

令和 2 年 6 月 4 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09296

研究課題名(和文)新しい代謝制御システムに基づく、加齢性疾患の性差医療基盤の構築

研究課題名(英文) Gender-specific medicine for age-related disease based on a novel metabolic regulatory system

研究代表者

河手 久香 (Kawate, Hisaka)

信州大学・医学部・研究員

研究者番号：20507503

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)：アドレノメデュリン(AM)は多彩な生理活性を有する内因性ペプチドであり、その機能は受容体活性調節タンパクRAMP2あるいはRAMP3によって規定されている。本研究では、閉経後代謝障害におけるRAMP3の意義を検討した。卵巣摘出と高脂肪食負荷を行ったRAMP3^{-/-}は、体重増加、内臓脂肪重量増加、酸素消費量低下、耐糖能異常、脂肪肝の増悪が見られた。さらに、RAMP3^{-/-}ではGPR30の発現が低下しており、エストロゲンの機能異常が考えられた。

以上の結果から、RAMP3は代謝制御に重要な役割を果たしており、その異常は閉経後代謝障害につながることを示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

閉経後の女性では、内臓脂肪型肥満、インスリン抵抗性、脂質代謝異常など、心血管病のリスクが著しく増加する。閉経後のエストロゲンの減少が、その基盤となることが示唆されており、ホルモン補充療法の効果が期待されるが、副作用などの問題から、新たな治療の登場が望まれている。

アドレノメデュリン(AM)は多彩な生理活性を有する内因性ペプチドである。本研究では、AMの受容体活性調節タンパクであるRAMP3と、閉経後代謝障害係や膜型エストロゲン受容体GPR30との関係が明らかとなり、治療標的として有望であることが示された。これらの研究成果は、将来的に加齢性疾患の性差医療につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：Adrenomedullin (AM) is an endogenous peptide which exerts a variety of physiological effects. RAMP2 and 3 are receptor activity-modifying proteins that bind to AM's receptor and regulate its function. In this study, using female RAMP3 knockout mice (RAMP3^{-/-}), we analyzed pathophysiological roles of RAMP3 in postmenopausal obesity. Mice were performed ovariectomy (OVX) and fed a high-fat diet. RAMP3^{-/-} exhibited greater obesity with adipose tissue weight gain, lower oxygen consumption, severer glucose-intolerance and fatty liver compared with wild-type mice. RAMP3^{-/-} also showed downregulation of membrane-type estrogen receptor GPR30.

These findings suggest that RAMP3 plays a key role in the regulation of metabolism, and its malfunction will lead to postmenopausal metabolic disorder.

研究分野：内分泌学

キーワード：アドレノメデュリン RAMP 性差医療

1. 研究開始当初の背景

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生理活性ペプチドであり、元々血管拡張性物質として発見されたが、その後の研究から、全身の様々な臓器、細胞で産生、分泌され、循環調節作用に加えて、抗酸化作用、抗炎症作用など多彩な生理活性を有することが明らかとなってきた。AM の受容体である CLR には、受容体活性調節タンパク RAMP が結合し、AM の様々な機能を制御している。RAMP には 3 種類のサブアイソフォームが存在し、CLR が RAMP2 または RAMP3 と結合することにより、AM に親和性の高い受容体として機能するようになる。ヒトの血中 AM 濃度は、肥満に伴い上昇し、BMI に相関することも報告されており、AM と肥満、メタボリックシンドロームとの関連が示唆されている。AM と RAMP は脂肪組織などの代謝系においても高発現が認められるが、その役割や、肥満、メタボリックシンドローム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

従来 of 生活習慣病研究は、主として中高年男性を標準として、病態とその推移、診断、治療法などが検討されてきた。しかし、同じ疾患に対するリスクファクターでもその寄与度に性差があること、同じ治療法でもその効果には性差があることが明らかになりつつある。こうした背景から、加齢性疾患の性差医療の基盤となる研究が期待されている。

これまで我々は、AM およびその関連因子について、様々な遺伝子改変マウスを用いた病態解析を行ってきた。一方で、これまでの研究は、オスマウスを用いての解析が中心であった。本研究では、加齢性疾患の性差医療に向けて、メスマウスを用いて卵巣摘出による閉経モデルを作成し、閉経後代謝障害における AM-RAMP 系の病態生理学的意義を検討することとした。

3. 研究の方法

RAMP2 ヘテロノックアウトマウス (RAMP2^{+/-}) メス、RAMP3 ホモノックアウトマウス (RAMP3^{-/-}) メス、およびコントロールとして野生型メスマウスを用いた。左右の側腹部を切開し、卵巣周囲脂肪をクレンメで挟んで、卵巣および子宮を創外に引き出し、子宮と卵巣の間を絹糸で結紮した後、両側の卵巣を摘出した。卵巣摘出手術を行なったマウスに対して、1 週間の経過観察の後、10 週間の高脂肪食 (総エネルギーの内 32% が脂肪) 負荷を行った。

週 1 回の体重測定を行い、高脂肪食負荷 10 週間において、オキシマックス等流量システムにより呼吸代謝測定を行った。16 時間の絶食の後に、1g/kg の Glucose を経口投与し、経口糖負荷試験 (OGTT) を行なった。

実験終了時に採血を行い、血中トランスアミナーゼ、中性脂肪、遊離脂肪酸、総コレステロール値を計測した。さらに、脂肪組織、および肝臓を摘出し、白色脂肪組織 (子宮周囲脂肪組織)、および肝臓の病理解析 (HE 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の遺伝子発現解析を行った。

4. 研究成果

(1) RAMP2 ノックアウトマウスにおける代謝障害の評価

RAMP2 ホモノックアウトマウスは胎生致死である、そこで RAMP2 ヘテロノックアウトマウス (RAMP2^{+/-}) オスを用いて、高脂肪食投与による肥満誘導モデルの検討を行った。その結果、RAMP2^{+/-}は野生型オスマウスと比較して、高脂肪食負荷時の体重が有意に亢進しており、内臓脂肪型肥満、脂肪細胞の肥大と脂肪組織への炎症細胞浸潤の亢進、脂肪肝の悪化や、インスリン抵抗性などが認められた。

次に、RAMP2^{+/-}メスおよび野生型メスマウスに対して卵巣摘出あるいは Sham 手術処置を行い、オスと同様に高脂肪食負荷を行った。RAMP2^{+/-}メスおよび野生型メスマウスは共に卵巣摘出によって体重が増加した。しかしながらオスマウスとは異なり、RAMP2^{+/-}メスでは野生型メスマウスと比べて、大きな体重の差は認められなかった。

(2) 卵巣摘出 RAMP3 ノックアウトマウスにおける代謝障害の評価

次に、もう一つの RAMP サブアイソフォームである RAMP3 について検討を進めた。RAMP3 ホモノックアウトマウス (RAMP3^{-/-}) メス、および野生型メスを用いて、Sham 手術、あるいは卵巣摘出手術を行い、高脂肪食負荷による肥満誘導モデルの検討を行った。

卵巣摘出を行ったマウスは、RAMP3^{-/-}、野生型マウス共に、Sham 手術群よりも体重の増加を認めたが、RAMP3^{-/-}は野生型マウスよりも、体重増加が亢進していた。摂餌量は、Sham 手術群に比べて、卵巣摘出群で低下を認めたが、RAMP3^{-/-}、野生型マウス間では大きな差を認めなかった。

呼気ガス分析においては、暗期、明期共に、卵巣摘出群は Sham 手術群よりも酸素消費量 (VO₂) の低下を認めたが、卵巣摘出 RAMP3^{-/-}において VO₂ 低下はより顕著であった。

血清脂質検査では、卵巣摘出 RAMP3^{-/-}において、コレステロール値の軽度上昇を認めたが、中性脂肪、遊離脂肪酸レベルには、各群に大きな変化は見られなかった。次に糖負荷試験を行ったところ、卵巣摘出群は Sham 手術群よりも血糖値の上昇を認めたが、卵巣摘出 RAMP3^{-/-}において、血糖の上昇はより顕著であった。

肝機能検査では、卵巣摘出群において、AST 値、ALT 値の上昇を認めたが、特に RAMP3^{-/-}において顕著であった。肝重量も、卵巣摘出 RAMP3^{-/-}において上昇していた。これを反映して、病理組織検査では、卵巣摘出 RAMP3^{-/-}において、著明な脂肪肝が確認された。

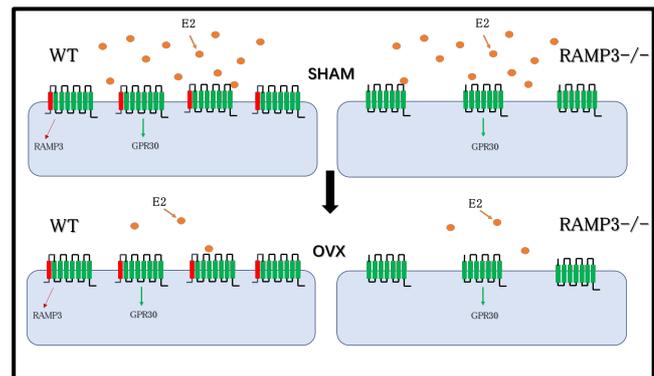
内臓脂肪重量は、腸間膜脂肪、腎臓周囲脂肪、子宮周囲脂肪のいずれも、卵巣摘出群は Sham 手術群よりも上昇しており、RAMP3^{-/-}においてより顕著であった。また脂肪組織の病理では、卵巣摘出 RAMP3^{-/-}において脂肪細胞のサイズの増大が見られた。

脂肪組織における遺伝子発現の検討では、卵巣摘出群において、脂肪分解に関わる β 3 アドレナリン受容体 (β 3AR)、Adipose Phospholipase A2 (AdPLA2)、Perilipin などの発現低下が認められたが、発現低下は RAMP3^{-/-}においてより顕著であった。

RAMP3^{-/-}メスにおいて、病態が悪化するメカニズムを検討するため、次にエストロゲン受容体について検討を行った。卵巣摘出を行った RAMP3^{-/-}、野生型マウスでは共に、Sham 群と比べて、内臓脂肪組織におけるエストロゲン受容体 ER α および ER β の発現が有意に低下していた。細胞膜型エストロゲン受容体である GPR30 は、卵巣摘出群において、野生型マウスに比較して、RAMP3^{-/-}において有意な発現低下が認められた。Western blotting によって、脂肪細胞における GPR30 の分布を検討したところ、卵巣摘出 RAMP3^{-/-}では、膜分画における GPR30 の発現低下が認められた。

今回、GPR30 が内臓脂肪組織においても発現していることが確認されたため、RAMP3^{-/-}卵巣摘出群で体重増加が顕著であった原因が、RAMP3 と GPR30 の相互作用の障害に起因する仮説を考えた (図)。

野生型マウス Sham 群では、卵巣から十分量のエストラジオール (E2) が産生されている。さらに RAMP3 も正常



に存在する。RAMP3 はシャペロンとしても働き、小胞体から細胞膜への受容体輸送にも関わっているため、野生型マウス Sham 群では、細胞膜に十分な量の GPR30 受容体が存在する状態であると考えられる。従って、野生型マウス Sham 群では、十分な量のリガンドと受容体の双方が存在し、エストロゲンシグナルによる抗肥満効果が発揮されている状態と考えられる。これに対し、RAMP3^{-/-}マウス Sham 群では、GPR30 の細胞膜への分布が相対的に低下する。しかし、リガンド側のエストラジオール (E2) の量は保たれているため、依然、エストロゲンシグナルによる抗肥満作用が残されている状態と考えられる。一方、卵巣摘出を行なった場合、エストラジオール (E2) の量は低下し、エストロゲンシグナルによる抗肥満作用が減弱する。卵巣摘出 (OVX) 野生型マウスでは、細胞膜に十分な量の GPR30 受容体が存在する状態であるが、卵巣摘出 (OVX) RAMP3^{-/-}マウスでは、リガンド、受容体側の双方のレベルが低下する状態になるため、エストロゲンシグナルによる抗肥満作用が著明に抑制されると考えられた。

本研究により、閉経後代謝障害に AM-RAMP 系が関与していることがはじめて明らかとなった。AM-RAMP 系の病態生理学的意義には性差が存在することが明らかとなり、今後、その詳細なメカニズム、特にエストロゲン-エストロゲン受容体系と、AM-RAMP 系のクロストークなどを今後明らかにする必要がある。本研究の成果を加齢性疾患の性差医療に展開したいと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Zhai L, Sakurai T, Kamiyoshi A, Ichikawa-Shindo Y, Kawate H, Tanaka M, Xian X, Hirabayashi K, Dai K, Cui N, Tanimura K, Liu T, Wei Y, Tanaka M, Tomiyama H, Yamauchi A, Igarashi K, Shindo T.	4. 巻 36
2. 論文標題 Endogenous calcitonin gene-related peptide suppresses ischemic brain injuries and progression of cognitive decline.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Hypertens.	6. 最初と最後の頁 876-891
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/HJH.0000000000001649.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Shindo T, Tanaka M, Kamiyoshi A, Ichikawa-Shindo Y, Kawate H, Yamauchi A, Sakurai T.	4. 巻 111
2. 論文標題 Regulation of cardiovascular development and homeostasis by the adrenomedullin-RAMP system	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Peptides.	6. 最初と最後の頁 55-61
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.peptides.2018.04.004.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Liu T, Kamiyoshi A, Tanaka M, Iida S, Sakurai T, Ichikawa-Shindo Y, Kawate H, Hirabayashi K, Dai K, Cui N, Tanaka M, Wei Y, Nakamura K, Matsui S, Yamauchi A, Shindo T.	4. 巻 110
2. 論文標題 RAMP3 deficiency enhances postmenopausal obesity and metabolic disorders.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Peptides.	6. 最初と最後の頁 10-18
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.peptides.2018.10.006.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hirabayashi K, Tanaka M, Imai A, Toriyama Y, Iesato Y, Sakurai T, Kamiyoshi A, Ichikawa-Shindo Y, Kawate H, Tanaka M, Dai K, Cui N, Wei Y, Nakamura K, Iida S, Matsui S, Yamauchi A, Murata T, Shindo T.	4. 巻 189
2. 論文標題 Development of a novel model of central retinal vascular occlusion and the therapeutic potential of the adrenomedullin-RAMP2 system.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Am J Pathol.	6. 最初と最後の頁 449-466
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ajpath.2018.10.021.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Liu T, Kamiyoshi A, Sakurai T, Ichikawa-Shindo Y, Kawate H, Shindo T, et al.	4. 巻 158
2. 論文標題 Endogenous calcitonin gene-related peptide regulates lipid metabolism and energy homeostasis in male mice.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Endocrinology	6. 最初と最後の頁 1194-1206
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1210/en.2016-1510	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Xian X, Sakurai T, Kamiyoshi A, Ichikawa-Shindo Y, Kawate H, Shindo T, et al.	4. 巻 158
2. 論文標題 Vasoprotective activities of the adrenomedullin-RAMP2 system in endothelial cells.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Endocrinology	6. 最初と最後の頁 1359 - 1372
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1210/en.2016-1531.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Imai A, Toriyama Y, Sakurai T, Kamiyoshi A, Ichikawa-Shindo Y, Kawate H, Shindo T, et al.	4. 巻 187
2. 論文標題 Adrenomedullin suppresses vascular endothelial growth factor-induced vascular hyperpermeability and Inflammation in retinopathy.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Am J Phthol.	6. 最初と最後の頁 999-1015
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ajpath.2017.01.014.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 田中愛、小山晃英、桜井敬之、神吉昭子、新藤優佳、河手久香、新藤隆行 他	4. 巻 40
2. 論文標題 アドレノメデュリン-RAMP2系は転移前土壌形成を抑制し、癌転移を抑制する	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 血管	6. 最初と最後の頁 101-106
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 神吉昭子、桜井敬之、河手久香、新藤優佳、新藤隆行 他
2. 発表標題 アドレノメデュリン - RAMP2系による脂肪細胞の細胞骨格とエネルギー代謝制御機構
3. 学会等名 第39回日本肥満学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kamiyoshi A, Sakurai T, Kawate H, Ichikawa-Shindo Y, Shindo T. et al.
2. 発表標題 RAMP3 deficiency enhances postmenopausal obesity and metabolic disorders
3. 学会等名 第83回日本循環器学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 神吉昭子、桜井敬之、河手久香、新藤優佳、新藤隆行 他
2. 発表標題 アドレノメデュリン - RAMP2系は褐色脂肪細胞とベージュ脂肪細胞の分化を制御する
3. 学会等名 第38回日本肥満学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 神吉昭子、桜井敬之、新藤優佳、河手久香、新藤隆行 他
2. 発表標題 アドレノメデュリン - RAMP2系による、脂肪細胞の細胞骨格およびエネルギー代謝制御機構
3. 学会等名 第21回日本心血管内分泌代謝学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Kamiyoshi A, Sakurai T, Ichikawa-Shindo Y, Kawate H, Shindo T, et al.
2. 発表標題 Regulation of cytoskeleton and energy metabolism of adipocytes by adrenomedullin-RAMP2 system
3. 学会等名 第82回日本循環器学会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

http://www7a.biglobe.ne.jp/~shindo/ 信州大学医学部 循環病態学教室 http://www7a.biglobe.ne.jp/~shindo/

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考