The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	The counterregulating role of ACE2 and ACE2-mediated angiotensin 1-7 signaling against angiotensin II stimulation in vascular cells
Author(s)	林, 則宏
Citation	大阪大学, 2010, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/58201
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

【25】

氏　　名	林（はやし）　則（のり）　宏（ひろ）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学　位　記　番　号	第　２４２４６　号
学位授与年月日	平成22年10月27日
学位授与の要件	学位規則第４条第１項該当 医学系研究科内科系臨床医学専攻
学　位　論　文　名	The counterregulating role of ACE2 and ACE2-mediated angiotensin 1-7 signaling against angiotensin II stimulation in vascular cells （アンジオテンシンIIによって刺激された血管平滑筋細胞、内皮細胞におけるアンジオテンシン変換酵素２－アンジオテンシン(1-7)系について）
論　文　審　査　委　員	（主査） 教　授　楽木　宏実 （副査） 教　授　下村伊一郎　　教　授　祖父江憲治

論　文　内　容　の　要　旨

〔　目　　的　〕

レニン-アンジオテンシン系（RAS）はアンジオテンシンII（ANG II）を生理活性物質としてアンジオテンシンIIタイプ１受容体（AT1）を介して動脈硬化形成に重要な役割を果たしていることが数多くの研究で証明されている。近年同定されたアンジオテンシン変換酵素２（ACE2）は、ANG IIを分解しアンジオテンシン(1-7)（ANG(1-7)）を産生する機能を持つ。ANG(1-7)はMas受容体を介してANG IIと拮抗作用があることが報告されている。我々はACE2ノックアウトマウスを用いた検討で、圧負荷をかけることにより高血圧性心不全(Yamamoto K, et al. Hypertension 2006)、高血糖負荷をかけることにより糖尿病性腎症(Shiota A, et al. Hypertens Res 2010)、と各々の進行が加速されたと報告した。しかしながら、ACE2、ANG(1-7)の動脈硬化進展における役割については明らかではない。さらにACE2ノックアウトマウスに糖尿病性腎症を作成しAT1拮抗薬(ARB)で治療をした場合、ACE2ノックアウトマウスはワイルドタイプと同等にまでアルブミン排泄を低下させることが出来なかったことから、このような臓器障害にANG(1-7)およびMas受容体が関与している可能性が示唆された。

以上より今回我々は、ラットの血管平滑筋細胞(A10)および正常ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)を用いて、ANGII刺激下での、細胞増殖、細胞接着、MAPKリン酸化に与えるACE2、ANG(1-7)の影響を検討した。

〔　方法ならびに成績　〕

24時間無血清処理したA10およびHUVECに対してANGII(10^{-7}M)で10分間添加した。ANG II刺激の10-20分前にANG(1-7)(10^{-7} M)、ARB(olmesartan; 10^{-5} M)、ACE2阻害薬(DX600; 10^{-6}M)、Mas受容体拮抗薬(D-Ala7-ANG(1-7); 10^{-5}M)を単独もしくは併用投与した。このような条件下で後に示す測定を行った。MAPKのリン酸化はWestern-blottingによりERK1/2およびリン酸化ERK1/2を測定し、A10の細胞増殖はcell counting kit-8により測定した。HUVECの細胞接着は、単球の培養細胞系であるTHP-1をPKH67で染色しHUVECへの接着を蛍光染色して、接着細胞数を計測することにより定量評価を行った。

A10、HUVECどちらにおいてもERK1/2のリン酸化は、ANGII添加により増加し($p<0.01$ vs. control)、ARB投与でcontrolレベルまで抑制された($p<0.01$ vs. ANGII添加)。また、ANGII添加およびARB+ACE2阻害薬投与で再増加したもののANGII単独投与までには至らず($p<0.01$ vs. control)、ここにANG(1-7)を加えると再びcontrolレベルまで抑制された($p<0.01$ vs. ANGII添加およびARB+ACE2阻害薬投与)。このANG(1-7)による抑制はMas受容体拮抗薬を投与することでANG(1-7)非添加レベルまで再増加し($p<0.01$ vs. ANGII+ANG(1-7)添加およびARB+ACE2阻害薬投与)、ANGII1添加にARBおよびMas受容体拮抗薬を同時投与したレベルと同等になった。ANGII 添加およびACE2阻害薬単独投与(ARB非投与)では、ANGII添加で増加したERK1/2のリン酸化がさらに増加傾向が認められたが統計学的有意差は認めなかった。

このERK1/2リン酸化の意義を検証するためにA10に対して細胞増殖とHUVECに対してはTHP-1との細胞接着を検討した。細胞増殖・細胞接着ともに、ANGII添加により増加し($p<0.01$ vs. control)、ARB投与でcontrolレベルまで抑制された($p<0.01$ vs. ANGII添加)。また、ANGII添加およびARB+ACE2阻害薬投与で再増加したもののANGII単独投与までには至らず($p<0.01$ vs. control)、ここにANG(1-7)を加えると再びcontrolレベルまで抑制された($p<0.01$ vs. ANGII添加およびARB+ACE2阻害薬投与)。このANG(1-7)による抑制はMas受容体拮抗薬を投与することでANG(1-7)非添加レベルまで再増加し($p<0.01$ vs. ANGII+ANG(1-7)添加およびARB+ACE2阻害薬投与)、ANGII1添加にARBおよびMas受容体拮抗薬を同時投与したレベルと同等になった。ANGII 添加およびACE2阻害薬単独投与(ARB非投与)では、ANGII添加で増加した細胞増殖がさらに増加した($p<0.05$ vs. ANGII添加)が、細胞接着の増加は統計学的有意差を認めなかった。

以上よりANG(1-7)およびACE2 はANGII存在下で平滑筋細胞増殖や内皮細胞と単球の細胞接着亢進というフェノタイプを伴ってERK1/2リン酸化に影響を与えることが示された。

〔　総　　括　〕

今回の研究により、ACE2はARB投与によりANGII-AT1系を抑制している状態では、ANG(1-7)-Mas受容体系を賦活化させることで抑制的に働き、ERK1/2リン酸化・平滑筋細胞増殖・内皮細胞と単球との細胞接着を抑制することが示唆された。しかし、ARB非投与下でANGII-AT1系が抑制されていない状態では、ACE2がANG(1-7)-Mas受容体を介してこれらの反応に対して与える影響は限定的なものであった。しかしながら高血圧性臓器障害進展においてANGII-AT1系の果たす役割は非常に大きく、ANGII-AT1系抑制下にANG(1-7)-Mas受容体系を賦活化させることで動脈硬化進展に大きく関与する平滑筋細胞増殖・内皮細胞と単球との細胞接着を効率的に抑制することが示されたことは、ANG(1-7)-Mas受容体系が動脈硬化の新規治療標的としても重要であることを示唆する。

論文審査の結果の要旨

アンジオテンシン変換酵素２（ACE2）はアンジオテンシンII（ANGII）を分解し、アンジオテンシン（1-7）（ANG（1-7））を産生しANG（1-7）はMas受容体を介してアンジオテンシンII受容体（AT1受容体）と拮抗した作用を認めるが、動脈硬化形成において内因性ACE2がANGII-AT1受容体系とANG（1-7）-Mas受容体系に与える影響は明らかでない。本研究はラットの血管平滑筋細胞および正常ヒト臍帯静脈内皮細胞を用いて、ANGII刺激下での、細胞増殖、細胞接着、ERK1/2リン酸化に与える内因性ACE2、ANG(1-7)-Mas受容体の影響を検討した。アンジオテンシンII受容体拮抗薬（ARB）非投与下においては、内因性ACE2がこれらに与える影響は限定的であったが、ARB投与下においては、内因性ACE2がANG（1-7）-Mas受容体系を賦活化することで、ERK1/2リン酸化、血管平滑筋細胞の増殖、単球の内皮細胞への接着は抑制された。今回の研究によりACE2、ANG(1-7)-Mas受容体系が動脈硬化の新規治療標的となり得ることが示唆され、学位に値すると考えられる。