

Title	新規GPCRリガンドapelinの生理機能に関する分子薬理学的研究
Author(s)	笠井, 淳司
Citation	大阪大学, 2007, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/47255
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名	かさ い あつ し 笠 井 淳 司
博士の専攻分野の名称	博 士 (薬 学)
学位記番号	第 21099 号
学位授与年月日	平成 19 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 薬学研究科応用医療薬科学専攻
学位論文名	新規 GPCR リガンド apelin の生理機能に関する分子薬理学的研究
論文審査委員	(主査) 教授 馬場 明道 (副査) 教授 八木 清仁 教授 松田 敏夫 教授 東 純一

論 文 内 容 の 要 旨

ヒトゲノム計画によりおおよそ 720 種類の G 蛋白共役型受容体 (G protein-coupled receptor, GPCR) 様配列をコードした cDNA が同定された。それらのうち内因性リガンドが同定されていない GPCR、つまりオーファン受容体は、その内因性リガンドが同定され、受容体・リガンドの組み合わせが明らかになって初めて生理作用が解明されていく。また、既存の疾病治療薬の約半数が GPCR を作用標的としていることから、オーファン受容体とそのリガンド研究は、生命現象の理解のみならず、新規創薬ターゲットの探索を行う上でも重要であると考えられる。

ヒトゲノムから同定されたオーファン受容体 APJ は、肺、心臓、胎盤、脊髄などいくつかの組織に発現していることが確認されている。Apelin は APJ の内因性リガンドとして同定された 13 アミノ酸残基のペプチドであり、そのアミノ酸配列はヒト、マウス間において 100% の保存が認められる。Apelin も肺、心臓、胎盤、脊髄、脳など一部 APJ の発現部位とオーバーラップした発現が認められるものの、本シグナル系に対する特異的作用薬 (作動薬・拮抗薬) の開発がまだであることから、内因性 apelin の役割は未だほとんど明らかになっていない。そこで本研究では、内因性 apelin の生理学的意義を分子レベルで明らかにする目的で、1) 新規に作製された apelin 遺伝子欠損マウス (apelin-KO) の表現型解析、2) apelin の *in vitro* 血管新生様作用に関連した解析、3) apelin-KO を用いた *in vivo* 肥満病態モデルにおける解析、4) 生後早期の網膜血管形成に関する apelin-KO を用いた解析を行った。

1) 遺伝子改変マウスの網羅的スクリーニングシステムである SHIRPA プロトコルを用いて新規に作成された apelin-KO の表現型解析から、apelin-APJ の生理的役割を解明しようと試みた結果、apelin-KO は野生型マウスに比べて、①不安レベルの若干の増加、②侵害受容応答の亢進、③ヒト先天性眼疾患である第一次硝子体過形成遺残 (persistent hyperplastic primary vitreous, PHPV) と類似した片眼性白濁異常を高頻度に発症するという 3 つの表現型変化が明らかとなり、内因性 apelin がこれらの機能発現に関与している可能性を見出した。

2) マウス網膜血管形成期に APJ が血管内皮細胞に発現し、apelin は伸展する網膜血管の先端にある血管内皮細胞で発現誘導されること、および APJ 強制発現細胞に対して、細胞遊走作用、細胞増殖作用を有することが報告されており、apelin-APJ シグナルの血管新生への関与が示唆されている。そこで *in vitro* における apelin の血管新生への関与を解明すべく、アカゲザル脈絡膜網膜由来細胞株 RF/6A を用いて、*in vitro* 実験系における血管新生の指標となる細胞走化性、細胞増殖、管腔形成に対する apelin の作用を解析した。その結果、apelin が RF/6A 細胞に対して、細胞走化性、細胞増殖、管腔形成作用を有することを示し、血管新生に関与する可能性が明らかとなった。

3) ごく最近、脂肪細胞の分化過程において **apelin** が発現誘導されること、ヒト肥満患者の脂肪細胞、および高脂肪食マウスでの脂肪細胞での **apelin** 発現が上昇することが報告された。そのため、内因性 **apelin** の肥満病態における役割を明らかにする目的で、**apelin** 欠損の肥満モデルマウスを作製し、その表現型を解析した。その結果、**apelin** 欠損による肥満病態に変化は認められなかった。一方、脂肪組織における **apelin**、**APJ** の mRNA 発現解析では **apelin**、**APJ** は共に脂肪組織内の血管内皮細胞において高い発現が見られた。このことから、少なくとも肥満に関連する糖尿病病態の発現については **apelin-APJ** シグナルの寄与は極めて少ないことが考えられる。また、**APJ** の発現が脂肪組織内でも血管内皮細胞に強く発現していることから、**apelin-APJ** シグナルの標的が脂肪組織内の血管内皮細胞であることが考えられる。

4) **Apelin-KO** の表現型が類似している **PHPV** は、未だ原因不明の硝子体動脈遺残と片眼性異常を特徴とするヒト先天性眼疾患である。最近、網膜血管形成不全により発生した網膜先端部分の虚血領域に対して本来消失してしまう硝子体動脈が伸展し、遺残する可能性を示唆しており、網膜血管形成不全と **PHPV** の関わりが注目されている。一方、上述した様に、網膜血管形成時における **apelin-APJ** の発現から、網膜血管形成に関わる可能性がある。そこで、**apelin-KO** の個体レベルでの網膜血管形成について解析を行った結果、①生後 15 日齢 (P15) までの網膜血管形成期において、**apelin**、**APJ** が網膜において一過性に発現上昇してくること、②**apelin-KO** では網膜表面血管の伸展が、同腹の野生型に比べて遅延していること、③P5 網膜における各種血管新生因子 (VEGF や FGF2) やその受容体の発現量、血管形成の足場となる astrocyte の分布/形態には顕著な変化を認めないこと、④*in vivo* 角膜ポケット法において、**apelin-KO** では VEGF や FGF2 誘発の血管新生が野生型に比べて著明に減弱していること、⑤**apelin** は単独では血管新生を示さないが、低用量の FGF2 の血管新生作用を増強させることを明らかにした。これらのことから、生後早期の網膜血管形成に対して、**apelin** は発現誘導され、VEGF や FGF2 などの血管新生因子の作用を増強させることで網膜血管形成に対して、促進的に働くことを示唆した。

以上の結果から、内因性 **apelin** が不安関連行動、侵害受容応答に関与する可能性を示した他、特に生後早期の網膜血管形成に重要な因子であることが明らかとなった。また、**apelin-KO** の網膜形成遅延が **PHPV** のリスクファクターとなる可能性も示唆された。

論文審査の結果の要旨

オーファン GPCR のひとつである **APJ** とその内因性リガンドの **apelin** シグナル系の機能は殆ど解明されていない。

本研究は **apelin/APJ** シグナル系の生理病態機能を分子薬理的に追求することを目的に、新規に作製された **apelin** 遺伝子欠損マウス (**apelin-KO**) の表現型解析、**apelin** の *in vitro* 血管新生作用に関連した解析、**apelin-KO** を用いた *in vivo* 肥満病態モデルにおける解析、及び、生後早期の網膜血管形成に関する **apelin-KO** を用いた解析を行った。

その結果、**apelin-KO** マウスの生後早期の網膜血管網の発達遅延と白濁眼を中心とする片眼性の異常眼の特徴的な表現型を見出した。更に、その分子基盤として **apelin-KO** では VEGF、FGF の血管新生作用が減弱することを明らかにした。これらの知見から **apelin** が既知の血管新生因子と協働して、血管病態に関与する因子であることを初めて明らかにした、この成果は学術的意義も高く、博士 (薬学) の学位授与に充分値するものである。