

## 機能選択的レニン-アンジオテンシン系 (RAS) 調節による 新規生活習慣病治療法の探求

小豆島 健 護, 涌 井 広 道, 田 村 功 一

横浜市立大学医学部 循環器・腎臓・高血圧内科学

**要 旨:** 肥満症は脂肪細胞機能不全とともにインスリン抵抗性を惹起し, 種々の生活習慣病へと進展するが, その過程において組織レニン-アンジオテンシン系 (RAS) の過剰活性化が病態進展に深く関与している. 特に, 1型アンジオテンシンII受容体 (AT1受容体) 情報伝達系の活性化が組織RASの過剰活性化に寄与しており, 慢性的な細胞・組織の酸化ストレス増加・炎症反応亢進などを介して生活習慣病関連臓器障害を発症・増悪させる. AT1受容体結合蛋白であるATRAP (AT1 receptor-associated protein) は, AT1受容体の細胞内取り込み (internalization) を促進し, AT1受容体情報伝達系に対して抑制的に作用する. また, 最近の検討ではATRAPはAT1受容体の生理的情報伝達系には悪影響を与えずに, 病的刺激の持続による臓器障害と関連したAT1受容体情報伝達系の過剰活性化に対してのみ選択的な抑制作用を発揮できるという機能上の大きな利点をもつ可能性が高いことを見出している (機能選択的RAS調節作用). 本研究では, 生活習慣病の基盤である肥満症における脂肪細胞ATRAPの発現・活性調節とインスリン抵抗性との関連について検討し, 脂肪細胞ATRAPが機能選択的RAS調節作用により脂肪細胞機能不全の改善とともにインスリン抵抗を改善できる可能性を明らかにした.

**Key words:** レニン-アンジオテンシン系 (Renin-Angiotensin System), AT1受容体 (AT1 Receptor), 生活習慣病 (Lifestyle Disease), 肥満症 (Obesity), 脂肪細胞 (Adipocyte), インスリン抵抗性 (Insulin Resistance)

### はじめに

組織局所における1型アンジオテンシンII受容体 (AT1受容体) 情報伝達系の活性化がもたらす組織レニン-アンジオテンシン系 (RAS) の異常亢進は, 慢性的な細胞・組織の酸化ストレス増加・炎症反応亢進などを介して生活習慣病関連臓器障害を発症・増悪させ, 重篤な心血管腎臓病を引き起こす<sup>1,2)</sup>. したがって, AT1受容体は生活習慣病の増悪受容体として捉えることができる.

AT1受容体結合蛋白であるATRAP (AT1 receptor-associated protein) は, AT1受容体のC末端に特異的に結合する蛋白として世界で初めてクローニングされた. そしてこれまでに, 培養細胞 (心筋細胞, 血管平滑筋細胞, 腎細胞な

ど) や遺伝子改変動物 (腎臓ATRAP高発現マウス) を用いた検討により, ATRAPは細胞内取り込み (internalization) に関与する細胞内膜構造物であるエンドゾーム上に主に存在し, 細胞内に移動してきたAT1受容体を持続的に捕捉し続けることによりAT1受容体のinternalizationを促進し, 結果的にAT1受容体情報伝達系に対して抑制的に作用していることを明らかにしてきた<sup>3-6)</sup>. また, 最近の検討ではATRAPはAT1受容体の生理的情報伝達系には悪影響を与えずに, 病的刺激の持続によるAT1受容体下流の臓器障害と関連した情報伝達系の過剰活性化に対してのみ選択的な抑制作用を発揮できるという機能上の大きな利点をもつ可能性が高いことを見出している<sup>7,8)</sup>. 本総説では, 生活習慣病の基盤となる肥満症, インスリン抵

抗性における脂肪細胞 ATRAP の病態生理学的意義に焦点を当てて解説する。

## AT1受容体結合因子 ATRAP の単離同定

マウス腎から作製された cDNA ライブラリーを用いて AT1 受容体 C 末端の細胞質内ドメインを bait として yeast two-hybrid system による遺伝子クローニングを行い, AT1 受容体に特異的に結合する因子として ATRAP が単離同定された<sup>9,10</sup>。ATRAP は, 160 残基のアミノ酸からなる 18kDa の低分子蛋白であり, 特異的に AT1 受容体に結合し, AT2 受容体, エンドセリン ETB 受容体, あるいはカテコールアミン  $\beta 2$  受容体などには結合しないと考えられる。

## ATRAP のドメイン構造

マウス ATRAP のアミノ酸配列解析による立体構造予測から, ATRAP は N 末端に 3 つの膜貫通ドメインから構成される細胞外ドメインを持つとともに C 末端側には細胞質内ドメインを持つという珍しい構造上の特徴を有すると予測された<sup>11</sup>。また, 欠変異体を用いた検討により, ATRAP の 110~120 番目のアミノ酸残基の C 末端細胞質内ドメインと AT1 受容体の 339~359 番目のアミノ酸残基の C 末端細胞質内ドメインが直接結合すると考えられた。

## ATRAP の生体内組織分布

著者らは, ATRAP 蛋白質発現の検出のためにポリクローナル抗 ATRAP 抗体を作製し, Western blot 解析においては in vitro transcribed/translated ATRAP 蛋白質, 培養細胞に遺伝子導入された ATRAP 蛋白質, および細胞・組織に発現している内在性 ATRAP 蛋白質について予想通り約 18kDa の単一バンドの検出に成功し, これらのバンドは抗原ペプチド吸収試験において消失することから, ATRAP 蛋白質に由来する特異的なバンドであると考えられた。そして, ATRAP の組織発現分布についての検討では, AT1 受容体と同様に, 脳, 腎, 心, 血管, 脂肪などの全身諸臓器に幅広く内在性発現を認めることを明らかにした<sup>12</sup>。

## ATRAP による機能選択的 RAS 調節

前述の通り, AT1 受容体は生活習慣病の増悪受容体として捉えることができるが, 一方, RAS は生物の進化の過程で獲得されたもので, 生体内の水・電解質代謝や循環系の恒常性維持, および臓器発生・分化にとって重要な生理的調節系である。最近の心血管病高リスク患者や蛋白尿合併 2 型糖尿病・慢性腎臓病患者を対象とした複数の大規模臨床試験では, ARB (angiotensin II receptor

blocker) と ACE (angiotensin-converting enzyme) 阻害薬の併用治療や, ARB あるいは ACE 阻害薬とレニン阻害薬との併用治療などの強力な RAS 阻害は心血管病や腎機能障害などの予後改善には無効であり, 逆に腎障害, 高カリウム血症, 低血圧などの有害事象を増加させることが報告されている<sup>13,14</sup>。また, 動物実験では, 脂肪細胞特異的 AT1 受容体欠損マウスはベースラインから脂肪細胞分化障害による脂肪細胞の肥大化を認め, 高脂肪食負荷により肥満症を誘導した際の体重増加やインスリン抵抗性の増悪を改善しなかったことが報告されている<sup>15</sup>。したがって, 臓器の発生・形態形成や恒常的生理機能維持を担う AT1 受容体の生理的情報伝達系の遮断を回避しつつ, 同受容体の病的な活性化のみを選択的に効率的かつ安全に抑制することが重要なポイントと考えられる (図 1)。

ATRAP は AT1 受容体の internalization を持続的に促進することにより, AT1 受容体情報伝達系に抑制的に作用する。これまでの検討により, 全身性の ATRAP 欠損および高発現マウスにおいて, 普通飼育下ではコントロールマウスと比較して組織学的変化を含めた全身 (各臓器) の生理学的機能に明らかな変化を認めないこと, そしてアンジオテンシン II 刺激, 高食塩負荷, 高脂肪食負荷, 5/6 腎摘, 加齢などの病的刺激を加えた際にのみフェノタイプを修飾 (ATRAP 欠損では病態増悪, ATRAP 高発現では病態改善) することを確認している<sup>16-22</sup>。これらの結果は, ATRAP が AT1 受容体の生理的情報伝達系には悪影響を与えずに, 病的刺激による AT1 受容体下流の臓器障害と関連した情報伝達系の過剰活性化に対してのみ選択的に作用 (機能選択的 RAS 調節作用) する可能性を示唆している (図 1)。また, ATRAP は心臓, 血管平滑筋, 脂肪細胞などの各組織において, AT1 受容体情報伝達系である MAPKs (mitogen-activated protein kinases) のうち p38-MAPK のみを選択的に修飾することが判明しており, ATRAP の機能選択的 RAS 調節のメカニズムの一端を担っている可能性がある。

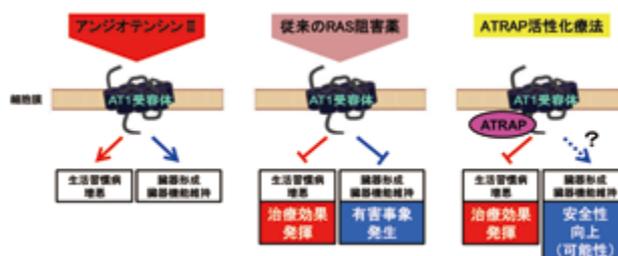


図 1. ATRAP は AT1 受容体の C 末端に結合し, 細胞内取り込み (internalization) を促進することで組織 RAS 活性を抑制。生活習慣病と関連した AT1 受容体情報伝達系の過剰活性化を機能選択的に抑制する可能性。

## 生活習慣病と脂肪細胞 ATRAP 発現

マウス脂肪細胞では ATRAP, AT1 受容体ともに豊富に発現している。病態モデル動物における脂肪細胞 ATRAP 発現の変化を検討するために、2 型糖尿病モデルである KKAy マウスを用いた。同マウスは遺伝的な食欲中枢障害により、過食による内臓脂肪型肥満、インスリン抵抗性をきたし、2 型糖尿病を発症するモデルマウスである。KKAy マウスでは、コントロールマウスと比較して内臓脂肪 ATRAP 発現が有意に減少していた一方で、AT1 受容体発現は両群間で変化をみとめなかった<sup>17)</sup>。また、ヒト脂肪細胞にも ATRAP および AT1 受容体は豊富に発現している。腹部手術を施行した際に採取した内臓脂肪を用いた検討では、高血圧症をはじめとした生活習慣病（肥満、糖尿病、脂質異常症）に罹患している患者群において、罹患していない患者と比較して脂肪細胞 ATRAP 発現が低い傾向にあった。一方で、病態モデルマウスでの検討と同様に、AT1 受容体発現にはこのような傾向は認められなかった<sup>17)</sup>。これらの結果は、生活習慣病の進展における組織 RAS 活性を含めた病態生理において、脂肪細胞 ATRAP がより重要な役割を果たしている可能性を示している。

## 肥満症とインスリン抵抗性における脂肪細胞 ATRAP の病態生理学的意義

全身性 ATRAP 欠損マウスは、通常食飼育下では生理学的機能に変化は認められなかった。しかし、高脂肪食負荷によりコントロールマウスと比較し全身性 ATRAP 欠損マウスでは内臓脂肪重量増加および脂肪細胞肥大、血圧上昇、そしてインスリン抵抗性の増悪が認められた。また、全身性 ATRAP 欠損マウスでは、脂肪組織炎症に重要な役割を果たす MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1) 発現が有意に増加しているとともに、脂肪組織への炎症細胞浸潤が亢進していた。一方、全身性 ATRAP 高発現マウスの内臓脂肪を全身性 ATRAP 欠損マウスに移植したところ、前述の高脂肪食負荷により誘導される変化は抑制された。これらの結果により、脂肪細胞 ATRAP が肥満症とインスリン抵抗性の進展に関する病態生理に関与することが判明したが、そのメカニズムは不明であった<sup>17)</sup>。

さらなるメカニズム解明のため、5.4-kb Adiponectin プロモーターを用いて脂肪細胞特異的 ATRAP 高発現マウスを作製した。全身性 ATRAP 欠損マウスと同様に、脂肪細胞特異的 ATRAP 高発現マウスも通常餌飼育下において生理学的機能に変化は認められなかった。しかし、コントロールマウスと比較し脂肪細胞特異的 ATRAP 高発現マウスでは高脂肪食負荷による体重増加、脂肪重量・体積の増加および細胞面積の増大、そしてインスリン抵抗性の

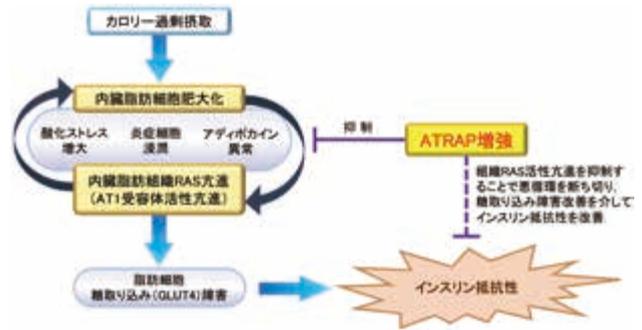


図 2. ATRAP 発現増強により、カロリー過剰摂取による脂肪細胞の肥大化・炎症、酸化ストレス増大およびアンジオテンシン受容体の過剰な亢進状態を是正し、内臓脂肪型肥満にともなうインスリン抵抗性を改善。

増悪が有意に抑制された。また、高脂肪食負荷による脂肪組織の炎症性サイトカインおよび NADPH oxidase mRNA 発現の上昇が抑制されるとともに、炎症細胞の浸潤も有意に軽減していた。そして、高脂肪食負荷時の脂肪細胞特異的 ATRAP 高発現マウスの脂肪組織において、AT1 受容体情報伝達系である p38-MAPK 活性は抑制され、細胞内糖取り込みに関するトランスポーターである GLUT 4 (Glucose transporter type 4) 発現が増加していた<sup>23)</sup>。

これらの結果は、肥満症と随伴するインスリン抵抗性の進展において、脂肪細胞 ATRAP が脂肪組織 RAS の過剰活性化を抑制することで病態進展の抑制に寄与していることを示唆している。その機序として、機能選択的組織 RAS 調節—酸化ストレス抑制—GLUT4 発現増加—インスリン抵抗性改善が関与していると考えられた (図 2)。

## おわりに

AT1 受容体結合蛋白として同定された ATRAP は、AT1 受容体の internalization を促進することで、同受容体の活性を抑制する。その抑制効果は、生体にとって必要である生理的情報伝達系の遮断を回避しつつ、病的な活性化のみを選択的に抑制する機能選択的抑制効果である可能性がある。本総説では生活習慣病の基盤となる肥満症、インスリン抵抗性における脂肪細胞 ATRAP の病態生理学的意義を中心に解説した。全身性 ATRAP 欠損マウスでは、高脂肪食負荷による脂肪組織の炎症性細胞浸潤が亢進するとともに内臓脂肪型肥満とインスリン抵抗性が増悪し、これらの現象は ATRAP が発現している脂肪組織を移植することにより抑制された。さらに、脂肪特異的 ATRAP 高発現マウスでは、高脂肪食負荷による脂肪組織 RAS の過剰活性化と随伴する炎症反応を抑制するとともに内臓脂肪型肥満とインスリン抵抗性が改善した。注目すべきは、どちらの ATRAP 発現改変マウスでも普通飼育

下では組織学的変化を含めた生理学的機能に明らかな変化を認めず, これまでの心臓, 腎臓, 血管など他臓器での報告と一致して, 脂肪細胞においても ATRAP は機能選択的 RAS 調節作用を有している可能性が考えられた. 以上より, 脂肪細胞 ATRAP は生活習慣病の基盤である肥満症, インスリン抵抗性に対する新たな治療標的になり得るが, ATRAP の機能選択的 RAS 調節に関する分子レベルでの作用機序についてはまだ不明な点が多く, 今後のさらなる研究発展が望まれる.

## 文 献

- Benigni A, Corna D, Zoja C, et al: Disruption of the Ang II type 1 receptor promotes longevity in mice. *J Clin Invest*, **119**: 524–530, 2009.
- Aroor AR, McKarns S, Demarco VG, Jia G, Sowers JR: Maladaptive immune and inflammatory pathways lead to cardiovascular insulin resistance. *Metabolism*, **62**: 1543–1552, 2013.
- Tanaka Y, Tamura K, Koide Y, et al: The novel angiotensin II type 1 receptor (AT1R)-associated protein ATRAP downregulates AT1R and ameliorates cardiomyocyte hypertrophy. *FEBS Lett*, **579**: 1579–1586, 2005.
- Azuma K, Tamura K, Shigenaga A, et al: Novel regulatory effect of angiotensin II type 1 receptor-interacting molecule on vascular smooth muscle cells. *Hypertension*, **50**: 926–932, 2007.
- Masuda S, Tamura K, Wakui H, et al: Expression of angiotensin II type 1 receptor-interacting molecule in normal human kidney and IgA nephropathy. *Am J Physiol Renal Physiol*, **299**: F720–F731, 2010.
- Wakui H, Tamura K, Matsuda M, et al: Intrarenal suppression of angiotensin II type 1 receptor binding molecule in angiotensin II-infused mice. *Am J Physiol Renal Physiol*, **299**: F991–F1003, 2010.
- Tamura K, Wakui H, Maeda A, et al: The physiology and pathophysiology of a novel angiotensin receptor-binding protein ATRAP/Agtrap. *Curr Pharm Des*, **19**: 3043–3048, 2013.
- Wakui H: The pathophysiological role of angiotensin receptor-binding protein in hypertension and kidney diseases: Oshima Award Address 2019. *Clin Exp Nephrol*, **24**: 289–294, 2020.
- Daviet L, Lehtonen JY, Tamura K, Griese DP, Horiuchi M, Dzau VJ: Cloning and characterization of ATRAP, a novel protein that interacts with the angiotensin II type 1 receptor. *J Biol Chem*, **274**: 17058–17062, 1999.
- Cui T, Nakagami H, Iwai M, et al: ATRAP, novel AT1 receptor associated protein, enhances internalization of AT1 receptor and inhibits vascular smooth muscle cell growth. *Biochem Biophys Res Commun*, **27**: 938–941, 2000.
- Lopez-Illasaca M, Liu X, Tamura K, Dzau VJ: The angiotensin II type I receptor-associated protein, ATRAP, is a transmembrane protein and a modulator of angiotensin II signaling. *Mol Biol Cell*, **14**: 5038–5050, 2003.
- Tsurumi Y, Tamura K, Tanaka Y, et al: Interacting molecule of AT1 receptor, ATRAP, is colocalized with AT1 receptor in the mouse renal tubules. *Kidney Int*, **69**: 488–494, 2006.
- Parving HH, Brenner BM, McMurray JJ, et al: Cardiorenal end points in a trial of aliskiren for type 2 diabetes. *N Engl J Med*, **367**: 2204–2213, 2012.
- Fried LF, Emanuele N, Zhang JH, et al: Combined angiotensin inhibition for the treatment of diabetic nephropathy. *N Engl J Med*, **369**: 1892–1903, 2013.
- Putnam K, Batifoulier-Yiannikouris F, Bharadwaj KG, et al: Deficiency of angiotensin type 1a receptors in adipocytes reduces differentiation and promotes hypertrophy of adipocytes in lean mice. *Endocrinology*, **153**: 4677–4686, 2012.
- Wakui H, Tamura K, Masuda S, et al: Enhanced angiotensin receptor-associated protein in renal tubule suppresses angiotensin-dependent hypertension. *Hypertension*, **61**: 1203–1210, 2013.
- Maeda A, Tamura K, Wakui H, et al: Angiotensin receptor-binding protein ATRAP/Agtrap inhibits metabolic dysfunction with visceral obesity. *J Am Heart Assoc*, **2**: e000312, 2013.
- Wakui H, Dejima T, Tamura K, et al: Activation of angiotensin II type 1 receptor-associated protein exerts an inhibitory effect on vascular hypertrophy and oxidative stress in angiotensin II-mediated hypertension. *Cardiovasc Res*, **100**: 511–519, 2013.
- Ohsawa M, Tamura K, Wakui H, et al: Deletion of the angiotensin II type 1 receptor-associated protein enhances renal sodium reabsorption and exacerbates angiotensin II-mediated hypertension. *Kidney Int*, **86**: 570–581, 2014.
- Wakui H, Uneda K, Tamura K, et al: Renal tubule angiotensin II type 1 receptor-associated protein promotes natriuresis and inhibits salt-sensitive blood pressure elevation. *J Am Heart Assoc*, **4**: e001594, 2015.
- Kobayashi R, Wakui H, Azushima K, et al: An angiotensin II type 1 receptor binding molecule has a critical role in hypertension in a chronic kidney disease model. *Kidney*

- Int, **91**: 1115-1125, 2017.
22. Uneda K, Wakui H, Maeda A, et al: Angiotensin II Type 1 Receptor-Associated Protein Regulates Kidney Aging and Lifespan Independent of Angiotensin. *J Am Heart Assoc*, **6**: e006120, 2017.
23. Azushima K, Ohki K, Wakui H, et al: Adipocyte-Specific Enhancement of Angiotensin II Type 1 Receptor-Associated Protein Ameliorates Diet-Induced Visceral Obesity and Insulin Resistance. *J Am Heart Assoc*, **6**: e004488, 2017.

### Abstract

#### PATHOPHYSIOLOGY OF RENIN-ANGIOTENSIN SYSTEM RECEPTOR-BINDING PROTEIN IN LIFESTYLE DISEASE

Kengo AZUSHIMA, Hiromichi WAKUI, Kouichi TAMURA

*Department of Medical Science and Cardiorenal Medicine,  
Yokohama City University Graduate School of Medicine*

The angiotensin II type 1 receptor (AT1R) is a major player in the signal transduction of the renin-angiotensin system (RAS), and the overactivation of this signaling contributes to the progression of visceral obesity and metabolic disorders including insulin resistance. AT1R-associated protein (ATRAP) promotes AT1R internalization along with the suppression of overactivation of tissue AT1R signaling. Systemic deficiency of ATRAP promoted diet-induced visceral obesity and insulin resistance, along with exacerbation of adipose tissue inflammation and macrophage infiltration, and the transplantation of fat pads expressing ATRAP rescued these conditions in this model. Furthermore, in contrast to ATRAP deficiency, enhancement of ATRAP in adipose tissue ameliorated diet-induced visceral obesity and insulin resistance via the attenuation of overactivated AT1R signaling and adipose inflammation. It is noteworthy that both models of ATRAP deficiency and enhancement did not show any evident alterations in physiological function, including adipose tissue morphology at baseline. These results suggest that ATRAP could inhibit just the “excessive” activation of RAS, along with preserving the “physiological” activation of RAS that is necessary for the living body to maintain its homeostasis. Therefore, adipose tissue ATRAP could become an effective and tolerable therapeutic strategy to treat visceral obesity and metabolic disorders including insulin resistance.

