

卷頭総説

卷頭総説

アドレノメデュリンの機能の多様性を制御する受容体活性調節タンパクRAMPサブアイソフォームとその機能分化

新藤 隆行

信州大学 医学部医学科 循環病態学教室

アドレノメデュリン (AM) と受容体活性調節タンパク (RAMP)

生体は生体内恒常性維持のために、精巧な情報伝達因子と情報制御のシステムを構築しており、それらの機能不全や破綻は、様々な疾患の発症につながると考えられる。中でも液性生理活性因子は、全身の様々な細胞・臓器で産生され、生体内の恒常性維持と臓器間連携における情報伝達因子の役割を果たしている。アドレノメデュリン (Adrenomedullin : AM) はヒト褐色細胞腫から発見された52個のアミノ酸からなる生理活性ペプチドであり、分子内に6個のアミノ酸よりなるリング構造と、C末端にアミド基を有するのが特徴的である^[1]。AMは、血管拡張性物質として発見されたが、その後の研究から、血管拡張作用以外にも、多彩な生理作用を有することが明らかとなってきた^[2]。AMは生体内に広範囲に分布しており、血管においては内皮細胞のアポトーシスの抑制、抗動脈硬化作用、血管新生作用、心臓においては冠血流量増加、心肥大や線維化の抑制、肺においては気管支拡張作用、腎臓においては腎血流量の増加や利尿作用など、様々な作用を有する。最近、炎症性腸疾患患者にAMを投与することで症状が寛解することが報告され、AMの臨床応用も期待されている^[3, 4]。

一方、AMをはじめとした生理活性ペプチドは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制約もある。そこで我々が注目しているのが、AMの受容体システムである。AMは分子進化的にカルシトニン、アミリンなどのペプチドと近接な関係に

あると考えられ、これらはカルシトニンスーパーファミリーと呼ばれている。カルシトニンスーパーファミリーに属するペプチドは、部分的にその受容体システムを共有している。すなわち、7回膜貫通型Gタンパク共役型受容体であるcalcitonin receptor-like receptor (CLR) に対して、受容体活性調節タンパクreceptor activity-modifying protein (RAMP) のサブアイソフォームが1対1で結合することで、これらのペプチドに対する受容体として機能する様になる。中でも、CLRとRAMP1の組み合わせがカルシトニン遺伝子関連ペプチド (CGRP) に対して親和性が強く、CLRとRAMP2またはRAMP3の組み合わせがAMに対して親和性が高いことがよく知られている^[5]。RAMPサブアイソフォーム間のアミノ酸相同性は約30%程度と低い。各RAMPは長い細胞外ドメインを有するのが特徴で、CLRの細胞外ドメインと相互作用し、これらのペプチドの結合を制御していると考えられている。いずれのRAMPサブアイソフォームも生体内に広く分布している。本稿では、AMとそのファミリー因子の生理作用の多様性を制御しているRAMP、特にRAMP2とRAMP3を中心に、遺伝子改変マウスなどの解析から明らかとなってきた両者の機能分化について概説したい。

AM-RAMP2系による血管の恒常性制御

血管拡張物質として発見されたAMであるが、我々は、AMノックアウトマウスのホモ接合体 (AM-/-) が、血管の発達が未熟であると共に、血管壁の構造に大きな異常を認め、胎生中期に、びまん性出血や全身性浮腫が原因で致死であることを見出した^[6]。この結果から、AMが血管の発生分化そのものに必須であることが

アドレノメデュリンの機能の多様性を制御する受容体活性調節タンパク RAMP サブアイソフォームとその機能分化

明らかとなった。一方、AM-/-が致死となる段階において、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たことから、我々は、血管におけるAMの機能制御にはRAMP2が重要ではないかと考えた。そこでRAMP2ノックアウトマウス (RAMP2-/-) を樹立したところ、RAMP2-/-はAM-/-と同じ様な血管の発達異常により胎生致死となることが確認された^[7]。RAMP2-/-においては、代償性のAMの発現亢進を認めたが、その他のRAMPサブアイソフォーム発現には変化を認めないことから、RAMPサブアイソフォームの間には相補性がなく、血管の正常な発生には、AM-RAMP2系が必須であることが明らかとなった。

AM、RAMP2のノックアウトマウスは共に胎生致死となってしまうため、次に我々は、臓器、細胞特異的なノックアウトマウスの検討を進めた。血管内皮細胞特異的RAMP2ノックアウトマウス (E-RAMP2-/-) は、全身型のRAMP2-/-と比較して、胎生後期まで発生が進むものの、周産期に全身性の著明な浮腫を生じ、ほとんどの個体が致死となった。一方、一部のE-RAMP2-/-では成体が得られた。E-RAMP2-/-成体では、血管壁の形態異常に加え、主要臓器の血管周囲の著明な炎症細胞浸潤を認めた。さらに加齢に伴い、酸化ストレスの亢進と臓器内線維化の進展を認め、肝硬変様の所見や、水腎症、糸球体硬化症などの自然発症を認めた^[8]。

E-RAMP2-/-では得られる成体数が限られるため、次に我々は、成体になってからRAMP2欠損誘導を可能とする誘導型血管内皮細胞特異的RAMP2ノックアウトマウス (DI-E-RAMP2-/-) を作成した。DI-E-RAMP2-/-

では、RAMP2欠損誘導後早期から、血管透過性亢進に伴う全身性浮腫の発症が認められた。血管内皮細胞は、アクチンの重合不全を認め、特にcortical actin ringの形成異常が認められた。アクチン重合を制御する低分子量GタンパクであるRhoファミリーを検討したところ、DI-E-RAMP2-/-の血管内皮細胞では、Rac1の活性が低下しており、RhoAの活性が亢進していた。反対に、血管内皮細胞にAMを添加すると、cortical actin ringは増強し、その作用はRac1阻害剤により抑制されることが確認された。こうした結果から、AM-RAMP2系が、血管内皮細胞のRhoAおよびRac1の活性化レベルの調節に関わり、血管内皮細胞の形態維持に重要な働きを持つことが明らかとなった^[8]。さらにDI-E-RAMP2-/-を用いて、大腿動脈にWire injuryを行い、新生内膜形成を検討した。4週間後、DI-E-RAMP2-/-では、新生内膜形成が著明に亢進し、再内皮化の抑制、平滑筋増殖の亢進、新生内膜、外膜のマクロファージ浸潤亢進、酸化ストレスレベルの亢進を認めた^[9]。以上の結果から、血管のAM-RAMP2系は、血管の発生だけでなく、成体の血管恒常性維持にも必須であることが明らかとなった（図1）。

脈管系恒常性制御におけるAM-RAMP2系とAM-RAMP3系の機能分化

RAMP2-/-とは異なり、RAMP3ノックアウトマウス (RAMP3-/-) は血管の発生に異常は認めず、成体が得られた。成体において片側下肢虚血モデルを用いて血管新生能を評価したところ、RAMP3-/-では野生型マウスと比べて変化を認めないことから、発生段階のみならず

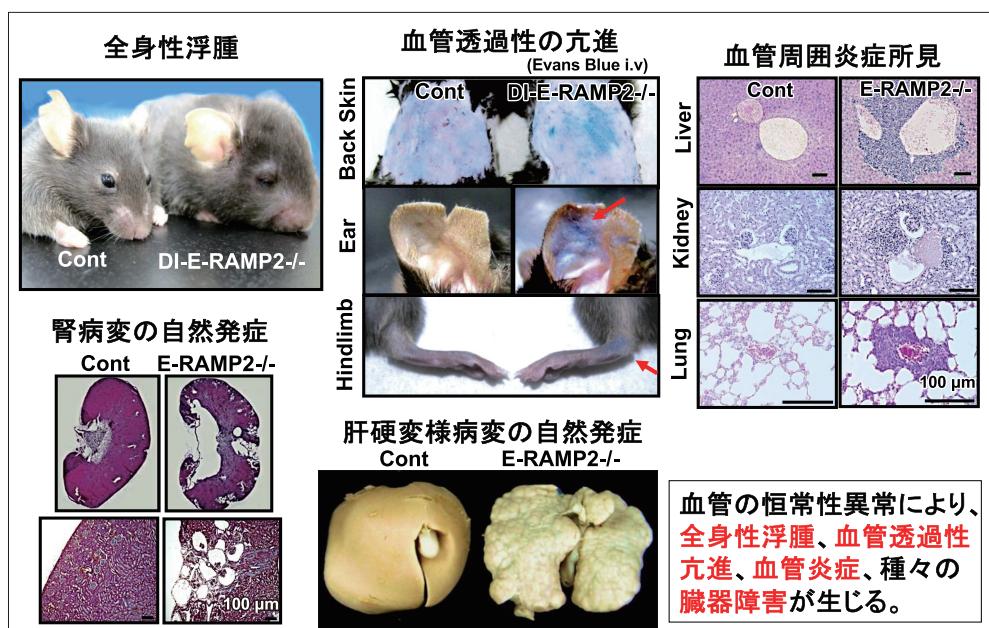


図1. 血管特異的RAMP2ノックアウトマウスの表現型
血管内皮細胞特異的RAMP2ノックアウトマウス (E-RAMP2-/-) および誘導型血管内皮細胞特異的RAMP2ノックアウトマウス (DI-E-RAMP2-/-) の表現型を示す。DI-E-RAMP2-/-では、RAMP2欠損誘導後より、血管透過性の亢進に伴い、全身性浮腫の発症を認めた。E-RAMP2-/-は、加齢と共に、血管周囲の炎症所見と種々の臓器障害を自然発症した。

成体においても、RAMP3は血管新生には関与していないことが明らかとなった^[10]。

血管内皮細胞においてはRAMP2の発現が高いのに対し、リンパ管内皮細胞ではRAMP3の発現が高いことから、次に我々は、術後リンパ浮腫モデルの検討を行った。その結果、野生型マウスと比較して、血管、リンパ管特異的RAMP2-/は共に、術後リンパ浮腫の重症度の変化を認めなかつたが、RAMP3-/のみで浮腫の増悪を認めた。RAMP3-/では、新生リンパ管数、血管数に変化はないものの、リンパ管の異常拡張、間質浮腫の増悪、炎症細胞浸潤の亢進が認められた。電顕では、RAMP3-/において、リンパ管内皮細胞におけるミトコンドリアの空胞変性、繋留フィラメントの形成不全が特徴的に観察された。インドシアニングリーンを用いた耳介、尾部のリンパ管造影では、RAMP3-/においてリンパ管ドレナージが低下していることが明らかとなった。さらにRAMP3-/では、腸管リンパ管による脂質の吸収遅延、乳糜の輸送障害が認められた^[10]。

次にRAMP3-/および野生型マウス胎児よりリンパ管内皮細胞を初代培養し、検討を行った。RAMP3-/のリンパ管内皮細胞では、VEGF-CやVEGFR-3などのリンパ管関連因子の発現低下が認められた。RAMP3-/のリンパ管内皮細胞は、野生型と比較し細胞遊走能が低下しており、細胞生存シグナルであるAktの活性低下が認められた。

これらの結果から、AM-RAMP2系が発生段階の血管新生、成体での血管恒常性を制御しているのに対し、AM-RAMP3系は成体でのリンパ管機能を制御している

ことが明らかとなった。AM-RAMP系はRAMP2、3の機能分化により、血管、リンパ管という脈管系全体の恒常性を制御していると考えられた（図2）。

心血管系ストレス応答におけるAM-RAMP2系とAM-RAMP3系の機能分化

RAMP2、RAMP3は心臓においても高発現している。成体マウスの心臓においてRAMP2を欠損誘導すると、拡張型心筋症様所見の自然発症を認め、致死となつた^[11]。これに対し、先天的な心筋細胞特異的RAMP2ノックアウトマウス（C-RAMP2-/）は正常に生まれ、定常状態の心機能に変化はなかった。そこで、8週齢C-RAMP2-/に対して、横行大動脈縮窄術（TAC）を用いて、心血管系ストレス応答を検討した^[12]。C-RAMP2-/では、コントロールに比較し、TAC 7日目の早期から、心機能低下、心肥大、線維化が亢進し、生存率も低下した。C-RAMP2-/の心臓では、TUNEL染色陽性のアポトーシス細胞の増加、電顕での心筋原線維の走行異常とミトコンドリアの形態異常を認めた。C-RAMP2-/の心筋細胞では、TAC施行の有無に関わらず、細胞刺激時のカルシウムトランジェントのピークの低下と、消退の遅延が確認された。C-RAMP2-/初代培養新生仔心筋細胞は、イソプロテレノール投与24時間後、細胞面積拡大、酸化ストレスレベルの亢進に加え、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、ミトコンドリア関連因子の発現低下を認めた。そこで、心筋細胞ミトコンドリアを分離し、細胞外フラックスアナライザーにて検討したところ、C-RAMP2-/ではミトコンドリア呼吸

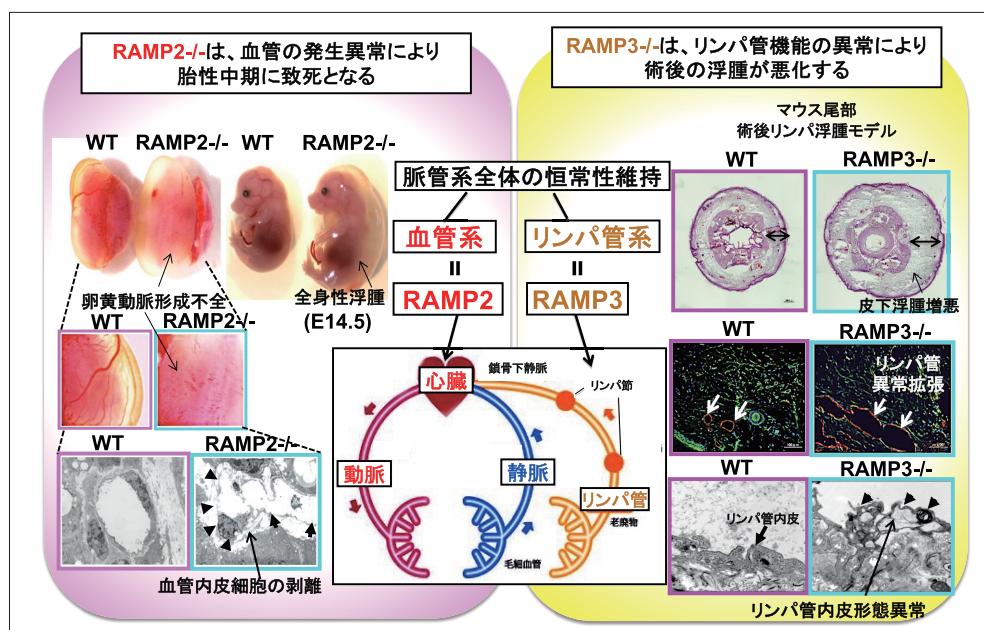


図2. 脈管系の恒常性制御におけるAM-RAMP2系、AM-RAMP3系の機能分化

RAMP2ノックアウトマウス（RAMP2-/）およびRAMP3ノックアウトマウス（RAMP3-/）の表現型を示す。RAMP2-/は血管の発生異常により胎生中期に致死となる。RAMP3-/は発生に異常を認めないが、成体においてリンパ管機能の異常により術後リンパ浮腫の増悪を認める。AM-RAMP2系が発生段階の血管新生、成体での血管恒常性を制御しているのに対し、AM-RAMP3系は成体でのリンパ管機能を制御していると考えられる。

アドレノメデュリンの機能の多様性を制御する受容体活性調節タンパク RAMP サブアイソフォームとその機能分化

能とATP産生能の低下が確認された。C-RAMP2^{-/-}では、cAMPの産生低下と共に、cAMP-response element binding protein (CREB) の活性低下を認め、これがミトコンドリア新生のマスター・レギュレーターであるPGC-1の発現低下と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、コントロールに比較して、心機能の低下と冠動脈周囲の線維化の亢進が認められた。RAMP3^{-/-}初代培養心筋細胞では、C-RAMP2^{-/-}で認められたミトコンドリアの異常は確認できなかった。RAMP3^{-/-}では、LYVE-1免疫染色陽性のリンパ管数の減少を特徴的に認め、さらにリンパ管内皮細胞のギャップ結合タンパクであるコネキシン43の発現低下を認めた。コネキシン43はリンパ管のドレナージ機能に必須であると考えられている。RAMP3^{-/-}では、特に冠動脈周囲のリンパ管の発達が不良であり、組織液のドレナージ障害による慢性炎症の持続によって、冠動脈周囲の特徴的な線維化病変の形成に繋がったと考えられた。

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が必要であることが明らかとなった（図3）。

AM-RAMP2系による血管恒常性制御と癌転移抑制作用

AMとその受容体システムの発現は、肺、乳腺、脾臓^[13-15]などの多くの癌で報告されている。我々は、DI-

E-RAMP2^{-/-}を用いて、成体において血管内皮細胞のRAMP2を欠損させることで、癌の増殖と転移における血管のAM-RAMP2系の意義を検討した^[16]。

DI-E-RAMP2^{-/-}を用いて、B16F10メラノーマ細胞の皮下移植実験を行なうと、コントロールマウスに比較して、腫瘍内血管新生は減弱し、腫瘍増殖は抑制された。その一方で、B16BL6メラノーマ細胞を用いて、原発巣から遠隔臓器への転移モデルの検討を行ったところ、DI-E-RAMP2^{-/-}では肺への転移率が亢進するという、一見すると相反する結果となった（図4左）。

DI-E-RAMP2^{-/-}において転移が亢進するメカニズムを解明するため、RAMP2欠損誘導後に転移予定先臓器である肺に生じる変化を時系列的に観察した。その結果、腫瘍の転移前の早期の段階で、血管壁におけるマクロファージの接着や浸潤、炎症性サイトカインの発現亢進が認められた。炎症はRAMP2欠損誘導後も持続し、腫瘍の転移がはじまる直前の段階では、腫瘍細胞を転移巣へ誘導するとされるS100A8/A9とその下流因子であるSAA3の発現亢進を認め、転移予定先臓器における転移前土壤形成が促進していると考えられた（図4右）。

次に、原発巣の腫瘍内血管について検討を進めた。DI-E-RAMP2^{-/-}では、血管内皮細胞が間葉系細胞マーカー陽性となり、細胞間接着が障害され異常増殖を認めるなど、内皮間葉移行 (Endothelial-mesenchymal transition: EndMT) を伴う血管構造不安定化が確認され、癌の転移促進つながると考えられた。

一方RAMP2過剰発現マウスでは、腫瘍細胞の血管内皮への接着や、遠隔臓器への転移が抑制され、生存率が

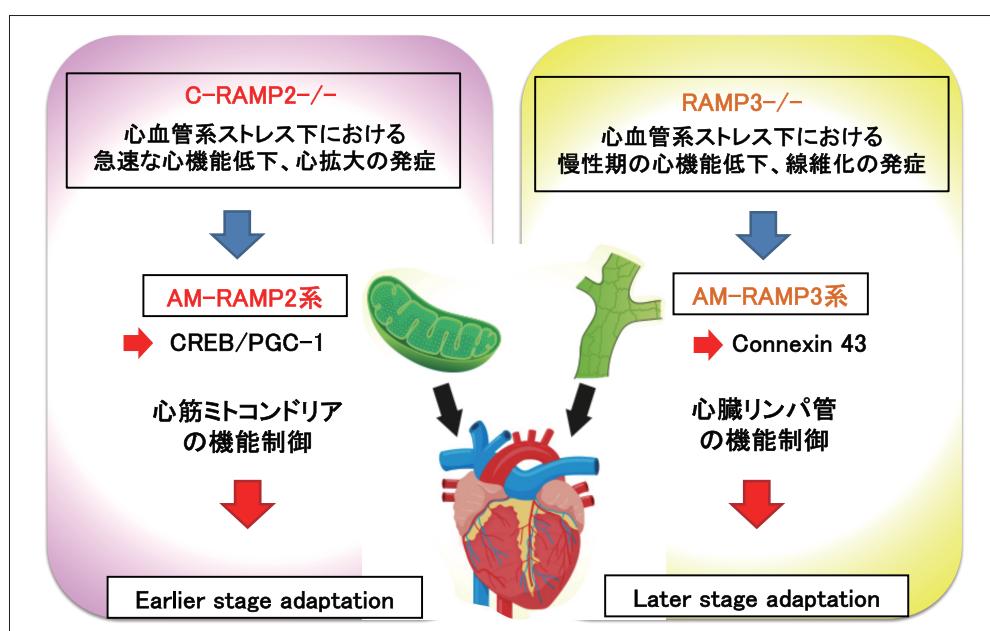


図3. 心血管系ストレス応答におけるAM-RAMP2系とAM-RAMP3系の機能分化
横行大動脈縮窄術 (TAC) によって、心筋細胞特異的RAMP2ノックアウトマウス (C-RAMP2^{-/-}) は、急速な心機能低下、心拡大を示すのに対し、RAMP3ノックアウトマウス (RAMP3^{-/-}) では、慢性期の心機能低下、線維化の亢進を示す。AM-RAMP2系はCREB-PGC-1の制御により心筋ミトコンドリアの機能制御を司るのに対して、AM-RAMP3系はコネキシン43の発現制御により、心臓リンパ管のドレナージ機能を制御している。

改善し、AM-RAMP2系の活性化による癌転移抑制効果が示された。

以上の結果から、血管内皮細胞のRAMP2欠損により、転移予定先臓器の血管における慢性炎症が、癌細胞の転移前土壤となり、癌の遠隔臓器への転移を促進させること、さらに原発巣の血管では、EndMTによる血管構造の不安定化が生じ、腫瘍細胞の血管内浸潤が亢進することが明らかとなった。AM-RAMP2系による血管恒常性制御作用は、心血管系疾患のみならず、癌の転移を抑制する治療法につながる可能性がある。

癌転移におけるAM-RAMP2系とAM-RAMP3系の拮抗作用

肺癌は予後不良であり、特に肝転移の制御が重要な課題である。次に我々は、DI-E-RAMP2-/‐を用いて、肺癌細胞の肝転移実験を行った^[17]。Pan02肺癌細胞を脾臓に移植し、肝臓への転移の検討を行うと、DI-E-RAMP2-/‐はControl群と比べ、転移率が上昇した。これは先述の、DI-E-RAMP2-/‐ではメラノーマ細胞の肺転移が亢進するという結果と同様の結果であった。さらに我々は、DI-E-RAMP2-/‐の転移巣では、ポドプラニン(PDPN)の発現が著明に亢進していることを見出した。PDPNは、リンパ管のマーカーとして知られているが、それ以外にも、癌関連線維芽細胞(cancer-associated fibroblast; CAF)での発現が知られている。さらに最近、肺癌においてPDPN陽性のCAFが存在する例は予後不良であることが報告されている。実際に、DI-E-RAMP2-/‐の転移巣では、PDPN陽性のCAFが増加しており、DI-E-RAMP2-/‐における肝転移亢進に関与して

いると考えられた。

DI-E-RAMP2-/‐では、RAMP2の発現低下と共に、RAMP3の発現が亢進していた。そこで次にRAMP3-/‐マウスを用いて、同様の肝転移モデルの検討を行った。意外なことに、RAMP3-/‐では、DI-E-RAMP2-/‐とは反対に、肝転移が抑制されていた。さらに、DI-E-RAMP2-/‐とは逆に、癌周囲のPDPN陽性CAFが減少していた。RAMP3-/‐の初代培養CAFでは、PDPN発現に関わるp-Src、Cas活性が低下していた。さらに、RAMP3-/‐CAFではαSMA発現とストレスファイバーの形成が抑制されている一方で、cortical actin ring形成が亢進しており、間葉上皮移行(Mesenchymal-epithelial transition: MET)を生じていると考えられた。

RAMP3-/‐CAFはPan02肺癌細胞との共培養により、Pan02細胞の増殖、遊走を抑制した。さらにRAMP3-/‐CAFでは、腫瘍増殖促進因子の発現低下と腫瘍増殖抑制因子の発現亢進が認められた。実際にRAMP3-/‐CAFをPan02細胞と混合してマウスに皮下移植すると、癌の増殖は抑制された。

以上の結果から、DI-E-RAMP2-/‐では、AM-RAMP3系の代償性の亢進とPDPN陽性の悪性度の高いCAF(Malignant CAF)が増加した結果、癌の悪性度が強化したと考えられた。一方、RAMP3-/‐ではPDPN陰性の悪性度の低いCAF(Benign CAF)が主体となった結果、癌の悪性度が低下したと考えられた(図5)。

結語

我々の一連の検討から、受容体活性調節タンパク

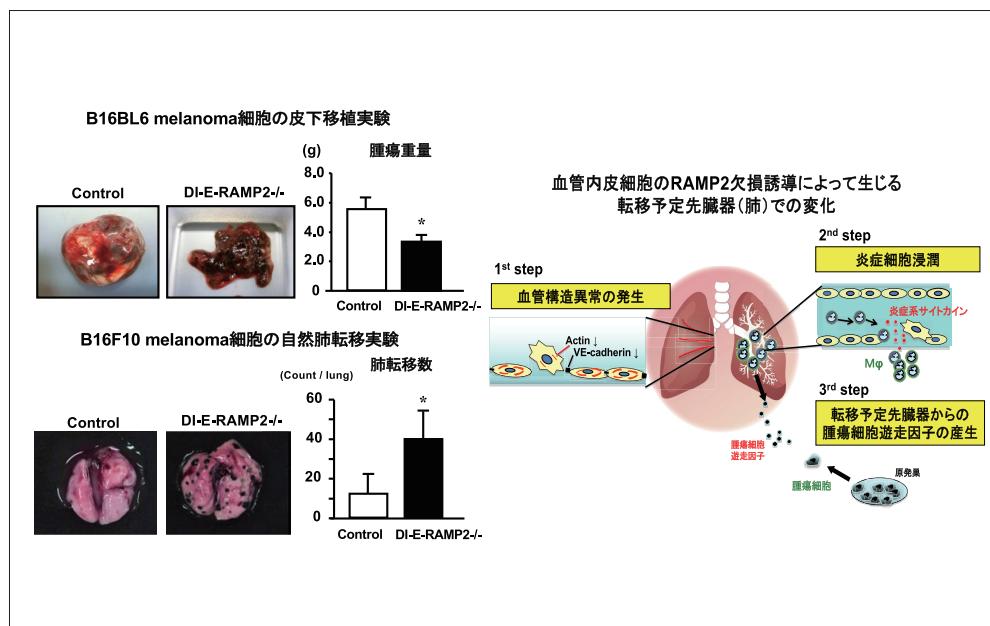


図4. AM-RAMP2系による血管恒常性制御と癌転移抑制作用

- (左) 誘導型血管内皮細胞特異的RAMP2ノックアウトマウス(DI-E-RAMP2-/-)にメラノーマ細胞を移植すると、局所での増殖は抑制されるのに対し、遠隔臓器への転移は亢進する。
- (右) DI-E-RAMP2-/-においては、血管構造異常の発生と共に、血管壁への炎症細胞浸潤が亢進し、転移前土壤が形成され、腫瘍細胞遊走因子の産生亢進を来すことで原発巣からの転移が亢進すると考えられる。

アドレノメデュリンの機能の多様性を制御する受容体活性調節タンパク RAMP サブアイソフォームとその機能分化

RAMPのサブアイソフォーム間に機能分化が存在することが明らかとなってきた。RAMPの機能分化が、AMをはじめとしたカルシントニンスーパーファミリーの生理機能の多様性を生み出していると考えられる。

AMをはじめとした生理活性ペプチドは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制約もある。一方、RAMPは比較的小さい1回膜貫通型タンパクであり、我々はその構造解析も終了している^[18, 19]。RAMPの病態生理学的意義とそのメカニズムの解明を進め、特異的なアゴニスト、アンタゴニストによりRAMPの活性を人為的に操作することができれば、心血管系疾患のみならず、癌の転移抑制や、その他の難治性疾患に対する新たな治療法に展開することが期待される。

引用文献

- Kitamura, K., et al., *Adrenomedullin: a novel hypotensive peptide isolated from human pheochromocytoma*. Biochem Biophys Res Commun, 1993. **192** (2): p. 553-60.
- Shindo, T., et al., *Regulation of cardiovascular development and homeostasis by the adrenomedullin-RAMP system*. Peptides, 2019. **111**: p. 55-61.
- Ashizuka, S., et al., *Adrenomedullin as a potential therapeutic agent for inflammatory bowel disease*. Curr Protein Pept Sci, 2013. **14** (4): p. 246-55.
- Ashizuka, S., et al., *Adrenomedullin Therapy in Patients with Refractory Ulcerative Colitis: A Case Series*. Dig Dis Sci, 2016. **61** (3): p. 872-80.
- McLatchie, L.M., et al., *RAMPs regulate the transport and ligand specificity of the calcitonin-receptor-like receptor*. Nature, 1998. **393** (6683): p. 333-9.
- Shindo, T., et al., *Vascular abnormalities and elevated blood pressure in mice lacking adrenomedullin gene*. Circulation, 2001. **104** (16): p. 1964-71.
- Ichikawa-Shindo, Y., et al., *The GPCR modulator protein RAMP2 is essential for angiogenesis and vascular integrity*. J Clin Invest, 2008. **118** (1): p. 29-39.
- Koyama, T., et al., *Vascular endothelial adrenomedullin-RAMP2 system is essential for vascular integrity and organ homeostasis*. Circulation, 2013. **127** (7): p. 842-53.
- Xian, X., et al., *Vasoprotective Activities of the Adrenomedullin-RAMP2 System in Endothelial Cells*. Endocrinology, 2017. **158** (5): p. 1359-1372.
- Yamauchi, A., et al., *Functional differentiation of RAMP2 and RAMP3 in their regulation of the vascular system*. J Mol Cell Cardiol, 2014. **77**: p. 73-85.
- Yoshizawa, T., et al., *Novel regulation of cardiac metabolism and homeostasis by the adrenomedullin-receptor activity-modifying protein 2 system*. Hypertension, 2013. **61** (2): p. 341-51.
- Cui, N., et al., *Adrenomedullin-RAMP2 and -RAMP3 Systems Regulate Cardiac Homeostasis during*

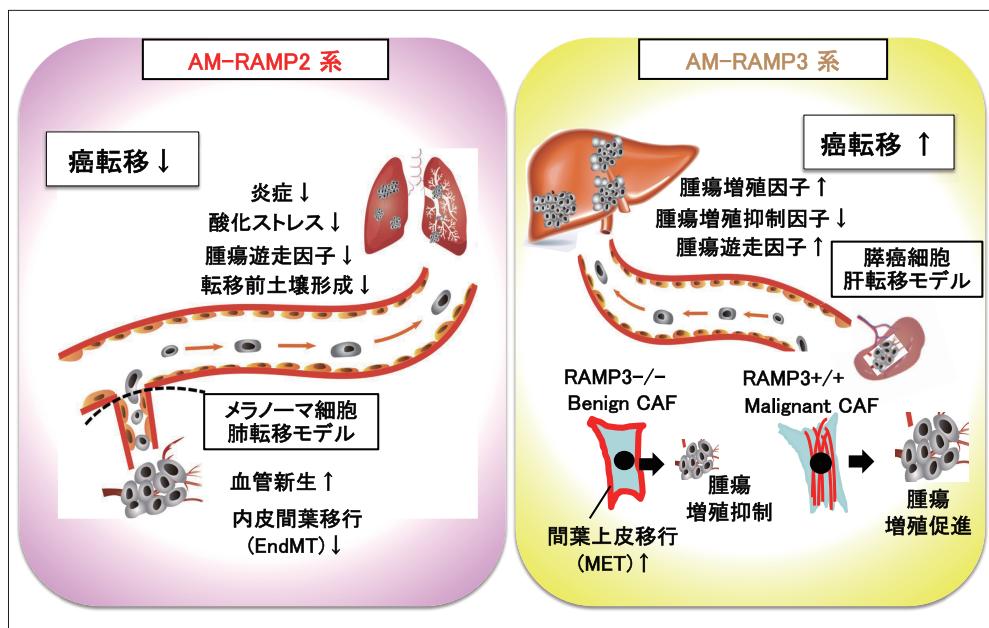


図5. 癌転移におけるAM-RAMP2系とAM-RAMP3系の拮抗作用
AM-RAMP2系は血管の恒常性維持に働き、癌の転移を抑制するのに対し、AM-RAMP3系は癌微小環境において癌関連線維芽細胞(CAF)の悪性化に係わり、癌の転移を促進する。

- Cardiovascular Stress. Endocrinology, 2021. 162 (3).*
- 13. Miller, M.J., et al., *Adrenomedullin expression in human tumor cell lines. Its potential role as an autocrine growth factor.* J Biol Chem, 1996. **271** (38): p. 23345-51.
 - 14. Siclari, V.A., et al., *Tumor-expressed adrenomedullin accelerates breast cancer bone metastasis.* Breast Cancer Res, 2014. **16** (6): p. 458.
 - 15. Ramachandran, V., et al., *Adrenomedullin is expressed in pancreatic cancer and stimulates cell proliferation and invasion in an autocrine manner via the adrenomedullin receptor, ADMR.* Cancer Res, 2007. **67** (6): p. 2666-75.
 - 16. Tanaka, M., et al., *The endothelial adrenomedullin-RAMP2 system regulates vascular integrity and suppresses tumour metastasis.* Cardiovasc Res, 2016. **111** (4): p. 398-409.
 - 17. Dai, K., et al., *Deficiency of the adrenomedullin-RAMP3 system suppresses metastasis through the modification of cancer-associated fibroblasts.* Oncogene, 2020. **39** (9): p. 1914-1930.
 - 18. Kusano, S., et al., *Structural basis for extracellular interactions between calcitonin receptor-like receptor and receptor activity-modifying protein 2 for adrenomedullin-specific binding.* Protein Sci, 2012. **21** (2): p. 199-210.
 - 19. Kusano, S., et al., *Crystal structure of the human receptor activity-modifying protein 1 extracellular domain.* Protein Sci, 2008. **17** (11): p. 1907-14.