

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09124

研究課題名(和文) 心血管病の発症進展を強力に抑制するAM受容体の新たな分子調節機構の解明と治療応用

研究課題名(英文) Basic and clinical studies of the adrenomedullin receptor

研究代表者

桑迫 健二 (Kuwasaki, Kenji)

宮崎大学・フロンティア科学実験総合センター・准教授

研究者番号：20381098

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：強力な降圧ペプチド、アドレノメデュリン(AM)刺激後のヒト1型AM受容体(AM1受容体)の細胞内輸送における非網膜型G蛋白共役型受容体(GPCR)キナーゼ(GRK)とβ-アレスチンの新しい作用の分子基盤と分子メカニズムを明らかにした。プロテインキナーゼ(PKC)がAM非刺激下にヒトAM1受容体の細胞内移行(異種脱感作)を惹起する分子メカニズムも明らかにした(責任領域も同定)。さらに、ヒトAM1受容体の安定発現株を独自に作製してAM刺激後のAM1受容体の脱感作・再感作機構を明らかにし、その再感作を促進する効率的な手段の1つを確立した。

研究成果の概要(英文)：Adrenomedullin (AM) is a potent hypotensive peptide and can mediate multi-protective signaling through type 1 AM receptors (AM1 receptors), which consist of calcitonin receptor-like receptor (CLR), a G protein-coupled receptor (GPCR), and GPCR activity-modifying protein 2 (RAMP2). Here we elucidated the molecular basis and mechanism of GPCR kinases (GRKs) and beta-arrestins, both of which interact with the cytoplasmic C-terminal tail of the human (h)AM1 receptors. We also clarified the molecular mechanism by which protein kinase C (PKC) induces the internalization of the hAM1 receptors in the absence of AM. Furthermore, we elucidated the mechanism of the intracellular trafficking and signaling of the hAM1 receptors using their stable transfectants and found an effective strategy that can promote their re-sensitization.

研究分野：循環器内科学

キーワード：ペプチド G蛋白共役型受容体 心血管病 分子調節機構 臨床応用

1. 研究開始当初の背景

近年、わが国では動脈硬化に起因する心血管病の患者数が増えつつあり、死亡原因の約25%を占める。国民の約4千万人が罹患している高血圧は、脳卒中と心筋梗塞の発症および死亡への関与度合いが最も高い。

現在、全世界で販売額の上位を占める医薬品の半数以上はG蛋白共役型受容体(GPCR)を標的にしたものである。それ故、心血管病の罹患率低下を目指して、心血管病の病態で昇圧系が降圧系より優位に作用する機序をGPCR側から明らかにし、新たな治療戦略を創出することは重要である。

RAMP (McLatchie et al. *Nature* 1998) は、GPCRの機能を制御する初めての修飾蛋白として同定され、3つのタイプ(RAMP1、RAMP2、RAMP3)が存在する。我々は、とりわけ、心血管病の発症・進展を強力に抑制する1型アドレノメデュリン(AM)受容体(GPCRの1つであるカルシトニン受容体とRAMP2の複合体)の機能解析に加え、分子調節機構と病態での役割の解明を目指した基盤研究を展開してきた。その結果、ヒトの1型AM受容体(AM₁受容体)の分子調節機構に関して、3つの画期的な新知見を得た。

2. 研究の目的

本研究では、これら3つの新知見の基礎研究から治療応用へと展開するための研究基盤を確立する。

GPCRの主要なシグナル分子、GPCRキナーゼ(GRK)とβ-アレスチンの新作用については、機序を明らかにし、それらの作用を特異的に解除するための手段を開発する。これらの手段やAM₁受容体シグナルの再感作促進法を心血管病や高血圧の病態モデルで用いて、AMの治療効果を解析する。

3. 研究の方法

(1) GRKとβ-アレスチンの新作用の機序解明と治療応用

これらの新作用をAM₁受容体が内在する培養細胞(心血管系)でも検証する。当該培養細胞で標的のGRKとβ-アレスチンを過剰発現させた時と欠落させた時のAM₁受容体の細胞膜発現とAMの反応性および細胞内移行とシグナルの再感作を比較解析する。

さらに、心臓もしくは血管に過剰発現させた時のGRKとβ-アレスチンの新作用を解析し、これらの新作用の機序を解明する。併せて、GRKとβ-アレスチンに作用すると考えられるシグナル分子(既知・新規を問わず)の同定も試みる。

AM₁受容体との作用に不可欠なGRKとβ-アレスチンの責任領域を特定し、これらの蛋白の新作用を特異的に解除させるドミナントネガティブ(DN)-GRKとDN-β-アレスチンを同定する。これらの新作用を規定する第3のシグナル分子(既知・未知)に関してもDN変異体を同定する。以上のDN変異体を心血管病や高血圧の病態モデルに発現させたことによるAMの治療効果の変化を解析する。

(2) 独自の再感作促進法によるAM受容体の治療応用

申請者らの再感作促進法を用いて、培養細胞(心血管系)に内在するAM₁受容体のAM依存性細胞内移行とその後の細胞内輸送(AM受容体のC末端と細胞内器官を特異的に認識する抗体を用いて蛍光染色)とシグナルの再感作を解析する。

AMの治療標的である心血管病の病態モデルを作製して、申請者らの再感作促進法が外因性のAMの作用とシグナル反応をどの程度高めるかを比較解析する。

4. 研究成果

(1) 非網膜型G蛋白共役型受容体(GPCR)キナーゼ(GRK)のうち、GRK4とGRK5のみがAMの非刺激下に1型アドレノメデュリン受容体(AM₁受容体)の細胞膜への輸送をそれぞれ55%と30%に低下させた。V5-CLRに対するGRKの遺伝子導入比を10:4から10:1に減じて、GRK4とGRK5による抑制効果は維持された(各75%、35%)。これに応じて、¹²⁵I-AMのAM₁受容体への結合性とAMによるAM₁受容体の反応性(細胞内cAMP産生能)も著明に低下した。この現象は、AM₁受容体の母体であるGPCRのカルシトニン受容体様受容体(CLR)の細胞内C末端領域(C-tail)を完全に欠失させた時とβ₂-アドレナリン受容体(β₂-AR)に置換した時に消失した。CLRのC-tailの系統的な欠失体の検討から、Ser-Phe-Ser-Asn-Ser配列が責任領域であることが判明した。

(2) CLRをβ-アレスチン1もしくはβ-アレスチン2と共発現させると、AM₁受容体の細胞膜発現とAMの結合性・反応性は著変なかったが、AM(100nM)による細胞内移行(1時間後)は、それぞれ40%と50%に低下した。予期せぬことに、それぞれのドミナントネガティブ(DN)変異体も、CLRの細胞内移行85%と70%に低下させた。一方、CLRのC-tailをβ₂-ARに置換したCLR-β₂-ARをβ-アレスチン1もしくはβ-アレスチン2と共発現させると、AM(100nM)による細胞内移行は、それぞれ140%と170%に増加した。それぞれのDN変異体は、CLR-β₂-ARの細胞内移行を75%と60%に低下させた。これらのβ-アレスチンによるCLR-β₂-ARの細胞内移行の促進およびDN変異体による抑制効果は、野生型のβ₂-AR

で得られた所見と合致していた(既報通り)

(3) CLR を RAMP2 の安定発現株に共発現させて、AM の非刺激下に、プロテインキナーゼ (PKC) アクチベーターの PMA (2 μ M) を 1 時間添加すると、AM₁ 受容体の約 30% が細胞内移行した。この細胞内移行は、CLR の細胞内 C 末端領域を完全に欠失させても全く解除されなかった。CLR の細胞内ループのリン酸化部位の変異体 4 種のうち、Thr175Ala 以外は、部分的に有意に細胞内移行が減少した (3 種の変異体の間に有意差はなかった)。PMA を加える前の Thr175Ala の細胞膜発現は、他の 3 種と同等であった。Thr175Ala 以外の 3 種の変異体は、PMA による細胞内移行後に、AM で刺激すると、cAMP の反応性は有意に低下した。一方、CLR を共発現させて、100 μ M の 8-Br-cAMP (cAMP アナログ) を 1 時間添加しても、AM 非刺激下の細胞内移行は全く見られなかった (5 種の CLR 変異体も同様)。

(4) AM₁ 受容体の安定発現株を独自に作製して、クラスリンを経由して細胞内移行した AM 受容体が、細胞膜に再分布 (再感作) せず分解系に向かう (ライソゾームに集積) することを明らかにした (共焦点顕微鏡とフローサイトメトリーを使用)。CLR の細胞内 C 末端領域を欠失させると、細胞内移行後に再分布する (ライソゾーム集積を回避) ことを見出した。この現象は、細胞膜再分布の経路を阻害する 2 つの薬剤 (Monensin 25 μ M、Bafilomycin A1 200nM) の前処置により完全に抑制された。AM₁ 受容体をライソゾームに集積させる責任領域をより詳細に特定し、その責任領域をより効率的にブロックする手段の確立を試みた。

(5) 非網膜型 GRK が AM 非刺激下に AM₁ 受容体の細胞膜発現を抑制するメカニズムおよび -アレスチンが AM₁ 受容体の細胞内移行を抑制するメカニズムに関しては、多方面からアプローチを試みたが、研究期間内に全解明に至らなかった。現在も、引き続き精力的に検討を重ねている。

今後、AM の創薬に向けて、PKC を活性化できる他の GPCR が、各々のリガンド刺激後に AM₁ 受容体を細胞内移行させ、異種脱感作を惹起するのに関しても明らかにする必要がある。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 10 件)

(1) Kuwasako K, Kitamura K, Nagata S, Sekiguchi T, Danfeng J, Murakami M, Hattori Y, Kato J. β -arrestins negatively control human

adrenomedullin type 1-receptor internalization. *Biochem Biophys Res Commun* 2017; 487: 438-443. (査読有り)
DOI: 10.1016/j.bbrc.2017.04.083.

(2) Jiang D, Kawagoe Y, Kuwasako K, Kitamura K, Kato J. Inhibitory effects of losartan and azelnidipine on augmentation of blood pressure variability induced by angiotensin II in rats. *Eur J Pharmacol* 2017; 806: 91-95. (査読有り)
DOI: 10.1016/j.ejphar.2017.04.018.

(3) Kato J, Kawagoe Y, Jiang D, Kuwasako K, Shimamoto S, Igarashi K, Tokashiki M, Kitamura K. Plasma levels of natriuretic peptides and year-by-year blood pressure variability: a population-based study. *J Hum Hypertens* 2017; 31: 525-529. (査読有り)
DOI: 10.1038/jhh.2017.14.

(4) Sekiguchi T, Shiraishi A, Satake H, Kuwasako K, Takahashi H, Sato M, Urata M, Wada S, Endo M, Ikari T, Hattori A, Srivastav AK, Suzuki N. Calcitonin- typical suppression of osteoclastic activity and amphioxus calcitonin superfamily peptides and insights into the evolutionary conservation and diversity of their structures. *Gen Comp Endocrinol* 2017; 246: 294-300. (査読有り)
DOI: 10.1016/j.ygcen.2017.01.004.

(5) Kuwasako K, Sekiguchi T, Nagata S, Jiang D, Hayashi H, Murakami M, Hattori Y, Kitamura K, Kato J. Inhibitory effects of two G protein-coupled receptor kinases on the cell surface expression and signaling of the human adrenomedullin receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 2016; 470: 894-899. (査読有り)
DOI: 10.1016/j.bbrc.2016.01.138.

(6) Sekiguchi T, Kuwasako K, Ogasawara M, Takahashi H, Matsubara S, Osugi T, Muramatsu I, Sasayama Y, Suzuki N, Satake H. Evidence for conservation of the calcitonin superfamily and activity-regulating mechanisms in the basal chordate *Branchiostoma floridae*: insight into the molecular and functional evolution in chordates. *J Biol Chem* 2016; 291: 2345-2356. (査読有り)
DOI: 10.1074/jbc.M115.664003.

(7) Jiang D, Tokashiki M, Hayashi H, Kawagoe Y, Kuwasako K, Kitamura K, Kato J. Augmented blood pressure variability in hypertension induced by angiotensin II in rats. *Am J Hypertens* 2016; 29: 163-169. (査読有り)
DOI: 10.1093/ajh/hpv102.

(8) Ogawa N, Komura H, Kuwasako K, Kitamura K, Kato J. Plasma levels of natriuretic peptides and development of chronic kidney disease.

BBMC Nephrol 2015; 16: 171. (査読有り)
DOI: 10.1186/s12882-015-0163-9.

(9) Ogawa N, Komura H, Kuwasako K, Kitamura K, Kato J. Plasma levels of natriuretic peptides and development of chronic kidney disease. BBMC Nephrol 2015; 16: 171. (査読有り)
DOI: 10.1186/s12882-015-0163-9.

(10) Murakami M, Suzuki T, Wu TW, Kuwasako K, Takahashi E, Watanabe H, Murakami AM, Miyoshi I, Yanagisawa T, Sasano H, Ono K, Ohba T. Modified autonomic regulation in mice mutated in the $\beta 4$ subunit of the lh/lh calcium channel. Biochem Biophys Res Commun 2015; 461: 200-205. (査読有り)
DOI: 10.1016/j.bbrc.2015.03.112.

〔学会発表〕(計 23 件)

(1) 加藤文司、姜丹鳳、桑迫健二、渡嘉敷真理子、北村和雄：地元自治体健診における過去 24 年間の高血圧および心血管危険因子コントロール状況と高血圧対策の今後の課題。第 40 回日本高血圧学会総会、2017 年 10 月 20 日(松山) 10/20-10/22

(2) 桑迫健二、北村和雄、永田さやか、姜丹鳳、加藤文司。G 蛋白共役型受容体 (GPCR) を制御するシグナル分子、GPCR キナーゼと β -アレスチンの 1 型アドレノメデュリン (AM) 受容体の細胞内輸送機構における新規作用。第 40 回日本高血圧学会総会、2017 年 10 月 22 日(松山) 10/20-10/22

(3) 加藤文司、桑迫健二、北村和雄：地元自治体における 24 年間の健診結果の解析と今後の課題。第 6 回臨床高血圧フォーラム、2017 年 5 月 13 日(岡山) 5/13-5/14

(4) 桑迫健二、関口俊男、姜丹鳳、加藤文司、鈴木信雄、佐竹 炎：カルシトニン (CT) /CT 遺伝子関連ペプチド (CGRP) ファミリーの起源のペプチドと受容体の同定と機能解析。第 90 回日本薬理学会年会、2017 年 3 月 15 日(長崎) 3/15-3/17

(5) 加藤文司、川越由紀子、姜丹鳳、桑迫健二、渡嘉敷真理子、北村和雄：血中ナトリウム利尿ペプチド (ANP、BNP) レベルと長期血圧変動性の関連。第 21 回日本心血管内分泌代謝学会学術総会、2017 年 12 月 10 日(大阪) 12/8-12/10

(6) 姜丹鳳、渡嘉敷真理子、川越由紀子、桑迫健二、北村和雄、加藤文司：血圧変動性増大の動物モデルと病態薬理学的解析。第 53 回高血圧関連疾患モデル学会学術総会、2017 年 11 月 24 日(福岡) 11/24-11/26

(7) 小川敬之、小村浩史、桑迫健二、北村和

雄、加藤文司：ナトリウム利尿ペプチドの血漿濃度と慢性腎臓病 (CKD) 発症との関連について。第 5 回臨床高血圧フォーラム、2016 年 5 月 15 日(東京) 5/14-5/15

(8) 加藤文司、川越由紀子、姜丹鳳、桑迫健二、渡嘉敷真理子、北村和雄：一般住民におけるナトリウム利尿ペプチド (ANP、BNP) の血中レベルと長期血圧変動性の関連。第 39 回日本高血圧学会総会、2016 年 10 月 1 日(仙台) 9/30-10/2

(9) 姜丹鳳、川越由紀子、桑迫健二、北村和雄、加藤文司：アンジオテンシン II (Ang II) 持続投与による血圧変動性増大に対するジヒドロピリジン系カルシウム拮抗薬 (CCB) の効果。第 39 回日本高血圧学会総会、2016 年 9 月 30 日(仙台) 9/30-10/2

(10) 桑迫健二、北村和雄、永田さやか、加藤文司：G 蛋白共役型受容体 (GPCR) の重要なシグナル分子、 β -アレスチンの新規作用：1 型アドレノメデュリン受容体 (AM₁ 受容体) の細胞内移行の負の制御。第 88 回日本薬理学会年会、2016 年 3 月 20 日(名古屋) 3/18-3/20

(11) 桑迫健二、北村和雄、永田さやか、姜丹鳳、加藤文司：細胞内シグナル分子、 β -アレスチンの新規作用。第 69 回日本薬理学会西南部会、2016 年 11 月 26 日(愛媛) 11/26

(12) 河野清香、川越由紀子、桑迫健二、渡嘉敷真理子、北村和雄、加藤文司：一般住民におけるアドレノメデュリン (AM) の血中濃度の性差および体重増加との関連。第 113 回日本内科学会講演会、2016 年 4 月 16 日(東京) 4/15-4/17

(13) 桑迫健二、関口俊男、永田さやか、姜丹鳳、北村和雄、加藤文司、鈴木信雄、佐竹 炎：カルシトニン (CT) /CT 遺伝子関連ペプチド (CGRP) ファミリーの進化研究：その起源のペプチドと受容体の同定と機能解析。第 39 回日本高血圧学会総会、2016 年 9 月 30 日(仙台) 9/30-10/2

(14) Mariko Tokashiki, Kubo Keishi, Kenji Kuwasako, Sayaka Nagata, Johji Kato, Kazuo Kitamura. Biochemical properties of the N-terminally palmitoylated adrenomedullin. 2015 Council on Hypertension 2015 Scientific Sessions. 2015 年 5 月 23 日(Washington DC), Sept 16-19, 2015 Council on Hypertension 2015 Scientific Sessions

(15) 桑迫健二、北村和雄、永田さやか、姜丹鳳、林英孝、村上学、加藤文司：G 蛋白共役型受容体キナーゼ (GRK) によるアドレノメデュリン (AM) 受容体の細胞膜輸送の抑制

効果 . 第 66 回日本薬理学会北部会、2015 年 9 月 18 日 (富山)、9/18

(16) 村上 学、大場貴喜、柳澤輝行、桑迫健二、尾野恭一 : 電位依存性カルシウムチャネル サブユニットと自律神経 . 第 66 回日本薬理学会北部会、2015 年 9 月 18 日 (富山)、9/18

(17) 桑迫健二、北村和雄、永田さやか、姜丹鳳、林 英孝、渡嘉敷真理子、加藤丈司 : ヒト I 型アドレノメデュリン (AM) 受容体の AM 非刺激下の新規作用 : プロテインキナーゼ C (PKC) の活性化による細胞内移行の促進 . 第 38 回日本高血圧学会総会、2015 年 10 月 10 日 (松山)、10/9-10/11 《高得点演題及びリサーチアワード受賞》

(18) 姜 丹鳳、渡嘉敷真理子、林 英孝、川越由紀子、桑迫健二、北村和雄、加藤丈司 : アンジオテンシン II 持続投与高血圧ラットの血圧変動性増大 . 第 38 回日本高血圧学会総会、2015 年 10 月 9 日 (松山)、10/9-10/11

(19) 渡嘉敷真理子、久保恵是、桑迫健二、永田さやか、加藤丈司、北村和雄 : N 端パルミトイル化アドレノメデュリン誘導体の臨床応用に向けた有用性 . 第 38 回日本高血圧学会総会、2015 年 10 月 11 日 (松山)、10/9-10/11

(20) 桑迫健二、北村和雄、永田さやか、姜丹鳳、加藤丈司 : G 蛋白共役型受容体キナーゼ (GRK) の新規作用 . 第 68 回日本薬理学会西南部会、2015 年 11 月 21 日 (下関)、11/21

(21) 姜 丹鳳、渡嘉敷真理子、林 英孝、川越由紀子、桑迫健二、北村和雄、加藤丈司 : アンジオテンシン II 持続投与高血圧ラットの血圧変動性増大 . 第 19 回日本心血管内分泌代謝学会、2015 年 12 月 12 日 (神戸)、12/10-12/12

(22) 河野清香、川越由紀子、桑迫健二、島本怜史、五十嵐浩二、渡嘉敷真理子、北村和雄、加藤丈司 : 一般住民における血中アドレノメデュリン値の性差および体重増加との関連 . 第 19 回日本心血管内分泌代謝学会、2015 年 12 月 11 日 (神戸)、12/10-12/12

(23) 桑迫健二、北村和雄、永田さやか、姜丹鳳、林 英孝、加藤丈司 : G 蛋白共役型受容体キナーゼ (GRK) の新規作用 : 降圧系 1 型アドレノメデュリン受容体 (AM₁ 受容体) の細胞膜輸送の強力な抑制効果 . 第 19 回日本心血管内分泌代謝学会、2015 年 12 月 11 日 (神戸)、12/10-12/12

(1) 研究代表者

桑迫 健二 (KUWASAKO KENJI)
宮崎大学・フロンティア科学実験総合センター・准教授
研究者番号 : 20381098

(2) 研究分担者

北村 和雄 (KITAMURA KAZUO)
宮崎大学・医学部・教授
研究者番号 : 50204912

永田 さやか (NAGATA SAYAKA)
宮崎大学・医学部・助教
研究者番号 : 00452920

加藤 丈司 (KATO JOHJI)
宮崎大学・フロンティア科学実験総合センター・教授
研究者番号 : 20274780