

総説 (平成26年度横浜市立大学医学研究奨励賞受賞研究)

老化にともなう心血管病における アンジオテンシン受容体結合蛋白の病態生理学的意義

涌井 広道, 田村 功一

横浜市立大学医学部 循環器・腎臓内科学

要旨: 組織局所でのレニン-アンジオテンシン系の1型アンジオテンシン受容体(AT1受容体)情報伝達系の過剰活性化は、酸化ストレスや炎症反応を増大させ、動脈硬化などの老化にともなう心血管病の発症・進展に深く関与している。したがって、老化にともなう心血管病の発症・進展において、アンジオテンシンII(AngII)=老化にともなう心血管病増悪因子、AT1受容体=老化にともなう心血管病増悪因子受容体として捉えることができる。本研究テーマであるアンジオテンシン受容体結合蛋白(AT1 receptor-associated protein; ATRAP)は、AT1受容体のC末端に特異的に結合する機能性蛋白としてクローニングされた。本研究では、ATRAPの発現・活性調節機構異常と老化にともなう心血管病との関連について検討し、ATRAPが細胞や組織表面に存在するAT1受容体の細胞内取り込み(internalization)を持続的に促進し、『AT1受容体情報伝達系の過剰活性化に拮抗する内在性抑制機序を担う受容体結合分子』として機能することにより、老化にともなう心血管病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), 老化 (Senescence), 動脈硬化 (Atherosclerosis), 腎障害 (Kidney Injury)

はじめに

近年、種々の病的刺激に対する生体の反応における内在性の要因によって組織局所での酸化ストレスの増加や炎症反応の亢進が引き起こされ動脈硬化などの老化にともなう心血管病が発症する機序が注目されている¹⁾。特にレニン-アンジオテンシン系の関与については「組織局所における1型アンジオテンシン受容体(AT1受容体)系の過剰活性化」によって、細胞・組織の酸化ストレスの増加・炎症反応の亢進とともに動脈硬化などの老化にともなう心血管病の病態が進展する可能性が指摘されている²⁾。したがって、組織局所でのAT1受容体情報伝達系を効率的に抑制することは老化にともなう心血管病治療において重要なポイントである可能性がある。一方、「AT1受容体機能活性化に対する内在性抑制機構」としては、従来からは2型アンジオテンシン受容体(AT2受容体)やアンジオテンシン変換酵素2(ACE2)、アン

ジオテンシン-(1-7)、mas受容体などが挙げられるが、AT1受容体への直接結合機能制御分子として、ATRAP(AT1 receptor-associated protein)が世界で最初にクローニングされた。

AT1受容体に結合する新規因子(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^{3,4)}。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β2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

コンピューターによる立体構造予測では, マウス ATRAP のアミノ酸配列の解析から, N末端は細胞外ドメインであり, N末端側に3つの膜貫通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⁵⁾. また, 欠画変異体を用いた検討により, ATRAPの110~122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⁶⁾.

ATRAPによるAT1受容体のinternalization

内在性に ATRAP 発現が認められた HEK293 腎細胞や心筋細胞において, ATRAP の細胞内局在を検討したところ, ATRAP は主に核周囲の小胞膜上 (エンドゾーム, 滑面小胞体, ゴルジ体など) に存在していた. 免疫沈降実験では心筋細胞において ATRAP が AT1 受容体に結合していることが確認された. また, 心筋細胞での免疫細胞染色実験の結果, 非刺激下において AT1 受容体は主に心筋細胞の細胞膜に存在するのに対して, ATRAP は主に核周囲に存在していたが, 心筋細胞をアンジオテンシン II (Ang II) で刺激すると AT1 受容体と ATRAP がともに核周囲のエンドゾームで共局在した. さらに, アデノウイルスベクターを用いて ATRAP を高発現させた心筋細胞では, 細胞表面の AT1 受容体発現量が減少することが観察された⁷⁾. すなわち, ATRAP は internalization に関与する細胞内膜構造物であるエンドゾーム上におもに存在し, 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結果的に AT1 受容体の internalization を促進すると考えられた. さらに, 生体においても, 腎臓 ATRAP 高発現トランスジェニックマウスを用いた検討結果から, 腎における ATRAP 高発現が腎組織細胞膜分画での AT1

受容体発現を減少させることを明らかにした⁸⁾.

細胞における ATRAP の機能解析

ATRAP を HEK293 細胞に過剰発現させると Ang II による c-fos プロモーター活性化の抑制がみられた. ATRAP を心筋細胞に高発現させた検討では, Ang II を介した心肥大応答に重要とされる p38MAPK の活性化が選択的に抑制された. また, 血管平滑筋細胞においても ATRAP の内在性発現が認められ, ATRAP を過剰発現させると, 細胞表面の AT1 受容体数の減少とともに, Ang II 刺激による TGF β 発現誘導, BrdU 取り込み率の増加が抑制され, ATRAP は Ang II を介した血管平滑筋の動脈硬化反応に対して抑制的に作用していると考えられた⁹⁾. さらに, マウス遠位直尿管細胞においても ATRAP は内在性に発現しており, ATRAP を高発現させると, Ang II 刺激による TGF β 産生誘導が抑制された¹⁰⁾. さらに, ATRAP は calcium-modulating cyclophilin ligand (CAML) への結合を介して細胞増殖・分化や免疫機能, あるいは心肥大や動脈硬化などの病態とも関連がある calcineurin-NFAT 経路への抑制作用をもつことも報告されている¹¹⁾. 以上により, ATRAP は AT1 受容体の constitutive な internalization を促進し, AT1 受容体情報伝達系に対して抑制的に作用している可能性が明らかにされた¹²⁾ (図 1).

生体における ATRAP の発現調節の検討

著者らは, 組織 ATRAP 発現量 / AT1 受容体発現量の低下によって, 組織局所における AT1 受容体系の過剰活性化が亢進し, 老化にともなう心血管病の発症・進展が惹起される可能性を報告している.

A. 老化促進刺激による ATRAP 発現の変化

マウス腎組織において ATRAP は主に尿管を中心幅広く分布しており, 老化を促進する Ang II 刺激を行うことで, 腎臓での ATRAP 発現量は有意に減少した⁸⁾. また, マウスやラットへの老化促進 Ang II 刺激によって, 心肥大反応とともに心臓における ATRAP 発現量は減少した^{13,14)}.

B. 病態モデル動物における ATRAP 発現の変化および ARB による ATRAP 発現維持効果

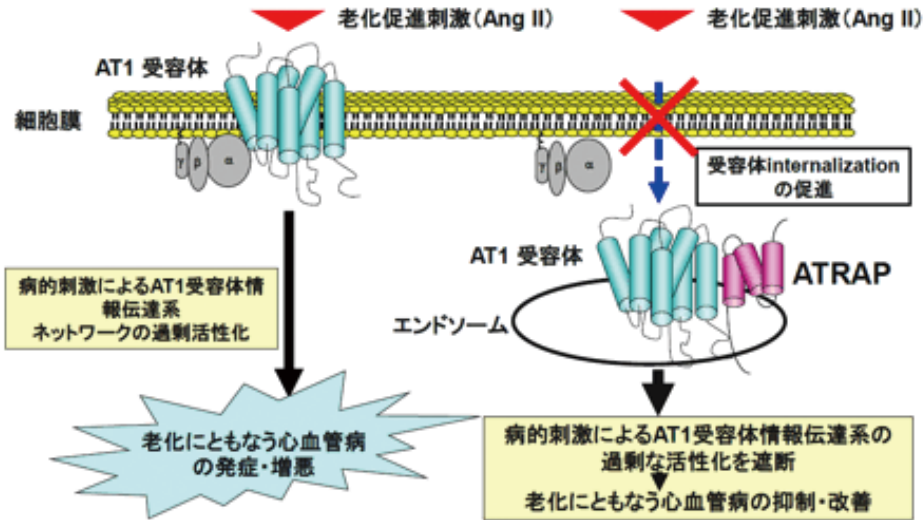
老化高血圧モデル動物である高血圧自然発症ラット (SHR) における ATRAP と AT1 受容体の発現バランスについて検討したところ, SHR では加齢にともなう高血圧や心肥大の進行とともに, 心臓での ATRAP の AT1 受容体に対する相対的発現が低下していた¹⁴⁾. さらに, 非降圧用量の AT1 受容体拮抗薬 (ARB) オルメサルタンを投

与することにより、悪化した両者の発現バランスの改善とともに心肥大の抑制がみられることを明らかにした。また、Dahl食塩感受性ラットでは、老化を促進する高食塩負荷により腎ATRAP発現の低下とともに、血圧の上昇、腎での酸化ストレスの増大、炎症の亢進、線維化の進行がみられた。さらに、ARB投与によって、ATRAP発現量は対照群と同等レベルにまで回復し、同時に高食塩負荷による血圧上昇が抑制され、腎障害も抑制された¹⁵⁾。すなわち、老化にともなう心・腎障害に対するARBの臓

器保護効果には、組織ATRAPの持続的な発現回復効果が関与している可能性が示唆された。

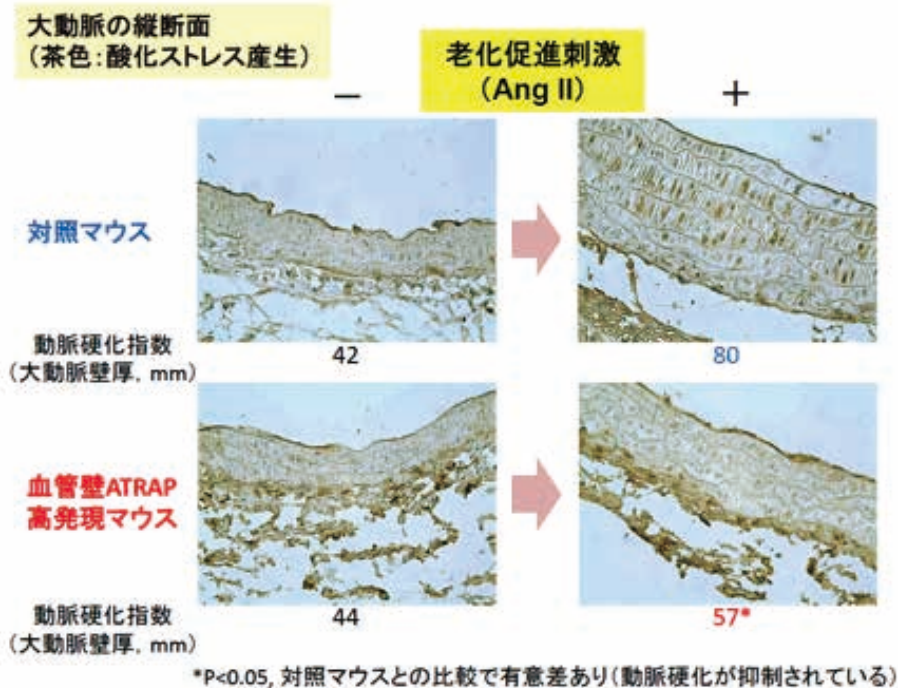
生体におけるATRAPの生理機能

心筋細胞特異的ATRAP高発現マウスでは、老化促進Ang II刺激による心肥大反応が抑制された¹³⁾。また、腎尿管ATRAP高発現マウスではAng II刺激や高食塩負荷による血圧上昇が抑制され、全身性ATRAP欠損マウスで



Tamura K, et al. *Curr Hypertens Rep*, 9:121-7, 2007から改定

図1 ATRAPはAT1受容体に結合して細胞内への取り込みを促進し病的刺激によるAT1受容体情報伝達系の過剰活性化を遮断する



Wakui H, et al. *Cardiovasc Res*, 100: 511-9, 2013から改定

図2 ATRAPを血管において高発現させると老化促進刺激による動脈硬化が抑制される

は老化促進AngII刺激による血圧上昇や腎障害の増悪がみられた¹⁶⁻¹⁸⁾。さらに、血管平滑筋 ATRAP 高発現マウスでは、AngII刺激による動脈硬化反応が抑制された¹⁹⁾ (図2)。すなわち、ATRAPは生体において、老化にともなう心血管病を抑制する分子である可能性がある。

ATRAPの発現・活性制御機構の検討

ATRAPはAT1受容体系の過剰活性化を抑制し、老化にともなう心血管病を抑制する臓器保護的な作用が期待され、将来的にはATRAP特異的活性化薬の開発などが待ち望まれる。著者らはその前段階として、ATRAP遺伝子が内在性に高発現している腎尿管細胞の系において、ATRAP遺伝子の発現調節に重要な複数のプロモーター領域を同定し、Runx-3、USF-1,2などの転写調節因子の関与を明らかにした^{20,21)}。

おわりに

AT1受容体直接結合分子として単離同定されたATRAPは、AT1受容体のconstitutiveなinternalizationを促進し、AT1受容体情報伝達系の過剰活性化に拮抗する内在性抑制因子として機能すると考えられる。また、老化にともなう心血管病の発症・進展において、組織局所におけるAT1受容体とATRAPの発現バランスが重要である可能性が示唆され、さらに、遺伝子改変マウスを用いた検討から、ATRAPが老化関連心血管障害を抑制する可能性が示唆された。しかしながら、生体組織におけるATRAPの分子レベルでの作用機序や発現調節機序についてはまだまだ不明な点が多く、今後のさらなる研究の展開が望まれる。現在、著者らは長期自然飼育中の全身性ATRAP高発現マウス、および全身性ATRAP欠損マウスを用いて、ATRAPが組織における寿命・老化関連因子発現、酸化ストレス産生、炎症関連因子産生、および老化にともなう心血管病の発症・進展や寿命に与える影響についてより詳細に検討中である。

文 献

- 1) Duewell P, Kono H, Rayner KJ, et al: NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals. *Nature*, **464** (7293):1357-1361, 2010.
- 2) Ferder L, Inserra F, Martínez-Maldonado M: Inflammation and the metabolic syndrome: role of angiotensin II and oxidative stress. *Curr Hypertens Rep*, **8** (3): 191-198, 2006.
- 3) Daviet L, Lehtonen JY, Tamura K, et al: Cloning and

- characterization of ATRAP, a novel protein that interacts with the angiotensin II type 1 receptor. *J Biol Chem*, **274**: 17058-17062, 1999.
- 4) 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*, **279**: 938-941, 2000.
- 5) Lopez-Illasaca M, Liu X, Tamura K, et al: 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, 2000.
- 6) 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.
- 7) Tanaka Y, Tanaka Y, Tsurumi 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.
- 8) 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.
- 9) 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.
- 10) 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.
- 11) Guo S, Lopez-Illasaca M, Dzau VJ: Identification of calcium-modulating cyclophilin ligand (CAML) as transducer of angiotensin II-mediated nuclear factor of activated T cells (NFAT) activation. *J. Biol. Chem*, **280**: 12536-12541, 2005.
- 12) Tamura K, Tanaka Y, Tsurumi Y, et al: The role of angiotensin AT1 receptor-associated protein in renin-angiotensin system regulation and function. *Curr Hypertens Rep*, **9**: 121-127, 2007.
- 13) Wakui H, Tamura K, Tanaka Y, et al: Cardiac-specific activation of AT1 receptor-associated protein completely suppresses cardiac hypertrophy in chronic angiotensin II-infused mice. *Hypertension*, **55**: 1157-1164, 2010.
- 14) Shigenaga A, Tamura K, Wakui H, et al: Effect of olmesartan on tissue expression balance between angiotensin II receptor and its inhibitory binding

- molecule. *Hypertension*, **52**: 672–678, 2008.
- 15) Dejima T, Tamura K, Wakui H, et al: Prepubertal angiotensin blockade exerts long-term therapeutic effect through sustained ATRAP activation in salt-sensitive hypertensive rats. *J Hypertens*, **29**: 1919–1929, 2011.
 - 16) 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.
 - 17) 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.
 - 18) 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.
 - 19) Wakui H, Dejima T, Tamura T, 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.
 - 20) Matsuda M, Tamura K, Wakui H, et al: Involvement of Runx 3 in the basal transcriptional activation of the mouse angiotensin II type 1 receptor-associated protein gene. *Physiol Genomics*, **43**: 884–894, 2011.
 - 21) Matsuda M, Tamura K, Wakui H, et al: Upstream Stimulatory Factors 1 and 2 Mediate The Transcription of Angiotensin II Binding and Inhibitory Protein. *J Biol Chem*, **288**: 19238–19249, 2013.

Abstract

THE PATHOPHYSIOLOGICAL ROLE OF ANGIOTENSIN RECEPTOR-BINDING PROTEIN IN AGING-ASSOCIATED CARDIOVASCULAR DISEASES

Hiromichi WAKUI, Kouichi TAMURA

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

The AT1 receptor (AT1R)-associated protein (ATRAP) specifically interacts with the carboxyl-terminal domain of AT1R. In vitro studies have shown that ATRAP suppresses Ang II-mediated pathological responses in cardiovascular cells by promoting AT1R internalization. Both ATRAP and AT1R are broadly expressed in many tissues in vivo. Accumulating evidence indicates that tissue-specific regulatory balancing of ATRAP and AT1R expression may be involved in the modulation of pathological AT1R signaling at local tissue sites and in the pathophysiology of aging-associated cardiovascular diseases. Furthermore, the results of in vivo experiments with ATRAP gene-modified mice suggest that the activation of ATRAP inhibits aging-associated cardiovascular diseases and hypertension. These results suggest that ATRAP activation strategies may have clinical benefits in the treatment of aging-associated cardiovascular diseases.

