

総説

アンジオテンシン変換酵素阻害剤：新たな展開

早狩 誠^{1,2)} 清水 武史³⁾ 中川 潤一²⁾
兵藤 壘²⁾ 上野 桂代²⁾ 下山 律子²⁾

抄録 本稿では, angiotensin-converting enzyme (ACE) 阻害剤の新たな機能, 1) 脂肪組織から血清中への AGT 分泌抑制, 2) 記憶保持, 3) insulin 分解酵素の阻害について論じた.

Angiotensinogen (AGT) に関する我々の成果では, 脂肪組織に複数の分子サイズ AGT の存在を示したが, 血液中には高度にグリコシル化された AGT が分泌していた. Captopril および olmesartan は, ラットの血清中 AGT レベルを低下させた.

次に, angiotensin IV (Ang IV) 受容体 (AT4) であり, 記憶保持に深く関与する AT4/insulin regulated aminopeptidase (IRAP) は, 記憶保持に関連する脳の海馬で発現し, 記憶保持に関連するペプチド物質の代謝に係っている可能性が想定された. 筆者らは, 中枢移行性 ACE 阻害剤 captopril が記憶保持を改善することを Morris 水迷路法により実証した. ラット脳抽出物のペプチドプロファイリングでは, captopril 投与群に特異的に発現するシグナルを認めた.

ACE 阻害薬と insulin を併用している患者では, 低血糖を生じることが報告されていたが, この機序はキレート作用を有する ACE 阻害剤が insulin-degrading enzyme (IDE) 活性を阻害することが示唆された.

弘前医学 68:1-13, 2017

キーワード: ACE 阻害剤; 降圧機序; 記憶保持増強; インスリン分解抑制.

緒言

Renin-angiotensin system (RAS) は, 生体内において血圧および体内水分バランスの調節機構に重要なシステムであり, その役割については古くから研究されてきた. RAS では, 分子量 50~55 kDa の糖タンパク angiotensinogen (AGT) から renin (EC.3.4.23.15) により不活性型デカペプチド angiotensin I (Ang I) が産生される. Ang I は angiotensin-converting enzyme (ACE: EC 3.4.15.1) により Ang I の C-末端ジペプチドを遊離し, 血管収縮性オクタペプチド angiotensin II (Ang II) に変換される (図 1). Ang II は血管平滑筋の収縮をもたらすことにより通常血管平滑筋の緊張を維持している.

ACE は Ang I から Ang II への変換以外に血管拡張性ペプチド bradykinin の不活性化や多くの生理活性ペプチドを分解する carboxydiptidase でもある¹⁻³⁾. ACE の特異的阻害剤である captopril,

enalapril, imidapril および lisinopril などは高血圧症の治療薬として広く臨床応用されてきた.

ACE 阻害剤の発見の大きな契機は, 1970 年代に ACE と bradykinin の分解に係る酵素 kininase II が ACE と同一の酵素であること⁴⁾, 蛇毒 (*Bothrops jararaca*) から見出だされたペプチド類が kininase II を抑制し bradykinin の作用を増強する bradykinin potentiating factor (BPF) の発見によるところが大きい⁵⁾. 1977 年これらの BPF の中で最も作用の強かった SQ20881 (Pyr-Trp-Pro-Arg-Pro-Gln-Ile-Prp-Pro) をリード化合物として Squibb 社の Ondetti らによって世界初の経口 ACE 阻害薬 captopril が報告された⁶⁾. ドラッグデザインの際には, ACE の活性部位が carboxypeptidase A に似ているという情報に基づいて行われた (後日明らかになった情報では共通部分は活性部位に Zn²⁺ を有しているだけであった). Carboxypeptidase A の活性部位と各種合成化合物との反応性について, コンピューター

¹⁾ 弘前大学大学院医学研究科薬剤学講座

²⁾ 弘前大学医学部附属病院薬剤部

³⁾ 弘前大学大学院医学研究科ゲノム生化学講座

別刷請求先: 早狩 誠

平成 28 年 12 月 22 日 受付

平成 29 年 1 月 17 日 受理

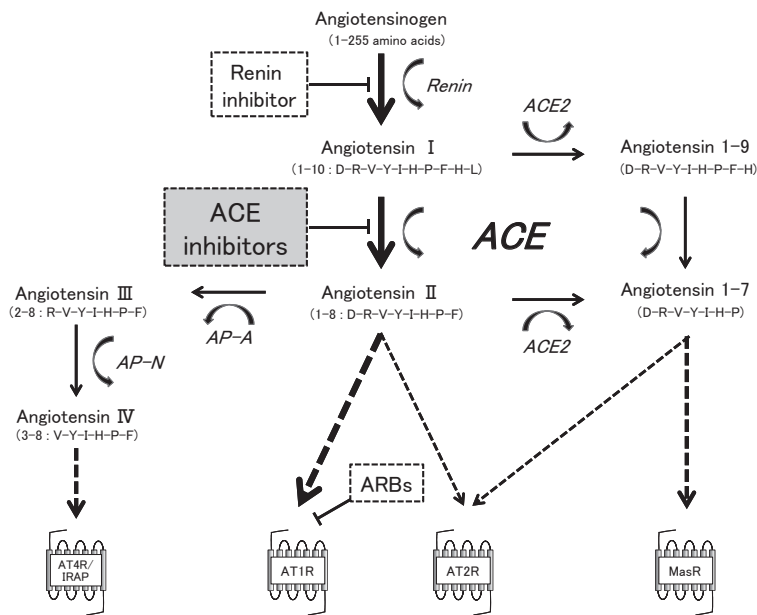


図1 Renin-angiotensin system

シミュレーション技術を駆使した構造活性相関の解析により最初の ACE 阻害剤が誕生した⁶⁾。この成果は生体物質を標的として理論的にデザインされた世界最初の医薬品としても創薬に携わる研究者から大きな賞賛を得た。

しかしながら、開発された ACE 阻害剤 captopril の臨床応用は容易には進まなかったのも事実である。当初米国で行われた臨床応用では高濃度の captopril が用いられたため、captopril の構造内 SH 基に由来する重篤な副作用(発疹, 味覚障害, 空咳, 骨髄抑制)が生じ、米国では高レニン性高血圧症にしか適応が認められず、他の症状への臨床応用は見送られた。しかし元東北大学医学部薬理学橋本虎六教授は、この薬剤の作用機序に注目し低用量で軽症および中等症本態性高血圧症を劇的に改善することを報告し⁷⁾、captopril が同症の第一選択薬として日の目を見た。その後副作用の主因となった SH 基の置換などの工夫を凝らし、より強力な ACE 阻害作用を有する数多くの ACE 阻害剤が開発され、これらは国内外で臨床応用されてきたのは周知のことである⁸⁾。

その後、captopril の臨床試験において生じた空咳や味覚障害などの副作用の予防を目的とし、Ang II 受容体拮抗薬(ARB)の開発が進められた。Ang II 受容体(AT1 および AT2)の ligand

である Ang II の構造の一部を改変することにより、Ang II と AT1 との結合を抑制するペプチド性化合物が合成されたが、体内への投与の際にタンパク分解酵素の影響を受けるため臨床応用されず、主に研究用として重要な役割を發揮した⁹⁾。最初の非ペプチド性 ARB として、1995 年 losartan¹⁰⁾ の登場以来多数の ARB が開発され臨床応用されている^{11,12)}。その中で、candesartan と losartan は高齢の高血圧患者の認知機能を改善することも示された^{13,14)}。本邦では ARB が高血圧症治療薬の主体をなしているが、各種 ACE 阻害剤は安価なこともあり、海外では未だ高血圧症治療薬の主体を維持している。

嘗て本態性高血圧の治療薬としてドラマチックに登場した ACE 阻害剤がトリガーとなり、ARB そして renin 阻害剤等の各種 RAS 抑制剤の開発経緯は、ACE や Ang II 受容体を含む RAS が高血圧症への薬物療法の重要な標的であることを意味し、現在も確固たる地位を築いているのは言うまでもない。その端緒となった橋本虎六先生の繊細な洞察力それに伴う努力に敬意を表したい。

本稿では長い期間降圧薬として使用されてきた ACE 阻害剤の新たな作用の可能性について述べることにする。

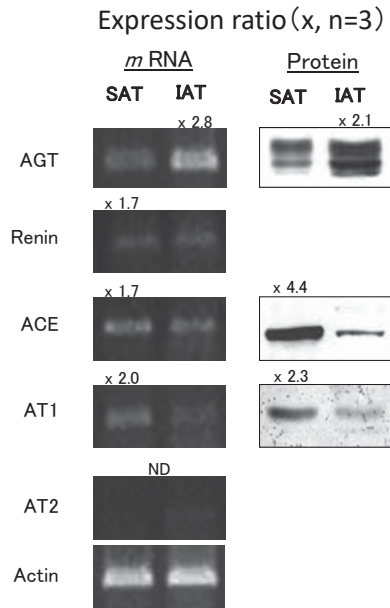


図2 ラット脂肪組織中 RAS 構成因子の発現
各因子の発現は、RT-PCR 法およびイムノブロット法にて解析した。SAT：皮下脂肪組織、IAT：内臓脂肪組織。数値は発現倍率を示す。

期待される新たな作用

1. 新たな降圧機序について

内臓周囲に存在する脂肪組織の増加は、糖の代謝異常、高血圧、動脈硬化などの発症に関与するとされている。一般に前駆脂肪細胞は peroxisome proliferator-activated receptor γ 等の刺激により成熟脂肪細胞に分化するが¹⁵⁾、その過程において運動不足やカロリー過多な食事の摂取により、成熟脂肪細胞は肥大化脂肪細胞へと変化し肥満へと移行する。肥大化した脂肪細胞では、leptin, adiponectin, AGT, TNF- α , plasminogen activator inhibitor-1 などの数多くの生理活性物質が産生され循環系に分泌される。これらの物質は摂食抑制、insulin感受性の低下、脂肪組織での炎症の惹起、糖尿病の誘発、高血圧症など生活習慣病の発症に大きく関与していることが明らかとなってきている^{16,17)}。各論については多くの総論があり、本稿では高血圧症との関連性が高い AGT の発現に焦点を絞って我々の研究成果も含めて紹介する。

脂肪細胞には RAS の存在が古くから議論されてきた。我々はラット内臓脂肪および皮下脂肪での RAS 構成因子である AGT, renin, ACE, Ang

II receptor type I (AT1) および type II (AT2) の発現について遺伝子発現 (RT-PCR 法) およびタンパク量 (イムノブロット法) を解析した。各構成因子の発現量に差異はあるものの両組織に各構成因子の遺伝子およびタンパクの発現を認めた。皮下組織では ACE および AT1 の発現が高く、AGT の発現量は内臓脂肪組織で高い値を示した (図 2)。

ラット脂肪組織 AGT のタンパク解析において、分子量 50 kDa ~ 60 kDa を示す約 4 種類の AGTs が認められた。Gimenez-Roqueplo らはヒト AGT の分子量の違いは分子内に存在する Asn^{14,137,271,295} への糖鎖付加の差によると報告した¹⁸⁾。これらの複数のバンドは glycosidase の処理により、分子量約 50 kDa の分子に収束したことから、AGT の分子量の差は glycosylation の違いによることが再確認できた (図 2)。AGT 内 Asn (4 残基) への糖鎖の付加の比率は、ヒト血清中 renin 活性に影響を及ぼす。特に N-末端に最も近い位置の Asn¹⁴ を Gln に置換し糖鎖付加を阻止した recombinant AGT は、renin による分解を全く受けず、AGT 内の N-グリコシド結合の比率は血清中 renin 活性にとって重要である¹⁸⁾。我々の検討においてラット血清には高分子 AGT (highly glycosylated AGT) が主に検出された (図

2). 脂肪細胞内で生合成された AGT の循環系への分泌には, AGT 構造内における糖鎖の比率が大きく影響していた.

肥満等における肥大化脂肪細胞の増加は, 脂肪細胞内から血清中へ高分子 AGT の分泌が増大し, 結果的に Ang II 産生亢進が想定される. 脂肪細胞中 AGT 遺伝子が欠損したマウスでは血清中 AGT 濃度が減少する報告¹⁹⁾からも脂肪組織での AGT 産生増加は, 高血圧症にとって大きな原因となる可能性が示唆される. 産生した Ang II はオートクライン/パラクライン的に脂肪細胞に作用し, 脂質形成や insulin 感受性の低下等に影響を及ぼすと考えられる²⁰⁾.

高血圧症の治療薬は長期間投与される. 我々は RAS 抑制剤 (ACE 阻害剤, ARB) を約 9 週間投与したラットの血清中 AGT 濃度は, 検討期間内 (3, 6, および 9 週間) において, 正常群は 3.25 ± 0.34 , 3.46 ± 0.23 , および 3.47 ± 0.35 $\mu\text{g/ml}$ であり, 週齢による産生量の変化に有意差を認めなかった (データ未発表). 一方 captopril 投与 3 週群において AGT 濃度は対照群と比較し約 39% ($p=0.067$, 内臓脂肪減少率: 10%) 低下した. その後 AGT 濃度は約 16% および 13% の減少を示しやや上昇したが, 血清 AGT の産生量は減少傾向を示した. Imidapril 投与群では, いずれの期間内においても AGT 発現量の変化は認めなかった. また, ARB の 1 つである olmesartan 投与群において AGT 発現量は, 3 週群では変化が認められなかったが, 6 および 9 週群で約 20% ($p=0.007$) および 25% ($p=0.027$) に減少した. Losartan 群では血清 AGT 量の抑制は顕著ではなかった. Captopril および olmesartan を投与したラットでは, 血清中 AGT 濃度の抑制が示された. 特に olmesartan は投与 3 週間後から継続的に顕著な血清 AGT 濃度の減少を示したことから, 血管平滑筋での Ang II の結合抑制のみならず, 内臓脂肪組織における AGT の産生および分泌抑制効果も有する優れた降圧薬である可能性が示唆され, 今後の詳細な解析が期待される.

2. 記憶保持増強効果

1970年代前半, 脳での RAS の発見に伴い脳 RAS と生理機能 (血圧の調節, 体内水分のバランスと

口渇, vasopressin の放出, および生殖行動と性行動への影響など) との関連性が明らかになった²¹⁾. 最近ではアルツハイマー病 (AD), パーキンソン病, 糖尿病の病因, 記憶保持等における脳血流の確保の必要性および脳保護に大きく関与することが示されている²²⁻²⁴⁾.

長い間中枢 RAS に対する ACE 阻害剤の影響について多くの研究が進められてきたが, それらの中で ACE 阻害剤と認知機能との関連性も注目されていた. Captopril の中枢への作用に関連して, 24 週間 captopril で治療した軽度および中等度の高血圧症の男性患者は, 職場での精神的ストレスが改善され, 性機能障害が少なく, 幸福感が改善された²⁵⁾. Amenta らは, 高血圧症患者の治療時に認知機能への影響に関する臨床試験を行い, ACE 阻害剤が血圧効果とは無関係に認知機能を改善し, この効果は β 遮断薬および利尿薬より優れていると結論付けた²⁶⁾. さらに, ACE 阻害剤は出血性または虚血性脳血管障害後に生じた認知機能低下を改善し, 血管性認知症の発生を減少させると報告している²⁶⁾. 軽度認知障害を有する患者では, ACE 阻害剤による認知能力消失の予防も注目され^{27, 28)}, ACE 阻害剤を投与された AD 患者の認知低下率の改善を Hajjar らやその他グループが報告している^{29, 30)}. これらの結果を検証する目的で, Yasar³¹⁾ らは ACE 阻害剤, ARB, および利尿薬を投与した患者での解析を試み, ACE 阻害剤が AD 発症リスクを減少するとしている. 一方, Sudilovsky らは, ACE 阻害剤 ceranopril が AD 患者の認知機能に影響を与えないと報告したが³²⁾, ceranopril は非中枢移行性であった.

これらの結果は, 全ての ACE 阻害剤に認知機能低下の改善効果が認められるのではなく, blood-brain barrier (BBB) を通過し中枢 RAS にも影響を及ぼす ACE 阻害剤の存在を示唆していた. このような疑問を解決するかのようになり, 2007 年に開催された米国老年医学会にて Sink らは中枢移行性 ACE 阻害剤 (captopril, fosinopril, lisinopril, perindopril, ramipril, trandolapril) を投与した患者は, BBB を通過しない ACE 阻害剤を投与した患者に比べて, 認知機能低下を 50% ほど遅延させる ($P=0.04$) と報告し³³⁾, その機序としてアルツ

ハイマー型認知症の特徴である脳の炎症を抑える作用によると想定していた。非中枢移行性 ACE 阻害剤では、逆にリスクを高める結果となっていた。こうして一躍中枢移行性 ACE 阻害剤の認知機能への効果が脚光を浴びたものの、その機序は未だ十分に解明されていない。本稿では ACE 阻害剤の記憶保持機構の増強の機序について考察を行った。

近年、Ang II の代謝物である Ang IV が結合する受容体(AT4)がラット脳の海馬等に高濃度で存在し、学習や記憶保持と深く係っていることが推測されていた^{34,35}。Ang 関連ペプチドは前駆物質 AGT に対する各種プロテアーゼのプロセシングにより産生する(図1)³⁶。ACEにより産生した Ang II は、glutamyl aminopeptidase A (AP-A; EC 3.4.11.7)によってN末端 Asp¹ 残基が切断されたヘプタペプチド Ang III に変換される。Ang III はさらに膜結合性 alanyl amino-peptidase N (AP-N; EC 3.4.11)によってヘキサペプチド Ang IV に変換される。Ang IV は carboxypeptidase P (Carb-P) および pyrolyl oligopeptidase (PO) によって、Ang 3-7 に代謝される。

Ang IV は Ang II 受容体である AT1 および AT2 には親和性を示さないが、AT4 に高い親和性を示すことから AT4 の内在性リガンドと考えられていた³⁵。

一方、Ang II は carboxypeptidase, ACE2 により Ang 1-7 に変換される。また、ACE2 は Ang I にも作用し Ang 1-9 を産生し、Ang 1-9 は ACE により C-末端ジペプチドを遊離し活性型 Ang 1-7 へ変換される(図1)³⁷。Ang 1-7 はオーファンヘテロ三量体 G タンパク質共役型受容体(Mas 受容体: MasR)に結合し³⁸、末梢器官の炎症および線維症に対し、グルコース利用を増加させ、insulin 抵抗性を低下させる^{39,40}。2000年 ACE2 は ACE のホモログとして同定され ACE と高度の構造類似性を示すが、bradykinin は分解せず、captopril や enalapril などの ACE 阻害によって活性は抑制されない³⁷。

MasR は、脳では海馬および梨状皮質を含む記憶および認知に関連する部位にも存在する^{41,42}。これらの結果を支持するように Ang 1-7 は長期記憶保持能を促進することが示された⁴³。AT1 お

よび A2 および MasR の詳細については多数報告されており本稿では省略する。

脳 RAS と認知機能との関連性において Ang IV の役割の解明が急務となった。古くは AT1 および AT2 に対するアンタゴニストが、学習能力および記憶課題の処理能力を促進すると報告されていた。実際に ARB による Ang II の AT1 への結合遮断が、ラットおよびマウスにおいて記憶の改善をもたらす証拠として、様々な課題の解決能力を促進することが示されていた^{44,47}。1988年 Braszko らは、Ang IV を脳室内に注入したラットでは記憶および学習能が改善されたと報告した⁴⁸。Ang IV および Ang IV 誘導体 Nle¹-Ang IV の長期記憶(LTP)の増強についても検討され^{49,52}、Ang IV 誘導体 Nle¹-Ang IV は、物体認識および空間記憶を改善した⁵³。これらの成績の中で、特に Ang II が関連する記憶増強効果は、Ang II から Ang III、そして Ang IV への変換に基づく可能性が高いと考えられていたが⁵⁴、我々の検討においては、ARB(losartan)投与ラットでは、記憶保持の改善は認められなかった⁵⁵。ARB が脳の Ang IV レベルを上昇させることによって認知機能を改善するという仮説の証明には、AT1 の遮断によって生じた内因性 Ang II、Ang III、そして Ang IV、さらには Ang 1-7 などの脳内レベルを検証することが求められる。

AT4 は 160~190 kDa の分子量を有する二量体(または三量体)である⁵⁶。近年 AT4 の機能や構造について多くの研究成果が報告された中で特筆すべき内容は、AT4 が insulin-regulated aminopeptidase (IRAP: EC 3.4.11.3) と同定されたことである⁵⁶。この IRAP は glucose 輸送体 (GLUT4) の機能を調節し、glucose の細胞内への取り組みに係る。肝臓、筋肉、そして脂肪細胞等での glucose の取り込みは、細胞内 GLUT4 貯蔵顆粒のトランスローケーションにより細胞膜へ移動する必要がある。この移動には貯蔵顆粒に豊富に存在する IRAP が必須と考えられている⁵⁷。神経細胞での glucose 取り込み調節における IRAP の正確な役割は未だ確立されていない。しかしながら、ラットにおいて glucose 投与が認知能力を高めるが⁵⁸、細胞内での神経代謝、神経活動または神経伝達物質の合成に変化をもたら

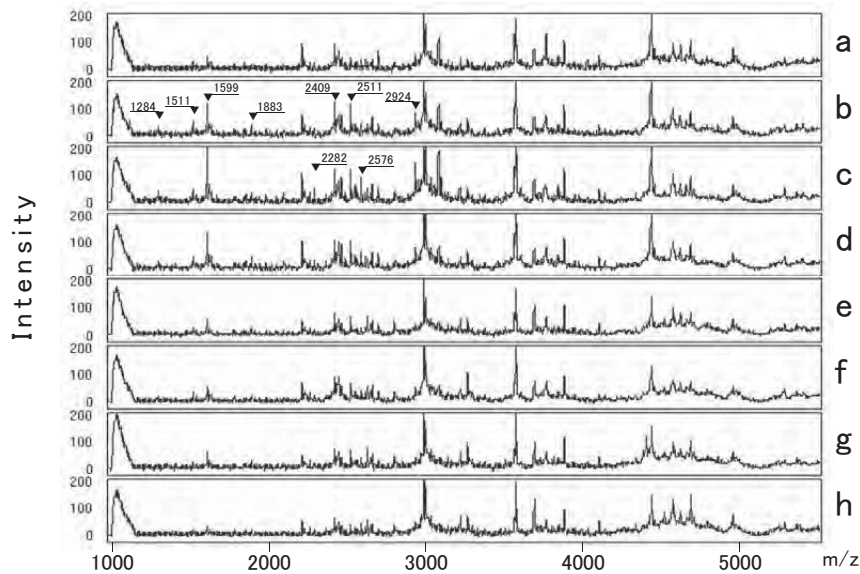


図3 ラット脳抽出物のペプチドマッピング

各種RAS抑制剤投与ラット脳抽出試料についてMALDI-TOF MS法にてペプチド性物質のマッピングを行った。a; control, b; captopril: 5mg/kg, c; captopril: 10mg/kg, d; captopril: 20mg/kg, e; imidapril: 1mg/kg, f; imidapril: 4mg/kg, g; losartan: 21mg/kg, h; losartan: 42mg/kg. ▼: captopril投与ラットにおいて特異的に出現したシグナル。

し、記憶および学習を促進する可能性も考えられている。Glucoseは認知機能の維持に重要であるacetylcholineの合成と放出の両方を促進する⁵⁹⁾。

IRAPは当初GLUT4を含む顆粒のマーカータンパク質(vp165)として、ラット精巣上体の脂肪細胞cDNAライブラリからクローニングされたが、aminopeptidase AおよびNと相同配列を有するgluzincin aminopeptidase familyのtype2膜貫通タンパク質であり⁶⁰⁾、別名oxytocin-degrading enzyme, cystinyl aminopeptidase, placental leucine aminopeptidase, gp160, またはvp165として脂肪組織、筋肉、腎臓、副腎、肺、および心臓を含む多くの組織に広く分布している⁶¹⁾。IRAPは基質特異性が広く、*in vitro*においてオピオイドペプチド(met-enkephalin, dynorphin)やoxytosin, Arg⁸-vasopressin, Lysyl-bradykinin (kallidin), neurokinin A, somatostatin, neuromedin B, およびcholecystokinin-8(CCK-8)などの多くの生理活性ペプチドのN末端アミノ酸を切断する性質を有しているが^{62, 63)}、内在性基質は未だ明らかにされていない。各種ペプチドの分解は活性中心に存在しているZn²⁺結合部位のモチーフ(His-Glu-Xaa-Xaa-His)が触媒活性を担っている⁶⁰⁾。Vasopressin, oxytocin, およびsomatostatinは、

学習や記憶保持^{64, 65)}を増強することが報告されており、IRAP活性の抑制はこれらのペプチドも含めた記憶関連ペプチド性物質の半減期を延長させることが予想される。

Ang IVはAT4の内在性リガンドとして想定されていたが、Moellerらはhemoglobinβ鎖より産生されかつオピオイド活性を有するLVV-hemorphin-7 (LVV-H7)を羊脳より単離し、AT4の内在性リガンドであることを報告した⁶⁶⁾。AT4リガンドAng IVおよびLVV-H7いずれも、IRAP活性を阻害し^{67, 68)}、これらのリガンドは[²⁵I] Nle1-Ang IVの結合に対して競合し、IC₅₀値はそれぞれ32および140 nMとされる⁵⁶⁾。ラット脳内でのLVV-H7濃度は0.6 ± 0.05 nmol/gと高濃度を示し⁶⁹⁾、検出が困難とされるAng IVのそれより高い値を示すことから、脳内IRAP活性はLVV-H7により調節されている可能性が考えられる(図3)。IRAPの活性抑制は認知機能の改善に繋がることが想定され、Ang IVをリード化合物としてIRAPの酵素活性を抑制する物質の開発も進められているが⁷⁰⁾、経口投与、各種proteaseへの抵抗性、そしてBBB透過性など創薬されるまでにクリアすべき課題が多数存在している。

IRAPの内在性基質としては、vasopressinお

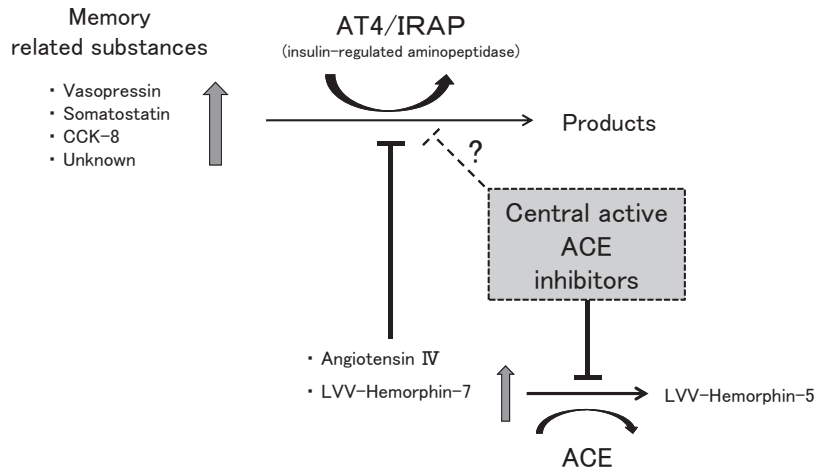


図4 中枢移行性 ACE 阻害剤投与における記憶保持増強機構

よび somatostatin が候補として考えられている。Vasopressin の中枢投与は、受動的回避学習解析での記憶保持能力を改善し、食物が与えられる視覚弁別課題のオペラント行動を高める⁷¹⁾。興味深いことに vasopressin の断片 (Gln⁴-Asn⁵-Cys⁶-Pro⁷-Arg⁸ および Asn⁵-Cys⁶-Pro⁷-Arg⁸) は、受動的回避学習解析において天然ペプチドよりも効果的であった^{72, 73)}。Somatostatin の海馬内投与は、脳内 somatostatin を枯渇させる cysteamine や scopolamine 投与にて認知機能障害を生じ、ラットにおいて記憶障害を改善した^{74, 75)}。

Hayakari ら³⁾ はラット脳内より精製した ACE による LVV-H7 の分解機構を酵素反応速度論的に解析し、内在性基質 Ang I との比較を行った。反応速度パラメーター (K_m 値: 15 μM , K_{cat} 値: 82 s^{-1} , そして K_m/K_{cat} 値: 5300 s^{-1}/mM) はいずれも内在性基質 Ang I に対する各値より優れた値を示し、LVV-H7 はラット脳内 ACE に対する内在性基質の可能性を報告した。ACE はシークエンシャルに LVV-H7 の C-末端からジペプチドを遊離し最終的に LVV-H3 (Leu¹-Val²-Val³-Tyr⁴) にまで変換する。各段階の速度定数 (k_1 , k_2 , および k_3) は、 k_1 が k_2 および k_3 の約 240 倍を示し、ACE は LVV-H7 を速やかに分解し脳内にはその分解産物の LVV-H5 が蓄積している可能性が示された。事実ラット各組織中 hemorphin 類は、脳内 LVV-H5 濃度が LVV-H7 の約 3 倍である。同様に ACE が局在しているラット肺におい

ても LVV-H5 濃度は 2 倍以上であった。しかしながら、ACE が少ない心臓での LVV-H5 濃度は LVV-H7 と同程度であった⁷⁴⁾。この結果は脳 ACE が LVV-H7 を LVV-H5 に速やかに変換する役割を演じている可能性を示唆し、LVV-H5 の新たな生理的機能が今後明らかにされる可能性がある。LVV-H7 と同様に hemoglobin β 鎖の産物である VV-H7 からは VV-H5 が産生され、ラット脳および肺における VV-H5 濃度は、それぞれ VV-H7 の約 3 倍および 11 倍を示している⁷⁶⁾。VV-H5 は別名 valorphin として抗腫瘍効果が注目されている⁷⁷⁾。

Hayakari ら³⁾ により LVV-H7 はラット脳 ACE の内在性基質の可能性が示唆され、中枢移行性 ACE 阻害剤の投与による認知機能の改善効果は、脳内 ACE 活性抑制により蓄積した LVV-H7 が IRAP 活性抑制をもたらし、その結果 IRAP により代謝調節される学習および認知機能関連ペプチドレベルの上昇による可能性が想定される。ラットに中枢移行性 ACE 阻害剤 captopril, 非中枢移行性 ACE 阻害剤 imidapril, ARB の losartan を投与し、Morris 水迷路法にて標的への到達時間を評価項目とし長期記憶保持能を解析した結果、中枢移行性 ACE 阻害剤 captopril 投与群において到達時間の短縮を認めた。この効果は captopril 濃度依存的であった。

さらに記憶保持能の解析を行ったラット脳でペプチドマッピングを行った。Captopril 投与群に

において特異的に出現した物質を認め(図4)⁵⁵⁾, 現在構造解析を進めているところである. 今後のこれらの物質の構造解析により, 認知機能との関連性が明らかになることに期待したい.

3. ACE 阻害剤 captoprilのinsulin 分解抑制

Insulin は, 食事後の血糖値の上昇に伴い膵臓内に存在するβ細胞から血中に放出される. 放出された insulin は筋肉細胞や脂肪細胞の細胞膜上に存在する insulin 受容体に結合し, 細胞内 GLUT4 貯蔵顆粒を膜に移動させ膜表面に GLUT4 を取り込む. 取り込まれた GLUT4 は食事により上昇した血液中の glucose を細胞内に取り込み, 最終的に血糖値を下げることになるが, 分泌された insulin は insulin-degrading enzyme (IDE)により分解を受けその生理的機能を失う.

近年 IDE の酵素化学的性状が明らかとなってきた. ヒト赤血球⁷⁸⁾から精製された IDE の分子量は300 kDa を示し, ダイマーまたはトライマーのサブユニット構造(分子量:110 kDa)を有し, 血清, 肝臓, 筋肉そして他の組織にも存在する. IDE は Zn^{2+} metalloproteinase の一種で, insulin を分解するが, SH 基反応剤やキレート剤により阻害を受ける^{79,80)}. 近年この IDE は amyloidβ の分解に係ることが明らかとなり, AD 発症との関連性が注目されている.

遺伝子組換え insulin 製剤の開発により糖尿病の症状に適した各種製剤の選択が可能となった. Insulin 製剤は, 作用時間の違いにより超速攻型から持効型まで多種類の製剤が上市され, 糖尿病患者の薬物療法に欠かせないツールとなっている. これらの製剤の使用上の注意として ACE 阻害剤併用時には低血糖症状を呈する可能性が明記されている⁸¹⁾.

我々は超速効型 insulin 製剤(insulin aspart: insulin β鎖 Pro²⁸→Asp²⁸, ノボラビット30注, ノボノルディスクファーマ株式会社)のヒト血清 IDE による分解を LC-MS/MS 法にて解析した. LC-MS/MS 装置での検出限界を考慮し insulin 濃度は 4 μU/ml とした. 酵素分解反応の諸条件の検討を行った結果, insulin の分解は反応経過時間とともに分解を受けその反応は反応時間6時間までは逐次反応曲線を示し, この反応式を

用いて阻害機構等の解析が可能であった. 通常成人(60 kg)に本剤を投与した時の最高血中濃度は約26 μU/ml⁸²⁾であったが, 反応時間とともに insulin 濃度は減少し, その分解は我々の検討と同様逐次反応を示していた. 今後検討した IDE 分解測定法を用い, 各種 ACE 阻害剤やキレート能のある薬剤による IDE 阻害活性を検討し, insulin 治療時における低血糖症状の機序や使用上の注意点などを明らかにする必要がある. 糖尿病患者における重篤な低血糖状態が複視, けいれん, 昏睡などの生命に危険な状況を生じることから, 高血圧症を併発している患者等への安全な薬物療法にとって重要である.

結 語

1970年代に軽度および中等度本態性高血圧症の劇的な治療薬として登場した ACE 阻害剤 captopril に始まり, ACE の構造解析とともに多くの ACE 阻害剤が開発され, さらには ACE 阻害剤の有する副作用を軽減した ARB や renin 阻害剤が開発され, 今や RAS 抑制剤は高血圧症の治療薬として最も使用されている. この間, 脂肪細胞の性状の解明そして生活習慣病との密接な関連性, 記憶保持機構, そして認知症に関する各種の研究は大きく進展し, これらの疾患と RAS が大きく係っていることも明らかになった.

長年暴飲暴食による生活習慣において, 摂取エネルギーが消費エネルギーを上回ることにより体脂肪が増える内臓脂肪蓄積型肥満と生活習慣病の関連性が注目されてきた. この内臓脂肪には白色脂肪細胞が多く含まれ, この細胞では多くのサイトカイン等が産生され高血圧・脂質異常症・糖尿病等の発症に大きく関与している.

我々や多くの研究は脂肪細胞には RAS の存在を示し, 血清中 AGT の供給源として脂肪細胞が示された. さらに脂肪組織では複数の分子サイズを示す AGT が存在するが, 血液には高度に糖が付加した高分子量の AGT が分泌していた. AGT への糖鎖の付加は細胞からの遊離に影響を及ぼすとともに, renin 活性にも影響を及ぼす. RAS 抑制剤を投与したラットにおいて, captopril および olmesartan は血清 AGT 濃度を

減少させ優れた降圧薬の可能性が示唆された。

2009年 Sink らは、高齢者を対象としたコホート研究において、BBBを通過するACE阻害剤が認知症障害を抑制することを報告したが、その機序は未だ明らかにされていない。記憶保持に係る組織として脳の海馬が知られているが、海馬には記憶保持と強く係っているAT4が発現している。AT4はinsulin-regulated aminopeptidase (IRAP)であることが示され、記憶保持に係るペプチド性物質の代謝に係っている可能性が想定されている。この酵素はまた内在性リガンドAng IVや内在性リガンドとして想定されるLVV-H7により活性阻害を受ける。RAS抑制剤を投与したラットでは、中枢移行性ACE阻害剤captopril投与群でMorris水迷路法にて記憶保持能の改善が認められたが、非中枢移行ACE阻害剤imidaprilやARBのlosartan投与群では、改善効果は認められなかった。Captopril投与群のラット脳抽出物のペプチドプロファイリングでは、captopril投与群において特異的なシグナルの出現を認め、記憶保持関連物質の可能性が示唆された。

速攻型insulin皮下投与において、ACE阻害剤が併用された患者では、低血糖を生じる可能性が報告されているが、その機序は不明であった。近年IDEの性状が明らかとなり、キレート作用を有する化合物はIDEを抑制し、insulinの作用を増長する可能性が推定される。

なお、筆者らの結果は、弘前大学動物実験委員会および弘前大学医学研究科倫理委員会の審査を受け、弘前大学動物実験に関する規程ならびにヘルシンキ宣言を遵守して行われた。

引用文献

- 1) Skidgel RA, Erdös EG. The broad substrate specificity of human angiotensin I converting enzyme. *Clin Exp Hypertens A*. 1987;9:243-59.
- 2) Hayakari M, Satoh K, Ookawa K, Kano H, Murakami S, Ikeda N, Tsuchida S. Kinetic evaluation of beta-neoendorphin hydrolysis by the somatic and testicular isozymes of human angiotensin-converting enzyme. *Biochim Biophys Acta*. 1997;1339:31-8.
- 3) Hayakari M, Satoh K, Izumi H, Kudoh T, Asano J, Yamazaki T, Tsuchida S. Kinetic-controlled hydrolysis of Leu-Val-Val-hemorphin-7 catalyzed by angiotensin-converting enzyme from rat brain. *Peptides*. 2003;24:1075-82.
- 4) Yang HY, Erdös EG, Levin Y. Characterization of a dipeptide hydrolase (kininase II: angiotensin I converting enzyme). *J Pharmacol Exp Ther*. 1971;177:291-300.
- 5) Ferreira SH, Rocha e Silva M. Potentiation of bradykinin and eledoisin by BPF (bradykinin potentiating factor) from *Bothrops jararaca* venom. *Experientia*. 1965;21:347-9.
- 6) Ondetti MA, Rubin B, Cushman DW. Design of specific inhibitors of angiotensin-converting enzyme: new class of orally active antihypertensive agents. *Science*. 1977;196:441-4.
- 7) 橋本虎六. 経口的に有効な選択的アンジオテンシン変換酵素阻害剤SQ14,225発見の経緯. *心臓*. 1977;9巻:188-91.
- 8) Todd PA, Heel RC. Enalapril. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic use in hypertension and congestive heart failure. *Drugs*. 1986;31:198-248.
- 9) Streeten DH, Anderson GH Jr, Dalakos TH. Angiotensin blockade: its clinical significance. *Am J Med*. 1976;60:817-24.
- 10) Wexler RR, Greenlee WJ, Irvin JD, Goldberg MR, Prendergast K, Smith RD, Timmermans PB. Nonpeptide angiotensin II receptor antagonists: the next generation in antihypertensive therapy. *J Med Chem*. 1996;39:625-56.
- 11) Eklind-Cervenka M, Benson L, Dahlström U, Edner M, Rosenqvist M, Lund LH. Association of candesartan vs losartan with all-cause mortality in patients with heart failure. *JAMA*. 2011; 305:175-82.
- 12) Kjeldsen SE, Schmieder RE, Unger T, Mancia G. Telmisartan and hydrochlorothiazide combination therapy for the treatment of hypertension. *Curr Med Res Opin*. 2010;26: 879-87.
- 13) Zanchetti A, Elmfeldt D. Findings and implica-

- tions of the Study on COgnition and Prognosis in the Elderly(SCOPE) - a review. *Blood Press.* 2006;15:71-9.
- 14) Trenkwalder P. The Study on COgnition and Prognosis in the Elderly (SCOPE)--recent analyses. *J Hypertens Suppl.* 2006;24:S107-14.
 - 15) Tai TA, Jennermann C, Brown KK, Oliver BB, MacGinnitie MA, Wilkison WO, Brown HR, et al. Activation of the nuclear receptor peroxisome proliferator- activated receptor gamma promotes brown adipocyte differentiation. *J Biol Chem.* 1996;271:29909-14.
 - 16) Hata A, Namikawa C, Sasaki M, Sato K, Nakamura T, Tamura K, Lalouel JM. Angiotensinogen as a risk factor for essential hypertension in Japan. *J Clin Invest.* 1994;93:1285-7.
 - 17) Massiéra F, Bloch-Faure M, Ceiler D, Murakami K, Fukamizu A, Gasc JM, Quignard-Boulangé A, et al. Adipose angiotensinogen is involved in adipose tissue growth and blood pressure regulation. *FASEB J.* 2001;15:2727-9.
 - 18) Gimenez-Roqueplo AP, Célérier J, Lucarelli G, Corvol P, Jeunemaitre X. Role of N-glycosylation in human angiotensinogen. *J Biol Chem.* 1998;273:21232-8.
 - 19) Yiannikouris F, Karounos M, Charnigo R, English VL, Rateri DL, Daugherty A, Cassis LA. Adipocyte-specific deficiency of angiotensinogen decreases plasma angiotensinogen concentration and systolic blood pressure in mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2012;302:R244-51.
 - 20) Karlsson C, Lindell K, Ottosson M, Sjöström L, Carlsson B, Carlsson LM. Human adipose tissue expresses angiotensinogen and enzymes required for its conversion to angiotensin II. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998;83:3925-9.
 - 21) Thomas WG, Mendelsohn FA. Angiotensin receptors: form and function and distribution. *Int J Biochem Cell Biol.* 2003;35:774-9.
 - 22) Wright JW, Yamamoto BJ, Harding JW. Angiotensin receptor subtype mediated physiologies and behaviors: new discoveries and clinical targets. *Prog Neurobiol.* 2008;84:157-81.
 - 23) Pelegrini-da-Silva A, Rosa E, Guethe LM, Juliano MA, Prado WA, Martins AR. Angiotensin III modulates the nociceptive control mediated by the periaqueductal gray matter. *Neuroscience.* 2009;164:1263-73.
 - 24) Wright JW, Harding JW. Importance of the brain Angiotensin system in Parkinson's disease. *Parkinsons Dis.* 2012;2012:860923.
 - 25) Croog SH, Levine S, Testa MA, Brown B, Bulpitt CJ, Jenkins CD, Klerman GL, Williams GH. The effects of antihypertensive therapy on the quality of life. *N Engl J Med.* 1986;314:1657-64.
 - 26) Amenta F, Mignini F, Rabbia F, Tomassoni D, Veglio F. Protective effect of anti-hypertensive treatment on cognitive function in essential hypertension: analysis of published clinical data. *J Neurol Sci.* 2002;203-4:147-51.
 - 27) Kehoe PG, Wilcock GK. Is inhibition of the renin-angiotensin system a new treatment option for Alzheimer's disease? *Lancet Neurol.* 2007;6:373-8.
 - 28) Rozzini L, Chilovi BV, Bertoletti E, Conti M, Del Rio I, Trabucchi M, Padovani A. Angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitors modulate the rate of progression of amnesic mild cognitive impairment. *Int J Geriatr Psychiatry.* 2006;21:550-5.
 - 29) Hajjar IM, Keown M, Lewis P, Almor A. Angiotensin converting enzyme inhibitors and cognitive and functional decline in patients with Alzheimer's disease: an observational study. *Am J Alzheimers Dis Other Dement.* 2008;23:77-83.
 - 30) Soto ME, van Kan GA, Nourhashemi F, Gillette-Guyonnet S, Cesari M, Cantet C, Rolland Y, et al. Angiotensin-converting enzyme inhibitors and Alzheimer's disease progression in older adults: results from the Réseau sur la Maladie d'Alzheimer Français cohort. *J Am Geriatr Soc.* 2013;61:1482-8.
 - 31) Yasar S, Xia J, Yao W, Furberg CD, Xue QL, Mercado CI, Fitzpatrick AL, et al. Antihypertensive drugs decrease risk of Alzheimer disease: Ginkgo Evaluation of Memory Study.; Ginkgo Evaluation of Memory (GEM) Study Investigators. *Neurology.* 2013;81:896-903.
 - 32) Sudilovsky A, Cutler NR, Sramek JJ, Wardle T, Veroff AE, Mickelson W, Markowitz J, et al. A

- pilot clinical trial of the angiotensin-converting enzyme inhibitor ceranapril in Alzheimer disease. *Alzheimer Dis Assoc Disord.* 1993;7:105-11.
- 33) Sink KM, Leng X, Williamson J, Kritchevsky SB, Yaffe K, Kuller L, Yasar S, et al. Angiotensin-converting enzyme inhibitors and cognitive decline in older adults with hypertension: results from the Cardiovascular Health Study. *Arch Intern Med.* 2009;169:1195-202.
- 34) Moeller I, Chai SY, Oldfield BJ, McKinley MJ, Casley D, Mendelsohn FA. Localization of angiotensin IV binding sites to motor and sensory neurons in the sheep spinal cord and hindbrain. *Brain Res.* 1995;701:301-6.
- 35) Chai SY, Bastias MA, Clune EF, Matsacos DJ, Mustafa T, Lee JH, McDowall SG, et al. Distribution of angiotensin IV binding sites (AT4 receptor) in the human forebrain, midbrain and pons as visualised by in vitro receptor autoradiography. *J Chem Neuroanat.* 2000;20:339-48.
- 36) Chauvel EN, Llorens-Cortès C, Coric P, Wilk S, Roques BP, Fournié-Zaluski MC. Differential inhibition of aminopeptidase A and aminopeptidase N by new beta-amino thiols. *J Med Chem* 1994;37:2950-7.
- 37) Donoghue M, Hsieh F, Baronas E, Godbout K, Gosselin M, Stagliano N, Donovan M, et al. A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. *Circ Res.* 2000;87:E1-9.
- 38) Santos RA, Simoes e Silva AC, Maric C, Silva DM, Machado RP, de Buhr I, Heringer-Walther S, et al. Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003;100:8258-63.
- 39) Echeverría-Rodríguez O, Del Valle-Mondragón L, Hong E. Angiotensin 1-7 improves insulin sensitivity by increasing skeletal muscle glucose uptake in vivo. *Peptides.* 2014;51:26-30.
- 40) Muñoz MC, Giani JF, Burghi V, Mayer MA, Carranza A, Taira CA, Dominici FP. The Mas receptor mediates modulation of insulin signaling by angiotensin-(1-7). *Regul Pept.* 2012;177:1-11.
- 41) Metzger R, Bader M, Ludwig T, Berberich C, Bunnemann B, Ganten D. Expression of the mouse and rat mas proto-oncogene in the brain and peripheral tissues. *FEBS Lett.* 1995;357:27-32.
- 42) Pereira MG, Souza LL, Becari C, Duarte DA, Camacho FR, Oliveira JA, Gomes MD, et al. Angiotensin II-independent angiotensin-(1-7) formation in rat hippocampus: involvement of thimet oligopeptidase. *Hypertension.* 2013;62:879-85.
- 43) Hellner K, Walther T, Schubert M, Albrecht D. Angiotensin-(1-7) enhances LTP in the hippocampus through the G-protein-coupled receptor Mas. *Mol Cell Neurosci.* 2005;29:427-35.
- 44) Wright JW, Harding JW. The brain angiotensin system and extracellular matrix molecules in neural plasticity, learning, and memory. *Prog Neurobiol.* 2004;72:263-93.
- 45) Basso N, Paglia N, Stella I, de Cavanagh EM, Ferder L, del Rosario Loes Arnaiz M, Inserra F. Protective effect of the inhibition of the renin-angiotensin system on aging. *Regul Pept.* 2005;128:247-52.
- 46) Bild W, Hritcu L, Stefanescu C, Ciobica A. Inhibition of central angiotensin II enhances memory function and reduces oxidative stress status in rat hippocampus. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2013;43:79-88.
- 47) Mogi M, Horiuchi M. Effects of angiotensin II receptor blockers on dementia. *Hypertens Res.* 2009;32:738-40.
- 48) Braszko JJ, Kupryszewski G, Witczuk B, Wiśniewski K. Angiotensin II-(3-8)-hexapeptide affects motor activity, performance of passive avoidance and a conditioned avoidance response in rats. *Neuroscience.* 1988;27:777-83.
- 49) Wright JW, Stublely L, Pederson ES, Kramár EA, Hanesworth JM, Harding JW. Contributions of the brain angiotensin IV-AT4 receptor subtype system to spatial learning. *J Neurosci.* 1999;19:3952-61.
- 50) Kramár EA, Armstrong DL, Ikeda S, Wayner MJ, Harding JW, Wright JW. The effects of angiotensin IV analogs on long-term potentiation within the CA1 region of the hippocampus in vitro. *Brain Res.* 2001;897:114-21.
- 51) Wayner MJ, Armstrong DL, Phelix CF, Wright

- JW, Harding JW. Angiotensin IV enhances LTP in rat dentate gyrus in vivo. *Peptides*.2001;22:1403-14.
- 52) Paris JJ, Eans SO, Mizrahi E, Reilly KJ, Ganno ML, McLaughlin JP. Central administration of angiotensin IV rapidly enhances novel object recognition among mice. *Neuropharmacology*. 2013;70:247-53.
- 53) Olson ML, Cero IJ. Intrahippocampal Norleucine¹-Angiotensin IV mitigates scopolamine-induced spatial working memory deficits. *Peptides*. 2010;31:2209-15.
- 54) Wright JW, Harding JW. Brain renin-angiotensin-a new look at an old system. *Prog Neurobiol*. 2011;95:49-67.
- 55) 金澤佐知子, 細井一広, 照井一史, 下山律子, 中川潤一, 板垣史郎, 早狩 誠. 中枢移行性アンジオテンシン変換酵素阻害剤投与によるラット脳内ペプチド性物質のプロファイリング. *弘前医学*. 2014;65:95-103.
- 56) Albiston AL, McDowall SG, Matsacos D, Sim P, Clune E, Mustafa T, Lee J, et al. Evidence that the angiotensin IV(AT₄) receptor is the enzyme insulin-regulated aminopeptidase. *J Biol Chem*. 2001;276:48623-6.
- 57) Jordens I, Molle D, Xiong W, Keller SR, McGraw TE. Insulin-regulated aminopeptidase is a key regulator of GLUT4 trafficking by controlling the sorting of GLUT4 from endosomes to specialized insulin-regulated vesicles. *Mol Biol Cell*. 2010; 21:2034-44.
- 58) Ragozzino ME, Unick KE, Gold PE. Hippocampal acetylcholine release during memory testing in rats: augmentation by glucose. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996;93:4693-8.
- 59) Kopf SR, Buchholzer ML, Hilgert M, Löffelholz K, Klein J. Glucose plus choline improve passive avoidance behaviour and increase hippocampal acetylcholine release in mice. *Neuroscience*. 2001; 103:365-71.
- 60) Keller SR, Scott HM, Mastick CC, Aebersold R, Lienhard GE. Cloning and characterization of a novel insulin-regulated membrane aminopeptidase from Glut4 vesicles. *J Biol Chem*. 1995;270:23612-8.
- 61) Rogi T, Tsujimoto M, Nakazato H, Mizutani S, Tomoda Y. Human placental leucine aminopeptidase/oxytocinase. A new member of type II membrane-spanning zinc metallopeptidase family. *J Biol Chem*. 1996;271:56-61.
- 62) Andersson H, Hallberg M. Discovery of inhibitors of insulin-regulated aminopeptidase as cognitive enhancers. *Int J Hypertens*. 2012;2012:789671.
- 63) Ye S, Chai SY, Lew RA, Albiston AL. Insulin-regulated aminopeptidase: analysis of peptide substrate and inhibitor binding to the catalytic domain. *Biol Chem*. 2007;388:399-403.
- 64) Meyer-Lindenberg A, Domes G, Kirsch P, Heinrichs M. Oxytocin and vasopressin in the human brain: social neuropeptides for translational medicine. *Nat Rev Neurosci*. 2011;12:524-38.
- 65) Liguz-Lecznar M, Urban-Ciecko J, Kossut M. Somatostatin and Somatostatin-Containing Neurons in Shaping Neuronal Activity and Plasticity. *Front Neural Circuits*. 2016;10:48.
- 66) Moeller I, Albiston AL, Lew RA, Mendelsohn FA, Chai SY. A globin fragment, LVV-hemorphin-7, induces [³H]thymidine incorporation in a neuronal cell line via the AT₄ receptor. *J Neurochem*. 1999; 73:301-8.
- 67) Lew RA, Mustafa T, Ye S, McDowall SG, Chai SY, Albiston AL. Angiotensin AT₄ ligands are potent, competitive inhibitors of insulin regulated aminopeptidase (IRAP). *J Neurochem*. 2003;86: 344-50.
- 68) Lee J, Chai SY, Mendelsohn FA, Morris MJ, Allen AM. Potentiation of cholinergic transmission in the rat hippocampus by angiotensin IV and LVV-hemorphin-7. *Neuropharmacology*. 2001;40:618-23.
- 69) Yatskin ON, Philippova MM, Blishchenko EYu, Karelin AA, Ivanov VT. LVV- and VV-hemorphins: comparative levels in rat tissues. *FEBS Lett*. 1998;428:286-90.
- 70) Albiston AL, Morton CJ, Ng HL, Pham V, Yeatman HR, Ye S, Fernando RN, et al. Identification and characterization of a new cognitive enhancer based on inhibition of insulin-regulated aminopeptidase. *FASEB J*. 2008;22:4209-17.
- 71) Paban V, Alescio-Lautier B, Devigne C, Soumireu-Mourat B. The behavioral effect of vasopressin

- in the ventral hippocampus is antagonized by an oxytocin receptor antagonist. *Eur J Pharmacol.* 1998;361:165-73.
- 72) Fujiwara M, Ohgami Y, Inada K, Iwasaki K. Effect of active fragments of arginine-vasopressin on the disturbance of spatial cognition in rats. *Behav Brain Res.* 1997;83:91-6.
- 73) Albiston AL, Mustafa T, McDowall SG, Mendelsohn FA, Lee J, Chai SY. AT4 receptor is insulin-regulated membrane aminopeptidase: potential mechanisms of memory enhancement. *Trends Endocrinol Metab.* 2003;14:72-7.
- 74) Matsuoka N, Maeda N, Yamaguchi I, Satoh M. Possible involvement of brain somatostatin in the memory formation of rats and the cognitive enhancing action of FR121196 in passive avoidance task. *Brain Res.* 1994;642:11-9.
- 75) Matsuoka N, Yamazaki M, Yamaguchi I. Changes in brain somatostatin in memory-deficient rats: comparison with cholinergic markers. *Neuroscience.* 1995;66:617-26.
- 76) Yatskin ON, Philippova MM, Blishchenko EYu, Karelin AA, Ivanov VT. LVV- and VV-hemorphins: comparative levels in rat tissues. *FEBS Lett.* 1998; 428:286-90.
- 77) Blishchenko EY, Sazonova OV, Kalinina OA, Moiseeva EV, Vass AA, Karelin AA, Ivanov VT. Antitumor effect of valorphin in vitro and in vivo: combined action with cytostatic drugs. *Cancer Biol Ther* 2005;4:118-24.
- 78) Shii K, Yokono K, Baba S, Roth RA. Purification and characterization of insulin-degrading enzyme from human erythrocytes. *Diabetes.* 1986;35:675-83.
- 79) Rawlings ND, Barrett AJ. Homologues of insulinase, a new superfamily of metalloendo- peptidases. *Biochem J.* 1991;275:389-91.
- 80) Shen Y, Joachimiak A, Rosner MR, Tang WJ. Structures of human insulin-degrading enzyme reveal a new substrate recognition mechanism. *Nature.* 2006;443:870-4.
- 81) Herings RM, de Boer A, Stricker BH, Leufkens HG, Porsius A. Hypoglycaemia associated with use of inhibitors of angiotensin converting enzyme. *Lancet.* 1995;345:1195-8.
- 82) Kaku K, Matsuda M, Urae A, Irie S. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of insulin aspart, a rapid-acting analog of human insulin, in healthy Japanese volunteers. *Diabetes Res Clin Pract.* 2000;49:119-26.