

●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

2

血管内皮細胞のアドレノメデュリン-RAMP2 システム
による血管恒常性維持機構

小山 晃英, 桜井 敬之, 神吉 昭子, 新藤 優佳, 河手 久香, 荒居 琢磨, 家里 康弘, 吉沢 隆浩,
楊 磊, 植竹 龍一, 五十嵐 恭子, 鳥山 佑一, 沖村 綾乃, 山内 啓弘, 田中 愛, 新藤 隆行
信州大学医学系研究科臓器発生制御医学講座

I. はじめに

血管は全身に分布して、生体機能の維持に必須の役割を果たす。一方で、血管の障害は、癌、脳卒中、心臓病の3大生活習慣病の病態にも深く関わっている。さらに血管の恒常性維持のための調節システムの異常と、その修復過程の破綻は、様々な慢性臓器障害の原因となる。血管の恒常性維持において中心となるのが、血管内皮細胞である。血管内皮細胞は血管構成細胞の中でも、体内最大の臓器間ネットワークを形成し、体内恒常性を維持する生理活性分子を産生する(1-3)。

ナトリウム利尿ペプチド、エンドセリン、アドレノメデュリンなどの重要な生体内生理活性分子の発見は我が国でなされ、その後の研究も我が国が世界をリードしてきた。これらの分子は、多彩な生理活性を有し、生体内恒常性維持において重要な役割を有する。中でもアドレノメデュリン(Adrenomedullin: AM)は、血管をはじめ全身の組織で広範に産生される血管作動物質である。AMは血管拡張物質として発見され、高血圧、心不全、腎不全などで血中濃度が上昇することから、各疾患への関与も示唆されてきた。

AMは、全身の組織に広く分布し、血管においては血管内皮細胞や、平滑筋細胞から産生される。AMは当初、血管拡張作用を有する血管作動物質として注目されたが、その後の研究から、抗炎症作用、抗アポトーシス作用、抗酸化作用など、多彩な生理活性を有することが明らかとなってきた。AMノックアウトマウス(AM^{-/-})は、胎生期の血管の発達が未熟であり、血管の構造に異常を認め、胎生致死となる(4)。このことから、AMが血管の発生に必須であることが明らかとなった。また、

AMヘテロノックアウトマウス(AM^{+/-})は、成体まで成長し、外見の変化はないが、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。これに対し、血管特異的AM過剰発現マウスでは、臓器障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が報告されている(5-9)。

一方、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、CLR(calcitonin-receptor-like receptor)という7回膜貫通Gタンパク共役型受容体を共有している(10)。AMとCGRPに対するCLRの特異性は、1回膜貫通型タンパクである受容体活性調節タンパクRAMP(receptor-activity-modifying-protein)により規定されていると考えられている。RAMPには、RAMP1, 2, 3の3種類が報告されている。CLR+RAMP1の組み合わせは主としてCGRPの受容体として作用し、CLR+RAMP2, CLR+RAMP3では、主としてAM受容体として機能する。

AM^{-/-}が致死となる直前の胎生期の血管内皮細胞においては、受容体活性調節タンパクRAMPのサブユニットフォームの中でも、特にRAMP2の発現が亢進していた。実際に、RAMP2単独ノックアウトマウス(RAMP2^{-/-})を作製してみると、RAMP2^{-/-}はAM^{-/-}同様、血管の発達不全、構造異常、著明な浮腫(図1)や出血などにより、胎生致死であった(11)。RAMP2^{-/-}胎児の血管における遺伝子発現の変化を検討すると、

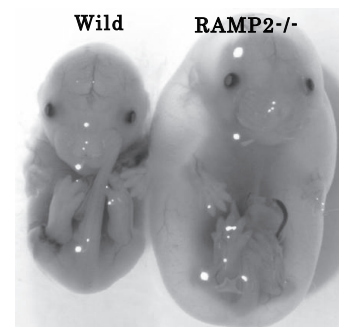


図1. RAMP2ノックアウトマウス胎仔(E14.5)の外観

* 信州大学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丁目1番1号)

RAMP2が欠損することによって、代償性のAMの発現亢進が認められたが、CLRやその他のRAMP発現量に変化が認められず、RAMP2欠損によりAMの受容体機能が失われること、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系が必要であることが示された。

II. 方法と結果

1) 血管内皮細胞特異的RAMP2ノックアウトマウス胎生期の表現形

本研究では、血管におけるRAMP2の病態生理学的意義を明らかとするために、RAMP2 floxマウスと、血管内皮細胞特異的にCreリコンビナーゼを発現するvascular endothelial (VE)-cadherin Cre transgenic マウス (12) を交配し、Cre-lox Pシステムにより、血管内皮細胞特異的RAMP2ノックアウトマウス (E-RAMP2^{-/-}) を新たに作製した。

E-RAMP2^{-/-}は、全身型のRAMP2ホモノックアウトマウス (Conventional RAMP2^{-/-}) と比較して、胎生後期まで発生段階が進むものの、表現形が強いものでは、周産期に全身性の著明な浮腫とそれに伴う体重の増加が認められ、ほとんどの個体で、周産期の死亡が確認された (図2)。血管の電顕像からは、平滑筋細胞に変化は認められないが、内皮細胞では基底膜からの部分的な剥離が確認された。E-RAMP2^{-/-}胎児の組織では、腸管絨毛の毛細血管の構造異常、肺の間質の浮腫、電顕像では血管内皮細胞の空胞化や基底膜からの剥離などが認められた。



図2. 血管内皮細胞特異的RAMP2ノックアウトマウス (E-RAMP2^{-/-}) 胎児 (E19.5) の外観

2) 血管内皮細胞特異的RAMP2ノックアウトマウス成体期の表現形

コンディショナルターゲティングによるE-RAMP2^{-/-}では、RAMP2欠損の浸透率は100%ではない。E-RAMP2^{-/-}のうち、RAMP2遺伝子発現が一部残った個体では成体が得られた。成体のE-RAMP2^{-/-}は、野生型マウスと比較して血圧が低下しており、胸部大動脈の病理所見では、収縮性が失われたように血管が拡張していた。さらに、6ヶ月齢E-RAMP2^{-/-}の大動脈では、細胞の老化の

マーカーとなるsenescence-associated- β -galactosidase (SA- β -gal) 染色陽性の所見が認められた。電顕による観察では、内皮細胞の基底膜からの剥離と、平滑筋層の断裂化が観察された (図3)。大動脈のリング標本のex vivo培養を行うと、E-RAMP2^{-/-}では、標本からの血管新生が著明に低下している事が観察された。これらの結果から、E-RAMP2^{-/-}成体では、血管内皮細胞のみならず、平滑筋にも構造異常を認め、両者の機能障害を生じていることが示唆された。

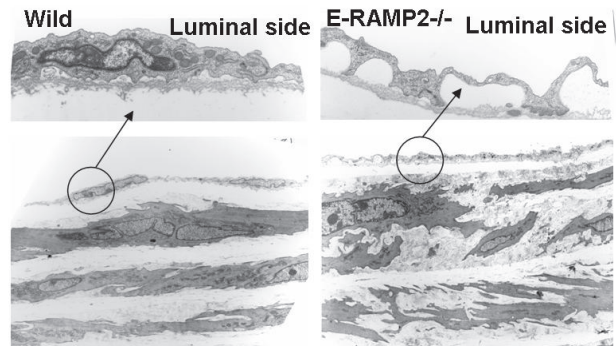
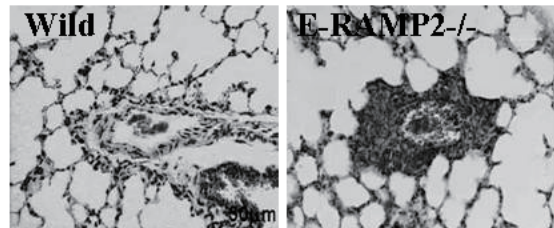


図3. 6ヶ月齢マウスの成体の血管壁の電顕像

E-RAMP2^{-/-}では、血管内皮細胞の基底膜からの剥離と血管平滑筋層の断裂化を認める。

全身型のRAMP2ヘテロノックアウトマウス (Conventional RAMP2^{+/-}) は成体まで成長し、外見上の変化は認めないが、1年齢を超える加齢マウスでは、肺、腎臓、肝臓といった主要な臓器に血管炎様の細胞浸潤が自然発症し、胸部大動脈では、SA- β -gal染色陽性の所見が認められる。さらに、炎症性接着因子であるICAM-1、VCAM-1が、8週齢の若年期から発現が亢

肺



肝臓

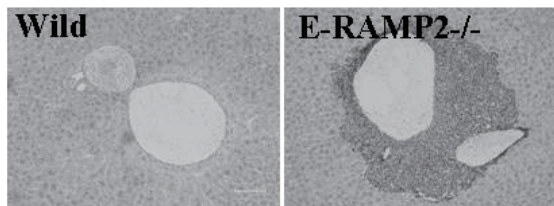


図4. 6ヶ月齢マウスの肺と肝臓の病理像

進している。一方、E-RAMP2^{-/-}では、RAMP2^{+/-}より、病変がさらに早期に出現した(図4)。血管炎様の所見は若年期でも認められ、6ヶ月齢程になると、より著明となった。浸潤細胞は、CD3やF4/80陽性細胞が多いことからTリンパ球やマクロファージの浸潤による慢性炎症が生じていることが示唆された。

これらの細胞浸潤のメカニズムを検討するために、野生型とRAMP2^{+/-}から、肝臓類洞内皮細胞を初代培養し、マクロファージの接着実験をおこなった。RAMP2^{+/-}由来の内皮細胞では、野生型と比較して、マクロファージの接着性が亢進していた。また、Real-time PCR法により内皮細胞の遺伝子発現を検討したところ、RAMP2^{+/-}の肝臓類洞内皮細胞では、VCAM-1の発現亢進、eNOSの発現低下が認められた。

E-RAMP2^{-/-}の肝臓においては、6ヶ月齢以上の一部のマウスで、肝硬変様の形態変化が認められた(図5)。肝臓組織のSirius red染色による検討では、通常の肝硬変とは異なり、線維化は肝細胞側ではなく、血管の走行に沿って進行していることが認められた。

E-RAMP2^{-/-}の腎臓では、水腎症と多発性嚢胞腎が自然発症し、嚢胞の周囲には線維化が著明であった(図6)。糸球体も拡大しており、糸球体硬化症を伴っていると考えられた。電顕像からは、糸球体において、足突起の融合、基底膜の肥厚、内皮細胞と基底膜の部分的離開などが確認された。

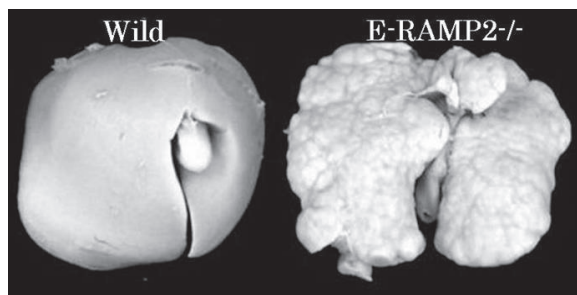


図5. 6ヶ月齢マウスの肝臓の外観

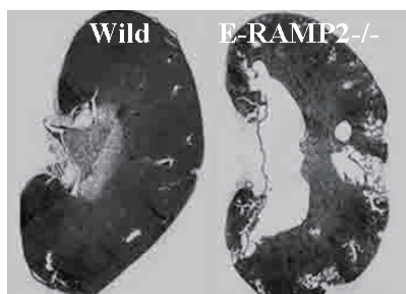


図6. 6ヶ月齢マウスの腎臓の断面像

3) 血管内皮細胞におけるAM-RAMP2システムと酸化ストレス

AMは、強い抗酸化作用を有することが報告されている。E-RAMP2^{-/-}における臓器障害の原因として、酸化ストレス亢進の可能性を考え、スーパーオキシドの産生を示すdihydroethidine (DHE) 染色、不飽和脂肪酸の過酸化物である4-hydroxy-2-nonenal (4 HNE)の免疫染色、NADPH oxidaseの細胞質型のサブユニットであるp67-phoxの免疫染色を行った。E-RAMP2^{-/-}の肝臓では、斑状にDHE、p67phox陽性所見を認め、中心静脈周囲に4 HNE陽性所見を認めた。腎臓では、DHE、4 HNE、p67-phoxともに尿細管に強い陽性所見が認められた。また腎臓では、NADPH-oxidaseのサブユニットであるp22^c、p47^c、p67-phoxの遺伝子発現が亢進していた。

酸化ストレスへの応答性におけるAM-RAMP2系の意義を検討するため、ヒト臍帯静脈内皮細胞を細胞株化したEAhy926細胞に、RAMP2を安定過剰発現させた細胞を作製した(11)。この細胞を用いて、早期老化(premature senescence)を引き起こすことが知られている。細胞への過酸化水素負荷実験を行った。RAMP2過剰発現細胞では、AM投与下において、コントロールと比較して、老化マーカーであるSA-β-galの染色性が低下していた。

4) 薬剤誘導型血管内皮細胞特異的RAMP2ノックアウトマウス成体期の表現形

E-RAMP2^{-/-}は、得られる成体が少ないため、成体期の解析に限界があった。このため、次に薬剤誘導性によりオンデマンドに内皮細胞のRAMP2を欠損させることができるdrug induced-E-RAMP2^{-/-} (DI-E-RAMP2^{-/-})を作成した。このマウスでは、RAMP2欠損誘導とともに、著しい体重増加を認めた。Evans Blueを用いた血管透過性アッセイの結果、血管透過性の亢進が確認された。さらに、RAMP2欠損誘導早期から内皮細胞の接着因子の発現の亢進と、腎糸球体内皮細胞の蜂の巣状の構造異常が認められた(図7)。

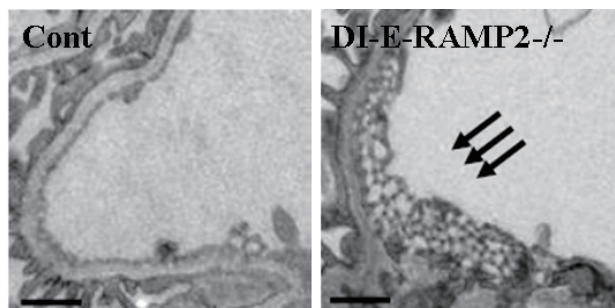


図7. DI-E-RAMP2^{-/-}の糸球体の電顕像

このマウスを用いて、下肢虚血モデルを作製し、血管新生の評価を行った。DI-E-RAMP2^{-/-}では、対照群と比較して血流の回復遅延、免疫染色から毛細血管の発達不全、間質の浮腫の増悪などが認められた。

Ⅲ. 考察

Conventional RAMP2^{-/-}は血管壁の構造異常により致死となる。一方、E-RAMP2^{-/-}は、Conventional RAMP2^{-/-}と比較して発生段階は進むものの、全身性の浮腫を引き起こし、肺の間質浮腫による呼吸不全、親マウスによる喰殺、育児放棄、授乳障害、腸管絨毛の浮腫による栄養吸収障害など諸々の原因から、周産期にほとんどのマウスが死亡する。Conventional RAMP2^{-/-}マウスの胎生期の血管壁では、4型コラーゲンやアクチンの発現低下が認められ、電顕像から血管壁の菲薄化と層状構造の破綻が観察される。これらのことから、RAMP2^{-/-}では、血管を構成する細胞の分化自体は認められるものの、血管壁構造が脆弱なため、血液循環開始後、最終的に血管が破綻してしまうと考えられた。一方、E-RAMP2^{-/-}では、血管内皮細胞の異常が、表現形の主因であると考えられ、内皮細胞間の結合の脆弱性、基底膜からの剥離などにより、血管内成分が漏れ出て、全身性の浮腫になったと予想される。今回、E-RAMP2^{-/-}の多くが全身性の浮腫により致死となったことから、血管内皮細胞の異常が、RAMP2^{-/-}の浮腫の表現形の主因となることが明らかとなった。

一部のE-RAMP2^{-/-}では成体が得られ、病理学的解析を中心に解析を進めた。E-RAMP2^{-/-}成体の胸部大動脈は、内皮細胞のみならず平滑筋細胞にも構造異常が観察された。E-RAMP2^{-/-}では、胎児期から内皮細胞が基底膜から剥離しており、様々なストレスが血管平滑筋層に大きく加わることで、平滑筋細胞の形質変換を生じ、血管の収縮力低下による血圧低下を引き起こしているのではないかと推測された。

各主要臓器では、血管炎様の細胞浸潤が認められた。これらの血管炎様の所見は、若年期でも認められるが、生後6ヶ月ほど経過した個体において、より広範囲に現れる。同様の所見は、RAMP2^{+/-}でも生後1年後くらいから徐々に認められる。一方でE-RAMP2^{-/-}では、RAMP2^{+/-}より、病変がより早期に出現する。前述したように、E-RAMP2^{-/-}では動脈壁の内皮細胞と平滑筋細胞の構造異常が確認されている。さらに薬剤誘導型で成体期から内皮細胞のRAMP2を欠損することが可能となるDI-E-RAMP2^{-/-}では、RAMP2欠損誘導早期の段階から内皮細胞の接着因子の発現亢進が認められた。これら

のことから、内皮細胞の機能不全を端に、血管構成細胞の形態が変化し、Transmigrationが起りやすい環境であることがわかる。

肝臓では、血管炎様の細胞浸潤のみならず、肝硬変様の形態変化が確認できた。さらにF4/80染色では、活性化されたマクロファージが多数確認できることから、慢性炎症が起きていることが示唆される。また、線維化は中心静脈周辺から広がるのではなく、類洞内皮細胞に沿って進行していることから、類洞内皮細胞の障害が、肝線維化のプライマリーな原因となっていることが予想された。腎臓においても、アドレノメデュリンのカウンターパートナーとされるエンドセリンの血管特異的過剰発現マウスが、加齢により嚢胞腎や糸球体硬化症などの腎障害を示す。このことからE-RAMP2^{-/-}の腎臓における病態は、内皮細胞の慢性傷害に起因することが予想される(13)。

E-RAMP2^{-/-}の肝臓、腎臓における、superoxide、酸化脂質、NADPH oxidaseの亢進が免疫染色、mRNAから確認された。AMには、強力な酸化ストレス抑制効果があり、E-RAMP2^{-/-}では酸化ストレスの亢進が臓器障害を促進した一つの原因と考えられる。一方、RAMP2の過剰発現内皮細胞に、過酸化水酸負荷をおこなったところ、コントロールと比較して耐性を示した。このことから、RAMP2は、AMを介して酸化ストレスの制御を可能とすることが示唆された。

Ⅳ. おわりに

今回の一連のノックアウトマウスの解析結果は、血管内皮細胞のRAMP2という、単独の因子の異常が、発生・成体での双方の血管の恒常性維持破綻をもたらすことを示した初めての知見である。本研究により、AMの発生における血管新生作用が主として血管内皮細胞のRAMP2によって規定されていることが明らかとなった。成体においても血管内皮細胞のRAMP2の急性欠損により、血管新生の低下など、血管の機能不全を生じることが明らかとなった。さらにRAMP2の慢性欠損により、内皮細胞の恒常性が破綻し、血管の老化が亢進し、最終的に全身の臓器不全を引き起こすことが示された。生理活性ペプチドそのものは血中半減期が短いため、慢性疾患の治療薬として応用するには制約がある。これに対し、受容体側の調節因子である膜タンパクRAMPを標的とすれば半減期の問題はなく、慢性疾患への応用に道が拓ける。AM-RAMP2システムの血管恒常性維持機構の解明は、これまで有効な手段がなかった慢性炎症と慢性臓器不全の新しい治療法開発に繋がることが期待される。

文 献

1. Mochizuki N : Vascular integrity mediated by vascular endothelial cadherin and regulated by sphingosine 1-phosphate and angiopoietin-1. *Circ J* 73 : 2183–2191, 2009
2. Higashi Y, Noma K, Yoshizumi M, Kihara Y : Endothelial function and oxidative stress in cardiovascular diseases. *Circ J* 73 : 411–418, 2009
3. Dejana E: Endothelial cell-cell junctions: happy together. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5 : 261–270, 2004
4. 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* 104 : 1964–1971, 2001
5. 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* 101 : 2309–2316, 2000
6. 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* 109 : 1789–1794, 2004
7. 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* 26 : 731–736, 2003
8. 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* 90 : 657–663, 2002
9. 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* 22:1310–1315, 2002
10. 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* 393 : 333–339, 1998
11. 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 : 29–39, 2008
12. Kogata N, Arai Y, Pearson JT, Hashimoto K, Hidaka K, Koyama T, Somekawa S, Nakaoka Y, Ogawa M, Adams RH, Okada M, Mochizuki N : Cardiac ischemia activates vascular endothelial cadherin promoter in both preexisting vascular cells and bone marrow cells involved in neovascularization. *Circ Res* 98 : 897–904, 2006
13. Shindo T, Kurihara H, Maemura K, Kurihara Y, Ueda O, Suzuki H, Kuwaki T, Ju KH, Wang Y, Ebihara A, Nishimatsu H, Moriyama N, Fukuda M, Akimoto Y, Hirano H, Morita H, Kumada M, Yazaki Y, Nagai R, Kimura K : Renal damage and salt-dependent hypertension in aged transgenic mice overexpressing endothelin-1. *J Mol Med* 80 : 105–116, 2002