Control 群、2) C21 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の評価を、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、またリアルタイム PCR 法により mRNA 発現量を評価した。結果、C21 投与群では血圧の変化を認めず、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- $\alpha$  および IL-1 $\beta$  の炎症性サイトカインの mRNA 発現の増加は減弱させた。この効果は GW9662 併用群で減弱していた。

次に、AT2 受容体が平滑筋細胞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) より平滑筋細胞を採取し、*in vitro* での検討を行った。C21 投与 24 時間後の reporter assay で PPAR $\gamma$  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 $\gamma$  DNA binding 活性を検討し、更に PPAR $\gamma$  を活性化する因子についても検討を行った。平滑筋細胞から抽出した蛋白を細胞膜、細胞質、核内成分に分画し Western Blot を行った。また平滑筋細胞から mRNA を抽出し RT-PCR 法にて解析した。結果、smAT2TG-VSMC を用いた reporter assay では C21 刺激後に PPAR $\gamma$  の活性化を認めた。EMSA の検討から PPAR $\gamma$  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 $\gamma$  を活性化するコンプレックスの一部に retinoid X receptor (RXR) $\alpha$ 、p300 の他、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 $\gamma$  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) を用いた血管障害モデルでは 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。この新生内膜面積は C21 投与で減少した。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。

#### 【結論】

以上から、申請者は AT2 受容体の刺激が一部 PPAR $\gamma$  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 $\gamma$  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明らかにした。

本学位審査は平成 29 年 1 月 23 日に開催され、申請者は、AT2 受容体刺激は一部 ATIP を介した PPAR $\gamma$  の活性化により血管リモデリングを抑制することを明らかにした。申請者は審査員からの以下の質問 ①PPAR $\gamma$  の DNA 結合力と複合体の転写活性について、②カフモデルの炎症ピークのタイミングについて、③C21 の抗炎症作用の臨床応用の可能性、④AT2 受容体の ATIP の抗がん作用、⑤PPAR $\gamma$  のオートレグレーション、等に対して明快に答えた。

申請者のレニン・アンジオテンシン系およびアンジオテンシン II 2 型受容体の関連事項における深い見識があることを示し、審査員は全員一致で本研究が学位 (医学) に値すると判定した。