

# 心不全病態において Apelin は ACE2 の陽性調節因子である\*

佐 藤 輝 紀

秋田大学大学院医学系研究科 医学教育学講座, 循環器内科学講座

(平成 27 年 9 月 24 日掲載決定)

## Apelin is a positive regulator of ACE2 in failing hearts

Teruki Sato

Department of Medical Education, Cardiovascular and Respiratory Medicine, Akita University Graduate School of Medicine

**Key words :** Apelin, ACE2, heart failure

### 1. はじめに

Apelin は内因性のペプチドリガンドであり, APJ レセプターに結合することによって心収縮能の増強<sup>1,2)</sup>や血管拡張<sup>3)</sup>, 血管新生<sup>4)</sup> など多彩な生理活性を発揮することが知られている.

一方で, ACE2 (アンジオテンシン変換酵素 2; Angiotensin Converting Enzyme2) は Carboxypeptidase として昇圧物質の Angiotensin II を基質として Angiotensin1-7 に変換し, レニン-アンジオテンシン系(RAS)を負に調節することが知られている<sup>5-7)</sup>. そのため, 血圧調節や心機能調節<sup>8,9)</sup>, 腎機能調節<sup>10,11)</sup>, 急性肺障害<sup>12,13)</sup> など, 生態の恒常性維持に重要な役割を担っていることが先行研究によって明らかにされてきた. とここで, ACE2 は Angiotensin II のみならず Apelin-13 も基質となることが *in vitro* の実験で報告されていた<sup>7)</sup>. その生理的意義は不明なままであった. さらに興味深いことに, 酵素と基質の関係である ACE2 と Apelin のそれぞれの遺伝子欠損マウスの心臓における表現型は似通っていることが報告されている<sup>9,14)</sup>. Apelin-APJ システムが RAS に拮抗することも報告さ

れている<sup>15)</sup>. その心臓における意義は明らかではなかった. そこで, 私達は心機能調節における Apelin と RAS の相互作用の意義を特に ACE2 に着目し, ノックアウト (KO) マウスの機能解析を用いて明らかにすることを目的として研究をおこなった.

### 2. Apelin KO マウスの心臓において ACE2 ならびに Ang1-7 の発現が低下していた

最初に, 私達はマウスの心臓におけるレニンアンジオテンシン系に関与する因子の mRNA の発現解析を行ったところ, 野生型に比較して Apelin KO マウスの心臓では ACE2 の発現のみが有意に低下していた (図 1A). また, ウェスタンブロット法で測定した ACE2 においても同様の結果が得られた (図 1B). 続いて, マウス血液中のアンジオテンシンペプチドを網羅的に測定する質量分析を行ったところ, マウスの横行大動脈縮窄 (TAC) 術を施行した圧負荷モデルにおいて, Apelin KO マウスでは野生型に比較して Ang1-7 が低下していた (図 2A, B). さらに, 血漿中の ACE2 活性も Apelin KO マウスでは有意に低く, ACE2 KO マウス同様であった (図 2C). つまり, Apelin KO マウスの心臓においては, ACE2 の発現・活性が低下していることにより, Ang1-7 も低下していることが明らかとなり, Apelin KO マウスと ACE2 KO マウスの表現型が似通っている一つの理由であろうと考えられた.

Corresponding author : Teruki Sato  
Department of Medical Education, Cardiovascular and Respiratory Medicine, Akita University Graduate School of Medicine, 1-1-1 Hondo, Akita 010-8543, Japan  
TEL : 81-18-884-6110  
FAX : 81-18-836-2612  
E-mail : satot@med.akita-u.ac.jp

\*平成 27 年 2 月 12 日秋田医学会学術受賞記念講演

(22)

Apelin induces ACE2

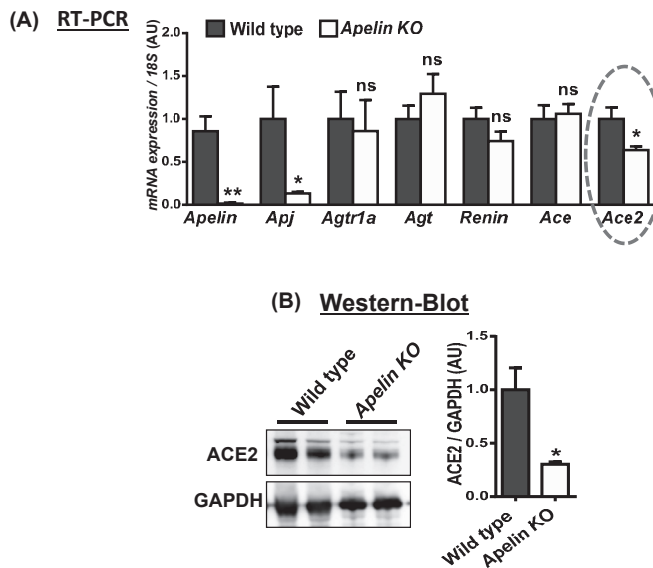


図 1. Apelin KO マウスの心臓において ACE2 の発現が低下している。

A; qRT-PCR によるレニンアンジオテンシン系関連遺伝子の発現解析。18S にて標準化。Apelin KO マウスの心臓では有意に ACE2 発現が低下している。

B; ウェスタンブロット法による ACE2 蛋白の発現解析。蛋白レベルにおいても ACE2 の発現は有意に低下していた。(n=8 per group, All values are means±SEM. \*P<0.05, \*\*P<0.01 versus wild type.)

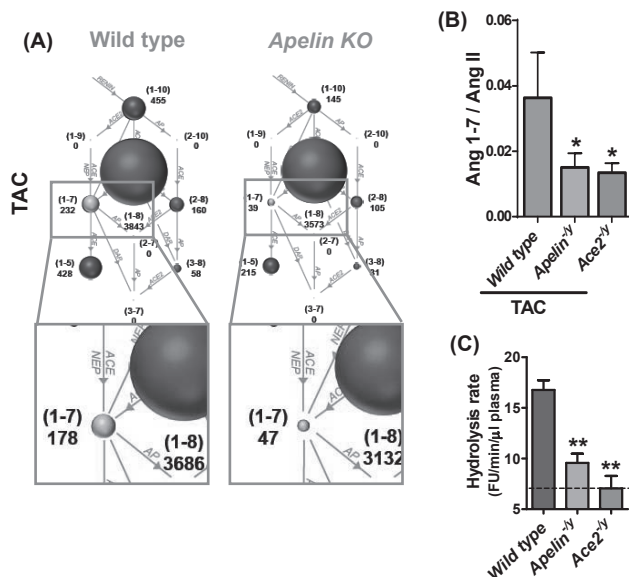


図 2. Apelin KO マウスでは ACE2 酵素活性が低下し、Ang1-7 の産生が低下している。

A,B; メタボローム解析によるアンジオテンシンペプチドの測定。TAC 術後の Apelin KO マウスでは Ang 1-7 の発現量が低下していた。Ang 1-7 / AngII 比は ACE2 の低下を示している。

C; マウス血漿中の ACE2 酵素活性を測定すると Apelin KO マウスは ACE2 KO マウスと同様に低下していた。(n = 3-6 per group, All values are means±SEM. \*P<0.05, †P=0.098 versus wild type.)

### 3. アンジオテンシン受容体阻害は Apelin KO マウスの心機能を改善する

ACE2 欠損マウスは, RAS システムが亢進していることにより, 心肥大や線維化を来すが, その表現型は ARB (Angiotensin Receptor Blocker, アンジオテンシン受容体拮抗薬) を投与することによって回復しうることが報告されている<sup>8)</sup>. そこで, 私達は Apelin KO マウスに ARB を投与することでその表現型を改善できるかどうかを実験で検証した. 12 か月齢の野生型マウスと Apelin KO マウスに ARB であるロサルタンを飲み水に混ぜて投与し, 心エコーにて心機能を評価した. 12 か月齢の Apelin KO マウスはベースラインで心機能が低下していたが, 投与後 6 か月した時点で野生型マウスと差がないほどに改善していることが分かった (図 3A). また, マウス心臓における mRNA 発現解析を行ったところ, ARB を投与した Apelin KO マウスでは BNP や  $\beta$ -MHC といった心不全関連遺伝子の発現が有意に抑制されていた (図 3B). そこで, AT1 受容体 KO マウスと Apelin KO マウスを交配することで AT1R; Apelin 二重欠損マウスを作製し, 心機能を評価した. 12 か月齢における心機能は Apelin KO マウスに比較して, AT1R; Apelin 二重欠損マウスでは有意に心機能が保持されていることが分かった. さらに, TAC 手術を施行して圧負荷モデルを作製したところ, Apelin KO マウスでは心機能が顕著に低下す

る一方で, AT1R; Apelin 二重欠損マウスでは心機能が保持されていた (図 A-C). すなわち, Apelin KO マウスにおける心機能低下は, アンジオテンシン II-AT1 受容体のシグナルを断ち切ることにより改善できることが, 薬理学的手法と, 遺伝学的手法の両方のアプローチによって明らかになった. 興味深いことに, ARB を投与した Apelin KO マウスや AT1R; Apelin 二重欠損マウスの心臓において, Apelin KO マウスと比較して ACE2 の発現が上昇していた (図 4D). これらのことは, ACE2 による RAS のバランス維持が心機能調節に重要であることを示唆している.

### 4. Ang 1-7 は Apelin の下流で心不全・心肥大を改善する

ACE2 は前述のように Angiotensin II から Ang 1-7 を産生するが, Ang 1-7 は Mas 受容体に結合することにより, AngII-AT1R 軸と拮抗的に作用したり, 心血管機能に良い効果をもたらすことが知られている<sup>16-18)</sup>. これまでの実験結果から, Apelin が欠損することにより, ACE2 の発現が低下, ひいては Ang1-7 の作用が減弱することが心機能低下を惹起していると考えられた. そこで, Apelin KO マウスの TAC モデルを用いて, Ang 1-7 ペプチド投与実験を行った. TAC 手術を施行すると同時に浸透圧ポンプを用いて Ang 1-7 ペプチドを持続投与した. 2 週間後に評価した Apelin KO マウ

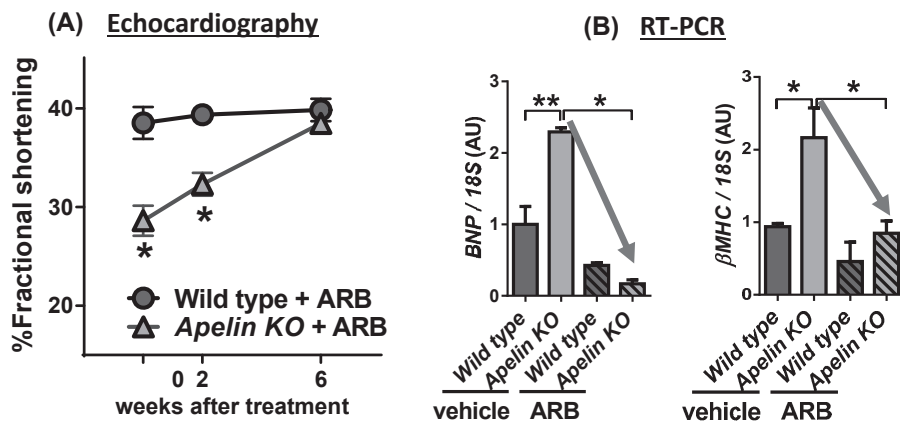


図 3. ARB にて Apelin KO マウスの心機能は改善できる

A; 心エコーにて測定したマウスの %FS の推移を折れ線グラフで示した. 投与開始後 6 週間で野生型マウスと差が無い程度に心機能が改善した.

B; qRT-PCR にて心臓における BNP や  $\beta$ MHC を測定し, ARB 投与後の Apelin KO マウスでは有意に低下を認めた.

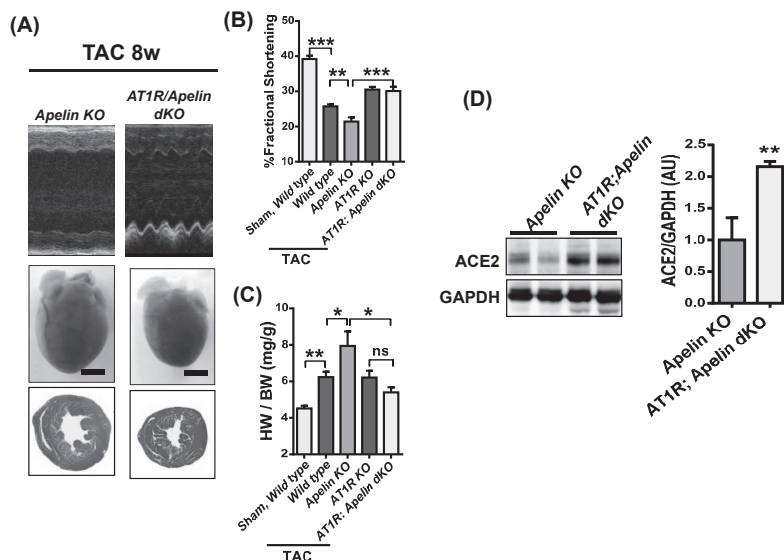


図 4. AT1R; Apelin 二重欠損マウスでは心機能が保護される。

A; TAC 8 週間後の Apelin KO マウスと AT1R; Apelin 二重欠損マウスの心エコー写真と心臓の写真, HE 染色による組織像。

B; TAC 後の心エコーによる %FS を示す。Apelin KO マウスの心機能低下は AT1R; Apelin 二重欠損マウスでは認められない。

C; 心体重比も AT1R; Apelin 二重欠損マウスでは肥大の程度が抑制されていた。

D; ウェスタンブロット法による ACE2 の定量。Apelin KO マウスと比較し, AT1R; Apelin 二重欠損マウスの心臓では ACE2 の発現が有意に高くなっていた。( $n=5-14$  per group, All values are means  $\pm$  SEM.

\* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ )

スの心機能では, 生理食塩水投与群に比較して Ang1-7 投与群で有意に心機能が保持され (図 5A, B), 心肥大も軽減されていた (図 5C)。したがって, TAC 心不全モデルにおいて, Ang1-7-Mas 受容体の経路は, Apelin の下流で心機能を保持する作用を持つことが分かった。

## 5. Apelin は心臓における ACE2 の発現を転写レベルで上昇させる

内因性の Apelin が, ACE2-Ang1-7 軸の作用を増強し心機能の維持に寄与することが分かった。そこで, 外因性の Apelin が ACE2 の発現にどのように作用するかを検討したところ, マウスに Apelin ペプチドを持続投与した結果, 心臓において ACE2 の発現が有意に上昇していた (図 6A)。さらに, *in vitro* の実験系で, マウスの初代培養心筋細胞においても Apelin ペプチドを添加することによっても ACE2 の発現が有意に上昇した (図 6B)。これらのことは, Apelin が ACE2 を

正に調節していることを示している。そして, そのメカニズムを検討するために, 培養細胞株を用いて ACE2 レポーターアッセイを行った。HEK293T 細胞にヒト ACE2 レポータープラスミドと APJ 発現プラスミドを遺伝子導入し, Apelin 添加の有無の条件で Luciferase Assay を行った。結果として, Apelin は APJ 受容体存在下で, 濃度依存性に ACE2 の転写活性を上昇させた。重要なこととして, ACE レポータープラスミドを用いた同条件の実験においては反応が見られなかった (図 6C)。すなわち, Apelin は転写性に ACE2 を制御していることが分かった。

## 6. AT1R 非依存性に Apelin は ACE2 の発現を上昇させる

APJ と AT1R が受容体レベルで拮抗することや<sup>15)</sup>, また AT1R 受容体シグナルを阻害することで ACE2 が上昇することが知られている<sup>19,20)</sup> ため, Apelin の ACE2 制御が直接的か間接的かを検討した。私達は

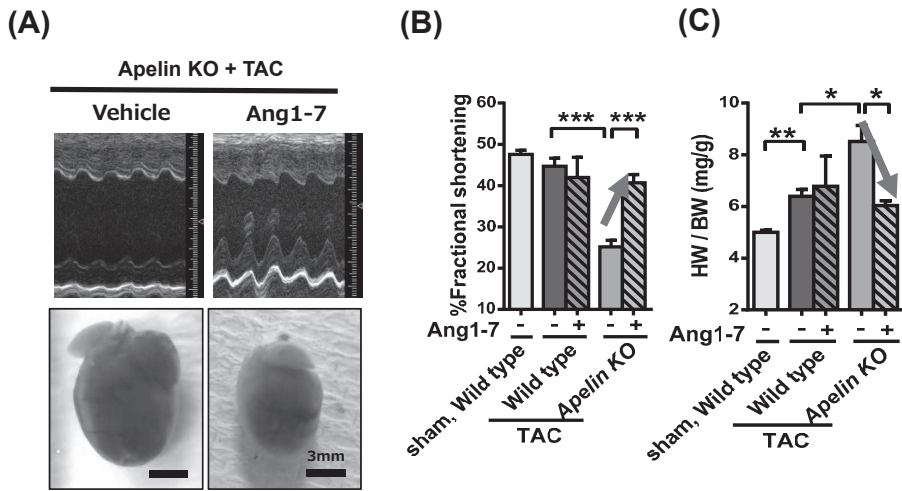


図 5. Ang 1-7 ペプチド投与による Apelin KO マウスの心機能低下と心肥大抑制  
C；心エコーと心臓の写真を示す. Ang 1-7 投与群では心収縮能が維持され, 心肥大も抑制されている. ( $n=5-6$  per group, All values are means  $\pm$  SEM.  $*P<0.05$ ,  $**P<0.01$ ,  $***P<0.001$ )

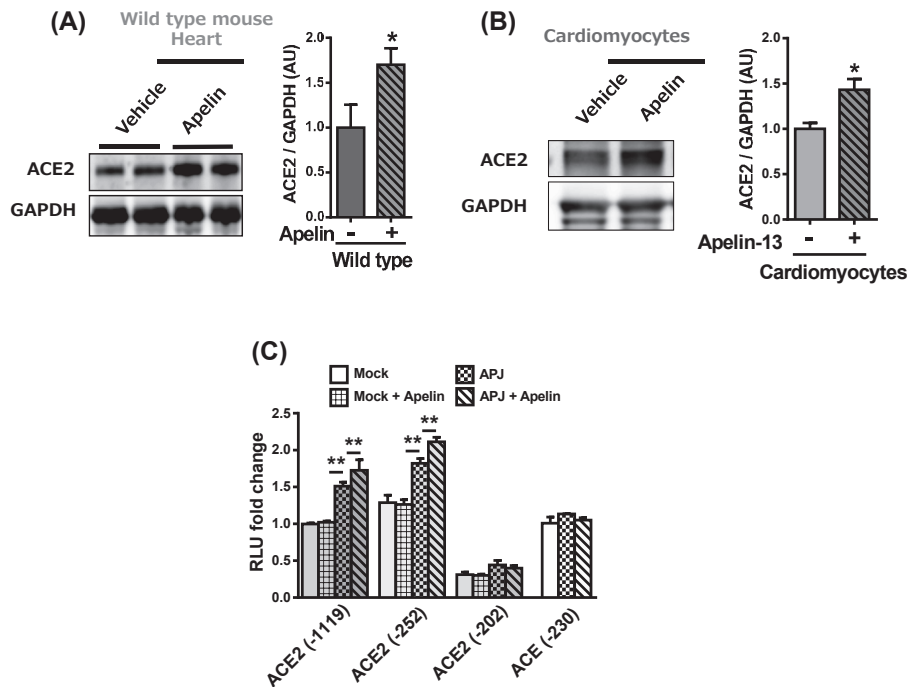


図 6. Apelin による ACE2 転写活性誘導と ACE2 発現上昇.  
B；Apelin 持続投与後野生型マウスの心臓 (A) と 1  $\mu$ M の Apelin ペプチドを添加したマウス単離心筋細胞における ACE2 蛋白をウエスタンブロットで定量した. 生理食塩水群と比較して有意に ACE2 の発現は上昇した.  
C；培養細胞における ACE2 レポーターアッセイにおいて, Apelin は ACE2 転写活性を誘導することが分かった.

(26)

Apelin induces ACE2

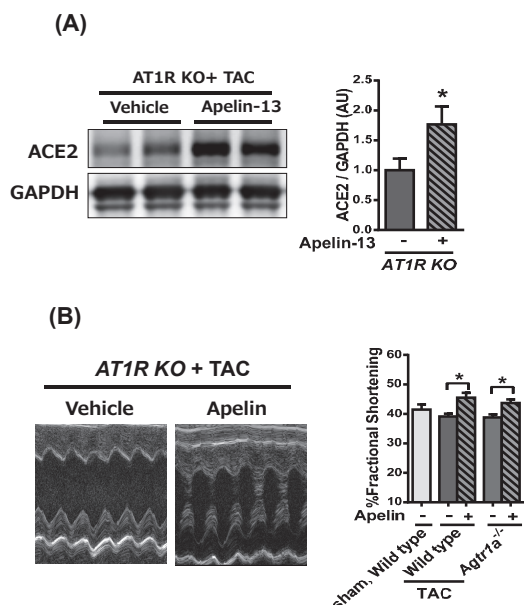


図 7. AT1R KO マウスにおいても Apelin は ACE2 を誘導し、心保護効果を発揮する。

A; AT1R KO マウス心臓における ACE2 発現量の解析。Apelin 投与群において ACE2 発現上昇を認める。

B; AT1R KO マウスの心エコーでは Apelin ペプチド投与によって心機能が維持されていた。

TAC 術を施行した AT1R KO マウスに Apelin 投与実験を行ったところ、心臓において生理食塩水群に比較して有意に Apelin 投与群において ACE2 の発現量は上昇していた (図 7A)。また、その心機能を心エコーで評価すると、Apelin の陽性変力作用が認められ (図 7B)、Apelin の生理活性は AT1R KO マウスにおいても発揮されることを確認した。これらの結果は Apelin が AT1R 非依存的なメカニズムによって ACE2 を正に調節し、心機能調節、心保護作用に寄与していることを示している。

## 7. さ い ご に

今回の研究で内因性 Apelin の欠損により ACE2, Ang1-7 の発現が減少することが分かった。同様に、外因性の Apelin は野生型マウスの ACE2 発現を上昇させ、心機能を改善した。さらに、その作用は AT1R とは独立な機構であったことから、Apelin が ACE2 の発現を誘導するという新しいシグナル経路が存在する

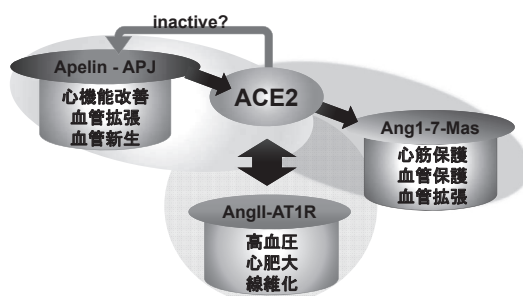


図 8. Apelin-APJ-ACE2-Ang1-7-Mas 分子ネットワークによる心血管病制御のシェーマ。

ことが分かった。すなわち、ACE2 が Apelin システムと RAS を共役させていて、Apelin は ACE2 を正に調節することで心機能調節において重要な役割を担っていると考えられた。一方で、Apelin が ACE2 の基質であるという先行研究から、ACE2 は Apelin のネガティブフィードバック機構として存在しているとこれまで考えられてきたが、本研究において、Ang1-7 により Apelin 欠損マウスの心機能を改善したことから、Apelin が ACE2 の発現上昇を介して Ang1-7 シグナルを活性化する、つまり Apelin シグナルの下流において ACE2 が Ang1-7 の正の調節因子として機能することが初めて明らかになった<sup>21)</sup>。また、本研究では Apelin が ACE2 を転写性に制御していることを示したが、詳細なメカニズムは解明の余地がある。将来的には Apelin-ACE2-Ang1-7 分子ネットワークが新たな治療法の開発につながる可能性があり、臨床研究も含めて今後の課題としたい (図 8)。

## 謝 辞

本研究は情報制御学・実験治療学講座 今井由美子教授、久場敬司准教授 (現分子機能学・代謝機能学教授) はじめ、同講座の研究員、実験補助の皆様のご助言、ご協力のもとに成しえた研究成果であり、この場をお借りして心より感謝申し上げます。

## 引用文献

- 1) Szokodi, I. (2002) Apelin, the novel endogenous ligand of the orphan receptor apj, regulates cardiac contractility. *Circulation research*, **91**, 434-440.
- 2) Berry, M.F., Pirolli, T.J., Jayasankar, V., Burdick, J.,



- Morine, K.J., Gardner, T.J. and Woo, Y.J. (2004) Apelin has in vivo inotropic effects on normal and failing hearts. *Circulation*, **110**, II187-193.
- 3) Ashley, E.A., Powers, J., Chen, M., *et al.* (2005) The endogenous peptide apelin potently improves cardiac contractility and reduces cardiac loading *in vivo*. *Cardiovascular research*, **65**, 73-82.
  - 4) Tempel, D., de Boer, M., van Deel, E.D., Haasdijk, R.A., Duncker, D.J., Cheng, C., Schulte-Merker, S. and Duckers, H.J. (2012) Apelin enhances cardiac neovascularization after myocardial infarction by recruiting aplnr+ circulating cells. *Circulation research*, **111**, 585-598.
  - 5) Donoghue, M., Hsieh, F., Baronas, E., *et al.* (2000) A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ace2) converts angiotensin i to angiotensin 1-9. *Circulation research*, **87**, E1-9.
  - 6) Tipnis, S.R., Hooper, N.M., Hyde, R., Karran, E., Christie, G. and Turner, A.J. (2000) A human homolog of angiotensin-converting enzyme. Cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase. *The Journal of biological chemistry*, **275**, 33238-33243.
  - 7) Vickers, C., Hales, P., Kaushik, V., *et al.* (2002) Hydrolysis of biological peptides by human angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase. *The Journal of biological chemistry*, **277**, 14838-14843.
  - 8) Yamamoto, K., Ohishi, M., Katsuya, T., *et al.* (2006) Deletion of angiotensin-converting enzyme 2 accelerates pressure overload-induced cardiac dysfunction by increasing local angiotensin ii. *Hypertension*, **47**, 718-726.
  - 9) Crackower, M.A., Sarao, R., Oudit, G.Y., *et al.* (2002) Angiotensin-converting enzyme 2 is an essential regulator of heart function. *Nature*, **417**, 822-828.
  - 10) Tikellis, C., Bialkowski, K., Pete, J., Sheehy, K., Su, Q., Johnston, C., Cooper, M.E. and Thomas, M.C. (2008) Ace2 deficiency modifies renoprotection afforded by ace inhibition in experimental diabetes. *Diabetes*, **57**, 1018-1025.
  - 11) Oudit, G.Y., Herzenberg, A.M., Kassiri, Z., Wong, D., Reich, H., Khokha, R., Crackower, M.A., Backx, P.H., Penninger, J.M. and Scholey, J.W. (2006) Loss of angiotensin-converting enzyme-2 leads to the late development of angiotensin ii-dependent glomerulosclerosis. *The American journal of pathology*, **168**, 1808-1820.
  - 12) Imai, Y., Kuba, K., Rao, S., *et al.* (2005) Angiotensin-converting enzyme 2 protects from severe acute lung failure. *Nature*, **436**, 112-116.
  - 13) Kuba, K., Imai, Y., Rao, S., *et al.* (2005) A crucial role of angiotensin converting enzyme 2 (ace2) in sars coronavirus-induced lung injury. *Nature medicine*, **11**, 875-879.
  - 14) Kuba, K., Zhang, L., Imai, Y., *et al.* (2007) Impaired heart contractility in apelin gene-deficient mice associated with aging and pressure overload. *Circulation research*, **101**, e32-42.
  - 15) Chun, H.J., Ali, Z.A., Kojima, Y., *et al.* (2008) Apelin signaling antagonizes ang ii effects in mouse models of atherosclerosis. *The Journal of clinical investigation*, **118**, 3343-3354.
  - 16) Ferreira, A.J., Santos, R.A., Bradford, C.N., Mecca, A.P., Summers, C., Katovich, M.J. and Raizada, M.K. (2010) Therapeutic implications of the vasoprotective axis of the renin-angiotensin system in cardiovascular diseases. *Hypertension*, **55**, 207-213.
  - 17) Santos, R.A., Simoes e Silva, A.C., Maric, C., *et al.* (2003) Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the g protein-coupled receptor mas. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **100**, 8258-8263.
  - 18) Ferrario, C.M., Chappell, M.C., Tallant, E.A., Brosnahan, K.B. and Diz, D.I. (1997) Counterregulatory actions of angiotensin-(1-7). *Hypertension*, **30**, 535-541.
  - 19) Agata, J., Ura, N., Yoshida, H., Shinshi, Y., Sasaki, H., Hyakkoku, M., Taniguchi, S. and Shimamoto, K. (2006) Olmesartan is an angiotensin ii receptor blocker with an inhibitory effect on angiotensin-converting enzyme. *Hypertension research: official journal of the Japanese Society of Hypertension*, **29**, 865-874.
  - 20) Igase, M., Kohara, K., Nagai, T., Miki, T. and Ferrario, C.M. (2008) Increased expression of angiotensin converting enzyme 2 in conjunction with reduction of neointima by angiotensin ii type 1 receptor blockade. *Hypertension research: official journal of the Japanese Society of Hypertension*, **31**, 553-559.
  - 21) Sato, T., Suzuki, T., Watanabe, H., *et al.* (2013) Apelin is a positive regulator of ace2 in failing hearts. *The Journal of clinical investigation*, **123**, 5203-5211.