

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：24303

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25893225

研究課題名(和文) アドレノメデュリン-RAMP2システムによる血管不全治療法の検討

研究課題名(英文) A novel therapeutic approach for vascular failure by adrenomedullin-RAMP2 system

研究代表者

小山 晃英 (Koyama, Teruhide)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：40711362

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：血管作動性ペプチドであるアドレノメデュリンの受容体活性調節蛋白(RAMP2)が血管不全の新たな治療標的となるか検討を行った。血管内皮細胞特異的RAMP2ノックアウトマウスを用いた検討では、血管障害後、コントロールマウスに比較して、新生内膜肥厚と炎症性サイトカインや酸化ストレスレベルの亢進を認めた。一方、新たに樹立した血管内皮細胞特異的RAMP2過剰発現マウスでは、コントロールマウスに比較して、血管障害部位の新生内膜形成や炎症が抑制されていた。これらのことから、RAMP2の活性を調節することにより、血管不全に対する新たな治療標的となり得ることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Adrenomedullin (AM) is a vasoactive peptide and its clinical applications are expected. AM's receptor CLR interacts with one of the receptor activity-modifying proteins (RAMP1-3). We have suggested that vascular function of AM is mainly regulated by RAMP2. To clarify whether RAMP2 could be an alternative therapeutic target of AM, we generated and analyzed genetically engineered mice of RAMP2. We found that neointimal formation after vascular injury was markedly enhanced in vascular endothelial cell-specific RAMP2 knockout mice (DI-E-RAMP2^{-/-}) compared with control mice. DI-E-RAMP2^{-/-} also showed higher degree of oxidative stress and increased expression of inflammatory cytokines. Next, we generated vascular endothelial cell-specific RAMP2-overexpressing transgenic mice (E-RAMP2Tg). Contrary, intimal hyperplasia and inflammation was suppressed in E-RAMP2Tg compared with wild-type mice. These results suggest that RAMP2 could be a novel therapeutic target for vascular failure.

研究分野：循環器内科学

キーワード：アドレノメデュリン RAMP2 血管内皮細胞 動脈硬化 血管恒常性

1. 研究開始当初の背景

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生理活性ペプチドである。AM 遺伝子ヘテロ欠損マウスでは、血圧上昇、動脈硬化や臓器障害の増悪が認められるのに対し、AM 過剰発現マウスは逆に血圧低下を認め、動脈硬化や臓器障害に抵抗性を示す。このことから AM は血圧調節作用に加え、抗動脈硬化作用、臓器保護作用を有することが明らかとなった。一方、AM 遺伝子ホモ欠損 (AM-/-) マウスは、胎生中期に血管構造の破綻を生じ、びまん性出血や浮腫で致死となることから、AM が発生における血管新生・血管構築維持に必須であることも明らかとなった(Shindo T et al. Circulation. 2001)。

現在 AM の臨床応用としては、AM の血管新生作用を応用した、重症下肢末梢動脈閉塞症に対する治験や、AM の抗炎症作用や組織修復作用を応用した、炎症性腸疾患に対する治験が行われている。AM は、多彩な生理作用を有するため、治療応用に向けての期待度が高い。一方で、血中半減期が短いため、慢性疾患の治療薬として応用するには制約がある。これに対し、受容体側の調節因子である RAMP2 を標的とすれば半減期の問題はなく、血管不全や慢性臓器障害への応用に道が拓ける。本研究の成果により、新たな治療法、予防法の開発に展開することが期待される。

これまでの研究成果

AM は臨床応用が期待される一方、血中半減期が短いため、慢性疾患への臨床応用には制限が多い。そこで申請者はこれまでに、AM の受容体システムに着目した検討を進めてきた。AM の受容体は、G タンパク共役型受容体である CLR(calcitonin receptor-like receptor)に、受容体活性調整タンパクである RAMP(receptor activity-modifying protein)が結合し、受容体としての機能が調整されている。しかしながら、複数ある RAMP のサブアイソフォームの中でも、RAMP2 遺伝子欠損 (RAMP2-/-) マウスのみにおいて、AM-/- マウス同様に血管の異常が再現され、胎生中期に全身性の著明な浮腫を生じて致死となる(Shindo Y, Koyama T et al. The Journal of Clinical Investigation 2008)。これらの結果は、発生における AM の重要な生理機能が、RAMP2 によって規定されていることをはじめて示したものであると同時に、RAMP2 が AM に代わる新たな治療標的分子となることを期待させる結果でもあった。

2. 研究の目的

(1)血管障害に対する AM-RAMP2 システムの意義

血管内皮細胞特異的 RAMP2 遺伝子欠損マウスは、血管の構造不全により、そのほとんどは胎生後期に全身性の浮腫を生じ、致死とな

る。そこで、申請者が新たに樹立に成功した薬剤誘導型血管内皮細胞特異的 RAMP2 遺伝子欠損 (DI-E-RAMP2-/-)マウスを用いて、成体になってから遺伝子欠損を誘導し、胎性致死の問題を回避する。これにより成体における血管障害モデルを用いた病態解析が可能となる。本研究では、DI-E-RAMP2-/-マウス、成体で得られる RAMP2 ヘテロノックアウト (RAMP2+/-)マウス、およびコントロールマウスにおいて、血管傷害や慢性臓器障害の病態を比較検討する。

(2)RAMP2 による血管保護作用の検討

血管内皮細胞特異的 RAMP2 過剰発現 (E-RMAP2Tg)マウスを新たに樹立する。RAMP2 過剰発現による、発生、成長の影響などに注目して表現型の解析を行う。RAMP2 過剰発現により、血管の障害に対する応答性に差異が生じるかを検討する。

3. 研究の方法

RAMP2+/-マウス、薬剤誘導型血管内皮細胞特異的 RAMP2 遺伝子欠損(DI-E-RAMP2-/-)マウスを用いて、(1)大腿動脈内にワイヤーを挿入し、血管内膜を強制剥離させて内膜肥厚を惹起させる血管ワイヤー障害モデルと、(2)大腿動脈周囲にポリエチレンチューブのカフを留置し、内膜肥厚を惹起させる血管カフ障害モデルを作製する。新生内膜形成、再内皮化、病変部の酸化ストレスレベルなどに及ぼす影響を検討する。さらに、新たに樹立する E-RMAP2Tg マウスを用いて病態モデル作製し、血管障害に対する応答性の変化を検討する。

4. 研究成果

血管ワイヤー障害 4 週間後、RAMP2+/-マウスでは野生型(WT)マウスに比較して、有意に新生内膜肥厚が亢進していた。RAMP2+/-マウスでは再内皮化が抑制され、平滑筋の増殖が亢進していた。さらに RAMP2+/-マウスでは、新生内膜および外膜でのマクロファージ浸潤が亢進しており、炎症性サイトカインの発現や酸化ストレスレベルの亢進を認めた。

次に、成体において血管内皮細胞の RAMP2 欠損を誘導することができる DI-E-RAMP2-/-マウスを用いて、内膜肥厚を惹起させる血管カフ障害モデルを作製し、検討を行った。DI-E-RAMP2-/-マウスでは WT に比較して、血管病変部の RAMP2 発現が 30%程度に低下していた。DI-E-RAMP2-/-ではコントロールマウスに比較して、新生内膜が肥厚し(下図)、炎症性サイトカインの発現や酸化ストレスレベルの亢進を認めた。

一方、E-RMAP2Tg マウスの血管では、RAMP2

動脈硬化による血管内膜肥厚モデル

DI-E-RAMP2-/-では、動脈硬化が増悪している



コントロールマウス

DI-E-RAMP2-/-マウス

の発現が約7倍に上昇していた。血管ワイヤー障害後、E-RMAP2Tg マウスはWTに比較して新生内膜形成が抑制されており、病変部のマクロファージ浸潤も抑制されていた。更にE-RMAP2Tgの血管では、IL-1 β , IL-6などの炎症サイトカインの発現低下と、NADPH oxidaseの発現低下を認めた。

以上の結果から、血管におけるAM-RAMP2系は、炎症や酸化ストレスを抑制することで、新生内膜形成を抑制し、抗動脈硬化作用を有することが明らかとなり、RAMP2が動脈硬化に対する新たな治療標的分子となる可能性が示された。

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4件)

Igarashi K, Sakurai T, Kamiyoshi A, Ichikawa-Shindo Y, Kawate H, Yamauchi A, Toriyama Y, Tanaka M, Liu T, Xian X, Imai A, Zhai L, Owa S, Koyama T, Uetake R, Ihara M, Shindo T. Pathophysiological roles of adrenomedullin-RAMP2 system in acute and chronic cerebral ischemia Peptides. 査読有, 2014 Dec;62:21-31. doi: 10.1016/j.peptides.2014.08.013. Epub 2014 Sep 22.

Shindo T, Sakurai T, Kamiyoshi A, Ichikawa-Shindo Y, Kawate H, Koyama T. Pathophysiological roles of adrenomedullin and its receptor activity modifying system Nihon Yakurigaku Zasshi. 査読有, 2014 May;143(5):232-5.

Uetake R, Sakurai T, Kamiyoshi A, Ichikawa-Shindo Y, Kawate H, Iesato Y, Yoshizawa T, Koyama T, Yang L, Toriyama Y, Yamauchi A, Igarashi K, Tanaka M, Kuwabara T, Mori K, Yanagita M, Mukoyama M, Shindo T. Adrenomedullin-RAMP2 system suppresses ER stress-induced tubule cell death and is involved in kidney protection. PLoS One. 査読有, 2014 Feb 5;9(2):e87667. doi: 10.1371/journal.pone.0087667. eCollection 2014.

小山晃英

ジャーナルトピックス 血管から老いる- 内分泌物質とホメオスタシス機構- 臨床化学、査読有、2013, Vol.42 No.4 P.355

[学会発表](計9件)

五十嵐恭子, 桜井敬之, 神吉昭子, 新藤優佳, 河手久香, 山内啓弘, 鳥山佑一, 田中愛, Liu Tian, Xian Xian, 今井章, Zhai Liuyu, 大和慎治, 小山晃英, 新藤隆行 急性および慢性脳虚血におけるAM-RAMP2系の神経保護作用

第26回日本脳循環代謝学会総会
2014年11月21-22日(岡山)

Koyama T, Sakurai T, Kamiyoshi A, Ichikawa-Shindo Y, Iinuma N, Arai T, Yoshizawa T, Iesato Y, Yang L, Uetake R, Okimura A, Yamauchi A, Tanaka M, Igarashi K, Toriyama Y, Kawate H, Shindo T. Vascular Endothelial Adrenomedullin-RAMP2 System Is Essential for Vascular Integrity and Organ Homeostasis 第46回日本動脈硬化学会
2014年7月10-11日(新宿)

田中愛, 小山晃英, 桜井敬之, 神吉昭子, 植竹龍一, 山内啓弘, 五十嵐恭子, 鳥山佑一, 劉甜, 羨鮮, 今井章, 谷口俊一郎, 新藤隆行 アドレノメデュリン-RAMP2系は、血管恒常性を維持し、「癌転移前土壌」の形成を抑制する 第35回日本炎症・再生医学会
2014年7月1-4日(万国津梁館)

山内啓弘, 桜井敬之, 神吉昭子, 河手久香, 新藤優佳, 小山晃英, 植竹龍一, 五十嵐恭子, 鳥山佑一, 田中愛, 劉甜, 羨鮮, 今井章, 新藤隆行 アドレノメデュリン受容体システムの機能分化と、血管、リンパ管の制御機構 第38回日本リンパ学会総会
2014年6月20日(北里大学薬学部コンベンションホール)

田中愛, 桜井敬之, 神吉昭子, 小山晃英, 河手久香, 新藤優佳, 植竹龍一, 山内啓弘, 五十嵐恭子, 鳥山佑一, 羨鮮, 劉甜, 今井章, 谷口俊一郎, 新藤隆行 アドレノメデュリン-RAMP2系は、転移前土壌の形成を抑制する 第87回日本内分泌学会学術総会
2014年4月24-26日(博多)

Tanaka M, Koyama T, Sakurai T, Kamiyoshi A, Shindo Y, Uetake R, Yamauchi A, Igarashi K, Toriyama Y, Xian Xian, Tian Liu, Imai A, Taniguchi S, Shindoh T. Adrenomedullin-RAMP2 System as a Novel Therapeutic Target of Tumor Angiogenesis and Metastasis 第78回日本循環器学会学術総会
2014年3月21日(東京)

Yamauchi A, Sakurai T, Kamiyoshi A, Shindo Y, Koyama T, Uetake R, Igarashi K, Toriyama

Y, Tanaka M, Imai A, Shindoh T
Pathophysiological Roles of RAMP2 and
RAMP3 in the Vascular System
第 78 回日本循環器学会学術総会
2014 年 3 月 21 日 (東京)

山内啓弘、桜井敬之、神吉昭子、小山晃英、
植竹龍一、五十嵐恭子、鳥山佑一、今井章、
新藤優佳、新藤隆行
アドレノメデュリン受容体活性調節タンパ
ク RAMP2 および RAMP3 の脈管系における機能
分化
第 17 回日本心血管内分泌代謝学会
2013 年 11 月 22 日 (大阪)

田中愛、小山晃英、桜井敬之、神吉昭子、
楊磊、植竹龍一、山内啓弘、五十嵐恭子、鳥
山佑一、新藤隆行
腫瘍血管新生と転移におけるアドレノメデ
ュリン-RAMP2 システムの病態的意義
第 17 回日本心血管内分泌代謝学会
2013 年 11 月 22 日 (大阪)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小山 晃英 (KOYAMA, Teruhide)
研究者番号：40711362
京都府立医科大学・医学研究科・助教

(2) 研究協力者

新藤 隆行 (SHINDO, Takayuki)
研究課題番号：26293183
信州大学・医学系研究科・教授