

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システムによる、
白色脂肪、褐色脂肪の脂質、エネルギー代謝制御神吉 昭子, 桜井 敬之, 河手 久香, 新藤 優佳, 植竹 龍一, 山内 啓弘, 五十嵐 恭子,
鳥山 佑一, 田中 愛, 劉 甜, 羨 鮮, 今井 章, 翟 留玉, 大和 慎治, 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、ヒト褐色細胞腫から分離された血管拡張性ペプチドである¹⁾。AMは血管、心臓、腎臓など様々な臓器で産生・分泌され、血管拡張作用に加えて、抗酸化作用、抗炎症作用、臓器保護作用など多彩な生理活性を有する内因性ペプチドである。また、ヒトの血中AM濃度は肥満に伴い上昇し、BMI (body mass index) に相関することも報告されており²⁾、AMはメタボリックシンドロームの病態発症に重要な役割を持つと考えられる。

AM受容体はGタンパク共役型受容体であるCLR (calcitonin receptor-like receptor) という7回膜貫通型受容体と、受容体活性調節タンパクであるRAMP (receptor activity-modifying protein) という1回膜貫通型タンパクが結合し、受容体として機能する³⁾。RAMPには1, 2, 3の3種類のサブアイソフォームがあり、CLRがRAMP2またはRAMP3と結合することによりAM受容体として機能する。

脂肪細胞では、白色脂肪組織においてAMとその受容体が発現し、AMの脂肪細胞の機能制御への関与も報告されていることから^{4), 5)}、脂肪細胞におけるAMの作用が生体の恒常性維持に重要であると考えられる。

我々はこれまでに、AMとAMの受容体活性調節タンパクであるRAMP2のノックアウトマウスを樹立し、AMホモノックアウトマウス (AM^{-/-}) とRAMP2ホモノックアウトマウス (RAMP2^{-/-}) は血管形成異常や浮腫が認められ、共に胎生致死となることを明らかにした。このことから、AMの血管における機能がRAMP2によって規定され、AM-RAMP2システムの心血管系に

おける病態生理学的な重要性を明らかにし^{6)~9)}、さらにAMの肝臓や腎臓での臓器保護作用も報告している^{10), 11)}。一方、AMとRAMP2は脂肪細胞でも高発現が認められるが、脂肪細胞におけるAM-RAMP2システムの役割や、メタボリックシンドローム発症における病態生理学的意義は不明な点が多い。

我々はこれまでに、RAMP2ヘテロノックアウトマウス (RAMP2^{+/-}) に高脂肪食負荷を行うと、野生型マウスと比較して、体重増加と脂肪肝の増悪、インスリン抵抗性亢進を示すことから、AMが代謝制御にも関与していることを報告してきた。

本研究では、脂肪細胞でのAM-RAMP2システムに着目し、脂肪細胞特異的なRAMP2遺伝子ノックアウトマウスを樹立し、白色脂肪組織と褐色脂肪組織におけるAM-RAMP2システムによる脂質代謝およびエネルギー代謝調節機構を検討した。

方法

脂肪細胞特異的にCreリコンビナーゼを発現するaP2CreトランスジェニックマウスとRAMP2floxedマウスを交配し、脂肪細胞特異的RAMP2ノックアウトマウス (A-RAMP2^{-/-}) を作成した。

普通食投与下において、オキシマックス等流量システムにより呼吸代謝測定を行った。また、白色脂肪組織(精巢上体脂肪組織、皮下脂肪組織)の病理解析(HE染色、マッソントリクローム染色、F4/80染色)を行った。さらに、リアルタイムPCRにより白色脂肪組織(精巢上体脂肪組織)と褐色脂肪組織(肩甲骨間脂肪組織)の遺伝子発現解析(炎症性サイトカイン、マクロファージマーカー、脂肪酸代謝関連遺伝子、ミトコンドリア関連遺伝子)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)

結果

A-RAMP2^{-/-}マウスは、普通食投与下において、5週齢の若年期より野生型マウス(WT)と比較して体重が有意に増加し(図1A)、各白色脂肪組織重量の増加も認められた(図1B)。A-RAMP2^{-/-}は、白色脂肪組織においてRAMP2遺伝子が野生型マウスの約30%に低下していることが確認された。一方、AM遺伝子発現量は代償的に約3倍に上昇していた(図1C)。エネルギー消費を調べるため、呼吸代謝測定を行った結果、普通食投与下において、A-RAMP2^{-/-}は野生型マウスと比較して、明期、暗期ともに酸素消費量の低下と呼吸商の上昇が見られた(図2)。呼吸商が上昇していることから、脂肪を消費しにくく、肥満になりやすいと考えられた。次に、白色脂肪組織の病理解析を行った。精巣上体脂肪組織では、A-RAMP2^{-/-}は野生型マウスと比較して、白色脂肪細胞が肥大化し(図3A)、F4/80陽性のマクロファージ浸潤も増加していた(図3B)。さらに加齢マウスでは、白色脂肪組織間質の著明な線維化の亢進が認められた(図3C)。リアルタイムPCRによる遺伝子発現解析により、炎症性サイトカイン(TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、MCP-1)の上昇と、マクロファージマーカー

(F4/80、CCR2、CD68)の上昇、脂肪酸 β 酸化系遺伝子であるACSL1(acyl-CoA synthetase long-chain family member 1)、MCAD(medium-chain acyl-CoA dehydrogenase)、EHHADH(enoyl-CoA hydratase/3-hydroxyacyl CoA dehydrogenase)の低下が認められた(図4)。また、皮下脂肪組織においても、若年期より皮下脂肪層の肥厚と(図5A)、線維化の亢進が認められた(図5B)。

次に、褐色脂肪組織の解析を行った。褐色脂肪組織においては、白色脂肪組織と同様にA-RAMP2^{-/-}ではRAMP2遺伝子が野生型マウスの約20%に低下していることが確認されたが、AM遺伝子発現量に変化は見られなかった。褐色脂肪組織のリアルタイムPCRによる遺伝子発現解析により、普通食投与下において、A-RAMP2^{-/-}は野生型マウスと比較して、脂肪酸 β 酸化系遺伝子であるACSL1とミトコンドリア関連遺伝子であるATP synthase、COX IV、UCP1などの発現低下が見られた(図6)。

以上の結果より、白色脂肪細胞、褐色脂肪細胞ともに、AM-RAMP2システムは脂肪細胞の分化およびエネルギー代謝制御に関与することが示唆された。

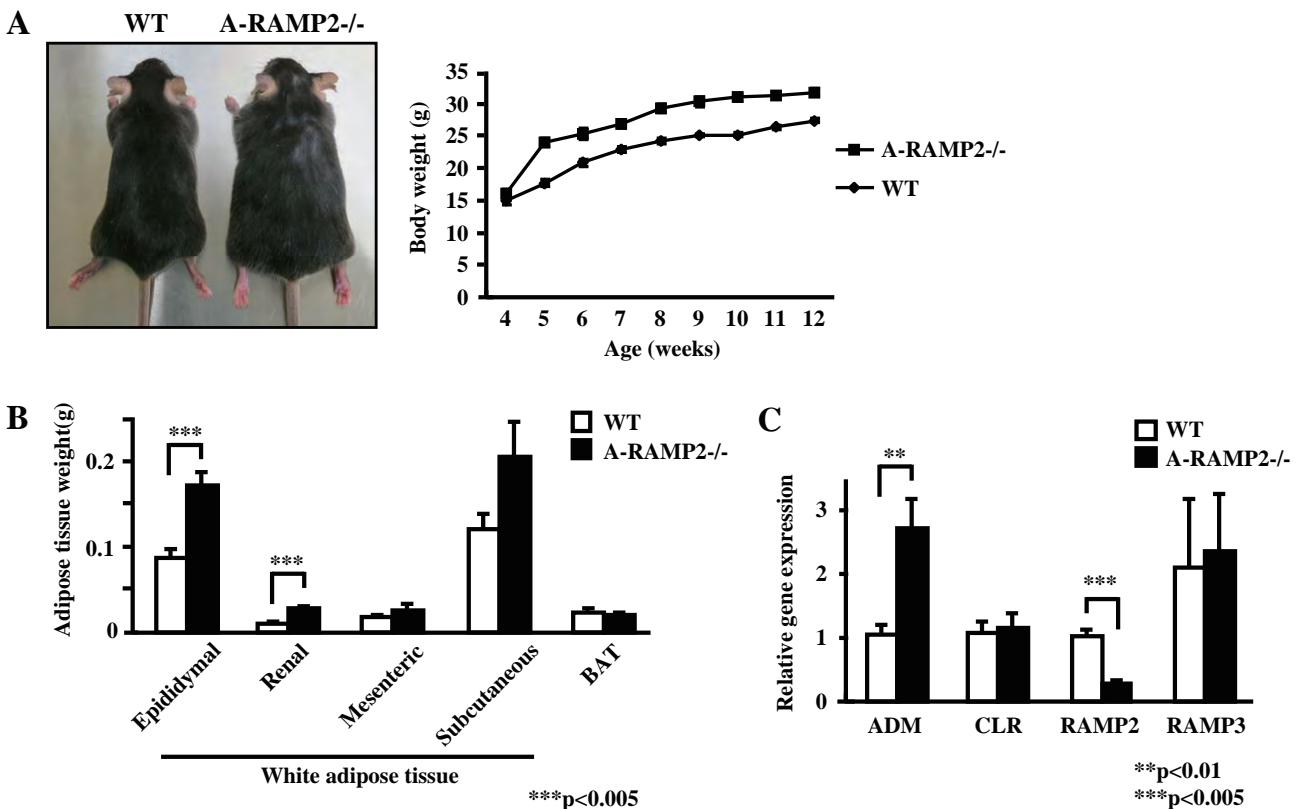


図1

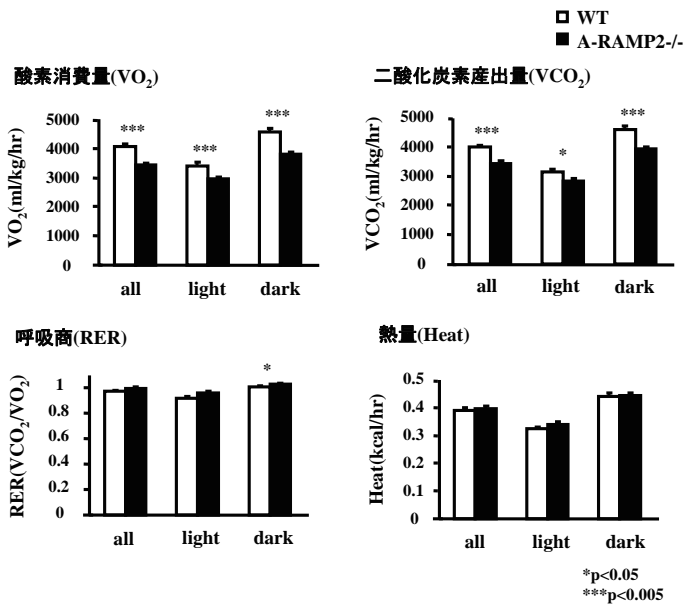


图 2

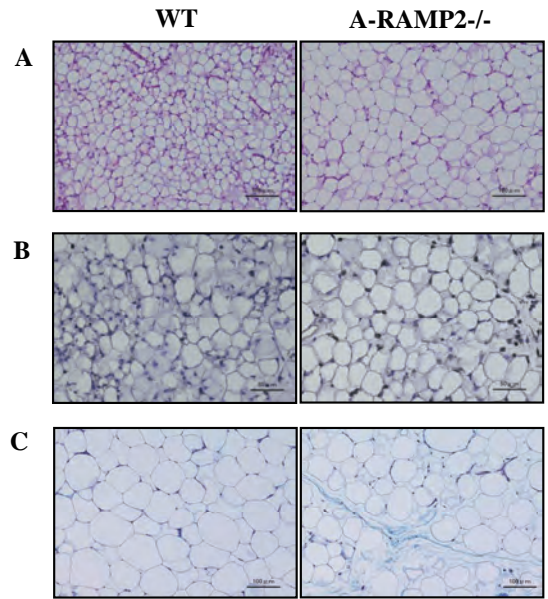


图 3

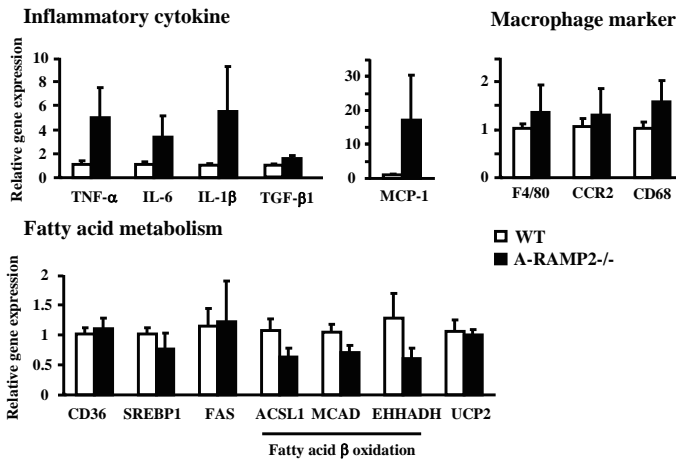


图 4

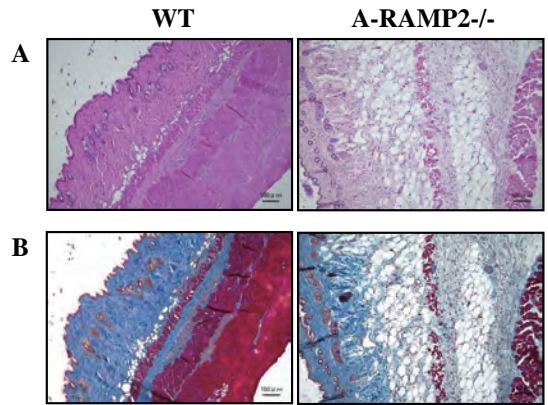


图 5

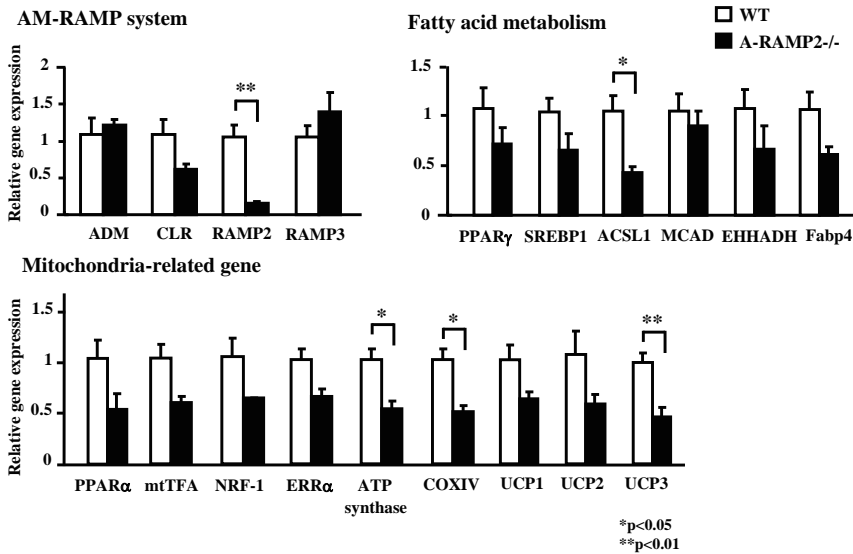


图 6

考 察

脂肪組織はアドレノメデュリンなどのアディポカインを産生する臓器であり、生体の恒常性維持に重要な役割を担う。脂肪細胞には、エネルギーを蓄積する白色脂肪細胞、熱産生を行う褐色脂肪細胞、白色脂肪組織中に存在し熱産生を行うベージュ脂肪細胞が存在し、それぞれが異なる機能を有する。

マウスの鼠径部皮下脂肪組織は、若年期には褐色脂肪様の脂肪細胞（ベージュ脂肪細胞）が多く見られるが、加齢とともに、白色脂肪細胞の割合が増加することが報告されている¹²⁾。A-RAMP2^{-/-}マウスの鼠径部皮下脂肪組織においては、野生型マウスと比較して若年期に白色脂肪細胞の割合が多いことから、白色脂肪細胞の分化制御にAM-RAMP2システムが関与していることが示唆された。また、褐色脂肪組織の遺伝子発現解析により、ミトコンドリア関連遺伝子、脂肪酸代謝関連遺伝子の発現低下が認められ、褐色脂肪細胞におけるミトコンドリア機能の維持にAM-RAMP2システムが関与していることが考えられる。我々は、心臓におけるミトコンドリア機能の恒常性維持にAM-RAMP2システムが重要であることをこれまでに報告しており¹³⁾、脂肪細胞においてもミトコンドリア機能制御についてより詳細に検討することにより、代謝制御機構への関与を明らかに出来ると考える。

本研究により、AM-RAMP2システムが、白色脂肪細胞、褐色脂肪細胞の脂質、エネルギー代謝制御に重要な役割を持ち、脂肪蓄積とエネルギー消費のバランスを維持していることを明らかにした。

本研究の臨床的意義

これまでに、冠動脈疾患（CAD）患者で心外膜脂肪組織のAMの発現が低下していることが報告されており、脂肪組織で分泌されるAMがこれらの疾患の重要な因子であることが示唆されている¹⁴⁾。また、血管周囲脂肪組織が血管障害へ影響することも報告されており、脂肪細胞は体内のあらゆる部位に存在し、各部位によって働きが異なると考えられ、脂肪組織におけるAMの機能を解明することは、様々な病態の解明につながると考える。また、AMはペプチドであり血中半減期が短いため、AMの受容体に注目し、その受容体活性調節タンパクであるRAMP2の治療への応用が考えられる。RAMP2は1回膜貫通型膜タンパクで、比較的単純な構造のため治療へ応用できる可能性が高いと考える。本研究の成果により、メタボリックシンドローム病態の治療及び予防に

展開す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日本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 (2): 553-60
2. Nomura I, Kato J, Tokashiki M, Kitamura K. Increased plasma levels of the mature and intermediate forms of adrenomedullin in obesity. *Regul Pept.* 2009; 158: 127-31
3. 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): 333-9
4. Nambu T, Arai H, Komatsu Y, Yasoda A, Moriyama K, Kanamoto N, Itoh H, Nakao K. Expression of the adrenomedullin gene in adipose tissue. *Regul Pept.* 2005; 132: 17-22
5. Iemura-Inaba C, Nishikimi T, Akimoto K, Yoshihara F, Minamino N, Matsuoka H. Role of adrenomedullin system in lipid metabolism and its signaling mechanism in cultured adipocytes. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2008; 295 (5): R1376-84
6. 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): 1964-71
7. 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): 1789-94
8. 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

9. 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, Martínez A, Shindo T. Vascular endothelial adrenomedullin-RAMP2 system is essential for vascular integrity and organ homeostasis. *Circulation.* 2013;127 (7) : 842 – 53
10. 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 – 16
11. Uetake R, Sakurai T, Kamiyoshi A, Ichikawa-Shindo Y, Kawate H, Iesato Y, Yoshizawa T, Koyama T, Yang L, Toriyama Y, Yamauchi A, Igarashi K, Tanaka M, Kuwabara T, Mori K, Yanagita M, Mukoyama M, Shindo T. Adrenomedullin-RAMP2 system suppresses ER stress-induced tubule cell death and is involved in kidney protection. *PLoS One.* 2014; 9 (2) : e87667
12. Rogers NH, Landa A, Park S, Smith RG. Aging leads to a programmed loss of brown adipocytes in murine subcutaneous white adipose tissue. *Aging Cell.* 2012 ; 11 (6) : 1074 – 83
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, Kashihara 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 (2) : 341 – 51
14. Iacobellis G, di Gioia CR, Di Vito M, Petramala L, Cotesta D, De Santis V, Vitale D, Tritapepe L, Letizia C. Epicardial adipose tissue and intracoronary adrenomedullin levels in coronary artery disease. *Horm Metab Res.* 2009 ; 41 (12) : 855 – 60