

平成 21 年 5 月 1 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18590819
 研究課題名（和文） アドレノメデュリンと関連ペプチドの特徴的作用の解析と治療応用
 研究課題名（英文） Pharmacological Analysis and Therapeutic Application of Adrenomedullin and Adrenomedullin-related Peptide
 研究代表者
 加藤 文司（KATO JOHJI）
 宮崎大学・医学系研究科・教授
 研究者番号：20274780

研究成果の概要：アドレノメデュリン（AM）と Proadrenomedullin N-terminal 20 peptide（PAMP）は、同一の前駆体から産生されるが、相互に異なる作用を有する。本研究では、AM と PAMP の特徴的な作用を解析して、治療薬としての有用性の検討した。その結果、血管新生作用、心筋線維化抑制作用、併用降圧作用、大腸潰瘍治癒促進作用、血圧上昇抑制機能が明確になり、血管新生と大腸潰瘍治癒促進の作用機序についても解明された。また、大動脈疾患の発症進展の機序に関する新たな知見も得られた。本研究の結果を基盤として、AM と PAMP の臨床治療学的応用のための研究展開が可能である。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	1,200,000	0	1,200,000
2007 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2008 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
総計	3,400,000	660,000	4,060,000

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

1. 研究開始当初の背景

アドレノメデュリン（AM）は、1993 年に研究代表者の研究施設において、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、ヒト正常副腎髄質、肺、血管壁、心房、心室、腎臓、脳、等の幅広い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、降圧作用や心血管保護作用を含めて多彩な作用を発揮することが明らかになった。また、

Proadrenomedullin N-terminal 20 peptide（PAMP）は、AM 前駆体（preproAM）の遺伝子解析により発見された生理活性ペプチドであり、AM と同様の臓器や組織において産生され降圧作用を発揮する。AM と PAMP の発見から 12 年が経過し、この間の研究結果の蓄積により、同一の前駆体ペプチド（proAM）から産生される異なった 2 種類の生理活性ペプチド AM と PAMP によるユニークな循環調節機構の存在が明らかになった。現在、AM の心血管保護作用や臓器保護作用を利用し、心筋梗塞や肺高血圧の患者への治療応用も進められている。

最近、AM と PAMP の新たな生物作用が判

明した。AM の新規かつ特徴的作用として血管新生作用が報告され、さらに、最近我々は、PAMP が AM より強力な血管新生作用を發揮することを明らかにした。すなわち、同一の前駆体ペプチドから產生される AM と PAMP が協調して血管新生を調節している可能性が判明した。AM や PAMP の產生と受容体が血管内皮と平滑筋で認められる事実も、これらのペプチドの血管新生における意義を示唆している。また、最近の我々の研究により、AM が強力な心血管線維化抑制作用を發揮することが、新たに明らかになった

2. 研究の目的

本研究は以下の3点を主要な目的として実施された。1) AM と PAMP の血管新生作用を細胞および個体レベルで明確にする；2) 最近明らかになった AM または PAMP の特徴的作用（血管新生作用と抗線維化作用）を利用した治療応用の可能性を疾患モデル動物を用いて明確にする；3) これらの特徴的作用の細胞および個体レベルで作用機序の解明を進める。このような一連の解析により、同一の前駆体ペプチド（proAM）から產生される異なった2種類の生理活性ペプチド AM と PAMP による血管新生調節機構が明らかにされ、AM と PAMP の特徴的作用を利用した治療応用の可能性を明らかにすることが出来る。

3. 研究の方法

(1) PAMP の血管新生作用

PAMP の生体内での役割を明確にするために、PAMP 単独過剰発現ラット(Tg)を確立し、PAMP の血管新生作用を検討した。ヒト AM・PAMP の cDNA を改変し pCAGGS に導入した遺伝子を Wistar ラットの受精卵の前核にマイクロインジェクションし、PAMP のみを過剰発現するラットを作成した。下肢虚血モデルを作成して、血管新生を検討すると共に、ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) を用いて、PAMP の血管新生の機序を検討した。

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

アンジオテンシン受容体拮抗薬 (ARB) は、心筋梗塞後の左室リモデリングを抑制して心機能の低下を抑制する。一方、我々は、AM を心筋梗塞ラットの急性期に投与することにより、慢性期の左室リモデリングが抑制され、心機能の低下が抑制されることを示した。そこで、ARB カンデサルタンを投与を受けた心筋梗塞ラットを対象に、心筋梗塞急性期における AM 投与の相加的な有用性について検討した。ラットの左冠動脈結紮により心筋梗塞を作成して、カンデサルタン (10 $\mu\text{g}/\text{kg}$)

日)を10週間経口投与した。カンデサルタン投与に加えて、1.0 $\mu\text{g}/\text{h}$ AM を、心筋梗塞作成直後より1週間、浸透圧ミニポンプを用いて腹腔内に投与した。

(3) AM と PAMP の併用降圧効果

AM と PAMP は、同一前駆体ペプチドから產生されるが、相互に異なった機序で降圧効果を發揮する。AM または PAMP が単独で投与された場合の降圧効果に関して多くの報告があるが、併用された場合の効果に関する報告は少ない。そこで、大動脈に留置したカテーテルにより、無麻酔無拘束にて、連続的に詳細に血圧を観察分析することにより、AM または PAMP の長期間の単独投与と併用投与の効果を比較した。15週の雄性自然発症高血圧ラット (SHR) の大動脈にカテーテルを挿入し、腹腔内に小型発信器を植え込み、無麻酔無拘束での血圧、脈拍、行動量を、テレメータシステムを用いて連続モニターした。7日間のコントロール期間の後に、ヒト AM ならびにヒト PAMP を、浸透圧ポンプを使用し、単独または併用にて皮下投下し、7日間血圧、脈拍、行動量を測定した。

(4) 大腸潰瘍モデルにおける AM の効果

消化管臓器における AM の生理作用としては、胃酸分泌抑制作用や胃粘膜保護作用などが報告されているが、大腸における生理機能に関する検討は少ない。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 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。雄性 Wistar ラットを用い、開腹下に、肛門より 5-6cm 口側大腸の漿膜内に酢酸を注入し潰瘍を作成した。AM (0.25, 0.5, 1.0 μg) を生理食塩液に溶解し経肛門的に一日一回投与し、潰瘍面積を経時的に測定した。さらに、投与5日目の潰瘍部大腸組織における IL-6 と IFN- γ 含量を測定した。

(5) AM の血圧上昇抑制機能

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、地元自治体の基本健康診査を受診した町民を対象に、降圧ペプチド 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。基本健康診査を受診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。追跡し得た 177 名を解析対象とし、収縮期血圧 140 mmHg 以上または収

縮期血圧 90 mmHg 以上を認めた場合を高血圧発症とした。

(6) 腹部大動脈瘤 (AAA) の発症進展における 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。一方、腹部大動脈瘤 (AAA) は高齢者に比較的多く、動脈硬化を基盤に腹部大動脈が拡大する疾患である。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。

4. 研究成果

(1) PAMP の血管新生作用

PAMP-Tg では血漿及び種々の組織において高レベルのヒト PAMP が検出されたが、ヒト AM は認められなかった。左大腿動脈を切離後、虚血肢への血流回復をレーザー Doppler 血流計で測定した。Tg (87%) では Wt (52%) に比較し虚血肢への血流改善が有意に増強しており、血管新生を CD31 染色で評価したところ、Tg では Wt に比較し新生血管が有意に多かった。また、PAMP は HUVEC の遊走能を亢進するとともに、血管内皮細胞の管腔形成を促進したが、これらの作用は PD098059 (ERK 阻害剤) で完全に抑制された。さらに、PAMP による ERK のリン酸化を Western Blotting で証明した。以上より、PAMP は血管内皮に作用し、ERK 依存的に血管新生を亢進する生理活性ペプチドであることが明らかとなった。

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

プラセボ投与群と比較して、カンデサルタン投与群およびカンデサルタン+AM 投与 (AM 併用) 群では、心重量、肺重量、左室拡張末期圧、非梗塞左室心筋の心筋細胞サイズとコラーゲン量が減少した。これらのパラメータに関して、カンデサルタン群と AM 併用群の間で有意差は認められなかったが、梗塞サイズに対するコラーゲン量の比率は、カンデサルタン群と比較して、併用投与群で有意な低値を示した。また、血中 ANP 濃度も、併用投与により低下する傾向を示した。心筋梗塞ラットにおいて、カンデサルタン治療に加えて、急性期の AM の併用投与は、非梗塞部左室の線維化抑制の観点から有用であると考えられた。

(3) AM と PAMP の併用降圧効果

AM の単独投与により、SHR の昼間および夜間の収縮期血圧が有意に低下し、PAMP の単独投与では、昼間および夜間の拡張期血圧が有意に低下した。AM と PAMP の併用投与では、昼間および夜間の収縮期血圧ならびに昼間および夜間の拡張期血圧がともに有意に低下した。無麻酔無拘束下の SHR において、AM または PAMP の単独投与と比較して、両者の併用より効果的な降圧効果が得られた。すなわち、AM と PAMP は相互に降圧作用を増強することが判明し、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。

(4) 大腸潰瘍モデルにおける AM の効果

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。投与後 3、5、10 日目すべての時点において、AM 投与群が対照群より潰瘍面積が小さく、5 日目に最も著明な差が認められた。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、潰瘍部組織重量が低値であった。また、AM 投与群では、対照群と比較して、大腸組織内 IFN- γ 含量の差を認めなかったが 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。

(5) AM の血圧上昇抑制機

血漿 AM、ANP および BNP 濃度の中央値を基準に、低 AM 群と高 AM 群、低 ANP 群と高 ANP 群または低 BNP 群と高 BNP 群に分類し解析したところ、3 年間の追跡期間中、高 AM 群からの高血圧発症 (27.8%) は、低 AM 群 (11.5%) より有意に ($P < 0.01$) 高頻度であった。一方、高血圧発症頻度に関して、低 ANP 群 (18.6%) と高 ANP 群 (21.7%) および低 BNP 群 (20.2%) と高 BNP 群 (20.2%) の 2 群間では、明らかな差は観察されなかった。すなわち、高血圧発症に先行して血中 AM 濃度上昇が観察されたことは、AM が血圧上昇に対して抑制的に機能していることを示唆している。

(6) 腹部大動脈瘤 (AAA) の発症進展における AM の病態生理学的役割

AAA 組織の肥満細胞に高いレベルの AM 免疫活性が観察され、AAA を認めない大動脈と比較すると、AAA では肥満細胞の数が増加していた。細胞培養実験では、肥満細胞からの AM の産生と分泌が観察され、AAA 由来の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。すなわち、AAA 組織中の肥満細胞が AM を産生し、産生された AM が AAA 組織の線維化を抑制する可能性が判明した。今後、AM が AAA 拡大抑制的に機能しているか否かを、動物モデルを用いて明確にする必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 10 件) 全て査読有り

- ① 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
- ② 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
- ③ 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
- ④ 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
- ⑤ 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
- ⑥ 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

- ⑦ 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
- ⑧ Kato J, Kitamura K, Eto T: Plasma adrenomedullin level and development of hypertension. *J Hum Hypertens* 2006; 20: 566-570
- ⑨ 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
- ⑩ 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

研究代表者

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