

日本心脈管作動物質学会研究奨励賞受賞論文

1

アドレノメデュリン-RAMP 2系による
心臓エネルギー代謝制御と恒常性維持

吉沢 隆浩¹, 桜井 敬之¹, 神吉 昭子¹, 河手 久香, 新藤 優佳¹, 荒居 琢磨¹, 小山 晃英¹, 家里 康弘¹,
楊 磊¹, 植竹 龍一¹, 山内 啓弘¹, 田中 愛¹, 川上 速人², 中西 広樹³, 田口 良³, 新藤 隆行¹
¹信州大学医学系研究科臓器発生制御医学講座, ²杏林大学医学部解剖学, ³東京大学医学部メタボローム講座

序言

多くの心脈管作動物質は、心臓やその他様々な臓器において、機能調節や恒常性維持に重要な役割を果たしている。また、それらの機能破綻は多くの疾患に関与することが知られている。心血管病の病態メカニズム解明や、治療法開発のためには、これら生理活性物質の機能メカニズム解明が重要である。

アドレノメデュリン (AM) はヒト褐色細胞種から発見されたペプチドで、血管拡張性の降圧作用を有する^[1, 2]。AMは全身の臓器に広く分布しており、副腎だけでなく、肺や腎臓、心臓、血管等主要な組織でも多く生合成・分泌されている^[3]。また、炎症性サイトカインや血管作動性物質などの内在性生理活性物質や低酸素、酸化ストレスなど様々な要因がAMの生合成調節に関与している。

AMを静注すると、降圧とともに心拍数や心拍出量は増加する^[4]。AMの心拍出量増加作用は、AMが心臓でcAMPやCaの増加を介して直接作用している可能性が示唆されている。また、培養心筋細胞を用いた研究から、AMはアンジオテンシンIIによる心筋蛋白質合成能の活性化を抑制し、心筋肥大抑制作用があることも示唆されている^[5]。

さらに、AM過剰発現マウス (Tg) では有意な降圧が観察されたが、血圧が野生型に比べて低いにもかかわらず、エンドキシシンショックに対しては抵抗性であり、AMの抗炎症作用および臓器保護作用が示された^[6]。

AMノックアウトマウス (KO) では、ホモ接合体 (AM^{-/-}) は血管形成異常や浮腫が認められ、胎生致死となる。ヘテロ接合体 (AM^{+/-}) では、外見や行動に明らかな差は認められないが、AMの発現が心臓や腎臓で低下しており、血圧の上昇が認められる^[7]。また、AM^{+/-}マウスでは心血管系の負荷実験を行った時の心肥大、線維化、腎障害が亢進しており、AMが臓器保護作用を有する心脈管作動物質であることが示唆される^[8, 9]。

AMとCGRPは受容体としてCLR (calcitonin-receptor-like receptor) というG蛋白共役型受容体を共有する^[10]。CLRのAM受容体としての特異性は、1回膜貫通型のRAMP (receptor-activity-modifying protein) と呼ばれる膜蛋白によって規定される。RAMPには3つのアイソフォームが知られており、RAMP 2またはRAMP 3とCLRが結合することでAM受容体として機能する。また、RAMPはCLRの細胞膜表面への発現に必須であり、AMの生理機能発現に重要である^[11]。

RAMPの各アイソフォームのKOマウスの内で、AM^{-/-}と同様に胎生致死となるのはRAMP 2^{-/-}のみであった。ヘテロ接合体 (RAMP 2^{+/-}) においても、野生型 (WT) と比較して、血管新生能などに違いを認められた^[12]。このことから、成体におけるAMの機能発現にもRAMP 2が必須であり、心血管系の恒常性維持に重要であることが示唆される。

しかし、AMおよびRAMP 2の心臓における機能や作用メカニズムの解析には、それらのホモ接合体のKOマウスが胎生致死になることから、限界があった。そこで、本研究では、成体心筋細胞特異的RAMP 2^{-/-}を用いて、その病態生理学的意義の解明に取り組んだ。

方法

動物実験はすべて信州大学医学部の定める動物実験指

* 1 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3-1-1)

* 2 杏林大学医学部解剖学
(〒181-8611 東京都三鷹市新川6-20-2)

* 3 東京大学医学部メタボローム講座
(〒113-0033 東京都文京区本郷7-3-1)

針に従って行った。実験には8から12週齢の雄のマウスを用い、SPF条件下で明：7 AM～7 PM，暗：7 PM～7 AMの光のコントロール下，飼育した。心筋細胞特異的RAMP 2^{-/-}マウス (C-RAMP 2^{-/-}) は，RAMP 2 floxマウスと α -MHC-MerCreMerマウス^[13]を交配することで作成した。RAMP 2の欠損誘導にはタモキシフェンを用いた。

RAMP 2の欠損誘導後，安楽死したマウスの胸郭を開胸し写真を撮影・計測して心胸郭比を求めた。摘出した心臓の重量と体重から心体重比を求めた。心エコー検査にはVevo660イメージングシステムを用い計測を行った。採取した心臓を10%ホルマリンで固定し，パラフィン包埋，薄切，染色し，病理解析に用いた。一般染色にはHE染色を，心線維化の評価にはマッソン・トリクロム(MT)染色を行った。また，過酸化脂質の指標として4-HNE染色を行った。電子顕微鏡写真の撮影には，2%グルタルアルデヒドで還流固定した心臓サンプルを用いた。

遺伝子発現の評価にはRT-リアルタイムPCRを用いた。組織から抽出したRNAをDNA free処理した後，逆転写反応を行いcDNAを合成した。リアルタイムPCRはABI PRISM 7300 Systemを用いて行った。

マウス胎児初代培養心筋細胞は胎生14.5日から16.5日の胎児の心臓から分離・培養を行った。培養心筋細胞にてRAMP 2の欠損誘導後，ミトコンドリア膜電位の評価としてTMRE染色を，ミトコンドリアからの活性酸素種(ROS)産生の評価としてMito SOX Red染色を行った。脂質メタボローム解析は心臓組織から抽出した脂質をLC-MSにて解析した。

結果

心筋細胞特異的RAMP 2^{-/-}マウス (C-RAMP 2^{-/-}) では心拡大を認め (図1 A)，心胸郭比 (CTR) の増大 (図1 B) や心体重比の増加 (図1 C) を認めた。

心エコー検査 (図2 A) からは左室駆出率 (EF) の低下 (図2 B) や左心室径(LVDs)の拡大 (図2 C) を認め，拡張型心筋症様の所見と心機能の低下が認められた。

病理解析からは心筋細胞肥大 (図3 A) と，MT染色で心線維化の亢進 (図3 B) が認められた。電子顕微鏡による観察 (図3 D) では，心筋原線維の走行異常が認められた。また，4-HNE免疫染色からは過酸化脂質の蓄積亢進が認められた (図3 C)。

RT-リアルタイムPCRで遺伝子発現を検討したところ，BNPおよびSERCA 2に有意な発現変化が認められ，心不全に合致した所見と考えられた。また，コラーゲン α 1 (Coll. α 1) といった心線維化に関連する遺伝子にも変動を認めた (図4)。

電子顕微鏡写真をさらに詳しく解析したところ，ミトコンドリアの構造に異常が認められた (図5 A)。また，ミトコンドリア制御因子 (PGC-1 α ，PGC-1 β ，PPAR- α) について，RT-リアルタイムPCRにおいて，遺伝子発現の低下が認められた (図5 B)。

ミトコンドリア内膜特異的な脂質で，ミトコンドリア機能維持に重要な役割を果たすことが知られているカルジオオリピン (CL) についてLC-MSで解析を行ったところ，複数の分子種で心臓組織中の含量低下を認めた。また，DHA (22:6) 含有の成熟型CLの分子種においては早期の段階で低下傾向を認めた (図6)。

胎児初代培養心筋細胞では，RAMP2の欠損誘導により，TMRE染色において，ミトコンドリア膜電位の低下が (図7 A)，Mito SOX Red染色において，ミトコンドリアからのROS産生の増加が認められた (図7 B)。

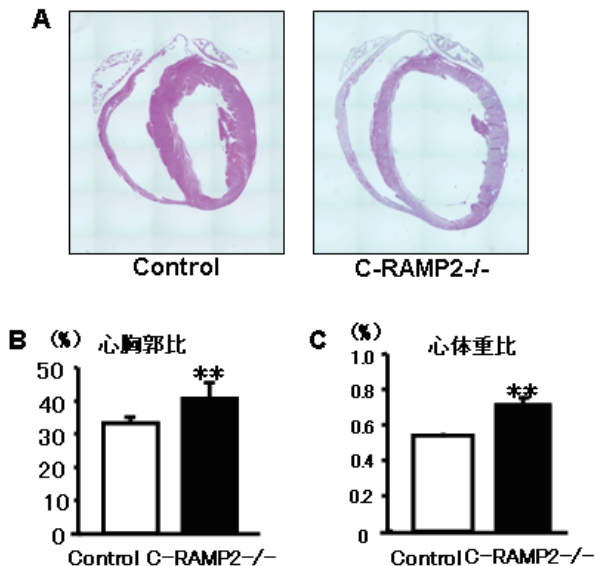


図1

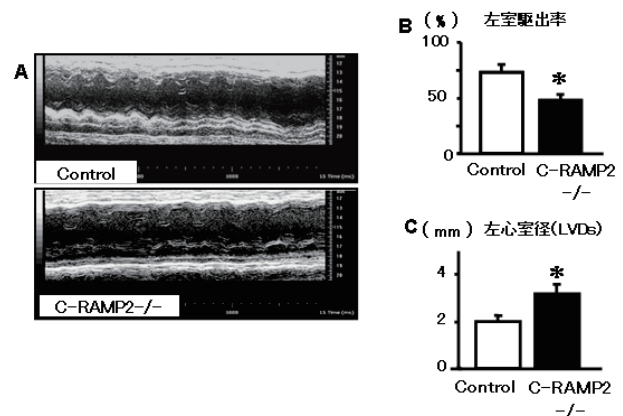


図2

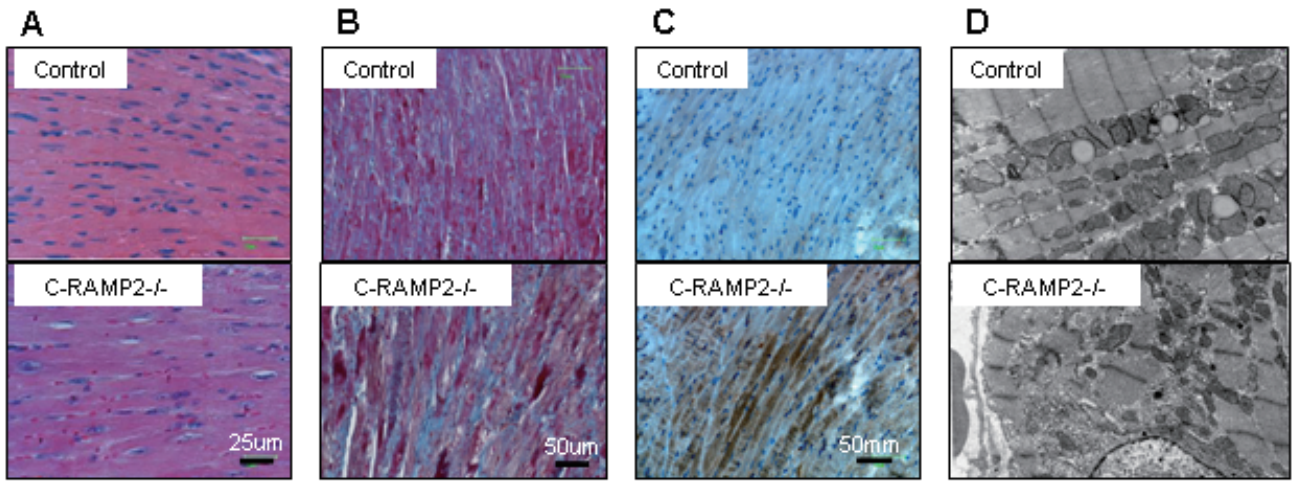


図3

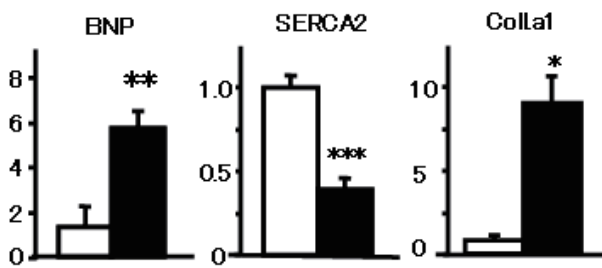


図4

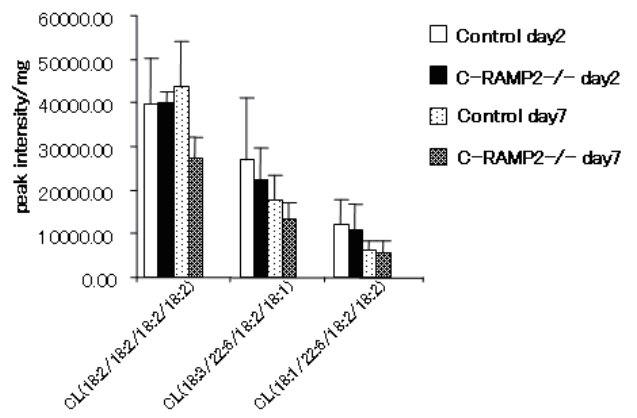


図6

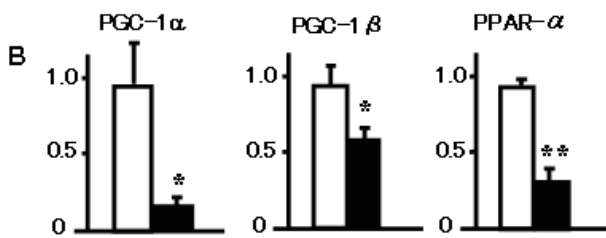
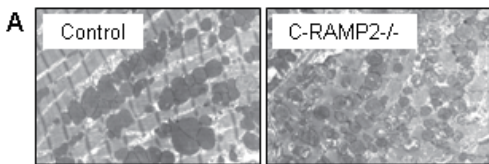


図5

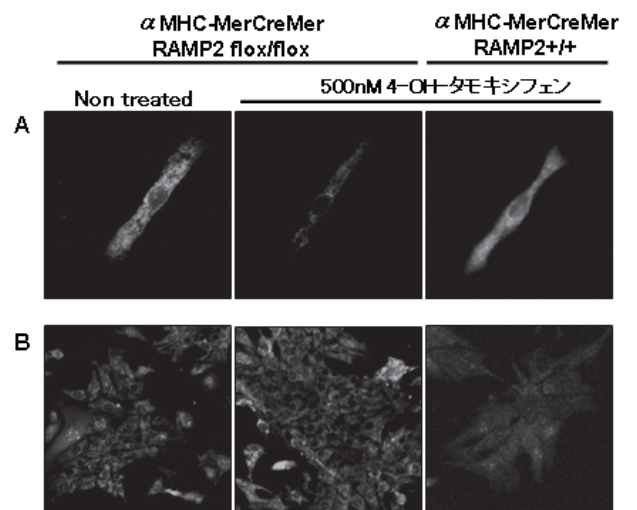


図7

考察

われわれは本研究で、心筋細胞特異的なRAMP 2の欠損誘導が、成体において心線維化や心拡大、拡張型心筋症様の心不全の自然発症を誘発することを明らかにした。また、電子顕微鏡写真や遺伝子発現、胎児初代培養心筋細胞を用いたミトコンドリア機能評価から、C-RAMP 2^{-/-}において心筋ミトコンドリアの構造異常や機能不全を明らかにした。さらに、心不全の発症においては、ミトコンドリアの異常がその他の障害性変化に先行していることが示唆された。このことから、C-RAMP 2^{-/-}の心臓障害の原因として、心筋ミトコンドリアの機能不全が重要であると考えられた。

AMの下流シグナルには、PI 3 K-Akt系やCAMKII, cAMP-PKA系など様々なシグナル経路が知られている^[14]。C-RAMP 2^{-/-}では、AM添加時のcAMP増加の抑制などが認められた(吉沢ら、未発表データ)。また、それらの経路で活性化される事が知られているCREBのリン酸化の低下が、C-RAMP 2^{-/-}で認められた(吉沢ら、未発表データ)。

これらのことから、AM-RAMP 2システムがCREBの活性化を介してミトコンドリア機能の制御・維持に重要な働きをし、心臓の機能制御や恒常性維持に重要な役割を担っていると考えられる。

本研究の臨床的意義について

従来から、血漿および組織のAM濃度は、心不全^[16]、肺高血圧^[17]、急性心筋梗塞^[18]などの病態で上昇することが報告されており、AMは心疾患に関連する重要な因子であることが示唆されている。また、うっ血性心不全の患者にAMを静注投与したところ、心係数の上昇を認めたと報告もある^[19]。これらのことから、AMの心疾患治療薬としての可能性が期待されている。しかし、AMはペプチドであるために、投与経路が限られる点や、血中半減期が短いなどの課題がある。

今回われわれはAMの受容体システムに着目した解析を行い、AM-RAMP 2システムが心臓の恒常性維持に重要であることを明らかにした。今後、AM受容体であるCLR-RAMP 2型受容体の構造解析やアゴニスト開発により、投与経路や血中半減期の問題が解決されることが期待される。

謝辞

今回、本稿を執筆する機会を与えて頂いた日本心臓血管

動物質学会に深謝致します。

引用文献

1. Takei, Y., et al., Identification of novel adrenomedullin in mammals: a potent cardiovascular and renal regulator. *FEBS Lett.* 2004. 556 (1-3): p. 53-8.
2. Kitamura, K., et al., Adrenomedullin: a novel hypotensive peptide isolated from human pheochromocytoma. *Biochem Biophys Res Commun.* 1993. 192 (2): p. 553-60.
3. Minamino, N., K. Kikumoto, and Y. Isumi, Regulation of adrenomedullin expression and release. *Microsc Res Tech.* 2002. 57 (1): p. 28-39.
4. Rademaker, M.T., et al., Beneficial hemodynamic and renal effects of adrenomedullin in an ovine model of heart failure. *Circulation.* 1997. 96 (6): p. 1983-90.
5. Tsuruda, T., et al., Adrenomedullin: a possible autocrine or paracrine inhibitor of hypertrophy of cardiomyocytes. *Hypertension.* 1998. 31 (1 Pt 2): p. 505-10.
6. Shindo, T., et al., Hypotension and resistance to lipopolysaccharide-induced shock in transgenic mice overexpressing adrenomedullin in their vasculature. *Circulation.* 2000. 101 (19): p. 2309-16.
7. Shindo, T., et al., Vascular abnormalities and elevated blood pressure in mice lacking adrenomedullin gene. *Circulation.* 2001. 104 (16): p. 1964-71.
8. Niu, P., et al., Protective effects of endogenous adrenomedullin on cardiac hypertrophy, fibrosis, and renal damage. *Circulation.* 2004. 109 (14): p. 1789-94.
9. Shimosawa, T., et al., Adrenomedullin, an endogenous peptide, counteracts cardiovascular damage. *Circulation.* 2002. 105 (1): p. 106-11.
10. Shimosawa, T., et al., Proadrenomedullin NH (2)-terminal 20 peptide, a new product of the adrenomedullin gene, inhibits norepinephrine overflow from nerve endings. *J Clin Invest.* 1995. 96 (3): p. 1672-6.
11. 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.
12. 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.
13. Sohal, D.S., et al., Temporally regulated and tissue-specific gene manipulations in the adult and embryonic heart using a tamoxifen-inducible Cre protein. *Circ Res.* 2001. 89 (1): p. 20-5.
14. Nishimatsu, H., et al., Adrenomedullin induces endothelium-dependent vasorelaxation via the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent pathway in rat aorta. *Circ Res.* 2001. 89 (1): p. 63-70.
15. Herzig, S., et al., CREB regulates hepatic gluconeogenesis through the coactivator PGC-1. *Nature.* 2001. 413 (6852): p. 179-83.

16. Nishikimi, T., et al., Increased plasma levels of adrenomedullin in patients with heart failure. *J Am Coll Cardiol*, 1995. 26 (6): p. 1424–31.
17. Kakishita, M., et al., Increased plasma levels of adrenomedullin in patients with pulmonary hypertension. *Clin Sci (Lond)*, 1999. 96 (1): p. 33–9.
18. Nagaya, N., et al., Cardiac adrenomedullin gene expression and peptide accumulation after acute myocardial infarction in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2000. 278 (4): p. R1019–26.
19. Nagaya, N., et al., Hemodynamic, renal, and hormonal effects of adrenomedullin infusion in patients with congestive heart failure. *Circulation*, 2000. 101 (5): p. 498–503.