

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月31日現在

機関番号：13601

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23790288

研究課題名（和文） AM-RAMP2系による肝臓脂質代謝制御とメタボリックシンドロームにおける意義

研究課題名（英文） Metabolic regulations by adrenomedullin-RAMP2 system

## 研究代表者

神吉 昭子（KAMIYOSHI AKIKO）

信州大学・医学系研究科・助教

研究者番号：10397309

研究成果の概要（和文）：アドレノメデュリン（AM）は、血管拡張作用をはじめ多彩な生理作用を有する内因性ペプチドである。AMの受容体活性調節タンパクであるRAMP2ヘテロノックアウトマウスの高脂肪食投与による肥満誘導モデルの解析と、脂肪細胞特異的なRAMP2ノックアウトマウスの作成・解析を行い、AM-RAMP2システムが脂質代謝制御とメタボリックシンドロームの発症および脂肪細胞の分化に関与することを示した。

研究成果の概要（英文）：Adrenomedullin (AM) is a vasodilating peptide. Receptor activity-modifying protein 2 (RAMP2) is the critical determinant of vascular functions of AM. In high-fat diet fed RAMP2 heterozygous knockout mice and adipocyte-specific RAMP2 knockout mice analysis, these observations indicate that AM-RAMP2 system play critical roles in the regulation of glucose and lipid metabolism and adipocyte development.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：実験動物学

科研費の分科・細目：基礎医学・薬理学一般

キーワード：生理活性物質、メタボリックシンドローム

## 1. 研究開始当初の背景

(1) アドレノメデュリン（AM）は、血管をはじめとした全身の組織で産生され、強力な血管拡張作用や、抗酸化作用、抗炎症作用、抗動脈硬化作用など多彩な生理活性を有する内因性ペプチドである。

AMと生活習慣病を含む多くの病態との関連も報告されており、AMの治療応用が期待されている。これまでに、AMとその受容体が脂肪組織に発現し、脂質代謝経路に関与していることが報告されている。さらに我々は、AMとその受容体が肝臓の類洞内皮細胞にも発現し、肝障害に対する保護作用を持つことを明らかにした（Peptides 31:865-71, 2010）。一方で、肝臓におけるAMの脂質代謝をはじめとした代謝制御における意義は明らかに

なっていない。

(2) AMはペプチドであり血中半減期が短いため、それ自体を慢性疾患の治療薬として利用することは難しい。そこで我々は、AMの受容体システムに着目した。AM受容体は7回膜貫通型受容体CLRと1回膜貫通型の受容体活性調節タンパクRAMP2またはRAMP3よりなる。我々は特にRAMP2に着目し、RAMP2ノックアウトマウスを樹立し（J Clin Invest 118:29-39, 2008）、RAMP2ホモノックアウトマウスは胎生致死であり、心血管系の異常が認められることを示した。このことは、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を示している。

(3) 我々は、AM-RAMP2 システムの代謝制御における意義を検討するため、RAMP2 ヘテロノックアウトマウス (RAMP2<sup>+/-</sup>) を用いて、肥満病態における反応性を検討した。その結果、高脂肪食投与による肥満誘導モデルにおいて、RAMP2<sup>+/-</sup>は野生型マウスと比較して、脂肪細胞の肥大と脂肪組織への炎症細胞浸潤の亢進とともに、脂肪肝が増悪することを見いだした。脂肪細胞の肥大化や臓器への脂肪蓄積が過剰になると、代謝制御機構の破綻が生じることから、AM-RAMP2 システムがメタボリックシンドロームの発症に大きく関与している可能性が考えられる。

## 2. 研究の目的

近年、動脈硬化及び心血管疾患発症の原因として、肥満を背景としたメタボリックシンドロームが注目されているが、メタボリックシンドロームの発症や病態における AM の意義は明らかでない。

RAMP2<sup>+/-</sup>の高脂肪食投与による肥満誘導モデル、及び脂肪細胞特異的な RAMP2 ノックアウトマウス (AR2KO) の樹立と解析を行い、AM-RAMP2 システムによる炎症・肝臓脂質代謝制御とメタボリックシンドロームにおける意義を解明し、新たな治療法開発への展開をはかることを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) RAMP2<sup>+/-</sup>の高脂肪食投与肥満誘導モデルの解析

RAMP2<sup>+/-</sup>と野生型マウスに、8 週齢から 10 週間高脂肪食 (32%脂肪含有飼料; HFD32) を投与した。10 週間後、経口ブドウ糖負荷試験 (OGTT) とインスリン負荷試験 (ITT) を行い、インスリン抵抗性を調べた。体重を経時的に測定し、解剖時に採血、各脂肪組織重量測定、組織 (白色脂肪組織、肝臓など) のサンプリングを行った。

白色脂肪組織、肝臓の病理染色 (HE 染色、F4/80 染色、オイルレッド O 染色)、及びリアルタイム PCR により遺伝子発現解析 (炎症性サイトカイン、マクロファージマーカーなど) を行った。

### (2) 脂肪細胞特異的 RAMP2 ノックアウトマウス (AR2KO) の作成と表現型解析

脂肪細胞特異的に Cre を発現する aP2Cre マウスと RAMP2<sup>flxed</sup> マウスを交配し、脂肪細胞特異的 RAMP2 ノックアウトマウス (AR2KO) を作成した。体重を経時的に測定し、解剖時に各脂肪組織重量を測定、組織 (白色脂肪組織、肝臓など) のサンプリングを行った。

白色脂肪組織の病理染色 (HE 染色、F4/80 染色)、及びリアルタイム PCR により遺伝子発現解析 (炎症性サイトカイン、酸化ストレ

ス、脂肪酸代謝関連遺伝子など) を行った。

## 4. 研究成果

### (1) RAMP2<sup>+/-</sup>の高脂肪食投与肥満誘導モデルの解析

RAMP2<sup>+/-</sup>は野生型マウスと比較して、体重の増加と白色脂肪組織重量の増加の傾向が見られた。

RAMP2<sup>+/-</sup>は野生型マウスと比較して、白色脂肪細胞の肥大と白色脂肪組織への炎症細胞浸潤の亢進、炎症性サイトカイン (TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$ ) の発現増加が見られた。また、RAMP2<sup>+/-</sup>は野生型マウスと比較して、肝臓の炎症性サイトカイン (IL-6、IL-1 $\beta$ ) の発現増加傾向と脂肪肝の増悪が観察された (図 1)。

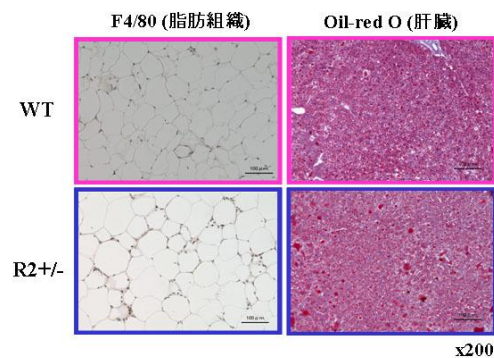


図 1

OGTT、ITT の結果から、RAMP2<sup>+/-</sup>は野生型マウスと比較して、グルコース値とインスリン値が高値であり、インスリン抵抗性を示した (図 2)。また、血中アディポネクチンの低下とレプチンの上昇を示した。

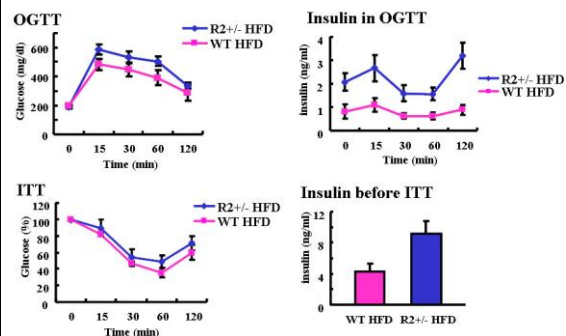


図 2

(1) の結果から、糖代謝と脂質代謝制御に AM-RAMP2 システムが関与していることが示唆された。

### (2) 脂肪細胞特異的 RAMP2 ノックアウトマウス (AR2KO) の表現型解析

普通食投与時において、AR2KO は野生型マ

ウスと比較して、体重と白色脂肪組織重量の有意な増加が認められた (図 3)。

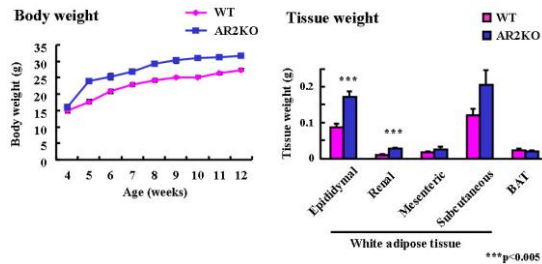


図 3

また、AR2KO で白色脂肪細胞の肥大と白色脂肪組織への炎症性細胞浸潤の亢進が見られた (図 4)。白色脂肪組織の遺伝子発現解析より、AR2KO では炎症性サイトカイン (TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$ ) の発現上昇、酸化ストレスの上昇、及び脂肪酸代謝関連遺伝子の発現低下傾向が認められた。

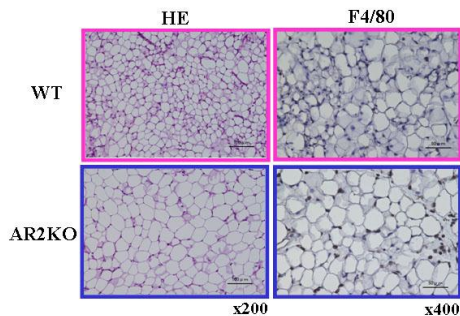


図 4

(2) の結果から、脂肪細胞の分化と代謝制御に AM-RAMP2 システムが関与していることが示唆された。

以上の結果より、AM-RAMP2 システムが脂質代謝制御とメタボリックシンドロームの発症および脂肪細胞の分化に関与することが示唆された。

RAMP2 は 1 回膜貫通型タンパクで比較的単純な構造のため、抗体医薬などの治療標的分子となる可能性が高いと考える。本研究の成果により、メタボリックシンドローム病態の治療及び予防に展開することが期待される。

## 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 6 件)

①Koyama T, Kamiyoshi A (他 20 名, 4 番目), Vascular endothelial adrenomedullin-RAMP2 system is essential for vascular integrity and organ homeostasis. *Circulation*, 127(7):842-53, 2013, 査読有

DOI:10.1161/CIRCULATIONAHA.112.000756

②Yoshizawa T, Kamiyoshi A (他 20 名, 3 番目), Novel regulation of cardiac metabolism and homeostasis by the adrenomedullin-receptor activity-modifying protein 2 system. *Hypertension*, 61(2):341-51, 2013, 査読有

DOI:10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.00647

③Yang L, Kamiyoshi A (他 12 名, 3 番目), Endogenous CGRP protects against neointimal hyperplasia following wire-induced vascular injury. *J Mol Cell Cardiol*, 59:55-66, 2013, 査読有

DOI:10.1016/j.yjmcc.2013.02.002

④Iesato Y, Kamiyoshi A (他 13 名, 4 番目), Adrenomedullin-RAMP2 system is crucially involved in retinal angiogenesis. *Am J Pathol*, 182(6):2380-90, 2013, 査読有

DOI:10.1016/j.ajpath.2013.02.015

⑤Arai T, Kamiyoshi A (他 14 名, 3 番目), Induction of LYVE-1/stabillin-2-positive liver sinusoidal endothelial-like cells from embryoid bodies by modulation of adrenomedullin-RAMP2 signaling. *Peptides*, 32(9):1855-65, 2011, 査読有

DOI:10.1016/j.peptides.2011.07.005

⑥Shindo T, Sakurai T, Kamiyoshi A, Ichikawa-Shindo Y. Adrenomedullin-RAMP2 system in cardiovascular development and homeostasis. *Current Hypertension Reviews*, 7:217-27, 2011, 査読有

[学会発表] (計 5 件)

①神吉昭子, アドレノメデュリン-RAMP2 システムの代謝制御における意義, 第 86 回日本内分泌学会, 2013.4.25, 仙台

②神吉昭子, Metabolic regulations by adrenomedullin-RAMP2 system, 第 77 回日本循環器学会, 2013.3.15, 横浜

③神吉昭子, アドレノメデュリン-RAMP2 システムの代謝制御における役割, 第 42 回日本心臓血管作動物質学会, 2013.2.8, 奈良

④Kamiyoshi A, Novel metabolic regulations by adrenomedullin-RAMP2 system. American Heart Association Scientific Sessions 2011, 2011.11.14, Orlando, USA

⑤神吉昭子, Novel metabolic regulations by adrenomedullin-RAMP2 system. 第 75 回

日本循環器学会, 2011. 8. 3, 横浜

[その他]

ホームページ等

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

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

神吉 昭子 (KAMIYOSHI AKIKO)

信州大学・医学系研究科・助教

研究者番号 : 10397309