

令和 6 年 9 月 11 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02669

研究課題名（和文）受容体活性調節システムによる生体内恒常性制御機構の解明と創薬への展開

研究課題名（英文）Regulation of homeostasis in the body by receptor activity-modifying system and its application to drug discovery

研究代表者

新藤 隆行（Shindo, Takayuki）

信州大学・学術研究院医学系・教授

研究者番号：90345215

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,300,000円

研究成果の概要（和文）：我々は、生体内の恒常性維持を司る、「生理活性因子の情報制御システム」=「アドレノメデュリン(AM)-RAMP系」を、生活習慣病や慢性臓器障害の新たな治療標的として注目した。

本研究では、我々のこれまでの研究基盤に基づき、心血管系および代謝系におけるRAMP2とRAMP3の機能分化の解明を進めた。さらに、AM-RAMP系の制御法を生活習慣病と慢性臓器不全に対する創薬に展開するため、RAMPに結合する低分子化合物の探索を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

超高齢化社会に突入した我が国においては、生活習慣病や慢性臓器障害への医学的対策が喫緊の課題である。AM-RAMP系の様な生体内恒常性を制御するシステムを統合的に理解し、人為的に介入、操作することができれば、生活習慣病や慢性臓器障害に対する新しい創薬のパラダイムになると期待される。

本研究成果により、AM-RAMP系を治療標的として応用展開する足掛かりが得られた。

研究成果の概要（英文）： We have focused on the “adrenomedullin (AM)-RAMP system” as a novel therapeutic target for lifestyle-related diseases and chronic organ damage.

In this study, based on our previous research foundation, we elucidated the functional differentiation of RAMP2 and RAMP3 in cardiovascular and metabolic systems. Furthermore, we searched for small-molecule compounds that bind to RAMPs to apply the regulation of the AM-RAMP system to drug discovery for lifestyle-related diseases and chronic organ failure.

研究分野：循環病態学

キーワード：受容体活性調節タンパク 恒常性 生活習慣病 慢性臓器障害 創薬

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C-19、F-19-1(共通)

1. 研究開始当初の背景

生活習慣病や慢性臓器障害の新規治療戦略のためには、生体内恒常性制御のメカニズムの包括的な解析を進め、病態の本質を解明することが不可欠である。我々は、生体内の恒常性維持を司る、「生理活性因子の情報制御システム」=「AM-RAMP系」に着目した。

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る。AMは血管拡張作用をはじめ、多彩な生理活性を有する。我々はこれまで主として循環系調節ホルモンとして捉えられてきたAMが、エネルギー代謝や、小胞体ストレス制御などにより、各細胞や臓器の恒常性そのものに必須の因子であることを明らかとした。AMは臓器保護作用、組織再生作用、抗炎症作用などの多彩な生理活性を有し、その応用が期待されている。我々はAMの機能の多様性を制御するメカニズムを解明するため、AMの受容体システムに着目した。

AMは、カルシトニン、CGRP、アミンなど分子進化的に類縁の関係にあり、これらのペプチドは、カルシトニンスーパーファミリーと呼ばれる。カルシトニンスーパーファミリーは、受容体として、7回膜貫通型Gタンパク共役型受容体CLRを部分的に共有している。CLRには、一回膜貫通型タンパクRAMPが1対1で結合する。RAMPには複数のサブアイソフォームが存在する。我々は、AMがインプットとしてもたらした情報を、各RAMPサブアイソフォームが受容体活性調節因子として、巧妙に情報処理、翻訳を行うことで、アウトプットとしての生理機能の多様性を生み出していると考えた。

2. 研究の目的

本研究では、我々のこれまでの研究基盤に基づき、心血管系疾患、代謝系疾患を中心に、RAMPシステムの障害に伴い、生体内外からのストレスへの応答不全・破綻から引き起こされる病態のメカニズムを解明すると共に、RAMPシステムの制御法を開発し、生活習慣病と慢性臓器不全に対する創薬に展開することを目的とした。

3. 研究の方法

AMの生理機能は、主としてAMの受容体活性調節タンパクRAMP2あるいはRAMP3によって制御されている。しかしながら、従来、RAMP2とRAMP3の機能分化や病態生理学的意義の差異は不明であった。本研究では、RAMP2とRAMP3について、胎生期から全身で遺伝子欠損させたマウス、あるいは成体において各組織特異的に遺伝子欠損を誘導できるマウスを樹立し、心血管系、代謝系の変化を検討し、両者の機能分化を検討した。

4. 研究成果

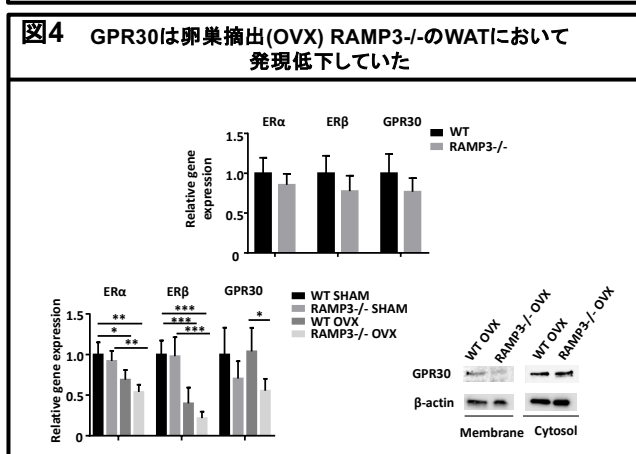
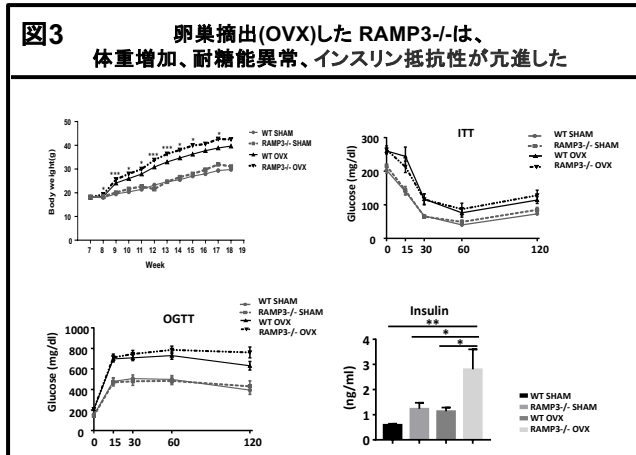
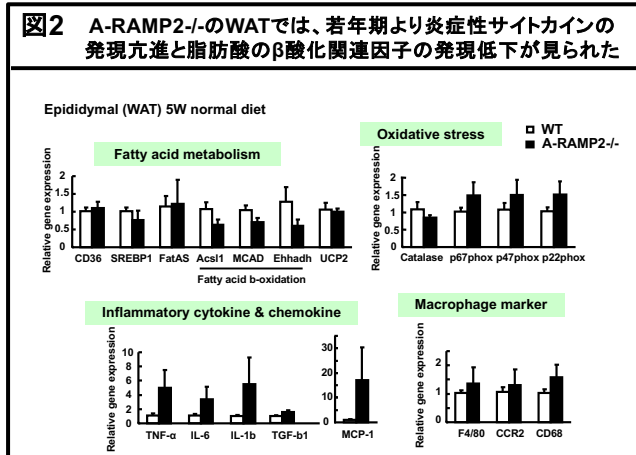
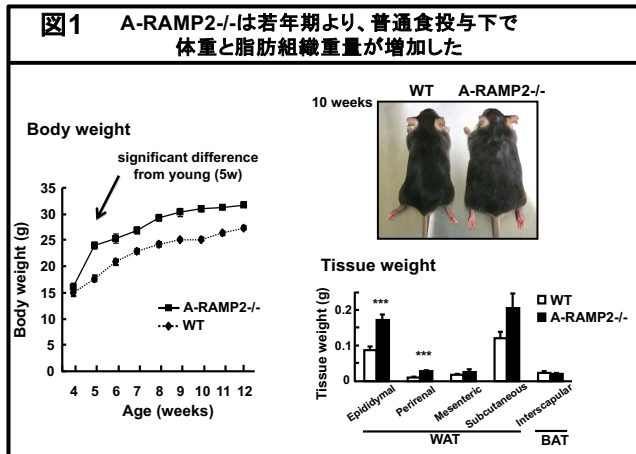
(1) 代謝制御における AM-RAMP2 系と AM-RAMP3 系の機能分化 (図 1-図 4)

我々はこれまで、AM-RAMP 系の心血管系恒常性維持作用を明らかとしてきた。一方、AM と RAMP は共に、代謝系臓器においても高発現が認められる。本研究では、AM-RAMP2 系および AM-RAMP3 系の代謝制御における役割を検討した。

脂肪細胞特異的 RAMP2 ノックアウトマウス (A-RAMP2^{-/-}) オスは、通常食下でも 5 週齢の若年期から体重増加を認め、内臓脂肪型肥満を呈した。呼吸ガス分析では、終日、酸素およびエネルギー消費量低下、呼吸商上昇を認め、脂肪が消費されにくく、肥満が誘発されていると考えられた。内臓脂肪では、脂肪細胞の肥大、炎症細胞浸潤の亢進、著明な線維化を認め、炎症性サイトカイン、ケモカインの著明な発現亢進と、脂肪酸 β 酸化系酵素の発現低下を認め、脂質代謝障害による脂肪細胞肥大と共に、脂肪組織における慢性炎症が惹起されていると考えられた。

これに対し、RAMP3 ノックアウトマウス (RAMP3^{-/-}) オスに対して高脂肪食負荷を行ったところ、野生型マウスと比較して、体重に大きな変化は認められなかった。そこで RAMP3^{-/-}メスに対して卵巣摘出(OVX)と高脂肪食負荷を行なったところ、内臓脂肪型肥満による体重増加が認められ、脂肪肝の増悪、インスリン抵抗性亢進を認めた。RAMP3 はエストロゲンの膜型受容体である GPR30 に結合したことから、エストロゲンと AM-RAMP3 系のクロストークが予想された。

以上の結果から、AM-RAMP2 系、AM-RAMP3 系共に、代謝制御において重要な役割を有することが明らかとなった。一方で、両者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った。



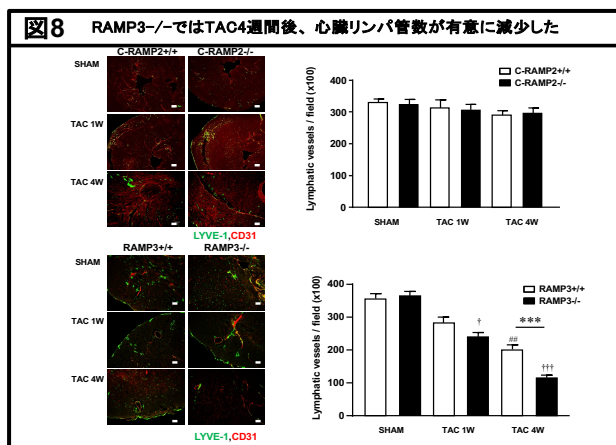
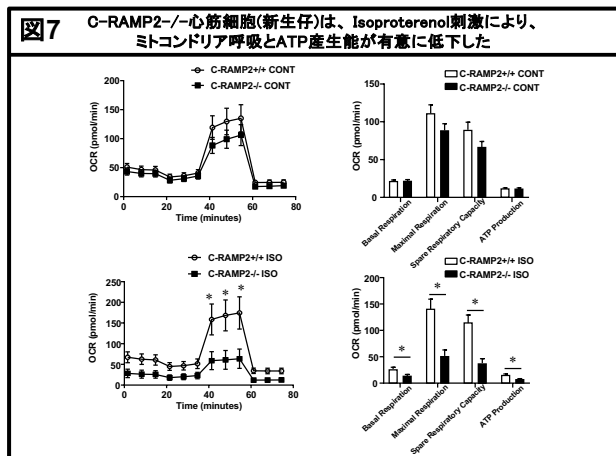
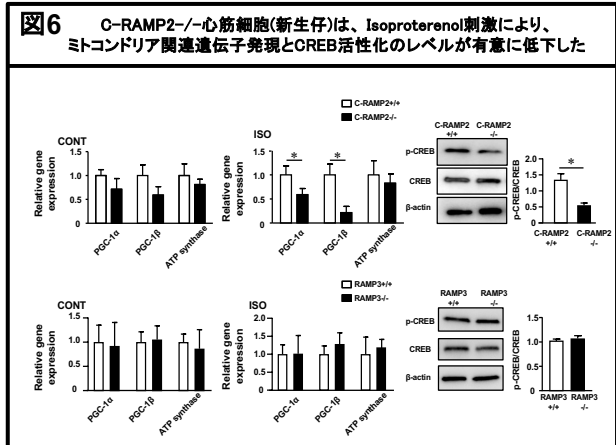
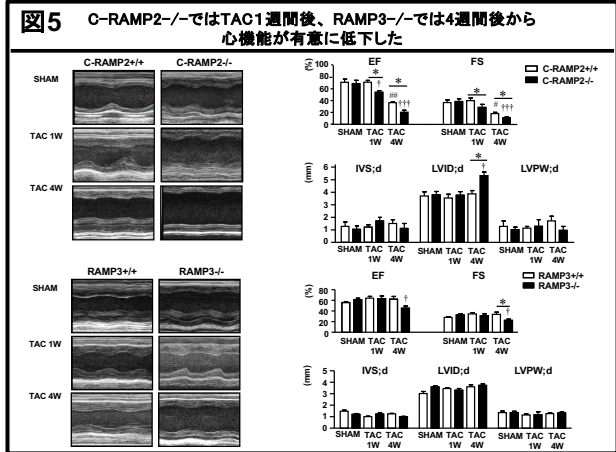
(2) 心臓恒常性制御におけるAM-RAMP2系とAM-RAMP3系の機能分化 (図5-図8)

これまで我々は、誘導型心筋細胞特異的 RAMP2 ノックアウトマウス(DI-C-RAMP2^{-/-})では、拡張型心筋症様の心不全が自然発症し、心筋ミトコンドリアに特徴的な異常所見を認めることを報告してきた。一方で、心臓においては RAMP2 のみならず、RAMP3 も発現しているが、AM-RAMP2 系と、AM-RAMP3 系の機能分化や協調作用などについては不明であった。そこで本研究では、心筋細胞特異的 RAMP2 および RAMP3 ノックアウトマウス(-/-)を用いて、横行大動脈縮窄術(TAC)を施行し、心血管系ストレス応答における両者の意義を検討した。

心筋細胞特異的 RAMP2 ノックアウトマウス(C-RAMP2^{-/-})では、TAC7 日目の早期から、心機能低下、心肥大、線維化が亢進した。C-RAMP2^{-/-}の心臓では、アポトーシスの増加とミトコンドリアの形態異常を認め、カルシウムトランジェントの低下が確認された。C-RAMP2^{-/-}心筋細胞では、イソプロテレノール負荷後、ミトコンドリア数の減少、ミトコンドリア膜電位低下が見られた。また C-RAMP2^{-/-}ではミトコンドリア呼吸能の低下が確認された。C-RAMP2^{-/-}では CREB の活性低下と PGC-1 α の発現低下を認め、これらがミトコンドリア機能異常につながったと考えられた。

一方、RAMP3^{-/-}では、TAC 後 28 日目の後期になってはじめて、心機能の低下が認められた。RAMP3^{-/-}では、ミトコンドリアの異常は確認できなかったが、LYVE-1 免疫染色陽性のリンパ管数の減少と、リンパ管内皮細胞のギャップジャンクションタンパクであるコネキシン 43 の発現低下を認めた。

以上の結果から、AM-RAMP2 系は心筋細胞のミトコンドリア機能維持に必須であり、ストレス応答の早期から必要であるのに対し、AM-RAMP3 系はリンパ管の恒常性制御により、より後期の段階でのストレス応答に必要であるという機能分化が明らかとなった。



(3) RAMP を標的とした創薬への展開

各々の RAMP サブタイプに特異的に結合する低分子化合物はこれまでに存在しない。本研究では、RAMP 各サブアイソフォームを生活習慣病や慢性臓器障害の新しい治療標的と想定し、RAMP 各サブアイソフォームの活性を特異的に調整することができる化合物の探索を進めた。

化合物ライブラリーの中から、RAMP2 に結合する低分子化合物のスクリーニングを行った。さらに RAMP2 タンパクの細胞外ドメインの構造解析データを用いたドッキング計算を行い、候補化合物を化合物ライブラリーの中から選択した。さらに CLR と RAMP2 の安定過剰発現細胞株を作成し、時間分解蛍光 TR-FRET 法によって細胞内 cAMP レベルを定量化するアッセイ系を構築した。

一方、ヒト由来 RAMP2 とヒト由来 CLR の細胞外領域同士の複合体に低分子化合物が結合した立体構造情報を得るために、目的タンパク質の発現および精製条件を検討した。RAMP2・CLR 複合体は、酸化還元比調節下でジスルフィドイソメラーゼを存在させた無細胞タンパク質合成系にて共合成した。目的物を含む可溶性画分から、アフィニティクロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィーを一連とするカラムクロマトグラフィー法により夾雑物を取り除き、高純度の RAMP2・CLR 複合体試料を得ることができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

| | |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名 Sakurai T, Shindo T. | 4. 巻 2 |
| 2. 論文標題 Production of single- and multiple-gene-modified mice via maternal SpCas9-based gene editing. | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 STAR Protoc. | 6. 最初と最後の頁 100509 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.xpro.2021.100509. | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Wei Y, Tanaka M, Sakurai T, Kamiyoshi A, Ichikawa-Shindo Y, Kawate H, Cui N, Kakiyama S, Zhao Y, Aruga K, Sanjo H, Shindo T. | 4. 巻 162 |
| 2. 論文標題 Adrenomedullin-RAMP2 system ameliorates pulmonary fibrosis by regulating TGF-beta-Smads signaling and myofibroblast differentiation. | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Endocrinology | 6. 最初と最後の頁 1-22 |
| 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 Cui N, Sakurai T, Kamiyoshi A, Ichikawa-Shindo Y, Kawate H, Tanaka M, Tanaka M, Wei Y, Kakiyama S, Zhao Y, Aruga K, Kawagishi H, Nakada T, Yamada M, Shindo T. | 4. 巻 162 |
| 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 1-20 |
| 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 Tanaka M, Kakiyama 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 M, Shindo T. | 4. 巻 191 |
| 2. 論文標題 Adrenomedullin-RAMP2 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 Koyama T, Kuriyama N, Suzuki Y, Saito S, Tanaka R, Iwao M, Tanaka M, Maki T, Itoh H, Ihara M, Shindo T, Uehara R. | 4. 巻 11 |
| 2. 論文標題 Mid-regional pro-adrenomedullin is a novel biomarker for arterial stiffness as the criterion for vascular failure in a cross-sectional study. | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Sci Rep. | 6. 最初と最後の頁 305 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-79525-2. | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である) | 国際共著 - |

[学会発表] 計5件(うち招待講演 1件/うち国際学会 1件)

| |
|--|
| 1. 発表者名 崔南奇、桜井敬之、神吉昭子、新藤優佳、河手久香、新藤隆行 |
| 2. 発表標題 心血管系ストレス応答における、アドレノメデュリン-RAMP2系・RAMP3系の機能分化 |
| 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 Kakihara S, Tanaka M, Hirabayash K, Imai A, Toriyama Y, Iesato Y, Sakurai T, Kamiyoshi A, Kawate H, Ichikawa-Shindo Y, Tanaka M, Murata T, Shindo T. |
| 2. 発表標題 Pathophysiological roles of adrenomedullin-2 in mouse model of ocular neovascularization. |
| 3. 学会等名 The Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) 2021 (国際学会) |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 新藤隆行 |
| 2. 発表標題 アドレノメデュリンとその受容体活性調節システムによる生体内恒常性制御 |
| 3. 学会等名 第50回日本心脈管作動物質学会(招待講演) |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 田中愛、桜井敬之、神吉昭子、市川優佳、河手久香、柿原伸次、Zhao Yunlu、松田順繁、有賀公亮、新藤隆行 |
| 2. 発表標題 AM-RAMP2系による高内皮細静脈の機能制御とリンパ行性転移抑制作用 |
| 3. 学会等名 第25回日本心血管内分泌代謝学 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Tanaka M, Sakurai T, Kamiyoshi A, Ichikawa-Shindo Y, Hisaka K, Kakiyama S, Zhao Y, Matsuda Y, Aruga K, Kasahara T, Shindo T. |
| 2. 発表標題 Homeostatic regulation of high endothelial venules and suppression of lymphatic metastasis by adrenomedullin-RAMP2 system. |
| 3. 学会等名 第86回日本循環器学会 |
| 4. 発表年 2021年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

| |
|--|
| 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 |
|-------|---|--------------------------------------|----|
| 研究分担者 | 横山 茂之 (Yokoyama Shigeyuki) (00159229) | 信州大学・医学部・特任教授 (13601) | |

6. 研究組織（つづき）

| | 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 |
|-------|---|--------------------------------------|----|
| 研究分担者 | 村田 敏規 (Murata Toshinori) (50253406) | 信州大学・学術研究院医学系・教授 (13601) | |
| 研究分担者 | 桜井 敬之 (Sakurai Takayuki) (80317825) | 信州大学・学術研究院医学系・准教授 (13601) | |
| 研究分担者 | 神吉 昭子 (Kamiyoshi Akiko) (10397309) | 信州大学・学術研究院医学系・助教 (13601) | |

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