

研究課題別評価書

1. 研究課題名

受容体活性調節タンパクの機能解明と血管新生および血管合併症治療への応用

2. 氏名

新藤 隆行

3. 研究のねらい

アドレノメデュリン(AM)は、心血管系をはじめ、全身の組織で広範に産生される 52 個のアミノ酸からなるペプチドである。AM は強力な血管拡張作用を有する降圧物質として発見されたが、それ以外にも多彩な生理活性を有することが明らかとなってきた。AM と、生活習慣病を中心とした多くの病態との関連も示唆されている。

我々はこれまで AM とその関連因子の遺伝子操作動物の解析などから、これらの病態生理学的意義を検討してきた。AM ヘテロノックアウトマウス(AM+/-)では、血圧上昇や、心血管系に傷害が加わった際、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抵抗性を示すことから、AM が抗動脈硬化作用、臓器保護作用を有することを報告した。一方、AM ノックアウトマウスのホモ接合体(AM-/-)は血管の発達が未熟であり、胎生中期にびまん性出血や浮腫が原因で致死であることから、AM が血管新生そのものに必須であることを初めて明らかとした。更に成体に AM を投与したときにも血管新生促進効果が確認されることから、AM の虚血性疾患などへの治療応用も期待される。

一方、AM の受容体システムについては、巧妙な制御系が報告されている。AM とそのファミリー因子であるカルシトニン遺伝子関連ペプチド(CGRP)は、同一の G タンパク共役型受容体(GPCR)である CRLR (calcitonin receptor like receptor)を共用している。CRLR は、受容体活性調節タンパク RAMP (receptor activity modifying protein) 1、2、3 のいずれかと重合する事により、リガンドである AM や CGRP などの AM ファミリー因子との親和性が制御されており、こうした受容体システムの巧妙さが、AM の生理機能の多様性を生み出していると予想される。

本研究は、RAMP システムの病態生理学的意義とそのメカニズムを明らかにする共に、血管新生療法や、血管合併症などに対する新規治療法開発へと展開させることを目的とした。

4. 研究成果

AM-RAMP2系と血管新生

AM ノックアウトマウスが致死となる胎生中期の血管において、複数の RAMP サブアイソフォームの中でも、特に RAMP2 の発現が亢進している事に着目し、血管における AM の機能が主として RAMP2 によって制御されている可能性を考え、まず RAMP2 単独ノックアウトマウスを樹立した。RAMP2 ホモノックアウトマウス(RAMP2-/-)は、AM-/-同様、胎生中期に致死であり、AM-/-と同様の血管の発達不全と共に、著明な浮腫や出血、心嚢水貯留が認められた(図1A)。RAMP2-/-では、卵膜上を走る卵黄動脈の発達が抑制されており、電顕による観察では、卵黄動脈の血管内皮細胞の基底膜からの剥離が認められた(図1B)。また、大動脈では、血管壁の4型コラーゲン及びアクチンの発現低下が認められ、血管壁の菲薄化と、層状構造の破綻が観察された(図2)。以上の所見から、RAMP2-/-では、血管構成細胞は正常に分化するが、脆弱な血管構造のため、循環開始と共に浮腫や出血を生じることが示唆された。

次に、遺伝子発現の変化を検討したところ、RAMP2-/-では、胎児の血管における4型コラーゲンなどの基底膜構成因子、VE-カドヘリンやクロロディン 5 など、血管内皮細胞のアドヘレンスジャンクション、タイトジャンクションを構成する因子の低下が認められた。更に、RAMP2-/-においては、代償性の AM の発現亢進を認めたが、CRLR や、その他の RAMP 発現に変化を認めず、RAMP2 欠損により、血管の発生における機能的 AM 受容体が失われること、その他の RAMP サブアイソフォームとの間には機能的な相補性がなく、血管の正常な発生には、AM-RAMP2 系が必

須であることが初めて明らかとなった。

一方、RAMP2 ノックアウトマウスのヘテロ接合体(RAMP2+/-)では、血管における RAMP2 の発

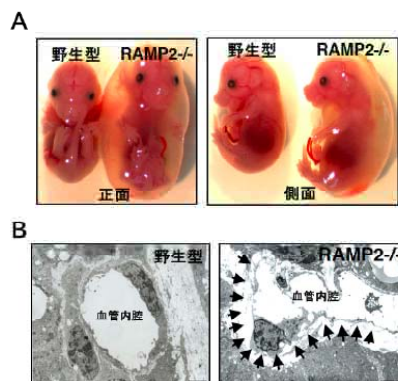


図1 RAMP2ノックアウトマウス(RAMP2-/-)胎仔の外観と血管構造の異常

A. マウス胎仔外観
B. 卵黄動脈の電顕像 Bar=2μm

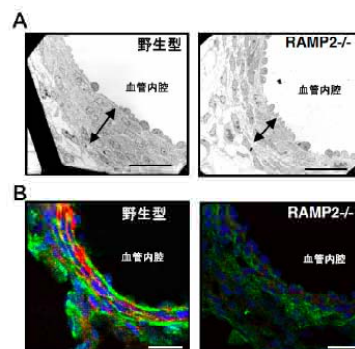


図2 RAMP2ノックアウトマウス(RAMP2-/-)胎仔の大動脈壁構造の異常

A. 血管壁の電顕像 (矢印=平滑筋層)
B. 免疫染色像 (緑=4型コラーゲン、赤=平滑筋層) Bar=25μm

現が半減していたが、大きな外観上の異常を認めず、成体が得られた。RAMP2+/-成体を用いて、マトリジェルプラグアッセイや、大動脈標本を用いた大動脈リングアッセイを行ったところ、RAMP2+/-では、野生型と比較して、血管形成の減弱が観察された。更に、AM+/-と同様に、虚血時の血管再生能の低下も観察されたことから、成体における AM の血管新生作用においても、AM-RAMP2 系が中心的役割を担っているものと考えられた。更に、RAMP2+/-成体では、ヒスタミン皮下注射による皮下浮腫モデル、傷害性脳浮腫モデルなどの各種の浮腫の病態モデルにおいて、血管透過性の亢進が認められたことから、AM-RAMP2系が、成体における血管構造安定化にも寄与していることが推測された。

次に、AM-RAMP2 系を賦活化した場合、実際に血管新生の亢進や、血管構造安定化が得られるか検討するため、ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)を細胞株化した EAh926 細胞に、RAMP2 を安定過剰発現させた細胞を樹立し、細胞機能の変化を検証した。RAMP2 過剰発現細胞では、アポトーシスが抑制されており、マトリジェル培養での管腔形成は著明に亢進していた。また、管腔形成は PI3K 阻害剤と PKA 阻害剤により抑制された。RAMP2 過剰発現細胞では、コントロール細胞に比較して、基底膜構成因子、細胞接着因子の遺伝子発現亢進が認められた。RAMP2 過剰発現内皮細胞を半透膜フィルター上で単層培養し、蛍光標識デキストランの透過を蛍光プレートリーダーで計測することで血管内皮細胞の透過性を評価した結果、RAMP2 過剰発現内皮細胞では透過性が抑制されていることが確認された。更に、過酸化水素処理後、RAMP2 過剰発現内皮細胞では、コントロール細胞と比較して、タイトジャンクション構造がより多く保たれているのが確認された。以上より、血管内皮細胞の AM-RAMP2 系を選択的に賦活化させることにより、管腔形成の亢進に加えて、血管構造の安定化が得られることが証明された。

AM-RAMP2 系を標的とすることで、従来の血管再生療法の問題であった、再生血管の退縮や、浮腫などの弱点を克服し、構造的、機能的に安定した血管を作出する新たな血管新生療法への応用、更に、AM-RAMP2 系の血管透過性抑制作用、抗浮腫作用を応用することで、難治性浮腫の新規治療法開発への展開などが視野に入る。

血管・心臓特異的ジーンターゲットによる RAMP2 の機能解析

続いて我々は、血管における RAMP2 の意義を直接明らかにするために、血管内皮細胞特異的 RAMP2 ノックアウトマウス(E-RAMP2-/-)を樹立した。E-RAMP2-/-の 95%は出生直前に致死であり、全身性の浮腫を認めた。一方で、血管の RAMP2 発現が2割程度残存する5%の E-RAMP2-/-は、成体が得られた。成体の E-RAMP2-/-では、血管壁構造の異常に加え、腎糸球体硬化症などの自然発症が認められた。さらに、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が認められた。

以上の結果から、発生段階および成体期共に、AM-RAMP2 系が、血管新生および血管恒常性維持に必須であることが明らかとなった。

一方、薬剤投与誘導型心筋特異的 RAMP2 ノックアウトマウス(C-RAMP2^{-/-})では、ターゲティング誘導後、心拡大と心拍出低下を認め、拡張型心筋症様変化が認められた。C-RAMP2^{-/-}では、心不全や線維化マーカー、ゼラチナーゼ、NADPH オキシダーゼなどの発現亢進に加え、レニン-アンジオテンシン系関連因子の発現亢進が認められた。また早期の段階で、ミトコンドリアの膨化などの異常が認められた。

以上の結果から、心筋における AM-RAMP2 系は、酸化ストレスや、心リモデリングの制御に加え、心ミトコンドリア機能維持を介して、心保護的に働いている事が明らかとなった。

5. 自己評価

本研究により、これまで、詳細が不明であった RAMP の病態生理学的意義を初めて明らかとする事が出来た。特に、AM の発生における血管新生作用が、RAMP2 によって規定されていること、成体においても、AM による血管新生、血管保護作用、臓器保護作用が RAMP2 によって制御されていることを解明したことは評価されると考える。AM は、その臨床応用が期待される一方、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応用するには多くの制約が考えられていた。本研究では、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た。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な病態を包括的に改善する、新たな治療法開発への展開も期待される。

6. 研究総括の見解

AM、RAMP2、RAMP3 の遺伝子操作マウスを用いて、AM-RAMP システムの病態生理学的意義の解析を行い、AM の血管保護作用、臓器保護作用が RAMP2 によって制御されていること、心臓では酸化ストレス、心臓リモデリング、ミトコンドリア機能維持を介する心臓保護に働くことを明らかにするなど、計画に沿って優れた成果が挙げられた。今後、RAMP2 を治療標的分子とする創薬へ向けた成果を期待したい。

7. 主な論文等

A. さきがけ個人研究者主導で得られた成果で主なもの

①論文

1. 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.
2. 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(1):149-55. 2008.
3. 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. The GPCR modulator protein RAMP2 is essential for angiogenesis and vascular integrity. *J Clin Invest.* 118(1):29-39. 2008.
4. Kamiyoshi A, Sakurai T, Shindo Y, Iinuma N, Kawate H, Yoshizawa T, Koyama T, Muto S, Shindo T. Endogenous α -calcitonin gene-related peptide mitigates liver fibrosis in chronic hepatitis induced by repeated administration of concanavalin A. *Liver Int.* 29(5):642-9. 2009.
5. 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.* (in press). 2010.

②特許

研究期間累積件数:2 件

発 明 者:新藤隆行

発明の名称:代謝症候群の治療もしくは予防剤、検査方法、検査薬、及び代謝症候群
の治療薬の候補化合物のスクリーニング方法

出 願 人:科学技術振興機構

1. 国内出願 出願日:2007 年 11 月 26 日

2. 国際出願 出願日:2008 年 11 月 21 日

③受賞

1. 第 21 回国際高血圧学会 JSH Award(2006 年 10 月 15 日)

2. 第 2 回 Vascular Biology Innovation Conference 最優秀賞(2007 年 8 月 26 日)

3. 第 13 回高峰譲吉研究奨励賞(2009 年 10 月 23 日)

B. 本研究課題に関連した成果で主なもの

①招待講演

1. Takayuki Shindo, Pathophysiological roles of Adrenomedullin-RAMP system in cardiovascular diseases, CV Expert Forum, Seoul, Korea (2008/5/3)

2. 新藤隆行、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、第 1 回臨床研究フォーラム(静岡)(2008 年 8 月 9 日)

3. 新藤隆行、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、第 6 回 CEM フォーラム(京都)(2009 年 4 月 4 日)

4. 新藤隆行、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、第 6 回 GPCR 研究会基調講演、(東京)(2009 年 5 月 8 日)

5. Takayuki Shindo, RAMP2 is the Key Determinant of the Vascular Functions of Adrenomedullin, CVEM2010, Nara, Japan (2010/4/1)