

厚生労働科学研究費補助金 (長寿科学総合研究事業)
総括研究報告書

—血管内皮細胞特異的受容体の制御による動脈硬化予防に関する研究—

主任研究者 望月直樹 国立循環器病センター研究所循環器形態部 部長

研究要旨: 血栓形成から動脈硬化症の過程で特に重要と思われ、血管内皮細胞特異的に発現する7回膜貫通型受容体 Edg(Endothelial Differentiation Gene)ファミリーとAPV(AT1-related apelin/virus)受容体の情報伝達系を解明する。両受容体とも血管内皮細胞に発現することから動脈硬化症発症・増悪の制御にかかわる機能を有すると予想し、生理的機能をまず検討した。EdgについてはEdg受容体刺激によりVEGF受容体が活性化され、細胞内情報伝達系が活性化されることを明らかにしたので、新規VEGF受容体拮抗薬による内皮細胞運動機能の抑制効果について検討した。さらにEdg受容体拮抗薬のスクリーニング系を開発した。APVはノックアウトマウスを作製し、アンジオテンシンIIによって惹起される血圧上昇作用に対してAPV受容体は拮抗的に働く降圧系である可能性が示唆された。

分担研究者 深水昭吉
筑波大学先端学際領域研究センター
応用生物化学系 教授

A.研究目的

動脈硬化の発症機構や脳血管機能の解明には、内皮細胞の制御機構を明らかにすることは必須である。血管内皮細胞におけるEdg, APV両受容体の機能を調べることに動脈硬化症の予防に通ずる治療方法を開発することを目的に研究を行った。まずEdg, APVの生理的機能を明らかにするために、Edg, APV受容体について、今年度以下の目標を設定した。

(1) Edg受容体ファミリーの細胞内情報伝達系を検討し、至適なEdg受容体拮抗薬・作働薬のスクリーニング系を開発する。また、これまで本研究により明らかにしてきたEdg受容体からVEGF受容体へのTransactivation機構についてさらに検討し、血管内皮細胞の運動制御を新規VEGF受容体拮抗薬で抑制可能か否かを検討する。
(2) APV受容体がどのG蛋白質と共役しているのかを同定する。また、APV受容体の遺伝子欠損マウスのヘテロ接合体・ホモ接合体の内皮機能に着目して解析を行う。

B.研究方法

1) APV受容体シグナル伝達経路の解明: 樹立したマウスAPV受容体安定発現細胞を用い、2ndメッセンジャーとしてCa²⁺の流入・cAMP産生を観察した。さらにAkt/PKB, MAPKのうちERKや、JNKとp38の活性化を測定するため、ウェスタンブロッティングにてリン酸化状態を検討した。

2) マウスAPV受容体遺伝子改変マウスの作製・解析: APV受容体の翻訳領域をネオマイシン耐性遺伝子、さらに詳細な発現解析のため核移行シグナルを持つlacZ遺伝子と置き換えた遺伝子欠損マウスを作製し、ヘテロ接合体マウスを取得した。これらヘテロ接合体マウスを交配し、ホモ接合体マウスを取得して実験に供した。

(倫理面への配慮) マウスの実験に関しては、筑波大学実験動物委員会の倫理規定に沿って行った。

3) 新規VEGF受容体拮抗薬MZ323881によるVEGF受容体依存性血管内皮細胞情報伝達系の解明—ヒト大動脈内皮細胞(HAECs)を培養しS1Pで刺激したときにVEGF受容体のtransactivationを確認した。ERKの活性化は抗リン酸化ERK抗体を用

いてImmunoblottingを行ない検討した。VEGF受容体のリン酸化は抗リン酸化抗体による免疫沈降物のVEGF受容体交抗による検出で確認した。細胞の運動機能についてVEGF依存性の運動能の亢進を抗リン酸化Akt抗体を用いて検討した。また、VEGF刺激による細胞の進展にアダプター蛋白質Crkが関与するか否かを調べた。以上の情報伝達系について新規VEGF受容体阻害薬MZ323881(AstraZeneca社より提供された)の効果を調べた。

4) VEGF刺激による細胞遊走にかかわる調節機構の解明—HAECsをVEGFで刺激したときにおこる細胞進展と細胞の運動能についてVEGFR-2阻害剤MZ323881の有効性について調べた。

5) 血管形成能に及ぼすVEGF刺激の検討—HAECsのVEGF存在下あるいはHGF存在下での血管形成能についてまず調べ、これにたいしてMZ323881が抑制作用を有するか調べた。コラーゲンマトリゲルのなかにHAECsを培養し管腔形成とその占有率を計算することで形成能を評価した。

本研究の細胞の進展についての評価・細胞の運動能の評価は細胞を倒立顕微鏡でtime-lapseで観察し、imageした後にMetaMorph解析ソフト(Roper社製)で評価を行った。

6) Edg受容体の作働薬開発のためのスクリーニング系の開発—昨年までにEdg受容体のcDNAのクローニングを終了しEdg1,3,5,6(S1P受容体)、Edg2,4,7(LPA受容体)の発現細胞株を樹立した。この細胞株を用いてFluo3-AMで細胞をラベルすることで刺激依存性の細胞内Caの増加を計測できるシステムを開発した。

C.研究結果

APV受容体シグナル伝達経路の解明:

樹立したマウスAPV受容体安定発現細胞の解析から、APV受容体の細胞内情報伝達経路として三量体G蛋白質のなかでGiを介すること、2ndメッセンジャーとしてCa²⁺の流入・cAMP産生が抑制されることを見出した。さらに糖代謝、細胞の運動や生存において重要なAkt/PKBの活性化、細胞の増殖、生存、運動に重要なMAPKのうちERKを活性化することを明らかにした。一方、JNKとp38は活性化しないことが判明した。

マウスAPV受容体遺伝子改変マウスの作製・解析: ヘテロ接合体、ホモ接合体ともに意識下における血

庄は、野生型マウスと同様であった、しかし、ACE阻害剤を1週間投与したホモ接合体に対してアンジオテンシンIIを投与した場合、野生型に比して血圧上昇の感受性が亢進していた。

新規 VEGF 受容体拮抗薬 ZM323881 の作用：HAECsをVEGFで刺激するとERK/MAPKの活性化を認めたがこのERKの活性化はMZ323881の濃度依存性に抑制された。完全に抑制する濃度は10 μ Mであった。VEGF受容体のなかでVEGFR-1, -R2, -R3のいずれに対して特異的にMZ323881が阻害するかを各VEGFRのリン酸化の阻害活性で調べた。MZ323881はVEGFR-2特異的阻害薬であることが判明した。他のチロシンキナーゼに対する阻害作用の有無をそれぞれの刺激依存性の受容体のリン酸化を阻害するか否かで検討した。PDGF受容体阻害もEGF受容体阻害も認めなかった。HGF受容体阻害もないことはHGF依存性のAktのリン酸化を阻害しないことから明らかになった。さらにHGF依存性のNOSのリン酸化も阻害しないことからHGF受容体阻害は無いことを確認できた。

VEGF 刺激による細胞遊走調節機構には VEGFR-2 が必須：HAECの細胞運動能はVEGFで亢進するがそのときの指標としてアダプター蛋白質Crkのリン酸化を伴うことをこれまでに明らかにしてきた。S1P依存性のEdg受容体からのVEGF受容体のTransactivationでもCrkのリン酸化を起こしていた。VEGF刺激によりHAECは細胞を進展させるがこの進展作用はCrkIIのリン酸化を伴い、またCrkIの優勢劣性変異型で抑制された。またVEGFR-2受容体阻害薬であるNZ323881でも抑制されたことからVEGFによる細胞進展にはVEGFR-2が不可欠であることが判明した。また細胞の運動性の亢進もVEGFR-2阻害薬により抑制されたのでVEGFR-2依存性であることがあきらかとなった。VEGF刺激による管腔形成もZM323881により抑制されたが、HGF依存性の管腔形成は阻害されなかった。

Edg 受容体の作働薬開発のためのスクリーニング系：昨年までにクローニングしていたEdg cDNAを恒常的に発現するようにneomycin耐性遺伝子をもつプラスミドに入れてネオマイシン選択培地で培養して安定発現細胞株を樹立した。樹立できた株はHela細胞を親株として、Edg-1,2,3,4,5,6,7までをそれぞれ発現する株である。この細胞株に蛍光色素Fluo3-AMを導入してS1P刺激依存性にCaを測定する系を構築した。96穴プレートでも測定可能であるためにスクリーニング系に使用できることを確認した。製薬会社との共同研究ですでにEdg受容体の作働薬のスクリーニングに着手した。

D. 考察

本年度の研究から、GiからMAPKKを介しERKに至るシグナルにはチロシンキナーゼが関与している可能性があることが明らかとなった。さらに、リガンドであるアペリン刺激によって細胞に形態変化や細胞骨格の変化、またアポトーシスの抑制作用が見られることから、アペリン-APV受容体シグナル伝達は重要な生理作用を担っていることが推察される。一方、遺伝子欠損マウスの解析から、アンジオテンシンIIによって惹起される血圧上昇作用に対してAPV受容体は拮抗的に働く降圧系である可能性が示唆された。現在、血管内皮細胞特異的APV受容体過剰発現マウス(樹立中)、血管平滑筋細胞特異的APV受容体過剰発現マウス(樹立済み)、心筋細胞特異的APV受容体過剰発現マウス(作製予定)を作

製し、全身性の血圧制御に加えて心肥大や動脈硬化症といった心血管イベントへの関与を解析している。

Edg受容体の主要な情報伝達系として昨年までにVEGF受容体のtransactivationを明らかにしてきた。本年度はこのVEGFR活性化によって惹起される細胞内情報伝達系がZM323881という新規VEGFR-2阻害薬で抑制されることを明らかにした。細胞増殖の指標であるERK/MAPK系の阻害・e-NOS/Aktの阻害さらには、細胞の運動にかかわるCrkのリン酸化や管腔形成をZM323881は抑制した。このことから、VEGFR-2がVEGFR-1,-R2,-R3のなかで生物学的に特に重要であることが示唆された。ただし、VEGFR-1/VEGFR-2のheterodimerの受容体も存在し、このheterodimerが優位に働いていると、このtypeの受容体機能も抑制してしまうために、VEGFR-2のみが重要とは結論できない。ただし、VEGFR-2が必須であることは結論できた。また、本研究の目的であったEdg受容体作働薬の開発に着手するためのスクリーニング系を確立できたことは研究成果として大きかった。特に、製薬会社との共同研究を開始して候補薬剤のいくつかを同定して現在その薬剤について、さらに改良を加えている

E. 結論

- (1) Edg受容体刺激はVEGF受容体のTransactivationを介して細胞運動を調節していることを新規VEGFR-2拮抗薬を用いて明らかにした。
- (2) APV受容体は三量体GTP結合蛋白質Giを介してERK/MAPKを活性化するとともに、アポトーシス抑制・細胞骨格再編成作用を示すことを明らかにした。
- (3) APVは個体ではAngiotensinによる昇圧作用に拮抗する降圧作用を有することをノックアウトマウスを用いて明らかにした。

F. 健康危険情報

特記なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Endo A, Nagashima K, Kurose H, Mochizuki S, Matsuda M, Mochizuki N. Sphingosine 1-phosphate induces membrane ruffling and increases motility of human umbilical vein endothelial cells via vascular endothelial growth factor receptor and CrkII. *J Biol Chem*. 277: 23747-54, 2002
- (2) Post GR, Swiderski C, Waldrop BA, Salty L, Glembocki CC, Wolthuis RM, Mochizuki N. Guanine nucleotide exchange factor-like factor (Rlf) induces gene expression and potentiates alpha 1-adrenergic receptor-induced transcriptional responses in neonatal rat ventricular myocytes. *J Biol Chem*. 277:15286-92, 2002
- (3) R. E. Itoh, K. Kurokawa, Y. Ohba, H. Yoshizaki, N. Mochizuki, and M. Matsuda. Activation of Rac and Cdc42 video-imaged by FRET-based single-molecule probes in the membrane of living cells. *Mol. Cell. Biol*. 22:6582-6591, 2002
- (4) Kunori Y, Koizumi M, Masegi T, Kasai H,

Kawabata H, Yamazaki Y, and Fukamizu A.
Rodent α -chymase are elastase-like proteases.
Eur. J. Biochem. 269, 5921-5930, 2002

- (5) Araya N, Hirota K, Shimamoto Y, Miyagishi M, Yoshida E, Ishida J, Kaneko S, Kaneko M, Nakajima T, and Fukamizu A. Cooperative interaction of EWS with CBP selectively activates HNF4-mediated transcription. *J. Biol. Chem.* 278, 5427-5432, 2003
- (6) Daitoku H, Yamagata K, Matsuzaki H, Hatta M, and Fukamizu A. Regulation of PGC-1 promoter activity by protein kinase B and the forkhead transcription factor FKHR. *Diabetes* 52, 642-649, 2003

2. 学会発表

- (1) 橋本泰美、石田純治、山本理恵、藤原佳絵、浅田幸江、深水昭吉「APV 受容体の細胞内情報伝達経路の解析」第 25 回 日本分子生物学会 平成 14 年 12 月 (横浜)
- (2) 菅谷健、粕谷善俊、望月直樹、深水昭吉「マウス APV 受容体の細胞内情報伝達経路の解析」第 25 回 日本分子生物学会 平成 14 年 1 2 月 (横浜)

H. 知的所有権の出願・取得状況 該当無し

－内皮細胞受容体 Edg, APV の機能解析に関する研究－

主任研究者 望月直樹 国立循環器病センター研究所循環器形態部 部長

研究要旨：血栓形成から動脈硬化症の過程で特に重要と思われ、血管内皮細胞特異的に発現する7回膜貫通型受容体 Edg(Endothelial Differentiation Gene)ファミリーの情報伝達系を解明する。血管内皮細胞では Edg 受容体刺激により VEGF 受容体が活性化され、細胞内情報伝達系が活性化されることを明らかにしたので、新規 VEGF 受容体拮抗薬による内皮細胞運動機能の抑制効果について検討した。さらに Edg 受容体拮抗薬のスクリーニング系を開発した。

A.研究目的

Edg 受容体ファミリーの細胞内情報伝達系を検討し、至適な Edg 受容体拮抗薬・作働薬のスクリーニング系を開発する。また、これまで本研究により明らかにしてきた Edg 受容体から VEGF 受容体への Transactivation 機構についてさらに検討し、血管内皮細胞の運動制御を新規 VEGF 受容体拮抗薬で抑制可能か否かを検討する。

B.研究方法

新規 VEGF 受容体拮抗薬 ZM323881 による VEGF 受容体依存性血管内皮細胞情報伝達系の解明—ヒト大動脈内皮細胞(HAECs)を培養し S1P で刺激したときに VEGF 受容体の transactivation を確認した。ERK の活性化は抗リン酸化 ERK 抗体を用いて Immunoblotting を行ない検討した。VEGF 受容体のリン酸化は抗リン酸化抗体による免疫沈降物の VEGF 受容体交抗による検出で確認した。細胞の運動機能について VEGF 依存性の運動能の亢進を抗リン酸化 Akt 抗体を用いて検討した。また、VEGF 刺激による細胞の進展にアダプター蛋白質 Crk が関与するか否かを調べた。以上の情報伝達系について新規 VEGF 受容体阻害薬 MZ323881 (AstraZeneca 社より提供された)の効果を調べた。VEGF 刺激による細胞遊走にかかわる調節機構の解明—HAECs を VEGF で刺激したときにおこる細胞進展と細胞の運動能について VEGFR-2 阻害剤 MZ323881 の有効性について調べた。血管形成能に及ぼす VEGF 刺激の検討—HAECs の VEGF 存在下あるいは HGF 存在下での血管形成能についてまず調べ、これにたいして MZ323881 が抑制作用を有するか調べた。コラーゲンマトリゲルのなかに HAECs を培養し管腔形成とその占有率を計算することで形成能を評価した。本研究の細胞の進展についての評価・細胞の運動能の評価は細胞を倒立顕微鏡で time-lapse で観察し、image した後に MetaMorph 解析ソフト (Roper 社製) で評価を行った。Edg 受容体の作働薬開発のためのスクリーニング系の開発—昨年までに Edg 受容体の cDNA のクローニングを終了し Edg1,3,5,6 (S1P 受容体)、Edg2,4,7 (LPA 受容体)の発現細胞株を樹立した。この細胞株を用いて Fluo3-AM で細胞をラベルすることで刺激依存性の細胞内 Ca の増加を計測できるシステムを開発した。

C.研究結果

新規 VEGF 受容体拮抗薬 ZM323881 の作用：

HAECs を VEGF で刺激すると ERK/MAPK の活性化を認めたがこの ERK の活性化は MZ323881 の濃度依存性に抑制された。完全に抑制する濃度は 10 μ M であった。VEGF 受容体のなかで VEGFR-1, -R2, -R3 のいずれに対して特異的に MZ323881 が阻害するかを各 VEGFR のリン酸化の阻害活性で調べた。MZ323881 は VEGFR-2 特異的阻害薬であることが判明した。他のチロシンキナーゼに対しての阻害作用の有無をそれぞれの刺激依存性の受容体のリン酸化を阻害するか否かで検討した。PDGF 受容体阻害も EGF 受容体阻害も認めなかった。HGF 受容体阻害もないことは HGF 依存性の Akt のリン酸化を阻害しないことから明らかになった。さらに HGF 依存性の NOS のリン酸化も阻害しないことから HGF 受容体阻害は無いことを確認できた。VEGF 刺激による細胞遊走調節機構には VEGFR-2 が必須：HAEC の細胞運動能は VEGF で亢進するがそのときの指標としてアダプター蛋白質 Crk のリン酸化を伴うことをこれまでに明らかにしてきた。S1P 依存性の Edg 受容体からの VEGF 受容体の Transactivation でも Crk のリン酸化を起こしていた。VEGF 刺激により HAEC は細胞を進展させるがこの進展作用は CrkII のリン酸化を伴い、また CrkI の優勢劣性変異型で抑制された。また VEGFR-2 受容体阻害薬である NZ323881 でも抑制されたことから VEGF による細胞進展には VEGFR-2 が不可欠であることが判明した。また細胞の運動性の亢進も VEGFR-2 阻害薬により抑制されたので VEGFR-2 依存性であることがあきらかとなった。VEGF 刺激による管腔形成も ZM323881 により抑制されたが、HGF 依存性の管腔形成は阻害されなかった。Edg 受容体の作働薬開発のためのスクリーニング系：昨年までにクローニングしていた Edg cDNA を恒常的に発現するように neomycin 耐性遺伝子をもつプラスミドに入れてネオマイシン選択培地で培養して安定発現細胞株を樹立した。樹立できた株は Hela 細胞を親株として、Edg-1,2,3,4,5,6,7 までをそれぞれ発現する株である。この細胞株に蛍光色素 Fluo3-AM を導入して S1P 刺激依存性に Ca²⁺ を測定する系を構築した。96穴プレートでも測定可能であるためにスクリーニング系に使用できることを確認した。製薬会社との共同研究ですでに Edg 受容体の作働薬のスクリーニングに着手した。

D.考察

Edg 受容体の主要な情報伝達系として昨年までに VEGF 受容体の transactivation を明らかにしてき

た。本年度はこの VEGFR 活性化により生じる細胞内情報伝達系が ZM323881 という新規 VEGFR-2 阻害薬で抑制されることを明らかにした。細胞増殖の指標である ERK/MAPK 系の阻害・e-NOS/Akt の阻害さらには、細胞の運動にかかわる Crk のリン酸化や管腔形成を ZM323881 は抑制した。このことから、VEGFR-2 が VEGFR-1、-R2、-R3 のなかで生物学的に特に重要であることが示唆された。ただし、VEGFR-1/VEGFR-2 の heterodimer の受容体も存在し、この heterodimer が優位に働いていると、この type の受容体機能も抑制してしまうために、VEGFR-2 のみが重要とは結論できない。ただし、VEGFR-2 が必須であることは結論できた。

また、本研究の目的であった Edg 受容体作働薬の開発に着手するためのスクリーニング系を確立できたことは研究成果として大きかった。特に、製薬会社との共同研究を開始して候補薬剤のいくつかを同定して現在その薬剤について、さらに改良を加えている。

E. 結論

血管内皮細胞で Edg は VEGFR を活性化しこの下流の情報伝達系に作用している。VEGFR-2 が増殖・運動に不可欠であった。また、Edg 受容体作働薬のスクリーニング系を確立しスクリーニングを開始した。

F. 健康危険情報

特記なし。

G. 研究発表

- (1) Endo A, Nagashima K, Kurose H, Mochizuki S, Matsuda M, Mochizuki N. Sphingosine 1-phosphate induces membrane ruffling and increases motility of human umbilical vein endothelial cells via vascular endothelial growth factor receptor and CrkII. **J Biol Chem.** 277: 23747-54, 2002
- (2) Shinohara M, Terada Y, Iwamatsu A, Shinohara A, Mochizuki N. Higuchi M, Gotoh Y, Ihara S, Nagata S, Itoh H, Fukui Y, Jessberger R. SWAP-70 is a guanine-nucleotide-exchange factor that mediates signalling of membrane ruffling. **Nature** 416: 759-63, 2002
- (3) Post GR, Swiderski C, Waldrop BA, Salty L, Glembotski CC, Wolthuis RM, Mochizuki N. Guanine nucleotide exchange factor-like factor (Rlf) induces gene expression and potentiates alpha 1-adrenergic receptor-induced transcriptional responses in neonatal rat ventricular myocytes. **J Biol Chem.** 277:15286-92, 2002

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当無し

動物モデルにおける Edg, APV の動脈硬化での役割に関する研究

分担研究者 深水昭吉 筑波大学応用生物化学系 教授

研究要旨: 動脈硬化の発症機構や脳血管機能の解明には、内皮細胞の制御機構を明らかにすることが必須である。マウス APV (AT1-related apelin/virus) 受容体は、内皮細胞、平滑筋細胞、脳、心臓、腎臓、肺や脂肪細胞に発現し、G タンパク質共役型 7 回膜貫通型受容体に分類される。しかし、APV 受容体を介した生理作用は不明である。そこで本研究は、APV 受容体の生理機能を解明し、G タンパク質共役型受容体を持つ病態発生メカニズムを理解し、動脈硬化予防に資することを目的とした。

A. 研究目的

三量体 G タンパク質と共役している 7 回膜貫通型受容体は、様々な生理活性物質をリガンドとして受け取り、生体の発生分化や生理機能において重要な役割を担っている。分担者は、血圧調節に重要なマウス・1 型アンジオテンシン受容体 (AT1 受容体) と高い相同性があり、心血管系を中心に高い発現が見られる 7 回膜貫通型構造をとるマウス受容体をクローニングした。最近では、そのリガンドとしてアペリンという 36 アミノ酸からなるペプチドが同定された。一方、この受容体のヒトホモログは HIV 感染時の共役受容体となる可能性が報告されたものの、その詳細な生理機能は未だ不明な点が多い。分担者は、この受容体を APV 受容体 (AT1-related apelin/virus receptor) と命名し、細胞レベル・組織レベル・個体レベルにおける生理機能の解析を進めている。

動脈硬化の発症機構や脳血管機能の解明には、内皮細胞の制御機構を明らかにすることは必須である。そこで、内皮細胞に発現する樹立細胞株を活用して、APV 受容体がどの G 蛋白質と共役しているのかを同定する。また、APV 受容体の遺伝子欠損マウスのヘテロ接合体・ホモ接合体の内皮機能に着目して解析を行う。APV 受容体の拮抗薬が存在しない現在、受容体を介したシグナル伝達系を明らかにして、さらにノックアウトマウスの表現型を解析することは、拮抗薬創生のヒントを得ることが出来る。

B. 研究方法

1) APV 受容体シグナル伝達経路の解明: 樹立したマウス APV 受容体安定発現細胞を用い、2nd メッセンジャーとして Ca^{2+} の流入・cAMP 産生を観察した。さらに Akt/PKB、MAPK のうち ERK や、JNK と p38 の活性化を測定するため、ウェスタンブロッティングにてリン酸化状態を検討した。

2) マウス APV 受容体遺伝子改変マウスの作製・解析: APV 受容体の翻訳領域をネオマイシン耐性遺伝子、さらに詳細な発現解析のため核移行シグナルを持つ *lacZ* 遺伝子と置き換えた遺伝子欠損マウスを作製し、ヘテロ接合体マウスを取得した。これらヘテロ接合体マウスを交配し、ホモ接合体マウスを取得して実験に供した。(倫理面への配慮) マウスの実験に関しては、筑波大学実験動物委員会の倫理規定に沿って行った。

C. 研究結果

1) APV 受容体シグナル伝達経路の解明: 樹立したマウス APV 受容体安定発現細胞の解析から、APV 受容体の細胞内情報伝達経路として三量体 G 蛋白質の内 Gi を介すること、2nd メッセンジャーとして Ca^{2+} の流入・cAMP 産生が抑制されることを見出した。さらに糖代謝、細胞の運動や生存において重要な Akt/PKB の活性化、細胞の増殖、生存、運動に重要な MAPK のうち ERK を

活性化することを明らかにした。一方、JNK と p38 は活性化しないことが判明した。

2) マウス APV 受容体遺伝子改変マウスの作製・解析: ヘテロ接合体、ホモ接合体ともに意識下における血圧は、野生型マウスと同様であった、しかし、ACE 阻害剤を 1 週間投与したホモ接合体に対してアンジオテンシン II を投与した場合、野生型に比して血圧上昇の感受性が亢進していた。

D. 考察

本年度の研究から、Gi から MAPKK を介し ERK に至るシグナルにはチロシキナーゼが関与している可能性があることが明らかとなった。さらに、リガンドであるアペリン刺激によって細胞に形態変化や細胞骨格の変化、またアポトーシスの抑制作用が見られることから、アペリン-APV 受容体シグナル伝達は重要な生理作用を担っていることが推察される。一方、遺伝子欠損マウスの解析から、アンジオテンシン II によって惹起される血圧上昇作用に対して APV 受容体は拮抗的に働く降圧系である可能性が示唆された。現在、血管内皮細胞特異的 APV 受容体過剰発現マウス(樹立中)、血管平滑筋細胞特異的 APV 受容体過剰発現マウス(樹立済み)、心筋細胞特異的 APV 受容体過剰発現マウス(作製予定) を作製し、全身性の血圧制御に加えて心肥大や動脈硬化症といった心血管イベントへの関与を解析している。

E. 結論

本研究から、APV 受容体シグナル伝達系は心血管系細胞に対して重要な生理作用を担っていることが示唆された。今後は新たな予防・治療法の開発のため、APV 受容体に関わる薬剤の開発に着手し、その評価系として APV 受容体安定発現細胞、遺伝子欠損マウス、遺伝子導入マウスを効果的に利用していく予定である。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Kunori, Y., Koizumi, M., Masegi, T., Kasai, H., Kawabata, H., Yamazaki, Y., and Fukamizu, A.: Rodent a-chymase are elastase-like proteases. *Eur. J. Biochem.* 269, 5921-5930 (2002)
- (2) Araya, N., Hirota, K., Shimamoto, Y., Miyagishi, M., Yoshida, E., Ishida, J., Kaneko, S., Kaneko, M., Nakajima, T., and Fukamizu, A.: Cooperative interaction of EWS with CBP selectively activates HNF4-mediated transcription. *J. Biol. Chem.* 278, 5427-5432 (2003)
- (3) Daitoku, H., Yamagata, K., Matsuzaki, H., Hatta, M., and Fukamizu, A.: Regulation of PGC-1 promoter

activity by protein kinase B and the forkhead transcription factor FKHR. *Diabetes* 52, 642-649 (2003)

2. 学会発表

- (1) 橋本泰美、石田純治、山本理恵、藤原佳絵、浅田幸江、深水昭吉「APV 受容体の細胞内情報伝達経路の解析」第 25 回 日本分子生物学会 平成 14 年 12 月(横浜)
- (2) 菅谷健、粕谷善俊、望月直樹、深水昭吉「マウス APV 受容体の細胞内情報伝達経路の解析」第 25 回 日本分子生物学会 平成 14 年 12 月(横浜)

H. 知的財産権の出願・登録状況 特になし