

脳保護におけるAT₂受容体

茂木 正樹 岩井 將 堀内 正嗣

要 旨：脳保護作用のあるアンジオテンシンII(Ang II)1型受容体ブロッカー(ARB)の神経細胞への影響を検討した。Ang II 2型(AT₂)受容体刺激でneurosphereは分化し神経分化因子のMMS2が増加した。AT₂受容体欠損マウスでは野生型と比較して脳梗塞後認知機能は顕著に低下し、脳内のMMS2の発現増強は認められなかった。脳保護にはARBで相対的に活性化するAT₂受容体刺激が重要と考えられた。(J Jpn Coll Angiol, 2006, 46: 377-382)

Key words: angiotensin II type-1 receptor blockers, neural differentiation, MMS2, beyond blood pressure lowering effects, cognitive function

はじめに

脳卒中は、日本人の死因の第3位を占め、一度ダメージを受けた脳神経の修復は大変困難である。また、高齢者に認められる潜在性の多発性脳梗塞は認知機能の低下を来し、脳血管性痴呆の主原因となる。多くの場合、やはり一度形成した梗塞巣の改善は難しい。さらに、脳卒中後遺症である上下肢の麻痺・嚥下障害といった運動機能障害や、言語障害・認知機能障害などによるコミュニケーション障害などは、患者のquality of life(QOL)を著しく低下させ、経済的・社会的な損失を伴う。こうしたことから、脳卒中は生活習慣の改善による一次予防が最も重要な対処法であると考えられており、なかでも血圧の適正なコントロールは脳卒中の初発・再発予防に最も有効であり、降圧剤による血圧コントロールは脳卒中における最善の"予防的治療法"である。昨今、さまざまな降圧剤で、降圧を超えた作用が注目されており、脳卒中に対しては、大規模臨床研究の結果からアンジオテンシンII(Ang II)1型AT₁受容体ブロッカー(angiotensin II type 1 receptor blocker: ARB)やアンジオテンシン変換酵素阻害薬(angiotensin converting enzyme inhibitor: ACEI)といったレニン・アンジオテンシン系(renin-angiotensin system:

愛媛大学医学部分子細胞生命科学講座医化学・心血管生物学分野

RAS)を抑制する降圧剤が、脳血管障害の発症予防、さらに認知機能障害の抑制に働いていることが証明されてきている。しかし、こうしたエビデンスを裏付ける分子メカニズムについては詳しくわかっていない。

われわれは、これまでにアンジオテンシンII 2型(AT₂)受容体ノックアウト(AT₂KO)マウスを用いて、中大脳動脈閉塞(middle cerebral artery occlusion: MCAO)モデルを作成し、梗塞巣領域の大きさについて検討を行い、野生型マウスに比べAT₂KOマウスでは虚血梗塞巣サイズの増大が認められたことを報告してきた。ARB、バルサルタンを投与した野生型マウスでは梗塞巣のサイズは縮小するが、AT₂KOマウスでは、バルサルタンによる梗塞巣のサイズの縮小する度合いは小さく、AT₂受容体からのシグナルの関与が示唆された¹⁾。この梗塞領域増大の原因としてAT₂受容体を介したシグナルの欠如により、梗塞巣周辺の血流の低下や酸化ストレスが増大する影響が関与していると考えられた¹⁾。

AT₂受容体の発現は主に胎生期に多く²⁾、誕生後に減少してAT₁/AT₂比が逆転し、成人の組織ではAT₁受容体の発現が主要になり、AT₂受容体は通常の状態ではほとんど発現を認めない。脳での通常のAT₂受容体の発現は小脳やオリーブ核などの特定の領域に限られるとしているが³⁾、心不全や腎不全、脳障害などの臓器障害発生時にAT₂受容体の発現が増加することが報告さ

2005年12月26日受付 2006年6月1日受理

れている⁴⁾。また、AT₂受容体は学習や運動機能の調節を行う領域で強く発現しており、ARBやACEIにより認知機能の増強が認められることが報告されている⁵⁾。こうしたことから、AT₂受容体からのシグナルは臓器の発生や細胞分化に深く関与している可能性を考えられ、神経損傷の修復・再生にも深く関与していることが考えられるが、脳ダメージ後にAT₂受容体からのシグナルが直接神経細胞にどのような影響を与えるかについての詳細は全くわかっていないかった。

そこで今回われわれは、MMS2(methyl methanesulfonate sensitive 2)という神経分化関連因子に着目して検討を行った。MMS2はユビキチン結合酵素(E2)の変異体の一つで、E2の一つであるUbc-13と結合してDNA修復に働くことが報告されている⁶⁾。MMS2はラットの胎児脳での発現亢進が認められており、脳の発生・分化に関与することが示唆されている⁷⁾。われわれはAT₂受容体からのシグナルの活性化が、このMMS2の発現にどのように影響を与えるかを検討したところ、AT₂受容体からのシグナルによりMMS2の発現が増強することを見出した。そこで、さらにAT₂受容体からのシグナルが神経保護や神経分化にどのように関与し影響を与えてい るかについてMMS2との関連を含めて検討を行った。

方 法

(1) *in vitro* assay

神経分化を評価する系として胎児マウスの脳皮質から単離した神経幹細胞を培養しneurosphereを作成した。神経分化の程度については神経成熟マーカーであるMAP2(microtubule-associated protein 2), βIII-tubulin, またグリア細胞マーカーであるGFAP(glial fibrillary acidic protein)などの発現をウエスタンプロットtingにより検討した。Ang IIは10⁻⁵Mの濃度で、またARB, パルサルタンは10⁻⁷Mの濃度で用いた。MMS2のmRNAの発現はノーザンプロットting, あるいはリアルタイムPCR法を用いて検討した。MMS2の影響について詳細に検討するためMMS2のsmall interfering RNA(siRNA)を作成し遺伝子ノックダウンを行った。

(2) *in vivo* assay

マウスはAT₂KOマウスと週齢の一致した野生型マウスを用いて比較検討を行った。認知機能の評価は電撃回避試験(shuttle avoidance test)を施行した。具体的に

は左右に分割されたケージの一方にマウスを入れ、マウスのいる側のケージに20mAの微弱電流が流れる。マウスは驚いて別のケージに回避するが電流が流れる前にランプとブザーでの予告が行われるため、それを学習したマウスは、電流が流れる前にあらかじめ他方のケージに移動し、電撃刺激を回避することができる。この回避率(avoidance rate)を認知機能と考えて、20回施行のうちの回避した割合を検討した。脳梗塞は総頸動脈からシリコンでコートしたマイクロフィラメントを挿入して中大脳動脈を閉塞させるMCAOモデルを作成して検討した。脳梗塞前後の認知機能に関しては、梗塞前はMCAO直前を、梗塞後はMCAO処置後24時間後のマウスで運動機能のほぼ等しいと思われるマウスを用いて検討した。ARB, パルサルタンは3mg/kg/kgの濃度で浸透圧ミニポンプを腹腔内に留置することで投与した。また、脳サンプルはMCAO処置24時間後に取り出し、リアルタイムPCR法および免疫染色法を用いてMMS2の発現を検討した。

結 果

通常、コートしていない培養皿の底には付着しないneurosphereは、Ang IIの刺激により培養皿の底に付着する細胞数が増加し(Ang II刺激なし: 浮遊細胞48個/視野・付着細胞16個/視野, Ang II刺激あり: 浮遊細胞2個/視野・付着細胞42個/視野), 付着したneurosphereは神経細胞様の細胞形態に分化し、神経細胞の分化マーカーであるβIII-tubulin, MAP2の発現が増強した(Fig. 1)が、グリア細胞の分化マーカーであるGFAPの発現には変化を認めなかった。これはARB, パルサルタンの添加によりさらに増強したが、AT₂受容体拮抗剤であるPD 123319を用いるとAng II存在下においてもこうした影響が認められなかつたことから、AT₂受容体を介したシグナルが神経幹細胞を分化させ、神経細胞への運命決定に大きく関与している可能性が示唆された。次にラットの脳発生・発達段階で発現が増加することから神経分化因子であると報告されているMMS2について発現を検討したところ、Ang II刺激によりMMS2の発現は増強し(ノーザンプロットによる解析でAng II 10⁻⁷M刺激により、4.1倍の発現増加), それはAT₂受容体を介したシグナルによるものと考えられた。そこでMMS2の働きについて詳細に検討するため, siRNAをneurosphereに導入してMMS2をノックダウンすること

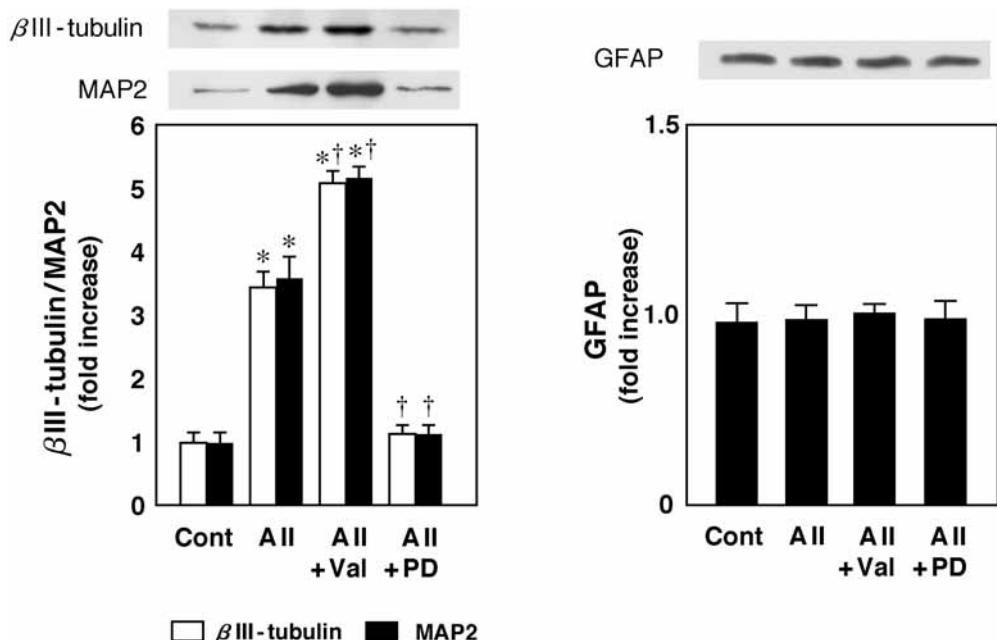


Figure 1 A: Increase in expression of mature neural cell markers, β III-tubulin and MAP2, by Ang II stimulation.
B: GFAP expression was not changed by each treatment.
*: $p < 0.05$ vs no treatment. †: $p < 0.05$ vs Ang II. Values are expressed as mean \pm SEM, $n = 3$.

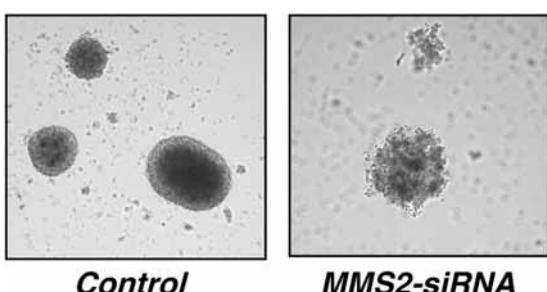


Figure 2 Representative photos of neurospheres treated with control-siRNA or MMS2-siRNA.

による変化を観察したところ、MMS2のsiRNAを導入したneurosphereは凝縮した細胞塊がほどけるように変化し崩壊した(Fig. 2)。崩壊した細胞は付着して神経細胞に分化することもなく、細胞の形態からはアポトーシスに陥った可能性が考えられた。以上からAT₂受容体の刺激はMMS2の発現を増強して神経細胞を保護し、分化に重要な働きをしている可能性が示唆された。

次にAT₂KOマウスを用いて電撃回避試験による認

知・学習能の検討を行った。運動機能的に著変のないマウス間の比較において、MCAO処置後の回避率はAT₂KOマウスで顕著に低下することが認められた(Fig. 3)。興味深いことにAT₂KOマウスでは梗塞前の回避率にも低下が認められ、AT₂受容体の欠如が前述した神経成熟や神経構築に何らかの影響を及ぼし、認知・学習機能に影響を及ぼしている可能性が考えられた。またARB、バルサルタンの投与により脳梗塞後の回避率の低下は抑制された。バルサルタンの投与量は血圧に影響を与えない濃度であり、こうした影響は降圧を超えた作用であると考えられる。脳内のMMS2の発現について検討を行ったところ、脳梗塞後の梗塞領域での脳内のMMS2発現は野生型マウスで増加したが、AT₂KOマウスにおいては増加を認めなかった(Fig. 4)。前述したように、脳障害などの臓器障害発生時にAT₂受容体の発現が増加することから、MMS2も何らかの病態時に増加するAT₂受容体を介して発現が調節されている可能性が示唆される。以上から、AT₂受容体を介したシグナルが脳梗塞後の認知機能障害の抑制にMMS2を介して関与している可能性が考えられた。

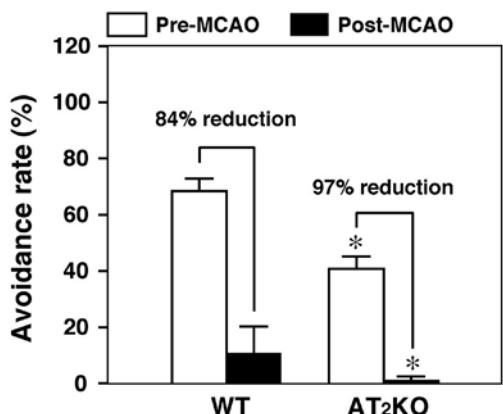


Figure 3 Comparison of total response and avoidance rate in age-matched wild-type mice and AT₂ receptor-deficient mice.
*: p < 0.05 vs WT. Values are expressed as mean ± SEM, n = 10 for each group.

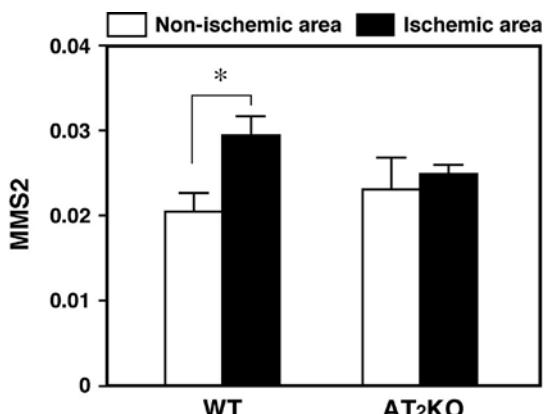


Figure 4 Comparison of MMS2 expression by real-time PCR method in age-matched wild-type, AT₂ receptor-deficient and valsartan-treated AT₂ receptor-deficient mice.
*: p < 0.05 vs non-ischemic area. Values are expressed as mean ± SEM, n = 5 for each group.

考 察

高齢化社会の進行により、記憶・学習・認知といった高次機能障害の予防が大変重要な課題として浮上してきている。認知機能障害に関しては血圧そのものが及ぼす影響が挙げられ、Syst-Eur試験⁸⁾では降圧により痴呆の発症抑制が認められ、PROGRESSなどの大規模試験からは、降圧により認知機能低下が予防できることが証明された⁹⁾。したがって降圧剤の認知機能に与える影響は高血圧によるものであることが 1 つ示唆される。しかし、ARBがサイアザイド系利尿剤と比較して、Sandoz Clinical Assessment Geriatric(SCAG), Mini Mental State Examination(MMSE)による認知機能スコアを有意に改善したこと⁵⁾や、降圧効果が同等にもかかわらず、ARBやACEIはほかの降圧剤に比べて、脳血管障害の発症を予防する効果や、二次予防に貢献するエビデンスが報告されていることから考えると、ARBの認知機能に与える影響としては、神経への直接作用だけでなく血管性認知症の予防にも効果があるものと思われる。

また、AT₂受容体の発現遺伝子(angiotensin II receptor type 2: AGTR2)はX染色体上に存在するが、最近の遺伝子解析によりヒトにおけるAGTR2遺伝子の欠損がX染色体関連の精神遅滞の原因遺伝子の一つであることが報告され¹⁰⁾、AT₂受容体からのシグナルが発生段階にお

ける神経の分化・成熟に何らかの関与をしているのではないかと考えられるようになってきた。これまでの報告から、AT₂KOマウスでは運動機能には問題がないものの、何かを探索する行動が野生型に比較して低下していることや、不安行動を示すこと、また飲水行動上の問題があると報告されている^{11, 12)}。また、AT₂KOマウスでは外的ストレスによる体温の調節機能の低下がみられることや、明暗迷路試験などで不安様の行動を来すとされる。われわれもAT₂KOマウスと野生型マウスを用いて行動について検討を行ったところ、AT₂KOマウスにおいて、高架式十字迷路試験を行うと、不安の指標の一つである開放場所からの回避時間が短縮すること、また社会性の行動指標であるsocial interaction検査により異ケージ飼育のマウスとのinteraction時間が減少することが認められた。AT₂受容体からのシグナルはアポトーシスに関与していることが報告されているが、AT₂KOマウスでは脳の部位により神経細胞数の増加を疑う所見も報告されている¹³⁾。以上より、AT₂KOマウスでは、AT₂受容体の欠如により神経分化や神経細胞のアポトーシスによる選択性の障害が起こり、脳の発生・形成段階に何らかの影響が、高次機能に何らかの支障を来している可能性が示唆され、われわれは今後さらに組織学的検討していく予定である。

最近、ユビキチン・プロテアソーム系の異常がアル

ツハイマー病やパーキンソン病、ブリオン病などに関する報告が報告されている¹⁴⁾。AT₂受容体によるMMS2の制御はこうした難治性神経疾患の発症・進展にも何らかの関与を及ぼしている可能性もあり、われわれは現在検討を行っている。

今後の高齢化社会におけるQOL向上にRASの抑制は重要因子となるに違いない。さらに付け加えるならばアルツハイマー病や不安神経症、うつ病などの高次機能障害にもRASの抑制が効果的であるといった報告¹⁵⁾や、さらにはストレス関連症全般においてAT₂受容体からのシグナルを抑制することが病態発生の予防や治療に繋がる¹⁶⁾といった報告もあり、ARB独自の降圧効果を超えた脳神経系への効果が今後さらに注目されていくものと考えられる。

追記：参考論文¹⁷⁾

文 献

- 1)Iwai, M, Liu HW, Chen R et al: Possible inhibition of focal cerebral ischemia by angiotensin II type 2 receptor stimulation. *Circulation*, 2004, **110**: 843–848.
- 2)Grady EF, Sechi LA, Griffin CA et al: Expression of AT₂ receptors in the developing rat fetus. *J Clin Invest*, 1991, **88**: 921–933.
- 3)Timmermans PB, Wong PC, Chiu AT et al: Angiotensin II receptors and angiotensin II receptor antagonists. *Pharmacol Rev*, 1993, **45**: 205–251.
- 4)Horiuchi M, Akishita M, Dzau VJ: Recent progress in angiotensin II type 2 receptor research in the cardiovascular system. *Hypertension*, 1999, **33**: 613–621.
- 5)Tedesco MA, Ratti G, Mennella S et al: Comparison of losartan and hydrochlorothiazide on cognitive function and quality of life in hypertensive patients. *Am J Hypertens*, 1999, **12**: 1130–1134.
- 6)Andersen PL, Zhou H, Pastushok L: Distinct regulation of Ubc13 functions by the two ubiquitin-conjugating enzyme variants Mms2 and Uev1A. *J Cell Biol*, 2005, **170**: 745–755.
- 7)Hofsaess U, Kapfhammer JP: Identification of numerous genes differentially expressed in rat brain during postnatal development by suppression subtractive hybridization and expression analysis of the novel rat gene rMMS2. *Brain Res Mol Brain Res*, 2003, **113**: 13–27.
- 8)Staessen JA, Fagard R, Thijs L et al: Randomised double-blind comparison of placebo and active treatment for older patients with isolated systolic hypertension. The Systolic Hypertension in Europe (Syst-Eur) Trial Investigators. *Lancet*, 1997, **350**: 757–764.
- 9)Tzourio C, Anderson C, Chapman N et al: Effects of blood pressure lowering with perindopril and indapamide therapy on dementia and cognitive decline in patients with cerebrovascular disease. *Arch Intern Med*, 2003, **163**: 1069–1075.
- 10)Vervoort VS, Beachem MA, Edwards PS et al: AGTR2 mutations in X-linked mental retardation. *Science*, 2002, **296**: 2401–2403.
- 11)Okuyama S, Sakagawa T, Chaki S et al: Anxiety-like behavior in mice lacking the angiotensin II type-2 receptor. *Brain Res*, 1999, **821**: 150–159.
- 12)Li Z, Iwai M, Wu L et al: Role of AT₂ receptor in the brain in regulation of blood pressure and water intake. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2003, **284**: H116–121.
- 13)von Bohlen und Halbach O, Walther T, Bader M et al: Genetic deletion of angiotensin AT₂ receptor leads to increased cell numbers in different brain structures of mice. *Regul Pept*, 2001, **99**: 209–216.
- 14)Bossy-Wetzel E, Schwarzenbacher R, Lipton SA: Molecular pathways to neurodegeneration. *Nat Med*, 2004, **10 Suppl**: S2–9.
- 15)Gard PR: Angiotensin as a target for the treatment of Alzheimer's disease, anxiety and depression. *Expert Opin Ther Targets*, 2004, **8**: 7–14.
- 16)Saavedra JM, Ando H, Armando I et al: Brain angiotensin II, an important stress hormone: regulatory sites and therapeutic opportunities. *Ann N Y Acad Sci*, 2004, **1018**: 76–84.
- 17)Mogi M, Li JM, Iwanami J et al: Angiotensin II type-2 receptor stimulation prevents neural damage by transcriptional activation of methyl methanesulfonate sensitive 2. *Hypertension*, 2006, **48**: 141–148.

Cerebroprotection Mechanisms by Angiotensin II Type-1 Receptor Blockers

Masaki Mogi, Masaru Iwai, and Masatsugu Horiuchi

Department of Molecular and Cellular Biology, Division of Medical Biochemistry and Cardiovascular Biology,
Ehime University School of Medicine, Ehime, Japan

Key words: angiotensin II type-1 receptor blockers, neural differentiation, MMS2, beyond blood pressure
lowering effects, cognitive function

Angiotensin II type 1 receptor blockers (ARB) have been widely used as antihypertensive drugs. They are expected to yield potential benefits including prevention of stroke and improvement of post-stroke cognitive decline. The aim of our study was to clarify molecular mechanisms. Angiotensin II treatment in neurospheres enhanced neural differentiation, leading to an increase in one of the ubiquitin conjugating enzyme variants, MMS2. Knocking down of MMS2 gene by small interfering RNA (siRNA) treatment significantly reduced a number of neurospheres with loss of sphere formation. ARB, valsartan enhanced such neurosphere differentiation and MMS2 expression, whereas an angiotensin II type 2 (AT₂) receptor antagonist, PD123319 inhibited them. After undergoing middle cerebral artery permanent occlusion, AT₂ receptor mRNA expression was significantly increased in the ischemic side of brain. To evaluate the cognitive function, mice were subjected to a passive avoidance task. The avoidance rate was significantly impaired in AT₂ receptor null (*Agtr2*^{-/-}) mice compared with wild-type mice. Treatment with valsartan restored such cognitive decline in wild-type mice, yet yielded a weaker effect in *Agtr2*^{-/-} mice. In ischemic brain regions, MMS2 was increased in wild-type mice, but not in *Agtr2*^{-/-} mice. Valsartan also enhanced MMS2 expression to a greater degree in wild-type mice. These findings indicate a unique mechanism of the AT₂ receptor in brain protection. (J Jpn Coll Angiol, 2006, **46**: 377–382)