

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-RAMP2システムは、
小胞体ストレス誘導性細胞死を抑制し、腎保護的に働く植竹 龍一, 桜井 敬之, 神吉 昭子, 新藤 優佳, 河手 久香, 吉沢 隆浩, 小山 晃英,
家里 康弘, 楊 磊, 鳥山 佑一, 山内 啓弘, 五十嵐 恭子, 田中 愛, 新藤 隆行
信州大学大学院医学系研究科 循環病態学講座

はじめに

アドレノメデュリン (adrenomedullin: AM) は、ヒト褐色細胞種から血管拡張因子として発見された生理活性ペプチドである¹。AMは、血管をはじめ心臓、腎臓、肺など全身に広く分布している。血中AM濃度は、高血圧、心不全、腎不全などの病態において、その重症度に応じて上昇することが報告されている。特に、腎疾患に関しては、血中AM濃度が、慢性腎臓病 (CKD) の長期予後を予測する最も感受性の高いパラメーターとなることが報告されており²、AMは腎臓において重要な病態生理学的意義を有することが示唆されている。遺伝子操作マウスを用いた検討では、AMホモノックアウトマウス (AM^{-/-}) は血管形成異常や浮腫により胎生致死となることから、AMが血管新生作用を有することも明らかとなった³。AMヘテロノックアウトマウス (AM^{+/-}) は成体が得られるが、心血管系にストレスを加えた際に、心肥大と線維化、腎障害、動脈硬化の亢進を認めた⁴⁻⁶。これに対し、AM過剰発現マウスは臓器障害や動脈硬化に抵抗性を示す⁷ことから、AMは、血管や臓器の保護作用を有することも示唆されている。

一方、AMの受容体システムには巧妙な制御系が存在している。AMは、カルシトニン、カルシトニン遺伝子関連ペプチド (CGRP)、インターメディン、アミリンなどと共に、スーパーファミリーを形成する。これらの一連の因子は、Gタンパク共役型受容体である、CLR (calcitonin receptor-like receptor) を受容体として共用している。CLRには、複数存在する1回膜貫通型タンパク、RAMP (receptor activity-modifying protein) サブアイソフォームのうちいずれか1つが結合し、受容体

機能を調整していると考えられている⁸。

AM^{-/-}が致死となる発生段階の血管においてRAMP各サブアイソフォームの発現を検討したところ、RAMP2の発現が亢進していたことから、我々は、RAMP2の機能に注目した。実際にRAMP2ノックアウトマウスを作成してみると、RAMP2^{-/-}はAM^{-/-}と類似の表現形により胎生致死となった⁹。この結果から、発生におけるAM-RAMP2システムの重要性が明らかとなった。一方で、AMとRAMP2は成体の各臓器 (肺、心臓、腎臓など) においても発現しているが、これらの病態生理学的意義については不明点が多い。

本研究では、RAMP2ヘテロノックアウトマウス (RAMP2^{+/-}) と野生型マウスを用いて腎障害モデルを作成し、腎臓におけるAM-RAMP2システムの病態生理学的意義を検討した。

実験方法

1) Streptozotocin (STZ) モデル

生後4週齢のマウスに250mg/kgのSTZを単回腹腔内投与した後、4週間後と12週間後に安楽死させて腎臓を採取した。

2) Tunicamycin (TUN) モデル

生後8週齢のマウスに0.5mg/kgのTUNを単回腹腔内投与した後、4日後に安楽死させて腎臓を採取した。

3) 細胞培養

培養ヒト近位尿細管上皮細胞 (RPTEC) に、STZ10mMあるいはSTZ10mM+AM10⁻⁷Mを投与して、TUNEL染色により細胞死を、ウェスタンブロット法により小胞体 (ER) ストレス関連因子の評価を行った。

* 信州大学大学院医学系研究科 循環病態学講座
(〒390-8621 長野県松本市旭3-1-1)

アドレノメデュリン-RAMP2システムは、小胞体ストレス誘導性細胞死を抑制し、腎保護的に働く

4) AM治療実験

TUNを投与する1週間前から、マウスに浸透圧ポンプ (Alzet Model 2002) を用いて0.05 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ の流速でAMの持続投与を開始した。1 mg/kgTUNを単回腹腔内投与し、4日後に安楽死させて腎臓を採取した。

結果

RAMP2 +/-マウスの腎臓におけるRAMP2の発現は、野生型マウスの約1/2に低下していた。STZ投与モデルにおいて、野生型とRAMP +/-の血糖値に有意差はなかった。STZ投与12週間後の時点において、糖尿病性腎症に特徴的な糸球体病変について検討を行ったが、両者のメサンギウム領域の面積などには有意な差は認められなかった。

予想外なことに、RAMP2 +/-の腎臓では、STZ投与4週間後の時点において、尿細管細胞の空胞変性が認められた (Figure 1 A)。電顕では、刷子縁の破綻を伴う近位尿細管の障害が確認された (Figure 1 B)。更にTUNEL染色により、尿細管細胞死の亢進が確認された。こうしたRAMP2 +/-での尿細管病変は、インスリン投与により血糖値を正常化しても認められた。従ってRAMP2 +/-における尿細管病変は、高血糖以外の原因が予想された。

我々は、STZによる尿細管細胞への直接の影響の可能性を考え、これを検証するため、次にヒト近位尿細管上皮細胞 (RPTEC) を用いて、STZを直接添加したときの影響を検討した。STZはグルコースとニトロソウレアからなる化合物であり、グルコーストランスポーターの一つであるGLUT2により細胞内に取り込まれる¹⁰。細胞内に取り込まれたSTZはDNAをアルキル化することにより細胞を障害する¹¹。膵 β 細胞はGLUT2を有するため、従来STZ投与モデルは、膵 β 細胞破壊によるI型糖尿病モデルとして利用されてきた。我々は、尿細管細胞もGLUT2を有する可能性を考えた。そこでRPTECにおいてRT-PCRを行ったところ、GLUT2の発現が確認された。実際に、RPTECにSTZを添加してTUNEL染色を行って見たところ、細胞死の増加が確認された。一方、STZと同時にAMを添加したところ、細胞死が抑制された。

次に、尿細管細胞死の原因を検討した。STZ投与後のRAMP2 +/-の尿細管細胞では、オートファゴソームのマーカーであるLC3免疫染色陽性粒子の増加を認め (Figure 2 A, B)、電顕においてもオートファゴソームの増加が確認された (Figure 2 C)。この所見から、RAMP2 +/-では、細胞内の異物蓄積により、オート

ファジーが亢進している可能性を考えた。そこで、細胞内の異物蓄積により誘導される、小胞体 (ER) ストレス応答 (unfolded protein response ; UPR) に着目し、解析を進めた。

RPTEC にSTZ投与を行なうと、ERストレスセンサータンパクの一つであるPERKの活性化 (Figure 3) や、その下流因子であり、細胞死を誘導する因子であるCHOPの発現亢進 (Figure 4) がウェスタンブロット法で確認された。一方、STZと同時にAMを添加した細胞では、PERKの活性化やCHOPの発現が抑制された。

そこで、AMによる尿細管細胞死の抑制効果が、ERストレス-UPR系に特異的な作用であるか確認するため、次に、ERストレスを直接惹起させる薬剤であるTunicamycin (TUN) を用いた検討を行った。TUNをマウスに投与したところ、RAMP2 +/-では野生型に比較して、BUNやクレアチニンの上昇を認めた。更にRAMP2 +/-では、病理所見で尿細管細胞の顕著な空胞変性 (Figure 5 A) と、腎臓のリアルタイムPCR解析でERストレスにより誘導される因子であるBiPやCHOPの発現上昇が確認された (Figure 5 B)。

最後に、AM-RAMP2システムを活性化することで、ERストレスにより引き起こされる腎障害を抑制できるか検討するため、野生型マウスに対して、浸透圧ポンプによるAMの持続投与と実験を行った。AMを投与した群では、TUN投与により引き起こされる尿細管の空胞化が抑制され (Figure 6 A)、TUNEL染色での細胞死の抑制が確認された (Figure 6 B)。リアルタイムPCRによる検討では、BiPやCHOPが抑制されることが確認された。

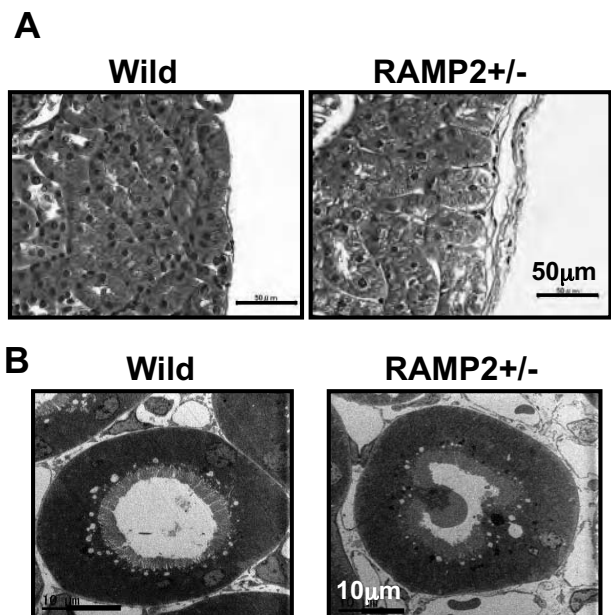


Figure 1

考察

我々はこれまでに、血管内皮細胞特異的RAMP2ノックアウトマウスや、心筋細胞特異的RAMP2ノックアウトマウスを用いた検討から、AM-RAMP2システムが、血管の恒常性維持や心筋細胞のエネルギー代謝に重要な

役割を持つことを報告してきた^{12,13}。本研究では、AM-RAMP2システムが、腎臓においてもその恒常性維持において重要な役割を持つことを明らかとした。

これまでに、AMは活性酸素種の産生抑制や炎症抑制作用により、臓器保護的に働くことが報告されている。本研究では、AM-RAMP2システムの新しい機能とし

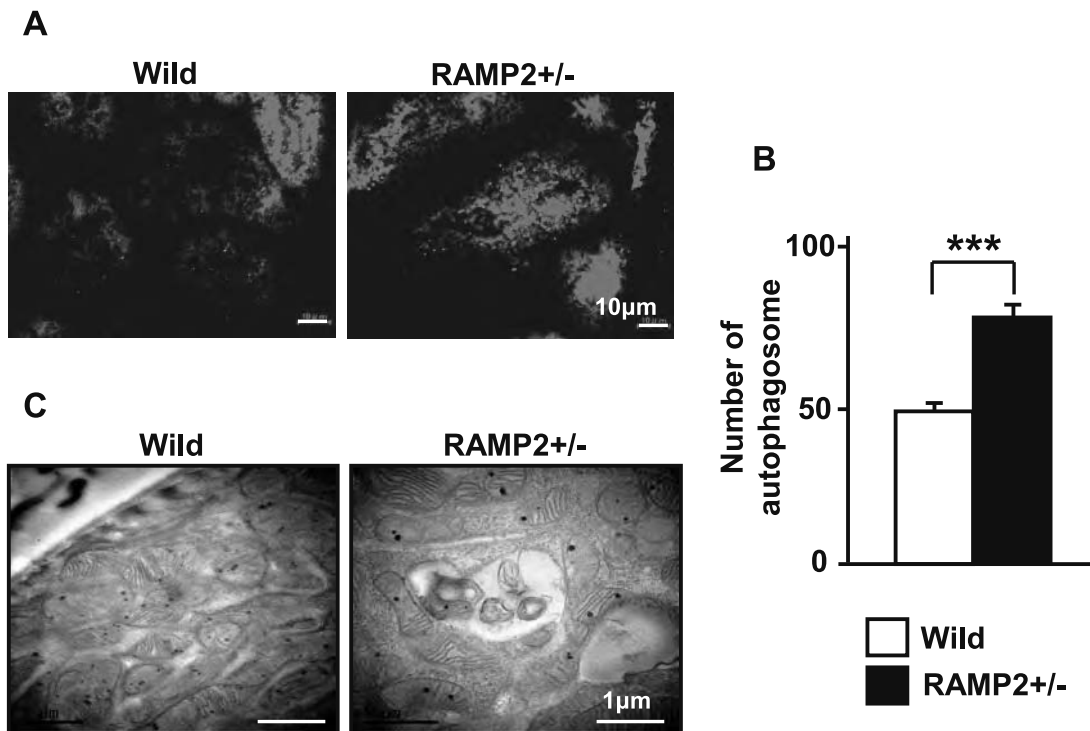


Figure 2

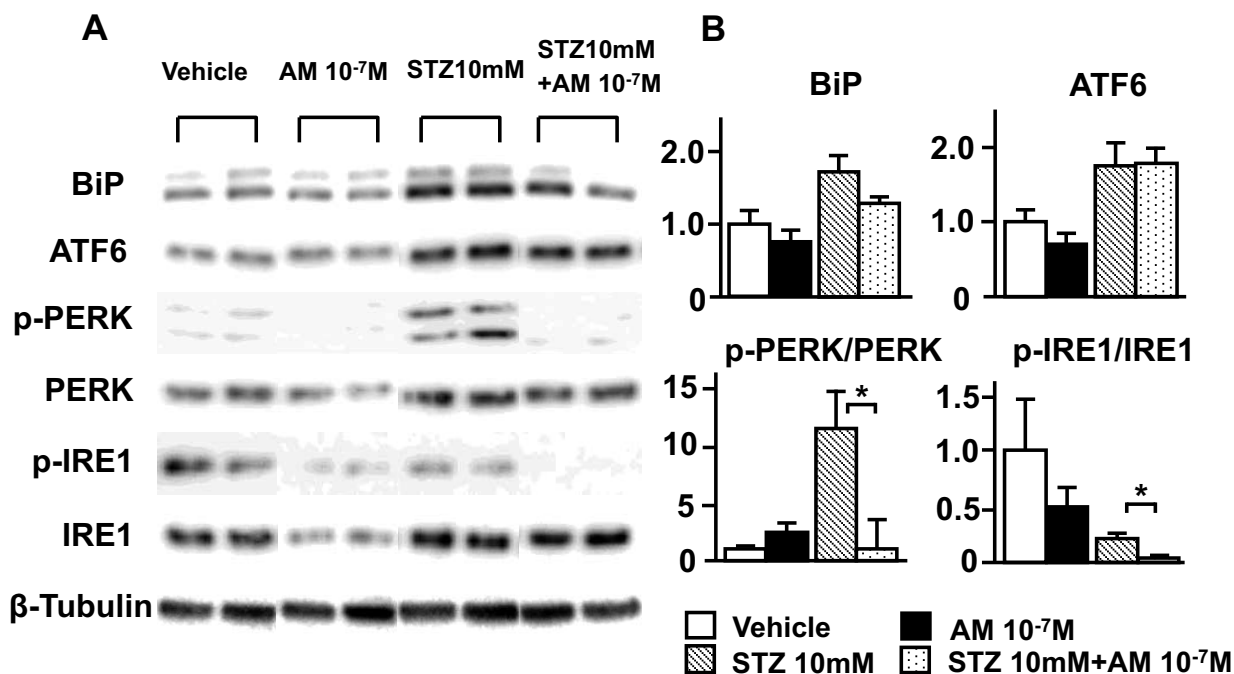


Figure 3

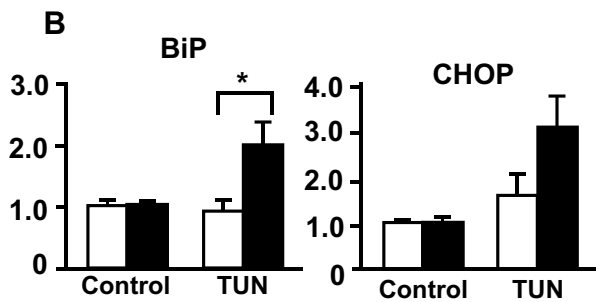
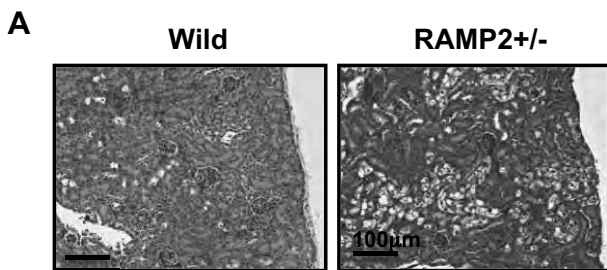
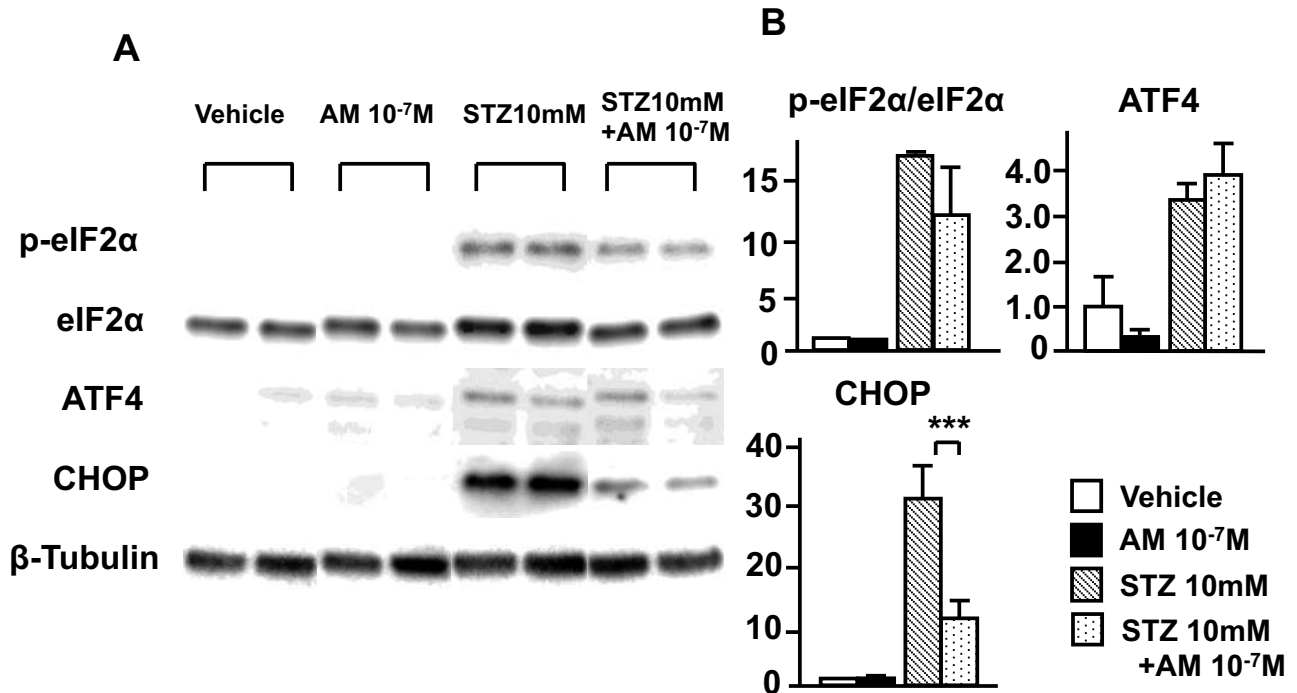
アドレノメデュリン-RAMP2システムは、小胞体ストレス誘導性細胞死を抑制し、腎保護的に働く

て、尿細管のERストレスを抑制することにより、腎保護的に働く作用を明らかとした。4-phenylbutyric acid (4-PBA) やTauroursodeoxycholic acid (TUDCA) などのケミカルシャペロンは、ERストレス-UPR系を制御することで、臓器保護作用を示す化合物であり、治療応用が期待されている。AM-RAMP2システムは、ERストレス-UPR系を抑制し臓器保護的に働く内因性シス

テムであり、新たな治療標的として注目される。

本研究の臨床応用への期待

近年、インドキシル硫酸などの尿毒素や慢性的なタンパク尿は、尿細管細胞においてERストレスを惹起し、細胞死を誘導することによりCKDの進展に寄与するこ



□ Wild ■ RAMP2^{+/-}

Figure 5

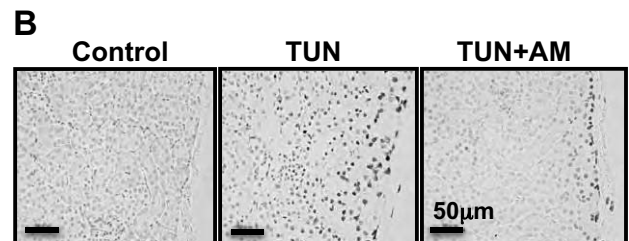
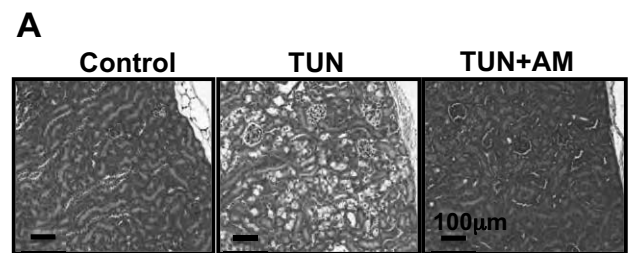


Figure 6

とが報告されている^{14,15}。従って、本研究で明らかとなったAM-RAMP2システムを介したERストレス-UPR系の制御系は、CKDの新たな治療標的となる可能性がある。しかし、AMのような生理活性ペプチドは血中半減期が短く、投与経路も限られるため、AMそのものを慢性疾患の治療に用いるには制約がある。今後、CLR-RAMP2型受容体の構造解析や、特異的アゴニストの開発により、血中半減期や投与経路の問題が解決されれば、CKDの新たな治療法開発に繋がることが期待される。

謝辞

本稿を執筆する機会を与えて頂いた心脈管作動物質学会に深謝致します。

引用文献

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: 553-560
2. Kronenberg F. Emerging risk factors and markers of chronic kidney disease progression. *Nat Rev Nephrol.* 2009; 5: 677-689
3. 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: 1964-1971
4. Shimosawa T, Shibagaki Y, Ishibashi K, Kitamura K, Kangawa K, Kato S, Ando K, Fujita T. Adrenomedullin, an endogenous peptide, counteracts cardiovascular damage. *Circulation.* 2002; 105: 106-111
5. 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: 657-663
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.* 2004; 109: 1789-1794
7. 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: 1310-1315
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: 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: 29-39
10. Schnedl WJ, Ferber S, Johnson JH, Newgard CB. Stz transport and cytotoxicity. Specific enhancement in glut 2-expressing cells. *Diabetes.* 1994; 43: 1326-1333
11. Szkudelski T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in b cells of the rat pancreas. *Physiological research/Academia Scientiarum Bohemoslovaca.* 2001; 50: 537-546
12. Koyama T, Ochoa-Callejero L, Sakurai T, Kamiyoshi A, Ichikawa-Shindo Y, Iinuma N, Arai T, Yoshizawa T, Iesato Y, Lei Y, Uetake R, Okimura A, Yamauchi A, Tanaka M, Igarashi K, Toriyama Y, Kawate H, Adams RH, Kawakami H, Mochizuki N, Martinez A, Shindo T. Vascular endothelial adrenomedullin-ramp2 system is essential for vascular integrity and organ homeostasis. *Circulation.* 2013; 127: 842-853
13. Yoshizawa T, Sakurai T, Kamiyoshi A, Ichikawa-Shindo Y, Kawate H, Iesato Y, Koyama T, Uetake R, Yang L, Yamauchi A, Tanaka M, Toriyama Y, Igarashi K, Nakada T, Kashiwara T, Yamada M, Kawakami H, Nakanishi H, Taguchi R, Nakanishi T, Akazawa H, Shindo T. Novel regulation of cardiac metabolism and homeostasis by the adrenomedullin-receptor activity-modifying protein 2 system. *Hypertension.* 2013; 61: 341-351
14. Kawakami T, Inagi R, Wada T, Tanaka T, Fujita T, Nangaku M. Indoxyl sulfate inhibits proliferation of human proximal tubular cells via endoplasmic reticulum stress. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2010; 299: F568-576
15. Ohse T, Inagi R, Tanaka T, Ota T, Miyata T, Kojima I, Ingelfinger JR, Ogawa S, Fujita T, Nangaku M. Albumin induces endoplasmic reticulum stress and apoptosis in renal proximal tubular cells. *Kidney Int.* 2006; 70: 1447-1455