

## アンジオテンシンタイプ2受容体を介した血管弛緩機構

屋山勝俊, 岡本 博\*

## Angiotensin Type 2 Receptor-Dependent Vasodilation

Katsutoshi YAYAMA and Hiroshi OKAMOTO

*Laboratory of Cardiovascular Pharmacology, Department of Biopharmaceutical Sciences,  
Kobe Gakuin University, 1-1-3 Minatogima, Chuo-ku, Kobe 650-8586, Japan*

(Received May 21, 2007)

Angiotensin II (Ang II) signaling is mediated by two receptor subtypes, type 1 (AT<sub>1</sub>) and type 2 (AT<sub>2</sub>). The activation of AT<sub>1</sub> receptors is responsible for the development of Ang II-dependent hypertension, whereas the activation of AT<sub>2</sub> receptor is thought to play a counter-regulatory protective role in the regulation of blood pressure that opposes the AT<sub>1</sub> receptor-mediated vasoconstriction. However, the precise mechanisms by which increased numbers of AT<sub>2</sub> receptors counterbalance the AT<sub>1</sub>-mediated actions of Ang II are unknown. We have demonstrated that the abdominal aortic banding in mice and rats and the 2-kidney, 1-clip Goldblatt model of hypertension in mice induces up-regulation of AT<sub>2</sub> receptors in the pressure-overloaded thoracic aorta. In these hypertensive animals, the AT<sub>1</sub>-receptor antagonists but not calcium antagonist abolish up-regulation of the aortic AT<sub>2</sub> receptor as well as blood pressure elevation, suggesting that the pressure-overload up-regulates the aortic AT<sub>2</sub> receptor by Ang II via the activation of AT<sub>1</sub> receptor. Ang II binding to up-regulated AT<sub>2</sub> receptors induces vasodilation in these aortas through bradykinin B<sub>2</sub>-receptor-mediated phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) at Ser<sup>633</sup> and Ser<sup>1177</sup> via a protein kinase A-dependent signaling pathway, resulting in sustained production of nitric oxide. These studies provide evidence that the vascular AT<sub>2</sub> receptor is up-regulated in the course of hypertension through the activation of AT<sub>1</sub> receptor, thereby activating a vasodilatory pathway in vessels through the AT<sub>2</sub> receptor via the bradykinin/nitric oxide/cGMP. This issue is important because the antihypertensive effect of AT<sub>1</sub>-receptor blockers is, at least in part, dependent on AT<sub>2</sub>-receptor activation.

**Key words**—hypertension; angiotensin II; AT<sub>2</sub> receptor; bradykinin; nitric oxide

## 1. はじめに

高血圧は、心疾患や動脈硬化などの循環器系疾患や突然死の最大の原因であり、わが国では60歳以上の約半数が高血圧症である。高血圧症によるこれら循環器系疾患発症の機序は複雑であり、これまで多くの研究がなされてきたが、基本的には持続的圧負荷に対する心血管系の代償反応に基づくと考えられている。高血圧による心臓での代償反応は後負荷増大に伴う心肥大の進展であり、血管系では血管壁肥厚として現れる。そのため高血圧は、心肥大、血管肥厚、虚血性心疾患、心不全や腎・脳血管障害などあらゆる心血管系疾患の重大な危険因子とされ、

その成因解明、予防、治療法の確立はこの分野において極めて重要な課題となっている。

高血圧発症には様々な循環調節因子が関与するが、アンジオテンシンII (Ang II) はそれらの中で最も重要な因子の1つである。Ang IIはアミノ酸8個からなるペプチドで、レニンがアンジオテンシノーゲンに作用してアンジオテンシンI (Ang I) を遊離し、アンジオテンシン変換酵素 (ACE) によりAng IIへと変換される (Fig. 1)。Ang IIは血管平滑筋の強力な収縮物質であり、またアルドステロン分泌を介して体液量を増大させ、高血圧を惹起する。さらに、心筋細胞のタンパク質合成亢進や心筋細胞肥大、血管平滑筋や非心筋細胞の増殖刺激、さらにコラーゲン等の細胞外マトリックス産生刺激を介して心血管系リモデリングに深く関与している。<sup>1)</sup> これらAng IIの作用発現は、アンジオテンシン受容体への結合により起こるが、現在、アンジオ

神戸学院大学薬学部生命薬学部門循環器薬理学研究室  
(〒650-8586 神戸市中央区港島1丁目1-3)

\*e-mail: okamoto@pharm.kobegakuin.ac.jp

本総説は、日本薬学会127年会シンポジウムS19で発表したものを中心に記述したものである。

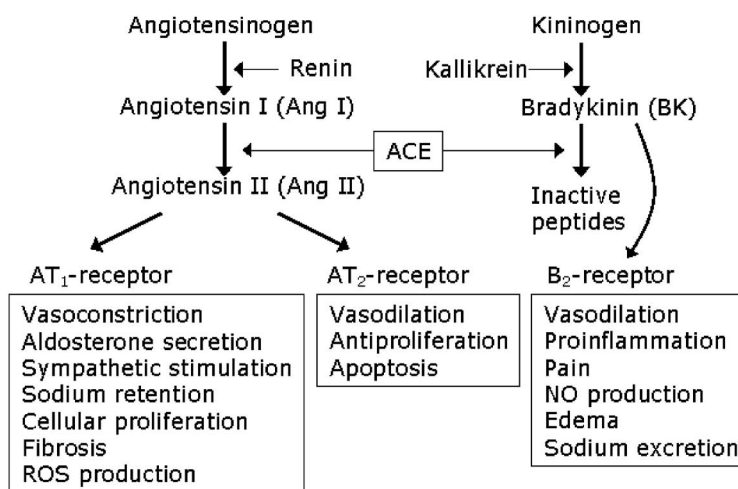


Fig. 1. Two Receptor Subtypes for Ang II in the Renin-Angiotensin System

テンシン受容体には数種類存在すると考えられている。そのうち構造が明らかにされているものに、タイプ1受容体（AT<sub>1</sub>受容体）とタイプ2受容体（AT<sub>2</sub>受容体）が知られ、上述したAng IIの心血管作用はAT<sub>1</sub>受容体を介するものである（Fig. 1）。<sup>1,2</sup> それゆえ、高血圧、心不全あるいは腎疾患でのACE阻害薬やAT<sub>1</sub>受容体遮断薬の臨床的有用性は、Ang II産生あるいはAT<sub>1</sub>受容体レベルでのレニン・アンジオテンシン（RA）系の抑制に基づくと考えられてきた。<sup>2,3</sup>

さて、ACEはキニン分解酵素キナーゼIIと同一酵素であり、ACE阻害薬の薬効の少なくとも一部はブラジキニン（BK）の分解抑制、あるいはその受容体であるB<sub>2</sub>脱感作抑制に基づくBK作用増強によるとの多くの証拠が報告されてきた。<sup>4</sup> また、AT<sub>1</sub>受容体遮断薬は腎レニン分泌を高め、その結果、循環血中のAng IIレベルを上昇させることから、その薬効の少なくとも一部はAT<sub>2</sub>受容体の活性化によるとの考えがある。<sup>5</sup> AT<sub>2</sub>受容体を介する生理作用やそのカスケードについては不明であったが、1999年、AT<sub>2</sub>受容体を高発現させたトランスジェニックマウス（AT<sub>2</sub>-TG）を用いたTsutsumiらの研究により、血管AT<sub>2</sub>受容体活性化が組織カリクレインを活性化し、産生されたBKの作用（B<sub>2</sub>受容体）を介した血管弛緩を引き起こすとの報告がなされた。<sup>6</sup> 実際に、Ang IIの慢性投与による血圧上昇がAT<sub>2</sub>-TGマウスではみられず、このように減弱したAng II昇圧反応が、B<sub>2</sub>受容体遮断薬icatibant投与によって再び出現することを認めて

いる。<sup>6</sup> これら一連の研究は、ACE阻害薬とAT<sub>1</sub>受容体遮断薬のいずれの薬効においても、それら作用発現の少なくとも一部にBKが関与することを示している。<sup>2,7</sup>

しかしながら、AT<sub>2</sub>受容体の生理的、病理的、特に循環器疾患における役割は依然不明な点が多い。筆者らは、血管機能におけるAT<sub>2</sub>受容体の役割を明らかにすることを目的に研究を進めてきたが、本稿では、筆者らが進めてきた一連の研究を中心に紹介し、AT<sub>2</sub>受容体を介したAng IIの血管弛緩作用の機構について概説する。

## 2. 高血圧負荷が血管AT<sub>2</sub>受容体発現を亢進させる

AT<sub>2</sub>受容体は胎児期に高発現しているが、生後、脳や子宮で発現を認めるものの、正常な血管や心臓など多くの組織でほとんど発現していない。<sup>2,8</sup> そのため、AT<sub>2</sub>受容体の機能を明らかにするには、上述したような遺伝子改変動物による解析が行われてきたが、生理的あるいは病的状態でのAT<sub>2</sub>受容体機能を知るには限界がある。一方、血管のAT<sub>2</sub>受容体発現は、高血圧や血管傷害のような病的状態下で変動するとの報告もあるが、<sup>9,10</sup> そのような血管におけるAT<sub>2</sub>機能を明らかにした研究は報告されていない。

筆者らは、慢性心不全の実験モデルとして広く用いられてきた腹部大動脈狭窄（banding）をラット及びマウスに作成し、左心室への負荷同様に、胸部大動脈への圧負荷形成がAT<sub>2</sub>受容体発現にどう影響するかについて検討した。<sup>11,12</sup> Bandingは胸部大

動脈への機械的負荷とともに、腎血流量低下による高レニン性高血圧を惹起し、これらによって胸部大動脈に高血圧負荷を与える。その結果、banding 形成後4日以内に、ラット及びマウスのいずれにおいても、胸部大動脈の  $AT_2$  受容体 mRNA 発現量に顕著な増加を認めしたが、 $AT_1$  受容体並びに  $B_2$  受容体 mRNA 発現レベルには変化を認めなかった (Fig. 2)。このような高血圧負荷に応じた血管  $AT_2$  受容体遺伝子の発現亢進は、ヒト腎性高血圧のモデルであるマウス 2-kidney, 1-clip Goldblatt (2K1C) 高血圧においても認められた。<sup>13)</sup> このような banding による血管  $AT_2$  受容体 mRNA 量増加は、マウスでは術後1週目まで認められたが (Fig. 2),<sup>12)</sup> ラットでは1ヵ月後においても持続していた。<sup>11)</sup>

このような banding による  $AT_2$  受容体 mRNA 発現の亢進が、どのように行われるかについて2つの要因の関与を推測した。その1つは、banding に伴う胸部大動脈への機械的負荷である。実際に、

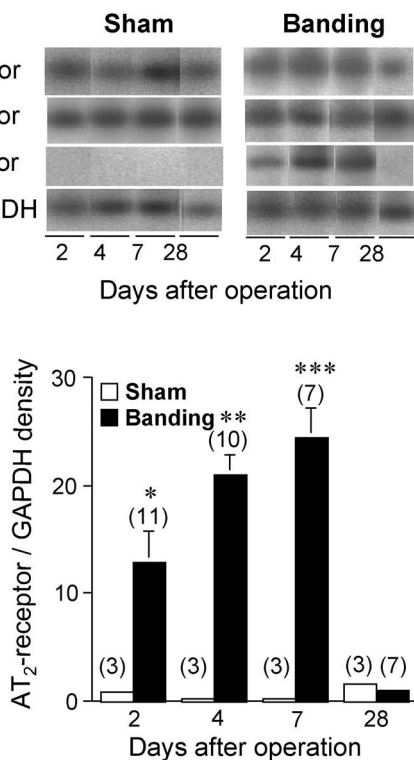


Fig. 2. The mRNA Levels of  $AT_1$ ,  $AT_2$ , and  $B_2$  Receptors in the Thoracic Aortas of Mice after Sham-Operation and Aortic Banding

Top: representative RT-PCR Southern blots of  $AT_1$ -,  $AT_2$ -, and  $B_2$ -receptor mRNA. Bottom: bar graph showing densitometric data for  $AT_2$ -receptor mRNA expressed as a ratio against GAPDH mRNA. Values are the mean  $\pm$  S.E. of sham-operated mice ( $n=3$ ) and banding mice ( $n=7-11$ ). \* $p<0.01$ , \*\* $p<0.001$ , \*\*\* $p<0.0001$  vs sham. Data are from Ref. 12).

banding 後の頸動脈血圧は、ラット・マウスのどちらにおいても約 30 mmHg の上昇を示し、これが胸部大動脈圧として機械的ストレスを与えると考えられた。もう1つの可能性は、腎血流量低下による循環血中 RA 系亢進であり、その結果、増加した血中 Ang II は血管  $AT_1$  受容体を刺激する。このように、banding による胸部大動脈での  $AT_2$  受容体発現亢進が、血管への機械的ストレス又は  $AT_1$  受容体活性化のいずれかに起因する可能性が考えられた。このことを証明するため、banding の術後から作用機構の異なる2種類の血管拡張薬 (カルシウム拮抗薬 nicardipine,  $AT_1$  受容体遮断薬 losartan) を投与し、血管  $AT_2$  受容体 mRNA 量を測定した。その結果、いずれの薬物でも banding による頸動脈圧上昇が抑えられたにも係わらず、banding による  $AT_2$  受容体 mRNA 増加はニカルジピンで影響されず、losartan で完全に抑制された (Fig. 3).<sup>12)</sup> これら結果から、banding による血管  $AT_2$  受容体の発現亢進は、 $AT_1$  受容体を介した Ang II 作用によるもの

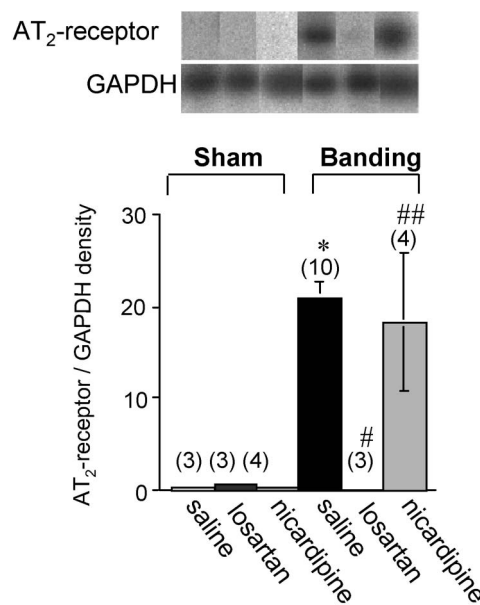


Fig. 3. Effects of Losartan and Nicardipine Administration on the Levels of  $AT_2$ -receptor mRNA in the Thoracic Aorta of Mice 4 Days after Sham-Operation and Aortic Banding

Losartan potassium (1 mg/kg, once a day) or nicardipine HCl (2 mg/kg, twice a day) was intraperitoneally administered into mice for 4 days after sham-operation and banding. The animals were then euthanized on day 4 to allow for the detection of  $AT_2$ -receptor mRNA by RT-PCR Southern blotting. The control groups of sham and banding animals received saline. Top: representative blots. Bottom: bar graph shows densitometric data for  $AT_2$ -receptor mRNA expressed as a ratio against GAPDH mRNA. Values are the mean  $\pm$  S.E.,  $n=3$  to 10 animals in each group. \* $p<0.001$  vs saline-treated sham, # $p<0.001$  vs saline-treated banding, ## $p>0.1$  vs saline-treated banding. Data are from Ref. 12).

と結論した。同様の結果は、腎性高血圧モデルである 2K1C 高血圧マウスにおいても認められた。<sup>13)</sup>では、このような Ang II による、AT<sub>1</sub> 受容体を介した AT<sub>2</sub> 受容体発現の増加には、どのような生理的意味があるのであろうか？これらいずれの高血圧モデルにおいても、循環血中 Ang II レベルの増加は血管 AT<sub>1</sub> 受容体を介して血圧上昇に働くが、同時に誘導される AT<sub>2</sub> 受容体により Ang II 作用を血管弛緩の方向へと切り替え、それによって血管を過剰な圧負荷から開放するよう働くものと想像される。

Banding 後の血中レニン濃度の増加は、2-3 日でピークに達し、1 週間以内に正常レベルに戻る。<sup>11)</sup>しかし、既に述べたように、特にラットの大動脈 AT<sub>2</sub> 受容体 mRNA レベルは、banding 後、少なくとも 1 ヶ月に渡って高いまま維持される。すなわち、循環血中の Ang II レベルだけでは、AT<sub>1</sub> 受容体を介した AT<sub>2</sub> 受容体発現の機構を説明できず、恐らくは血管独自に局在する RA 系の関与が重要であろうと思われる。<sup>14)</sup>

### 3. AT<sub>2</sub> 受容体発現が亢進した大動脈の Ang II 収縮応答性は減弱する

Ang II の AT<sub>2</sub> 受容体刺激は、AT<sub>1</sub> 受容体刺激による血管収縮作用に拮抗すると報告されてきた。そこで実際に、AT<sub>2</sub> 受容体 mRNA 発現が亢進した血管において、Ang II の収縮応答に変化がみられるかを、banding あるいは 2K1C 高血圧のラット・マウスから胸部大動脈を摘出し検討した。摘出血管のリング標本は、Ang II の濃度に依存して収縮反応を示すが、banding あるいは 2K1C 高血圧マウスから摘出した胸部大動脈では、その収縮応答性に明らかな減弱が認められた (Fig. 4).<sup>12)</sup>このような Ang II 収縮反応の減弱は、血管の最大収縮においてみられ、AT<sub>1</sub> 受容体感受性の低下によるものではない。

このような血管での Ang II 収縮応答性の減弱は、AT<sub>2</sub> 受容体選択的遮断薬である PD123319 の存在下で完全に抑制された。また、B<sub>2</sub> 受容体選択的遮断薬である icatibant によっても消失した (Fig. 4).<sup>12)</sup>よって、AT<sub>2</sub> 受容体 mRNA 発現が亢進した banding あるいは 2K1C 高血圧マウスの大動脈は、AT<sub>2</sub> 受容体並びに B<sub>2</sub> 受容体の両者に依存して、AT<sub>1</sub> 受容体を介した Ang II の血管収縮作用に拮抗すると結論付けられる。また、一酸化窒素 (NO) 合成酵

素阻害薬である N<sup>G</sup>-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) で血管リング標本を前処置することにより、Ang II 収縮応答性の減弱は認められなくなったことから、NO に依存した血管弛緩機構が AT<sub>2</sub> 受容体の下流にあることが推測された (Fig. 4).<sup>12)</sup>以上の結果から、AT<sub>1</sub> 受容体刺激による Ang II 収縮作用は、増加した AT<sub>2</sub> 受容体を介して拮抗され、この拮抗に B<sub>2</sub> 受容体の活性化と NO 産生の亢進が関与すると考えられた。

NO は血管平滑筋のグアニル酸シクラーゼを活性化し、cGMP の産生増加により血管平滑筋を弛緩させる。そこで、これらマウスでの胸部大動脈 cGMP 量を測定したところ、いずれの血管においても顕著な cGMP 量の増加が認められた (Fig. 5).<sup>12)</sup>そこで、このような cGMP 量増加が AT<sub>2</sub> 受容体を介したものかを知るため、banding あるいは 2K1C 高血圧マウスに AT<sub>2</sub> 受容体遮断薬 (PD123319)、あるいは B<sub>2</sub> 受容体遮断薬 (icatibant) を静脈内投与した。その結果、これらマウスの胸部大動脈 cGMP 量は、投与 1 時間後に対照動物レベルまで減少した (Fig. 5).<sup>12,13)</sup>

このように、banding あるいは 2K1C 高血圧を惹起したマウスの大動脈では、実際に AT<sub>2</sub> 受容体数が増加し、それを介した血管弛緩応答が B<sub>2</sub> 受容体 → NO 産生 → cGMP 産生というシグナルにより起こることが明らかとなった。

### 4. AT<sub>2</sub> 受容体発現が亢進した大動脈の NO 産生は増加する

血管内皮細胞での NO 産生は内皮型 NO 合成酵素 (eNOS) により調節されている。eNOS はアセチルコリンや BK などの血管作動物質や、ずり応力などの機械的刺激により、内皮細胞の細胞質 Ca<sup>2+</sup> 濃度が上昇すると、カルモジュリン (CaM) 依存性に一過性に活性化されることが知られている。<sup>15,16)</sup>しかし最近、Ca<sup>2+</sup> に依存しない活性化経路として、セリン/スレオニンキナーゼである protein kinase B (Akt) を介した、新たな eNOS 活性化機構が報告された。<sup>17-22)</sup>すなわち、血管内皮細胞にずり応力や血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) などの刺激が加わると、phosphoinositide 3-kinase (PI3K) が活性化され、phosphatidylinositol 2-phosphate から phosphatidylinositol 3-phosphate (PIP<sub>3</sub>) を産生する。PIP<sub>3</sub> は細胞質の Akt を細胞膜へと動員し、

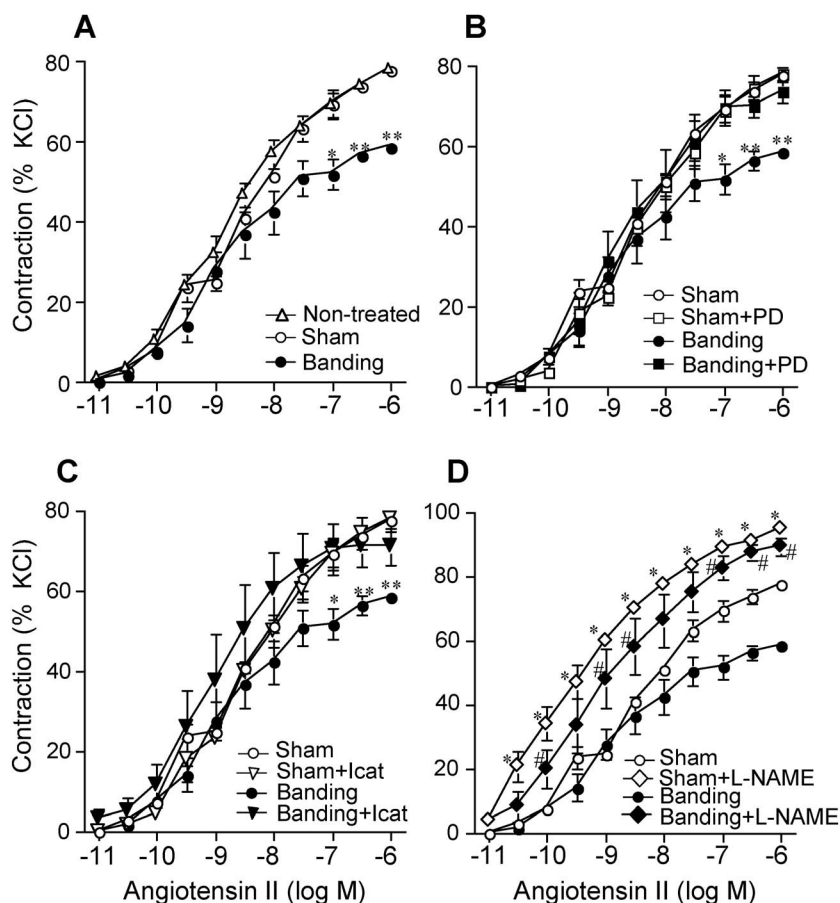


Fig. 4. Contractile Response to Ang II in Ring Preparations of the Thoracic Aorta

Thoracic aortas were dissected from mice 4 days after sham-operation or aortic banding, and the contractile response to Ang II was compared by constructing cumulative concentration-response curves for Ang II. The results are expressed as the percentage of contraction evoked by 40 mmol/l KCl. A: Comparison of the cumulative concentration-response curves for Ang II in aortic rings from sham-operated and banding mice. D123319 (1  $\mu$ mol/l) was added 15 mins before Ang II challenge. C: Effect of icatibant (ICAT) on the response to Ang II in aortic rings from sham-operated and banding mice. Icatibant (1  $\mu$ mol/l) was added 15 mins before Ang II challenge. D: Effect of L-NAME on the response to Ang II in aortic rings from sham-operated and banding mice. L-NAME (1 mmol/l) was added 30 mins before Ang II challenge. Values are the mean  $\pm$  S.E.,  $n=4$  to 5 for each point. \* $p<0.01$  vs sham, \*\* $p<0.01$  vs sham, # $p<0.01$  vs banding. Data are from Ref. 12).

Akt はそこで 3-phosphoinositide-dependent kinase 1 によりリン酸化され活性化型(リン酸化 Akt)となる。活性化 Akt は eNOS をリン酸化してこれを活性化し、NO 産生を増加させる。Ca<sup>2+</sup>/CaM による eNOS 活性化は、受容体刺激による Ca<sup>2+</sup> 動員に応じて一過性であるが、この eNOS リン酸化による Ca<sup>2+</sup> 非依存性 eNOS 活性化は比較的長時間持続し、NO の持続的産生に関与すると考えられている。また、eNOS には何ヵ所かのリン酸化部位が知られているが、特に Ser1177 あるいは Ser633 のリン酸化は、eNOS の活性化を起こすことが明らかにされている。<sup>21,22)</sup>

高血圧負荷により AT<sub>2</sub> 受容体の発現が亢進した大動脈では、AT<sub>2</sub> 受容体依存性に cGMP 量の増加が認められたことから、これら血管では eNOS の

持続的な活性化が起こっていると考えられた。そこで筆者らは、banding 並びに 2K1C 高血圧マウスを用い、胸部大動脈での総 eNOS 量、リン酸化 eNOS 量について検討を行った。<sup>13,23)</sup> その結果、これらのマウス大動脈では、総 eNOS 量、Ser1177 がリン酸化された eNOS (Ser1177) 量、Ser633 がリン酸化された eNOS (Ser633) 量のいずれにおいても、対照マウス大動脈と比較して有意に増加していた (Fig. 6).<sup>23)</sup> これらの結果は、圧負荷を受けた血管では総 eNOS 量のみならず、Ser1177 及び Ser633 にリン酸化を受けた eNOS も同時に増加し、これらによって持続的な NO 産生が生じているものと考えられた。そこで、これらの eNOS 量の増加が、AT<sub>2</sub> 受容体の活性化によるものかを明らかにするため、banding 並びに 2K1C 高血圧マウスに

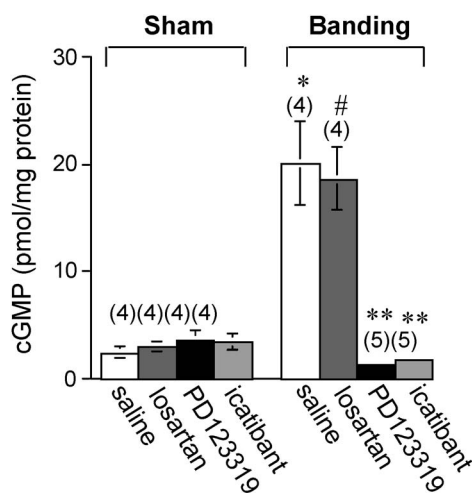


Fig. 5. *In Vivo* Effects of Losartan, PD123319, and Icatibant on cGMP Contents in the Thoracic Aortas of Mice 4 Days after Sham-Operation and Aortic Banding

Losartan potassium (20 mg/kg), PD123319 (10 mg/kg), or icatibant (0.5 mg/kg) was intravenously injected into mice 4 days after sham-operation and aortic banding. The control groups of sham and banding animals received saline. Thoracic aortas were excised 1 hr after injection of drugs or saline, and cGMP contents was measured by radioimmunoassay. Values are the mean  $\pm$  S.E.,  $n=4$  to 5 in each point. \* $p<0.01$  vs saline-treated sham,  $^{\#}p<0.01$  vs losartan-treated sham, \*\* $p<0.01$  vs saline-treated banding. Data are from Ref. 12).

PD123319 (AT<sub>2</sub> 受容体遮断薬) あるいは icatibant (B<sub>2</sub> 受容体遮断薬) を投与し, 総 eNOS 量並びにリン酸化 eNOS 量を測定したところ, 総 eNOS 量の増加は全く影響を受けなかったが, リン酸化 eNOS 量の増加は, ともにこれら遮断薬によって対照マウスのレベルにまで抑制された (Fig. 6). よって, 高血圧負荷によって増加した大動脈の AT<sub>2</sub> 受容体は, その eNOS リン酸化を促進するが, 総 eNOS 量増加には関与しないことが明らかとなった.<sup>13,23)</sup>

以上の結果は, 高血圧負荷によって増加した大動脈 AT<sub>2</sub> 受容体が Ang II の刺激を受け, B<sub>2</sub> 受容体の仲介するシグナル伝達によって eNOS リン酸化を亢進させ, NO 産生を持続的に高めていることを示唆する。

##### 5. AT<sub>2</sub> 受容体活性化は Protein kinase A を介して eNOS をリン酸化する

血管へのずり応力, VEGF や estrogen による刺激は Akt を活性化 (リン酸化) し, それによって eNOS のリン酸化 (Ser1177) が行われ, NO 産生が亢進する.<sup>15,18,19)</sup> では, banding や 2K1C 高血圧を惹起したマウス大動脈での AT<sub>2</sub> 受容体活性化と, それに続く B<sub>2</sub> 受容体を介した eNOS リン酸化

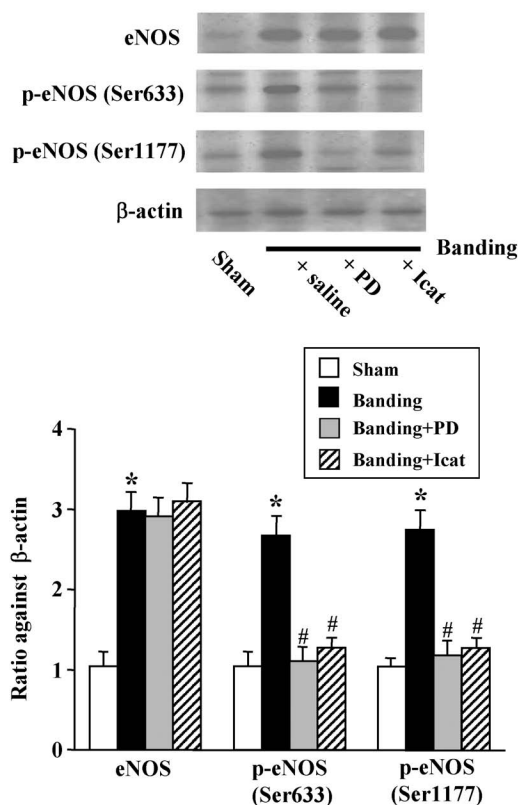


Fig. 6. The Protein Levels of eNOS, Phosphorylated eNOS at Ser<sup>633</sup> and at Ser<sup>1177</sup> in Thoracic Aortas of Mice 4 Days after Sham-Operation or Aortic Banding

PD123319 (1 mg/kg, twice a day) or icatibant (0.5 mg/kg, once a day) were administered intraperitoneally for 4 days after sham-operation or banding. Top: representative Western blots. Bottom: bar graph showing densitometric data for eNOS, eNOS phosphorylated at Ser<sup>633</sup> and at Ser<sup>1177</sup> as ratios relative to  $\beta$ -actin. Values are the mean  $\pm$  S.E. ( $n=6$ ). \* $p<0.001$  versus saline-treated sham mice,  $^{\#}p<0.001$  versus saline-treated banded mice. Data are from Ref. 23).

は, 同様に活性化 Akt により行われるのであろうか?そこで, これらマウス大動脈での Akt 量と, その活性型であるリン酸化 Akt (Ser473) 量を測定したところ, 両者とも増加することを認めた (Fig. 7).<sup>13,23)</sup> しかし, これら Akt 量とリン酸化 Akt 量の増加は, PD123319 あるいは icatibant を投与しても全く影響を受けなかった (Fig. 7).<sup>13,23)</sup> このことは, AT<sub>2</sub> 受容体刺激により引き起こされる eNOS リン酸化の亢進に, Akt は関与しないことを示す。

このことをさらに詳細に明らかにするため, banding マウスの胸部大動脈から血管リング標本作製し, マグナス装置内で Ang II を添加したのち, リン酸化 eNOS (Ser1177 及び Ser633) 量を測定した. Banding マウスから抽出したリング標本では, *in vitro* での Ang II 刺激によってリン酸化

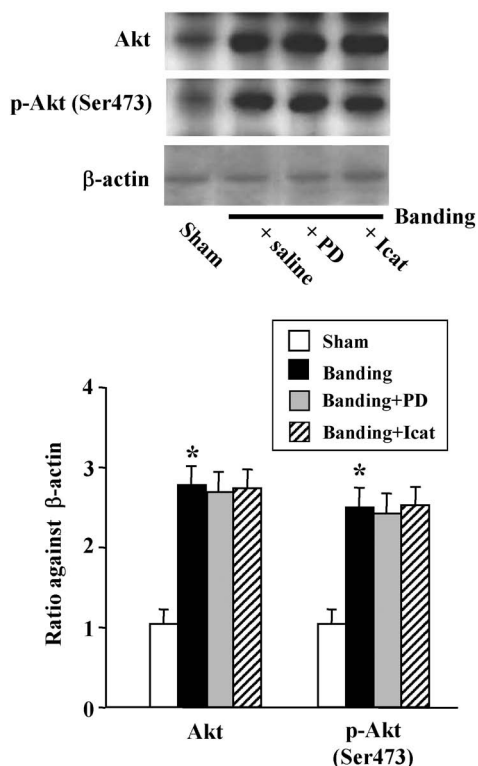


Fig. 7. The Protein Levels of eNOS, Phosphorylated eNOS at Ser<sup>633</sup> and at Ser<sup>1177</sup> in Thoracic Aortas of Mice 4 Days after Sham-Operation or Aortic Banding

PD123319 (1 mg/kg, twice a day) or icatibant (0.5 mg/kg, once a day) were administered intraperitoneally for 4 days after sham-operation or banding. Top: representative Western blots. Bottom: bar graph showing densitometric data for eNOS, eNOS phosphorylated at Ser<sup>633</sup> and at Ser<sup>1177</sup> as ratios relative to β-actin. Values are the mean ± S.E. (n=6). \*p<0.001 versus saline-treated sham mice, †p<0.001 versus saline-treated banded mice. Data are from Ref. 23).

eNOS量は増加したが、対照マウスのリング標本では、Ang II刺激によっても、そのような作用は認められなかった (Fig. 8).<sup>23)</sup> このような、bandingマウス大動脈で認められたAng IIによるeNOSリン酸化の亢進作用は、マグヌス内にPD123319あるいはicatibantを添加することによって、ほぼ完全に抑制されたことから、AT<sub>2</sub>受容体を介するものである (Fig. 8)。そこで、このようなAT<sub>2</sub>受容体刺激に伴うeNOSリン酸化を検出する実験系に、Akt活性化の上流にあるPI3Kの阻害薬、及びprotein kinase A (PKA)の阻害薬を添加し、AT<sub>2</sub>受容体刺激がPI3K/Akt系あるいはPKA系のいずれによってeNOSリン酸化へと仲介されるのかを検討した。その結果、bandingマウス大動脈リング標本でのAng IIによるeNOSリン酸化の亢進作用は、PI3K阻害薬であるwortmannin及びLY24002のい

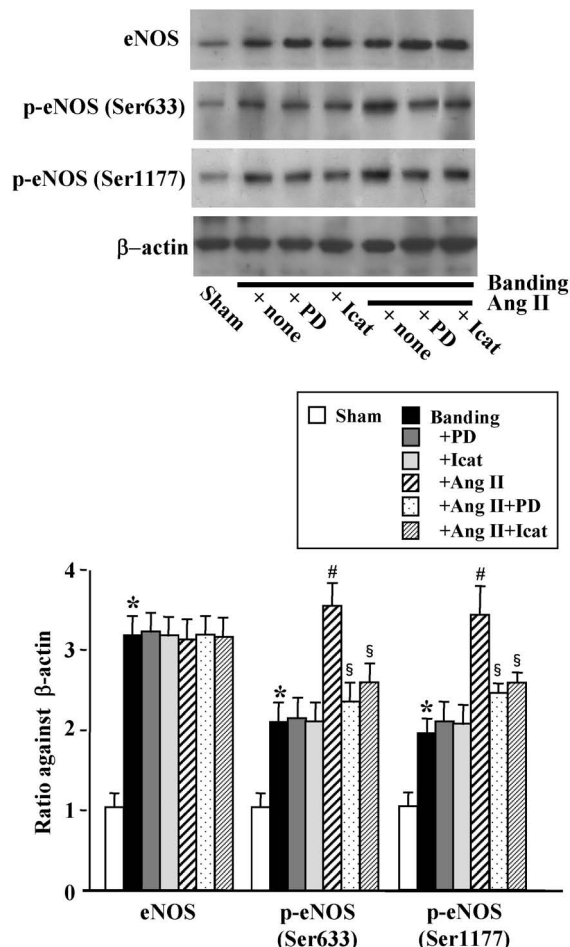


Fig. 8. *In Vitro* Effects of Ang II on Levels of eNOS, Phosphorylated eNOS at Ser<sup>633</sup> and at Ser<sup>1177</sup> in Aortic Rings Prepared from Mice 4 Days after Sham-Operation or Aortic Banding

Following equilibration for 1 hr in an organ bath, aortic rings were incubated for 30 mins with or without PD123319 (PD: 1 μmol/l) or icatibant (Icat: 1 μmol/l), and then treated with Ang II (0.1 μmol/l) for 10 mins. Top: representative Western blots. Bottom: bar graph showing densitometric data for eNOS, p-eNOS-Ser<sup>633</sup> and p-eNOS-Ser<sup>1177</sup> as ratios relative to β-actin. Values are the mean ± S.E. (n=8). \*p<0.001 versus sham-rings, †p<0.001 versus untreated banded-rings; #p<0.001 versus Ang II-treated banded-rings. Data are from Ref. 23).

ずれによってもほとんど影響されず、一方、PKA阻害薬であるH89とKT5720の両者によって強く抑制された (Fig. 9).<sup>23)</sup> これらの結果は、AT<sub>2</sub>受容体刺激によるeNOSリン酸化の亢進が、PI3K/Akt系ではなく、PKA系を介して行われることを示している。

このような血管リング標本での実験系を用い、Ang II刺激後のcGMP応答について検討した。Bandingマウスからのリング標本をAng IIで刺激すると、顕著なcGMP量の増加が認められ、この増加はPD123319やicatibantのみならず、PKA阻

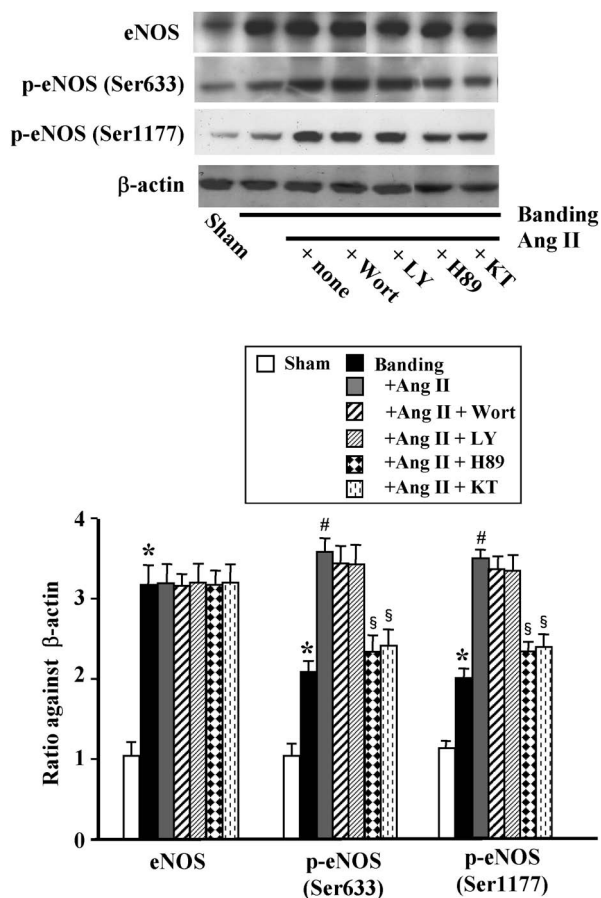


Fig. 9. *In Vitro* Effects of Receptor Antagonists and Protein Kinase Inhibitors on Ang II-Induced Elevation of cGMP in Aortic Rings

Aortic rings were prepared from mice 4 days after sham-operation or banding. Following equilibration for 1 hr in an organ bath, aortic rings were incubated for 30 mins with or without PD123319 (PD: 1  $\mu$ mol/l), icatibant (Icat: 1  $\mu$ mol/l), wortmannin (Wort: 1  $\mu$ mol/l), LY24002 (LY: 10  $\mu$ mol/l), H89 (10  $\mu$ mol/l) or KT5720 (KT: 10  $\mu$ mol/l), then treated with Ang II (0.1  $\mu$ mol/l) for 10 mins. Values are the mean  $\pm$  S.E. ( $n=8$ ). \* $p < 0.001$  versus sham-rings, # $p < 0.001$  versus untreated banded-rings, § $p < 0.001$  versus Ang II-treated banded-rings. Data are from Ref. 23).

害薬によって強く抑制された (Fig. 10).<sup>23)</sup> また, banding マウスの血管リング標本で認められる Ang II 収縮応答性の減弱についても, PI3K 阻害薬でほとんど影響されず, PKA 阻害薬によりほぼ消失した (Fig. 11).<sup>23)</sup>

以上の結果は,  $AT_2$  受容体の発現量が増加した血管では, Ang II 刺激による  $AT_2$  受容体活性化に続いて  $B_2$  受容体を介した PKA 活性化が起こり, これによって eNOS リン酸化が亢進し, NO の持続的産生による血管弛緩反応が起こっているものと考察される (Fig. 12). 実際, Akt は eNOS の Ser1177 をリン酸化するが,<sup>24,25)</sup> Ser633 リン酸化に関与せず, 一方, PKA は eNOS の両部位をリン酸化する

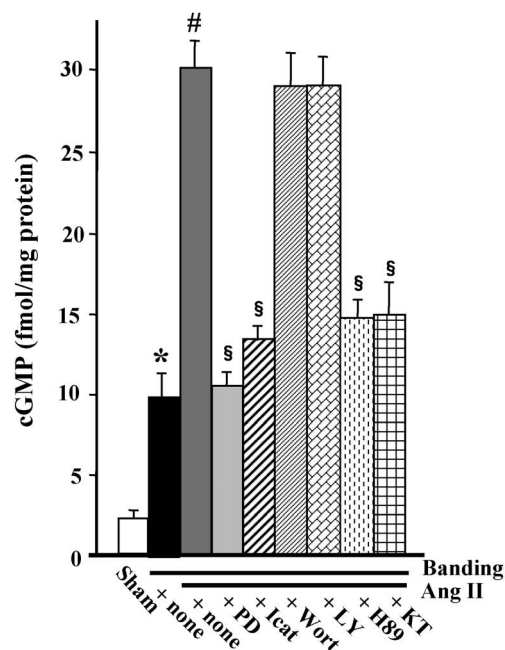


Fig. 10. *In Vitro* Effects of Receptor Antagonists and Protein Kinase Inhibitors on Ang II-Induced Elevation of cGMP in Aortic Rings

Aortic rings were prepared from mice 4 days after sham-operation or banding. Following equilibration for 1 hr in an organ bath, aortic rings were incubated for 30 mins with or without PD123319 (PD: 1  $\mu$ mol/l), icatibant (Icat: 1  $\mu$ mol/l), wortmannin (Wort: 1  $\mu$ mol/l), LY24002 (LY: 10  $\mu$ mol/l), H89 (10  $\mu$ mol/l) or KT5720 (KT: 10  $\mu$ mol/l), then treated with Ang II (0.1  $\mu$ mol/l) for 10 mins. Values are the mean  $\pm$  S.E. ( $n=8$ ). \* $p < 0.001$  versus sham-rings, # $p < 0.001$  versus untreated banded-rings, § $p < 0.001$  versus Ang II-treated banded-rings. Data are from Ref. 23).

との報告がある.<sup>22)</sup> また培養内皮細胞において, BK 刺激が PKA を介して eNOS リン酸化 (Ser1177) を起こし, NO 産生を高めることが報告されている.<sup>26)</sup> これらの報告と, 筆者らの一連の研究結果を合わせて考察すれば, Ang II による血管 (少なくとも大動脈) の  $AT_2$  受容体刺激は, なんらかの機構によって血管組織局所での BK 産生を引き起こし, その BK による内皮細胞の  $B_2$  受容体刺激が PKA 活性化を介して eNOS リン酸化を亢進させ, NO の持続的産生を起こすと考えられる (Fig. 12).<sup>30)</sup>

## 6. 今後の課題と展望

本稿では, 筆者らの研究を中心に, 高血圧負荷を受けた血管が  $AT_2$  受容体の発現を高め, その結果, Ang II による血管収縮反応が減弱すること, そしてこのような  $AT_2$  受容体を介した血管弛緩機構に eNOS のリン酸化を経由した BK/NO/cGMP 系の関与があることを述べてきた. このことは, RA 系に起因する高血圧では,  $AT_1$  受容体の活性化に伴



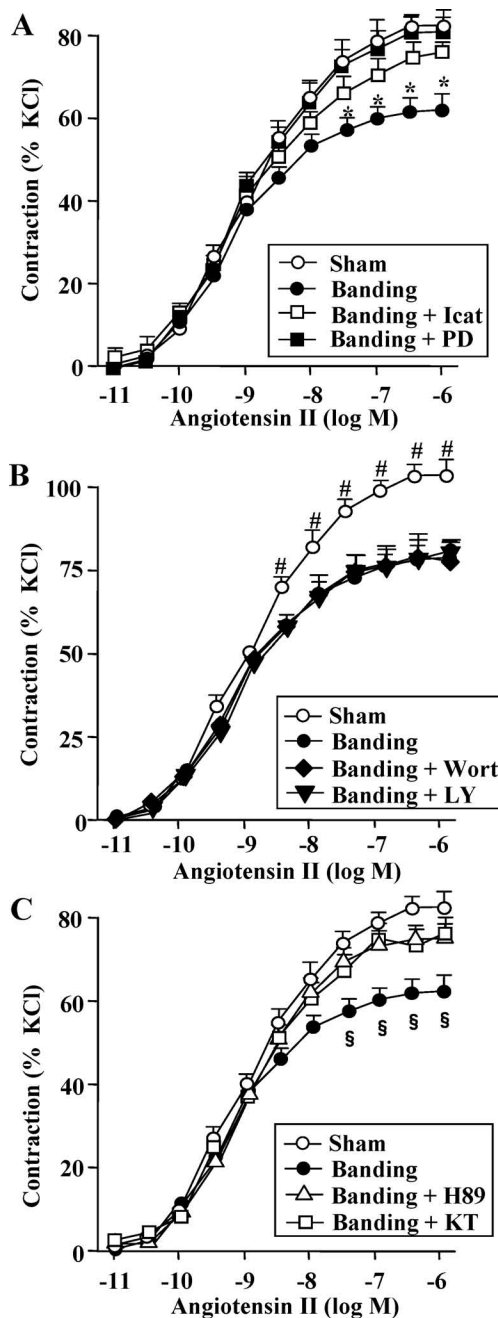


Fig. 11. Effects of Receptor Antagonists and Protein Kinase Inhibitors on Ang II-Induced Contractile Response of Aortic Rings

The cumulative concentration-response curves for Ang II was constructed 30 mins after treatment with or without PD123319 (PD: 1  $\mu$ mol/l), icatibant (Icat: 1  $\mu$ mol/l), wortmannin (Wort: 1  $\mu$ mol/l), LY24002 (LY: 10  $\mu$ mol/l), H89 (10  $\mu$ mol/l) or KT5720 (KT: 10  $\mu$ mol/l) in aortic rings prepared from mice 4 days after sham-operation or banding. The results are expressed as the percentage of contraction evoked by 40 mmol/l KCl. Effects of PD and Icat: (A), Wort and LY: (B), and H89 and KT: (C), on the response to Ang II were determined in rings from banded mice. Values are mean  $\pm$  S.E.,  $n=8$  for each point. A: \* $p<0.01$  versus sham rings and banded rings with PD or Icat, B:  $^{\#}p<0.01$  versus banded rings with or without Wort or LY, C:  $^{\S}p<0.01$  versus sham rings and banded rings with H89 or KT. Data are from Ref. 23).

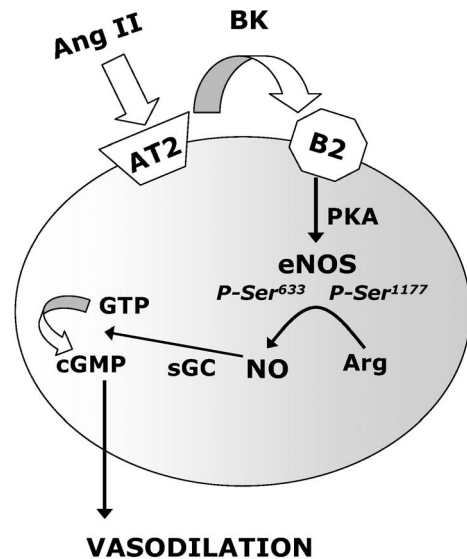


Fig. 12. Schematic Diagram Depicting the Cell Signaling Process in the Endothelium of the Mouse Thoracic Aorta Whereby Ang II Induces Vasodilation

Ang II binds to  $AT_2$  receptors in the plasma membrane. The activation of  $AT_2$  receptors stimulates the bradykinin (BK)  $B_2$  receptor ( $B_2$ ), which stimulates serine phosphorylation of eNOS at Ser<sup>633</sup> and Ser<sup>1177</sup> by a protein kinase A (PKA)-dependent pathway. Phosphorylation of eNOS increases NO production, activating soluble guanylyl cyclase (sGC), which converts GTP to cGMP. cGMP mediates vasodilation.

う  $AT_2$  受容体発現亢進により, Ang II 作用を血管収縮から血管拡張へとシフトさせ, これによって代償的に圧負荷に抵抗する機構のあることを示唆している. 血管は高血圧という異常状態に置かれることにより, 様々な代償機構を発動してその過剰な負荷を回避するような制御機能を持っており,  $AT_2$  受容体もそのような代償機構の1つを担うものと思われる.

しかし, まだまだ未解決の多くの課題があることに気付かされる. 第一の課題は血管での  $AT_2$  受容体の分布である. 筆者らの研究は, banding 等の高血圧負荷によって血管のどの細胞が  $AT_2$  受容体を発現するかについて明らかにしてない. 血管での  $AT_2$  受容体は, 血管内皮細胞に多く分布するが平滑筋細胞にも局在すると報告されている.<sup>3,27)</sup>  $AT_1$  受容体も両細胞に分布していることから,  $AT_1$  受容体刺激に反応した  $AT_2$  受容体遺伝子発現調節と, 本稿で示した  $AT_2$  受容体による血管弛緩機構の詳細を明らかにするには,  $AT_2$  受容体の分布は重要な情報である. この点を明らかにするには,  $AT_2$  受容体検出系に必要な特異性の高い抗体が必要であろう. もう1つの残された大きな課題は,

AT<sub>2</sub> 受容体刺激がどのような機構によって B<sub>2</sub> 受容体活性化につながるのかである。先に引用した Tsutsumi らの研究は、血管平滑筋細胞の AT<sub>2</sub> 受容体刺激が Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> 交換系を抑制してアシドーシスとし、それによってカリクレインを活性化して BK が遊離されると報告している。<sup>6)</sup> 実際、腎臓での AT<sub>2</sub> 受容体刺激が腎臓間質液中の BK 濃度を増加させることから、恐らくは血管内皮あるいは平滑筋細胞においても組織プロカリクレインがカリクレインへと活性化され、血管組織内局所において BK を遊離する可能性が大きい。<sup>7,28)</sup> これに関連して、AT<sub>2</sub> 受容体と B<sub>2</sub> 受容体のヘテロ 2 量体形成による直接的なシグナル伝達の可能性も考えられる。<sup>29)</sup> しかし、B<sub>2</sub> 受容体遮断薬は、この 2 量体形成を抑制しないことから、<sup>29)</sup> この機構は考え難い。この課題を明らかにするため、筆者らは、AT<sub>2</sub> 受容体刺激がプロカリクレインを活性化するかについて研究を進めている。また血管弛緩作用以外の AT<sub>2</sub> 受容体の機能、特に AT<sub>1</sub> 受容体を介した Ang II の細胞増殖、細胞外マトリックス産生、活性酸素産生作用に対して、AT<sub>2</sub> 受容体がどのように係わるかも、今後明らかにするべき課題として興味が持たれる。

## 7. おわりに

AT<sub>1</sub> 受容体遮断薬は、高血圧症、心不全、心肥大、心筋梗塞、あるいは、糖尿病性腎症などの循環器疾患治療への有用性が明らかにされており、ACE 阻害薬と同等の臓器保護効果を持っている。このような有用性の重要な根拠は、その優れた血管内皮機能の保護効果にある。ACE 阻害薬の持つ内皮機能への BK 効果増強作用と同様に、AT<sub>1</sub> 受容体遮断薬も AT<sub>2</sub> 受容体の間接的な活性化によって、内皮での BK 効果を引き出すことがその薬効を理解する上で重要であると考えられる。高血圧症など循環器疾患の分子機構の解明に加えて、その治療薬開発への観点でも、今後の AT<sub>2</sub> 受容体の機能に関する研究に期待が寄せられる。

**謝辞** 本研究は、文部科学省科学研究費基盤研究 (13672315, 16590074)、並びに文部科学省学術フロンティア推進事業 (2006-2011 年度) の支援により行われたものである。

## REFERENCES

- 1) De Gasparo M., Catt K. J., Inagami T., Wright W., Unger T. H., *Pharmacol. Rev.*, **52**, 415-472 (2000).
- 2) Matsubara H., *Circ. Res.*, **83**, 1182-1191 (1998).
- 3) Henrion D., Kubis N., Levy B. I., *Hypertension*, **38**, 1150-1169 (2001).
- 4) Benzing T., Fleming I., Blaukat A., Muller-Esterl W., Busser R., *Circulation*, **99**, 2034-2040 (1999).
- 5) Carey R. M., Wang Z. Q., Siragy H. M., *Hypertension*, **35**, 155-163 (2000).
- 6) Tsutsumi Y., Matsubara H., Masaki H., Kurihara H., Murasawa S., Takai S., Miyazaki M., Nozawa Y., Ozono R., Nakagawa K., Miwa T., Kawada N., Mori Y., Shibasaki Y., Tanaka Y., Fujiyama S., Koyama Y., Fujiyama A., Takahashi H., Iwasaka T., *J. Clin. Invest.*, **104**, 925-935 (1999).
- 7) Carey R. M., *Hypertension*, **45**, 840-845 (2005).
- 8) Viswanathan M., Tsutsumi K., Correa F. M. A., Saavedra J. M., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **179**, 1361-1367 (1991).
- 9) Otsuka S., Sugano M., Makino N., Sawada S., Hata T., Niho Y., *Hypertension*, **32**, 467-472 (1998).
- 10) Touyz R. M., Endemann D., He G., Li J.-S., Schiffrin E. L., *Hypertension*, **33**, 366-372 (1999).
- 11) Yayama K., Horii M., Hiyoshi H., Takano M., Okamoto H., Kagota S., Kunitomo M., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **308**, 736-743 (2004).
- 12) Hiyoshi H., Yayama K., Takano M., Okamoto H., *Hypertension*, **43**, 1258-1263 (2004).
- 13) Hiyoshi H., Yayama K., Takano M., Okamoto H., *Hypertension*, **45**, 967-973 (2005).
- 14) Paul M., Mehr P., Kreutz R., *Physiol. Rev.*, **86**, 747-803 (2006).
- 15) Ranjan V., Xiao Z., Diamond S. L., *Am. J. Physiol.*, **269**, H550-H555 (1995).
- 16) Noris M., Morigi M., Donadelli R., Aiello S., Foppolo M., Todeschini M., Orisio S., Remuzzi G., Remuzzi A., *Circ. Res.*, **76**, 536-543 (1995).
- 17) Harris M. B., Ju H., Venema V. J., Liang H.,

- Zou R., Michell B. J., Chen Z.-P., Kemp B. E., Venema R. C., *J. Biol. Chem.*, **276**, 16587–16591 (2001).
- 18) Papapetropoulos A., Garcia-Cardena G., Madri J. A., Sessa W. C., *J. Clin. Invest.*, **100**, 3131–3139 (1997).
- 19) Hisamoto K., Ohmichi M., Kurachi H., Hayakawa J., Kanda Y., Nishio Y., Adachi K., Tasaka K., Miyoshi E., Fujiwara N., Taniguchi N., Murata Y., *J. Biol. Chem.*, **276**, 3459–3467 (2001).
- 20) Michel T., Feron O., *J. Clin. Invest.*, **100**, 2146–2152 (1997).
- 21) Fulton D., Gratton J.-P., Sessa W. C., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **299**, 818–824 (2001).
- 22) Venema R. C., *Int. Immunopharmacol.*, **2**, 1755–1762 (2002).
- 23) Yayama K., Hiyoshi H., Imazu D., Okamoto H., *Hypertension*, **48**, 958–964 (2006).
- 24) Dimmerler S., Fleming I., Fisslthaler B., Hermann C., Busse R., Zeiher A. M., *Nature*, **399**, 601–605 (1999).
- 25) Fulton D., Gratton J.-P., McCabe T. J., Fontana J., Fujio Y., Walsh K., Franke T. F., Papapetropoulos A., Sessa W. C., *Nature*, **399**, 597–601 (1999).
- 26) Bae S. W., Kim H. S., Cha Y. N., Park Y. S., Jo S. A., Jo I., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **306**, 981–987 (2003).
- 27) Watanabe T., Barker T. A., Berk B. C., *Hypertension*, **45**, 1–7 (2005).
- 28) Siragy H. M., Jaffa A. A., Margolius H. S., Carey R. M., *Am. J. Physiol. Reg. Int. Comp. Physiol.*, **271**, R1090–R1095 (1996).
- 29) Abadir P. M., Periasamy A., Carey R. M., Siragy H. M., *Hypertension*, **48**, 316–322 (2006).
- 30) Carey R. M., Park J., *Hypertension*, **48**, 824–825 (2006).