

令和 4 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：2019～2021

課題番号：19K07317

研究課題名(和文) エネルギー代謝制御における、AM、AM2の機能分化と相互作用の解明

研究課題名(英文) Functional differentiation and interaction of AM and AM2 in metabolic regulation

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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：生理活性ペプチドであるアドレノメデュリン(AM)は、脂肪細胞の分化やエネルギー代謝を制御することをこれまでに明らかとしてきたが、アドレノメデュリン2(AM2)については、循環調節においてAMと類似した作用を持つが、代謝制御における意義は明らかでない。本研究では、代謝制御におけるAMとAM2の機能分化と相互作用を解明するため、AM2ノックアウトマウス(AM2^{-/-})を作製し、メタボリックシンドロームにおける病態生理学的意義を解析することにより、エネルギー代謝制御にAMと同様にAM2が関与する可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

AMとAM2は、血管拡張作用などの循環調節作用を有するなど、共通の作用を持つ反面、両者の分布や発現量は組織により異なっている。これまでにAMの生理作用については多く報告されているが、AM2の生理作用については不明な点が多い。両者は受容体活性調節タンパクRAMPを共有することから、代謝関連組織におけるAMとAM2の機能分化と相互作用を明らかにすることにより、メタボリックシンドロームの治療法開発に展開することが期待される。

研究成果の概要(英文)：We elucidated that adrenomedullin (AM) which is biologically active peptide controls adipocyte differentiation and energy metabolism so far. Whereas adrenomedullin 2 (AM2) has effects similar to AM in the cardiovascular regulation, but the role in the metabolic regulation is not clear. In this study, we established AM2 knockout mice (AM2^{-/-}) to elucidate functional differentiation and interaction of AM and AM2 in the metabolic regulation and analyzed pathophysiological significance in the metabolic syndrome. We showed the possibility that AM2 was involved in energy metabolic regulation similar to AM.

研究分野：代謝学

キーワード：アドレノメデュリン アドレノメデュリン2

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) アドレノメデュリン (AM) は、血管をはじめ全身で広く産生される生理活性ペプチドであり、血管拡張作用を有する循環系調節因子である。AM は脂肪細胞からも分泌され、血中の AM の 1/3 が脂肪細胞に由来し、肥満の重症度と AM の血中濃度が相関することが報告されている。一方、アドレノメデュリン 2 (AM2) は、トラフグから発見された生理活性ペプチドであり、その後、哺乳類でも確認された。AM は 52 個、AM2 は 47 個のアミノ酸からなり、AM2 は AM と分子構造が近く、両者のアミノ酸相同性は約 30% である。AM と同様に、血管拡張作用や強心作用などの循環調節作用が明らかとなっているが、両者の組織分布は異なり、腎臓、膵臓、腸間膜などでは、AM よりも AM2 の発現が高い。AM と同様に、AM2 は脂肪細胞からも分泌されているが、その生理学的意義は明らかでない。

(2) カルシトニンスーパーファミリーに属するペプチドは、部分的に受容体を共用している。AM と AM2 は、7 回膜貫通型受容体のカルシトニン受容体様受容体 CLR を共通の受容体としているが、CLR に 1 対 1 で結合する 1 回膜貫通型の受容体活性調節タンパク RAMP を共用しており、RAMP の種類により、リガンド側との親和性や機能が制御されている。RAMP には、1、2、3 の 3 種類のサブアイソフォームが存在し、AM が、CLR/RAMP2 または CLR/RAMP3 に親和性が高いのに対して、AM2 は主に CLR/RAMP3 に親和性が高いことが報告されている。また、細胞の種類により親和性の高い RAMP が異なることも報告されており、AM と AM2 の生理学的機能の差異を生じている可能性が考えられる。

(3) これまでに、AM の受容体活性調節タンパクである RAMP2 に着目し、RAMP2 ヘテロノックアウトマウス (RAMP2^{+/-}) と脂肪細胞特異的 RAMP2 ノックアウトマウス (A-RAMP2^{-/-}) を用いて、代謝制御における AM-RAMP2 系の役割について解析を行ってきた。その結果、高脂肪食投与による肥満誘導モデルで、RAMP2^{+/-} は野生型マウスと比較して、肥満、インスリン抵抗性、糖脂質代謝異常などを示すことを明らかにした。一方で、A-RAMP2^{-/-} は、若年期での体重増加、脂肪重量の増加とエネルギー代謝の低下が見られ、脂肪細胞の肥大、炎症細胞浸潤の亢進などが認められた。

2. 研究の目的

脂肪細胞の分化やエネルギー代謝制御における、AM と AM2 の機能分化と相互作用、およびメタボリックシンドロームにおける AM2 の病態生理学的意義を解明し、メタボリックシンドロームにおいて AM と AM2 が治療標的となりうるか検討した。

3. 研究の方法

CRISPR/Cas9 システムを用いて、AM2 ノックアウトマウス (AM2^{-/-}) を作製し、解析に使用した。各組織における AM2 遺伝子発現を、リアルタイム PCR により比較した。

胎生期から成体までの発生段階の異なる肝臓を採取し、リアルタイム PCR により AM、AM2 などの遺伝子発現を比較した。

AM2^{-/-} と野生型マウスの雄マウスを用いて、8 週齢より高脂肪食 (脂肪含有量 32%) を 10 週間投与して肥満誘導モデルを作成し、体重、組織重量を測定した。肝臓、白色脂肪組織を採取し、リアルタイム PCR による遺伝子発現解析、病理組織染色を行った。

4. 研究成果

(1) AM2 ノックアウトマウス (AM2^{-/-}) の作製

CRISPR/Cas9 システムにより、AM2 ノックアウトマウス (AM2^{-/-}) を新たに樹立した。AM2^{-/-} はホモ型でも生存しており、発生に異常は認められず、成体が得られることを確認した。AM ノックアウトマウス (AM^{-/-}) のホモ型が、血管形成異常により胎生致死であることは異なっていた。

リアルタイム PCR による遺伝子発現解析により、AM2^{-/-} では各組織 (腎臓、心臓、肝臓、白色脂肪組織、褐色脂肪組織) において AM2 が発現していないことを確認した。

(2) AM2 遺伝子の各組織における発現量の比較

AM2 は、腎臓で高発現であるのに対して、代謝関連組織である白色脂肪組織でも発現しているが、発現量は腎臓と比較すると低発現であった。肝臓においても同様に、AM2 発現は低発現であった。

肝臓での AM2 発現がより低発現であったことから、AM2 発現の肝臓における経時的变化を解析した結果、肝臓では胎生期において AM2 が高発現しているが、生後から徐々に AM2 発現が低下することが明らかになった。これは、AM が胎生期から成体まで恒常的に発現していることと異なっており、肝臓における AM と AM2 の役割が異なる可能性が示唆された。

(3) AM2-/-を用いた高脂肪食負荷による肥満誘導モデルの解析

AM2-/-に高脂肪食(HFD)を10週間投与後、解析を行った。野生型マウスと比較して、AM2-/-では、白色脂肪組織の重量増加と、脂肪肝の悪化が認められた。リアルタイムPCR解析より、AM2-/-の白色脂肪組織では、野生型マウスと比較して、炎症性サイトカインやマクロファージマーカーの発現が高く、肝臓では線維化関連遺伝子の発現が高かった。また、HE染色より、白色脂肪組織では脂肪細胞の肥大と炎症細胞浸潤の増加、オイルレッドO染色より、肝臓では脂肪滴の蓄積増加が認められた。

野生型マウスにおいて、高脂肪食投与時に普通食(ND)投与時と比較して、白色脂肪組織と肝臓で共に、AM2発現が増加することから、AM2は高脂肪食負荷に対して代償的な作用を有することが考えられた。一方、AMは高脂肪食投与により発現増加は見られなかった。

以上の結果より、AMとAM2は、組織により発現分布と発現量が異なり、高脂肪食投与によりAM2発現が増加することから、AM2はAMとは異なる作用により、メタボリックシンドロームを抑制することが示唆された。

本研究により、AM2はAMと同様に、メタボリックシンドロームの新たな治療標的となる可能性が示唆された。AMとAM2が共有しているRAMPの受容体側の機能解析を行うなど、AMとAM2の機能分化と相互作用をより詳細に解明することにより、新たな治療と予防法の開発につながることを期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 6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 神吉昭子、桜井敬之、新藤隆行 | 4. 巻 48(6) |
| 2. 論文標題 エネルギー代謝制御におけるAM、AM2の機能分化と相互作用 | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Medical Science Digest | 6. 最初と最後の頁 38-40 |
| 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 - |
| 1. 著者名 Wei Y, Tanaka M, Sakurai T, Kamiyoshi A, Ichikawa-Shindo Y, Kawate H, Cui N, Kakihara S, Zhao Y, Aruga K, Sanjo H, Shindo T | 4. 巻 162(8) |
| 2. 論文標題 Adrenomedullin ameliorates pulmonary fibrosis by regulating TGF- β -Smads signaling and myofibroblast differentiation | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Endocrinology | 6. 最初と最後の頁 bqab090 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1210/endo/bqab090. | 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 Tanaka M, Kakihara S, Hirabayashi K, Imai A, Toriyama Y, Iesato Y, Sakurai T, Kamiyoshi A, Ichikawa-Shindo Y, Kawate H, Tanaka M, Cui N, Wei Y, Zhao Y, Aruga K, Yamauchi A, Murata T, Shindo T | 4. 巻 191(4) |
| 2. 論文標題 Adrenomedullin-receptor activity-modifying protein 2 system ameliorates subretinal fibrosis by suppressing epithelial-mesenchymal transition in age-related macular degeneration | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Am J Pathol | 6. 最初と最後の頁 652-668 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ajpath.2020.12.012. | 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 Cui N, Sakurai T, Kamiyoshi A, Ichikawa-Shindo Y, Kawate H, Tanaka M, Tanaka M, Wei Y, Kakihara S, Zhao Y, Aruga K, Kawagishi H, Nakada T, Yamada M, Shindo T | 4. 巻 162(3) |
| 2. 論文標題 Adrenomedullin-RAMP2 and -RAMP3 systems regulate cardiac homeostasis during cardiovascular stress | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Endocrinology | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1210/endo/bqab001. | 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 Dai K, Tanaka M, Kamiyoshi A, Sakurai T, Ichikawa-Shindo Y, Kawate H, Cui N, Wei Y, Tanaka M, Kakiyama S, Matsui S, Shindo T | 4. 巻 39(9) |
| 2. 論文標題 Deficiency of the adrenomedullin-RAMP3 system suppresses metastasis through the modification of cancer-associated fibroblasts | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Oncogene | 6. 最初と最後の頁 1914-1930 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41388-019-1112-z. | 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 - |

〔学会発表〕 計10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、新藤優佳、河手久香、田中愛、崔南奇、田中正明、Yangxuan Wei、柿原伸次、Yunlu Zhao、笠原智貴、有賀公亮、新藤隆行 |
| 2. 発表標題 肥満および脂肪肝におけるアドレノメデュリン2の病態生理学的意義 |
| 3. 学会等名 第94回日本内分泌学会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 神吉昭子、桜井敬之、新藤優佳、河手久香、田中愛、崔南奇、田中正明、Wei Yangxuan、柿原伸次、Zhao Yunlu、笠原智貴、有賀公亮、新藤隆行 |
| 2. 発表標題 アドレノメデュリン2の肥満および脂肪肝における病態生理学的意義 |
| 3. 学会等名 第50回日本心臓血管作動物質学会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 神吉昭子、桜井敬之、新藤優佳、河手久香、田中愛、柿原伸次、Yunlu Zhao、松田順繁、有賀公亮、新藤隆行 |
| 2. 発表標題 アドレノメデュリン2の肝臓および代謝制御における病態生理学的意義 |
| 3. 学会等名 第25回日本心血管内分泌代謝学会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 神吉昭子、桜井敬之、新藤優佳、河手久香、田中愛、柿原伸次、Yunlu Zhao、松田順繁、有賀公亮、笠原智貴、新藤隆行 |
| 2. 発表標題 Pathophysiological significance of adrenomedullin 2 in hepatic and metabolic regulation |
| 3. 学会等名 第86回日本循環器学会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 神吉昭子、桜井敬之、新藤優佳、河手久香、田中愛、戴昆、崔南奇、Yangxuan Wei、田中正明、柿原伸次、松井周平、中村啓成、新藤隆行 |
| 2. 発表標題 急性腎障害におけるアドレノメデュリン2の病態生理学的意義 |
| 3. 学会等名 第93回日本内分泌学会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Kaniyoshi A, Sakurai T, Ichikawa-Shindo Y, Kawate H, Tanaka M, Cui N, Wei Y, Zhao Y, Aruga K, Shindo T |
| 2. 発表標題 Intermedin/Adrenomedullin 2 deficiency causes obesity and liver dysfunction under high-fat diet |
| 3. 学会等名 第24回日本心血管内分泌代謝学会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 神吉昭子、桜井敬之、新藤優佳、河手久香、田中愛、戴昆、崔南奇、田中正明、Yangxuan Wei、柿原伸次、新藤隆行 |
| 2. 発表標題 アドレノメデュリン2の高脂肪食負荷における病態生理学的意義 |
| 3. 学会等名 第41回日本肥満学会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 神吉昭子、桜井敬之、新藤優佳、河手久香、田中愛、戴昆、崔南奇、Yangxuan Wei、田中正明、柿原伸次、松井周平、中村啓成、新藤隆行 |
| 2. 発表標題 閉経後代謝障害におけるRAMP3の病態生理学的意義 |
| 3. 学会等名 第40回日本肥満学会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 神吉昭子、桜井敬之、新藤優佳、河手久香、田中愛、田中正明、柿原伸次、松井周平、中村啓成、新藤隆行 |
| 2. 発表標題 脂肪細胞のミトコンドリア機能制御におけるアドレノメデュリン-RAMP2系の病態生理学的意義 |
| 3. 学会等名 第23回日本心血管内分泌代謝学会 |
| 4. 発表年 2019年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

| |
|--|
| <p>信州大学医学部循環病態学教室ホームページ http://www7a.biglobe.ne.jp/~shindo/</p> |
|--|

| | | |
|---------------------------|-----------------------|----|
| 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 |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|