

氏名・(本籍)	佐藤輝紀 (秋田県)
専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	医博甲第858号
学位授与の日付	平成26年3月22日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻	医学系研究科医学専攻
学位論文題名	Apelin is a positive regulator of ACE2 in failing hearts (心不全病態においてアペリンはACE2の陽性調節因子である)
論文審査委員	(主査) 教授 尾野 恭 一 (副査) 教授 羽 渕 友 則 教授 長谷川 仁 志

学位論文内容要旨

Apelin is a positive regulator of ACE2 in failing hearts.
心不全病態においてアペリンは ACE2 の陽性調節因子である

申請者 秋田大学大学院 循環器内科学 佐藤輝紀

研究目的

Apelin は APJ レセプターに結合することで多彩な生理活性を發揮する内因性のペプチドリガンドである。心臓における強力な陽性変力作用、血管拡張作用や血管新生、インスリン感受性の改善や、中枢神経系における水分調節作用などが報告されており特に心血管系の治療ターゲットとして近年注目されている。Apelin は Angiotensin converting enzyme2 (ACE2) の基質であることも *in vitro* の実験で報告されているが、その生理的な意義は明らかではない。また、Apelin システムがレニン-アンジオテンシン系(RAS)に拮抗的に作用するという報告がなされているが、心臓における機能的な意義はいまだ明らかでない部分が多い。そこで私たちは、心機能調節における Apelin と RAS の相互作用の機能的意義を、特に ACE2 に着目し、ノックアウト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た。

研究方法

マウス ; Apelin, ACE2, AT1R 遺伝子欠損(KO)マウスを作製した。また Apelin/AT1R 遺伝子二重欠損(ダブル KO)マウスも作製した。それらのマウスの心機能は動物用心エコー(Vevo770)で測定している。マウスの心臓における遺伝子発現解析は定量 RT-PCR、蛋白発現をウェスタンブロットで評価した。

圧負荷心肥大モデル ; マウスの心臓圧負荷モデルとして、横行大動脈縮窄手術(TAC)を用いた。麻酔下に大動脈を剖出し、7-0silk で 27G 針と共に縛って大動脈に狭窄を作製する。2 週間または 8 週間後に心エコーで心機能評価し、その後心臓をサンプリングした。

マウスの薬物投与 ; ARB 投与はロサルタンカリウムを 0.6g/L の濃度で飲み水に混ぜ、6 週間投与した。Apeiln-13 ペプチド、Ang1-7 ペプチドは 1mg/kg/day の投与速度となるように浸透圧ポンプをマウスの皮下に挿入し、2 週間持続投与した。

メタボローム解析(RAS fingerprint) ; RAS のペプチド変換酵素活性を評価する為、マウスの血液をヘパリン添加チューブに採取し、血漿を凍結保存。平衡化した後に、アンジオテンシンペプチドを網羅的に測定した。

ACE2 レポーターアッセイ ; 培養細胞である HEK293T 細胞や Vero E6 細胞を用いて、ACE2 レポータープラスミドと APJ レセプタープラスミド、AT1 レセプタープラスミドをトランスフェクションし、Apelin や AngiotensinII を添加することで ACE2 の転写活性がどのように変化するかをルシフェラーゼアッセイにて評価した。

研究成績

ApelinKO マウスの心臓においては、ACE2 の発現量が有意に低下していた。また、ApelinKO マウスの血漿中における、ACE2 活性も同様にして有意に低下していた。さらに、血漿サンプルにおけるメタボローム解析では ACE2 の低下を反映してアンジオテンシン 1-7 (Ang1-7)が有意に低下していることを見出した。

ApelinKO マウスの心機能は 12 か月齢において野生型と比較して有意に低下しているが、ARB を投与することによって改善することができた。さらに、AT1R/Apelin ダブル KO マウスを作製したところ、TAC 手術による圧負荷モデルにおいても、ApelinKO マウスの心機能低下は改善された。重要なことに、TAC により低下する ApelinKO マウスの心機能は Ang1-7 を投与することで改善することができた。

一方で、Apelin ペプチドを外因性に野生型マウスに投与することで心臓の ACE2 が上昇した。培養細胞における ACE2 レポーターアッセイの結果からも、Apelin は ACE2 のプロモーター活性を上昇させて ACE2 を制御することが明らかとなった。

最後に、AT1R KO マウスにおいても Apelin を投与することで、ACE2 の発現上昇が見られ、Apelin の陽性変力作用が確認されたことから、Apelin は AT1R 非依存的に ACE2 を制御することが明らかとなった。

結論と考察

これまでの先行研究から内因性の Apelin が欠損することによってマウスの心機能が低下することが分かっていたが、今回の研究により内因性 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 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。また、本研究では Apeiln 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。

学位(博士一甲)論文審査結果の要旨

主査：尾野 恭一

申請者：佐藤 輝紀

論文題名： **Apelin is a positive regulator of ACE2 in failing hearts**
(心不全病態においてアペリンは ACE2 の陽性調節因子である)

要旨

Apelin は APJ 受容体に結合することで多彩な生理活性を発揮する内因性リガンドとして近年注目されているペプチドである。一方、Apelin は Angiotensin 変換酵素 2 (ACE2) の基質としても知られており、Renin-Angiotensin-Aldosterone (RAS) 系との相互作用が推察されていた。著者の研究は、心機能調節における Apelin と RAS 系の相互作用の機能的意義を明らかにすることを目的として、遺伝子改変マウスの機能解析を中心に行われたものである。その結果、1) Apelin 遺伝子欠損マウスにおいて ACE2 の発現量が低下していた。2) Apelin 遺伝子欠損マウスにおいては心機能が低下するものの、Angiotensin 1 受容体 (AT1R) の抑制薬 (ARB) により改善することができた。3) 大動脈縮窄術 (TAC) による心不全モデルにおいて、野生型マウス及び Apelin 遺伝子欠損マウス共に心機能は低下するが、Apelin 遺伝子欠損マウスにおいてより顕著であった。ARB 及び Ang1-7 により心機能の回復が見られた。4) AT1R、Apelin のダブル遺伝子欠損マウスにおいては心機能低下が認められなかった。5) Apelin 持続投与により心臓での ACE2 発現量が上昇した。培養細胞においても Apelin が ACE2 を発現することがわかった。6) Apelin は AT1 受容体遺伝子欠損マウスにおいても ACE2 の発現を誘導し、心機能を改善した。以上のことから、Apelin は不全心において ACE2 の発現を誘導し、心機能を改善することが明らかとなった。Apelin の心機能改善作用は AT1 受容体とは独立な機構であることが示唆された。

本論文の斬新さ、重要性、研究方法の正確性、表現の明瞭さは以下の通りである。

1) 斬新さ

RAS 系は心血管系において血圧のみならず心機能制御などの恒常性維持に重要な役割

を担っているが、ACE2はAngiotensin IIをAng1-7に変換することによりRAS系を負に調節することが最近明らかになってきた。一方、ApelinはACE2の基質であるためにACE2により不活性化されることが試験管内の実験で示されている一方で、Apelinが多様な生理活性を発揮することが知られている。しかしながら、ApelinとACE2の間の生体内での相互作用は不明なままであった。本研究は、Apelin遺伝子欠損マウスの心臓についてRAS系遺伝子の発現解析を行ったところ、ACE2の発現レベルがApelin遺伝子欠損マウスにおいて著しく低下していることを見出したことに端を発している。以後、Apelin、ACE2、AT1R遺伝子欠損マウスを作成し、その機能解析を通じてApelin-ACE2-Ang1-7分子ネットワークという概念を提唱することに至ったことは極めて斬新である。本学位論文内容は、*Journal of Clinical Investigation*にて発表されており、その斬新性及び重要性は世界的にも認められている。

2) 重要性

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考えられてきたが、本研究において、ApelinはACE2を介してAng1-7シグナルを活性化することが明らかとなった。これは極めて画期的なことであり、ApelinがAT1Rとは独立してACE2を制御することを示している。本研究により、Apelin系とRAS系の2つのシステムをACE2が共役させることが初めて明らかとなった。今後Apelin-ACE2-Ang1-7の分子ネットワークが新しい治療法の開発につながることを期待される。また、ApelinがACE2を転写性に制御していることは全く新しい発見であり、そのメカニズム解明と共に本研究のさらなる発展を期待したい。

3) 研究方法の正確性

遺伝子改変マウスの作成及び機能解析、病態モデル(TAC)の作成、メタボローム解析、ACE2レポーターアッセイ、薬理学実験等、膨大な実験内容により構成されている。多彩な観点から作業仮説をひとつひとつ検証しており、研究に対する真摯な姿勢と共に高い実験技術を伺わせる。研究方法の正確性に関しては疑う余地がない。

4) 表現の明瞭さ

研究の背景、研究方法・方法・結果および考察が明瞭かつ詳細に記載されており、文章も簡明である。

以上述べたように、本論文は学位を授与するに十分値する研究と判定された。