

総説

アドレノメデュリン2/インターメディンは 心筋細胞のミトコンドリア機能を調節して心臓保護に働く

ZHAO YUNLU¹、桜井 敬之^{1, 2}、神吉 昭子^{1, 2}、田中 愛^{1, 2}、市川 優佳¹
河手 久香¹、松田 順繁¹、ZHANG YAN¹、GUO QIANQIAN¹、LI PEIXUAN¹
星山 健¹、林 真倫那¹、LI JIAKE¹、新藤 隆行^{1, 2}

要　旨

本稿では、カルシトニンスーパーファミリーに属する機能性ペプチドである、アドレノメデュリン2 (AM2)、別名インターメジンの心臓および心筋細胞における役割を概説します。我々は、横大動脈縮窄術 (TAC) を施したAM2遺伝子欠損マウスの病態生理学的解析により、AM2遺伝子が心筋細胞における解糖系およびTCAサイクルに関連するミトコンドリア機能の調整に関わり、圧負荷状態下で心臓機能を維持する上で重要な役割を果たすことを明らかにしました。

キーワード：アドレノメデュリン2/インターメジン、心臓保護、横大動脈縮窄術 (TAC)、心不全、心筋細胞、ミトコンドリア

1. アドレノメデュリン2 (AM2) と受容体活性調節タンパク (RAMPs)

心血管系における内因性の生理活性ペプチドとその受容体は、循環の恒常性維持において重要な役割を果たしています。これらのペプチドは血圧や体液バランスの調節に関与しており、心血管疾患の薬理学的標的としても注目されています^[1, 2]。

アドレノメデュリン2 (AM2)、別名インターメジンは、高橋らによって初めて同定された機能性ペプチドであり、アドレノメデュリン (AM) やカルシトニン遺伝子関連ペプチド (CGRP) とともにカルシトニンスーパーファミリーに属します^[3, 4]。AMやCGRPと同様に、AM2受容体はクラスBのGタンパク質共役型受容体 (GPCR) の一つであるカルシトニン受容体様受容体 (CLR) と、3つの受容体活性修飾タンパク質 (RAMP1、RAMP2、RAMP3) のそれぞれと1対で構成されています^[5]。AMは主にRAMP2/3/CLR複合体に結合しますが、AM2がCLRに結合するメカニズムおよびRAMP

がこの結合をどのように制御しているかは不明です (図1A)^[6]。血管内でのAM2刺激はERKおよびPI3K/AKT経路を介して伝達されることが示唆されています^[7, 8]。AM2は全身に広く発現し、血管拡張、変力作用、ナトリウム利尿作用を持つほか、血管新生や内皮細胞の代謝制御にも関与します^[9, 10]。我々の先行研究では、AM2は新生血管性加齢黄斑変性症に関連する病態を軽減し、血液網膜閥門の破壊や脈絡膜新生血管、炎症、線維症を抑制することが実証されています^[11]。

心臓機能に関しては、うっ血性心不全モデルのラットにおいて、心臓内でのAM2発現が増加し、心臓保護に重要な役割を果たしていることが示唆されていますが、心肥大におけるAM2の役割は未解明です^[12]。本研究では、AM2遺伝子欠損マウス (AM2-/-) を用いて、心臓および心筋細胞におけるAM2の役割を明らかにすることを目指しました。

2. AM2遺伝子は心臓機能維持および心不全進行抑制に重要である

我々はCRISPR/Cas9ゲノム編集法を用いてAM2遺伝子欠損マウス (AM2-/-) を作製しました (図1B)。このマウスに横行大動脈狭窄術 (TAC) を施して心肥大を誘導し、AM2の病態生理学的役割を解析しました (図2A)。

¹⁾ 信州大学 医学部 循環病態学教室

²⁾ 信州大学 バイオメディカル研究所 ライフイノベーション部門
(〒390-8621 長野県松本市旭3-1-1)

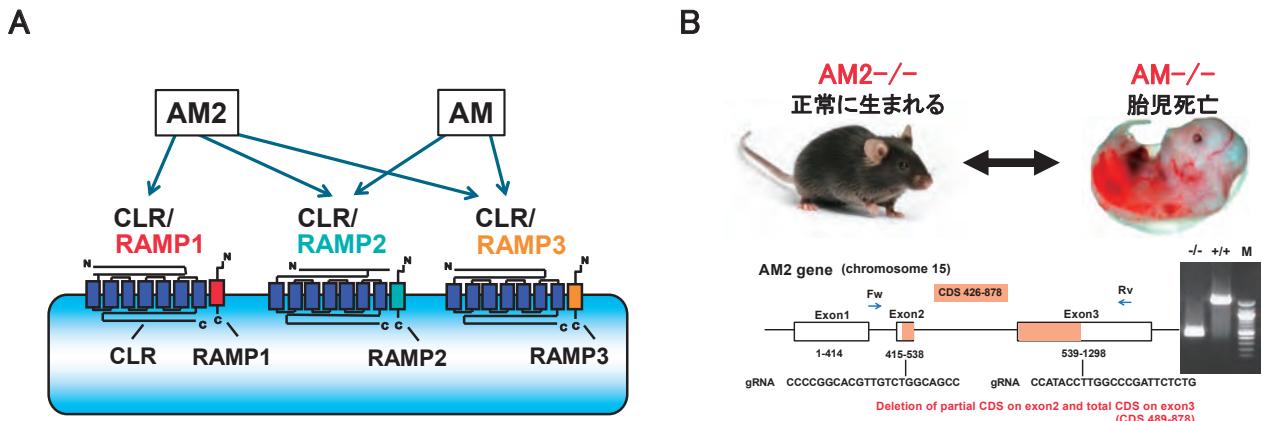


図1. AM2及びAM受容体システムとアドレノメデュリン2 (AM2)-/-マウスの作製

A. AM2の受容体は、RAMP1/CLR、RAMP2/CLRおよびRAMP3/CLR複合体である。
B. AM2-/-マウスの作製法

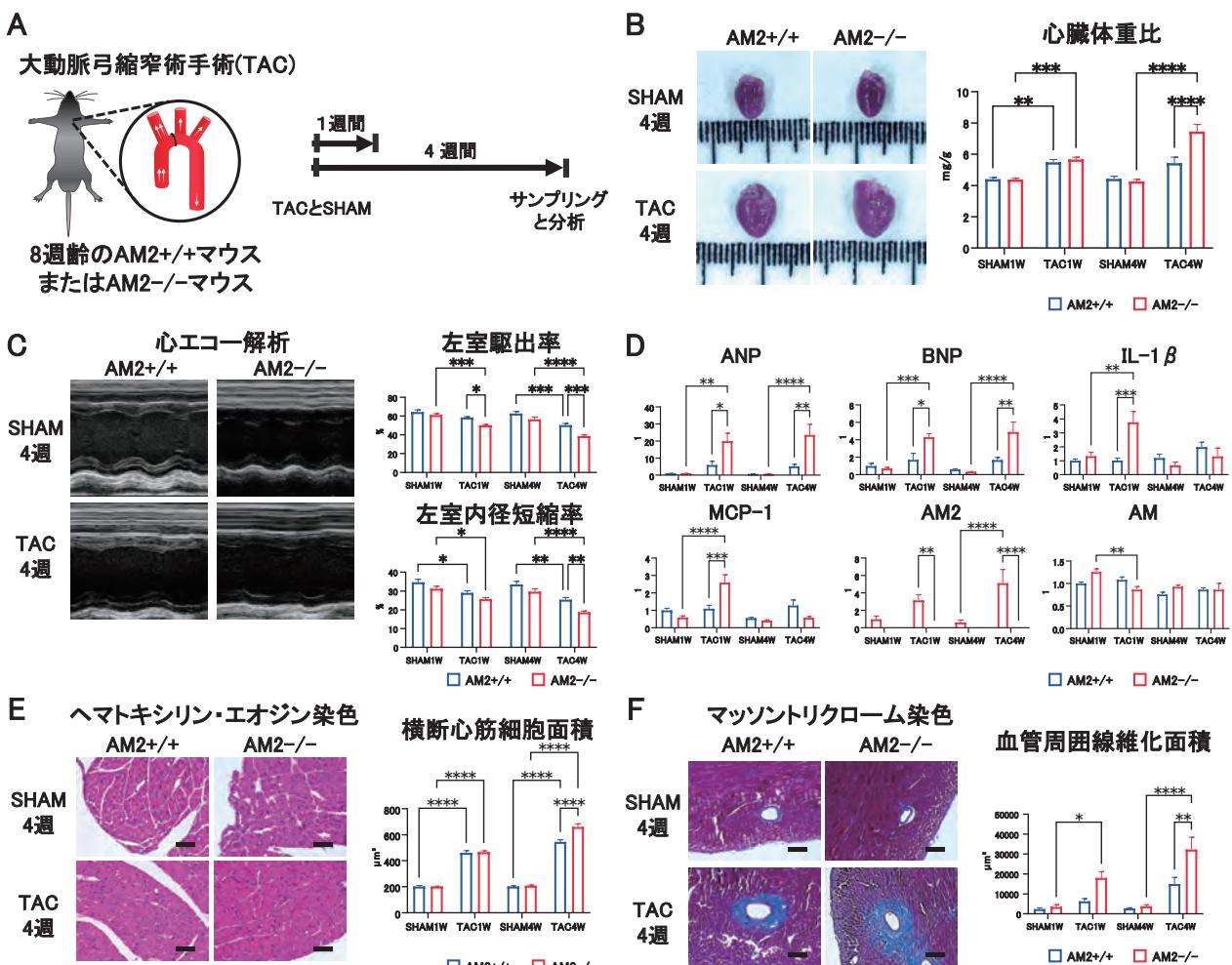


図2. 大動脈弓縮窄術手術 (TAC) モデルによるAM2-/-マウス心臓の解析

- TACモデルの実験デザイン
 - マウスの心臓像と心臓体重比
 - 心エコー解析像と左室駆出率と左室内径短縮率の結果
 - 心臓でのqPCRの結果
 - 心臓のヘマトキシリン・エオジン染色像と横断心筋細胞面積の定量 スケール = 50 μm
 - 心臓のマッソントリクローム染色像と血管周囲線維化面積の定量 スケール = 100 μm
- 平均 \pm 標準誤差 *: P < 0.05 ; **: P < 0.01 ; ***: P < 0.001 ; ****: P < 0.0001。

TAC術後4週間で、AM2^{-/-}マウスはAM2^{+/+}マウスと比較して心臓体重比が有意に増加しました ($P<0.0001$, 図2B)。

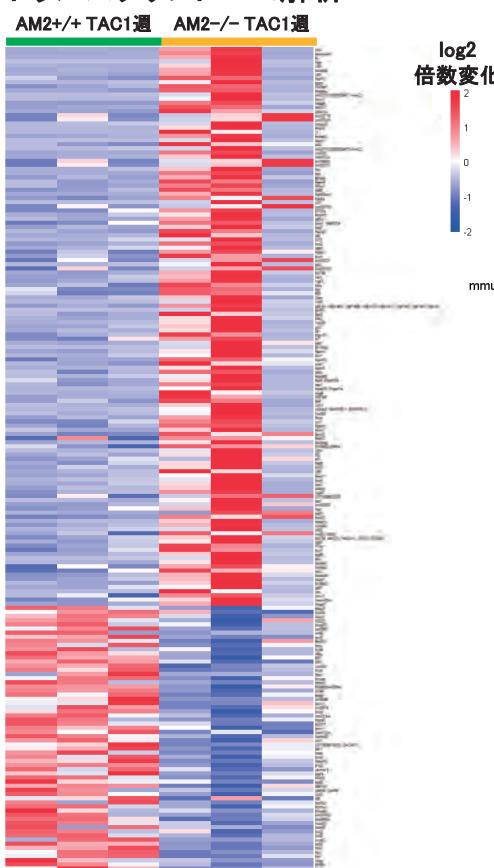
心エコー検査では、術後1週間でAM2^{+/+}マウスと比較して、AM2^{-/-}マウスの左室駆出率が25%減少し ($P<0.05$)、術後4週間では左室駆出率 ($P<0.01$) および左室内径短縮率 ($P<0.05$) がともに有意に減少しました (図2C)。さらに、遺伝子発現量解析では、術後1週間および4週間のAM2^{-/-}マウスの心臓でANP ($P<0.05$, $P<0.01$) およびBNP ($P<0.05$, $P<0.01$) の発現量がAM2^{+/+}マウスに比べて有意に高くなり、AM2^{-/-}マウスはより重度の心不全を示しました (図2D)。また、術後1週間でAM2^{-/-}マウスの心臓におけるIL-1 β およびMCP-1の発現量が有意に増加し ($P<0.001$)、炎症の増大が示唆されました。興味深いことに、術後1週間および4週間でAM2^{+/+}マウスではAM発現量に変化はありませんでしたが、AM2発現量は著しく増加していました ($P<0.0001$)。心臓の組織解析

では、術後4週間でAM2^{-/-}マウスの心筋細胞の横断面積がAM2^{+/+}マウスと比較して有意に増加し ($P<0.0001$, 図2E)、血管周囲の線維化もAM2^{+/+}マウスに比べて有意に増加していました ($P<0.01$, 図2F)。これらの結果を総合すると、AM2遺伝子の欠損が心不全の進行を悪化させ、圧力過負荷状態で心臓機能を維持する上でAM2が極めて重要であることが示唆されました。

3. AM2遺伝子欠損は心臓の代謝とTCAサイクルの活動を低下させる

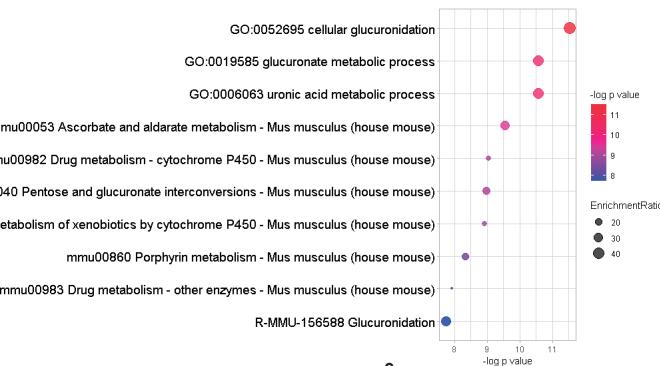
そこで、心臓におけるAM2遺伝子の包括的な理解と機能の推定のため、トランスクリプトーム解析を実施しました。TAC術後1週間、AM2^{-/-}マウスの心臓は、AM2^{+/+}マウスのそれと比較して、200個の遺伝子発現量が有意な変化を起こしており ($P<0.05$ 、倍数変化>2) (図3A)、そのGOパスウェイ分析は、発現量の変化が多い遺伝子群が細胞内の解糖経路および代謝プロセス (図3B) であることを明らかとしました。この発見を

A トランスクリプトーム解析



B

TOP 10 GOパスウェイ AM2-/- TAC1W vs AM2+/+ TAC1W



TOP 10 GOプロセス AM2-/- TAC1W vs AM2+/+ TAC1W

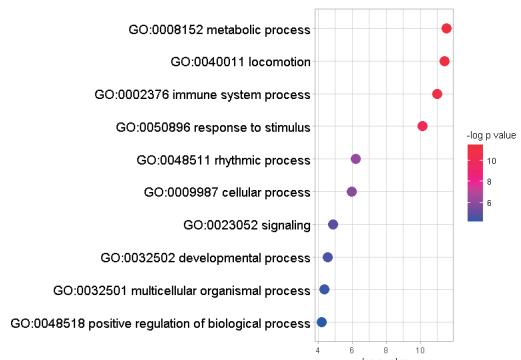


図3. TAC手術したAM2^{-/-}マウスの心臓のトランスクリプトーム解析

- A. TAC手術したAM2^{-/-}心臓とAM2^{+/+}心臓での遺伝子発現量の比較、顕著に変化していた遺伝子のヒートマップ
- B. 最も変化していたTop10のGOパスウェイ
- C. 最も変化していたTop10のGOプロセス

検証するために、AM2^{+/+}マウスとAM2^{-/-}マウスの心臓の代謝物定量分析を実施しました。代謝物enrichment分析では、AM2^{-/-}心臓のアミノ酸代謝とTCAサイクルの代謝物がAM2^{+/+}心臓と比較して顕著に変化していました（図4 A）。TAC術後1週間、AM2^{-/-}心臓ではセリン、グリシンが増加し（図4 B）、TCAサイクル代

謝物のコハク酸が減少しました（図4 C）。これらの結果は、AM2^{-/-}マウスの心臓は、AM2^{+/+}マウスのそれに比べ、TCAサイクルの活動能が低下していることを明らかとしました。

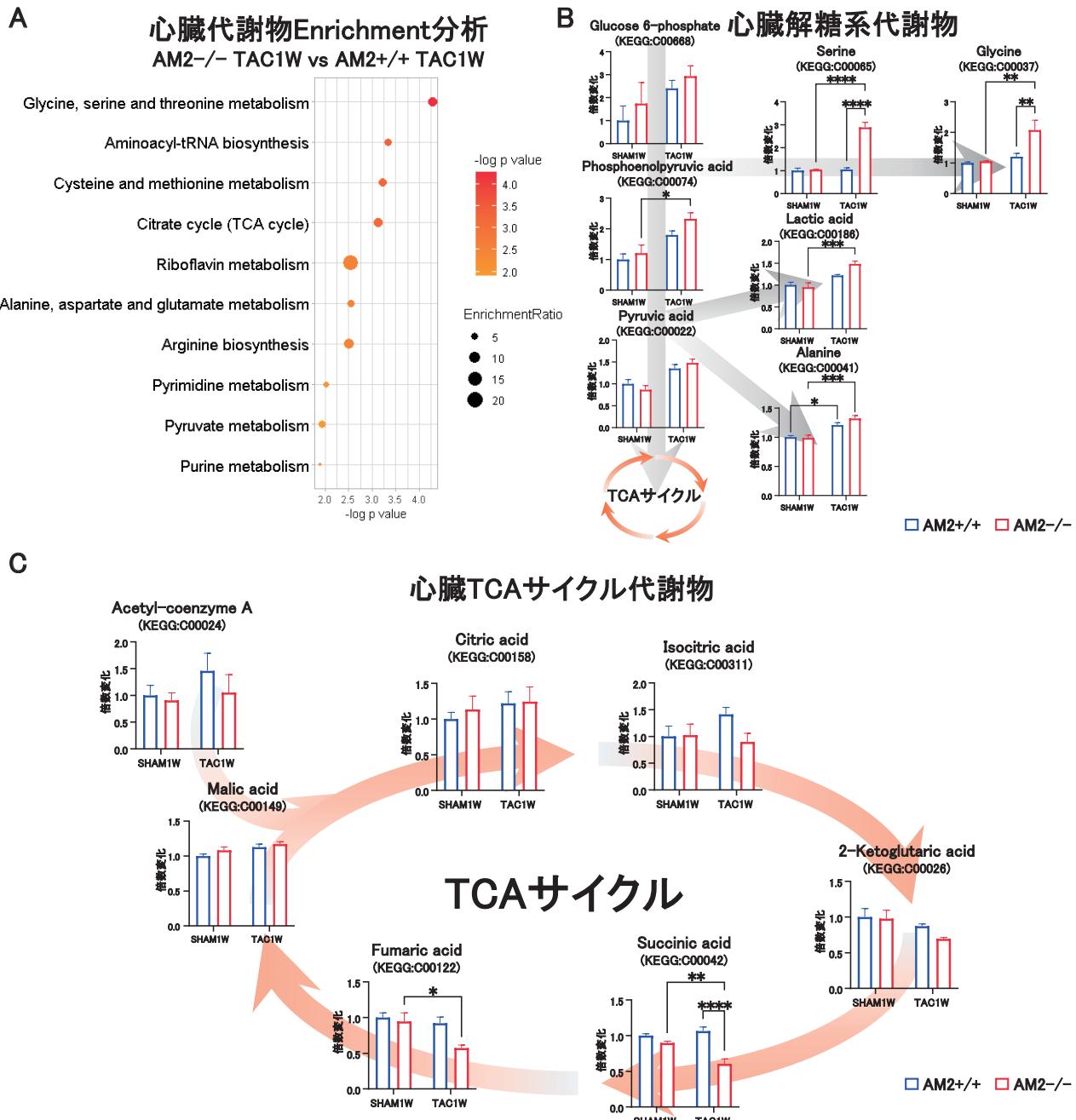


図4. TAC手術したAM2^{-/-}マウスの心臓の代謝物定量分析

- A. TAC手術したAM2^{-/-}心臓とAM2^{+/+}心臓での心臓代謝物Enrichment分析結果
- B. 心臓解糖系代謝物の定量分析結果
- C. 心臓TCAサイクル代謝物の定量分析結果

平均±標準誤差 *: P < 0.05 ; **: P < 0.01 ; ***: P < 0.001 ; ****: P < 0.0001。

4. AM2遺伝子欠損は心筋細胞のミトコンドリア機能を低下させる

AM2遺伝子とTCAサイクルの活性の関係が示唆されたことから、我々はミトコンドリアの機能と形態の評価を実施しました。先ず、ミトコンドリアの機能を組織レベルで判定できるコハク酸デヒドロゲナーゼ(SDH)染

色を、TACおよびSHAMの手術をしたAM2+/+およびAM2-/マウスの心臓で行いました(図5 A)。SHAM術後のAM2-/およびAM2+/+マウス心臓のSDH染色面積の差は認められない一方で、TAC術後1週間のそれは有意に($P < 0.001$)減少しました(図5 A)。次に、心臓のミトコンドリアの形態を観察するため、透過型電子顕微鏡分析を行いました。その結果、SHAM術後の

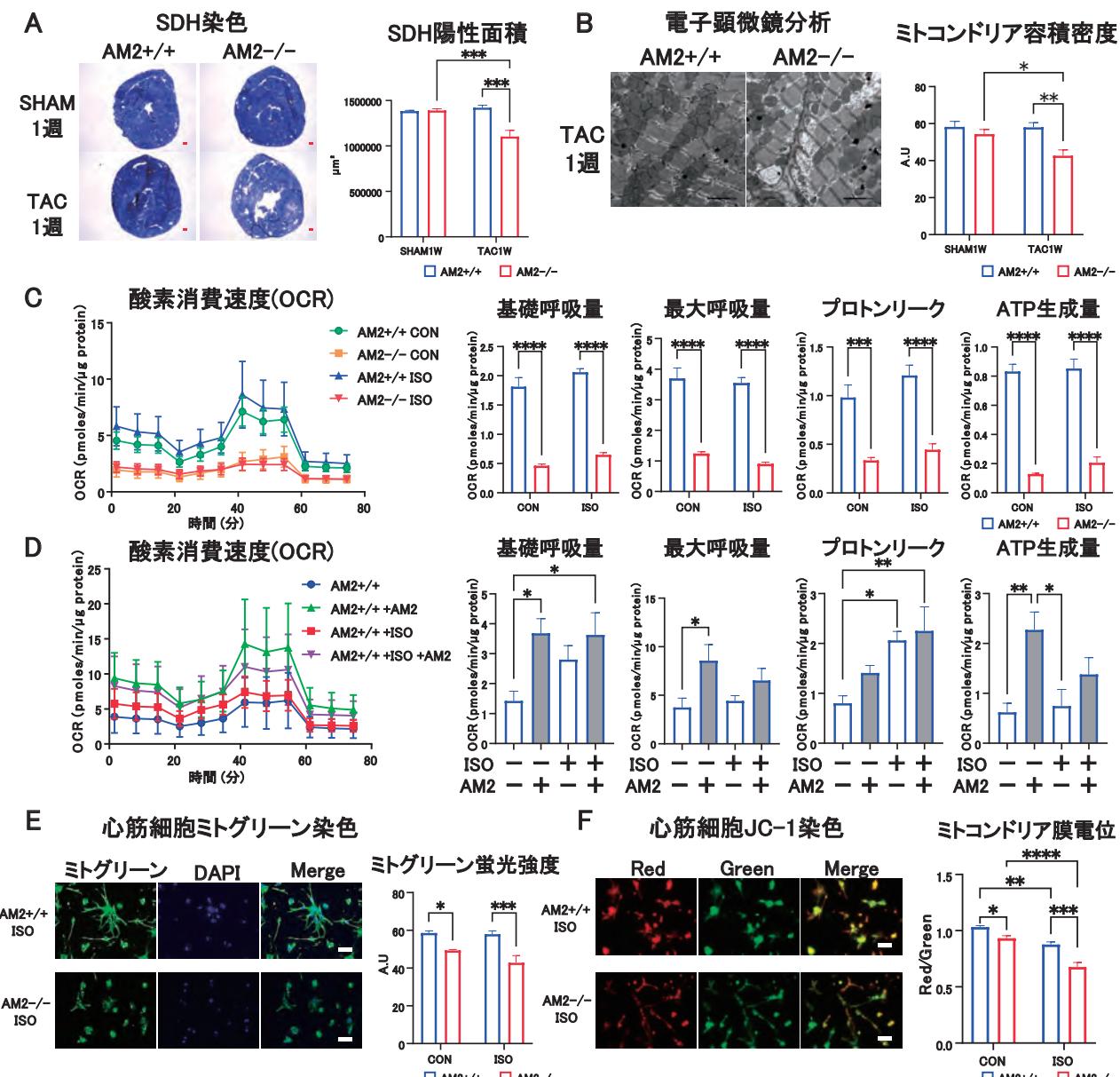


図5. AM2欠損心臓およびAM2欠損心筋細胞におけるミトコンドリアの形態と機能の解析

- 心臓のSDH染色像と陽性面積定量結果 スケール = 200 μm
 - 心臓の電子顕微鏡分析結果(ミトコンドリア容積密度はimage Jで定量) スケール = 2 μm
 - ISO処理したAM2-/心筋細胞とAM2+/+心筋細胞のフラックス代謝解析の結果
 - ISO処理したAM2+/+心筋細胞への外因性のAM2投与効果(フラックス代謝解析の結果)
 - 心筋細胞のミトグリーン染色像と蛍光強度定量の結果 スケール = 50 μm
 - 心筋細胞のJC-1染色像(ミトコンドリア膜電位はRed/Greenの比で計算) スケール = 50 μm
- 平均 \pm 標準誤差 *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$; ****: $P < 0.0001$ 。

AM2^{-/-}およびAM2^{+/+}マウス心臓のミトコンドリア容積密度に差異は認められない一方で、TAC術後のそれらは有意に減少しました（P < 0.01、図5B）。

そこで、AM2^{+/+}およびAM2^{-/-}マウスの胎児心臓から心筋細胞を回収し、そのミトコンドリアの機能と形態を解析しました。これらの心筋細胞はイソプロテレノール（ISO）処理を行い心肥大に相当する障害を与えました。フラックス代謝解析の結果は、ISOの処理の有無に関わらずAM2^{-/-}心筋細胞では基礎呼吸量、最大呼吸量、プロトンリーク、およびATP生成量のOCR値がAM2^{+/+}心筋細胞のそれらより有意に低いことが明ら

かになりました（図5C）。そして、外因性のAM2の添加効果を調べたところ、対照群、ISO処理群ともにAM2^{+/+}心筋細胞の基礎呼吸量、最大呼吸量、およびATP生成量のOCR値が増加しました（図5D）。AM2^{-/-}心筋細胞のミトグリーン平均蛍光強度はAM2^{+/+}心筋細胞のそれより低いこと（図5E；対照、P < 0.05；ISO、P < 0.001）、AM2^{-/-}心筋細胞のミトコンドリア膜電位は、AM2^{+/+}のそれよりも低いこと（P < 0.05）、ISO処理はさらにそれを低下させる（P < 0.001）ことが判明しました。以上の結果から、AM2遺伝子は心筋細胞のミトコンドリア呼吸と膜電位、ATP生成に関わることが明らかとなりました。

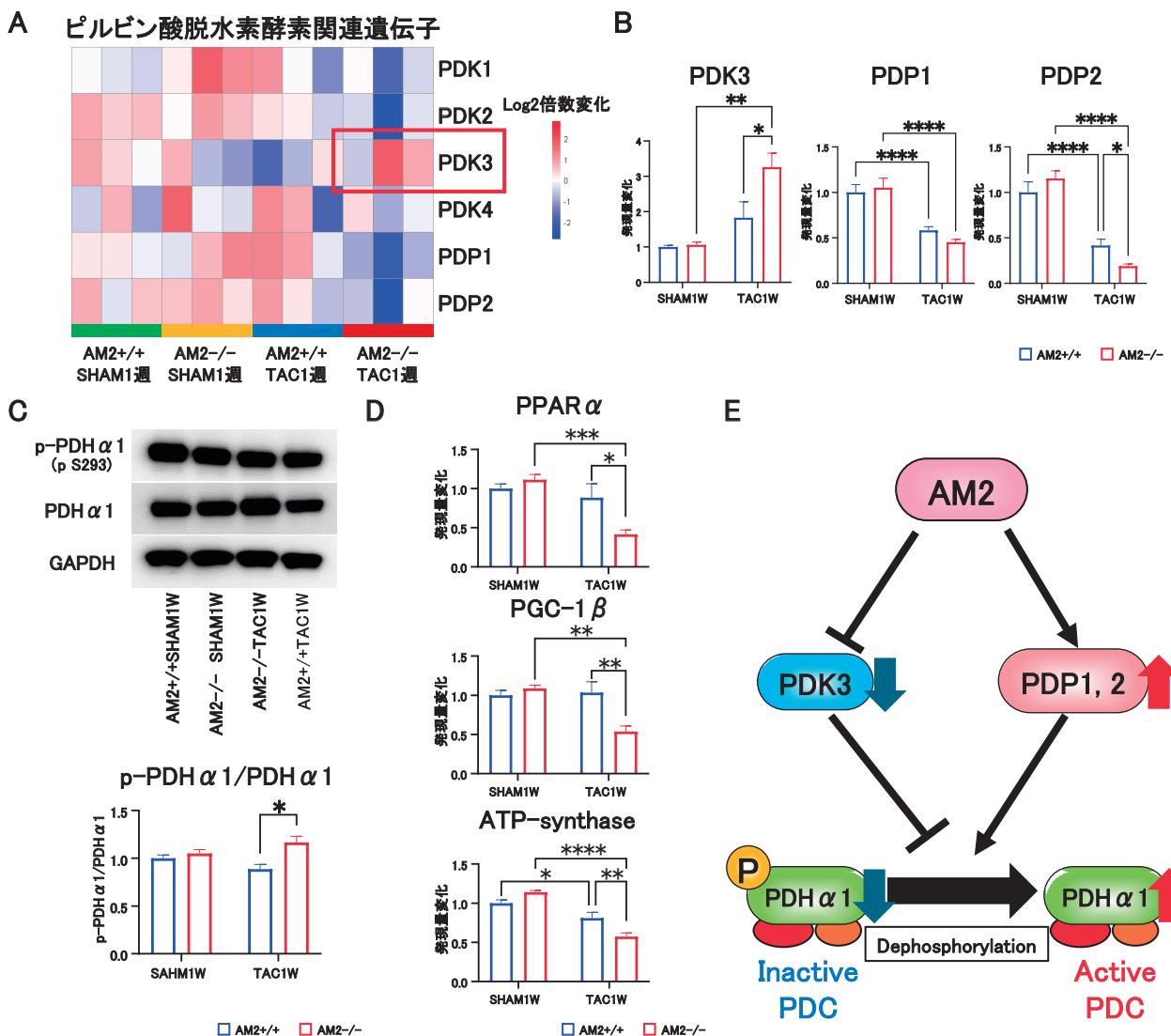


図6. AM2欠損心臓におけるピルビン酸脱水素酵素複合体（PDC）関連遺伝子の解析

- A. トランスクリプトーム解析によるPDC関連遺伝子発現量のヒートマップ
- B. qPCRによる心臓でのPDC関連遺伝子発現量の結果
- C. 心臓でのp-PDH α およびPDH α のウエスタンプロットの結果
- D. qPCRによる心臓でのPDC活性や β 酸化に関わる遺伝子発現量の結果
- E. AM2はPDK3、PDP1およびPDP2を介してPDCの脱リン酸化を促進する。

平均±標準誤差 * : P < 0.05 ; ** : P < 0.01 ; *** : P < 0.001 ; **** : P < 0.0001。

5. AM2遺伝子はミトコンドリア内に存在するピルビン酸脱水素酵素複合体（PDC）を調整する

そこで、AM2遺伝子が心臓のミトコンドリアの機能をどのように調整しているかを調べました。解糖系の主要酵素であるピルビン酸脱水素酵素複合体（PDC）に関わる遺伝子群を、TAC術後1週間のAM2^{-/-}マウスの心臓で、トランスクリプトーム解析したところ、PDCリン酸化を促進するピルビン酸脱水素酵素キナーゼ3（PDK3）の

発現量の上昇と、PDCを脱リン酸化するPDCホスファターゼ（PDP1、PDP2）の発現量の減少が認められました（図6 A）。これらはqPCR解析でも確認できました（図6 B）。加えて、TAC術後1週間のAM2^{-/-}マウスの心臓では、AM2^{+/+}マウスの心臓と比較して、PDCサブユニットPDH α 1のリン酸化が増加していることがウエスタンプロット分析で判明しました（P<0.05、図6 C）。さらにPDC活性やβ酸化に関わるPPAR α （P<0.05）とPGC-1 β （P<0.01）と、ATP-synthase（P<0.01）遺伝

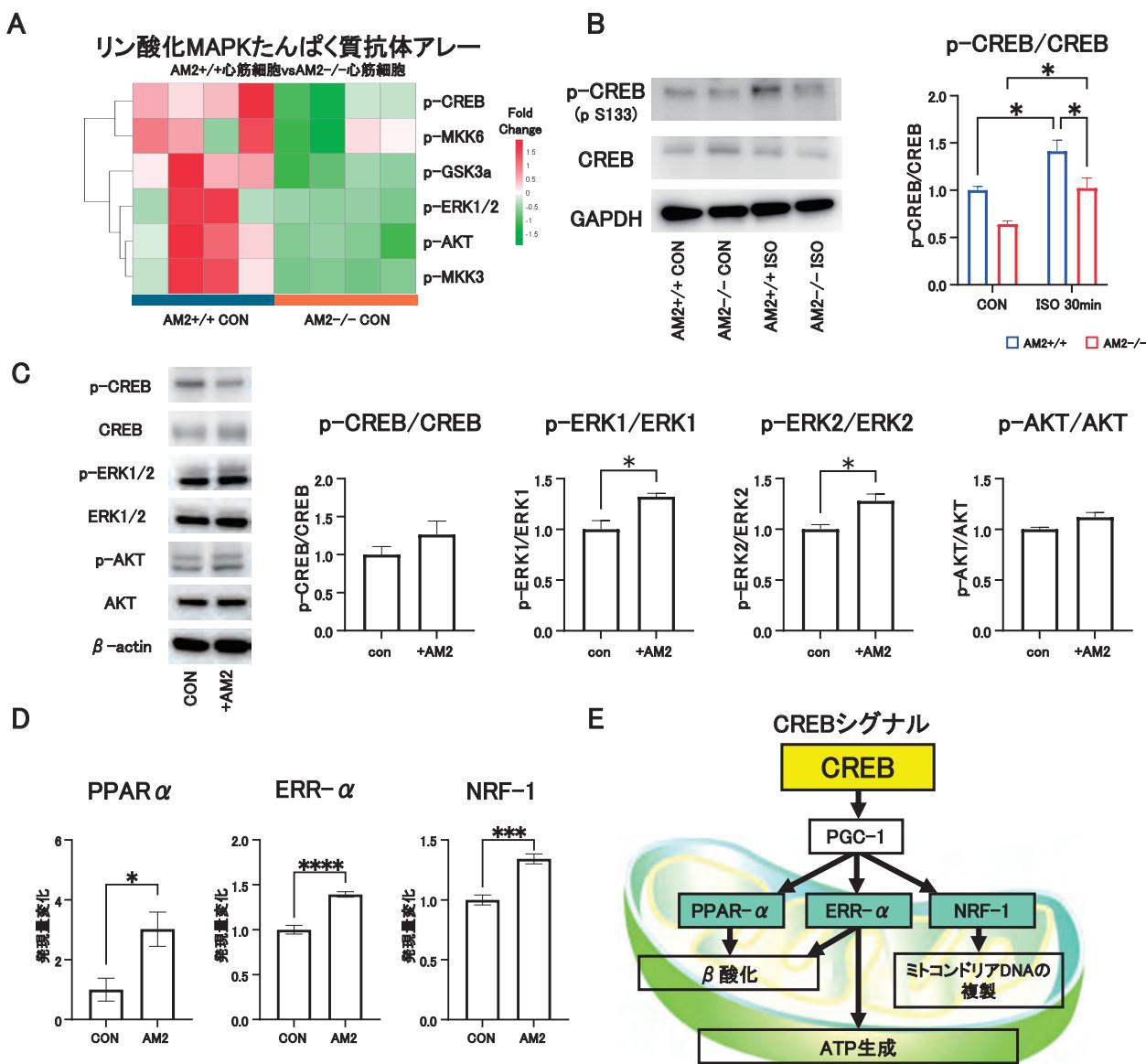


図7. 心筋細胞におけるAM2とMAPKの関連性

- 初代培養心筋細胞のリン酸化MAPKタンパク質アレーの解析結果
 - 初代培養心筋細胞でのp-CREBおよびCREBのウエスタンプロットの結果
 - H9c2ラット心筋細胞でのMAPKウエスタンプロット解析の結果
 - H9c2ラット心筋細胞でのミトコンドリア機能関連遺伝子のqPCRの結果
 - CREBシグナル伝達経路
- 平均±標準誤差 *: P < 0.05 ; **: P < 0.01 ; ***: P < 0.001 ; ****: P < 0.0001。

子の発現量はTAC術後1週間のAM2^{-/-}マウスの心臓で有意に低下していました(図6D)。これらの結果は、心臓圧力過負荷下で、AM2遺伝子欠損の心臓がミトコンドリアの機能の異常を示すのは、PDC活性の低下による可能性が示唆されました(図6E)。

6. AM2はMAPKシグナルを介して、ミトコンドリアの機能を調節する

AM2の刺激が如何にしてミトコンドリア内のPDC活性やβ酸化に伝わるのかを調べました。我々は、AM2^{+/+}およびAM2^{-/-}マウスから調整した胎児心筋細胞でのリン酸化MAPK抗体アレイ実験を実施しました(図7A)。

その結果、p-CREB、p-MKK6、p-GSK3a、p-ERK1/2、p-AKTおよびp-MKK3量がAM2^{+/+}心筋細胞と比較してAM2^{-/-}心筋細胞で減少していました。実際、心筋細胞のウエスタンプロット分析で、AM2^{-/-}心筋細胞ではAM2^{+/+}心筋細胞より、p-CREB/CREB比が減少していること、ISO処理した心筋細胞でも、それらの比の減少は有意に認められました(図7B、P<0.05)。さらに、これらの発見を検証するために、H9c2心筋細胞に外因性のAM2を投与する実験を行いました。その結果、AM2投与後、CREB、ERK1/2(P<0.05)、AKTとのリン酸化の増加をウエスタンプロット分析で認めました(図7C)。そして、CREBシグナルの下流にあるPPARα(P<0.05)、

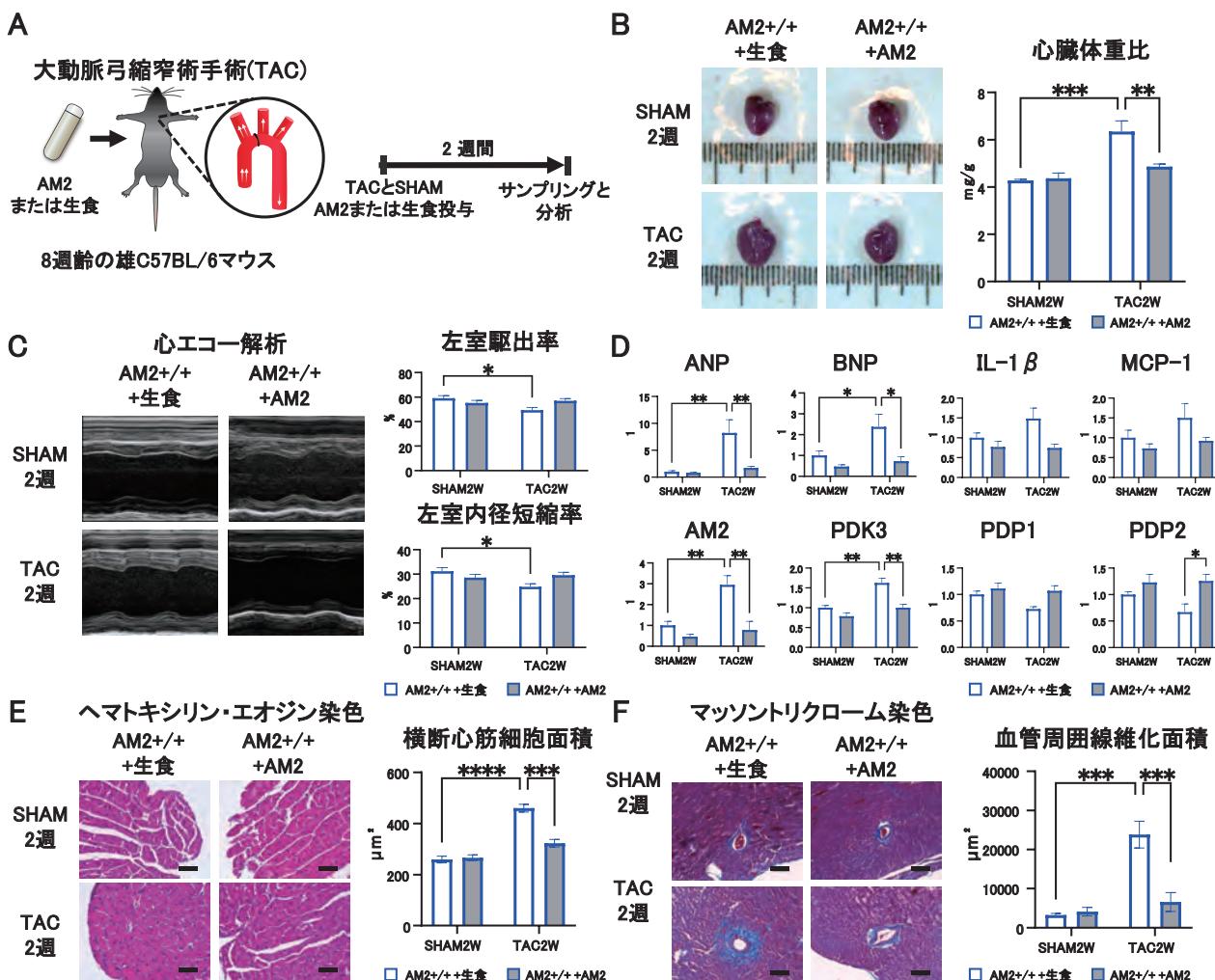


図8. AM2の投与による圧力過負荷による心不全症状の改善

- A. TAC術後マウスへの外因性のAM2投与実験のデザイン。
 - B. マウスの心臓像と心臓体重比。
 - C. 心エコー解析像と左室駆出率と左室内径短縮率の結果
 - D. 心臓でのqPCRの結果
 - E. 心臓のヘマトキシリン・エオジン染色像と横断心筋細胞面積の定量 スケール=50 μm
 - F. 心臓のマッソントリクローム染色像と血管周囲線維化面積の定量 スケール=100 μm
- 平均±標準誤差 *: P < 0.05 ; **: P < 0.01 ; ***: P < 0.001 ; ****: P < 0.0001。

ERR- α ($P < 0.0001$)、とNRF-1 ($P < 0.001$) 遺伝子の発現量の有意な増加をqPCR解析で認めました（図7D）。NRF-1はミトコンドリアDNAの複製に関する遺伝子ですが、我々はAM2-/心筋細胞のミトコンドリアコピー数の減少を観察しています（data not shown）。以上の結果をまとめると、AM2はCREBなどのMAPKリン酸化シグナル伝達経路を介して、心筋細胞のミトコンドリアのTCAサイクル、 β 酸化、ミトコンドリアDNAの複製を調整することが示唆されました（図7E）。

7. AM2は心臓の心不全に対する保護効果を示す

最後に、AM2投与による心不全に対する効果を検証しました。C57BL/6マウスに対してTACまたはSHAM手術を施し、AM2または生理食塩水（生食）を投与しました（図8A）。2週間後の結果として、生食投与を受けたTAC手術マウスのHW/BWは、SHAM手術マウスのそれより有意に増加しました（ $P < 0.01$ ）。一方、AM2を投与されたTAC手術マウスのHW/BWは、SHAM手術マウスのそれと同等でした（図8B）。心エコー検査の結果（図8C）、生食投与のTAC手術マウスでは、左室駆出率、左室内径短縮率が有意に減少しましたが、AM2投与

のTAC手術マウスとSHAM手術マウスでそれらの差はありませんでした。

qPCR解析の結果、TAC手術群においてAM2投与はANP、BNP ($P < 0.01$)、およびPDK3 ($P < 0.01$) の遺伝子発現量を低下させました。IL-1 β 、MCP-1、PDP1、PDP2の発現量に関しては、AM2投与群はSHAM手術群と同程度を維持していました。組織学的分析でも、TAC手術マウスの心臓での横断心筋細胞面積（図8E）および血管周囲線維化面積（図8F）はAM2投与によって、SHAM手術マウスのそれと同程度でした。これらの結果から、AM2投与は心不全の進行を抑制し、圧力負荷条件下での心臓機能を維持するための保護的役割を果たしていることが示唆されました。

結論

本研究では、AM2遺伝子が心筋細胞における解糖系およびTCAサイクルに関連するミトコンドリア機能の調整に関わり、圧負荷状態下で心臓機能を維持する上で重要な役割を果たすことを明らかにしました。AM2はMAPK経路を介してシグナルを伝達し、解糖、 β 酸化、酸化的リン酸化に関与する遺伝子発現に影響を及ぼしま

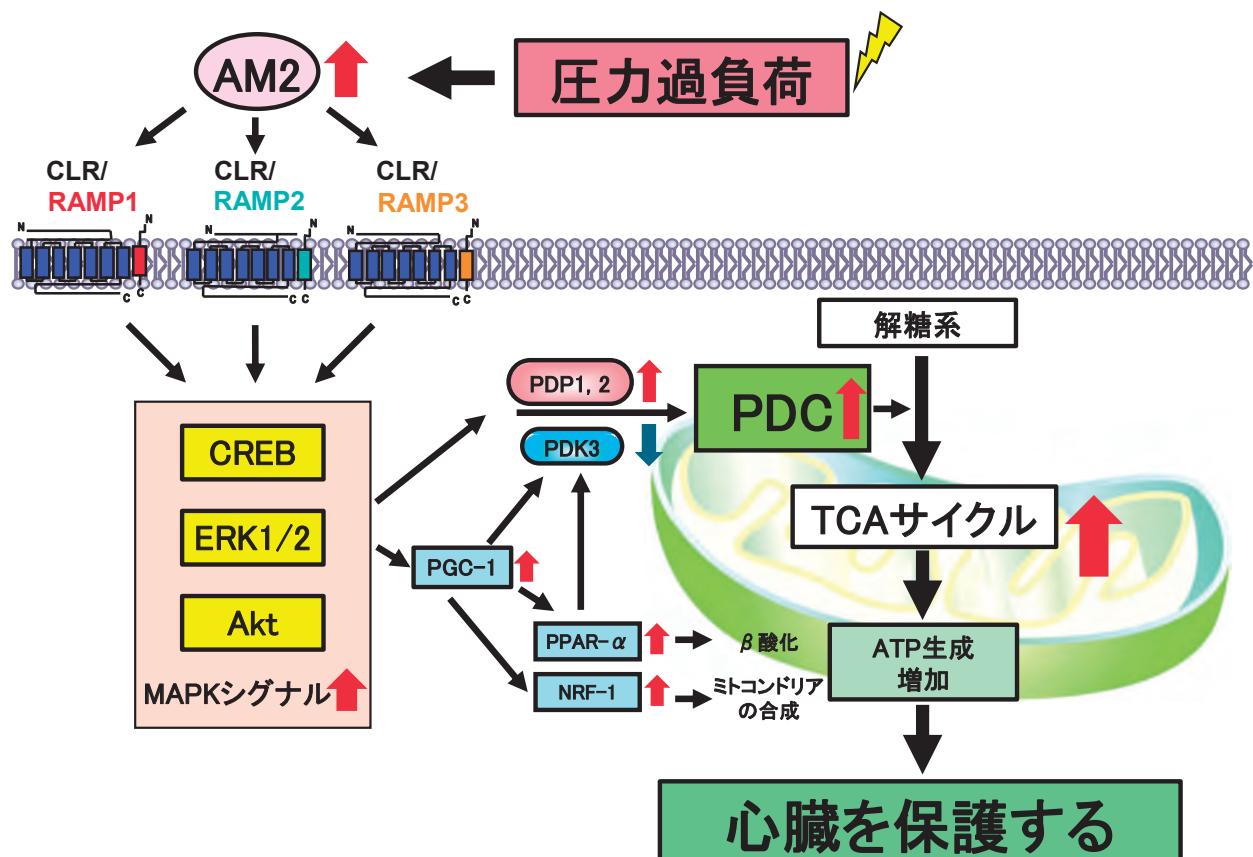


図9. 本研究で推定されたAM2によって活性化されるカスケード

す（図9）。また、AM2遺伝子欠損がTAC手術のマウスにおいて心不全の進行を加速させる一方で、外因性のAM2投与が心臓機能の維持に効果的でした。これらの発見は、AM2が心不全の新しい治療標的となり得る可能性を示唆しています。今後の研究では、AM2の分子メカニズム、特にAM2がRAMP1、RAMP2、RAMP3とどのように選択的に結合し、形成されたRAMP/CLR複合体を介してミトコンドリア機能を具体的に調節するか、心血管系における他のシグナル伝達経路との関係をさらに解明することが期待されます。

謝 辞

本稿を執筆する機会を与えて頂いた日本心脈管作動物質学会に深謝致します。

代謝物の定量分析にご協力いただいた群馬大学大学院医学系研究科教育研究支援センターの大日方英先生と相良陽子先生に感謝申し上げます。

利益相反

本論文内容に開示すべきCOIはありません。

引用文献

1. Freed, J.K., Healing the Broken Heart With Adrenomedullin. *Circ Res*, 2019. 124 (1) : p. 15–17.
2. Meijers, W.C., et al., Circulating heart failure biomarkers beyond natriuretic peptides : review from the Biomarker Study Group of the Heart Failure Association (HFA), European Society of Cardiology (ESC). *Eur J Heart Fail*, 2021. 23(10) : p. 1610 – 1632.
3. Hong, Y., et al., The pharmacology of adrenomedullin 2/intermedin. *Br J Pharmacol*, 2012. 166 (1) : p. 110 – 20.
4. Takei, Y., et al., Novel fish-derived adrenomedullin in mammals : structure and possible function. *Peptides*, 2004. 25 (10) : p. 1643-56.
5. Charles, C.J., M.T. Rademaker, and A.M. Richards, Hemodynamic, hormonal, and renal actions of adrenomedullin-2 in normal conscious sheep. *Endocrinology*, 2006. 147 (4) : p. 1871 – 7.
6. Babin, K.M., et al., Adrenomedullin 2/intermedin is a slow off-rate, long-acting endogenous agonist of the adrenomedullin(2)G protein-coupled receptor. *J Biol Chem*, 2023. 299 (6) : p. 104785.
7. Smith, R.S., Jr., et al., Intermedin is a new angiogenic growth factor. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2009. 297 (3) : p. H1040-7.
8. Chen, Y., et al., Intermedin (1 – 53) attenuates aging-associated vascular calcification in rats by upregulating sirtuin 1. *Aging (Albany NY)*, 2020. 12 (7) : p. 5651 – 5674.
9. Yallampalli, C., et al., Role of adrenomedullin 2 / intermedin in pregnancy induced vascular and metabolic adaptation in mice. *Front Physiol*, 2023. 14 : p. 1116042.
10. Pearson, L.J., et al., Intermedin (adrenomedullin-2) : a potential protective role in human aortic endothelial cells. *Cell Physiol Biochem*, 2009. 23 (1 – 3) : p. 97 – 108.
11. Kakihara, S., et al., Role of Adrenomedullin 2 / Intermedin in the Pathogenesis of Neovascular Age-Related Macular Degeneration. *Lab Invest*, 2023. 103 (4) : p. 100038.
12. Hirose, T., et al., Increased expression of adrenomedullin 2 /intermedin in rat hearts with congestive heart failure. *Eur J Heart Fail*, 2008. 10 (9) : p. 840 – 9.

Adrenomedullin 2/Intermedin Protects the Heart against Pressure Overload by Regulating Mitochondrial Function in Cardiomyocytes

Yunlu Zhao¹, Takayuki Sakurai^{1, 2}, Akiko Kamiyoshi^{1, 2}, Megumu Tanaka^{1, 2}, Yuka Ichikawa-Shindo¹
Hisaka Kawate¹, Yorishige Matsuda¹, Yan Zhang¹, Qianqian Guo¹, Peixuan Li¹, Ken Hoshiyama¹
Marina Hayashi¹, Jiake Li¹, Takayuki Shindo^{1, 2}

¹Department of Cardiovascular Research, Shinshu University School of Medicine

²Department of Life Innovation, Institute for Biomedical Sciences, Interdisciplinary Cluster for Cutting Edge Research,
Shinshu University
