

機関番号：13601

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790713

研究課題名 (和文)

アドレノメデュリン受容体制御系の病態生理学的意義の解明と、治療標的としての展開

研究課題名 (英文)

Pathophysiological roles of adrenomedullin' s receptor system and its potential as a therapeutic target

研究代表者

新藤 優佳 (SHINDO YUKA)

信州大学・医学系研究科・研究員

研究者番号：50507506

研究成果の概要 (和文)：

アドレノメデュリン (AM) は、多彩な生理活性を有するペプチドであり、循環器疾患との関連性も示唆されている。本研究では、G タンパク共役型受容体の調節因子である RAMP2 のノックアウトマウスの樹立、解析から、RAMP2 が AM の血管機能を規定している事を示した。

本研究では、血管の RAMP2 の意義を直接明らかとするために、血管内皮細胞特異的 RAMP2 ノックアウトマウス (E-RAMP2<sup>-/-</sup>) を樹立した。E-RAMP2<sup>-/-</sup> のほとんどは胎生後期に致死であり、血管の脆弱性による全身性浮腫を認めた。一方で、血管の RAMP2 発現が 2 割程度残存する一部の E-RAMP2<sup>-/-</sup> は、成体が得られた。成体の E-RAMP2<sup>-/-</sup> では、加齢と共に全身の臓器の血管炎、酸化ストレスレベルの亢進と臓器内の線維化が認められた。

以上から、RAMP2 は、AM の血管における機能規定因子であり、発生段階における血管新生に加えて、成体における AM の血管、臓器保護作用において重要であることが明らかとなった。

研究成果の概要 (英文)：

Adrenomedullin (AM) is a pleiotropic peptide involved in both the pathogenesis of cardiovascular diseases and circulatory homeostasis. In the present study, we generated and analyzed knockout mice of RAMP2, a small membrane protein and a modulator of G-protein coupled receptor (GPCR), and showed that it is the key determinant of the vascular functions of AM.

To analyze the roles of vascular RAMP2 directly, we generated vascular endothelial cell-specific RAMP2 knockout mice (E-RAMP2<sup>-/-</sup>). Most E-RAMP2<sup>-/-</sup> were lethal at later-gestation with systemic edema and vascular fragility. Contrary, small number of the E-RAMP2<sup>-/-</sup> can survive. In the survived E-RAMP2<sup>-/-</sup>, the RAMP2 expression in endothelial cells was kept at 20% of wild-type littermates. In adult E-RAMP2<sup>-/-</sup>, spontaneous occurrence of vasculitis lesions was detected throughout the body with aging. Furthermore, E-RAMP2<sup>-/-</sup> showed severe organ fibrosis with the enhancement of oxidative stress.

These results show that RAMP2 is the key determinant of the vascular functions of AM; RAMP2 is essential for the vaso- and organ-protective effects of AM in adult as well as for the angiogenesis during development.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：分子血管病態学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：アドレノメデュリン、RAMP、血管、血管新生、血管内皮細胞

## 1. 研究開始当初の背景

アドレノメデュリン(AM)は、心血管系をはじめ、全身の組織で広範に産生される 52 個のアミノ酸からなるペプチドである。AM は強力な血管拡張作用を有する降圧物質として発見されたが、それ以外にも多彩な生理活性を有することが明らかとなってきた。AM と、生活習慣病を中心とした多くの病態との関連も示唆されている。

我々はこれまで AM とその関連因子の遺伝子操作動物の解析などから、これらの病態生理学的意義を検討してきた。AM ヘテロノックアウトマウス (AM<sup>+/-</sup>) では、血圧上昇や、心血管系に傷害が加わった際、動脈硬化や臓器障害の増悪が認められるのに対し、AM 過剰発現マウスは逆に抵抗性を示すことから、AM が抗動脈硬化作用、臓器保護作用を有することを報告した。一方、AM ノックアウトマウスのホモ接合体 (AM<sup>-/-</sup>) は血管の発達が未熟であり、胎生中期にびまん性出血や浮腫が原因で致死であることから、AM が血管新生そのものに必須であることを初めて明らかとした。更に成体に AM を投与したときにも血管新生促進効果が確認されることから、AM の虚血性疾患などへの治療応用も期待される。

一方、AM の受容体システムについては、巧妙な制御系が報告されている。AM とそのファミリー因子であるカルシトニン遺伝子関連ペプチド (CGRP) は、同一の G タンパク共役型受容体 (GPCR) である CRLR (calcitonin receptor like receptor) を共用している。CRLR は、受容体活性調節タンパク RAMP (receptor activity modifying protein) 1、2、3 のいずれかと重合する事により、リガンドである AM や CGRP などの AM ファミリー因子との親和性が制御されており、こうした受容体システムの巧妙さが、AM の生理機能の多様性を生み出していると予想される。

## 2. 研究の目的

本研究は、血管における AM-RAMP 系の病態生理学的意義とそのメカニズムを明らかとすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

AM ノックアウトマウスが致死となる胎生中期の血管において、複数の RAMP サブアイソフォームの中でも、特に RAMP2 の発現が亢進している事に着目し、血管に

おける AM の機能が主として RAMP2 によって制御されている可能性を考え RAMP2 単独ノックアウトマウスを樹立した。

次に、AM-RAMP2 系の血管における直接の作用を明らかとするため、RAMP2<sup>flox</sup> マウスを、VE-カドヘリン Cre トランスジェニックマウスと交配することにより、血管内皮細胞特異的 RAMP2 ノックアウトマウス (E-RAMP2<sup>-/-</sup>) を樹立した。

## 4. 研究成果

RAMP2 ホモノックアウトマウス (RAMP2<sup>-/-</sup>) は、AM<sup>-/-</sup> 同様、胎生中期に致死であり、AM<sup>-/-</sup> と同様の血管の発達不全と共に、著明な浮腫や出血、心嚢水貯留が認められた。RAMP2<sup>-/-</sup> では、卵膜上を走る卵黄動脈の発達が抑制されており、電顕による観察では、卵黄動脈の血管内皮細胞の基底膜からの剥離が認められた。また、大動脈では、血管壁の 4 型コラーゲン及びアクチンの発現低下が認められ、血管壁の菲薄化と、層状構造の破綻が観察された。以上の所見から、RAMP2<sup>-/-</sup> では、血管構成細胞は正常に分化するが、脆弱な血管構造のため、循環開始と共に浮腫や出血を生じることが示唆された。

次に、遺伝子発現の変化を検討したところ、RAMP2<sup>-/-</sup> では、胎児の血管における 4 型コラーゲンなどの基底膜構成因子、VE-カドヘリンやクロロディン 5 など、血管内皮細胞のアドヘレンスジャンクション、タイトジャンクションを構成する因子の低下が認められた。更に、RAMP2<sup>-/-</sup> においては、代償性の AM の発現亢進を認めたが、CRLR や、その他の RAMP 発現に変化を認めず、RAMP2 欠損により、血管の発生における機能的 AM 受容体が失われること、その他の RAMP サブアイソフォームの間には機能的な相補性がなく、血管の正常な発生には、AM-RAMP2 系が必須であることが初めて明らかとなった。

一方、E-RAMP2<sup>-/-</sup> は、RAMP2<sup>-/-</sup> と比較して発生段階が進むものの、その 95% は出生直前に致死であり、胎生 18.5-19.5 日にかけて全身性の浮腫を認めた (図 1)。これらの結果から、RAMP2<sup>-/-</sup> で認められた発生の異常は、血管の発達異常が主因である

ことが明らかとなった。

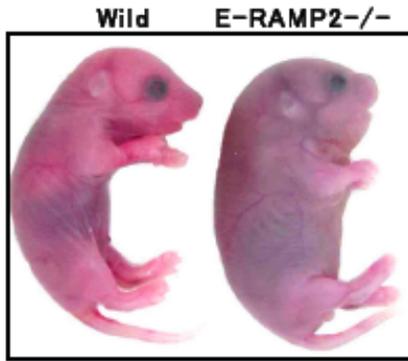


図1 血管内皮細胞特異的 RAMP2<sup>-/-</sup>胎児における全身性浮腫

一方で、5%の E-RAMP2<sup>-/-</sup>は、正常に生まれ、成体が得られた。成体の E-RAMP2<sup>-/-</sup>では、血管内皮細胞の RAMP2 発現は、野生型の 2 割程度残存していた。E-RAMP2<sup>-/-</sup>では、肺、肝臓、腎臓などの主要な臓器の血管周囲に炎症細胞浸潤を認め(図 2A)、血管を中心とした組織線維化の進展が認められた。特に、肝臓においては、肝細胞自体は正常に保たれているものの、脈管系を中心とした線維化が著明であり、マクロ上、肝硬変に類似した変化が著明に現れた。腎臓においても、強い臓器傷害(糸球体硬化症、嚢胞の形成、水腎症など)の自然発症が認められた(図 2B)。

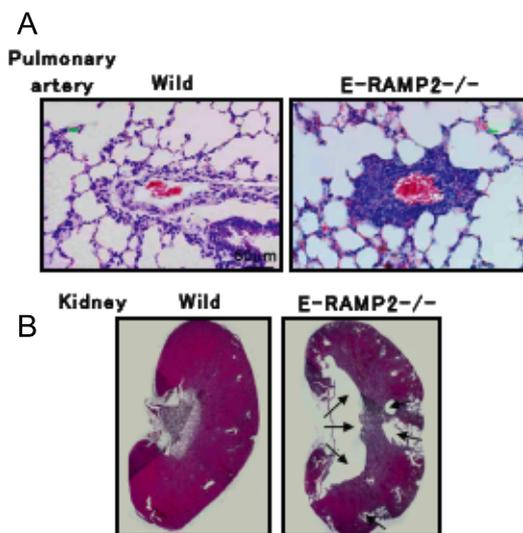


図2 血管内皮細胞特異的 RAMP2<sup>-/-</sup>成体における血管炎、腎障害所見

電顕像からは、病変は糸球体内皮細胞に留まらず、足突起の融合などの糸球体上皮側にも及んでいることが確認された。これらの個体では、肝・腎・心などにおいて、組織酸化ストレスレベルの亢進と NADPH オキシダーゼの活性亢進が認められた。

血管の発生においては、胎生中期～後期にかけて、本格的な循環開始を前に、血管の構造が成熟し、構造安定化する必要がある。AM-RAMP2 系は、このステージの血管構造安定化に重要であり、E-RAMP2<sup>-/-</sup>では、このプロセスに障害により血管構造が脆弱化しており、殆どのものは最終的に循環破綻し、致死になるものと考えられた。一方で、ゲノム欠損率の低い個体では、この Critical period を乗り越え、成体まで成長するが、加齢と共に、血管内皮細胞の機能異常が顕在化し、血管周囲への炎症細胞浸潤、組織酸化ストレスレベルの亢進、線維化が進展し、その他の細胞の傷害も加わり、臓器不全に至るものと推測された。以上の結果は、発生段階のみならず、成体においても、AM による血管保護作用、臓器保護作用が RAMP2 によって制御されていることを示すものであり、RAMP2 が新たな治療標的分子として期待される結果である。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

1. Iinuma N, Sakurai T, Kamiyoshi A, Shindo Y, Arai T, Yoshizawa T, Koyama T, Uetake R, Kawate H, Muto S, Tagawa Y, Miyagawa S, Shindo T.

Adrenomedullin in sinusoidal endothelial cells play protective roles against cold injury of liver.

Peptides. 31:865-71. 2010 (査読有)

2. Kamiyoshi A, Sakurai T, Shindo Y, Iinuma N, Kawate H, Yoshizawa T, Koyama T, Muto S, Shindo T.

Endogenous  $\alpha$ -CGRP mitigates liver fibrosis in chronic hepatitis induced by repeated administration of

concanavalin A.

Liver International. 29 (5) 642-9. 2009  
(査読有)

3. Shindo Y, Sakurai T, Kamiyoshi A,  
Koyama T, Yoshizawa T, Shindo T  
Regulation of angiogenesis and vascular  
integrity by adrenomedullin-RAMP2  
system.  
血管. 32 (2):33-6. 2009 (査読有)

[学会発表] (計 2 件)

1. アドレノメデュリン-RAMP2 システム  
による血管新生、血管恒常性維持機構  
第 38 回日本心脈管作動物質学会、岡山、  
2009 年 2 月 Young Investigator Award  
受賞 新藤優佳

2. アドレノメデュリン-RAMP2 システム  
は、血管新生、血管構造安定化、血管恒  
常性維持に必須である  
第 82 回日本内分泌学会、群馬、2009 年 4  
月 Young Investigator Award 受賞  
新藤優佳

[その他]  
ホームページ等

<http://www7a.biglobe.ne.jp/~shindo/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

新藤 優佳 (SHINDO YUKA)  
信州大学・医学系研究科・研究員  
研究者番号：50507506