

平成 21 年 5 月 1 日現在

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2006～2008

課題番号：18390236

研究課題名 (和文) アドレノメデュリンの展開医療

研究課題名 (英文) Translational Research on Adrenomedullin

研究代表者

北 俊弘 (KITA TOSHIHIRO)

宮崎大学・医学系研究科・助教

研究者番号：70315356

研究成果の概要：アドレノメデュリン (AM) は、ヒト褐色細胞腫 (副腎髄質の腫瘍) の組織中より発見された生理活性ペプチドである。これまでの研究により、AM は正常な様々なヒトの臓器や組織で産生されており、心血管保護作用やその他の多彩な臓器保護作用を発揮することが判明した。本研究では、AM の好ましい作用を疾患の治療に応用すべく、基礎研究から臨床研究まで幅広く展開した。その結果、治療薬としての有用性が明確になり、一方で、AM の疾患における新たな役割や疾患治療薬としての新たな可能性も明らかになった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	5,300,000	1,590,000	6,890,000
2007 年度	5,000,000	1,500,000	6,500,000
2008 年度	5,000,000	1,500,000	6,500,000
年度			
年度			
総計	15,300,000	4,590,000	19,890,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・血管病態学

キーワード：アドレノメデュリン、PAMP、臓器保護作用、臨床治療学的応用、展開医療

## 1. 研究開始当初の背景

アドレノメデュリン (AM) は、1993 年に本研究代表者および分担者らにより、ヒト褐色細胞腫組織中より単離・同定された生理活性ペプチドである。AM 遺伝子発現は、褐色細胞腫のみでなく、ヒト正常副腎髄質、肺、血管壁、心房、心室、腎臓、脳、等の種々の臓器や組織で認められる。遺伝子発現に一致して、蛋白 (ペプチド) レベルでも、これらの臓器や組織において、かなりの濃度で存在している。短期的長期的投与実験や遺伝子改変動物の解析により、AM は種々の臓器や組織に作用して、心血管保護作用を含め多彩な

作用を発揮することが明らかにされた。レニン・アンジオテンシン系の解明ならびにナトリウム利尿ペプチドやエンドセリンの発見により、新たな循環器疾患の治療薬が開発され臨床応用されてきた。単離・同定から 12 年が経過し、AM により発揮される作用のみならず、種々の疾患における病態生理学的役割も解明された。さらに研究代表者らは、AM が循環器疾患の治療に有用である可能性を明らかにした。治療応用が可能と予測される疾患にターゲットを絞り、展開医療を推進することより、新たな治療手段が提供される。また、最近の研究により、AM の新たな作用

も明らかにでき、治療応用の可能性を検証するための基礎研究も求められている。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、我々が明確にしてきた AM の特徴的な作用を、疾患治療に臨床応用すべく展開医療（探索研究）を行なうことである。治療ターゲットとなりうる疾患の条件として、1) 現在、満足できる治療・進行防止手段がなく、新たな治療方法の開発が強く求められていること、2) AM の特徴的作用が治療上極めて有用と判断されること、があげられる。この2つの条件を考慮し、本研究では、急性心筋梗塞、脳梗塞、糸球体腎炎、腹部大動脈瘤、関節リウマチ、炎症性腸疾患を主な対象とした。これらの疾患には、臨床試験が開始可能なレベルにあるものから、疾患モデル動物を用いた基礎的検討を要するものまでである。それぞれのレベルに応じた研究を展開し、医師主導型治験を可能とすべく、基盤的研究を推進した。

## 3. 研究の方法

### (1) 基礎研究

AM の臨床治療学的応用のための研究展開を目指して、主に疾患モデル動物への AM 投与と作用機序解明のための実験を実施した。また、AM と同一の前駆体から産生される proadrenomedullin N-terminal 20 peptide (PAMP) の併用効果についても検討した。用いた疾患モデルは、急性心筋梗塞、高血圧自然発症ラット (SHR)、抗糸球体基底膜抗体糸球体腎炎、関節リウマチ、大腸潰瘍である。AM の投与方法としては、腹腔内、関節内、注腸など、疾患モデルの病態や治療応用の可能性を考慮した手段を利用した。治療効果判定のための評価項目は、それぞれの疾患に応じて決定した（詳細については「研究成果」の項に後述）。

### (2) 臨床研究

AM による臨床治療学的応用の標的疾患や副作用の有無の検索を考慮しつつ研究を進めた。対象とした疾患患者は、陈旧性脳梗塞、片頭痛、原発性アルドステロン症であった。化学合成 AM を、15~80 ng/kg/min にて静脈内に 20 分間~27 時間持続静注した。コントロール群には生食を投与した。AM 投与の有用性や反応性を評価するための測定項目については、「研究成果」の項に後述した。また、内因性 AM の高血圧発症抑制機能を評価するために、検診を受診した地元住民を対象に、血中 AM 濃度を測定して、高血圧発症に関する追跡調査を実施した。

## 4. 研究成果

### (1) 基礎研究

#### ① 心筋梗塞ラットにおけるアンジオテンシン受容体拮抗薬 (ARB) と AM の併用効果

研究代表者らは、心筋梗塞ラットの急性期に AM を投与すると、慢性期の心筋リモデリングが抑制されて、心機能低下が抑制されることを報告した。本研究では、梗塞後リモデリング抑制の有用性が実証されている ARB に AM を併用することにより、より有効なリモデリング抑制効果が得られるかを検討した。ラット心筋梗塞モデルの急性期より、AM を腹腔内に 1 週間、ARB カンデサルタンを経口にて 9 週間、それぞれ投与した。急性期の AM 併用により、ARB 単独投与に比較して、非梗塞左室心筋の線維化をさらに抑制され、血中 ANP 濃度も低下し、左室収縮能と拡張能は改善傾向を示した。すなわち、急性心筋梗塞後リモデリング抑制を目的とした、AM の併用治療薬としての有用性が示唆された。

#### ② AM と proadrenomedullin N-terminal 20 peptide (PAMP) の併用効果

降圧ペプチド AM と PAMP が同一の前駆体から産生される意義を明確にするために、高血圧ラット (SHR) に、AM と PAMP を単独または併用投与して降圧効果を観察した。15 週齢の SHR に、AM または PAMP を単独または併用にて 4 週間皮下投与し、血圧と心拍数を無麻酔無拘束下に持続的にモニターした。AM と PAMP の併用投与により、単独投与と比較して、昼間と夜間ともに、さらなる降圧作用が観察された。以上より、同一の前駆体から産生される異なった 2 種類のペプチドが血圧の上昇に拮抗すべく、協調して機能している可能性が示唆された。すなわち、AM のみでなく PAMP の降圧作用の臨床応用の可能性が示唆された。

#### ③ 糸球体腎炎モデルを用いた AM の病態生理学的役割

AM は腎保護作用を発揮する可能性が指摘されている。そこで、糸球体腎炎モデルを作成して、メチルプレドニゾロン (MP) 治療を行った際の AM の病態生理学的役割を検討した。抗糸球体基底膜抗体糸球体腎炎ラットにおいて、MP は腎炎の進行を抑制した。MP は、培養メサンギウム細胞 (MC) における AM 産生を増加し、AM は MC の増殖を抑制し、アポトーシスを増加させた。MP を投与した腎炎ラットの糸球体では、AM の発現が増加しており、培養細胞実験の結果も考慮すると、MP の抗腎炎効果の一部に AM による腎炎抑制効果が関与している可能性が示唆された。

#### ④ 関節リウマチの動物モデルにおける AM の効果

AMの抗炎症効果が報告されていることより、関節リウマチの動物モデルに対するAMの治療効果を検討した。卵白アルブミンを用いたウサギ両膝の抗原惹起型関節炎モデルに、AM (1 ng/day~3 µg/day) を連日、膝関節内投与した。生理食塩水を投与した対照側と比較して、1 µg/day以上のAM投与により、膝関節腫脹は軽減し、組織学的評価では、炎症細胞浸潤と浮腫性の変化が抑制された。また、AMは膝蓋下脂肪体滑膜におけるTNF-α遺伝子発現を抑制したが、逆にIL-6遺伝子発現が増加していた。AMは関節リウマチの治療薬として有用である可能性が判明したが、IL-6産生を促進させる点についての検討が必要と考えられた。

#### ⑤ 大腸潰瘍の動物モデルにおけるAMの効果

炎症性腸疾患に対するAMの影響を明らかにする目的で、ラット酢酸誘発大腸潰瘍モデルに対してAMの注腸投与を行い、大腸潰瘍に対するAMの影響を検討した。AM注腸は、対照(生食注腸)群と比較して、濃度依存性に潰瘍面積を縮小させた。AM投与により、組織学的に、潰瘍辺縁の浮腫と炎症細胞浸潤が軽減し、潰瘍部組織重量が減少した。また、AM投与群では、対照群と比較して、大腸組織内IL-6含量が有意に低値であった。すなわち、AM注腸投与は、酢酸誘発大腸潰瘍の重症度を改善し、潰瘍改善効果にはTh2系サイトカインが関与している可能性が示唆された。炎症性腸疾患の治療薬としてのAMの可能性を示唆する結果と考えられた。

#### ⑥ 腹部大動脈瘤(AAA)におけるAMの病態生理学的役割

AMは血管壁で産生され、血管内皮機能改善および血管平滑筋細胞や外膜線維芽細胞の増殖抑制により、血管リモデリングを抑制すると考えられている。腹部大動脈瘤(AAA)発症進展におけるAMの病態生理学的役割を解明するために、手術時に得られたAAA組織におけるAMの発現を、免疫組織学的に検索した。また、細胞培養実験では、肥満細胞株とAAA組織より得られた線維芽細胞を用いて、線維化の指標として、コラゲナーゼ感受性プロリン取り込みを測定した。AAA組織中の肥満細胞にAM免疫活性が観察され、AAA組織では、肥満細胞の数が増加していた。培養実験では、肥満細胞からのAMの産生と分泌が観察され、線維芽細胞との共培養下において、AMはコラゲナーゼ感受性プロリン取り込みを抑制した。以上より、AAA組織中の肥満細胞により産生されたAMが、線維化を抑制する可能性が判明した。

## (2) 臨床研究

### ① 陳旧性脳梗塞患者における作用

ヒトに対する短時間のAM投与が血行動態、各種液性因子に与える影響は解明されてきているが、AM長時間投与の報告はほとんどみられない。臨床応用に際し、AM長時間投与の影響を検討することは必須である。本研究では、微小梗塞ないしラクナ梗塞を有する男性9名(65.2±2.5歳)を対象に、AM長時間投与を行い、脳血流、代謝を含む血行動態の変化を検討した。化学合成ヒトアドレノメデュリン(hAM)を、27時間15 ng/kg/minにて持続点滴静注した。AM投与により、血圧は低下し動脈コンプライアンスも改善した。脳血流は極軽度ではあるが低下し脳代謝も皮質領域では低下したが、基底核など深部領域の脳代謝は僅かながら有意に上昇した。血圧低下にもかかわらず、脳血流への影響は軽微であり、陳旧性脳梗塞患者へのAM投与の安全性が確認された。

### ② AMと片頭痛との関連の解析

AMとカルシトニン遺伝子関連ペプチド(CGRP)は、同一のペプチドファミリーに属し、CGPRは片頭痛の原因物質であると想定されている。AMが同様の病態を引き起こすか否かは、AMの臨床応用研究を展開するうえでの重要なポイントである。そこで、片頭痛の患者に、0.08 µg/kg/min AMまたは生食を20分間クロスオーバー法にて投与し、症状、Xe-CTスキャンにより脳血流量、超音波ドプラー法により中大脳動脈と末梢動脈の血流量を観察した。生食投与と比較して、AM投与により、末梢動脈の拡張は生じたが、片頭痛の増悪はなく、脳血流量や中大脳動脈血流に変化はなかった。すなわち、静脈内のAM投与は、片頭痛の原因とはならないことが証明された。

### ③ 原発性アルドステロン症患者における作用

アルドステロン分泌に対するAMの作用をより詳細に検討するために、血中アルドステロン濃度正常者(コントロール群)と原発性アルドステロン症患者(PA群)に対し、AMを27時間持続投与し、その反応性を比較検討した。コントロール群7名とPA群5名に対し、化学合成AM(2.5 pmol/kg/min)を27時間持続静注し、血圧や脈拍数などの血行動態をモニターした。コントロール群とPA群ともにAM投与で血圧が有意に低下した。AM投与によりPA群すべての症例で3時間後より血中アルドステロン濃度の抑制がみられ、27時間後に最大に達した。血中アルドステロン濃度は、AM投与中止15時間後にはほぼ基礎値に復帰した。PAにおいて血中

AM 濃度が有意に上昇していることと併せて考えると、AM は PA の病態の中で、アルドステロンに対抗する調整因子である可能性が示唆され、同時に、ヒトにおいてもアルドステロン分必抑制作用を発揮することが実証された。

④ 高血圧の発症における AM の役割

AM やナトリウム利尿ペプチド (ANP および BNP) は、血管拡張作用や利尿作用を有し、血圧上昇に対して抑制的に機能していると考えられている。高血圧患者では、これらの血中濃度が上昇しているが、血中濃度上昇が血圧上昇に先行して認められるか否かは明らかではない。本研究では、検診を受診した住民を対象に、AM、ANP および BNP の血中濃度と高血圧発症との関連を解析した。降圧薬服用者を除く正常血圧の住民 220 名を対象に、血中 AM、ANP および BNP 濃度を測定して、3 年間の追跡調査を行なった。血漿 AM、ANP および BNP 濃度の中央値を基準に、3 年間の追跡調査の結果、高 AM 群からの高血圧発症 (27.8%) は、低 AM 群 (11.5%) より有意に高頻度であった。一方、高血圧発症頻度に関して、低 ANP 群と高 ANP 群および低 BNP 群と高 BNP 群の 2 群間では、明らかな差は観察されなかった。すなわち、AM が高血圧発症に対して抑制的に機能しており、内因性 AM の機能を増強させる手段が、高血圧に対する治療応用につながる可能性を示唆している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 16 件) 全て査読有り

- ① Petersen KA, Birk S, Kitamura K, Olesen J: Effect of adrenomedullin on the cerebral circulation: relevance to primary headache disorders. *Cephalalgia* 2009; 29: 23-30
- ② Baba A, Fujimoto S, Kikuchi M, Kita T, Kitamura K: Effects of uroguanylin on natriuresis in experimental nephrotic rats. *Nephrology* 2009; 14: 80-85
- ③ Ferrario CM, Varagic J, Habibi J, Nagata S, Kato J, Chappell MC, Trask AJ, Kitamura K, Whaley-Connell A, Sowers JR: Differential regulation of angiotensin-(1-12) in plasma and cardiac tissue in response to bilateral nephrectomy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2009; 296: H1184-H1192
- ④ Nomura I, Kato J, Kitamura K: Association between body mass index and chronic kidney disease: A population-based, cross-sectional study of a Japanese community. *Vasc Health Risk Manag* 2009; 5: 315-320
- ⑤ Okura T, Marutsuka K, Hamada H, Sekimoto T, Fukushima T, Asada Y, Kitamura K, Chosa E: Therapeutic efficacy of intra-articular adrenomedullin injection in antigen-induced arthritis in rabbits. *Arthritis Res Ther* 2008; 10: R133
- ⑥ Kuwasako K, Kitamura K, Nagata S, Kato J: Functions of the extracellular histidine residues of receptor activity-modifying proteins vary within adrenomedullin receptors. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 377: 109-113
- ⑦ Tsuruda T, Kato J, Hatakeyama K, Kojima K, Yano M, Yano Y, Nakamura K, Nakamura-Uchiyama F, Matsushima Y, Imamura T, Onitsuka T, Asada Y, Nawa Y, Eto T, Kitamura K: Adventitial mast cells contribute to pathogenesis in the progression of abdominal aortic aneurysm. *Circ Res* 2008; 102: 1368-1377
- ⑧ Hashimoto H, Kitamura K, Kawasaki M, Saito T, Suzuki H, Otsubo H, Ohbuchi T, Yokoyama T, Fujihara H, Takei Y, Ueta Y: Adrenomedullin 2/intermedin-like immunoreactivity in the hypothalamus and brainstem of rats. *Auton Neurosci* 2008; 139: 46-54
- ⑨ Jessup JA, Trask AJ, Chappell MC, Nagata S, Kato J, Kitamura K, Ferrario CM: Localization of the novel angiotensin peptide, angiotensin-(1-12), in heart and kidney of hypertensive and normotensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2008; 294: H2614-H2618
- ⑩ Tsuruda T, Kato J, Sumi T, Mishima K, Masuyama H, Nakao H, Imamura T, Eto T, Kitamura K: Combined use of brain natriuretic peptide and C-reactive protein for predicting cardiovascular risk in outpatients with type 2 diabetes mellitus. *Vasc Health Risk Manag* 2007; 3: 417-423
- ⑪ Tsuruda T, Kato J, Hatakeyama K, Yamashita A, Nakamura K, Imamura T, Kitamura K, Onitsuka T, Asada Y, Eto T: Adrenomedullin in mast cells of abdominal aortic aneurysm. *Cardiovasc Res* 2006; 70: 158-164
- ⑫ Kato J, Kitamura K, Eto T: Plasma adrenomedullin level and development of hypertension. *J Hum Hypertens* 2006; 20: 566-570

- ⑬ Kuwasako K, Cao YN, Chu CP, Iwatsubo S, Eto T, Kitamura K: Functions of the cytoplasmic tails of the human receptor activity-modifying protein components of calcitonin gene-related peptide and adrenomedullin receptors. *J Biol Chem* 2006; 281: 7205-7213
- ⑭ Iwatsubo S, Fujimoto S, Matsumoto M, Sato Y, Hara S, Kitamura K, Eto T: Increased production of adrenomedullin in glomeruli from anti-glomerular basement membrane glomerulonephritis rats treated with methylprednisolone. *Nephron Exp Nephrol* 2006; 104: e41-47
- ⑮ Nagata S, Kato J, Sasaki K, Minamino N, Eto T, Kitamura K: Isolation and identification of proangiotensin-12, a possible component of the renin-angiotensin system. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 350: 1026-1031
- ⑯ Masuyama H, Tsuruda T, Kato J, Imamura T, Asada Y, Stasch JP, Kitamura K, Eto T: Soluble guanylate cyclase stimulation on cardiovascular remodeling in angiotensin II-induced hypertensive rats. *Hypertension* 2006; 48: 972-978

〔産業財産権〕

○出願状況（計 3 件）

発明の名称：「非細菌性の炎症性疾患の予防又は治療剤」

発明者：北村和雄、稲津東彦、加藤丈司、石川直人、山家純一、江藤胤尚、芦塚伸也

出願人：国立大学法人宮崎大学

出願番号：特願 2005-111889

出願日：平成 18 年 4 月 8 日

発明の名称「昇圧作用を有する新規ポリペプチド」

発明者：北村和雄、加藤丈司、永田さやか

出願人：国立大学法人宮崎大学

出願番号：特願 2006-181709

出願日：平成 18 年 6 月 30 日

発明の名称「動脈瘤の予防及び/又は治療薬」  
発明者：鶴田敏博、北村和雄、加藤丈司、畠山金太

出願人：国立大学法人宮崎大学、キッセイ薬品工業株式会社

出願番号：特願 2006-193689

出願日：平成 18 年 7 月 14 日

6. 研究組織

(1)研究代表者

北 俊弘 (KITA TOSHIHIRO)

宮崎大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：70315356

(2)研究分担者

加藤 丈司 (KATO JOHJI)

宮崎大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：20274780

北村 和雄 (KITAMURA KAZUO)

宮崎大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：50204912