

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590877

研究課題名(和文) 認知機能と糖代謝の相互作用 - 新しい治療ターゲットとしてのAng IV - IRAP系 -

研究課題名(英文) Interaction of cognitive function and glucose metabolism -angiotensin IV and IRAP system as a new therapeutic target-

研究代表者

大石 充 (Ohishi, Mitsuru)

鹿児島大学・医歯(薬)学総合研究科・教授

研究者番号：50335345

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：レニン-アンジオテンシン系のサブ・コンポーネントAng IVが海馬に発現するIRAPと呼ばれるGLUT4の細胞膜への移動に関係する酵素を受容体とすることが留学中の研究室より報告された。Ang(1-7)が独立してMEF1およびGLUT4産生亢進を介して耐糖能異常抑制することを我々は証明した。さらに我々は、アミロイド 1-40脳室内投与認知障害モデルを作成して、Ang IVがIRAPを介して記憶に関連する可能性を検討したが、認知機能障害が非常に不安定で、詳細な検討に用いることが難しいと判断した。現在、APP遺伝子改変マウスとIRAPノックアウトマウスの掛け合わせを行う実験の準備中である。

研究成果の概要(英文)：The Australian laboratory which I investigated before cloned the insulin-regulated aminopeptidase (IRAP) as a receptor for angiotensin IV, sub-component of renin-angiotensin system. It is a member of the family of zinc-dependent membrane aminopeptidases, which is mainly located in hippocampus and plays an important role for translocation to membrane of GLUT4. We reported another sub-component, angiotensin (1-7) improved glucose intolerance via increased MEF1 and GLUT4 production. We planned angiotensin IV and IRAP as a new therapeutic target for cognitive impairment using amyloid beta 1-40 intra-ventricular infusion model with IRAP knockout mice donated from the Australian laboratory. The cognitive function of this model is too unstable to evaluate angiotensin IV and IRAP function for cognitive impairment, we are now planning to make double knockout mice with IRAP and APP.

研究分野：医歯薬学

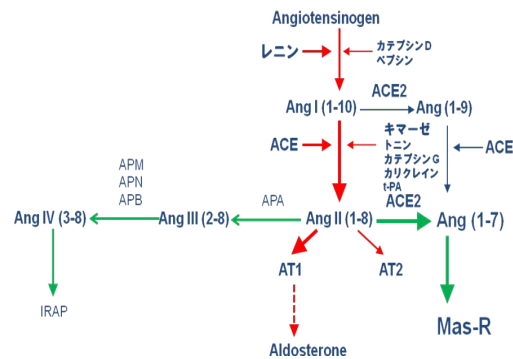
科研費の分科・細目：内科一般(含心身医学)

キーワード：アンジオテンシン IV アンジオテンシン 1-7 認知機能 耐糖能異常 IRAP

1. 研究開始当初の背景

レニン・アンジオテンシン (RAS)系は下図

レニン・アンジオテンシン・アルドステロン系



のようにアンジオテンシン II(AngII)が AT<sub>1</sub> 受容体と結合して angiogenesis や oxidative stress といった臓器傷害的に働く流れと生理活性物質である Ang II を分解して保護的に働く流れとで構成されている。AngII の不活性化が主な経路であるとされた Ang(1-7) や AngIV に生理活性が存在する可能性が示されて大きな脚光を浴びている。特に近年アンジオテンシン 1-7(Ang(1-7))の受容体としてプロトオンコジーンである Mas が同定され、ACE2/Ang(1-7)/Mas axis は米国・ブラジルを中心に研究が進んでおり、我々も ACE2 欠損マウスを用いて圧負荷モデルでのみ心不全を呈すること (Yamamoto K, Ohishi M, et al. **Hypertension** 2006; 平成 16 年度文科省科学研究費補助金(基盤 C)、糖尿病発症 ACE2 欠損マウスでは早期より糖尿病性腎症が重症化すること (Shiota A, Ohishi M, et al. **Hypertens Res** 2010)を報告した。一方、オーストラリア留学時代にアンジオテンシン IV(AngIV)受容体のクローニングの手伝いをする機会を得て(Zhuo JL, Ohishi M, et al. **J Hypertens** 1998)、AngIV 受容体として IRAP (insulin regulatable aminopeptidase)を同定し、GLUT4 の細胞内 translocation に必須であると共に脳の海馬領域に多く存在することを見だし (Albiston AL, et al. **J Biol Chem** 2001)、腎血流維持における AngIV の役割を解明した (Zhuo JL, Ohishi M, et al. **Am J Physiol** 2006)。さらに当時の共同研究者の Albiston AL・Chai SY を中心に AngIV や IRAP 結合物質である LVV-hemorphin7 が動物実験において様々なシチュエーションでの記憶力改善効果を確認している (Albiston AL, et al. **Neuroscience** 2004)。

高齢化・超高齢化社会の到来と共に認知症

は非常に大きな問題となっており、特にアルツハイマー型認知症の病態解明・治療法の開発は急務と考えられている。近年、糖尿病と認知機能およびアルツハイマー病との関連が注目されており、我々もアルツハイマー病モデルマウス(APP)×ob/ob マウスおよび APP×NSY マウスにより糖尿病が Aβ 沈着と IL-6 や TGF-β を惹起して認知機能のさらなる悪化を示すと共に、アルツハイマー病の存在が糖尿病を悪化させることを報告した(Takeda S, Rakugi H, et al. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2010)。この発見は診断および治療に新しい可能性を見出したと言える。アルツハイマー型認知症を疑う患者に糖負荷試験を行って血中 Aβ を測定することによりアルツハイマー型認知症を早期発見する可能性(Takeda S, Rakugi H, et al. **Biochem Biophys Res Commun**. 2009; **Mol Biosyst**. 2010)と、糖尿病という生活習慣病が Aβ 沈着というアルツハイマー型認知症の病態と密接な関係があることより、アンジオテンシン受容体拮抗薬(ARB)(Takeda S, Rakugi H, et al. **Hypertension**. 2009)やスタチン(Shinohara M, Rakugi H, et al. **J Biol Chem**. 2010)がアルツハイマー型認知症の治療薬となる可能性を報告してきた。

2. 研究の目的

アルツハイマー型認知症と糖尿病は相互に密接に関連しており、このメカニズムを追求することはアルツハイマー型認知症の新たな治療ターゲットの発見につながる可能性が高いと考えられる。AngIV 受容体である IRAP は海馬に分布して AngIV infusion により認知能の改善が認められること、および IRAP は GLUT4 の細胞内 translocation に必須であることから、我々が近年報告したアルツハイマー型認知症と糖尿病との相互関係の key molecule として AngIV-IRAP 系の役割が重要である可能性が高いと推察する。従って、本研究の目的はアルツハイマー型認知症と糖尿病の相互関連に対する AngIV-IRAP 系の役割を解明することである。

3. 研究の方法

古典的なレニン・アンジオテンシン系として知られている ACE-AT<sub>1</sub> 受容体系が認知症と関係する論文は数多く発表されているので、まず最初に認知症モデルの有用性を

検討すると共に、認知症と ACE - AngII-AT1 受容体系について詳細に検討した。認知症モデルとして  $\text{A}\beta 1\text{-}40$  脳室内投与モデルマウスを用いた。レニン・アンジオテンシン系が全く機能していない系として Angiotensinogen KO マウス (C57/B6,male: N=20)を用いて、古典的レニン・アンジオテンシン系が機能していないが、AngIV や Ang(1-7)などはむしろ亢進している系として AT1a KO マウス (C57/B6,male: N=20)を用いた。8 週齢の両系統の各半数 (N=10 ずつ) に対し AT1 受容体拮抗薬イルベタン 50mg/kg/day 投与開始した(-28day ~ 14day)。Day0 に  $\text{A}\beta 1\text{-}40$  を脳室内投与して認知機能障害を誘発して、Days7 ~ 12 に Morris Water Maze Test にて認知機能を確認した。用いた認知機能尺度は空間認知機能・学習能力の評価として Hidden-platform test : platform が見えない状態でそこに到達するまでの時間 (秒) を計測、運動能に差がないことを確認するために Visible-platform test : platform が見える状態でそこに到達するまでの時間 (秒) を計測 (ただし platform に到達する前にマウスが力尽き、泳ぐことを放棄してしまった場合には  $\times$ )、さらに Probe trial : platform を取り除いた後に 120 秒間マウスを自由に泳がせ、platform が置かれていた 1/4 円の部分をマウスが泳いでいた時間 (秒) を計測する 3 つのテストを行った。既報 (*Hypertension*. 2009;54:1345-1352) 通りであれば  $\text{A}\beta 40\text{-}1$  投与群では hidden-platform test において回数を重ねるごとに時間が短縮され、 $\text{A}\beta 1\text{-}40$  投与群では時間が変わらないはずで、また、両群間において visible-platform test の成績は変わらないはずである。

この研究と並行して糖代謝とレニン・アンジオテンシン系との関連を探索した。我々は従来より ACE2 欠損マウスを有しており、この耐糖能異常を調べて、AngIV の耐糖能に対する影響を比較検討して、認知機能との関連のベースデータとすることにした。

#### 4 . 研究成果

$\text{A}\beta 1\text{-}40$  脳室内投与モデルマウスを用いた研究では、 $\text{A}\beta 1\text{-}40$  投与群と  $\text{A}\beta 40\text{-}1$  投与群の間で明らかな認知機能の差は認められなかった。これにはいろいろな問題点が考えられたが、マウスの個体差が大きく、評価困難な印象があり、 $\text{A}\beta$  脳室内投与をアルツハイマー病モデルマウスとする妥当性が我々

の実験系からは認められないことから、大阪大学臨床遺伝子治療学里直行先生から APP23 マウスを御供与いただき、AT1a 欠損マウスおよび ACE2 欠損マウスと掛け合わせをすることに方向転換をして、現在ダブルノックアウトマウスを作成中である。

普通食投与では ACE2 ノックアウトマウスと野生型マウスの耐糖能は同等であったが、アンジオテンシン II 投与や高カロリー食は ACE2 欠損マウスの耐糖能を野生型マウスに比し顕著に悪化させた。ARB は高カロリー食による両群の耐糖能を改善したものの依然両群間で差を認め、アンジオテンシン (1-7) 阻害薬の同時投与あるいはアンジオテンシン (1-7) の単独投与により両群の差は消失した。インスリンに応答して血糖値を保つために重要な役割を果たしているグルコースを体内に運ぶ働きをする蛋白 (グルコース輸送体; glucose transporter; GLUT) である GLUT4 が正常に機能しないと 2 型糖尿病の発症につながると考えられている。インスリンの刺激のない状態では、GLUT4 は細胞内の小胞に蓄積されているが、細胞膜にある受容体にインスリンが結合すると刺激が起こり、GLUT4 が細胞膜へ移動し、血液中のグルコースを細胞内に取り込む。我々はこの GLUT 4 に着目をして、骨格筋の GLUT4 とそれを制御する MEF 2A の蛋白発現を検討した。GLUT4 は ACE2 ノックアウトマウスにおいて顕著に低下しており、その発現はアンジオテンシン (1-7) により制御されることがアンジオテンシン (1-7) 又はアンジオテンシン (1-7) 阻害薬投与により示された。また骨格筋筋芽細胞の筋管細胞への分化誘導下にアンジオテンシン (1-7) を投与すると MEF2A と GLUT4 の発現亢進を認めた。これらよりアンジオテンシン (1-7) は MEF2A および GLUT4 の発現調節を介した糖代謝改善作用を有することが示唆された。

MEF2 は神経細胞にも発現しており認知機能と関連があることが報告されており、最近では MEF2C の SNP と AD の関連が Nature genetics で報告されている。従って、ACE2-Ang1-7 が MEF2 活性化を介して認知機能を改善するという仮説の証明を ACE2KO-APP23 マウスを用いて、また AngIV も MEF2 活性化を介して耐糖能異常を来すのか、またこれが認知機能とどのように関連するのかをノックアウトマウスを用いた検討で証明する予定である。

#### 5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 48件)

1. Hanaoka Y, Yasuda O, Soejima H, Miyata K, Yamamoto E, Izumiya Y, Maeda N, Ohishi M, Rakugi H, Oike Y, Kim-Mitsuyama S, Ogawa H. Tissue inhibitor of metalloproteinase-3 knockout mice exhibit enhanced energy expenditure through thermogenesis. **PLoS One**. 2014; 9(4): e94930. (査読 有)
2. Wang X, Sugimoto K, Fujisawa T, Shindo N, Minato S, Kamada Y, Hamano M, Ohishi M, Ikegami H, Rakugi H. Novel effect of ezetimibe to inhibit the development of non-alcoholic fatty liver disease in Fatty Liver Shionogi mouse. **Hepatol Res** 2014; 44(1):102-113. (査読 有)
3. Takeuchi K, Yamamoto K, Ohishi M, Takeshita K, Hongyo K, Kawai T, Takeda M, Kamide K, Kurtz TW, Rakugi H. Telmisartan modulates mitochondrial function in vascular smooth muscle cells **Hypertens Res** 2013; 36: 433-439. (査読 有)
4. Takeda M, Yamamoto K, Takemura Y, Takeshita H, Hongyo K, Kawai T, Hanasaki-Yamamoto H, Oguro R, Takami Y, Tataru Y, Takeya Y, Sugimoto K, Kamide K, Ohishi M, Rakugi H. Loss of Angiotensin-converting enzyme 2 exaggerates high-calorie diet-induced insulin resistance by reduction of GLUT4 in mice. **Diabetes** 2013; 62(1): 223-233. (査読 有)
5. Kawai T, Ohishi M, Onishi M, Takeya Y, Ito N, Kato N, Yamamoto K, Kamide K, Rakugi H. Influence of renin angiotensin system gene polymorphisms on visit-to-visit blood pressure variability in hypertensive patients. **Am J Hypertens** 2012; 25(12): 1249-1255. (査読 有)
6. Congrains A, Kamide K, Katsuya T, Yasuda O, Oguro R, Yamamoto K, Ohishi M, Rakugi H. CVD-associated non-coding RNA, ANRIL, modulates expression of atherogenic pathways in VSMC. **Biochem Biophys Res Commun** 2012; 419(4): 612-616. (査読 有)
7. Congrains CA, Kamide K, Oguro R, Yasuda O, Miyata K, Yamamoto E, Kawai T, Kusunoki H, Yamamoto H, Takeya Y,

Yamamoto K, Onishi M, Sugimoto K, Katsuya T, Awata N, Ikebe K, Gondo Y, Oike Y, Ohishi M, Rakugi H. Genetic Variants at the 9q21 locus contribute to atherosclerosis through modulation of ANRIL and *CDKN2A/B*. **Atherosclerosis** 2012; 220: 449-455. (査読 有)

8. Maekawa Y, Ohishi M, Ikushima M, Yamamoto K, Yasuda O, Oguro R, Yamamoto-Hanasaki H, Tataru Y, Takeya Y, Rakugi H. Klotho protein diminishes endothelial apoptosis and senescence via a mitogen activated kinase pathways. **Geriatr Gerontol Int** 2011; 11(4): 510-516. (査読 有)
9. Kato N, Tataru Y, Ohishi M, Takeya Y, Onishi M, Maekawa Y, Rakugi H. Angiotensin converting enzyme single nucleotide polymorphism is a genetic risk factor for cardiovascular disease: A cohort study of hypertensive patients. **Hypertens Res** 2011; 34: 728-734. (査読 有)

[学会発表](計 17件)

1. 大石 充  
アンジオテンシンペプチド系の話題  
第 36 回日本高血圧学会総会, 大阪,  
2013
2. 大石 充, 楽木宏実:  
ACE2/Angiotensin(1-7)/mas 軸の最新知  
見  
第 40 回日本心脈管作動物質学会, 高  
松, 2011

[図書](計 9件)

1. 大石 充, 楽木宏実 :  
アンジオテンシン変換酵素 2-アンジオ  
テンシン(1-7)/Mas アキシスの基礎  
的・臨床的意義  
**血圧** 19(1): 26-29, 2012

[その他]

ホームページ等

<http://www.kufm.kagoshima-u.ac.jp/~intme>

[d1/](#)

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

大石 充 (MITSURU OHISHI)

研究者番号：50335345

鹿児島大学 心臓血管・高血圧内科学

教授

### (2)研究分担者

山本 浩一 (KOICHI YAMAMOTO)

研究者番号：00528424

大阪大学 老年・腎臓内科学 講師

楽木 宏実

研究者番号：20252679

大阪大学 老年・腎臓内科学 教授

### (3)連携研究者

なし