

# 血管

VOL34NO.4/2011  
JAPANESE JOURNAL OF  
CIRCULATION RESEARCH

日本心脈管作動物質学会

- ・ 総 編 集 長 岩 尾 洋 (大阪市立大学大学院医学研究科分子病態薬理学)
- ・ ベーシック編集長 玉 置 俊 晃 (徳島大学大学院病態情報医学講座情報伝達薬理学分野)
- ・ インフォマティクス編集長 田 中 利 男 (三重大学大学院医学系研究科薬理ゲノミクス)
- ・ ゲノミクス編集長 辻 本 豪 三 (京都大学大学院薬学研究科ゲノム創薬科学)
- ・ クリニカル編集長 伊 藤 正 明 (三重大学大学院循環器内科学)

### 編集委員 (ABC順)

江頭健輔, 藤田 浩, 藤田敏郎, 福田 昇, 古川安之, 林 晃一, 林登志雄, 平田恭信,  
 飯野正光, 池田宇一, 今泉祐治, 伊藤 宏, 伊藤正明, 伊藤猛雄, 岩尾 洋, 松原達昭,  
 松崎益徳, 三浦総一郎, 宮内 卓, 村松郁延, 永井良三, 永田博司, 中木敏夫, 中村真潮,  
 中尾一和, 錦見俊雄, 大橋俊夫, 岡村富夫, 大内尉義, 大柳光正, 島田和幸, 末松 誠,  
 高橋和広, 高橋克仁, 武田和夫, 田中利男, 谷口隆之, 辻本豪三, 山崎峰夫, 柳沢輝行,  
 吉村道博, 由井芳樹

# 学会案内

## 第41回日本心脈管作動物質学会

- 会 期：平成24年2月10日(金)～2月11日(土)
- 会 場：秋田キャッスルホテル  
〒010-0001 秋田県秋田市中通一丁目3-5  
TEL：018-834-1141 (代表)
- 会 長：伊藤 宏 (秋田大学大学院医学系研究科  
循環器内科学・呼吸器内科学)
- 事 務 局：〒010-8543 秋田県秋田市本道1-1-1  
秋田大学大学院医学系研究科  
循環器内科学・呼吸器内科学  
第41回日本心脈管作動物質学会事務局  
渡邊 博之  
TEL：018-884-6110 FAX：018-836-2612  
URL:<http://www.cna.ne.jp/~jscr41/>

### ●プログラム

#### 1. シンポジウム1「再生医療研究の最先端」

シンポジスト：李 鍾國 (大阪大学大学院医学系研究科  
心血管再生医学寄附講座)

永井 敏雄 (千葉大学大学院医学研究院 循環病態医科学)

竹原 有史 (旭川医科大学 心血管再生先端医療開発講座)

清水 優樹 (名古屋大学大学院医学系研究科 循環器内科学)

遠山 周吾 (慶応義塾大学医学部 循環器内科)

オーガナイザー：福田 恵一 (慶応義塾大学医学部 循環器内科)

室原 豊明 (名古屋大学大学院医学系研究科 循環器内科学)

#### シンポジウム2「レニン・アンジオテンシン系研究の最先端」

シンポジスト：竹内 純 (東京大学 分子細胞生物学研究所)

田村 功一 (横浜市立大学医学部 循環器・腎臓内科学)

下澤 達雄 (東京大学医学部附属病院 検査部)

西村 智 (東京大学医学系研究科 循環器内科)

システム疾患生命科学による先端医療技術開発拠点)

オーガナイザー：光山 勝慶 (熊本大学大学院生命科学研究部)

生体機能薬理学分野)

今井 由美子 (秋田大学大学院医学系研究科)

情報制御学・実験治療学)

シンポジウム3「イオンチャネル研究の最先端」

シンポジスト： 蒔田 直昌（長崎大学大学院医歯薬学総合研究科  
内臓機能生理学分野）  
松浦 博（滋賀医科大学 生理学講座  
細胞機能生理学部門）  
西田 基宏（九州大学大学院薬学研究院 薬効安全性学分野）  
オーガナイザー： 西尾 眞友（金沢医科大学医学部 薬理学）  
尾野 恭一（秋田大学大学院医学系研究科 細胞生理学講座）

2. 特別講演

演者：小室 一成（大阪大学大学院医学系研究科 循環器内科学）  
座長：平田結喜緒（東京医科歯科大学 内分泌・代謝内科）

3. 基調講演

演者：斎藤 能彦（奈良県立医科大学 第一内科学教室）  
座長：田中 利男（三重大学大学院医学系研究科 薬理ゲノミクス）

4. イブニングセミナー

演者：七里 眞義（北里大学医学部 内分泌代謝内科学）  
座長：伊藤 貞嘉（東北大学大学院医学系研究科 内科病態学講座  
腎・高血圧・内分泌学分野）

5. ランチョンセミナー

演者：下川 宏明（東北大学大学院医学系研究科 循環器内科学）  
座長：吉栖 正典（奈良県立医科大学 薬理学講座）

6. 若手シンポジウム

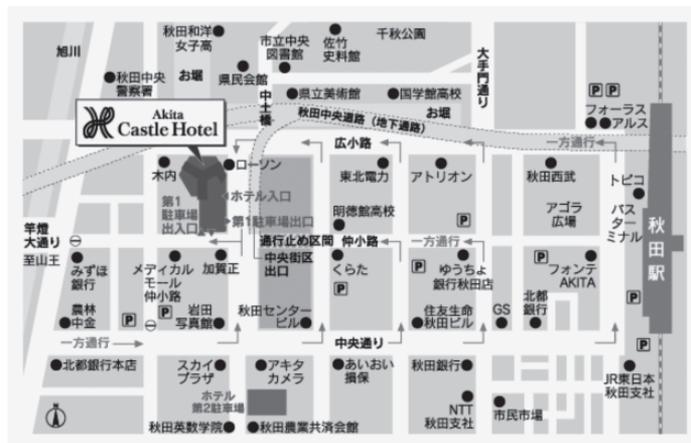
演者：徳留 健（国立循環器病研究センター研究所 生化学部）  
大蔵 隆文（愛媛大学大学院 病態情報内科学）  
岸 拓弥（九州大学大学院医学研究院  
先端心血管治療学講座）  
野間 玄督（広島大学原爆放射線医科学研究所  
ゲノム障害病理研究分野 再生医学研究部門）  
座長：西山 成（香川大学医学部 薬理学）

7. 一般演題（ポスター発表）

## 【会場および交通案内】

秋田キャッスルホテル

〒010-0001 秋田県秋田市中通一丁目3-5 TEL 018-834-1141 (代表)



### ■飛行機でお越しの方

\* 秋田空港リムジンバス「県庁」行き「木内前」下車 (所要時間約42分)  
《時刻表》ダイヤ変更の可能性がありますので、ホームページでのご確認をお願いします。

2 / 10 [行き]・ANA 981便 羽田11:05発 → 秋田12:10着  
バス12:25 空港発 → 13:02 木内前着  
・ANA1837便 名古屋中部10:15発 → 秋田11:40着  
バス11:55 空港発 → 12:32 木内前着  
・JAL2171便 大阪7:30発 → 秋田8:50着  
バス9:05 空港発 → 9:42 木内前着

2 / 11 [帰り]・バス 14:57 木内前発 → 15:30 空港着  
ANA1840便 秋田16:20 → 名古屋中部 17:40  
・バス 16:02 木内前発 → 16:35 空港着  
JAL1266便 秋田17:25 → 羽田 18:35  
・バス 16:57 木内前発 → 17:30 空港着  
JAL2178便 秋田18:20 → 大阪 19:50

### ■鉄道でお越しの方

\* JR秋田駅より車で2分

### ■自家用車でお越しの方

\* 秋田自動車道 秋田中央ICより10分

〔秋田キャッスルホテル駐車場〕(有料) ◇収容台数:150台  
〔秋田キャッスルホテル第2駐車場〕(有料) ◇収容台数:60台

### 【宿泊案内】

ホームページにてご案内いたしております。

## 《日本心脈管作動物質学会の入会および会員の継続について》

1. 年会費：4,000円
2. 期 間：加入（会費納入）した年の12月31日まで.
3. 機関誌：「血管」を年4回送付します. 本年度は1号が学会抄録号となります.
4. 総 会：年1回開催します. 学会の演題申込者はすべて本会会員に限ります.
5. 入会手続き：本学会入会希望者は, 学会HP内の各種届出用紙より, 入会申し込み用紙をダウンロードし, 必要事項を記入した用紙をメールまたはFax（059-232-1765）にて事務局までご送付ください. 折り返し必要書類をお送りします. また, 下記郵便口座あてに年会費4,000円をお払い込みください.
6. 会員の継続手続き：継続用紙にご記入の上, メールまたはFax（059-232-1765）にて事務局まで御送信ください.

郵便振替口座：00900-8-49012

加入者名：日本心脈管作動物質学会

7. 雑誌送付先などに変更が生じた場合はすみやかに事務局までお知らせください.

### 《「お知らせ」の掲載について》

本誌では, 「血管」に関連した学会および学術集会（国内外, 規模の大小は問いません.）の案内を, 無料掲載いたします. ご希望の方は, 締切日までに原稿を事務局へお送りください. （締切日等は事務局へご確認ください.）

〒514-8507 三重県津市江戸橋2丁目174番地

三重大学大学院医学系研究科薬理ゲノミクス分野

日本心脈管作動物質学会事務局

TEL 059-231-5411

FAX 059-232-1765

<http://jscr21.medic.mie-u.ac.jp/>

[jscr@doc.medic.mie-u.ac.jp](mailto:jscr@doc.medic.mie-u.ac.jp)

## ■第40回日本心脈管作動物質学会 研究奨励賞受賞論文

創薬標的としての遊離脂肪酸受容体：循環器疾患とメタボリックシンドローム

市村 敦彦…………… 145

血管内皮細胞のアドレノメデュリン-RAMP2システムによる血管恒常性維持機構

小山 晃英…………… 153

(プロ) レニン受容体／ATP6AP2における最新の知見

木内 謙一郎、市原 淳弘、伊藤 裕…………… 159

蛋白尿による近位尿細管細胞酸化ストレス蓄積における腎内酸性環境の役割

相馬 友和…………… 167

■ *Young Investigator Research Awards*

Free Fatty Acid Receptors as drug targets: Cardiovascular disease and  
metabolic syndrome

Atsuhiko Ichimura ..... 145

Vascular endothelial Adrenomedullin-RAMP2 system is essential for maintenance  
of vascular homeostasis

Teruhide Koyama ..... 153

Current knowledge about (pro)renin receptor/ATP6AP2

Kenichiro Kinouchi<sup>1</sup>, Atsuhiko Ichihara, and Hiroshi Itoh ..... 159

The Role of Renal Acidic Environment on Proteinuria-induced Oxidative Damage  
in Proximal Tubular Cells

Tomokazu SOUMA ..... 167

## 日本心脈管作動物質学会研究奨励賞受賞論文

1

創薬標的としての遊離脂肪酸受容体：  
循環器疾患とメタボリックシンドローム市村 敦彦, 原 貴史, 木村 郁夫, 平澤 明, 辻本 豪三  
京都大学大学院 薬学研究科 薬理ゲノミクス

## i. はじめに

心疾患や脳血管疾患等に代表される循環器疾患は動脈硬化が最大の要因であると考えられている。また、高血圧・高脂血症・糖尿病・肥満等の疾患は動脈硬化の危険因子であり、上記の症状が複合する状態はメタボリックシンドロームと呼ばれ、動脈硬化の進行を促進する。このため、メタボリックシンドロームの予防や治療は、循環器疾患の発症を防ぐうえで現在の医療の最大のテーマの一つとなっている。

メタボリックシンドロームの最大の要因は食生活にあると考えられている。近年、食生活の欧米化が進み、炭水化物の摂取量が減る一方で、動物性食品等の脂質が過剰に摂取されるようになった。その結果、余剰エネルギーが蓄積し、肥満、高脂血症、糖尿病といった生活習慣病を発症する原因となっている。この食事由来の脂質より得られる特定の脂肪酸は、生体内において重要なエネルギー源として利用される。一方で、近年、遊離脂肪酸を天然リガンドとする新たな一群のG蛋白共役型受容体(GPCR)ファミリーの発見により、脂肪酸が単なるエネルギー源としてだけではなく、シグナル伝達物質として働くことが明らかになった<sup>1-5</sup>。これら受容体は脂肪酸がリガンドであることから、生活習慣病(その内でも特に糖脂質代謝疾患)の新たな創薬・治療標的として注目されている。本総説では、これら脂肪酸受容体の内、特にGPR40とGPR120についての最新の知見と、メタボリックシンドローム治療への応用の可能性を踏まえて紹介する。

## ii. 脂肪酸受容体

遊離脂肪酸(FFAs)は必須の栄養因子として生体に

利用されるだけではなく、様々な細胞機能に関与することが報告されている。ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体(PPARs)を含む核内受容体は、遊離脂肪酸を受容し、いわゆる“脂肪酸センサー”として働き、脂質の取り込み、合成、輸送、貯蔵、分解、排出といった生理機能に関わるタンパク質発現を調節することにより、生理的・病理的条件下で恒常性を維持している<sup>6</sup>。しかし、これまでに報告されている脂肪酸の生理的機能のすべてがこの機構によって説明されるわけではなく、PPAR非依存的な機構や、細胞膜上の受容体を介していると考えられる特徴を有する機構も存在する<sup>7,8</sup>。近年、オーファンGPCRのリガンド探索により、複数の受容体のリガンドが様々な鎖長や不飽和度の遊離脂肪酸であることが示された<sup>9</sup>。これらの発見により、遊離脂肪酸受容体という新たな受容体ファミリーが確立されるに至った。主な遊離脂肪酸受容体にはGPR40(FFAR1)、GPR41(FFAR3)、GPR43(FFAR2)及びGPR120がある。GPR40及びGPR120は、食物由来の中鎖及び長鎖の脂肪酸により活性化されるのに対し、GPR41及びGPR43は主に腸内細菌により産生される短鎖脂肪酸により活性化される。これら遊離脂肪酸受容体の主な特徴について表1にまとめた。

これらの受容体はそれぞれ特徴的な組織発現分布を示し、個別に重要な生理機能を持っていることが報告されている。これらの受容体の内、主にGPR40及びGPR120について、現在までに明らかになっている機能及び特徴について以下に詳細に述べる。

## 1) GPR40

内因性リガンドとシグナル伝達 3つの独立したグループにより、GPR40が中鎖、長鎖の飽和、不飽和脂肪酸により活性化されることがほぼ同時に報告された<sup>10-12</sup>。様々な脂肪酸が $\mu\text{M}$ オーダーの濃度でGPR40アゴニストとして機能すること、及び、エイコサトリエン酸(C20)

\*京都大学大学院 薬学研究科 薬理ゲノミクス  
(〒606-8501 京都市左京区吉田下阿達町46-29)

表1. 遊離脂肪酸受容体の特徴

受容体名	GPR40 (FFAR 1)	GPR43 (FFAR 2)	GPR41 (FFAR 1)	GPR120
内因性リガンド (遊離脂肪酸)	中鎖-長鎖 (C8-C22)	短鎖 (C2-C4)	短鎖 (C2-C4)	中鎖-長鎖 (C10-C22)
合成リガンド	チアゾリジンジオン, GW9508, MEDICA16			NCG21
共役Gタンパク質	Gq/11	Gq/11	Gq/11, Gi/o	Gq/11
主な発現	膵臓β細胞, 腸管	脂肪組織, 白血球	脂肪組織, 交感神経節	腸管, マクロファージ
生理機能	インスリン分泌	5-HT分泌, PYY分泌	レプチン分泌, PYY分泌, 交換神経刺激	GLP-1分泌, CCK分泌, 抗炎症

が最も強力であることが見出された。興味深いことに、飽和脂肪酸のGPR40に対する効力はその炭素鎖長に依存し、ペンタデカン酸 (C15) 及びパルミチン酸 (C16) が最も強力であり、カプリン酸 (C10) やオクタン酸 (C8) は非常に弱い活性しか示さない一方で、不飽和脂肪酸ではその活性に炭素鎖長や不飽和度との相関は認められない。Briscoeらは約40種類の飽和、不飽和脂肪酸がすべてGPR40のアゴニストとして機能することを確認している<sup>10</sup>。外因性にGPR40を発現させたCHO細胞において、遊離脂肪酸はイノシトール1,4,5-3リン酸形成、細胞内カルシウムイオン上昇、及び細胞外シグナル制御キナーゼ1/2 (ERK1/2) の活性化を引き起こす<sup>11</sup>。また、膵島β細胞及び初代培養された膵島細胞の両方において、遊離脂肪酸刺激による細胞内カルシウムの大幅な上昇が認められる<sup>13,14</sup>。これらのことから、GPR40はGqファミリーに属するGα蛋白と共役していると考えられる。一方、膵島β細胞においては遊離脂肪酸刺激がcAMP産生に影響を与えないという報告もあり<sup>10,15</sup>、これらの知見はGPR40がGs及びGi/oとは共役していないことを示唆している。GPR40を過剰発現させたHEK293細胞において、GPR40の既知リンドはGqタンパク質を介したホスホリパーゼC (PLC) の活性化を引き起こす<sup>16</sup>。これらの機構はβ細胞で直接確認されているわけではないが、遊離脂肪酸によりβ細胞においても細胞内カルシウムが上昇することは、PLCの活性化と一致し、β細胞においても同様の機構が働いていることを示唆する。その一方で、その他の分子機構が存在することも示唆されている。例えば、Fengらはラット膵島β細胞において、リノレン酸 (C18) がGPR40を介したcAMPとプロテインキナーゼAの活性化により電位依存性カリウムチャネル電流を減少させ、β細胞の興奮性とインスリンの分泌を促進することを示している<sup>17</sup>。

**発現** 逆転写PCR (RT-PCR)、免疫組織染色、in situ hybridizationといった手法を用いた発現解析により、GPR40がインスリンを産生する膵島β細胞に高発現

することが明らかになった<sup>11</sup>。GPR40は膵臓全体と比較して、膵島に約100-200倍高発現していた<sup>10</sup>。われわれは、脾細胞、THP-1細胞、ヒト末梢血単核球においてGPR40の存在を抗GPR40モノクローナル抗体により同定した<sup>18</sup>。また、腸管を含むそれ以外の部位での発現も示唆されている。EdforkらはGPR40がGLP-1及びGIPを発現している腸管内分泌細胞で発現していることを報告している<sup>19</sup>。

**生理的機能** 遊離脂肪酸は膵島β細胞において多面的な生理機能を有することが知られている。遊離脂肪酸の急速投与はインスリン分泌を促進する一方で、高濃度の遊離脂肪酸に慢性的に暴露するとβ細胞はその機能を障害され、インスリン分泌能が低下する。また、遊離脂肪酸はげっ歯類及びヒトの膵島においてインスリン基礎分泌の維持及び急性期のグルコース依存性のインスリン分泌の両方に重要な役割を担っていると認識されている<sup>10,20-24</sup>。しかしながら、その分子機構は明確には知られていなかった。Itohらは、長鎖脂肪酸がGPR40の活性化により膵島β細胞からのグルコース誘導性インスリン分泌を増強させることを明らかにした<sup>11</sup>。GPR40の発現がsiRNAにより抑制されると、脂肪酸刺激後のインスリン分泌の増加が消失し、このプロセスにGPR40が関与することが示された。また、Stenebergらは、GPR40欠損β細胞は遊離脂肪酸刺激に対するインスリンの分泌量が少なく、また、GPR40欠損マウスは肥満誘発性の高インスリン血症、脂肪肝、高トリグリセリド血症、肝グルコース排出量の増加、高血糖、耐糖能異常を示さないことを明らかにした。また逆に、マウスにおけるGPR40の過剰発現は、β細胞の機能異常を惹起し、高インスリン血症、糖尿病に至ることを見出した。これらの結果から、遊離脂肪酸の即時的・慢性的作用がともにGPR40を介したものであることをGPR40の欠損マウス及びトランスジェニックマウスを用いて示した<sup>25</sup>。更に、インスリンのプロモーターにより発現誘導されるGPR40トランスジェニックマウスの表現型解析から、GPR40はグルコー

ス誘導性インスリン分泌を調節し得ることが示された<sup>26</sup>。以上の結果から、GPR40は肥満と糖尿病を結ぶ一連のプロセスにおいて重要な役割を果たしていることが示唆される。

**多型** ヒトGPR40では、2種類のアミノ酸置換を引き起こす塩基置換、Arg211His多型と希少なAsp175Asn多型が同定されている。リガンドの一つである5, 8, 11-eicosatriynoic acidによるイノシトールリン酸産生を、両多型をそれぞれ発現したCOS-7細胞で観察した結果から両多型のEC50値は共に野生型と同等であることが報告されている。一方、最大活性は、Asp175Asn多型が野生型より39%低いことが示されている<sup>27</sup>。現時点では、Asp175Asn多型が2型糖尿病やインスリン分泌量の変化とは関連がないと考えられている。これとは反対に、日本人男性に於けるArg211His多型と血中インスリンレベル等の代謝関連パラメータの相関関係に関する研究結果から、本多型がインスリン分泌能に寄与していることが報告されている。更に、734例のスクリーニングにより、Gly180Ser多型をもたらす一塩基多型が同定された。この変異体は、 $\beta$ 細胞において、遊離脂肪酸刺激による細胞内カルシウムの上昇に異常をきたすことが示されている<sup>28</sup>。

**合成リガンドと構造活性相関** GPR40は、その生物学的活性や組織分布から、2型糖尿病に代表されるメタボリックシンドロームの魅力的な創薬標的として大いに期待され、研究が進められてきた。現在までに、アゴニストまたはアンタゴニストとしての活性を有する多くの化合物が同定され、その生理学的・薬理的な効果が様々な実験系で研究されてきた<sup>29</sup>。Garridoらは、3-[4-[(N-alkyl)amino]phenyl] propanoic acidに基づき、一連のGPR40アゴニストを最初に報告した<sup>30</sup>。これらの化合物は作用強度にして100倍の増加を示し、そのうちいくつかは構造活性相関を示した。更に、複数の合成GPR40アンタゴニストも同定され、そのアンタゴニスト効果がin vitro及びin vivo両方のシステムを用いて研究されてきた<sup>10, 31-33</sup>。これらの内でも、GW9508は、GPR40だけでなくGPR120も活性化することから、詳細に研究されている。GW9508は、GPR120への効果に比べて100倍強くGPR40を活性化し、インスリン分泌細胞であるMIN 6細胞においてグルコース誘発性インスリン分泌を促進した。更に、4-phenethylidihydrocinnamic acidやPPAR $\gamma$ アゴニストであるチアゾリジンジオンなどのbromophenyl誘導体がGPR40アゴニスト活性をもつ一連の化合物としていくつかのグループから報告されている。これらの化

合物のアゴニスト活性は、GPR40過剰発現細胞における細胞内カルシウム、内因性にGPR40を発現している豚島 $\beta$ 細胞株MIN 6細胞におけるインスリン分泌測定、及び、GPR40欠損マウスにおけるグルコース耐性試験により評価されている<sup>34-38</sup>。ロジゲリタゾンやトロゲリタゾンなどの抗糖尿病性チアゾリジンジオン系化合物や、抗肥満効果を示すMEDICA16といった化合物は、GPR40に対するアゴニスト活性を示すことが明らかにされている<sup>13, 39</sup>。また、選択的GPR40アンタゴニストであるGW1100はGW9508と逆の作用を示したと報告されている<sup>39</sup>。GPR40の薬理作用を研究する上で、受容体とリガンドの直接相互作用をモニターすることは大変有用である。しかし、GPR40とリガンドの親和性や特異性が弱いことが原因で、直接相互作用を検出するのに適したシステムがなかったため、GPR40とそのリガンドの親和性を定量評価する研究は行われてこなかった。そこでわれわれは、フローサイトメーターを使用してGPR40リガンドの受容体親和性を定量評価することのできる実験系を構築した<sup>40</sup>。FLAGタグを付加したGPR40を発現しているSf9昆虫細胞を可溶化し、免疫磁気ビーズ上にGPR40タンパク質を固定した。このビーズとフローサイトメーターを用いた結合実験により、蛍光ラベルした遊離脂肪酸がGPR40上の結合サイト特異的に結合していることを検出することに成功した。本手法を使用することにより、先述のGPR40アゴニストGW9508やMEDICA16のGPR40への直接相互作用も検出することができた。これらの化合物は今後のGPR40の生理機能探索にとって有用なプローブとなると考えられる。また、われわれの開発した受容体-リガンド直接相互作用を検出する手法は、他のGPCRの薬理研究にも資するものであると期待される。

受容体活性化メカニズムの分子機構の理解と、より強く選択的なリガンドのデザインのために、受容体とそのリガンドの結合モードを実験的に検証することは大変有用である。GPR40の細胞外第二ループに存在する2つのGlu残基 (Glu-145及びGlu172) が、異なる膜貫通ドメインに存在するArg残基とイオン性のロック構造を形成していることが、ホモロジーモデリングから示された。これらのGlu残基をAla残基へ置換すると、受容体が恒常的に活性化することから、イオン性のロック構造の破綻を生じていることが予測される。従って、これらのGlu残基とArg残基により形成されるイオン性ロック構造はGPR40がリガンドと結合した際に活性化される分子スイッチのような役割を果たしていると考えられる<sup>41</sup>。

## 2) GPR120

**リガンド** GPR120は、われわれがマウス及びヒトの

ゲノムDNA断片からリガンド未知のオーファンGPCRとして単離した受容体である。GFP標識した受容体のインタナライゼーションアッセイを用いた化合物ライブラリーの大規模スクリーニングにより、GPR120の内因性リガンドが中鎖、長鎖の遊離脂肪酸であることを同定した<sup>42,43</sup>。活性化能は、C14~C18の炭素鎖長の飽和脂肪酸及びC16~C22の炭素鎖長の不飽和脂肪酸で検出された。リガンド特異性が類似しているにもかかわらず、ヒトGPR120はヒトGPR40とアミノ酸配列において10%の相同性しか示さず、進化系統樹でも離れた場所に位置する。このため、このリガンドプロファイルの類似性は収束進化の結果であると考えられる。GPR120の内因性リガンドを更に探索するため、Albatrellus ovinu子実体由来の化合物ライブラリーをスクリーニングした結果、新たにGPR120特異的な部分アゴニストを同定した<sup>13</sup>。この化合物は、GPR120の過剰発現細胞だけでなく、内因性にGPR120を発現している腸管内分泌細胞株STC-1でもGPR120の活性化能を示した。更に、PPAR $\gamma$ アゴニストであるチアゾリジジオン系化合物骨格を基に、GPR120リガンドの合成を試みた結果、GPR120に選択的な活性を示す化合物の同定にも成功している<sup>44</sup>。以上のように同定された化合物は、GPR120の生理的機能を明らかにする上で非常に有益なツールになるとともに、GPR120を標的とした新たな創薬候補となると考えられる。

**シグナル伝達** われわれは、GPR120を過剰発現させたHEK293細胞を用いた実験により、長鎖脂肪酸はGPR120を介して細胞内カルシウム濃度を上昇させるが、cAMP産生は引き起こさないことを明らかにした。これらの結果から、GPR120はGs及びGi/o型ではなく、Gqファミリーに属するG $\alpha$ 蛋白質と共役していることが示唆される<sup>13,43,45</sup>。GPR120の活性化は、ERK 1/2の活性化、ホスファチジルイノシトール3 (PI3)キナーゼの活性化、及び、セリン/スレオニプロテインキナーゼ Aktの活性化を、それぞれ諸条件下で引き起こすことが報告されている<sup>13,45,46</sup>。しかしながら、これらの反応が細胞内カルシウム上昇を引き起こしているのか否か、また、独立した共役メカニズムが存在しているのか否かといったことは不透明であり、今後の更なる解析を要する。また、これらのGPR120に関わるシグナル伝達経路は、既知のGLP-1分泌に関わるシグナル伝達経路とは一致しないため、GPR120を介したGLP-1分泌の分子機構にはさらなる研究を要する。最近、ドコサヘキサエン酸やエイコサペンタエン酸といった $\omega$ 3脂肪酸が、GPR120を介して抗炎症作用を発揮することが、Ohらによって

示された<sup>46</sup>。GPR120と結合した $\beta$ -アレスチン2がさらにTGF- $\beta$ -activated kinase 1 binding protein 1 (TAB1)と結合することで、toll like receptor (TLR) やtumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ といった炎症誘導シグナル経路上のTGF- $\beta$ -activated kinase 1 (TAK1)を阻害して炎症反応を抑制していることが、単球様細胞株RAW264.7及び腹腔内マクロファージを用いて示されている。

**発現と生理的機能** われわれは、腸管内分泌細胞に発現しているGPR120を食事由来の遊離脂肪酸によって活性化することによって、インスリン分泌を促進するホルモンとして知られているGLP-1や消化酵素分泌促進因子コレシストキニン (CCK)が分泌されることを明らかにした<sup>43,47</sup>。また、マウス腸管内分泌細胞であるSTC-1細胞を遊離脂肪酸により刺激することによっても、同様の効果が得られることを示した<sup>48</sup>。STC-1細胞の遊離脂肪酸によるGLP-1やCCKの分泌、及び細胞内カルシウム濃度の応答は、GPR120特異的なsiRNA発現ベクターの導入により抑制された<sup>47</sup>。また、遊離脂肪酸をマウス結腸に直接投与することにより、血中GLP-1濃度及びインスリン濃度が上昇した<sup>43</sup>ことから、GLP-1やCCKといったインクレチン分泌促進がin vivoでのGPR120を介した遊離脂肪酸の機能であると推定される。これらのことから、GPR120は創薬標的分子として魅力的であり、非常に注目されている。GPR120とGPR40は類似した特徴を持つ遊離脂肪酸により活性化され、GPR40は直接的に、GPR120は間接的にグルコース誘発性インスリン分泌を促進することから、GPR120

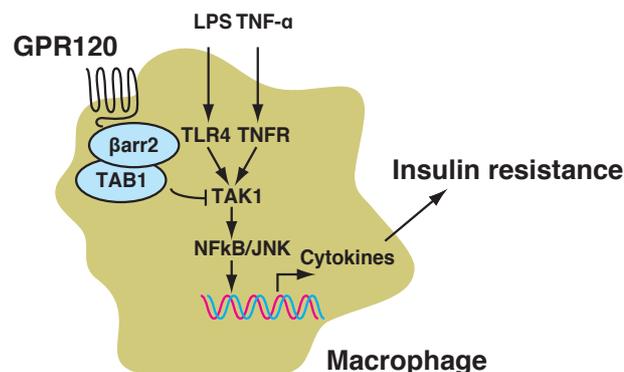


図1. GPR120によって調節されるマクロファージでの抗炎症作用の分子機構模式図。ω3脂肪酸によるGPR120の刺激により、LPS及びTNF $\alpha$ 誘引性TAK1の活性化が抑制され、サイトカイン産生が低下する。LPS, lipopolysaccharide; TNFR, TNF $\alpha$  receptor;  $\beta$ arr2,  $\beta$ -arrestin 2; TAB1, TAK1-binding protein 1; NF- $\kappa$ B, nuclear factor- $\kappa$ B; JNK, Jun-N-terminal kinase. 参考文献46から改変。

とGPR40は共に遊離脂肪酸によるインスリン分泌機構の評価や糖尿病の治療に重要であると考えられる。

このように、これまで腸管における発現が注目されてきたが、近年、GPR120の新たな機能が報告された<sup>46</sup>。Ohらは、GPR120が単球様RAW264.7細胞及び初代培養M1様マクロファージに内因性に発現しており、 $\omega$ 3脂肪酸(DHAやEPA)の受容体として機能することを見出した。 $\omega$ 3脂肪酸によるGPR120刺激により、これらの細胞に置いて広範な抗炎症作用が観られ、その効果はGPR120に対するsiRNAにより抑制された。 $\omega$ 3脂肪酸による抗炎症作用の分子機構は、これらの細胞を用いた*in vitro*実験により詳細に確認されている(図1)。すなわち、GPR120の刺激により、TKR及びTNF $\alpha$ シグナル伝達に共通のシグナル分子であるTAK1のリン酸化と活性化が阻害される。*in vivo*実験によって、野生型マウスでは $\omega$ 3脂肪酸の投与で全身の炎症が低下しインスリン感受性が増強されるが、GPR120欠損マウスではそういった効果が観られないことが示された。これらの結果は、GPR120が $\omega$ 3脂肪酸受容体として機能し、マクロファージ誘導性の組織炎症を抑制することで、全身におけるインスリン感受性や抗糖尿病機能を調節していることを示している。また、マクロファージによる組織の炎症は、動脈硬化等の循環器疾患の主たる原因としても知られており、メタボリックシンドロームを伴う循環器疾患においてもGPR120がなんらかの役割を果たしていることが予想される。

GPR120は、上述の腸管やマクロファージ以外にも、脂肪組織や肺、味蕾等その他の組織でも発現が観られる。これらの組織においても遊離脂肪酸が重要な生理活性を持つことが報告されていることから、GPR120がこれらの組織においてもなんらかの重要な生理機能を担っていると考えられる。しかしながら、こういった組織におけるGPR120の生理機能の解明には更なる研究が必要である。Gotohらは、GPR120がヒト及びマウスの脂肪組織に高発現することを示した<sup>49</sup>。脂肪細胞におけるGPR120の発現量は、前駆脂肪細胞に比較して多く、その発現量は、前駆脂肪細胞株3T3-L1細胞の脂肪分化に伴って上昇した。さらに、siRNAによるGPR120発現量の低下は、脂肪分化を抑制した。これらの結果から、*in vitro*において、GPR120は脂肪細胞の成熟を促進する因子として機能し、脂肪形成に重要な役割を担っていることが示された。しかし、脂肪細胞におけるGPR120の詳細な分子機能は不明である。それゆえに今後、肥満とGPR120の関連に関する研究は非常に興味深いものになることが期待される。実際に、われわれはGPR120の欠損マウスが肥満や脂肪肝といったメタボリックシンドローム様

の表現型を示すことを見出している。Matsumuraらは、GPR120のタンパク発現を、type2味覚細胞(ホスホリパーゼC $\beta$ 2及び $\alpha$ -ガストデュースン陽性)において検出した。これは、GPR120が味細胞の有郭乳頭に存在し、腸管内分泌細胞に発現する受容体のように食物性脂肪を感知していることが示唆される<sup>50</sup>。

GPR120タンパク質を検出することは、その生理機能を解明する上で有用である。われわれは、マウスGPR120の細胞外ドメインを認識する抗体を開発した<sup>51</sup>。この抗体を用いることで、mRNA発現が確認されていた肺及び脂肪組織におけるGPR120タンパク質の検出に成功した。肺においては、クララ細胞マーカーと同一部分が抗GPR120抗体によって染色されたことから、肺におけるGPR120の生理機能の解明が待たれる。

**合成リガンドと構造活性相関** GPR120はGPR40と同様に、その生物学的活性や組織分布から、2型糖尿病やその進行に対する創薬標的として期待され、研究が進められてきた。現在、PPAR $\gamma$ アゴニストからハイスループットスクリーニングにより得られた選択的GPR120アゴニストであるNCG21が報告されている<sup>44</sup>。更に、われわれは活性型ウシロドプシンの結晶構造をテンプレートとしたGPR120のホモロジーモデルに基づき、ドッキングシミュレーションを行った。本モデルを用いたシミュレーションにより、リガンド候補化合物のアゴニスト活性と、化合物-受容体の水素結合エネルギーがよく相関していることを見出した。以上のことから、ホモロジーモデルとドッキングシミュレーションを用いることで、効率的にGPR120に結合する化合物を予測可能となった<sup>52</sup>。

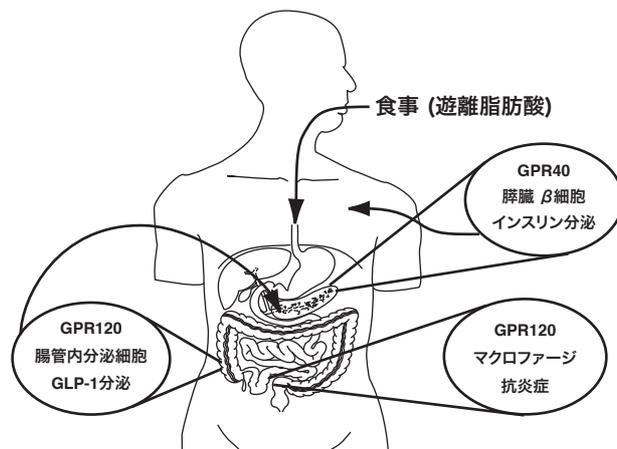


図2. 栄養状態と遊離脂肪酸のコミュニケーションによる恒常性維持メカニズム。遊離脂肪酸受容体は食事由来の栄養素によって活性化されることで糖・脂質代謝の恒常性を維持する。

### iii. おわりに

本総説で紹介したこれらの脂肪酸受容体は、リガンドが食事由来の脂肪酸であることから、食事により取り込んだエネルギー源を指標とし、体内の栄養状態を直接モニターすることによって、種々の生理機能を発揮させ、エネルギーバランスの制御を行っていると考えられる。すなわち、食事由来の栄養状態である外部環境と、生体内ホメオスタシスとのコミュニケーションを説明する分子機構である(図2)。今回紹介した以外にも、現在、これら脂肪酸受容体の選択的リガンド及び遺伝子改変マウスが得られており、その生理的な役割の解明が進んでいる。例えば、最近われわれは短鎖脂肪酸受容体GPR41について、体内のエネルギーバランスを認識することでエネルギー消費を調節し、エネルギーホメオスタシスを維持するという、新たなエネルギー調節機構を明らかにした<sup>53</sup>。われわれの知見は、肥満や糖尿病等に代表されるエネルギー調節障害に対する、GPR41を標的とした予防・治療薬への応用が可能であると期待される。このように、今回紹介した既存の知見以外にも様々な組織において脂肪酸受容体の生理機能の解明が進められており、今後、シグナル伝達分子としての脂肪酸の全く新たな機能が明らかになることで、メタボリックシンドロームの予防と治療へと発展することが期待される。

### 引用文献

- Hara T, Hirasawa A, Ichimura A, Kimura I, Tsujimoto G 2011. Free fatty acid receptors FFAR1 and GPR120 as novel therapeutic targets for metabolic disorders. *J Pharm Sci*.
- Hirasawa A, Hara T, Katsuma S, Adachi T, Tsujimoto G 2008. Free fatty acid receptors and drug discovery. *Biol Pharm Bull* 31 (10) : 1847-1851.
- Ichimura A, Hirasawa A, Hara T, Tsujimoto G 2009. Free fatty acid receptors act as nutrient sensors to regulate energy homeostasis. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 89 (3-4) : 82-88.
- Miyauchi S, Hirasawa A, Ichimura A, Hara T, Tsujimoto G 2010. New frontiers in gut nutrient sensor research : free fatty acid sensing in the gastrointestinal tract. *J Pharmacol Sci* 112 (1) : 19-24.
- Talukdar S, Olefsky JM, Osborn O 2011. Targeting GPR120 and other fatty acid-sensing GPCRs ameliorates insulin resistance and inflammatory diseases. *Trends Pharmacol Sci*.
- Chawla A, Repa JJ, Evans RM, Mangelsdorf DJ 2001. Nuclear receptors and lipid physiology : opening the X-files. *Science* 294 (5548) : 1866-1870.
- Louet JF, Chatelain F, Decaux JF, Park EA, Kohl C, Pineau T, Girard J, Pegorier JP 2001. Long-chain fatty acids regulate liver carnitine palmitoyltransferase I gene (L-CPT I) expression through a peroxisome-proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha)-independent pathway. *Biochem J* 354 (Pt 1) : 189-197.
- Sauer LA, Dauchy RT, Blasko DE 2000. Mechanism for the antitumor and anticachectic effects of n-3 fatty acids. *Cancer Res* 60 (18) : 5289-5295.
- Civelli O 2005. GPCR orphanizations : the novel, the known and the unexpected transmitters. *Trends Pharmacol Sci* 26 (1) : 15-19.
- Briscoe CP, Tadayyon M, Andrews JL, Benson WG, Chambers JK, Eilert MM, Ellis C, Elshourbagy NA, Goetz AS, Minnick DT, Murdock PR, Sauls HR, Jr., Shabon U, Spinage LD, Strum JC, Szekeres PG, Tan KB, Way JM, Ignar DM, Wilson S, Muir AI 2003. The orphan G protein-coupled receptor GPR40 is activated by medium and long chain fatty acids. *J Biol Chem* 278 (13) : 11303-11311.
- Itoh Y, Kawamata Y, Harada M, Kobayashi M, Fujii R, Fukusumi S, Ogi K, Hosoya M, Tanaka Y, Uejima H, Tanaka H, Maruyama M, Satoh R, Okubo S, Kizawa H, Komatsu H, Matsumura F, Noguchi Y, Shinohara T, Hinuma S, Fujisawa Y, Fujino M 2003. Free fatty acids regulate insulin secretion from pancreatic beta cells through GPR40. *Nature* 422 (6928) : 173-176.
- Kotarsky K, Nilsson NE, Flodgren E, Owman C, Olde B 2003. A human cell surface receptor activated by free fatty acids and thiazolidinedione drugs. *Biochem Biophys Res Commun* 301 (2) : 406-410.
- Hara T, Hirasawa A, Sun Q, Sadakane K, Itsubo C, Iga T, Adachi T, Koshimizu TA, Hashimoto T, Asakawa Y, Tsujimoto G 2009. Novel selective ligands for free fatty acid receptors GPR120 and GPR40. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 380 (3) : 247-255.
- Shapiro H, Shachar S, Sekler I, Hershinkel M, Walker MD 2005. Role of GPR40 in fatty acid action on the beta cell line INS-1 E. *Biochem Biophys Res Commun* 335 (1) : 97-104.
- Welters HJ, Diakogiannaki E, Mordue JM, Tadayyon M, Smith SA, Morgan NG 2006. Differential protective effects of palmitoleic acid and cAMP on caspase activation and cell viability in pancreatic beta-cells exposed to palmitate. *Apoptosis* 11 (7) : 1231-1238.
- Salehi A, Flodgren E, Nilsson NE, Jimenez-Felstrom J, Miyazaki J, Owman C, Olde B 2005. Free fatty acid receptor 1 (FFA (1) R/GPR40) and its involvement in fatty-acid-stimulated insulin secretion. *Cell Tissue Res* 322 (2) : 207-215.
- Feng DD, Luo Z, Roh SG, Hernandez M, Tawadros N, Keating DJ, Chen C 2006. Reduction in voltage-gated K+ currents in primary cultured rat pancreatic beta-cells by linoleic acids. *Endocrinology* 147 (2) : 674-682.
- Hirasawa A, Itsubo C, Sadakane K, Hara T, Shinagawa S, Koga H, Nose H, Koshimizu TA, Tsujimoto G 2008. Production and characterization of a monoclonal antibody against GPR40 (FFAR1 ; free fatty acid receptor 1). *Biochem Biophys Res*

- Commun 365 (1) : 22–28.
19. Edfalk S, Steneberg P, Edlund H 2008. Gpr40 is expressed in enteroendocrine cells and mediates free fatty acid stimulation of incretin secretion. *Diabetes* 57 (9) : 2280–2287.
  20. Dobbins RL, Chester MW, Daniels MB, McGarry JD, Stein DT 1998. Circulating fatty acids are essential for efficient glucose-stimulated insulin secretion after prolonged fasting in humans. *Diabetes* 47 (10) : 1613–1618.
  21. Dobbins RL, Chester MW, Stevenson BE, Daniels MB, Stein DT, McGarry JD 1998. A fatty acid- dependent step is critically important for both glucose- and non-glucose-stimulated insulin secretion. *J Clin Invest* 101 (11) : 2370–2376.
  22. Gravena C, Mathias PC, Ashcroft SJ 2002. Acute effects of fatty acids on insulin secretion from rat and human islets of Langerhans. *J Endocrinol* 173 (1) : 73–80.
  23. Stein DT, Esser V, Stevenson BE, Lane KE, Whiteside JH, Daniels MB, Chen S, McGarry JD 1996. Essentiality of circulating fatty acids for glucose-stimulated insulin secretion in the fasted rat. *J Clin Invest* 97 (12) : 2728–2735.
  24. Stein DT, Stevenson BE, Chester MW, Basit M, Daniels MB, Turley SD, McGarry JD 1997. The insulinotropic potency of fatty acids is influenced profoundly by their chain length and degree of saturation. *J Clin Invest* 100 (2) : 398–403.
  25. Steneberg P, Rubins N, Bartoov-Shifman R, Walker MD, Edlund H 2005. The FFA receptor GPR40 links hyperinsulinemia, hepatic steatosis, and impaired glucose homeostasis in mouse. *Cell Metab* 1 (4) : 245–258.
  26. Nagasumi K, Esaki R, Iwachidow K, Yasuhara Y, Ogi K, Tanaka H, Nakata M, Yano T, Shimakawa K, Taketomi S, Takeuchi K, Odaka H, Kaisho Y 2009. Overexpression of GPR40 in pancreatic beta-cells augments glucose-stimulated insulin secretion and improves glucose tolerance in normal and diabetic mice. *Diabetes* 58 (5) : 1067–1076.
  27. Hamid YH, Vissing H, Holst B, Urhammer SA, Pyke C, Hansen SK, Glumer C, Borch-Johnsen K, Jorgensen T, Schwartz TW, Pedersen O, Hansen T 2005. Studies of relationships between variation of the human G protein-coupled receptor 40 Gene and Type 2 diabetes and insulin release. *Diabet Med* 22 (1) : 74–80.
  28. Vettor R, Granzotto M, De Stefani D, Trevellin E, Rossato M, Farina MG, Milan G, Pilon C, Nigro A, Federspil G, Vigneri R, Vitiello L, Rizzuto R, Baratta R, Frittitta L 2008. Loss-of-function mutation of the GPR40 gene associates with abnormal stimulated insulin secretion by acting on intracellular calcium mobilization. *J Clin Endocrinol Metab* 93 (9) : 3541–3550.
  29. Bharate SB, Nemmani KV, Vishwakarma RA 2009. Progress in the discovery and development of small-molecule modulators of G-protein-coupled receptor 40 (GPR40/FFA 1 /FFAR 1) : an emerging target for type 2 diabetes. *Expert Opin Ther Pat* 19 (2) : 237–264.
  30. Garrido DM, Corbett DF, Dwornik KA, Goetz AS, Littleton TR, McKeown SC, Mills WY, Smalley TL, Jr., Briscoe CP, Peat AJ 2006. Synthesis and activity of small molecule GPR40 agonists. *Bioorg Med Chem Lett* 16 (7) : 1840–1845.
  31. Hu H, He LY, Gong Z, Li N, Lu YN, Zhai QW, Liu H, Jiang HL, Zhu WL, Wang HY 2009. A novel class of antagonists for the FFAs receptor GPR40. *Biochem Biophys Res Commun* 390 (3) : 557–563.
  32. Humphries PS, Benbow JW, Bonin PD, Boyer D, Doran SD, Frisbie RK, Piotrowski DW, Balan G, Bechle BM, Conn EL, Dirico KJ, Oliver RM, Soeller WC, Southers JA, Yang X 2009. Synthesis and SAR of 1, 2, 3, 4-tetrahydroisoquinolin-1-ones as novel G-protein-coupled receptor 40 (GPR40) antagonists. *Bioorg Med Chem Lett* 19 (9) : 2400–2403.
  33. Zhang X, Yan G, Li Y, Zhu W, Wang H DC260126, a small-molecule antagonist of GPR40, improves insulin tolerance but not glucose tolerance in obese Zucker rats. *Biomed Pharmacother* 64 (9) : 647–651.
  34. Bharate SB, Rodge A, Joshi RK, Kaur J, Srinivasan S, Kumar SS, Kulkarni-Almeida A, Balachandran S, Balakrishnan A, Vishwakarma RA 2008. Discovery of diacylphloroglucinols as a new class of GPR40 (FFAR 1) agonists. *Bioorg Med Chem Lett* 18 (24) : 6357–6361.
  35. Christiansen E, Urban C, Merten N, Liebscher K, Karlsen KK, Hamacher A, Spinrath A, Bond AD, Drewke C, Ullrich S, Kassack MU, Kostenis E, Ulven T 2008. Discovery of potent and selective agonists for the free fatty acid receptor 1 (FFA (1)/GPR40) , a potential target for the treatment of type II diabetes. *J Med Chem* 51 (22) : 7061–7064.
  36. McKeown SC, Corbett DF, Goetz AS, Littleton TR, Bigham E, Briscoe CP, Peat AJ, Watson SP, Hickey DM 2007. Solid phase synthesis and SAR of small molecule agonists for the GPR40 receptor. *Bioorg Med Chem Lett* 17 (6) : 1584–1589.
  37. Song F, Lu S, Gunnet J, Xu JZ, Wines P, Proost J, Liang Y, Baumann C, Lenhard J, Murray WV, Demarest KT, Kuo GH 2007. Synthesis and biological evaluation of 3-aryl-3-(4-phenoxy)-propionic acid as a novel series of G protein-coupled receptor 40 agonists. *J Med Chem* 50 (12) : 2807–2817.
  38. Zhou C, Tang C, Chang E, Ge M, Lin S, Cline E, Tan CP, Feng Y, Zhou YP, Eiermann GJ, Petrov A, Salituro G, Meinke P, Mosley R, Akiyama TE, Einstein M, Kumar S, Berger J, Howard AD, Thornberry N, Mills SG, Yang L Discovery of 5-aryloxy-2, 4 thiazolidinediones as potent GPR40 agonists. *Bioorg Med Chem Lett* 20 (3) : 1298–1301.
  39. Briscoe CP, Peat AJ, McKeown SC, Corbett DF, Goetz AS, Littleton TR, McCoy DC, Kenakin TP, Andrews JL, Ammala C, Fornwald JA, Ignar DM, Jenkinson S 2006. Pharmacological regulation of insulin secretion in MIN6 cells through the fatty acid receptor GPR40 : identification of agonist and antagonist small molecules. *Br J Pharmacol* 148 (5) : 619–628.
  40. Hara T, Hirasawa A, Sun Q, Koshimizu TA, Itsubo C, Sadakane K, Awaji T, Tsujimoto G 2009. Flow cytometry-based binding assay for GPR40 (FFAR1; free fatty acid receptor 1) . *Mol Pharmacol* 75 (1) : 85–91.
  41. Sum CS, Tikhonova IG, Neumann S, Engel S, Raaka BM, Costanzi S, Gershengorn MC 2007. Identification of residues important for agonist recognition and activation in GPR40. *J*

- Biol Chem 282 (40) : 29248–29255.
42. Awaji T, Hirasawa A, Kataoka M, Shinoura H, Nakayama Y, Sugawara T, Izumi S, Tsujimoto G 1998. Real-time optical monitoring of ligand-mediated internalization of alpha1b-adrenoceptor with green fluorescent protein. *Mol Endocrinol* 12 (8) : 1099–1111.
  43. Hirasawa A, Tsumaya K, Awaji T, Katsuma S, Adachi T, Yamada M, Sugimoto Y, Miyazaki S, Tsujimoto G 2005. Free fatty acids regulate gut incretin glucagon-like peptide-1 secretion through GPR120. *Nat Med* 11 (1) : 90–94.
  44. Suzuki T, Igari S, Hirasawa A, Hata M, Ishiguro M, Fujieda H, Itoh Y, Hirano T, Nakagawa H, Ogura M, Makishima M, Tsujimoto G, Miyata N 2008. Identification of G protein-coupled receptor 120-selective agonists derived from PPARgamma agonists. *J Med Chem* 51 (23) : 7640–7644.
  45. Katsuma S, Hatae N, Yano T, Ruike Y, Kimura M, Hirasawa A, Tsujimoto G 2005. Free fatty acids inhibit serum deprivation-induced apoptosis through GPR120 in a murine enteroendocrine cell line STC-1. *J Biol Chem* 280 (20) : 19507–19515.
  46. Oh DY, Talukdar S, Bae EJ, Imamura T, Morinaga H, Fan W, Li P, Lu WJ, Watkins SM, Olefsky JM GPR120 is an omega-3 fatty acid receptor mediating potent anti-inflammatory and insulin-sensitizing effects. *Cell* 142 (5) : 687–698.
  47. Tanaka T, Katsuma S, Adachi T, Koshimizu TA, Hirasawa A, Tsujimoto G 2008. Free fatty acids induce cholecystokinin secretion through GPR120. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 377 (4–6) : 523–527.
  48. Sidhu SS, Thompson DG, Warhurst G, Case RM, Benson RS 2000. Fatty acid-induced cholecystokinin secretion and changes in intracellular Ca<sup>2+</sup> in two enteroendocrine cell lines, STC-1 and GLUTag. *J Physiol* 528 Pt 1 : 165–176.
  49. Gotoh C, Hong YH, Iga T, Hishikawa D, Suzuki Y, Song SH, Choi KC, Adachi T, Hirasawa A, Tsujimoto G, Sasaki S, Roh SG 2007. The regulation of adipogenesis through GPR120. *Biochem Biophys Res Commun* 354 (2) : 591–597.
  50. Matsumura S, Mizushige T, Yoneda T, Iwanaga T, Tsuzuki S, Inoue K, Fushiki T 2007. GPR expression in the rat taste bud relating to fatty acid sensing. *Biomed Res* 28 (1) : 49–55.
  51. Miyauchi S, Hirasawa A, Iga T, Liu N, Itsubo C, Sadakane K, Hara T, Tsujimoto G 2009. Distribution and regulation of protein expression of the free fatty acid receptor GPR120. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 379 (4) : 427–434.
  52. Sun Q, Hirasawa A, Hara T, Kimura I, Adachi T, Awaji T, Ishiguro M, Suzuki T, Miyata N, Tsujimoto G Structure-activity relationships of GPR120 agonists based on a docking simulation. *Mol Pharmacol* 78 (5) : 804–810.
  53. Kimura I, Inoue D, Maeda T, Hara T, Ichimura A, Miyauchi S, Kobayashi M, Hirasawa A, Tsujimoto G Short-chain fatty acids and ketones directly regulate sympathetic nervous system via G protein-coupled receptor 41 (GPR41). *Proc Natl Acad Sci U S A* 108 (19) : 8030–8035.

## ●ベーシック

## 日本心脈管作動物質学会研究奨励賞受賞論文

2

血管内皮細胞のアドレノメデュリン-RAMP2 システム  
による血管恒常性維持機構

小山 晃英, 桜井 敬之, 神吉 昭子, 新藤 優佳, 河手 久香, 荒居 琢磨, 家里 康弘, 吉沢 隆浩,  
楊 磊, 植竹 龍一, 五十嵐 恭子, 鳥山 佑一, 沖村 綾乃, 山内 啓弘, 田中 愛, 新藤 隆行  
信州大学医学系研究科臓器発生制御医学講座

## I. はじめに

血管は全身に分布して、生体機能の維持に必須の役割を果たす。一方で、血管の障害は、癌、脳卒中、心臓病の3大生活習慣病の病態にも深く関わっている。さらに血管の恒常性維持のための調節システムの異常と、その修復過程の破綻は、様々な慢性臓器障害の原因となる。血管の恒常性維持において中心となるのが、血管内皮細胞である。血管内皮細胞は血管構成細胞の中でも、体内最大の臓器間ネットワークを形成し、体内恒常性を維持する生理活性分子を産生する(1-3)。

ナトリウム利尿ペプチド、エンドセリン、アドレノメデュリンなどの重要な生体内生理活性分子の発見は我が国でなされ、その後の研究も我が国が世界をリードしてきた。これらの分子は、多彩な生理活性を有し、生体内恒常性維持において重要な役割を有する。中でもアドレノメデュリン(Adrenomedullin: AM)は、血管をはじめ全身の組織で広範に産生される血管作動物質である。AMは血管拡張物質として発見され、高血圧、心不全、腎不全などで血中濃度が上昇することから、各疾患への関与も示唆されてきた。

AMは、全身の組織に広く分布し、血管においては血管内皮細胞や、平滑筋細胞から産生される。AMは当初、血管拡張作用を有する血管作動物質として注目されたが、その後の研究から、抗炎症作用、抗アポトーシス作用、抗酸化作用など、多彩な生理活性を有することが明らかとなってきた。AMノックアウトマウス(AM<sup>-/-</sup>)は、胎生期の血管の発達が未熟であり、血管の構造に異常を認め、胎生致死となる(4)。このことから、AMが血管の発生に必須であることが明らかとなった。また、

AMヘテロノックアウトマウス(AM<sup>+/-</sup>)は、成体まで成長し、外見の変化はないが、心血管系に傷害を加えたときの心肥大、線維化、腎障害、動脈硬化が亢進している。これに対し、血管特異的AM過剰発現マウスでは、臓器障害や動脈硬化に抵抗性を示すことから、AMが臓器保護作用、抗動脈硬化作用を有することが報告されている(5-9)。

一方、AMとそのファミリー因子であるカルシトニン遺伝子関連ペプチド(CGRP)は、CLR(calcitonin-receptor-like receptor)という7回膜貫通Gタンパク共役型受容体を共有している(10)。AMとCGRPに対するCLRの特異性は、1回膜貫通型タンパクである受容体活性調節タンパクRAMP(receptor-activity-modifying-protein)により規定されていると考えられている。RAMPには、RAMP1, 2, 3の3種類が報告されている。CLR+RAMP1の組み合わせは主としてCGRPの受容体として作用し、CLR+RAMP2, CLR+RAMP3では、主としてAM受容体として機能する。

AM<sup>-/-</sup>が致死となる直前の胎生期の血管内皮細胞においては、受容体活性調節タンパクRAMPのサブユニットフォームの中でも、特にRAMP2の発現が亢進していた。実際に、RAMP2単独ノックアウトマウス(RAMP2<sup>-/-</sup>)を作製してみると、RAMP2<sup>-/-</sup>はAM<sup>-/-</sup>同様、血管の発達不全、構造異常、著明な浮腫(図1)や出血などにより、胎生致死であった(11)。RAMP2<sup>-/-</sup>胎児の血管における遺伝子発現の変化を検討すると、

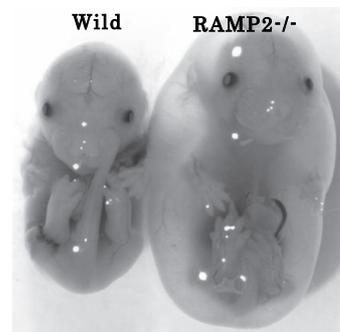


図1. RAMP2ノックアウトマウス胎仔(E14.5)の外観

\* 信州大学医学系研究科臓器発生制御医学講座  
(〒390-8621 長野県松本市旭3丁目1番1号)

RAMP2が欠損することによって、代償性のAMの発現亢進が認められたが、CLRやその他のRAMP発現量に変化が認められず、RAMP2欠損によりAMの受容体機能が失われること、その他のRAMPサブアイソフォームとの間には機能的な相補性がなく、血管の正常な発生にはAM-RAMP2系が必要であることが示された。

## II. 方法と結果

### 1) 血管内皮細胞特異的RAMP2ノックアウトマウス胎生期の表現形

本研究では、血管におけるRAMP2の病態生理学的意義を明らかとするために、RAMP2 floxマウスと、血管内皮細胞特異的にCreリコンビナーゼを発現するvascular endothelial (VE)-cadherin Cre transgenic マウス (12) を交配し、Cre-lox Pシステムにより、血管内皮細胞特異的RAMP2ノックアウトマウス (E-RAMP2<sup>-/-</sup>) を新たに作製した。

E-RAMP2<sup>-/-</sup>は、全身型のRAMP2ホモノックアウトマウス (Conventional RAMP2<sup>-/-</sup>) と比較して、胎生後期まで発生段階が進むものの、表現形が強いものでは、周産期に全身性の著明な浮腫とそれに伴う体重の増加が認められ、ほとんどの個体で、周産期の死亡が確認された (図2)。血管の電顕像からは、平滑筋細胞に変化は認められないが、内皮細胞では基底膜からの部分的な剥離が確認された。E-RAMP2<sup>-/-</sup>胎児の組織では、腸管絨毛の毛細血管の構造異常、肺の間質の浮腫、電顕像では血管内皮細胞の空胞化や基底膜からの剥離などが認められた。



図2. 血管内皮細胞特異的RAMP2ノックアウトマウス (E-RAMP2<sup>-/-</sup>) 胎児 (E19.5) の外観

### 2) 血管内皮細胞特異的RAMP2ノックアウトマウス成体期の表現形

コンディショナルターゲティングによるE-RAMP2<sup>-/-</sup>では、RAMP2欠損の浸透率は100%ではない。E-RAMP2<sup>-/-</sup>のうち、RAMP2遺伝子発現が一部残った個体では成体が得られた。成体のE-RAMP2<sup>-/-</sup>は、野生型マウスと比較して血圧が低下しており、胸部大動脈の病理所見では、収縮性が失われたように血管が拡張していた。さらに、6ヶ月齢E-RAMP2<sup>-/-</sup>の大動脈では、細胞の老化の

マーカーとなるsenescence-associated- $\beta$ -galactosidase (SA- $\beta$ -gal) 染色陽性の所見が認められた。電顕による観察では、内皮細胞の基底膜からの剥離と、平滑筋層の断裂化が観察された (図3)。大動脈のリング標本のex vivo培養を行うと、E-RAMP2<sup>-/-</sup>では、標本からの血管新生が著明に低下している事が観察された。これらの結果から、E-RAMP2<sup>-/-</sup>成体では、血管内皮細胞のみならず、平滑筋にも構造異常を認め、両者の機能障害を生じていることが示唆された。

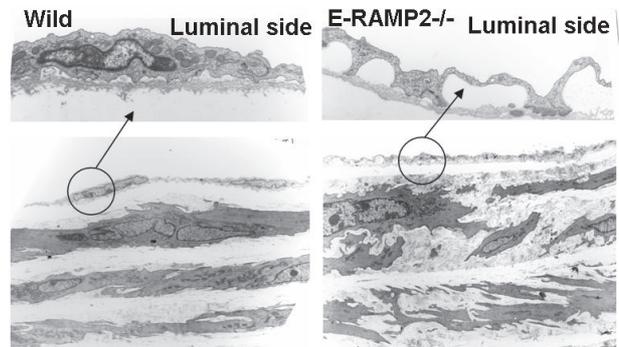
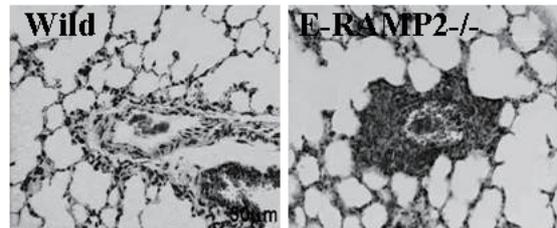


図3. 6ヶ月齢マウスの成体の血管壁の電顕像

E-RAMP2<sup>-/-</sup>では、血管内皮細胞の基底膜からの剥離と血管平滑筋層の断裂化を認める。

全身型のRAMP2ヘテロノックアウトマウス (Conventional RAMP2<sup>+/-</sup>) は成体まで成長し、外見上の変化は認めないが、1年齢を超える加齢マウスでは、肺、腎臓、肝臓といった主要な臓器に血管炎様の細胞浸潤が自然発症し、胸部大動脈では、SA- $\beta$ -gal染色陽性の所見が認められる。さらに、炎症性接着因子であるICAM-1、VCAM-1が、8週齢の若年期から発現が亢

### 肺



### 肝臓

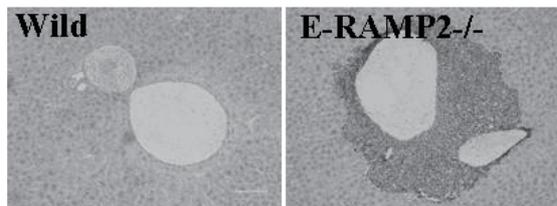


図4. 6ヶ月齢マウスの肺と肝臓の病理像

進している。一方、E-RAMP2<sup>-/-</sup>では、RAMP2<sup>+/-</sup>より、病変がさらに早期に出現した(図4)。血管炎様の所見は若年期でも認められ、6ヶ月齢程になると、より著明となった。浸潤細胞は、CD3やF4/80陽性細胞が多いことからTリンパ球やマクロファージの浸潤による慢性炎症が生じていることが示唆された。

これらの細胞浸潤のメカニズムを検討するために、野生型とRAMP2<sup>+/-</sup>から、肝臓類洞内皮細胞を初代培養し、マクロファージの接着実験をおこなった。RAMP2<sup>+/-</sup>由来の内皮細胞では、野生型と比較して、マクロファージの接着性が亢進していた。また、Real-time PCR法により内皮細胞の遺伝子発現を検討したところ、RAMP2<sup>+/-</sup>の肝臓類洞内皮細胞では、VCAM-1の発現亢進、eNOSの発現低下が認められた。

E-RAMP2<sup>-/-</sup>の肝臓においては、6ヶ月齢以上の一部のマウスで、肝硬変様の形態変化が認められた(図5)。肝臓組織のSirius red染色による検討では、通常の肝硬変とは異なり、線維化は肝細胞側ではなく、血管の走行に沿って進行していることが認められた。

E-RAMP2<sup>-/-</sup>の腎臓では、水腎症と多発性嚢胞腎が自然発症し、嚢胞の周囲には線維化が著明であった(図6)。糸球体も拡大しており、糸球体硬化症を伴っていると考えられた。電顕像からは、糸球体において、足突起の融合、基底膜の肥厚、内皮細胞と基底膜の部分的離開などが確認された。

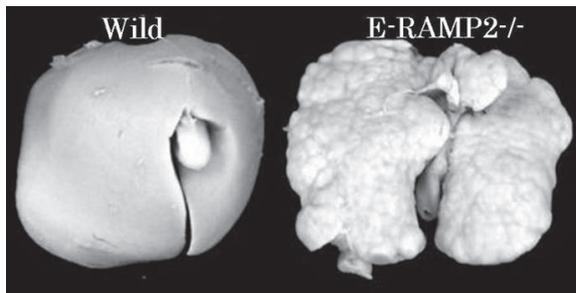


図5. 6ヶ月齢マウスの肝臓の外観

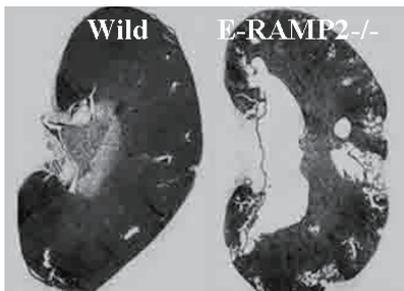


図6. 6ヶ月齢マウスの腎臓の断面像

### 3) 血管内皮細胞におけるAM-RAMP2システムと酸化ストレス

AMは、強い抗酸化作用を有することが報告されている。E-RAMP2<sup>-/-</sup>における臓器障害の原因として、酸化ストレス亢進の可能性を考え、スーパーオキシドの産生を示すdihydroethidine (DHE) 染色、不飽和脂肪酸の過酸化物である4-hydroxy-2-nonenal (4 HNE)の免疫染色、NADPH oxidaseの細胞質型のサブユニットであるp67-phoxの免疫染色を行った。E-RAMP2<sup>-/-</sup>の肝臓では、斑状にDHE、p67phox陽性所見を認め、中心静脈周囲に4 HNE陽性所見を認めた。腎臓では、DHE、4 HNE、p67-phoxともに尿細管に強い陽性所見が認められた。また腎臓では、NADPH-oxidaseのサブユニットであるp22<sup>-</sup>、p47<sup>-</sup>、p67-phoxの遺伝子発現が亢進していた。

酸化ストレスへの応答性におけるAM-RAMP2系の意義を検討するため、ヒト臍帯静脈内皮細胞を細胞株化したEAhy926細胞に、RAMP2を安定過剰発現させた細胞を作製した(11)。この細胞を用いて、早期老化(premature senescence)を引き起こすことが知られている。細胞への過酸化水素負荷実験を行った。RAMP2過剰発現細胞では、AM投与下において、コントロールと比較して、老化マーカーであるSA-β-galの染色性が低下していた。

### 4) 薬剤誘導型血管内皮細胞特異的RAMP2ノックアウトマウス成体期の表現形

E-RAMP2<sup>-/-</sup>は、得られる成体が少ないため、成体期の解析に限界があった。このため、次に薬剤誘導性によりオンデマンドに内皮細胞のRAMP2を欠損させることができるdrug induced-E-RAMP2<sup>-/-</sup> (DI-E-RAMP2<sup>-/-</sup>)を作成した。このマウスでは、RAMP2欠損誘導とともに、著しい体重増加を認めた。Evans Blueを用いた血管透過性アッセイの結果、血管透過性の亢進が確認された。さらに、RAMP2欠損誘導早期から内皮細胞の接着因子の発現の亢進と、腎糸球体内皮細胞の蜂の巣状の構造異常が認められた(図7)。

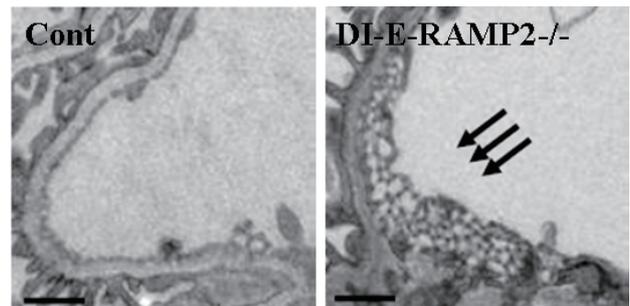


図7. DI-E-RAMP2<sup>-/-</sup>の糸球体の電顕像

このマウスを用いて、下肢虚血モデルを作製し、血管新生の評価を行った。DI-E-RAMP2<sup>-/-</sup>では、対照群と比較して血流の回復遅延、免疫染色から毛細血管の発達不全、間質の浮腫の増悪などが認められた。

### Ⅲ. 考察

Conventional RAMP2<sup>-/-</sup>は血管壁の構造異常により致死となる。一方、E-RAMP2<sup>-/-</sup>は、Conventional RAMP2<sup>-/-</sup>と比較して発生段階は進むものの、全身性の浮腫を引き起こし、肺の間質浮腫による呼吸不全、親マウスによる喰殺、育児放棄、授乳障害、腸管絨毛の浮腫による栄養吸収障害など諸々の原因から、周産期にほとんどのマウスが死亡する。Conventional RAMP2<sup>-/-</sup>マウスの胎生期の血管壁では、4型コラーゲンやアクチンの発現低下が認められ、電顕像から血管壁の菲薄化と層状構造の破綻が観察される。これらのことから、RAMP2<sup>-/-</sup>では、血管を構成する細胞の分化自体は認められるものの、血管壁構造が脆弱なため、血液循環開始後、最終的に血管が破綻してしまうと考えられた。一方、E-RAMP2<sup>-/-</sup>では、血管内皮細胞の異常が、表現形の主因であると考えられ、内皮細胞間の結合の脆弱性、基底膜からの剥離などにより、血管内成分が漏れ出て、全身性の浮腫になったと予想される。今回、E-RAMP2<sup>-/-</sup>の多くが全身性の浮腫により致死となったことから、血管内皮細胞の異常が、RAMP2<sup>-/-</sup>の浮腫の表現形の主因となっていることが明らかとなった。

一部のE-RAMP2<sup>-/-</sup>では成体が得られ、病理学的解析を中心に解析を進めた。E-RAMP2<sup>-/-</sup>成体の胸部大動脈は、内皮細胞のみならず平滑筋細胞にも構造異常が観察された。E-RAMP2<sup>-/-</sup>では、胎児期から内皮細胞が基底膜から剥離しており、様々なストレスが血管平滑筋層に大きく加わることで、平滑筋細胞の形質変換を生じ、血管の収縮力低下による血圧低下を引き起こしているのではないかと推測された。

各主要臓器では、血管炎様の細胞浸潤が認められた。これらの血管炎様の所見は、若年期でも認められるが、生後6ヶ月ほど経過した個体において、より広範囲に現れる。同様の所見は、RAMP2<sup>+/-</sup>でも生後1年後くらいから徐々に認められる。一方でE-RAMP2<sup>-/-</sup>では、RAMP2<sup>+/-</sup>より、病変がより早期に出現する。前述したように、E-RAMP2<sup>-/-</sup>では動脈壁の内皮細胞と平滑筋細胞の構造異常が確認されている。さらに薬剤誘導型で成体期から内皮細胞のRAMP2を欠損することが可能となるDI-E-RAMP2<sup>-/-</sup>では、RAMP2欠損誘導早期の段階から内皮細胞の接着因子の発現亢進が認められた。これら

のことから、内皮細胞の機能不全を端に、血管構成細胞の形態が変化し、Transmigrationが起りやすい環境であることがわかる。

肝臓では、血管炎様の細胞浸潤のみならず、肝硬変様の形態変化が確認できた。さらにF4/80染色では、活性化されたマクロファージが多数確認できることから、慢性炎症が起きていることが示唆される。また、線維化は中心静脈周辺から広がるのではなく、類洞内皮細胞に沿って進行していることから、類洞内皮細胞の障害が、肝線維化のプライマリーな原因となっていることが予想された。腎臓においても、アドレノメデュリンのカウンターパートナーとされるエンドセリンの血管特異的過剰発現マウスが、加齢により嚢胞腎や糸球体硬化症などの腎障害を示す。このことからE-RAMP2<sup>-/-</sup>の腎臓における病態は、内皮細胞の慢性傷害に起因することが予想される(13)。

E-RAMP2<sup>-/-</sup>の肝臓、腎臓における、superoxide、酸化脂質、NADPH oxidaseの亢進が免疫染色、mRNAから確認された。AMには、強力な酸化ストレス抑制効果があり、E-RAMP2<sup>-/-</sup>では酸化ストレスの亢進が臓器障害を促進した一つの原因と考えられる。一方、RAMP2の過剰発現内皮細胞に、過酸化水酸負荷をおこなったところ、コントロールと比較して耐性を示した。このことから、RAMP2は、AMを介して酸化ストレスの制御を可能とすることが示唆された。

### Ⅳ. おわりに

今回の一連のノックアウトマウスの解析結果は、血管内皮細胞のRAMP2という、単独の因子の異常が、発生・成体での双方の血管の恒常性維持破綻をもたらすことを示した初めての知見である。本研究により、AMの発生における血管新生作用が主として血管内皮細胞のRAMP2によって規定されていることが明らかとなった。成体においても血管内皮細胞のRAMP2の急性欠損により、血管新生の低下など、血管の機能不全を生じることが明らかとなった。さらにRAMP2の慢性欠損により、内皮細胞の恒常性が破綻し、血管の老化が亢進し、最終的に全身の臓器不全を引き起こすことが示された。生理活性ペプチドそのものは血中半減期が短いため、慢性疾患の治療薬として応用するには制約がある。これに対し、受容体側の調節因子である膜タンパクRAMPを標的とすれば半減期の問題はなく、慢性疾患への応用に道が拓ける。AM-RAMP2システムの血管恒常性維持機構の解明は、これまで有効な手段がなかった慢性炎症と慢性臓器不全の新しい治療法開発に繋がることが期待される。

## 文 献

1. Mochizuki N : Vascular integrity mediated by vascular endothelial cadherin and regulated by sphingosine 1-phosphate and angiopoietin-1. *Circ J* 73 : 2183–2191, 2009
2. Higashi Y, Noma K, Yoshizumi M, Kihara Y : Endothelial function and oxidative stress in cardiovascular diseases. *Circ J* 73 : 411–418, 2009
3. Dejana E: Endothelial cell-cell junctions: happy together. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5 : 261–270, 2004
4. Shindo T, Kurihara Y, Nishimatsu H, Moriyama N, Kakoki M, Wang Y, Imai Y, Ebihara A, Kuwaki T, Ju KH, Minamino N, Kangawa K, Ishikawa T, Fukuda M, Akimoto Y, Kawakami H, Imai T, Morita H, Yazaki Y, Nagai R, Hirata Y, Kurihara H : Vascular abnormalities and elevated blood pressure in mice lacking adrenomedullin gene. *Circulation* 104 : 1964–1971, 2001
5. Shindo T, Kurihara H, Maemura K, Kurihara Y, Kuwaki T, Izumida T, Minamino N, Ju KH, Morita H, Oh-hashii Y, Kumada M, Kangawa K, Nagai R, Yazaki Y : Hypotension and resistance to lipopolysaccharide-induced shock in transgenic mice overexpressing adrenomedullin in their vasculature. *Circulation* 101 : 2309–2316, 2000
6. Niu P, Shindo T, Iwata H, Iimuro S, Takeda N, Zhang Y, Ebihara A, Suematsu Y, Kangawa K, Hirata Y, Nagai R : Protective effects of endogenous adrenomedullin on cardiac hypertrophy, fibrosis, and renal damage. *Circulation* 109 : 1789–1794, 2004
7. Niu P, Shindo T, Iwata H, Ebihara A, Suematsu Y, Zhang Y, Takeda N, Iimuro S, Hirata Y, Nagai R : Accelerated cardiac hypertrophy and renal damage induced by angiotensin II in adrenomedullin knockout mice. *Hypertens Res* 26 : 731–736, 2003
8. Nishimatsu H, Hirata Y, Shindo T, Kurihara H, Kakoki M, Nagata D, Hayakawa H, Satonaka H, Sata M, Tojo A, Suzuki E, Kangawa K, Matsuo H, Kitamura T, Nagai R : Role of endogenous adrenomedullin in the regulation of vascular tone and ischemic renal injury: studies on transgenic/knockout mice of adrenomedullin gene. *Circ Res* 90 : 657–663, 2002
9. Imai Y, Shindo T, Maemura K, Sata M, Saito Y, Kurihara Y, Akishita M, Osuga J, Ishibashi S, Tobe K, Morita H, Oh-hashii Y, Suzuki T, Maekawa H, Kangawa K, Minamino N, Yazaki Y, Nagai R, Kurihara H : Resistance to neointimal hyperplasia and fatty streak formation in mice with adrenomedullin overexpression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22:1310–1315, 2002
10. McLatchie LM, Fraser NJ, Main MJ, Wise A, Brown J, Thompson N, Solari R, Lee MG, Foord SM : RAMPs regulate the transport and ligand specificity of the calcitonin-receptor-like receptor. *Nature* 393 : 333–339, 1998
11. Ichikawa-Shindo Y, Sakurai T, Kamiyoshi A, Kawate H, Iinuma N, Yoshizawa T, Koyama T, Fukuchi J, Iimuro S, Moriyama N, Kawakami H, Murata T, Kangawa K, Nagai R, Shindo T : The GPCR modulator protein RAMP2 is essential for angiogenesis and vascular integrity. *J Clin Invest* 118 : 29–39, 2008
12. Kogata N, Arai Y, Pearson JT, Hashimoto K, Hidaka K, Koyama T, Somekawa S, Nakaoka Y, Ogawa M, Adams RH, Okada M, Mochizuki N : Cardiac ischemia activates vascular endothelial cadherin promoter in both preexisting vascular cells and bone marrow cells involved in neovascularization. *Circ Res* 98 : 897–904, 2006
13. Shindo T, Kurihara H, Maemura K, Kurihara Y, Ueda O, Suzuki H, Kuwaki T, Ju KH, Wang Y, Ebihara A, Nishimatsu H, Moriyama N, Fukuda M, Akimoto Y, Hirano H, Morita H, Kumada M, Yazaki Y, Nagai R, Kimura K : Renal damage and salt-dependent hypertension in aged transgenic mice overexpressing endothelin-1. *J Mol Med* 80 : 105–116, 2002



## (プロ)レニン受容体/ATP6 AP2における最新の知見

木内 謙一郎<sup>1</sup>, 市原 淳弘<sup>2</sup>, 伊藤 裕<sup>1</sup><sup>1</sup>慶應義塾大学医学部腎臓内分泌代謝内科, <sup>2</sup>東京女子医科大学高血圧内分泌内科

## I. 要旨

(プロ)レニン受容体[(P)RR]は組織においてレニン・プロレニンと結合し、レニン活性を上昇させる、あるいはプロレニンにレニン活性を賦与するだけでなく、受容体を介した独自の細胞内シグナルを発生させるユニークな分子である。局所のレニン-アンジオテンシン系(RAS)の調節因子として、(P)RRの活性化は高血圧や糖尿病における心臓線維化や蛋白尿の進展に重要な役割を果たしている。大変興味深いことに、(P)RRのC末端側ドメインはATP6 AP2と呼ばれており、液胞型プロトンATPase (V-ATPase)と局在を共にしていることが示されている。V-ATPaseはサブユニットから構成される複合タンパク水素イオン輸送体で、受容体を介したエンドサイトーシス、タンパクやシグナル分子の修飾、膜輸送、ライソソーム酵素の活性化など、様々な基本的な細胞機能に関与している。V-ATPaseにおける(P)RRの役割は、これまでの研究で示唆されているほか、最近も精力的に研究にされている。さらに、(P)RRにはV-ATPaseとWnt受容体複合体との間の介在タンパクとしての新しい機能があることが発見された。このように、(P)RRは複数の機能を有する分子であり、その構造と挙動は複雑である。本総説では、(P)RRと哺乳類のV-ATPaseの機能に焦点を当て、現在得られている知見と今後の研究の展望について述べる。

## II. 緒言

(プロ)レニン受容体(以下(P)RR)はレニン・プロ

レニンの受容体として2002年にクローニングされた分子である<sup>1)</sup>。(P)RRと結合したレニンはレニン酵素活性が上昇し、プロレニンはレニン活性を獲得するだけでなく、アンジオテンシンIIと独立した細胞内伝達を引き起こす。(P)RRは局所レニン-アンジオテンシン系に重要な役割を果たし、更に(P)RR独自の細胞内伝達経路が高血圧や糖尿病における心臓線維化や蛋白尿に関与していることが示されてきた<sup>2-5)</sup>。また我々の研究により、

(P)RRは哺乳類のV-ATPaseと呼ばれる巨大な複合タンパクの構造と機能に必須の分子であることが明らかになった<sup>6)</sup>。V-ATPaseは、受容体を介したエンドサイトーシス、小胞膜輸送、ライソソーム酵素の活性化など様々な細胞機能に関与することが知られている。また、

(P)RRはV-ATPaseとWnt受容体複合体との介在タンパクとしての機能も担っていることが報告された<sup>7)</sup>。このように(P)RRは複数の機能を有し、複雑な構造と挙動を示す非常にユニークな分子である。本総説では(P)RRの機能の中で、特にV-ATPaseのサブユニットATP6 AP2としての機能に特に焦点を当てる。

## III. 臓器障害と(P)レニン受容体

レニンは非活性前駆体であるプロレニンから産生される。血漿プロレニン値は健常者と比較して糖尿病患者で高いだけでなく、糖尿病患者の中でも微量アルブミン尿を認める症例の方が、認めない症例と比して血漿プロレニン値が高いことが知られている<sup>8-10)</sup>。糖尿病において血漿プロレニン値が上昇する原因は明らかになっていないが、レニン遺伝子の発現亢進やプロレニンのレニンへの変換が低下している可能性が指摘されている。プロレニンはN末端側に43アミノ酸から構成されるプロセグメントを有する。プロセグメントはレニン酵素活性中心を覆い、アンジオテンシノーゲンの接近を阻害していると考えられている。プロレニンの活性化はアミノ酸切断を

\* 1 慶應義塾大学医学部腎臓内分泌代謝内科  
(〒160-8582 東京都新宿区信濃町35)

\* 2 東京女子医科大学高血圧内分泌内科  
(〒162-8666 東京都新宿区河田町8-1)

介すもの(酵素融解的活性化)と介さないもの(非酵素融解的活性化)の2通りが存在する。レニン酵素活性において生理的に重要な経路は、プロレニンのプロセグメント部分の切断であり、これによりレニン酵素活性中心へのアンジオテンシノーゲンの接近が可能になり、アンジオテンシンIの産生が起こる。生体内においては、プロレニンの酵素融解的活性化は非可逆の現象で、ほとんどが腎臓の傍糸球体細胞において起こる。一方、プロレニンの非酵素融解的活性化は可逆の現象で、レニン酵素活性領域を閉鎖しているプロセグメントが開く現象と捉えることが出来る。非酵素融解的活性化は*in vitro*において低温度や低pH(約3.3)で引き起こすことが可能である<sup>11)</sup>。(P)RRはプロレニンの非酵素融解的活性化を引き起こすことが出来る分子として、ヒト腎臓のメサンギウム細胞から同定された<sup>1)</sup>。(P)RRに結合したプロレニンはプロセグメントの切断を受けることなく、その構造を変化させレニン酵素活性を獲得し、局所においてアンジオテンシンIを産生する。従って、高血圧、糖尿病、更には妊娠高血圧症候群などの局所のRAS活性化が関与する病態における臓器障害に、(P)RR結合プロレニンが重要な役割を果たしている可能性が考えられる<sup>2-5,12)</sup>。更に(P)RRはアンジオテンシンII受容体と独立した細胞内シグナルを持つ。(P)RRの活性化はmitogen activated protein (MAP) kinasesであるextracellular signal-regulated kinase (ERK) 1/2やp38を介し、アンジオテンシンIIと独立して線維化マーカーやCOX2遺伝子の発現上昇をもたらす。臓器障害に重要な役割を果たすことが報告されている。また、(P)RRを阻害すると高血圧や糖尿病モデルにおいて、心臓線維化や蛋白尿が抑制されることも示されている<sup>2-5)</sup>。これらの知見から(P)RRを欠損させるとRASが活性化している状態において臓器保護効果を示すことが予測された。

#### IV. 発生における(プロ)レニン受容体の意義

これまでの研究でV-ATPaseの機能における(P)RRの役割が示唆されている。(P)RRを欠損したマウスの胚幹細胞を胚盤胞に導入してもキメラを形成することが出来ないことが分かっている。レニン、アンジオテンシノーゲン、アンジオテンシンtype I受容体など、RAS関連物質の欠損モデルは致死ではないことから、(P)RRにはRASと独立した生物の生存に必須な機能が関与していることが示唆された<sup>13-15)</sup>。また、(P)RRが変異したゼブラフィッシュでは、早期に眼球や皮膚の色素沈着異常、神経細胞死などの発達異常を示し、発達早期に死亡することから、神経細胞やメラノサイトにおいて重要

な機能を担っていることが示唆された<sup>16)</sup>。V-ATPaseのサブユニットの変異型ゼブラフィッシュは(P)RR変異型ゼブラフィッシュと同様の表現形を示すことから<sup>16)</sup>、(P)RRとV-ATPaseの間に機能的な関連があることが示唆された。アフリカツメガエルにおいても初期胚に(P)RRに対するmorpholino RNAを投与したところ、頭部や尾部の低形成、眼球の色素沈着低下など、(P)RR変異型ゼブラフィッシュと同様の表現形が観察された。<sup>7)</sup>ヒトにおいては、伴性劣性遺伝を示す家族性てんかんの一家系において、(P)RR遺伝子エクソンのsplice enhancerに点突然変異が入っていることが分かっており、(P)RRが神経細胞の機能に関与する可能性が示唆されている<sup>17,18)</sup>。以上より(P)RR遺伝子の変異や欠損によって観察される表現形から、(P)RRが発生や細胞生存に重要な役割を果たしていることが考えられる。これまで(P)RR欠損マウスの作成を数多くのグループが精力的に試みてきたが、(P)RR欠損胚性幹細胞は胚盤胞に導入した際にキメラ形成せず成功していなかった<sup>19)</sup>。このため、胎生致死を回避するため、組織特異的(P)RR欠損マウスの作成に我々のグループが初めて成功した<sup>6)</sup>。驚くべきことに、心筋細胞特異的(P)RR欠損マウスは劇症の心不全を発症し、全例が早期に死亡した。(P)RR欠損心筋細胞は無数の空胞が核周囲に蓄積し、中には多重空胞やオートファゴソームも認められたことから、RASとは独立した機序が細胞障害の原因と考えられた。(P)RRのC末端側は細胞内オルガネラの酸性環境を調節する液胞型プロトンATPase<sup>20)</sup>ライソソーム付随タンパク2(vacuolar adenosine triphosphatase (V-ATPase), H<sup>+</sup>-transporting, lysosomal accessory protein 2: ATP6 AP2)として発見された経緯がある<sup>21)</sup>。従って、(P)RR欠損心筋細胞の表現形を説明するメカニズムとして、(P)RRのV-ATPaseにおける役割を検討したところ、(P)RRはV-ATPase付随タンパクとして、哺乳類V-ATPaseの機能に必須であり、特に膜貫通部分であるVoセクターの機能と構造に必須であることが明らかとなった。我々の行った検討では、マウス各組織における(P)RRの発現レベルは、V-ATPaseの他のサブユニットの発現と相関することが分かっており<sup>22)</sup>、(P)RRが生理的には哺乳類V-ATPase付随タンパクとして機能していることが明らかとなった。

#### V. V-ATPaseのサブユニットとしての(プロ)レニン受容体の生理的意義

V-ATPaseは細胞膜に結合した、サブユニットから構成される巨大なタンパク複合体であり、細胞質側から

管腔側へ水素イオンを輸送し、オルガネラの腔や細胞外を酸性環境に維持している。V-ATPaseはほぼ全ての細胞に発現しており、トランスゴルジネットワーク、エンドソーム、ライソソーム、分泌顆粒、メラノソーム、シナプス小胞など、細胞内の様々な部分に広く分布している。このV-ATPase依存性のオルガネラ酸性環境は、タンパクや膜の輸送、膜癒合、受容体を介するエンドサイトーシス、ライソソームにおけるタンパク分解などに重要な役割を果たしている<sup>23)</sup>。例えば、ライソソームにおけるタンパク分解に必須な加水分解酵素はその最適酵素活性が低pH状態において発揮される。更に、貪食、細胞内へのウイルスの侵入、癌の転移、胚形成における水平方向決定など、様々な細胞現象にV-ATPaseは関わっている<sup>23,24)</sup>。V-ATPaseはpHセンサーとして膜輸送を調節していることも最近の研究で報告されている<sup>25)</sup>。我々の研究においても、(P)RRは細胞内オルガネラの酸性環境を検知し、V-ATPaseの活性を調節している可能性が示唆されている<sup>6)</sup>。(P)RRを含むV-ATPaseの構成因子の変異体や、薬剤によるV-ATPase活性阻害はオルガネラのpH恒常性を障害し、小胞内膜タンパクの蓄積を引き起こしたり、後期エンドソームやライソソームの間の輸送を阻害し、様々な生命体に細胞死を引き起こすこともある<sup>6,26)</sup>。また、非常に機能分化した細胞や組織において重要な役割を担っているV-ATPaseも存在し、腎臓遠位尿細管の間在細胞における尿の酸性化を司ったり、破骨細胞における骨吸収に重要な役割を果たしている。更に、V-ATPaseは内分泌組織にも非常に豊富に発現し、膵臓におけるβ細胞や副腎におけるカテコラミン産生細胞では、V-ATPaseは分泌小胞内の酸性化とは独立した機序でホルモンの調節分泌に重要な役割を担っていることが分かっている<sup>27,28)</sup>。このようにV-ATPaseは幅広くかつ特異的な分布を示すことから、この酵素が様々な基本的な細胞機能に重要であり、細胞生存においても必須であることが分かる。(P)RR欠損心筋細胞における細胞内小胞の蓄積は、V-ATPase阻害薬のバフィロマイシンで再現されたことから、

(P)RRの生理的な機能はV-ATPaseに関連した機能が非常に大きいことが我々の研究結果から明らかとなった。

V-ATPaseは進化の過程で保存されており、植物、酵母、哺乳類に相同性が確認されている。<sup>29)</sup> V-ATPaseは複合タンパクであり、V<sub>1</sub>セクターとV<sub>0</sub>セクターから構成される (Figure 1)。哺乳類においては、V<sub>1</sub>セクターは8つのサブユニット (A-H) から構成され、ATPの加水分解に関わっている。V<sub>0</sub>セクターは7つの異なるサブユニット (a, c, c', d, e, a Ac45, (P)RR) で構成され、細胞膜に結合し、細胞膜内外の水素イオンの輸送に

関わっている。サブユニットの中には (a, d, B, C, E, G, and H) 異なるアイソフォームを有するものがあり、V-ATPaseの各組織や細胞内局在の特異性が豊富になっている<sup>30)</sup>。更に、アイソフォームの存在により、他のアイソフォームの機能を相互に補完している可能性も示唆されている<sup>31)</sup>。特筆すべきことは、2つのV-ATPase付随タンパクであるAc45と (P)RRには、未だ酵母の相同タンパクが見つかっていない。

V-ATPaseの合成過程はまだ十分に明らかになっていないが、V<sub>0</sub>セクターとV<sub>1</sub>セクターの協調的な合成が重要であることが分かっている。V<sub>0</sub>セクターは小胞体において合成され、小胞体膜状で配列された後、目的のオルガネラへ運ばれ、そこで既に細胞質において出来上がっているV<sub>1</sub>セクターと最終的に複合体を形成する。酵母における研究では、V<sub>1</sub>セクターのサブユニットが仮に一つ欠落しても、残りのV<sub>1</sub>セクターのサブユニットタンパクの安定性に大きな影響を与えないが、V<sub>0</sub> sectorでは一つでもサブユニットが欠落すると、残りのV<sub>0</sub>セクターのタンパク安定性や、正常な配列に大きな影響を与えることが分かっている<sup>32,33)</sup>。V<sub>0</sub>セクターを欠損した酵母の変異体では、V<sub>1</sub>セクターは安定しているものの、細胞質に存在し、液胞膜上に配列することが出来ない。また、酵母においては更にいくつかの遺伝子 (Vma12p, Vma21p, Vma22p) がV-ATPaseの合成に必須であることが分かっている<sup>34)</sup>。これらの因子は小胞体膜上に存在するが、一つでも欠損するとV-ATPaseは正しく合成されないことが分かっている。この場合、V<sub>1</sub>セクターは存在できるものの、細胞質に局在し、液胞膜に結合することが出来ない<sup>35)</sup>。V<sub>0</sub>セクターは発現が非常に減少し、V<sub>0</sub>セクターのサブユニットが欠落した時に観察される現象に類似する<sup>35)</sup>。これまでの研究では、酵母のV<sub>1</sub>セクターのサブユニットは哺乳類のV<sub>1</sub>セクターのサブユニットに置換しても機能することが示されている<sup>36,37)</sup>。しかし、酵母のV<sub>0</sub>セクターのサブユニットを哺乳類の相同タンパクで置換し救済した報告は未だない<sup>38)</sup>。哺乳類のV<sub>0</sub>セクターには酵母にはない付随サブユニットであるAc45と (P)RRが存在するため、これらの哺乳類特異的なサブユニットを補わずにV<sub>0</sub>複合体を置換することは不可能である可能性がある。実際にマウスの心筋細胞と胎児線維芽細胞では (P)RRがV<sub>0</sub>セクター特異的にそのサブユニットの安定と正常な配列に必須であることが我々の研究から分かっている<sup>6)</sup>。この付随サブユニットが細胞の種類を問わず、哺乳類のV<sub>0</sub>サブユニットに重要であるかどうか、更なる検討が必要である。



ち (P)RRの膜貫通ドメインおよび細胞内ドメインは脊椎動物・無脊椎動物両者の間に相同性が非常に高いことが分かっており<sup>21)</sup>, (P)RR分子の最も基本的な機能としてV-ATPaseのサブユニットとして細胞生存に関与していることを裏付けるものである。一方, 細胞外ドメインは脊椎動物に限ってアミノ酸配列の相同性が高いことから<sup>19)</sup>, RASが進化の過程で登場してから, (P)RRはATP6AP2タンパクにレニン・プロレニン結合能が獲得したと考えることもできる<sup>41)</sup>。従って, RASは (P)RRを介し, V-ATPaseの機能を調節することによって細胞内酸性環境にも影響を与えている可能性がある。

(P)RRは受容体と考えられていることから, 当初は主に形質膜上に局在すると考えられていた。しかし, 最近の研究ではほとんどの (P)RRが細胞内, 特に核周囲に分布することが分かってきており, これはV-ATPaseが細胞内のオルガネラに分布する局在と一致する<sup>42, 43)</sup>。実際に, (P)RRの細胞内ドメインには小胞体・エンドソーム・ライソソームへのソーティングシグナル配列が

あることが分かっている<sup>19)</sup>。更にこれまでの研究で, (P)RRはトランスゴルジネットワークに多く局在し, そこでフリンやADAM19といったプロテアーゼによる切断を受け, N末端側が28kDaの可溶性 (P)RRとして細胞外へ分泌され, 残った8~9kDaのC末端側がATP6AP2と同一のものと考えられている<sup>44-46)</sup>。実際にN末端側の (P)RRは血漿中や尿中に存在することも分かっている<sup>44)</sup>。しかし, まだ解明されていない点が数多く残されている。V-ATPaseの機能と正常な構造に必要なのは, 全長の (P)RRなのか, それともフリンによって切断された後のC末端側の断片 (ATP6AP2) も許容されるのか。また, (P)RRは常にV-ATPaseと共に存在するのか, V-ATPaseと独立して存在することが可能なのか。血中あるいは尿中の可溶性 (P)RR量が細胞内環境を反映するのか。そして可溶性 (P)RRがどの程度組織RASに寄与するのか。 (P)RRの機能は細胞内局在や分子構造により決定される可能性もあり, 将来これらの問題点や (P)RRの複雑な細胞内動態を解明する必要がある。

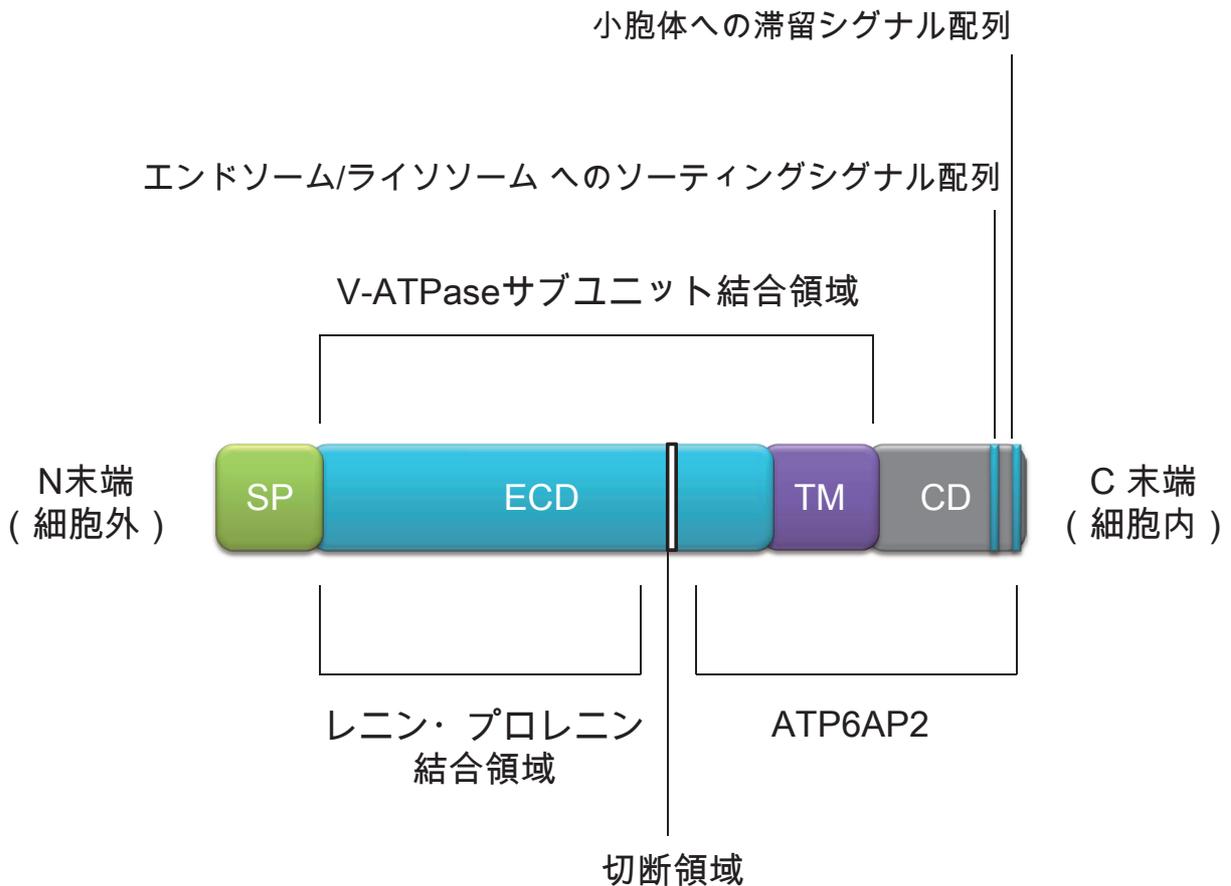


図2. (プロ)レニン受容体の細胞構造。細胞外にレニン・プロレニン結合領域を有し, 細胞内にV-ATPase関連領域 (ATP6AP2) を有する。近年の研究で, V-ATPaseサブユニットとの結合に細胞外ドメインも重要であることが分かっている。SP, シグナルペプチド; ECD, 細胞外ドメイン; TM, 膜貫通ドメイン; CD, 細胞内ドメイン。

最近のアフリカツメガエルにおける研究で、(P)RRはV-ATPase Voセクターのサブユニットc, dに結合することが分かり<sup>7)</sup>、(P)RRの膜貫通ドメインおよび細胞外ドメインが結合に必須であることも明らかになった。一方、(P)RRの膜貫通ドメイン及び細胞内ドメインがV-ATPaseと最終複合体を形成していた事実を考慮すると、大変意外でかつ相反する結果となっている<sup>21)</sup>。この結果が哺乳類V-ATPaseについても当てはまるのであれば、(P)RRの機能の中で、細胞外ドメインがRAS関連機能とV-ATPase関連機能の両者にとって共通に重要であることになる。そして、これらの機能を区別して解析するためには、結晶構造解析などを用いて(P)RRのレニン・プロレニン結合領域、V-ATPaseサブユニット結合領域を正確に明らかにする必要がある、極めて困難な研究になることが想定される。

## VII. 細胞内シグナル伝達におけるV-ATPase依存性細胞内酸性環境と(P)RR

近年のゲノムワイドsiRNAスクリーニングで、ショウジョウバエやアフリカツメガエルにおいて、(P)RRはWnt受容体複合体とV-ATPaseのアダプタータンパクとして機能していることが明らかになった<sup>7, 47, 48)</sup>。Wntシグナルはほとんど全ての器官形成に関与するとともに、成人においても恒常性維持のための自己複製や腫瘍形成にも関与することが分かっている<sup>49)</sup>。Wntは7回膜貫通型受容体であるFrizzledに結合し、続いてやはり7回膜貫通型分子であるLRP5, LRP6をリクルートする。現在3種類の異なるシグナル伝達がWnt受容体の下流に存在することが分かっている。①canonical Wnt/ $\beta$ -catenin cascade, ②noncanonical planar cell polarity (PCP) pathway, ③Wnt/ $Ca^{2+}$  pathwayである<sup>49)</sup>。(P)RRやV-ATPaseのサブユニットのノックダウンによるV-ATPase阻害、あるいは薬剤によるV-ATPaseの活性阻害によりWntシグナルは減弱することが分かっており、(P)RRはWnt受容体とV-ATPaseの間の介在タンパクとして、受容体の細胞内への取り込みと、それに引き起こるシグナル伝達を仲介していると考えられる。更に、V-ATPaseは生理的な状態や病的な状態におけるNotch受容体の活性化に重要であることも報告されている<sup>50, 51)</sup>。従って、細胞内オルガネラの酸性環境は様々な細胞内伝達機構にとって重要な因子である可能性がある。実際(P)RRを介した細胞内シグナルについても、集合管・遠位尿細管細胞株であるMadin-Darby canine kidney (MDCK) 細胞においてバフィロマイシンによりV-ATPaseの活性を阻害すると、レニン・プロレニン

によって惹起される(P)RRを介したERK1/2のリン酸化が減弱することが示されている<sup>42)</sup>。V-ATPaseを介した小胞内酸性化は受容体を介したエンドサイトーシスや受容体のリサイクリングを制御することにより、シグナル伝達が正常に起こるのに必須である。以上のことから、バフィロマイシンは小胞内の酸性化を阻害することにより、非特異的に様々な細胞内シグナル伝達を抑制する可能性があり、ERK1/2のリン酸化は(P)RRを直接介したシグナルの影響以外にも、他の細胞内シグナル伝達の影響であった可能性もある。今後の研究によってERK1/2のリン酸化が(P)RR特異的なシグナル伝達に起因するものであるのか、リガンド非特異的なシグナルによるものなのかを明らかにする必要がある。

## VIII. 今後の展望

(P)RRはレニン・プロレニンの受容体であるだけでなく、哺乳類V-ATPaseの付随サブユニットである。V-ATPaseのサブユニットが何故レニン・プロレニンの受容体としての機能を獲得したのかに関しては未だ有力な証拠は得られていないが、組織RASと細胞内環境が(P)RRを介して相互に影響し、調節されているならば大変興味深い。我々は今後、(P)RRの受容体としての機能と、V-ATPase関連タンパクとしての機能を区別して解析することにより、(P)RRを介した細胞内シグナルが高血圧や糖尿病の病態にどれほど影響を及ぼしているのかに関して検討を進めるとともに、組織RASと細胞内酸性環境のリンクに関して検討してゆく必要がある。

利益相反自己申告：申告すべきものなし

## 文 献

1. Nguyen, G., et al. Pivotal role of the renin/prorenin receptor in angiotensin II production and cellular responses to renin. *J Clin Invest* 2002; 109: 1417-27.
2. Ichihara, A., et al. Inhibition of diabetic nephropathy by a decoy peptide corresponding to the "handle" region for nonproteolytic activation of prorenin. *J Clin Invest* 2004; 114: 1128-35.
3. Ichihara, A., et al. Contribution of nonproteolytically activated prorenin in glomeruli to hypertensive renal damage. *J Am Soc Nephrol* 2006; 17: 2495-503.
4. Ichihara, A., et al. Nonproteolytic activation of prorenin contributes to development of cardiac fibrosis in genetic hypertension. *Hypertension* 2006; 47: 894-900.
5. Ichihara, A., et al. Prorenin receptor blockade inhibits development of glomerulosclerosis in diabetic angiotensin II

- type Ia receptor-deficient mice. *J Am Soc Nephrol* 2006 ; 17 : 1950–61.
6. Kinouchi, K., et al. The (pro) renin receptor/ATP6AP2 is essential for vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase assembly in murine cardiomyocytes. *Circ Res* 2010 ; 107 : 30–4.
  7. Cruciat, C.M., et al. Requirement of prorenin receptor and vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase-mediated acidification for Wnt signaling. *Science* 2010 ; 327 : 459–63.
  8. Daneman, D., et al. Plasma prorenin as an early marker of nephropathy in diabetic (IDDM) adolescents. *Kidney Int* 1994 ; 46 : 1154–9.
  9. Deinum, J., et al. Increase in serum prorenin precedes onset of microalbuminuria in patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetologia* 1999 ; 42 : 1006–10.
  10. Deinum, J., et al. Plasma renin and prorenin and renin gene variation in patients with insulin-dependent diabetes mellitus and nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* 1999 ; 14 : 1904–11.
  11. Danser, A.H. and J. Deinum. Renin, prorenin and the putative (pro) renin receptor. *Hypertension* 2005 ; 46 : 1069–76.
  12. Zhou, A., et al. A redox switch in angiotensinogen modulates angiotensin release. *Nature* 2010 ; 468 : 108–11.
  13. Ito, M., et al. Regulation of blood pressure by the type 1A angiotensin II receptor gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995 ; 92 : 3521–5.
  14. Tanimoto, K., et al. Angiotensinogen-deficient mice with hypotension. *J Biol Chem* 1994 ; 269 : 31334–7.
  15. Yanai, K., et al. Renin-dependent cardiovascular functions and renin-independent blood-brain barrier functions revealed by renin-deficient mice. *J Biol Chem* 2000 ; 275 : 5–8.
  16. Amsterdam, A., et al. Identification of 315 genes essential for early zebrafish development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004 ; 101 : 12792–7.
  17. Contrepas, A., et al. A role of the (pro) renin receptor in neuronal cell differentiation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2009 ; 297 : R250–7.
  18. Ramser, J., et al. A unique exonic splice enhancer mutation in a family with X-linked mental retardation and epilepsy points to a novel role of the renin receptor. *Hum Mol Genet* 2005 ; 14 : 1019–27.
  19. Burckle, C. and M. Bader. Prorenin and its ancient receptor. *Hypertension* 2006 ; 48 : 549–51.
  20. Nishi, T. and M. Forgac. The vacuolar (H<sup>+</sup>)-ATPases – nature’s most versatile proton pumps. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002 ; 3 : 94–103.
  21. Ludwig, J., et al. Identification and characterization of a novel 9.2-kDa membrane sector-associated protein of vacuolar proton-ATPase from chromaffin granules. *J Biol Chem* 1998 ; 273 : 10939–47.
  22. Kinouchi, K., A. Ichihara, and H. Itoh. Functional characterization of (pro) renin receptor in association with V-ATPase. *Front Biosci* 2011 ; 17 : 3216–23.
  23. Forgac, M. Vacuolar ATPases : rotary proton pumps in physiology and pathophysiology. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007 ; 8 : 917–29.
  24. Marshansky, V. and M. Futai. The V-type H<sup>+</sup>-ATPase in vesicular trafficking : targeting, regulation and function. *Curr Opin Cell Biol* 2008 ; 20 : 415–26.
  25. Hurtado-Lorenzo, A., et al. V-ATPase interacts with ARNO and Arf6 in early endosomes and regulates the protein degradative pathway. *Nat Cell Biol* 2006 ; 8 : 124–36.
  26. Beyenbach, K.W. and H. Wieczorek. The V-type H<sup>+</sup>-ATPase : molecular structure and function, physiological roles and regulation. *J Exp Biol* 2006 ; 209 : 577–89.
  27. Sun-Wada, G.H., et al. The a3 isoform of V-ATPase regulates insulin secretion from pancreatic beta-cells. *J Cell Sci* 2006 ; 119 : 4531–40.
  28. Sun-Wada, G.H., et al. Differential expression of a subunit isoforms of the vacuolar-type proton pump ATPase in mouse endocrine tissues. *Cell Tissue Res* 2007 ; 329 : 239–48.
  29. Stevens, T.H. and M. Forgac. Structure, function and regulation of the vacuolar (H<sup>+</sup>)-ATPase. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1997 ; 13 : 779–808.
  30. Sun-Wada, G.H., Y. Wada, and M. Futai. Diverse and essential roles of mammalian vacuolar-type proton pump ATPase : toward the physiological understanding of inside acidic compartments. *Biochim Biophys Acta* 2004 ; 1658 : 106–14.
  31. Kawamura, N., et al. Optic nerve compression and retinal degeneration in Tcirg1 mutant mice lacking the vacuolar-type H-ATPase a3 subunit. *PLoS One* 2010 ; 5 : e12086.
  32. Bauerle, C., et al. The *Saccharomyces cerevisiae* VMA6 gene encodes the 36-kDa subunit of the vacuolar H<sup>(+)</sup>-ATPase membrane sector. *J Biol Chem* 1993 ; 268 : 12749–57.
  33. Kane, P.M., et al. Assembly and targeting of peripheral and integral membrane subunits of the yeast vacuolar H<sup>(+)</sup>-ATPase. *J Biol Chem* 1992 ; 267 : 447–54.
  34. Graham, L.A., B. Powell, and T.H. Stevens. Composition and assembly of the yeast vacuolar H<sup>(+)</sup>-ATPase complex. *J Exp Biol* 2000 ; 203 : 61–70.
  35. Hirata, R., et al. VMA12 is essential for assembly of the vacuolar H<sup>(+)</sup>-ATPase subunits onto the vacuolar membrane in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 1993 ; 268 : 961–7.
  36. Hayashi, K., et al. Defective assembly of a hybrid vacuolar H<sup>(+)</sup>-ATPase containing the mouse testis-specific E1 isoform and yeast subunits. *Biochim Biophys Acta* 2008 ; 1777 : 1370–7.
  37. Sun-Wada, G.H., et al. A proton pump ATPase with testis-specific E1-subunit isoform required for acrosome acidification. *J Biol Chem* 2002 ; 277 : 18098–105.
  38. Sun-Wada, G.H. and Y. Wada. Vacuolar-type proton pump ATPases : roles of subunit isoforms in physiology and pathology. *Histol Histopathol* 2010 ; 25 : 1611–20.
  39. Nguyen, G. and A. Contrepas. Physiology and pharmacology of the (pro) renin receptor. *Curr Opin Pharmacol* 2008 ; 8 : 127–32.
  40. Nguyen, G. and D.N. Muller. The biology of the (pro) renin receptor. *J Am Soc Nephrol* 2009 ; 21 : 18–23.

41. Sihm, G., et al. Physiology of the (pro) renin receptor : Wnt of change? *Kidney Int* 2010 ; 78 : 246–56.
42. Advani, A., et al. The (Pro) renin receptor : site-specific and functional linkage to the vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase in the kidney. *Hypertension* 2009 ; 54 : 261–9.
43. Scheffé, J.H., et al. Prorenin engages the (pro) renin receptor like renin and both ligand activities are unopposed by aliskiren. *J Hypertens* 2008 ; 26 : 1787–94.
44. Cousin, C., et al. Soluble form of the (pro) renin receptor generated by intracellular cleavage by furin is secreted in plasma. *Hypertension* 2009 ; 53 : 1077–82.
45. Senbonmatsu, T., et al. New perspectives on secretion of (pro) renin receptor into extracellular space. *Front Biosci (Elite Ed)* 2010 ; 2 : 1362–7.
46. Yoshikawa, A., et al. The (pro) renin receptor is cleaved by ADAM19 in the Golgi leading to its secretion into extracellular space. *Hypertens Res* 2011 :
47. Buechling, T., et al. Wnt/Frizzled signaling requires dPRR, the *Drosophila* homolog of the prorenin receptor. *Curr Biol* 2010 ; 20 : 1263–8.
48. Hermle, T., et al. Regulation of Frizzled-dependent planar polarity signaling by a V-ATPase subunit. *Curr Biol* 2010 ; 20 : 1269–76.
49. Clevers, H. Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell* 2006 ; 127 : 469–80.
50. Vaccari, T., et al. The vacuolar ATPase is required for physiological as well as pathological activation of the Notch receptor. *Development* 2010 ; 137 : 1825–32.
51. Yan, Y., N. Deneff, and T. Schupbach. The vacuolar proton pump, V-ATPase, is required for notch signaling and endosomal trafficking in *Drosophila*. *Dev Cell* 2009 ; 17 : 387–402.

## 日本心脈管作動物質学会研究奨励賞受賞論文

4

蛋白尿による近位尿細管細胞酸化ストレス蓄積  
における腎内酸性環境の役割相馬 友和<sup>1)</sup>, 阿部 倫明<sup>1)</sup>, 森口 尚<sup>2)</sup>, 阿部 高明<sup>3)</sup>, 山本 雅之<sup>2)</sup>, 伊藤 貞嘉<sup>1)</sup>  
<sup>1)</sup>東北大学大学院 腎高血圧内分泌学分野, <sup>2)</sup>東北大学大学院 医化学分野, <sup>3)</sup>東北大学大学院 分子病態医工学分野

## I. はじめに

慢性腎臓病 (Chronic Kidney Disease, CKD) は, 成人の約 8 人に 1 人が罹患し, その進行に伴い心血管病が増加, 末期腎不全に至れば透析療法をはじめとした腎代替療法が必要となることから昨今, 注目を浴びている。本疾患の進行を抑制することで, これら合併症を防ぐことが重要であるが, 従来の治療法のみではいまだ十分には達成できておらず, 新規の慢性腎臓病治療法を開発することが急務となっている。

ここで, CKDの原因は糖尿病, 慢性糸球体腎炎, 高血圧など多岐に渡るが, 尿細管間質傷害, 線維化を共通の進行機序として進行することが明らかとなっている。また, 尿細管間質傷害を起こす重要な原因として, 腎傷害で糸球体より漏出してくる蛋白, とくに脂肪酸結合アルブミン (FFA-Alb) が近位尿細管で再吸収を受ける際に酸化ストレスが生じることが重要な役割を果たすことがわかってきた。すなわち, 酸化ストレスを介して尿細管細胞のアポトーシス, 尿細管間質の炎症, 線維化が生じるのである<sup>1, 2)</sup>。このことは, 尿細管細胞に蓄積される酸化ストレスの制御がCKDの治療戦略として重要であることを意味している。

一方, 腎臓は体液の恒常性を保つことを主な生理機能としており, 大量の体液を処理するために複雑な解剖学的構造が必要となっている。結果として, 自らを犠牲にするかのごとくに腎内は劣悪な環境に生理的にさらされている。特に水-ナトリウムの恒常性維持, 尿素排泄のために腎内が低酸素や高浸透圧の環境にあることは良く知られた事実である。ここで, 体液の酸塩基平衡の維持

において, 腎近位尿細管細胞は糸球体でろ過された重炭酸イオンを約80%を再吸収することで貢献している。この重炭酸イオンの再吸収の結果, 近位尿細管の管腔内はpH7からpH6.4前後へと酸性化されることがラットのMicropuncture法を用いた実験で示されている (図1表)<sup>3, 4)</sup>。ただし, 本法では表層に存在する近位尿細管 (S1, S2) の管腔内しか測定できず, より深部に存在する近位尿細管直部 (S3) の管腔内のpHは不明である。S3も重炭酸イオンの再吸収が可能であることが知られており, 近位尿細管管腔内は生理的にpH6.4未満の著明な酸性環境に曝されていることが予測される。加えて, この管腔内pHの低下に伴って近位尿細管細胞内も酸性化されることが知られている<sup>5)</sup>。このことは, 病的状態でFFA-Albにさらされる近位尿細管細胞が, 生理的状态下においてすでに著明な酸性環境にさらされていることを意味する。さらに, 近位尿細管細胞内には, pH低下にてリン酸化増強が生じるpHセンサー分子, proline rich tyrosine kinase 2 (Pyk 2) が存在することが近年報告され, この分子は, 活性酸素種産生のメディエーターとしても注目を受けている<sup>6, 7)</sup>。

これらの事実より, ひとたび糸球体傷害が生じてFFA-Albが大量に近位尿細管に負荷されるような状況になれば, 生理的状态でもすでに存在した腎内酸性環境が, pHセンサーPyk 2を介して活性酸素種産生を増悪させるのではないかと私たちは仮説を立てた。そしてこの酸性環境をアルカリ化することで酸化ストレスの蓄積が抑制されれば, 「CKDの新規治療法」になるのではないかと考えた。本論文では*in vitro*および*in vivo*の蛋白過剰負荷モデル系を用いて酸性環境がFFA-Albによる近位尿細管細胞への酸化ストレス蓄積に及ぼす影響について検討を行った結果を報告する<sup>8)</sup>。

\* 1 東北大学大学院 腎高血圧内分泌学分野

\* 2 東北大学大学院 医化学分野

\* 3 東北大学大学院 分子病態医工学分野

(〒000-0000 宮城県仙台市青葉区星陵町1-1)

## II. 方法と結果

まずは、*in vitro*の蛋白過剰負荷モデル系を用いて、酸性環境がFFA-Albによる近位尿細管細胞への酸化ストレス蓄積に及ぼす影響について検討を行った。ヒト近位尿細管由来培養細胞株（HK-2細胞）にFFA-Alb, 特にCKD患者尿中で最多であるオレイン酸結合アルブミン（OA-Alb）を投与し、その際に生じる活性酸素 $O_2^{\cdot-}$ を、 $O_2^{\cdot-}$ 感受性蛍光色素Dihydroethidiumを用いて蛍光顕微鏡下でreal timeに測定した。DihydroethidiumはpH非依存性であり本研究に適した蛍光色素である。OA-Alb刺激にてHK-2細胞内に $O_2^{\cdot-}$ 産生が増加し、本産生はpH依存性を示し酸性環境下で著明に上昇した（図1）。また、酸性環境下でのOA-Alb刺激でPyk2のリン酸化は増強された。さらに、本 $O_2^{\cdot-}$ 産生は、siRNAを用いたPyk2のノックダウンにて有意に抑制された（図2）。また、本 $O_2^{\cdot-}$ 産生は、NAD(P)H oxidase阻害薬apocyninにて抑制され、これら*in vitro*の実験系により、酸性環境がOA-Albによる $O_2^{\cdot-}$ 産生をPyk2の活性化によるNAD(P)H oxidase活性化を通じて相加的に増強することを証明した。

次に、*in vivo*の蛋白過剰負荷モデル系を用いて酸性環境の改善がFFA-Albによる近位尿細管細胞への酸化ストレス蓄積を抑制するかについて検討を行った。マウス蛋白過剰負荷モデル（マウス腹腔内にFFA-AlbおよびOA-Albを投与することで、過剰にこれらタンパクが糸球体を濾過されて近位尿細管細胞に負荷される。それによって、近位尿細管に酸化ストレスが蓄積し、尿細管間質傷害が生じる実験モデルである。蛋白尿による尿細管間質傷害モデルとして頻用されている。）において、FFA-AlbおよびOA-Alb腹腔内投与により著明な尿細管間質傷害が生じ、近位尿細管細胞（CD13陽性細胞）に細胞内活性酸素種の蓄積がFlow cytometryにて観察された（図3）。さらに、免疫組織染色にてDNA酸化傷害を示す8-OHdGの強い蓄積を近位尿細管細胞に認めた。これらの酸化ストレス傷害は、炭酸水素ナトリウムをマウスに飲水させることにより尿細管管腔内をアルカリ化することで著明に改善した。このことから、尿アルカリ化によって腎内酸性環境を改善させることで蛋白尿による酸化ストレス蓄積を抑制するという新規治療法の可能性を示すことができた（図4）。

## III. 考察

我々は本研究において、蛋白尿によって生じる近位尿細管細胞酸化ストレスを、生理的レベルの尿細管管腔内

酸性化が増強し、その細胞内機序としてPyk2を介したNAD(P)H oxidase活性化が関与することを示した。加えて、*in vivo*において蛋白尿による近位尿細管酸化ストレス蓄積を炭酸水素ナトリウム飲水で抑制できることを示した。これらのことから、外因性に炭酸水素ナトリウムのようなアルカリ製剤を投与することは、腎内酸化ストレスを制御する慢性腎臓病新規治療法となる可能性を示せたと考えている。

Pyk2は非受容体性チロシンキナーゼで、細胞内pHの低下を感知して自己リン酸化、活性化されることが報告されている<sup>6)</sup>。また、Pyk2のリン酸化はphorbol 12, 13-dibutyrateといったプロテインキナーゼC (PKC) のアゴニストによっても活性化されることが知られている。ここで、PKCはアルブミンのエンドサイトーシスにたずさわるスカベンジャー受容体の下流で活性化されることから<sup>1)</sup>、私たちはOA-Alb刺激と細胞内pH低下がPyk2活性化を相加的に増強すると考えた。実際に、Pyk2は酸とOA-Albによる刺激で著明にリン酸化が増強された。また、Pyk2のノックダウン実験で酸性環境下でのOA-Albによる $O_2^{\cdot-}$ 産生が抑制されたことからPyk2は本 $O_2^{\cdot-}$ 産生において機能的に重要な役割を果たしていることが示せたと考えられた。

重炭酸ナトリウム飲水による腎病変に対する効果としては、ほかに、多発性嚢胞腎モデルラットや5/6腎摘モデルを用いた報告があり<sup>9, 10)</sup>我々が報告した機序以外に、代謝性アシドーシスで産生が増加するアンモニアによる補体活性化が生じるという報告<sup>10)</sup>や重炭酸ナトリウム投与にてエンドセリン1の活性化が抑制されるという報告<sup>11)</sup>もある。我々の結果は、*in vivo*でのPyk2の直接的関与を示したものではなく、Pyk2の活性化以外の、これらの機序が複合的に関わった結果のものである可能性がある。今後、Pyk2ノックアウトマウスを用いて直接的関与が証明されていくことを期待している。

本研究はマウスを用いた急性投与の実験より得られた結果であり、まだまだ臨床応用に向けた検討は不十分である。しかし、近年、CKDに伴う代謝性アシドーシスを補正することがCKDの進行を抑制すること<sup>12)</sup>、さらに、高血圧に伴うCKD（腎硬化症）においては、われわれがマウスで見いだした現象に一致して、代謝性アシドーシスを認める以前より炭酸水素ナトリウムを投与することでCKDの進行が抑制されることが人の臨床研究により報告されている<sup>13)</sup>。これらの事実から、今後、さらなる基礎、臨床研究の積み重ねに基づいて、尿細管管腔内のアルカリ化にて近位尿細管細胞の酸化ストレスを抑制するという新規慢性腎臓病治療法が確立していけばと期待している<sup>8)</sup>。

近位尿管部位	管腔内pH	HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> 濃度 (mEq/L)
S1	7.06±0.15	18
S2	6.41±0.068	3.72±0.068
S3	<S2	<S2

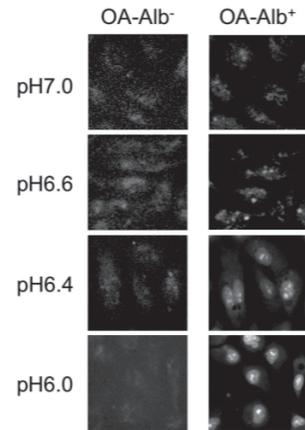
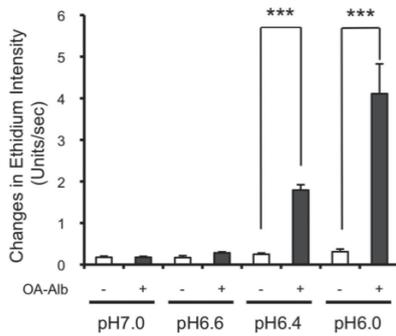
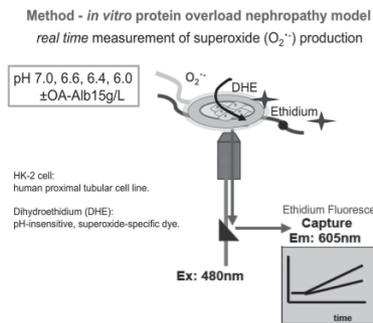
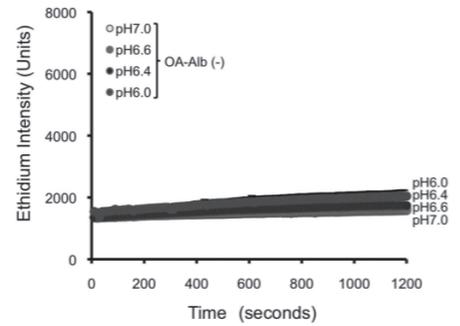
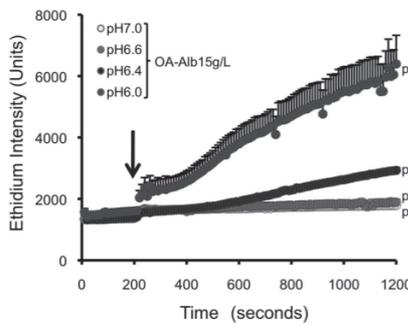


図1. 蛋白尿による酸化ストレス蓄積への酸性環境の影響 (*in vitro*蛋白過剰負荷モデル)

近位尿管管腔内は生理的に著明に酸性化されている(左上表)。OA-Alb刺激によるHK-2細胞内の酸化ストレス(活性酸素感受性蛍光色素Dihydroethidiumを用いて検出)は酸性環境で著明に増加した。(\*\*\*) p < 0.001)

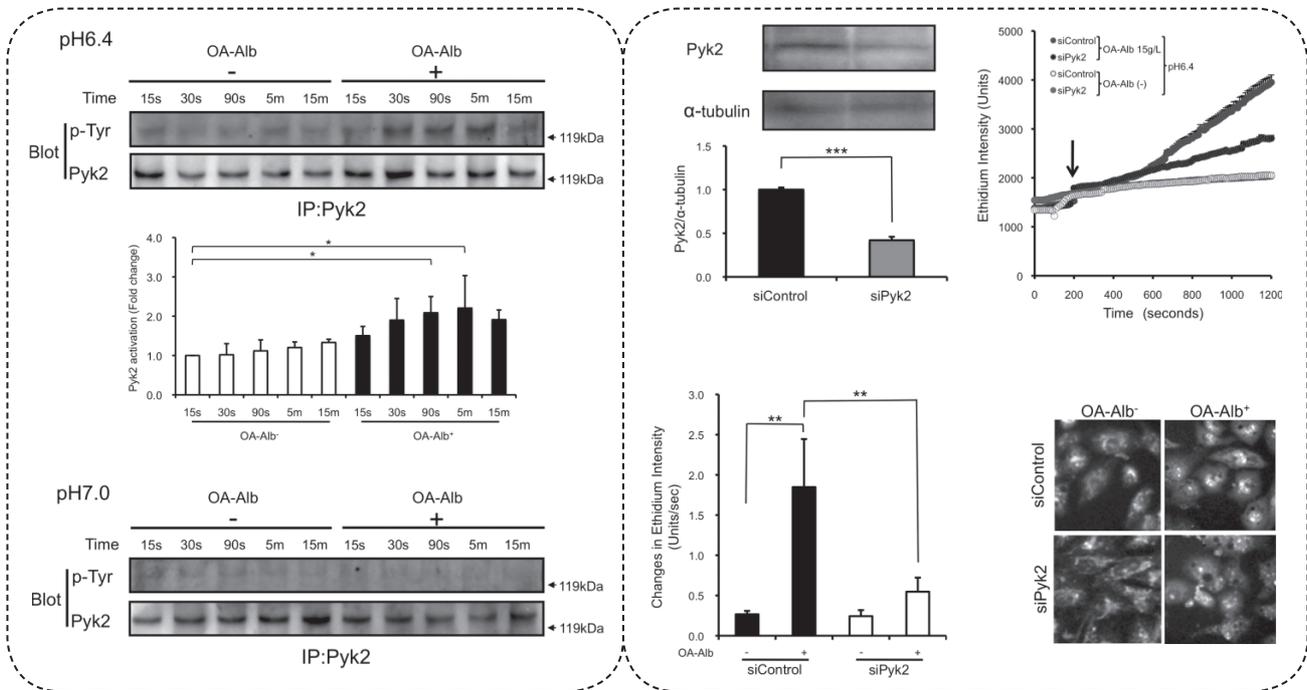


図2. Proline rich tyrosine kinase2 (Pyk2)の活性化と酸化ストレス産生

酸性環境(pH6.4)にてHK-2細胞にOA-Alb刺激を行うことでPyk2の活性化が生じ(左図)、Pyk2のsiRNAノックダウンにて活性酸素産生が有意に抑制された(右図)。( \* p < 0.05, \*\* p < 0.01, \*\*\* p < 0.001)

蛋白尿による近位尿管細胞酸化ストレス蓄積における腎内酸性環境の役割

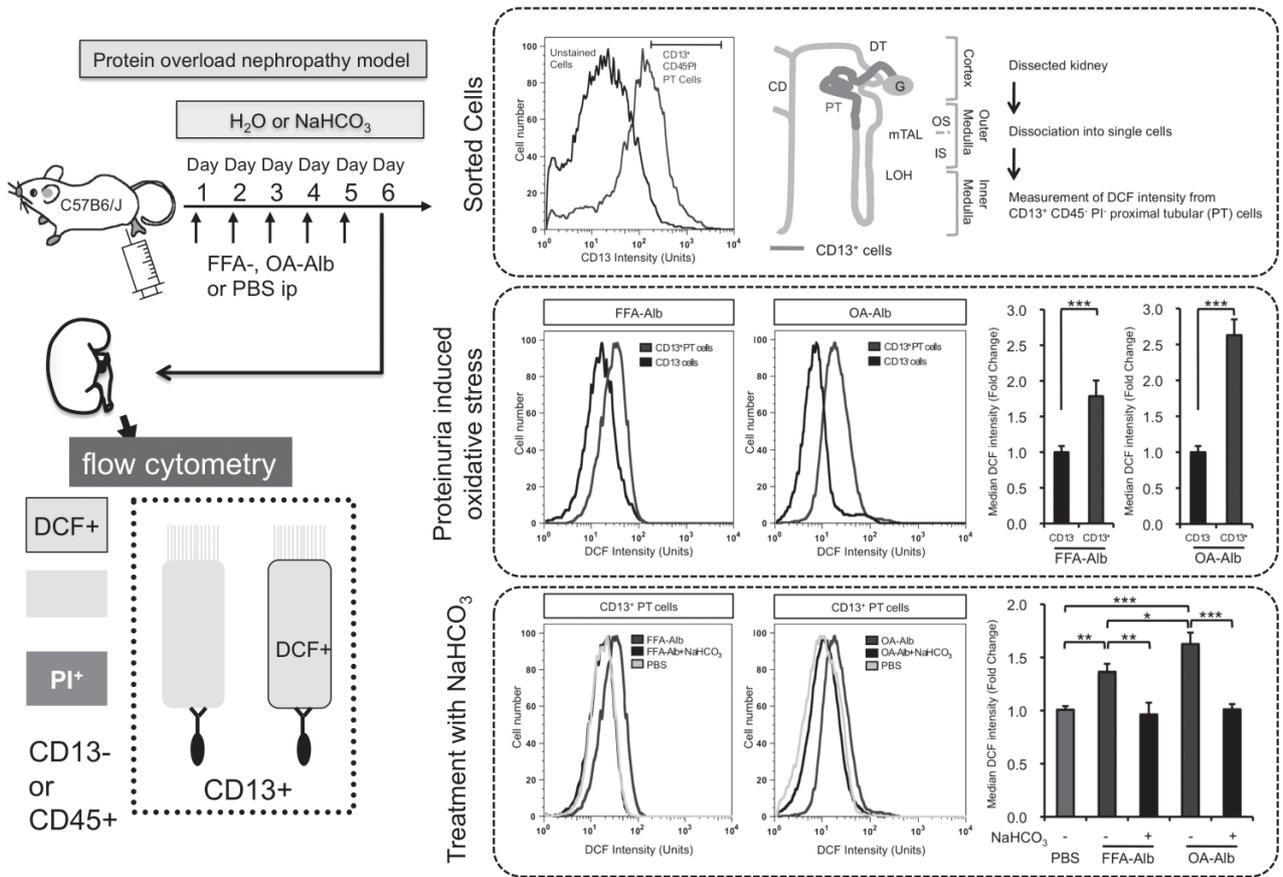


図3. フローサイトメトリーを用いた近位尿管細胞内酸化ストレス測定 (*in vivo* 蛋白過剰負荷モデル)

マウスに脂肪酸結合アルブミン (FFA-Alb) およびオレイン酸結合アルブミン (OA-Alb) を負荷し、腎を単離、フローサイトメトリーにてCD13陽性細胞を分離した。CD13陽性細胞 (近位尿管細胞) に活性酸素種感受性蛍光色素DCFDAを用いて酸化ストレスが蓄積していることを検出し、尿アルカリ化にて、その蓄積が改善することがわかった。(\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ )

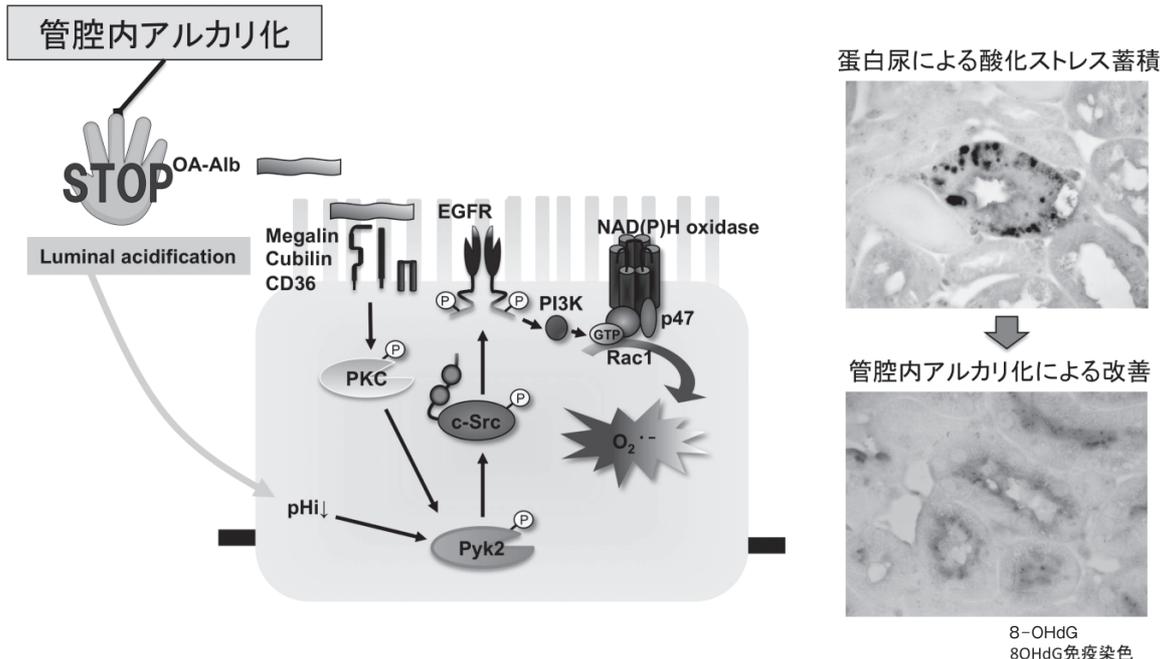


図4. 管腔内アルカリ化による酸化ストレス改善に基づく新規慢性腎臓病治療法

#### IV. 謝辞

本研究を行うにあたり、ご指導いただきました腎高血圧内分泌学分野 阿部倫明先生、阿部高明教授、伊藤貞嘉教授および医化学分野 森口尚先生、山本雅之教授に深謝いたします。

Bicarbonate supplementation slows progression of CKD and improves nutritional status. *J Am Soc Nephrol* 20 : 2075–2084, 2009

13) Mahajan A, Simoni J, Sheather SJ, Broglio KR, Rajab MH, Wesson DE : Daily oral sodium bicarbonate preserves glomerular filtration rate by slowing its decline in early hypertensive nephropathy. *Kidney Int* 78 : 303–309, 2010

#### 文 献

- 1) Abbate M, Zoja C, Remuzzi G : How does proteinuria cause progressive renal damage? *J Am Soc Nephrol* 17 : 2974–2984, 2006
- 2) Ishola DA Jr., Post JA, van Timmeren MM, Bakker SJ, Goldschmeding R, Koomans HA, Braam B, Joles JA : Albumin-bound fatty acids induce mitochondrial oxidant stress and impair antioxidant responses in proximal tubular cells. *Kidney Int* 70 : 724–731, 2006
- 3) DuBose TD Jr., Pucacco LR, Lucci MS, Carter NW : Micropuncture determination of pH, PCO<sub>2</sub>, and total CO<sub>2</sub> concentration in accessible structures of the rat renal cortex. *J Clin Invest* 64 : 476–482, 1979
- 4) Malnic G, de Mello-Aires M : Kinetic study of bicarbonate reabsorption in proximal tubule of the rat. *Am J Physiol* 220 : 1759–1767, 1971
- 5) Li S, Sato S, Yang X, Preisig PA, Alpern RJ : Pyk2 activation is integral to acid stimulation of sodium/hydrogen exchanger 3. *J Clin Invest* 114 : 1782–1789, 2004
- 6) Pastoriza-Munoz E, Harrington RM, Graber ML : Axial heterogeneity of intracellular pH in rat proximal convoluted tubule. *J Clin Invest* 80 : 207–215, 1987
- 7) Eguchi S, Iwasaki H, Inagami T, Numaguchi K, Yamakawa T, Motley ED, Owada KM, Marumo F, Hirata Y : Involvement of PYK2 in angiotensin II signaling of vascular smooth muscle cells. *Hypertension* 33 : 201–206, 1999
- 8) Souma T, Abe M, Moriguchi T, Takai J, Yanagisawa-Miyazawa N, Shibata E, Akiyama Y, Toyohara T, Suzuki T, Tanemoto M, Abe T, Sato H, Yamamoto M, Ito S : Luminal alkalization attenuates proteinuria-induced oxidative damage in proximal tubular cells. *J Am Soc Nephrol* 22 : 635–648, 2011
- 9) Torres VE, Mujwid DK, Wilson DM, Holley KH : Renal cystic disease and ammoniogenesis in Han:SPRD rats. *J Am Soc Nephrol* 5 : 1193–1200, 1994
- 10) Nath KA, Hostetter MK, Hostetter TH : Pathophysiology of chronic tubulointerstitial disease in rats. Interactions of dietary acid load, ammonia, and complement component C3. *J Clin Invest* 76 : 667–675, 1985
- 11) Phisitkul S, Khanna A, Simoni J, Broglio K, Sheather S, Rajab MH, Wesson DE : Amelioration of metabolic acidosis in patients with low GFR reduced kidney endothelin production and kidney injury, and better preserved GFR. *Kidney Int* 77 : 617–623, 2010
- 12) de Brito-Ashurst I, Varaganam M, Raftery MJ, Yaqoob MM :



## 編集後記

今年も色々なことがありました。3月11日に東北地方を襲った東北地方太平洋沖地震と津波による東日本大震災が発生し約2万人の死者と行方不明者が出ました。地震の影響により原子力発電所や日本の産業界にも多大の損失を与え続けています。8月に台風12号が四国から中国地方を縦断して奈良、和歌山、三重の3県に年間降雨量に匹敵する1000mmを超える大雨をもたらす水害が発生しました。9月には台風15号により日本全国に水害が発生して我が国には天災が如何に多いことかと今更ながら気付かされます。さらに、最近の急激な円高で1ドルが76円台に、ヨーロッパの財政不安から1ユーロが100円近くになり経済的にも心配事が増しました。

先行きに不安を感じるなかで明るい出来事が発表されました。我々の研究に関連する2011年のノーベル医学生理学賞は免疫学の分野に授けられました。ポイトラー、ホフマン両博士は、自然免疫の活性化に関する研究と、スタインマン博士は樹状細胞と獲得免疫におけるその役割の発見です。

「人類の歴史は感染症との闘いの歴史である」とよく言われますが、免疫学の分野では1960年代から拾ってみても下記の6件にノーベル賞が授与されています。感染を起こすと免疫機構が働くと同時に多くの場合は炎症を起こします。循環器疾患においても最近になり非感染性の炎症性組織病変が種々の病態と関連することが報告されてきています。メタボリックシンドロームの脂肪組織や動脈硬化巣をはじめとして各種の臓器障害に炎症性組織病変が伴っていることは良く知られています。免疫機構で働く細胞や受容体などの働きや役割を見直してみるのも楽しいかもしれません。

1996年にピーター・ドハーディー博士とロルフ・ティンカーナーゲル博士の、細胞性免疫防御の特異性に関する研究

1987年に利根川進博士の、抗体の多様性に関する遺伝的原理の発見

1984年にニールス・イエルネ博士、ジョルジュ・J・F・ケーラー博士、セーサル・ミルスタイン博士の、免疫系の発達と制御における選択性に関する諸理論、およびモノクローナル抗体の作成原理の発見

1980年にバルフ・ベナ・サラフ博士、ジャン・ドーセ博士、ジョージ・スネル博士の細胞表面において免疫反応を調節する、遺伝的に決定された構造に関する発見

1972年にジェラルド・モーリス・エデルマン博士、ロドニー・ロバート・ポーター博士の、抗体の化学構造に関する発見

1960年にフランク・マクファーレン・バーネット博士、ピーター・メダワー博士の、後天的免疫寛容の発見

(H. I.)

# お知らせ

## 千里ライフサイエンスセミナー D1 スーパーコンピュータ「京」の医療・創薬分野への応用

**日 時**：平成24年4月20日（金） 10：00～16：50

**場 所**：千里ライフサイエンスセンタービル 5階ライフホール

（大阪府豊中市新千里東町1-4-2、地下鉄御堂筋線／北大阪急行千里中央下車）

**コーディネーター**：

中村 春木 大阪大学 蛋白質研究所 教授

江口 至洋 理化学研究所 副プログラムディレクター

**趣 旨**：2012年の秋にはスーパーコンピュータ「京」が神戸の地で本格稼働します。スーパーコンピュータの中でも世界最速の「京」がどのような設計思想に基づいて開発されてきたのかをまずご紹介します。次いで「京」の試験利用実績も踏まえ、スーパーコンピュータを用いた医療および創薬分野における研究開発事例と研究計画のご紹介、および医療と創薬の現場から「京」への期待を述べて頂きます。このセミナーが市民のみなさまや医療および創薬に従事されているみなさまと、「京」を利活用されている研究者との意見交換の場になれば幸いです。

- プログラム**：
1. 京コンピュータ・プロジェクトの概観、および、次世代に向けて  
姫野 龍太郎（理化学研究所情報基盤センター・センター長）
  2. スーパーコンピュータ「京」の設計思想と生命科学への応用  
泰地 真弘人（理化学研究所計算科学研究機構・チームリーダー）
  3. スーパーコンピュータによる生体分子シミュレーション  
木寺 詔紀（横浜市立大学大学院生命ナノシステム科学研究科・教授）
  4. スーパーコンピュータが拓く予測型医療  
－心臓シミュレータ（UT-Heart）による個別最適医療  
杉浦 清了（東京大学大学院新領域創成科学研究科・教授）
  5. 「京」が拓く予測型、個別最適化医療、理論医学への期待と展望  
－全身循環と血管内局所イベントの関連の理論化  
後藤 信哉（東海大学医学部医学科内科学系・教授）
  6. 「京」に期待する創薬イノベーション  
金岡 昌治（大日本住友製薬株式会社・執行役員研究本部長）

**主 催**：公益財団法人 千里ライフサイエンス振興財団

**定 員**：200名

**参加費**：無 料

**申込要領**：氏名、勤務先、所属、〒所在地、電話番号、Eメールアドレスを明記の上、Eメールで下記宛お申し込み下さい。件名は「千里ライフサイエンスセミナー D1」として下さい。

**申 込 先**：千里ライフサイエンスセミナー D1係

E-mail :sng@senri-life.or.jp HP: <http://www.senri-life.or.jp/seminar-1.html>

〒560-0082 大阪府豊中市新千里東町1-4-2

千里ライフサイエンスセンタービル20階

TEL：06-6873-2001 FAX：06-6873-2002

# 日本心脈管作動物質学会会則

## 第1章 総 則

第1条 本会は日本心脈管作動物質学会（Japanese Society for Circulation Research）と称する。

第2条 本会の事務局は、三重県津市江戸橋2-174、三重大学医学部薬理学教室内に置く。

## 第2章 目的および事業

第3条 本会は心脈管作動物質に関する研究の発展を図り、会員相互の連絡および関連機関との連絡を保ち、広く知識の交流を求めるとして目的とする。

第4条 本会は前条の目的を達成するために次の事業を行う。

1. 学術講演会、学会等の開催
2. 会誌および図書の発行
3. 研究、調査および教育
4. 関係学術団体との連絡および調整
5. 心脈管作動物質に関する国際交流
6. その他本会の目的達成に必要な事業

## 第3章 会 員

第5条 本会員は本会目的達成に協力するもので次の通りとする。

1. 正会員
2. 賛助会員
3. 名誉会員

第6条 正会員の会費は年額4,000円とする。

第7条 賛助会員は本会の目的に賛同し、かつ事業を維持するための会費年額100,000円（一口）以上を納める団体または個人とする。

第8条 名誉会員は理事会で推薦し、評議員会の議決を経て総会で承認する。名誉会員は会費免除とする。

第9条 本会に入会を希望するものは、所定の手続きを経て、会費を添えて本会事務局に申し込むものとする。原則として2年間会費を滞納したものは退会とみなす。

## 第4章 役員および評議員

第10条 本会は次の役員を置く。

1. 会長 1名
2. 理事 若干名（うち理事長1名）
3. 会計監事 若干名

第11条 会長は理事会の推薦により、評議員会の議決を経て選ばれ、総会の承認を得るものとする。会長は総会を主宰する。

第12条 理事会は会長を補佐して会務を執行し、庶務、会計その他の業務を分担する。理事長は理事会の互選により選出され、本会の運営を統括する。

第13条 会計監事は理事より互選により選出し、会計監査を行う。

第14条 本会には、評議員をおく。評議員は正会員中より選出し、理事会の推薦を経て評議員会で議決し、総会の承認を得るものとする。理事長がこれを委嘱する。評議員は評議員会を組織し、本会に関する重要事項を審議する。

第15条 編集委員は機関誌“血管”（Japanese Journal of Circulation Research）を編集し、本会の学術活動に関する連絡を行う。なお、編集に関する事項は、事務局にて決定する。

第16条 役員の任期は会長は1年、理事長、理事、会計監事および編集委員は2年とする。ただし再任は妨げない。

第17条 役員は次の事項に該当するときはその資格を失う。

1. 定期評議員会時に満65歳を過ぎていた場合
2. 3年間連続で、役員会等を正当な理由なくして欠席した場合

## 第5章 会 議

第18条 理事会は少なくとも年1回理事長が招集し、議長は理事長がこれに当たる。

第19条 総会および評議員会は毎年1回これを開き、次の議事を行う。

1. 会務の報告
2. 会則の変更
3. その他必要と認める事項

第20条 臨時の総会、評議員会は理事会の議決があった時これを開く。

## 第6章 会 計

第21条 本会の事業年度は毎年1月1日より始まり、12月31日に終わる。

第22条 本会の会計は会費、各種補助金及び寄付金をもって充てる。

# 日本心脈管作動物質学会賛助会員

アクテリオンファーマシューティカルズジャパン株式会社

旭化成ファーマ株式会社

アステラス製薬株式会社

エーザイ株式会社

協和発酵キリン株式会社

第一三共株式会社

武田薬品工業株式会社

田辺三菱製薬株式会社

デザイナーフーズ株式会社

日本新薬株式会社

日本ベーリンガーインゲルハイム株式会社

バイエル薬品株式会社

株式会社ポッカコーポレーション

《五十音順》

日本心脈管作動物質学会役員

名誉会員

毛利喜久男 中川雅夫 山田和生 平田結喜緒

第41回会長

伊藤 宏

理事

田中利男 (理事長)  
伊藤正明 岩尾 洋 寒川賢治  
下川宏明 玉置俊晃 辻本豪三

監事

平田恭信 西山 成

評議員

〈基礎〉

安藤讓二 福永浩司 古川安之 萩原正敏  
服部裕一 平野勝也 五十嵐淳介 飯野正光  
今泉祐治 石井邦明 伊藤猛雄 岩本隆宏  
岩尾洋 蒔田直昌 寒川賢治 川崎博己  
松村靖夫 南野直人 光山勝慶 三輪聡一  
宮田篤郎 元村 成 村松郁延 中木敏夫  
中田徹男 中山貢一 成宮 周 西田育弘  
西村有平 西尾眞友 西山 成 大橋俊夫  
岡村富夫 新藤隆行 曾我部正博 佐藤靖史  
末松誠 菅原 明 高井真司 高倉伸幸  
多久和陽 玉置俊晃 田中利男 高谷口隆之  
徳留 健 土屋浩一郎 辻本豪三 筒井正輝  
上田陽一 牛首文隆 山本 隆一 柳澤 行

〈臨床〉

長谷部直幸 服部良之 藤田 浩 藤田敏郎  
福田昇 檜垣實男 東 幸仁 平田健一  
平田恭信 廣岡良隆 市来俊弘 池田宇一  
今西政仁 石橋敏幸 石光俊彦 伊藤 宏  
伊藤正明 伊藤貞嘉 伊藤隆之 岸 拓弥  
岸 幸夫 北村和雄 倉林正彦 小林直彦  
河野雅和 上月正博 小室一成 前村浩二  
丸山一男 湊口信也 三浦総一郎 室原豊明  
長田太助 永井良三 中尾一和 野出孝一  
錦見俊雄 小川久雄 大蔵隆文 大内尉義  
大柳光正 楽木宏実 佐田政隆 佐々木 享  
笹栗俊之 洪谷正人 七里眞義 島田和幸  
下門顕太郎 下川宏明 下澤達雄 高橋克仁  
武田和夫 筒井裕之 矢田 豊 吉村 道  
吉 栖 正 生 渡 邊 裕 司

(ABC順)

会長

第1回研究会 横山 育三  
第2回研究会 藤原 元始  
第3回研究会 岳中 典男  
第4回研究会 毛利喜久男  
第5回研究会 藤原 元始  
第6回研究会 岳中 典男  
第7回研究会 山本国太郎  
第8回研究会 毛利喜久男  
第9回研究会 土屋 雅晴  
第10回研究会 横山 育三  
第11回研究会 日高 弘義  
第12回研究会 三島 好雄  
第13回研究会 東 健彦  
第14回研究会 恒川 謙吾  
第15回研究会 戸田 昇  
第16回学会 塩野谷恵彦  
第17回学会 野々村禎昭  
第18回学会 河合 忠一  
第19回学会 平 則夫  
第20回学会 杉本 恒明  
第21回学会 安孫子 保  
第22回学会 外山 淳治  
第23回学会 千葉 茂俊  
第24回学会 中川 雅夫  
第25回学会 室田 誠逸  
第26回学会 猿田 享男  
第27回学会 矢崎 義雄  
第28回学会 田中 利男  
第29回学会 竹下 彰  
第30回学会 岩尾 洋  
第31回学会 平田結喜緒  
第32回学会 萩原 俊男  
第33回学会 藤田 敏郎  
第34回学会 辻本 豪三  
第35回学会 松岡 博昭  
第36回学会 玉置 俊晃  
第37回学会 下川 宏明  
第38回学会 川崎 博己  
第39回学会 伊藤 正明  
第40回学会 西山 成  
第41回学会 伊藤 宏

事務局

〒514-8507 三重県津市江戸橋2-174  
三重大学大学院医学系研究科薬理ゲノミクス分野内  
TEL 059-231-5411, FAX 059-232-1765

---

日本心脈管作動物質学会誌  
血管 第34巻4号  
2011年12月31日発行

発行人 田中利男  
三重大学大学院医学系研究科  
薬理ゲノミクス分野

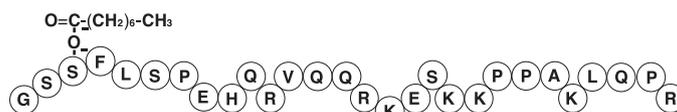
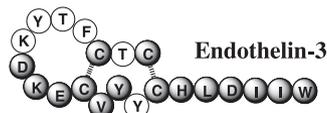
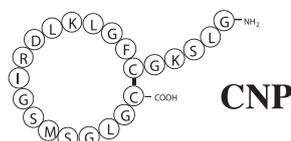
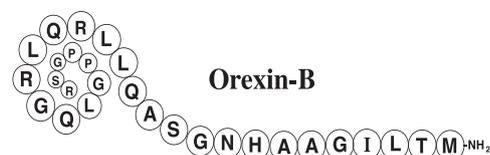
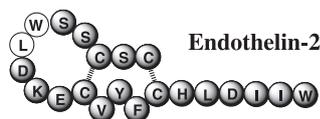
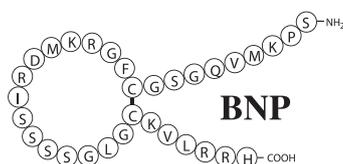
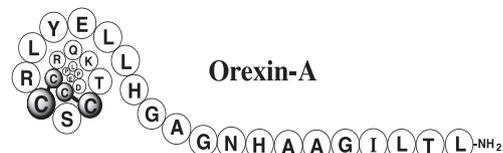
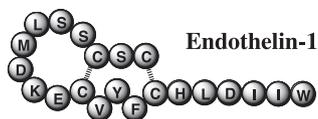
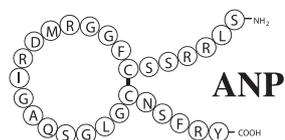
発行所 日本心脈管作動物質学会事務局  
〒514-8507 三重県津市江戸橋2-174  
三重大学大学院医学系研究科  
薬理ゲノミクス分野内  
TEL 059-231-5411  
FAX 059-232-1765  
<http://jscr21.medic.mie-u.ac.jp/>

印刷所 合資会社 黒川印刷  
〒514-0008 三重県津市上浜町2-11

# 高品質ペプチドがあなたの研究の信頼性を高めます！

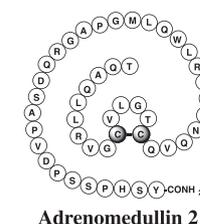
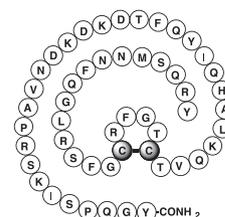
ペプチド研究所は、前身である財団法人蛋白質研究奨励会が1963年に9品目のペプチド合成用試薬を発売して以来、ユーザーに最高純度の化学合成ペプチドを提供することに努め、今や約1000品目をカタログに掲載するまでにいたしました。

特に日本の研究者によって次々と発見されてきた ANP、BNP、CNP などのナトリウム利尿ペプチドファミリー、Endothelin-1、-2、-3 などのエンドセリンファミリー、Adrenomedullin、Orexin、また、側鎖にオクタン酸を持つ Ghrelin などを、いち早く化学合成し、発見者やその研究グループの研究者の皆様の近くに位置しつつ、信頼できる実験結果の出せるペプチドを提供してきたと自負しています。今後とも倍旧のご愛顧を賜りますようお願い申し上げます。



## Novel Peptides for the Neuroendocrine Research

Code	Compound	Price: Yen	
4389-v	Kisspeptin-10 (Human) / Metastin (Human, 45-54)	0.5 mg Vial	7,200
4453-v	Kisspeptin-10 (Rat) / Metastin (Rat, 43-52)	0.5 mg Vial	7,200
4446-s	Kisspeptin-54 (Human) / Metastin (Human, 1-54)	0.1 mg Vial	22,000
4447-s	Kisspeptin-52 (Rat) / Metastin (Rat, 1-52)	0.1 mg Vial	28,000
4460-v	Peptide 234	0.5 mg Vial	7,200
4461-v	RFamide-Related Peptide-3 (Human)	0.5 mg Vial	6,000
4462-v	RFamide-Related Peptide-3 (Rat)	0.5 mg Vial	8,000
4456-s	Adropin (Human, 34-76)	0.1 mg Vial	25,000



PEPTIDE INSTITUTE, INC.

株式会社 ペプチド研究所

<http://www.peptide.co.jp>

E-mail: [info@peptide.co.jp](mailto:info@peptide.co.jp)

本社

〒562-8686 大阪府 箕面市 稲 4-1-2

電話: 072-729-4121 FAX: 072-729-4124

彩都研究所

〒567-0085 大阪府 茨木市 彩都 あさぎ 7-2-9

電話: 072-643-4411 FAX: 072-643-4422



彩都研究所 (GMP 棟 と 正面玄関)

- ・ 総 編 集 長 岩 尾 洋 (大阪市立大学大学院医学研究科分子病態薬理学)
- ・ ベーシック編集長 玉 置 俊 晃 (徳島大学大学院病態情報医学講座情報伝達薬理学分野)
- ・ インフォマティクス編集長 田 中 利 男 (三重大学大学院医学系研究科薬理ゲノミクス)
- ・ ゲノミクス編集長 辻 本 豪 三 (京都大学大学院薬学研究科ゲノム創薬科学)
- ・ クリニカル編集長 伊 藤 正 明 (三重大学大学院循環器内科学)