

アンジオテンシン変換酵素2の消化管アミノ酸吸収能と ウイルス腸炎における病態生理学的意義の解析

久 場 敬 司

秋田大学大学院医学系研究科
情報制御学・実験治療学講座 准教授

緒 言

レニン-アンジオテンシン系は、血圧の昇圧因子であるアンジオテンシンIIを介して、生体内における血圧調節や腎機能、水、電解質バランスの調節に寄与する。とりわけアンジオテンシン変換酵素(ACE)は、アンジオテンシンIのC末端から2つのアミノ酸を切り落としてアンジオテンシンIIを産生するペプチダーゼである。2000年、ACEの初めてのファミリー分子としてACE2がクローニングされた。ACE2はアンジオテンシンIとアンジオテンシンIIの両方を基質とするペプチダーゼであるが、C末端から1つのアミノ酸だけを切り出すために、結果的にアンジオテンシンIIの産生を抑制し、心血管機能の恒常性維持に寄与する¹⁾。また、ACE2は新規の消化管ペプチドApelinをもターゲットとする²⁾。

一方で、2003年、新興呼吸器感染症SARS(重症呼吸器症候群)の世界的な流行がおきたが、意外なことに申請者らはACE2がSARSウイルスのレセプターであることを明らかにした^{3) 4)}。すなわち、ACE2はSARSウイルスのレセプターとして、ウイルス粒子の細胞内侵入に不可欠な役割を担うことがわかった。興味深いことにSARSウイルスがACE2に結合することにより、ACE2の発現が抑制され、アンジオテンシンIIの上昇を介してレニン-アンジオテンシン系を活性化し、急性肺傷害を増悪化させることを明らかにした⁴⁾。したがって、上皮細胞においてACE2はSARSレセプターとしてウイルスの細胞内取り込みに関与する一方で、肺保護因子として機能することがわかった⁵⁾。

ACE2のファミリー分子としてCollectrinが同定されたが、Collectrinはプロテアーゼドメインを持たず、ACE2の膜貫通領域に高い相同性を示す。Collectrinが、膵β細胞のインスリン分泌に関与することが報告される一方で、Collectrin遺伝子欠損マウスを作製して解析したところ腎臓でのアミノ酸再吸収の不全により著名なアミノ酸尿をきたすことを見出した。詳細な解析の結果、

collectrinは腎近位尿細管の上皮細胞の刷子縁(管腔側)において、B⁰ clusterのSLC6ファミリーのアミノ酸トランスポーターB⁰AT1、XT3s1/SIT1、XT2、ならびにXT3と結合し、これらSLC6分子の発現を制御していることがわかった⁶⁾。B⁰AT1の家族性の遺伝的変異が、Hartnup症候群(ペラグラ様光線過敏症、小脳性運動失調、アミノ酸尿)の原因であることがわかっていたが、申請者らは培養細胞ならびに遺伝子欠損マウスの解析からACE2が腸管におけるB⁰AT1を介したアミノ酸の吸収に寄与し、B⁰AT1のACE2結合ドメインに変異をもつHartnup家系では、腸管からのアミノ酸吸収の低下を認めることを見出した⁷⁾。つまり、ACE2も腸管アミノ酸吸収不全型のHartnup症候群では重要な原因遺伝子であることがわかった。

本研究報告では、ACE2によるレニン-アンジオテンシン系の制御ならびに下流のAT1レセプター(アンジオテンシンIIの1型受容体)を介した炎症応答の制御機構の解析結果を示す。

材料および方法

AT1R遺伝子欠損マウスならびに野生型マウスにチオグリコレートを腹腔内投与し、マクロファージを得た。マクロファージをTLR4リガンドであるLPSあるいはTLR3リガンドであるpoly I:Cで刺激した後、Trizol試薬を用いてRNAを抽出し、逆転写反応を行い、cDNAを作製した後、後述の各種サイトカインについての定量的PCRを行った。

ヒトマクロファージは、ヒト単球細胞株THP-1細胞をphorbol 12-myristate 13-acetate(PMA)処理により分化誘導して得た。ヒトマクロファージをLPSならびにAT1レセプター阻害剤Losartanで刺激した後、同様にTrizol試薬を用いてRNAを抽出して定量的PCRを行った。

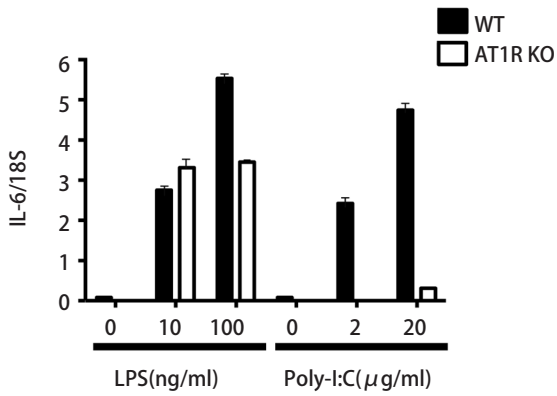


図1 AT1 レセプター欠損によるマクロファージの自然免疫応答の減弱

Poly-I:C 刺激に対して AT1R 欠損マクロファージは、サイトカイン産生が低下している。

結果

1. AT1 レセプター遺伝子欠損はマクロファージ炎症応答を減弱させる

インフルエンザ感染モデルにおいて、ACE2 遺伝子欠損マウスは、ウイルスの増殖には明らかな表現型を認めないものの、肺や腸管でのサイトカイン応答に異常を認め、アンジオテンシン II のシグナルを介した効果が考えられた (未発表データ)。そこで、LPS 刺激あるいは poly I:C 刺激により、野生型マクロファージでは IL6 などのサイトカイン産生が誘導されるが、AT1R 遺伝子欠損マウスでは LPS 刺激に対する応答は正常であったものの poly I:C 刺激に対するサイトカイン応答が有意に抑制されていた (図1)。

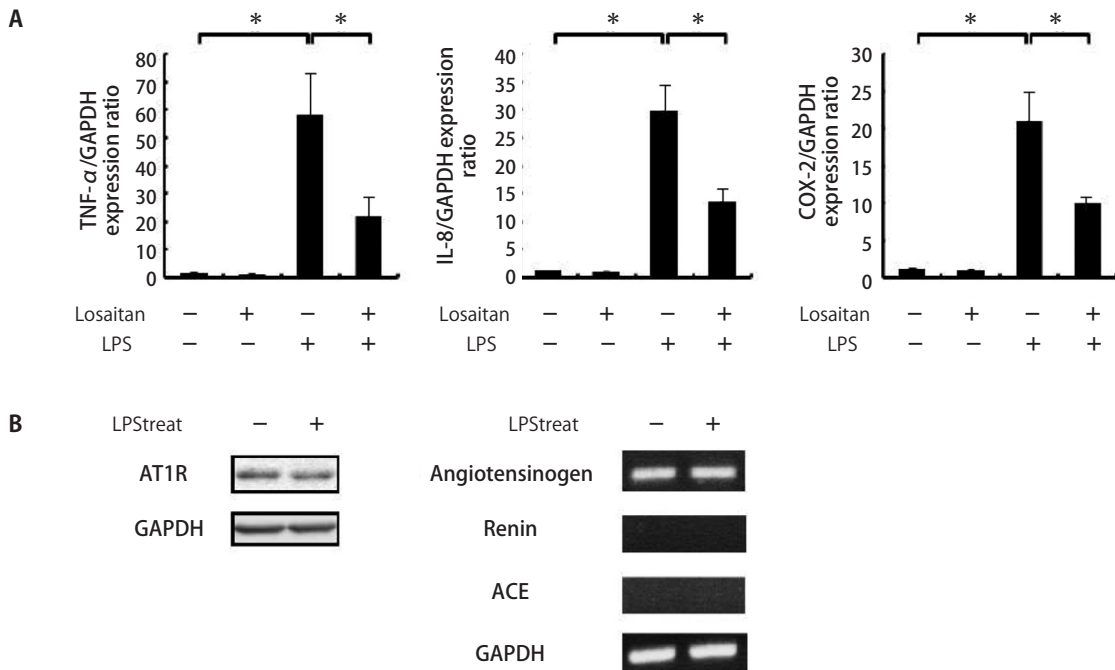


図2 AT1 レセプター阻害剤 Losartan の LPS 刺激に対する影響

A) マクロファージの炎症性サイトカイン産生に対する Losartan の抑制作用。B) マクロファージにおけるレニン-アンジオテンシン構成因子の発現。

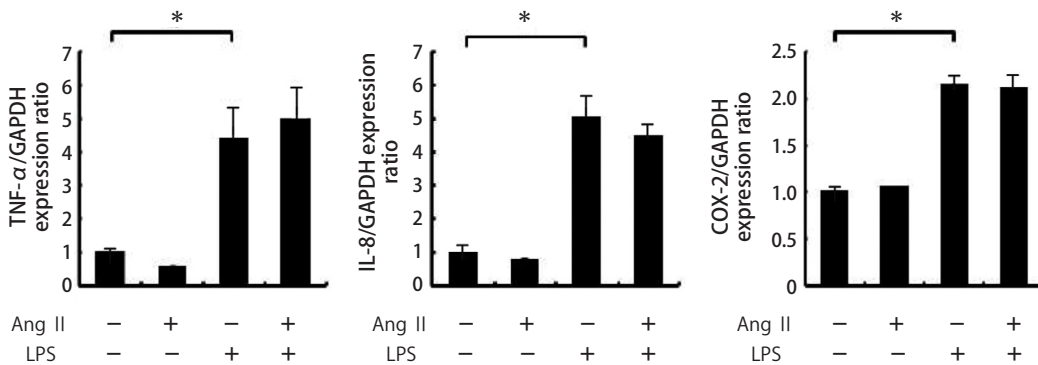


図3 アンジオテンシン II の LPS 刺激に対する影響

アンジオテンシン II は、マクロファージの炎症応答に影響を与えない。

2. AT1 レセプター阻害剤はマクロファージ炎症反応を抑制する
ヒトマクロファージを LPS で刺激することにより、TNF α 、IL-8、COX-2 の発現が上昇するが、これに対し、Losartan で処理すると、これらの炎症性サイトカインの発現は著しく抑制された (図 2 A)。Losartan の効果は、容量依存的であった。このとき、レニン-アンジオテンシン系の構成因子の発現を調べたところ、Renin や ACE の発現は全く認められなかったものの、AT1 レセプターならびに Angiotensinogen の発現が認められた (図 2 B)。そこで、アンジオテンシン II をマクロファージ培養系に添加し、AT1R 活性化によるサイトカイン産生の影響を調べたところ、アンジオテンシン II による増強効果は認められなかった (図 3)。すなわち、

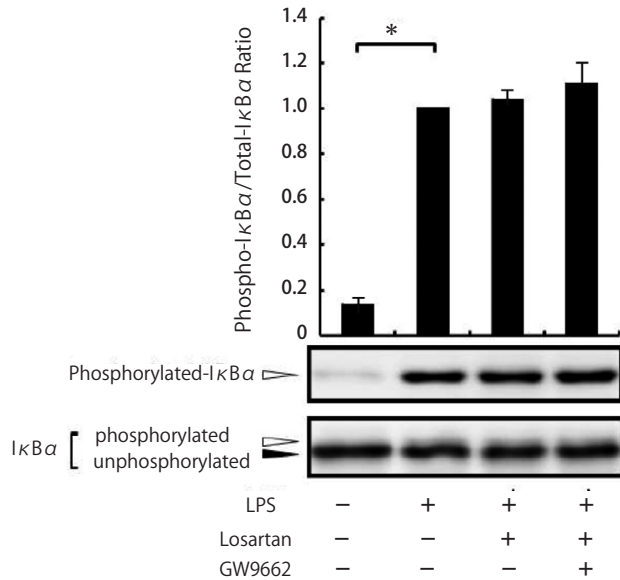


図 4 AT1 レセプター阻害剤の LPS 刺激による IκBα のリン酸化に対する影響

AT1R 阻害剤 (Losartan) ならびに PPAR- γ アンタゴニスト (GW9662) は、マクロファージの IκBα の活性化に影響を与えない。

Losartan はアンジオテンシン II のアンタゴニストとして機能するのではなく、独立に機能することが考えられた。

3. AT1 レセプター阻害剤により PPAR-gamma が活性化され抗炎症効果を発揮する

さらに、Losartan の抗炎症作用のメカニズムを明らかにするため、TLR4 の下流の NF- κ B の活性化状態を Western Blot で調べたところ、Losartan 処理により、マクロファージの NF- κ B の活性化は、ほとんど抑制されていなかった。すなわち、Losartan は TLR4-NF- κ B の経路には影響を及ぼさず他の経路を介して抗炎症作用を発揮することが分かった (図 4)。一方で、近年 Losartan が、Peroxisome proliferator-activated receptor- γ (PPAR- γ) を活性化することが報告されたことから、Losartan と同時に PPAR- γ のアンタゴニストでマクロファージを処理したところ、Losartan による炎症抑制作用が完全にブロックされることが分かった (図 5)。

考 察

以上より、ACE2 は、インフルエンザ感染においてアンジオテンシン II シグナルの抑制を介して、過剰な炎症応答を抑制していることが示唆された。マクロファージにおいて、AT1 レセプターは TLR3 を介した自然免疫応答に重要な役割を担うことが明らかになった。一方で、TLR4 を介した炎症応答には関与しないことがわかった。さらに、AT1 レセプターの阻害剤 Losartan は、PPAR- γ を活性化することにより抗炎症作用を発揮することが分かった。マクロファージの炎症応答にアンジオテンシン II の活性化が重要であることが示唆され、腸管で豊富に発現する ACE2 はアンジオテンシン II を負に調節することによりウイルス性腸炎の病態発症にお

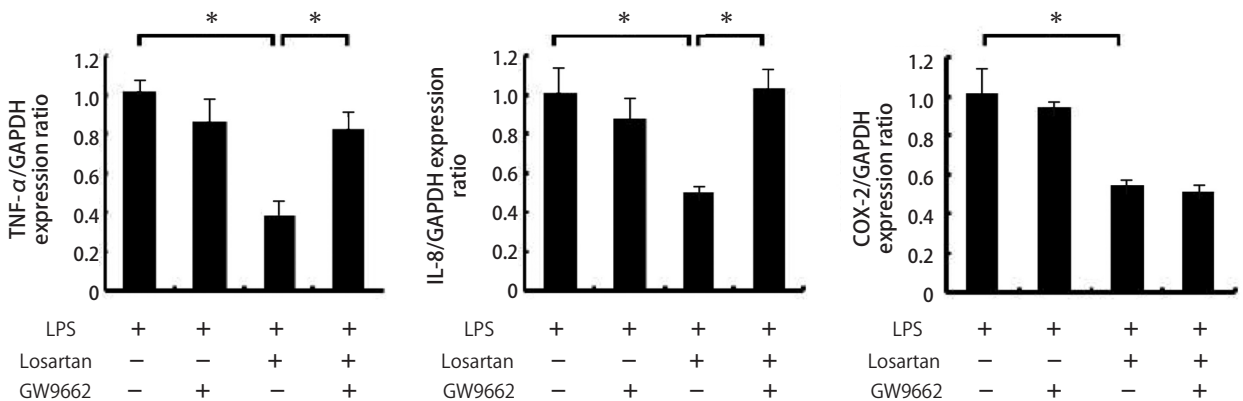


図 5 PPAR- γ アンタゴニストの AT1R 阻害剤の抗炎症作用に対する影響

AT1R 阻害剤 (Losartan) によるサイトカイン産生抑制は、PPAR- γ アンタゴニスト (GW9662) によりブロックされる。ただし、COX-2 の発現は影響を受けない。

る炎症制御に寄与する可能性が示唆された。今後、腸炎モデルで ACE2 の役割を解析していくと同時に ACE2 の新しいターゲットペプチドである Apelin の役割も解析していく予定である。

近年、オートファジーという自己食の制御機構が自然免疫と関わる事が明らかになってきているが、腸管でのペプチド代謝ならびにアミノ酸吸収に寄与する ACE2 が炎症性腸疾患においてどのように炎症を制御するかは未解明な部分が多い。今後、ACE2 による腸管でのアミノ酸代謝、吸収を制御する分子、化合物などがウイルス性腸炎や炎症性腸疾患の新しい治療法、予防法につながる事が期待される。

要 約

インフルエンザ感染において、ACE2 は、肺や腸管でのウイルスの増殖には影響を及ぼさないものの、アンジオテンシン II を負に調節することによりマクロファージのサイトカイン応答を抑制する。細胞内メカニズムと

しては、TLR3 の活性化を抑制すると同時に核内受容体 PPAR γ の活性化が炎症抑制に重要であることが分かった。今後、TLR3 – NF- κ B シグナルならびに PPAR γ シグナルと AT1 シグナルとの相互作用のメカニズムを解明していくことにより、新しいウイルス性腸炎の治療法開発へとつなげていきたい。

謝 辞

本研究の遂行のため研究助成を賜りました財団法人三島海雲記念財団に深く感謝申し上げます。

文 献

- 1) Crackower MA, et al. *Nature* 2002; **417**: 822.
- 2) Kuba K, et al. *Circ Res* 2007; **101**: e32.
- 3) Li W, et al. *Nature* 2002; **426**: 450.
- 4) Kuba K, et al. *Nat Med* 2005 ; **11**: 875.
- 5) Imai Y, Kuba K, et al. *Nature* 2005; **436**: 112.
- 6) Danilczyk U, et al. *Nature* 2007; **444**: 1088.
- 7) Camargo SM, Kuba K, et al. *Gastroenterology* 2008; **136**: 872.