

| | | | | |
|---------|---|---------|---------|--|
| 氏名(本籍) | なが の かつ まさ 永 野 克 将 (北海道) | | | |
| 学位の種類 | 博 士 (農 学) | | | |
| 学位記番号 | 博 甲 第 6511 号 | | | |
| 学位授与年月日 | 平成 25 年 3 月 25 日 | | | |
| 学位授与の要件 | 学位規則第 4 条第 1 項該当 | | | |
| 審査研究科 | 生命環境科学研究科 | | | |
| 学位論文題目 | Studies on the Regulation of Vascular Tonus by Apelin/APJ Signaling In Vivo (生体内 apelin/APJ シグナルによる血管収縮制御機構の研究) | | | |
| 主査 | 筑波大学教授 | 農学博士 | 深 水 昭 吉 | |
| 副査 | 筑波大学教授 | 博士(農学) | 谷 本 啓 司 | |
| 副査 | 筑波大学講師 | 博士(学術) | 加 香 孝一郎 | |
| 副査 | 筑波大学准教授 | 博士(獣医学) | 杉 山 文 博 | |

論 文 の 内 容 の 要 旨

血管組織に広く発現し、ATI型受容体と相同性を有する7回膜貫通型受容体・APJは、血管内皮細胞では降圧系として機能することが明らかとなっているが、血管平滑筋細胞における機能は不明である。著者は、血管内皮障害誘導マウスを用いた実験から、血管平滑筋のAPJシグナル活性化が昇圧作用を誘導することを報告した。著者はこの研究をさらに発展させ、血圧制御機構の中でも特に重要な、血管緊張性制御系における血管平滑筋APJの分子機能の解明を目的として解析に取り組んだ。

血管平滑筋APJの機能制御システムとして、著者は受容体ヘテロダイマーの可能性に着目した。その理由として、GPCRダイマー形成が血管機能制御に関わることが示唆されていることや、APJがATI受容体とダイマーを形成し、血圧や動脈硬化形成に寄与していることが報告されてことが挙げられる。さらに著者は、血管平滑筋におけるAPJの相手側候補として、血管平滑筋に広く発現し、生体内で血管収縮制御に深く関与している $\alpha 1$ -adrenergic receptor ($\alpha 1$ -AR)に着目した。まず始めに、APJと $\alpha 1$ -ARがダイマー形成をしているかどうか検討するため、2分子間の相互作用を生細胞上で検証することが出来るBimolecular Fluorescent Complementation (BiFC) assayによって検討した。3種類($\alpha 1A$ -AR、 $\alpha 1B$ -AR、 $\alpha 1D$ -AR)ある $\alpha 1$ -AR受容体ともAPJはヘテロダイマーを形成したが、 $\alpha 1B$ -ARおよび $\alpha 1D$ -ARとは、APJは細胞質内で結合した。一方、 $\alpha 1A$ -ARとは膜上で局在し、細胞内カルシウムシグナルを増強することが判明した。

そこで次に、血管平滑筋のAPJが血圧制御および血管収縮に関与するか、また、その際に $\alpha 1$ -ARシグナルを介するかどうかを個体レベルで検証するために、血管平滑筋細胞特異的APJ過剰発現マウス(SMA-APJ)を作製した。SMA-APJにAPJのリガンドであるapelinを腹腔内投与したところ、一過性の昇圧反応と強力な徐脈反応が確認された。血管にPAJ遺伝子を過剰発現したにも関わらず、心機能に大きな影響が表れた事から、心臓の栄養血管である冠動脈に着目し、Microfil血管造影法にて冠動脈の状態を観察した。その結果、apelin投与後のSMA-APJの冠動脈血管の複数箇所にて、狭窄部位を確認した。さらに、血管リング標本を用いた*ex vivo*解析から、APJは $\alpha 1$ -ARのみと協調的に相互作用し、強力な血管収縮増強作用を誘導することが明らかになった。また、 $\alpha 1$ -ARのサブタイプ特異的な阻害剤を用い、3つある $\alpha 1$ -ARのサブタイプのう

ち、 $\alpha 1A$ -AR が APJ との機能的な相互作用に最も重要であることが明らかとなった。

以上から著者は、血管平滑筋の APJ 受容体は、 $\alpha 1$ -AR、特に $\alpha 1A$ -AR との特異的な協調作用により、昇圧作用や血管収縮、および冠動脈攣縮の誘導に寄与することを明らかにした。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究において、BiFC-assay を用いることで、受容体の立体構造を維持しつつ、かつ生細胞上 7 回膜貫通型受容体のヘテロダイマー形成を検討できたことは非常に画期的な結果であった。また、APJ が $\alpha 1$ -AR サブタイプの中でも特に $\alpha 1A$ -AR と細胞膜上でヘテロダイマーを形成し、細胞内カルシウム流入活性を亢進するという新たな APJ 受容体制御機構の発見をもたらしたことは、非常に重要な知見であると思われる。さらに著者は、血管平滑筋細胞特異的 APJ 過剰発現マウス (SMA-APJ) を作製し、APJ が $\alpha 1A$ -AR と協調的に作用し、血圧制御ならびに血管収縮制御に関与することを、生体レベルで証明することに成功している。SMA-APJ マウスが示した血管収縮制御の中でも、冠動脈攣縮反応はヒトにおいても急性心筋梗塞等を誘導する原因として認識されているものの、その病態形成メカニズムを探る上で重要なモデルマウス等が確立されておらず、有効な治療法や予防法が存在しないことが問題視されていた。しかし本研究によって、血管平滑筋 APJ と $\alpha 1A$ -AR の活性化による冠動脈攣縮の発症をマウスで誘導できたことにより、冠動脈攣縮に対する更なる理解が深まることが期待される。

平成 25 年 1 月 22 日、学位論文審査委員会において、審査員全員の出席のもとに論文の審査及び最終試験を行い、本論文について著者に説明を求め、関連事項について質疑応答を行った。その結果、審査委員全員によって合格と判定された。

よって、著者は博士 (農学) の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。