

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460330

研究課題名(和文) 脂肪細胞におけるAM-RAMP2系の病態生理学的意義の解明と治療標的への展開

研究課題名(英文) Pathophysiological roles of AM-RAMP2 system in adipose tissues

## 研究代表者

神吉 昭子 (KAMIYOSHI, Akiko)

信州大学・学術研究院医学系・助教

研究者番号：10397309

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：アドレノメデュリン(AM)は血管拡張作用をはじめ多彩な生理作用を有するペプチドであり、AMとその受容体活性調節タンパクであるRAMP2は脂肪細胞でも高発現が認められる。本研究では、脂肪細胞でのAM-RAMP2システムの役割に着目し、脂肪細胞特異的なRAMP2ノックアウトマウスを作成し、白色脂肪組織と褐色脂肪組織における脂質代謝およびエネルギー代謝調節機構の解析を行った。白色脂肪細胞、褐色脂肪細胞ともに、AM-RAMP2システムが脂肪細胞の分化およびエネルギー代謝制御に関与することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Adrenomedullin(AM) is a vasodilatory peptide, which possess various bioactivities. AM and receptor activity-modifying protein 2 (RAMP2) are highly expresses in adipose tissues. In this study, to clarify the pathophysiological roles of AM-RAMP2 system in adipose tissues, we analyzed adipocyte-specific RAMP2 knockout mice. We showed that AM-RAMP2 system regulates energy metabolism and adipocyte differentiation between white adipose tissue and brown adipose tissue.

研究分野：代謝学

キーワード：生理活性物質 脂肪細胞

1. 研究開始当初の背景

(1) アドレノメデュリン (AM) は、ヒト褐色細胞腫から分離された血管拡張性ペプチドである。AM は血管、心臓、腎臓など様々な臓器で産生・分泌され、血管拡張作用に加えて、抗酸化作用、抗炎症作用、臓器保護作用など多彩な生理活性を有する内因性ペプチドである。また、ヒトの血中 AM 濃度は肥満に伴い上昇し、BMI (body mass index) に相関することも報告されており、AM はメタボリックシンドロームの病態発症に重要な役割を持つと考えられる。

(2) AM 受容体は G タンパク共役型受容体である CLR (calcitonin receptor-like receptor) という 7 回膜貫通型受容体と、受容体活性調節タンパクである RAMP (receptor activity-modifying protein) という 1 回膜貫通型タンパクが結合し、受容体として機能する。RAMP には 1、2、3 の 3 種類のサブアイソフォームがあり、CLR が RAMP2 または RAMP3 と結合することにより AM 受容体として機能する。

脂肪細胞では、白色脂肪組織において AM とその受容体が発現し、AM の脂肪細胞の機能制御への関与も報告されていることから、脂肪細胞における AM の作用が生体の恒常性維持に重要であると考えられる。

(3) 我々はこれまでに、AM と AM の受容体活性調節タンパクである RAMP2 のノックアウトマウスを樹立し、AM ホモノックアウトマウス (AM<sup>-/-</sup>) と RAMP2 ホモノックアウトマウス (RAMP2<sup>-/-</sup>) は血管形成異常や浮腫が認められ、共に胎生致死となることを明らかにした。このことから、AM の血管における機能が RAMP2 によって規定され、AM-RAMP2 システムの心血管系における病態生理学的な重要性を明らかにし、さらに AM の肝臓や腎臓での臓器保護作用も報告している。一方、AM と RAMP2 は脂肪細胞でも高発現が認められるが、脂肪細胞における AM-RAMP2 システムの役割や、メタボリックシンドローム発症における病態生理学的意義は不明な点が多い。

2. 研究の目的

我々はこれまでに、RAMP2 ヘテロノックアウトマウス (RAMP2<sup>+/-</sup>) に高脂肪食負荷を行うと、野生型マウスと比較して、体重増加と脂肪肝の増悪、インスリン抵抗性亢進を示すことから、AM が代謝制御にも関与していることを報告してきた。本研究では、脂肪細胞での AM-RAMP2 システムに着目し、脂肪細胞特異的な RAMP2 遺伝子ノックアウトマウスを作成し、白色脂肪組織と褐色脂肪組織における AM-RAMP2 システムによる脂質代謝およびエネルギー代謝調節機構を検討した。

3. 研究の方法

脂肪細胞特異的に Cre リコンビナーゼを発現する aP2Cre トランスジェニックマウスと RAMP2<sup>flxed</sup> マウスを交配して作成した、脂肪細胞特異的 RAMP2 ノックアウトマウス (A-RAMP2<sup>-/-</sup>) を使用した。

普通食投与下において、オキシマックス等流量システムにより明期、暗期の呼吸代謝測定を行った。また、白色脂肪組織 (精巣上体脂肪組織、皮下脂肪組織) の病理解析 (HE 染色、マッソントリクローム染色、F4/80 染色) を行った。さらに、リアルタイム PCR により白色脂肪組織 (精巣上体脂肪組織) と褐色脂肪組織 (肩甲骨間脂肪組織) の遺伝子発現解析 (炎症性サイトカイン、マクロファージマーカー、脂肪酸代謝関連遺伝子、ミトコンドリア関連遺伝子) を行った。

4. 研究成果

A-RAMP2<sup>-/-</sup> マウスは、普通食投与下において、5 週齢の若年期より野生型マウス (WT) と比較して体重が有意に増加し、各白色脂肪組織重量の増加も認められた。A-RAMP2<sup>-/-</sup> は、白色脂肪組織において RAMP2 遺伝子が野生型マウスの約 30% に低下していることが確認された。一方、AM 遺伝子発現量は代償的に約 3 倍に上昇していた。エネルギー消費を調べるため、呼吸代謝測定を行った結果、普通食投与下において、A-RAMP2<sup>-/-</sup> は野生型マウスと比較して、明期、暗期ともに酸素消費量の低下と呼吸商の上昇が見られた (図 1)。呼吸商が上昇していることから、脂肪を消費しにくく、肥満になりやすいと考えられた。

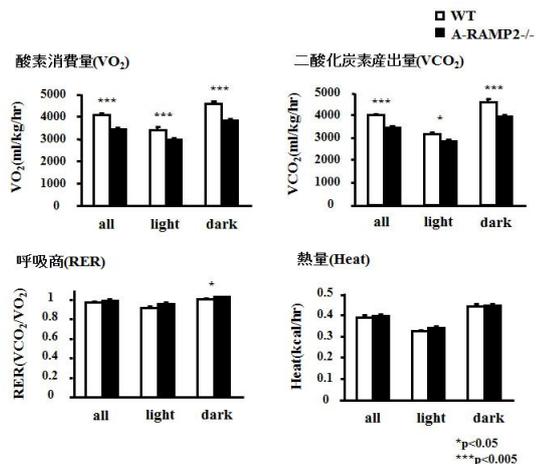


図 1 呼吸代謝測定

次に、白色脂肪組織の病理解析を行った。精巣上体脂肪組織では、A-RAMP2<sup>-/-</sup> は野生型マウスと比較して、白色脂肪細胞が肥大化し、F4/80 陽性のマクロファージ浸潤も増加していた。さらに、リアルタイム PCR による遺伝子発現解析により、炎症性サイトカイン (TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$ 、MCP-1) の上昇と、マクロファージマーカー (F4/80、CCR2、CD68) の上昇、脂肪酸 $\beta$ 酸化系遺伝子である ACSL1 (acyl-CoA synthetase long-chain family member 1)、MCAD (medium-chain

acyl-CoA dehydrogenase)、EHHADH(enoyl-CoA hydratase/3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase)の低下が認められた(図2)。

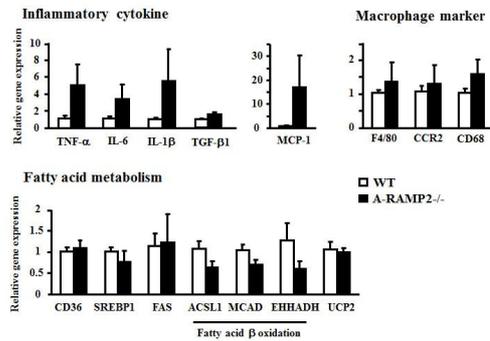


図2 白色脂肪組織の遺伝子発現

また、皮下脂肪組織においても、若年期より皮下脂肪層の肥厚と、線維化の亢進が認められた(図3)。

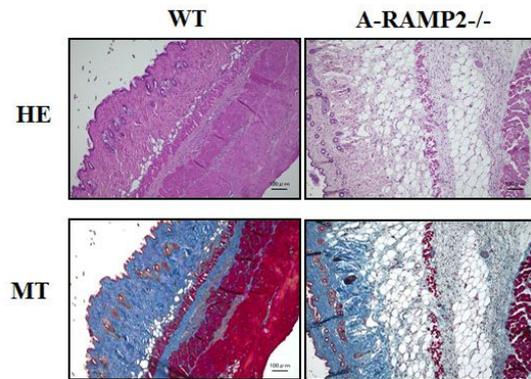


図3 皮下脂肪組織

次に、褐色脂肪組織の解析を行った。褐色脂肪組織においては、白色脂肪組織と同様にA-RAMP2<sup>-/-</sup>ではRAMP2遺伝子が野生型マウスの約20%に低下していることが確認されたが、AM遺伝子発現量に変化は見られなかった。褐色脂肪組織のリアルタイムPCRによる遺伝子発現解析により、普通食投与下において、A-RAMP2<sup>-/-</sup>は野生型マウスと比較して、脂肪酸β酸化系遺伝子であるACSL1とミトコンドリア関連遺伝子であるATP synthase、COX IV、UCP1などの発現低下が見られた(図4)。

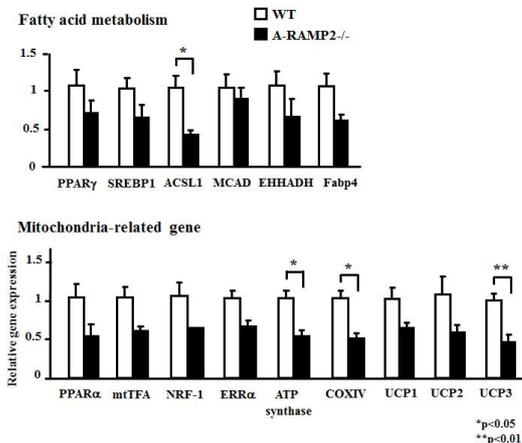


図4 褐色脂肪組織の遺伝子発現

以上の結果より、白色脂肪細胞、褐色脂肪細胞ともに、AM-RAMP2システムは脂肪細胞の分化およびエネルギー代謝制御に関与することが示唆された。

本研究により、AM-RAMP2システムが、白色脂肪細胞、褐色脂肪細胞の脂質、エネルギー代謝制御に重要な役割を持ち、脂肪蓄積とエネルギー消費のバランスを維持していることを明らかにした。

## 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8件)

新藤隆行、神吉昭子(他4名,3番目), アドレノメデュリン-RAMP2 シグナル, 細胞工芸学, 35(1):2-7, 2016, 査読無

Koyama T, Kamiyoshi A(他4名,3番目), Adrenomedullin-RAMP2 system in vascular endothelial cells. J Atheroscler Thromb, 22(7):647-653, 2015, 査読有, DOI:10.5551/jat.29967

Toriyama Y, Kamiyoshi A(他14名,5番目), Pathophysiological function of endogenous calcitonin gene-related peptide in ocular vascular diseases. Am J Pathol, 185(6):1783-1794, 2015, 査読有, DOI:10.1016/j.ajpath.2015.02.017

神吉昭子(他14名,1番目), アドレノメデュリン-RAMP2 システムによる、白色脂肪、褐色脂肪の脂質、エネルギー代謝制御, 血管, 37(4):135-139, 2014, 査読無

Yamauchi A, Kamiyoshi A(他13名,3番目), Functional differentiation of RAMP2 and RAMP3 in their regulation of the vascular system. J Mol Cell Cardiol, 77:73-85, 2014, 査読有, DOI:10.1016/j.yjmcc.2014.09.017

Igarashi K, Kamiyoshi A(他15名,3番目), Pathophysiological roles of adrenomedullin-RAMP2 system in acute and chronic cerebral ischemia. Peptides, 62:21-31, 2014, 査読有, DOI:10.1016/j.peptides.2014.08.013

Uetake R, Kamiyoshi A(他16名,3番目), Adrenomedullin-RAMP2 system suppresses ER stress-induced tubule cell death and is involved in kidney protection. PLoS One, 9(2):e87667, 2014, 査読有, DOI:10.1371/journal.pone.0087667

Shindo T, Kamiyoshi A(他6名,3番目),

Regulation of adrenomedullin and its family peptide by RAMP system-lessons from genetically engineered mice. *Curr Protein Pept Sci*, 14(5):347-357, 2013, 査読無

〔学会発表〕(計13件)

神吉昭子, Adrenomedullin-RAMP2 system regulates differentiation and lipid metabolism of white and brown adipose tissues. 第80回日本循環器学会, 2016.3.18-20, 仙台

神吉昭子, アドレノメデュリン-RAMP2 システムは、褐色脂肪細胞の細胞分化とエネルギー代謝を制御する, 第45回日本心臓血管作動物質学会, 2016.2.5-6, 徳島

神吉昭子, アドレノメデュリン-RAMP2 系は白色および褐色脂肪の脂質代謝と分化を制御する, 第19回日本心血管内分泌代謝学会, 2015.12.10-12, 神戸

神吉昭子, アドレノメデュリン-RAMP2 系による、白色脂肪と褐色脂肪の脂質代謝と分化制御, 第36回日本肥満学会, 2015.10.2-3, 名古屋

神吉昭子, アドレノメデュリン-RAMP2 システムによる白色脂肪と褐色脂肪の脂質、エネルギー代謝制御, 第88回日本内分泌学会, 2015.4.23-25, 東京

神吉昭子, アドレノメデュリン-RAMP2 システムは、白色脂肪-褐色脂肪間の脂質、エネルギー代謝を制御する, 第44回日本心臓血管作動物質学会, 2015.2.6-7, 高松

神吉昭子, アドレノメデュリン-RAMP2 システムは、白色脂肪-褐色脂肪間の脂質、エネルギー代謝バランスを制御する, 第18回日本心血管内分泌代謝学会, 2014.11.21-22, 横浜

神吉昭子, アドレノメデュリン-RAMP2 システムによる白色脂肪と褐色脂肪組織における脂質代謝制御, 第35回日本肥満学会, 2014.10.24-25, 宮崎

神吉昭子, アドレノメデュリン-RAMP2 システムによる脂質、エネルギー代謝調節, 第87回日本内分泌学会, 2014.4.24-26, 福岡

Kamiyoshi A, Adrenomedullin-RAMP2 system regulates lipid and energy metabolism in white and brown adipocytes. The 18<sup>th</sup> International Vascular Biology Meeting, 2014.4.14-17, Kyoto

神吉昭子, Pathophysiological significance of adrenomedullin-RAMP2

system in metabolism and adipose tissue. 第78回日本循環器学会, 2014.3.21-23, 東京

神吉昭子, アドレノメデュリン-RAMP2 システムによる、白色脂肪、褐色脂肪の脂質、エネルギー代謝制御, 第43回日本心臓血管作動物質学会, 2014.2.15-16, 神戸

神吉昭子, 脂肪細胞の代謝制御におけるアドレノメデュリン-RAMP2 システムの意義, 第17回日本心血管内分泌代謝学会, 2013.11.22-23, 大阪

〔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

神吉 昭子 (KAMIYOSHI, Akiko)  
信州大学・学術研究院医学系・助教  
研究者番号: 10397309