

機関番号：13601

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20390221

研究課題名 (和文)

RAMP による代謝、血管制御メカニズムの解明と、代謝異常、血管合併症治療への展開

研究課題名 (英文)

Clarification of the mechanism of metabolic and vascular regulation by RAMP and its application in metabolic disorders and vascular injuries.

研究代表者

新藤 隆行 (SHINDO TAKAYUKI)

信州大学・医学系研究科・教授

研究者番号：90345215

研究成果の概要 (和文)：

メタボリックシンドロームと、血管合併症との間を結ぶ重要な分子基盤として、近年、多彩な生理活性を有する液性因子が注目されている。これらの因子は、代謝や循環器系の恒常性維持を司っているが、一方でそのバランスの破綻が、メタボリックシンドローム発症や心血管病を引き起こすと考えられる。アドレノメデュリン (AM) は、血管をはじめ全身の組織で広範に産生される多彩な生理活性を持つペプチドであり、代謝と血管の双方の恒常性維持に関連する事が示唆されてきた。本研究では、AM の受容体活性調節タンパクである RAMP2 の遺伝子操作マウスを用い、RAMP2 が AM による代謝、血管制御の鍵分子であることを明らかとした。RAMP2 は、メタボリックシンドロームや心血管病の新しい治療ターゲットとなることが期待される。

研究成果の概要 (英文)：

Recently, various humoral factors have attracted much attention in terms of being a common molecular basis that links the onset of metabolic syndrome with that of vascular complications. These factors play important roles in the maintenance of metabolic and vascular homeostasis. In contrast, an imbalance between the factors may cause the onset of metabolic syndrome and cardiovascular diseases.

Adrenomedullin (AM), originally identified as a potent vasodilatory peptide produced by vascular cells, has been shown to be synthesized by a variety of cell types and possesses various biological functions. AM has been shown to be involved in both metabolic and vascular homeostasis.

In this study, by using gene-engineered mice of RAMP2 (a receptor activity-modifying protein of AM's receptor), we proved that RAMP2 is the key molecule of the AM's metabolic and vascular regulation. RAMP2 could be a novel therapeutic target for metabolic syndrome and cardiovascular diseases.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	5,100,000	1,530,000	6,630,000
2009年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
2010年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
年度			
年度			
総計	14,300,000	4,290,000	18,590,000

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、動脈硬化、メタボリックシンドローム

1. 研究開始当初の背景

メタボリックシンドロームと、血管合併症や臓器障害発症の間を結ぶ重要な分子基盤として、近年、多彩な生理活性を有する液性因子が注目されている。各臓器は液性因子を介して密に連携し合い、生体の様々な恒常性維持を司っているが、一方でそのバランスの破綻がメタボリックシンドローム発症の一端を担っていると考えられている。

アドレノメデュリン(AM)は、血管をはじめ全身の組織で広範に産生されるペプチドである。AMは当初、強力な血管拡張作用を有する降圧物質として注目されたが、その後の研究から、血管拡張作用だけにとどまらず、抗酸化作用、抗炎症作用、抗血栓作用、抗動脈硬化作用など多彩な生理活性を持つことが明らかとなってきた。更に最近、血中AM濃度が肥満に伴い上昇し、Body mass index(BMI)に相関が見られることや、AMとそのAM受容体が脂肪組織や動脈硬化病変部位において高発現していることが報告されている。我々はこれまで、AM及びその関連因子の遺伝子操作動物を樹立し、AMの慢性欠乏状態が、実際に血圧上昇をもたらすだけでなく、動脈硬化や、加齢に伴う肥満、耐糖能異常、臓器障害などを亢進させることを報告してきた。AMはメタボリックシンドローム発症の分子基盤にも関わると予想される。しかしながら、AMはペプチドであり、血中半減期も短いため、それ自体を慢性疾患の治療薬として応用するには多くの制約も抱えている。

そこで我々は、AMの受容体システムに注目した。AM受容体本体はCRLR(calcitonin receptor like receptor)という7回膜貫通型受容体であるが、CRLRは、受容体活性調節タンパクであるRAMP(receptor activity modifying protein)1、2、3のいずれかと重合する。AMノックアウトマウスが、血管の発達異常により胎生致死となる胎生中期の血管においては、RAMPサブアイソフォームの中でも、特にRAMP2の高発現を認める。このことから我々は、血管におけるAMシグナルの中心は、RAMP2によって担われている可能性を考えた。そこで、これを検証するため、RAMP2特異的ノックアウトマウスを樹立し、更にAM-RAMP2系の病態生理学的意義を検討した。

2. 研究の目的

メタボリックシンドロームと、血管合併症や臓器障害発症の間を結ぶ重要な分子基盤として、多彩な生理活性を有する液性因子の役割が注目されている。我々は、この液性因子の一つとして、アドレノメデュリン(AM)、及びその受容体活性調節タンパク(RAMP)システムに注目した。本研究は、メタボリックシンドローム及び血管合併症治療に向けたAM-RAMPシステムの病態生理学的意義の解明を目的とする。

3. 研究の方法

RAMP2遺伝子 exon2-4 の flox マウスを作成し、CAG-Cre トランスジェニックマウスと交配することで、RAMP2 単独ノックアウトマウスを作成した。後述の様に、RAMP2 ホモノックアウトマウスは胎生致死であったため、成体が得られる RAMP2 ヘテロノックアウトマウス(RAMP2^{+/-})を用いて、以後の代謝障害、動脈硬化病変モデルを作成した。

まず RAMP2 の代謝制御における意義を検討するため、RAMP2^{+/-}マウスと、野生型マウスを用い、8 週令から 18 週令にかけて、高脂肪食負荷実験を行った。

次に、RAMP2^{+/-}マウスと、野生型マウスを用い、ポリエチレンチューブのカフを大腿動脈周囲に 4 週間留置し、血管傷害モデルを作成し、動脈硬化病変の評価を行った。

更に、RAMP2 遺伝子に対する Flox マウスを、血管内皮細胞に特異的に発現する VE カドヘリン遺伝子のプロモータを用いた Cre リコンビナーゼトランスジェニックマウスと交配させることにより、血管内皮細胞特異的な RAMP2 ノックアウトマウス(E-RAMP2^{-/-})を樹立した。

4. 研究成果

RAMP2 ホモノックアウトマウス(RAMP2^{-/-})は、胎生中期に致死であり、血管の発達異常と共に、著明な浮腫や出血、心嚢水貯留が認められた。以上の所見は、AM ホモノックアウトマウス(AM^{-/-})と共通する所見であった。更に、RAMP2^{-/-}では、代償性の AM 発現亢進を認めたが、その他の RAMP 発現量に変化を認めず、RAMP サブアイソフォームの間に相補性がないことも明らかとなった。

一方、RAMP2 ヘテロノックアウトマウス (RAMP2^{+/-}) は、外観上の異常を認めず、成体が得られた。RAMP2^{+/-} の各臓器では、RAMP2 発現が半減している一方、AM 発現亢進を認め、RAMP2 の発現低下に伴い、ポジティブフィードバックが生じているものと考えられた。このことから、成体においても、RAMP2 が AM シグナルに、必須であることが推測された。

RAMP2 の代謝制御における意義を検討するため、RAMP2^{+/-} マウスと、野生型マウスを用い、8 週令から 18 週令にかけて、高脂肪食負荷実験を行った。RAMP2^{+/-} では、高脂肪食負荷時、野生型に比較して、体重増加、内臓脂肪重量の増加、血中インスリン値の上昇、糖負荷試験における耐糖能の悪化が認められた。RAMP2^{+/-} では、内臓脂肪における MCP-1、TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 等の炎症性サイトカイン、ケモカインの発現亢進と、アディポネクチンの発現低下を認め、脂肪組織における慢性炎症が、肥満や耐糖能異常の一因になっていることが推測された (図 1)。

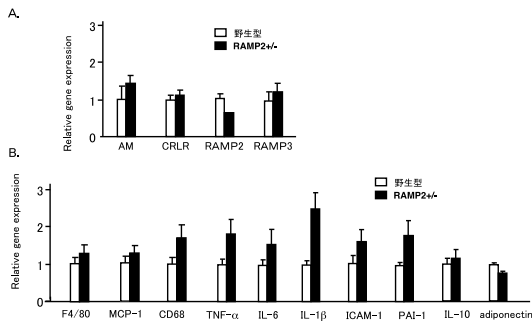


図1 高脂肪食負荷後の内臓脂肪の検討
A. RAMP2ヘテロノックアウトマウス(RAMP2^{+/-})では、脂肪組織のRAMP2発現は半減しており、AMの発現は亢進している。
B. RAMP2^{+/-}では、脂肪組織の炎症性マーカーの発現亢進を認める。

次に、RAMP2^{+/-} マウスと、野生型マウスを用い、ポリエチレンチューブのカフを大腿動脈周囲に4週間留置し、血管傷害モデルを作成し、動脈硬化病変の評価を行った。RAMP2^{+/-} マウスでは、新生内膜の形成、平滑筋増殖、炎症細胞浸潤、細胞外マトリックスの増生が亢進しており、動脈硬化病変の増悪が認められた (図 2A, B)。更に、RAMP2^{+/-} では、動脈硬化病変部に、ICAM-1、VCAM-1、MCP-1などの発現亢進を認め、傷害部位に強い炎症反応が惹起されていることが示された。また RAMP2^{+/-} では、PCNAの強発現を認め、平滑筋増殖が亢進していることが示唆された。RAMP2^{+/-} では、DHE 染色により、新生内膜が強染色され、病変部における酸化ストレスレベルの亢進が示された。また NADPH オキシダーゼのサブユニットである p67phox の強発現を認め、NADPH オキシダーゼ活性の亢進

が、傷害部位における酸化ストレス亢進の原因になっていると考えられた (図 2C)。カフ傷害モデルにおいて、RAMP2^{+/-} では、傷害後も RAMP2 の発現が強く誘導されることはなく、血管における RAMP2 の発現は、野生型の半分程度のみであった。

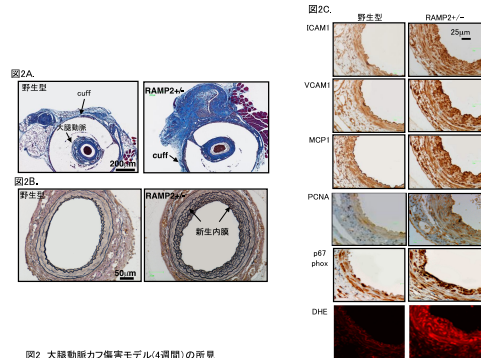


図2 大動脈カフ傷害モデル(4週間)の所見
A. Masson Trichrome染色 B. Elastica van Gieson染色
RAMP2ヘテロノックアウトマウス(RAMP2^{+/-})では、カフ周囲の内芽組織の形成と、新生内膜形成が増悪している。
C. 動脈硬化病変の免疫組織染色所見
RAMP2^{+/-}では、炎症性マーカーの発現亢進、酸化ストレスレベルの亢進、細胞増殖の亢進を認める。

次に、RAMP2 遺伝子に対する Flox マウスを、血管内皮細胞に特異的に発現する VE カドヘリン遺伝子のプロモータを用いた Cre リコンビナーゼトランスジェニックマウスと交配させることにより、血管内皮細胞特異的な RAMP2 ノックアウトマウス (E-RAMP2^{-/-}) を樹立した。E-RAMP2^{-/-} は、その約 90%が胎生中期から後期にかけて全身性の浮腫や出血を生じ致死となった。一方で、血管の RAMP2 発現が2割程度残存する E-RAMP2^{-/-} では、成体が得られた。成体の E-RAMP2^{-/-} では、加齢と共に、肺、肝臓、腎臓などの主要臓器の血管周囲に、著明な炎症細胞浸潤 (図 3A) と、血管を中心とした線維化 (図 3B) や組織酸化ストレスレベルの亢進 (図 3C) が認められた。

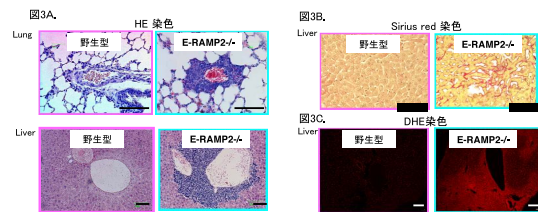


図3 血管内皮細胞特異的RAMP2ノックアウトマウス(E-RAMP2^{-/-})における血管、臓器障害
E-RAMP2^{-/-}では、肺、肝臓などの主要臓器内の血管周囲に、著明な炎症細胞浸潤(A)と、血管を中心とした線維化(B)や、組織酸化ストレスレベルの亢進(C)が認められる。(Bar=100 μ m)

AM は血圧低下作用、体液量調節作用の他、抗動脈硬化作用、抗炎症作用、抗酸化作用などを介して、メタボリックシンドロームや血管合併症の病態の各局面において、生体に防御的に作用していると考えられる。本研究で、我々は、RAMP2 ノックアウトマウスで、AM ノ

ックアウトマウスに認められた重要な代謝系、血管系の表現型が再現されることを確認した。以上の結果は、RAMP2 単独欠損で、代謝系、血管系における主要な AM シグナルが遮断されることを示すものである。逆に、RAMP2 を標的とすることで、AM の生理作用を制御できる可能性があり、RAMP2 は、AM に代わる治療標的となる可能性がある。AM-RAMP2 システムの分子メカニズムに立脚した治療薬が開発されれば、メタボリックシンドロームの様々な病態を包括的に改善する、新たな治療法開発への展開が期待される。

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 7 件)

1. Iinuma N, Sakurai T, Kamiyoshi A, Ichikawa-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(5) 865-71. 2010 (査読有)
2. Takeda N, Manabe I, Uchino Y, Eguchi K, Matsumoto S, Nishimura S, Shindo T, Nagai R. Cardiac fibroblasts are essential for the adaptive response of the murine heart to pressure overload. *J Clin Invest*. 120 (1) 254-65. 2010 (査読有)
3. Kamiyoshi A, Sakurai T, Ichikawa-Shindo Y, Iinuma N, Kawate H, Yoshizawa T, Koyama T, Muto S, Shindo T. Endogenous α -CGRP mitigates liver fibrosis in chronic hepatitis induced by repeated administration of concanavalin A. *Liver International*. 29 (5) 642-9. 2009 (査読有)
4. Ichikawa-Shindo Y, Sakurai T, Kamiyoshi A, Kawate H, Iinuma N, Yoshizawa T, Koyama T, Fukuchi J, Iimuro S, Moriyama N, Kawakami H, Murata T, Kangawa K, Nagai R, Shindo T. GPCR modulator protein RAMP2 is essential for angiogenesis and vascular integrity. *J Clin Invest*. 118, 29-39. 2008 (査読有)

5. Sakurai T, Kamiyoshi A, Watanabe S, Sato M, Shindo T.

Rapid zygosity determination in mice by SYBR Green real-time genomic PCR of a crude DNA solution.

Transgenic Res. 17, 149-55. 2008

(査読有)

6. Kusano S, Kukimoto-Niino M, Akasaka R, Toyama M, Terada T, Shirouzu M, Shindo T, Yokoyama S.

Crystal structure of the human receptor activity-modifying protein 1 extracellular domain.

Protein Sci. 17(11):1907-14. 2008

(査読有)

7. Higashikawa A, Manabe I, Shindo T, Yamada T, Kugimiya F, Ikeda T, Kawamura N, Kawasaki Y, Tsushima K, Takeda N, Nagai R, Hoshi K, Nakamura K, Chung UI, Kawaguchi H.

Kruppel-like factor 5 causes cartilage degradation through transactivation of matrix metalloproteinase 9.

J Biol Chem. 283(36):24682-9. 2008

(査読有)

[学会発表] (計 11 件)

1. 2010年8月29日 7th International Symposia on the CGRP クイーンズタウン 招待講演 Vasoactive peptides and their receptor regulation system. 新藤隆行
2. 2010年7月9日第28回内分泌代謝学サマナーセミナー 長崎 招待講演 Pathophysiological roles and potential applications of vasoactive peptides and their receptor regulation system. 新藤隆行
3. 2010年4月24日 第14回日本神経麻酔・集中治療研究会 松本 特別講演 心脈管作動性物質による臓器保護作用とその応用 新藤隆行
4. 2010年4月1日 International Symposium on Cardiovascular Endocrinology and Metabolism 奈良 招待講演 RAMP2 is the Key Determinant of the Vascular Functions of Adrenomedullin 新藤隆行

5. 2009年7月9日 第24回老化促進モデルマウス(SAM)研究協議会 松本
特別講演 アドレノメデュリンとその受容体システム 新藤隆行

6. 2009年5月8日 第6回GPCR研究会 東京
基調講演 アドレノメデュリン受容体活性調節システムとその病態生理学的意義
新藤隆行

7. 2009年4月4日 第6回CEMフォーラム 京都
招待講演 アドレノメデュリン受容体活性調節システムとその病態生理学的意義
新藤隆行

8. 2009年2月16日 第16回高血圧・心血管医学内科セミナー 前橋
招待講演 研究最前線 心血管作動性物質とその病態生理学的意義
新藤隆行

9. 2008年9月1日 第57回 福岡心臓血管研究会 福岡
招待講演 発生および病態におけるアドレノメデュリン-RAMP システムの意義
新藤隆行

10. 2008年8月8日 第1回臨床研究フォーラム招待講演 静岡
招待講演 発生および病態におけるアドレノメデュリン-RAMP システムの意義
新藤隆行

11. 2008年5月3日 Cardiovascular Expert Forum ソウル
招待講演 Pathophysiological roles of Adrenomedullin-RAMP system in cardiovascular diseases
新藤隆行

[その他]

ホームページアドレス

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

新藤 隆行 (SHINDO TAKAYUKI)
信州大学・医学系研究科・教授
研究者番号：90345215

(2) 研究分担者

桜井 敬之 (SAKURAI TAKAYUKI)
信州大学・医学系研究科・准教授
研究者番号：80317825

下澤 達雄 (SHIMOZAWA TATSUO)
東京大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：90231365

村田 敏規 (MURATA TOSHINORI)
信州大学・医学部・教授
研究者番号：50253406