

アドレノメデュリンの血管新生作用

アドレノメデュリンは、宮崎医科大学の北村氏および国立循環器病センターの寒川氏らにより、1993年に副腎髄質由来の褐色細胞腫からの分離が報告されたペプチドである。生体内に広く分布し、特に血管内皮や血管平滑筋細胞で多量に産生されている血管作動性の降圧物質として知られる。発見以来、10年間でおよそ1,400件にのぼるアドレノメデュリン関連論文が発表され、とりわけわが国

での研究が盛んとされる。この8月に東京大学大学院循環器内科から信州大学大学院臓器発生制御医学講座に就任した新藤隆行教授は、アドレノメデュリンに注目した研究を行っており、特に2001年に報告したノックアウトマウスの研究は1つのブレークスルーとなった。今回、このペプチドの血管新生作用を明らかにしている。



信州大学大学院
臓器発生制御医学講座
新藤隆行教授

ノックアウトマウスの観察から 血管新生作用を予測

アドレノメデュリンは、発見当初、副腎髄質に高濃度に存在することからこのように命名されたが、循環器系の臓器にも広く分布しており、特に血管内皮細胞での発現は副腎の20倍以上にものぼる。主として血管を拡張することによって強力な降圧作用を発揮するほか、強い臓器保護作用を持つことが、アドレノメデュリン過剰発現マウスを用いた敗血症性ショックモデルの検討から明らかになっている。

新藤教授らは、アドレノメデュリン遺伝子ノックアウト (AMKO) マウスを作製したことを2001年に発表した。同年と翌年、米国のCaron KMら、東京大学の下澤らもAMKOマウスの作製を発表しており、3者とも、AMKOマウスのホモ接合体 (AM^{-/-}) は胎生致死であると報告している。

新藤教授の検討によるとAM^{-/-}マウスは胎生12日以前には外見上の異常は認められなかったが、胎生13日になると卵黄動脈に発達不良が認められ、細い血管だけが生成された。また、臍帯動脈の血流不全や胎盤の発育不良が認められた。胎仔にも胎生13.5~14日で全身に著明な出血性変化が出現し、胎生13.5日で80%以上が死亡し、14.5日を越えて生存した胎仔は存在しなかった。胎仔の血管の変化は、出血性変化が顕在化していない12.5日の時点で既に生じており、肝臓内の小血管レベルで内皮細胞が基底膜から部分的に剥離し、血球が漏出している像が認められた。頸部の比較的太い血管のレベルでも内皮細胞が変形して管

腔側に突出し、心嚢腔も拡大して心嚢水の貯留が生じていた。

同教授は「遺伝子をつぶしてみても、初めてアドレノメデュリンが血管の構築そのものに重要だということがわかってきた。VEGF (vascular endothelial growth factor: 血管内皮増殖因子) など、血管新生因子の多くは欠損すると胎生致死になるが、血管作動性物質で胎生致死を招くものはアドレノメデュリン以外にあまりないのではないか。そこで、われわれはアドレノメデュリンが血管新生にかかわる重要な物質であるという仮説を立てて、検討を始めた」と、今回の研究の発端を説明している。

アドレノメデュリンは 虚血肢の血流を回復させる

手始めに、マウスの大腿動脈を切断して片側下肢虚血モデルを作製し、アドレノメデュリン投与

群、陽性コントロールとして血管新生因子の代表格であるVEGF投与群の3群間で虚血部位の回復状態を比較した。術後28日の時点で、コントロール群の虚血肢の足指では高頻度に壊死が観察された

が、アドレノメデュリン投与群とVEGF投与群では壊死は見られなかった。また、レーザードプラによる血流の観察では、術後12日でアドレノメデュリン投与群、VEGF投与群ともに9割以上の血流回復が見られた (対コントロール群P<0.05, 図1)。術後28日の虚血部位の毛細血管密度は、アドレノメデュリン投与群でコントロールの約2.2倍、VEGF投与群で約2.8倍 (P<0.01) だった。

上述のようにAMKOマウスのホモ接合体は胎生致死だが、ヘテロ接合体 (AM^{+/-}) は外見上明らかな異常が認められず、普通に生まれてくる。しかし、心臓や腎臓などでのアドレノメデュリン産生量は、正常の約半分に低下している。

AM^{+/-}ノックアウトマウスと同腹の野生型マウスに上記と同様の方法で片側虚血肢を作製し、レーザードプラで術後7日目の血流の回復を見ると、明らかに野生型マウスのほうが順調だった (P<0.05)。また、アドレノメデュリンの受容体拮抗薬AM22-52を野生型マウスに投与した系でも、血流

の回復低下と血管形成の減少が見られ、血管形成の減少の程度はAM^{+/-}ノックアウトマウスと野生型に対するAM22-52投与群でほぼ同等で、野生型の半分近くに低下していることが確認された。

アドレノメデュリンは血管新生にかかわる2つの経路を活性化

実験を進めていくなかで、HUVECs (ヒト臍帯静脈内皮細胞) にアドレノメデュリンとVEGFを添加した系で、それぞれを単独で添加するより同時に添加したほうが細胞増殖が有意に進展することから、新藤教授はアドレノメデュリンとVEGFにsynergistic (相乗的) な作用があるのではないかと推測した。

この仮説は、HAECs (ヒト血管内皮細胞) 培養系の実験で、アドレノメデュリンの投与量と投与時間依存性にVEGF mRNAの発現が増強することで確認された。

最近、VEGFによる血管新生のメカニズムとして、Akt-eNOS (内皮型一酸化窒素合成酵素) 経路が注目されている。AktはPI3キナーゼ (PI3K) によって活性化されるセリン・スレオニンリン酸化酵素で、血管新生に至る一連の経路として、VEGFが血管内皮でPI3Kの活性化を通じてAktのリン酸化を促進させることによってeNOSを活性化させる経路が提唱されている。

そこでHUVECsを用いて、アドレノメデュリン単独投与の系とVEGFを添加した系でAktのリン酸化の程度を検討すると、アドレノメデュリンとVEGFを同時に添加した系でアドレノメデュリンの投与量依存性にAktのリン酸化が増強することが確認された。eNOSのリン酸化も同様に、アドレノメデュリンとVEGFをとともに添加した系で、アドレノメデュリン投与量依存性に増強した (図2)。

新生血管の安定化作用に注目

一連の検討結果から、従来血管拡張作用を持つ血管作動性物質の1つと考えられてきたアドレノメデュリンが、血管新生という全く新しい側面を持つこと、その作用

図2. AMはVEGFによるAkt, eNOSのリン酸化を増強する

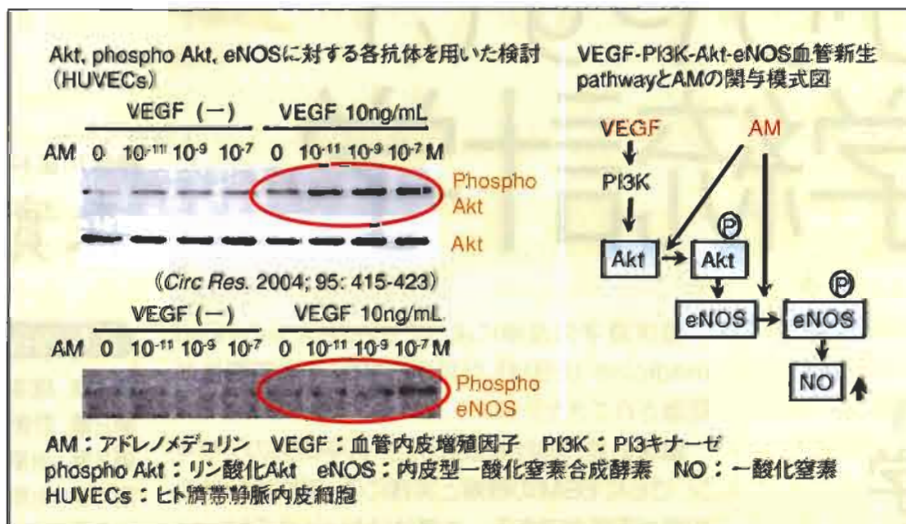
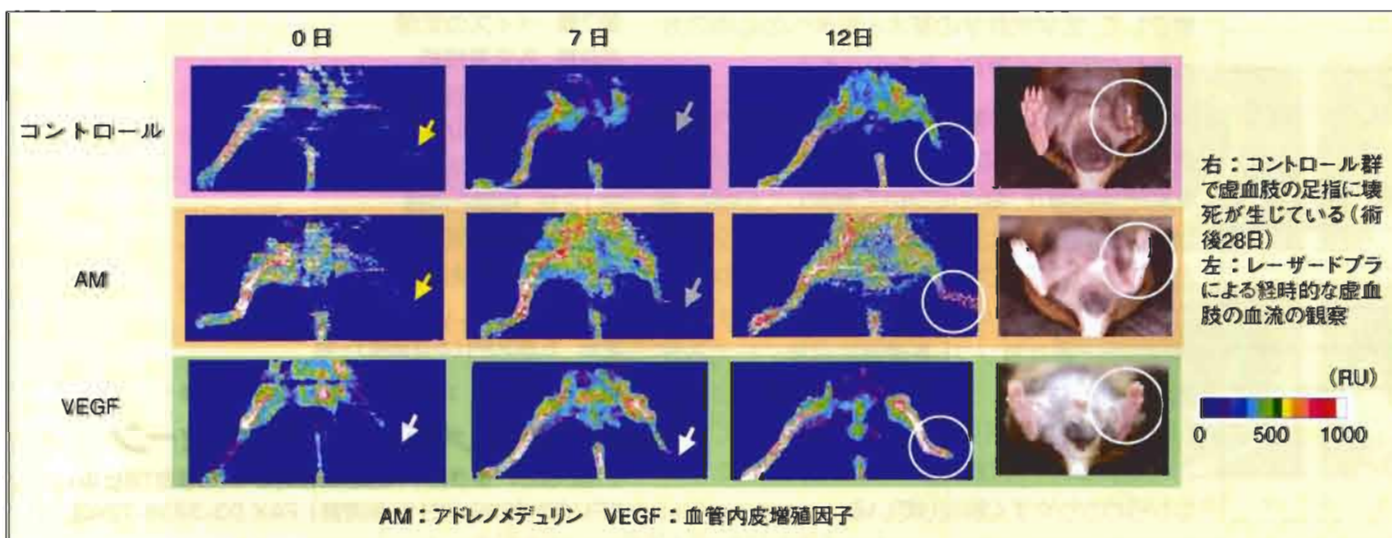


図1. AM, VEGF投与でマウス虚血肢の血流が回復する



(Circ Res. 2004; 95: 415-423)

は主としてVEGFの発現亢進とVEGFによるPI3K-Akt-eNOS経路の増強という2つのpathwayを介して発現されていることが示唆された。

ところで、AM^{+/-}ノックアウトマウスにアドレノメデュリン、VEGFのどちらかを投与しても、虚血肢の血流はそれぞれの投与群でほぼ同等に回復する。ところが、VEGFのレセプターであるFlk-1遺伝子をノックアウトしたマウスにアドレノメデュリンを投与しても、虚血肢の血流はコントロール

群と同程度にしか回復しない。これらの結果は、既述の実験でも示唆されたように、アドレノメデュリンとVEGFが上下関係にあり、虚血下においてはVEGFがアドレノメデュリンの下流に存在して作用を発揮することを示唆している。

とすると、実際の血管新生療法に際しては、VEGFを投与すれば十分ではないか、という考え方が成り立つことになる。

しかし残念ながら、VEGFによって誘導された血管は非常に脆弱

で浮腫を起しやすく、かつVEGFの投与をやめるとせっかくの新生血管は消失してしまうことが知られている。この点に関連して新藤教授は、アドレノメデュリンが現在試みられている血管新生療法の次のステップのキー物質になりうるとして、次のように話している。

「アドレノメデュリンによってどのような因子の発現が増強するかをDNA arrayで検討すると、VEGFだけでなくさまざまな因子を動かすことがわかってきた。なかでも

現在われわれが最も注目しているのが、細胞接着因子との関連だ。ノックアウトマウスによる胎生期の検討からも、アドレノメデュリンは血管新生だけでなく、細胞間の接着を強固にして基底膜を安定化させ、浮腫を防止し、血管を丈夫に維持する働きをしていることが示唆されている。したがって、アドレノメデュリンは新生血管を安定に維持する、より成熟した血管新生療法を実現するための有力な候補物質になりうるのではないかと考えている」