

ベーシック

日本心脈管作動物質学会研究奨励賞受賞論文

アドレノメデュリン-RAMP 2 システムによる血管新生および血管構造維持機構

新藤 優佳, 桜井 敬之, 神吉 昭子, 小山 晃英, 吉沢 隆浩, 新藤 隆行
 信州大学大学院医学系研究科 臓器発生制御医学講座

はじめに

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血管拡張作用を持つペプチドである¹。AMは、全身に広く分布し、血管においては血管内皮細胞や、平滑筋細胞から分泌される。我々はこれまで、AMおよびその関連因子の遺伝子操作動物の解析から、これらの病態生理学的意義を検討してきた。AMノックアウトマウスのヘテロ接合体では、血圧上昇を認めると共に、心血管系に傷害を加えたときの心肥大、線維化、腎障害、動脈硬化が亢進しているのに対し、血管特異的AM過剰発現マウスでは逆に血圧低下を認め、臓器傷害や動脈硬化に抵抗性を示すことから、AMが臓器保護作用、抗動脈硬化作用を有することを報告してきた²⁻⁶。

更に我々は、AMノックアウトマウスのホモ接合体 (AM^{-/-}) では、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⁷。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はじめて明らかとなった。

AM-RAMP 2 系と血管新生

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⁸。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、アドレノメデュリン受容体活性調節タンパク

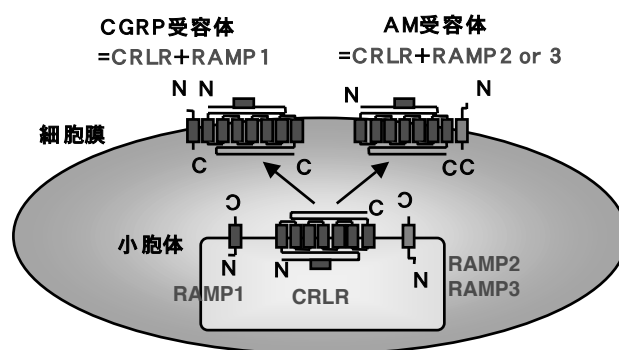


図1. AM及びCGRPの受容体システム

RAMP (receptor activity modifying protein) 1, 2, 3 のいずれかと重合することにより、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 (図1)。

我々は、AMノックアウトマウスが致死となる発生段階の血管においては、RAMPサブアイソフォームの中でも、特にRAMP 2の発現が高いことに着目し、血管におけるAMの機能発現には、RAMP 2が鍵分子となっている可能性を考えた。そこで、AM-RAMP 2系の病態生理学的意義を検討するため、RAMP 2ノックアウトマウスを新たに作成した⁹。

RAMP 2ホモノックアウトマウス (RAMP 2^{-/-}) 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2 A)。RAMP 2^{-/-}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2 B)。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3)。以上の所見から、RAMP 2^{-/-}では、血管構成細胞は正

*信州大学大学院医学系研究科 臓器発生制御医学講座
 (〒390-8621 長野県松本市旭3-1-1)

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、Real-time PCR法により、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ゲン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遺伝子発現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発現量に変化を認めないことから、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示された。

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の発現が半減していたが、大きな外観上の異常を認めず、成体で得られた。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、血管新生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、液体窒素処理による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のかどうか検討するため、我々は、ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)を細胞株化したEAhy926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(図4A)。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(0.5mM, 2hr)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(図4B)。

以上より、血管内皮細胞のAM-RAMP2系を選択的

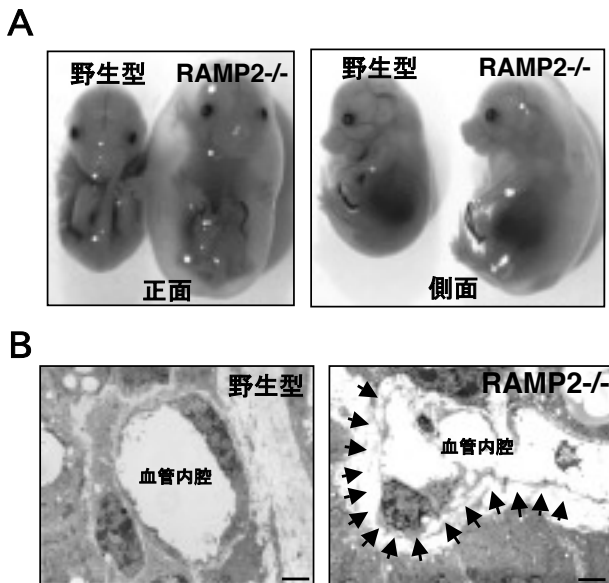


図2. RAMP2ノックアウトマウス(RAMP2^{-/-})胎仔の外観と血管構造の異常
A. マウス胎仔外観
B. 卵黄動脈の電顕像 Bar = 2 μm

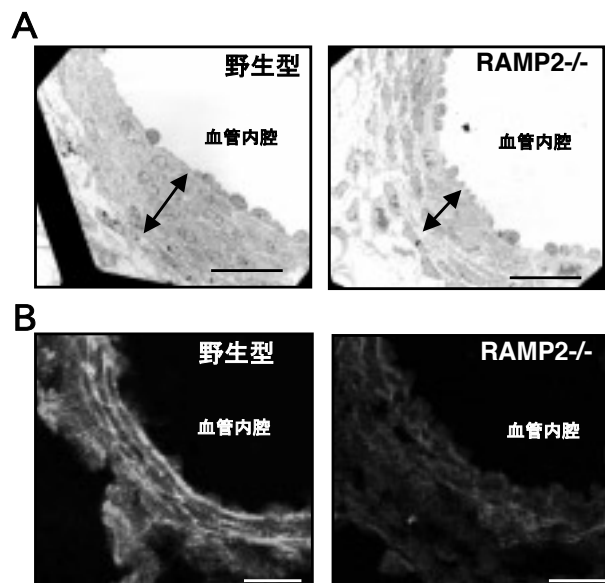


図3. RAMP2ノックアウトマウス(RAMP2^{-/-})胎仔の大動脈壁構造の異常
A. 血管壁の顕微鏡(矢印=平滑筋層)
B. 免疫染色像 Bar = 2 μm

に賦活化させることにより、管腔形成の充進に加えて、血管構造の安定化が得られることが証明された。

考 察

AM-RAMP2系は、血管新生を促進させるだけではなく、安定した血管構造の形成や維持に必要なシステムであると考えられた。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、脳浮腫などの難治性浮腫の新規治療法開発への展開が期待される。

文 献

1. Kitamura K, Kangawa K, Kawamoto M, Ichiki Y, Nakamura S, Matsuo H, Eto T. Adrenomedullin: a novel hypotensive peptide isolated from human pheochromocytoma. *Biochem Biophys Res Commun*. 1993; 192 (2): 553-560.
2. Shindo T, Kurihara H, Maemura K, Kurihara Y, Kuwaki T, Izumida T, Minamino N, Ju KH, Morita H, Oh-hashii Y, Kumada M, Kangawa K, Nagai R, Yazaki Y. Hypotension and resistance to lipopolysaccharide-induced shock in transgenic mice overexpressing adrenomedullin in their vasculature. *Circulation*. 2000; 101 (19): 2309-2316.
3. Imai Y, Shindo T, Maemura K, Sata M, Saito Y, Kurihara Y, Akishita M, Osuga J, Ishibashi S, Tobe K, Morita H, Oh-hashii Y, Suzuki T, Maekawa H, Kangawa K, Minamino N, Yazaki Y, Nagai R, Kurihara H. Resistance to neointimal hyperplasia and fatty streak formation in mice with adrenomedullin overexpression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002; 22 (8): 1310-1315.
4. Niu P, Shindo T, Iwata H, Ebihara A, Suematsu Y, Zhang Y, Takeda N, Iimuro S, Hirata Y, Nagai R. Accelerated cardiac hypertrophy and renal damage induced by angiotensin II in adrenomedullin knockout mice. *Hypertens Res*. 2003; 26 (9): 731-736.
5. Niu P, Shindo T, Iwata H, Iimuro S, Takeda N, Zhang Y, Ebihara A, Suematsu Y, Kangawa K, Hirata Y, Nagai R. Protective effects of endogenous adrenomedullin on cardiac hypertrophy, fibrosis, and renal damage. *Circulation*. 2004; 109 (14): 1789-1794.
6. Nishimatsu H, Hirata Y, Shindo T, Kurihara H, Kakoki M, Nagata D, Hayakawa H, Satonaka H, Sata M, Tojo A, Suzuki E, Kangawa K, Matsuo H, Kitamura T, Nagai R. Role of endogenous adrenomedullin in the regulation of vascular tone and ischemic renal injury: studies on transgenic/knockout mice of adrenomedullin gene. *Circ Res*. 2002; 90 (6): 657-663.
7. Shindo T, Kurihara Y, Nishimatsu H, Moriyama N, Kakoki M, Wang Y, Imai Y, Ebihara A, Kuwaki T, Ju KH, Minamino N, Kangawa K, Ishikawa T, Fukuda M, Akimoto Y, Kawakami H, Imai T, Morita H, Yazaki Y, Nagai R, Hirata Y, Kurihara H. Vascular abnormalities and elevated blood pressure in mice lacking adrenomedullin gene. *Circulation*. 2001; 104 (16): 1964-1971.
8. McLatchie LM, Fraser NJ, Main MJ, Wise A, Brown J, Thompson N, Solari R, Lee MG, Foord SM. RAMPs regulate the transport and ligand specificity of the calcitonin-receptor-like receptor. *Nature*. 1998; 393 (6683): 333-339.
9. 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*. 2008; 118 (1): 29-39.

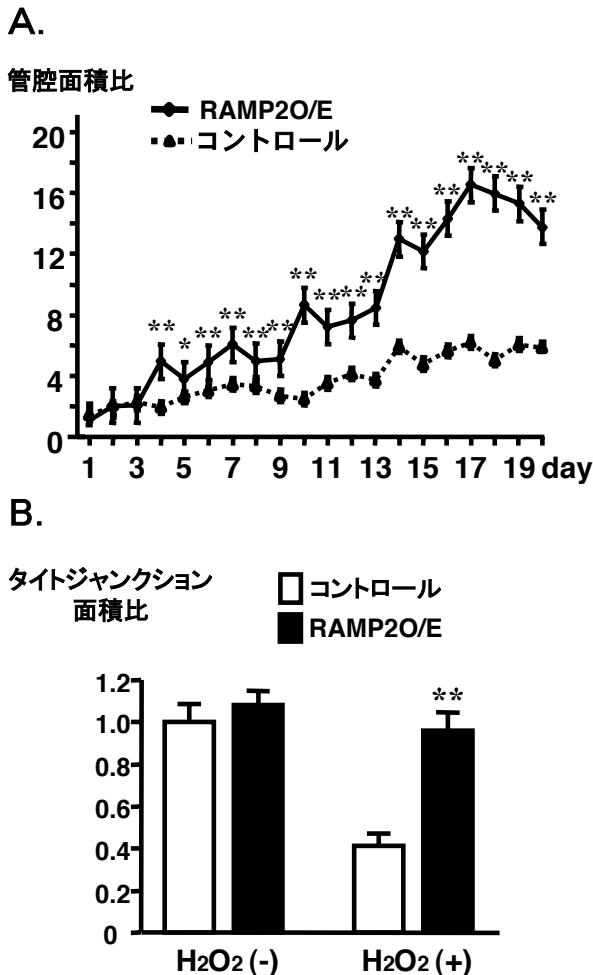


図4. RAMP2過剰発現内皮細胞 (RAMP2 O/E) の管腔形成能とタイトジャンクション構造維持能の検討
 A. RAMP2 O/Eでは、マトリジェルアセットにおける管腔形成能が充進している。
 B. 免疫染色像 (緑 = 4型コラーゲン、赤 = 平滑筋層)
 Bar = 2 μm