

第45回 研究奨励賞受賞論文

1

アドレノメデュリンは、複数の受容体システム“AM1R, AM2R”を介し、血管・リンパ管の分化と脈管系恒常性を制御する

○山内 啓弘¹⁾²⁾, 桜井 敬之¹⁾, 神吉 昭子¹⁾, 新藤 優佳¹⁾, 河手 久香¹⁾, 田中 愛¹⁾, 劉 甜¹⁾, 羨 鮮¹⁾, 今井 章¹⁾, 翟 留玉¹⁾, 平林 一貴¹⁾, 大和 慎治¹⁾, 載 昆¹⁾, 崔 南奇¹⁾, 劉 騰¹⁾, 五十嵐恭子¹⁾, 新藤 隆行¹⁾
¹⁾信州大学大学院医学系研究科 循環病態学講座, ²⁾日本生物製剤

緒言

アドレノメデュリン (AM) は、ヒト褐色細胞腫組織抽出液から同定されたペプチド性生理活性分子である。AMは52個のアミノ酸を有し、分子内のシステイン残基間のジスルフィド結合による6アミノ酸のリング構造と、C末端のアミド化構造が特徴的であり、これらの構造がAMの活性に重要とされている^[1]。(図1)

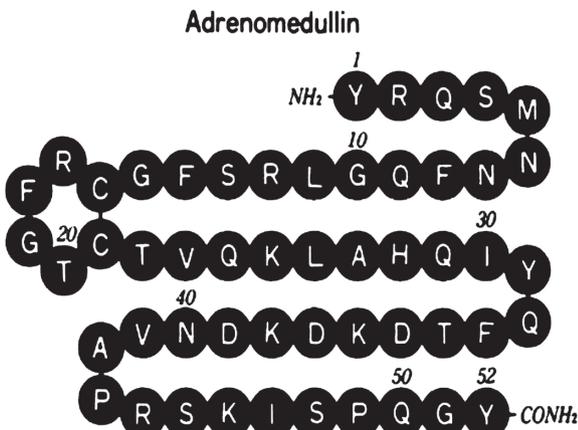


図1 アドレノメデュリンの分子構造

AMの分子構造は、強力な血管拡張作用を有するペプチドとして既に同定されていた、カルシトニン遺伝子関連遺伝子 (Calcitonin gene-related peptide : CGRP) と類似していたことから、発見当初、AMは血管拡張作用

による循環調節因子と考えられた。しかしその後の研究によって、AMは心臓、肺、腎臓など、生体内に広範囲に分布しており、血管においては内皮細胞のアポトーシスの抑制、抗動脈硬化作用、血管新生作用、心臓においては冠血流量増加、心肥大や線維化の抑制、肺においては気管支拡張作用、腎臓においては腎血流量の増加や利尿作用など、様々な生理活性を有することが明らかとなってきた^[2-4]。

AMの受容体について

AMとCGRPは、分子進化的にカルシトニンやアミリンなどのペプチドホルモンと近縁関係にあり、これらはカルシトニンスーパーファミリーと呼ばれる。カルシトニンスーパーファミリーは、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部分的に共用している^[5]。AMとCGRPに対するCLRの親和性は、RAMP (Receptor activity-modifying protein) と呼ばれる1回膜貫通型の受容体調節タンパクにより制御されていると考えられている。CLRにはRAMPサブアイソフォームのいずれかが1対1で結合する。CLRとRAMP1の複合体はCGRPに親和性の高い受容体として機能する一方で、AMに親和性の高い受容体として機能するAM1受容体 (AM1R) (CLRとRAMP2の複合体) およびAM2受容体 (AM2R) (CLRとRAMP3の複合体) が確認されている (図2)。

各RAMPは長い細胞外ドメインを有するのが特徴で、受容体とリガンドとの結合に関与していると考えられている。RAMPサブアイソフォーム間のアミノ酸相同性は約30%程度と低い。いずれのRAMPも生体内に広く分布している事が確認されている^[6]。

* 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)
 ** 株式会社 日本生物製剤 (〒151-0063 東京都渋谷区富ヶ谷1-44-4)

アドレノメデュリンは、複数の受容体システム“AM1R, AM2R”を介し、血管・リンパ管の分化と脈管系恒常性を制御する

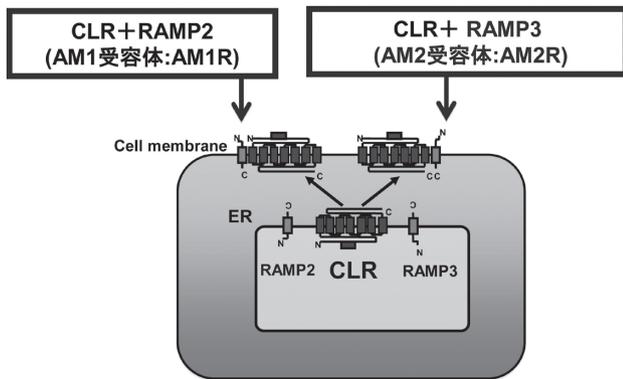


図2 アドレノメデュリン受容体システム

AMおよびAM1Rノックアウトマウスの表現型

AMノックアウトマウスのホモ接合体 (AM^{-/-}) は、胎生期に血管の発達不全により、全身の出血や浮腫を生じて、胎生14日に致死となる^[7] (図3)。AMヘテロ接合体 (AM^{+/-}) は成体が得られるが、血圧上昇を認め、さらに、心血管系へのストレス負荷により、動脈硬化や心肥大・線維化、腎障害などが増悪する^[8]。これらの所見から、我々は、AMが発生段階、成体における恒常性維持の双方において重要な働きを有することを報告してきた。一方、受容体側に関しては、AM1R^{-/-}のみが、AM^{-/-}と同様の表現型を示し、ホモ接合体は血管の発達不全により胎生致死となった^[9] (図3)。

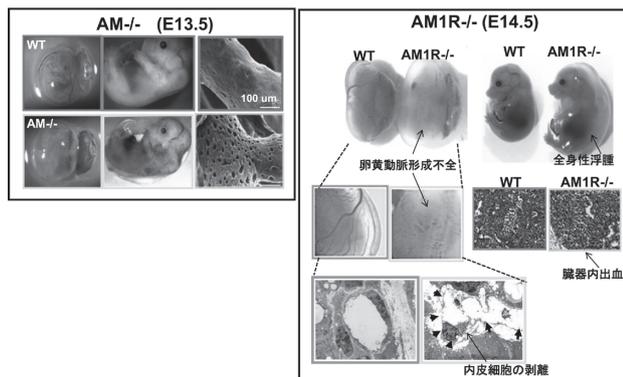


図3 AMとAM1R^{-/-}マウスの表現型

さらに最近我々は、誘導型血管内皮細胞特異的AM1R欠損マウス (Drug-inducible vascular endothelial cell-specific AM1R knockout mouse: DI-VE-AM1R^{-/-}) を作成し、成体になってからRAMP2遺伝子欠損を誘導することで、成体での解析を可能とした。DI-VE-AM1R^{-/-}では、内皮細胞を中心とした血管構造の異常が誘導され、全身性の浮腫を生じ、時間経過と共に、血管の炎症、肝線維化、水腎症などを自然発症した^[10]。

これらの結果から、AM1Rが発生および成体における血管新生や血管の恒常性維持に重要であることが明らかとなった。

一方で、AM2Rについては、これまでその病態生理学的意義はほとんど解明されていない。本研究では我々はAMに高親和性の受容体として働くAM1R, AM2Rについて、胎生期から全身で遺伝子欠損させたマウス、あるいは成体において各組織特異的に欠損を誘導できるマウスを樹立し、各種AM受容体の機能分化と生理学的意義を解析した。

AM2Rノックアウトマウスの表現型

AM1R^{-/-}が胎生致死となるのに対して、AM2R^{+/-}同士を交配した際の出生仔の遺伝子型の比率は、メンデルの法則に従っており、ホモ接合体も通常通り産出されることが確認された。この結果より、AM1Rと異なり、AM2Rは個体の発生段階には必須でないことが明らかとなった。

次に、成体における血管新生の評価を行うために、片側下肢虚血モデルの検討を行ったが、AM2R^{-/-}における血管新生や血流回復は、野生型マウスに比較して有意な変化は見られなかった。また、各種血管新生関連遺伝子の発現にも変化は認められなかった。

AM2R^{-/-}におけるリンパ管機能の評価

次にAM2R^{-/-}におけるリンパ管新生を評価するために、マウス尾部の表皮を剥離し、術後リンパ浮腫を誘発する尾部浮腫モデルの検討を行った。

AM2R^{-/-}、野生型マウス共に、術後12日をピークに、浮腫による尾部径の肥厚が認められたが、AM2R^{-/-}では野生型に比較して、有意に浮腫の増悪が認められた (図4)。さらに治療実験として同モデルにおいてAMの持

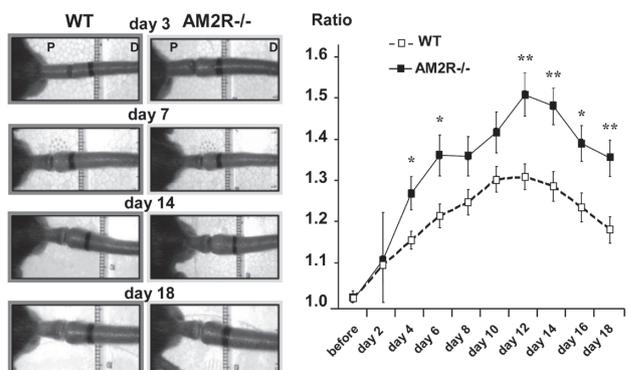


図4 AM2R^{-/-}における尾部リンパ浮腫の評価

続投与を行うと、野生型マウスでは浮腫が軽減するのに
対して、AM2R^{-/-}では効果が認められなかった。

AM2R^{-/-}に対してAM1R^{+/-}、DI-VE-AM1R^{-/-}、DI-
LE-AM1R^{-/-} (Drug-inducible lymphatic endothelial
cell-specific AM1R knockout mouse) は尾部リンパ浮
腫モデルにおいて野生型との差は認められなかった。

AM2R^{-/-}の病理解析を行ったところ、LYVE-1陽性リ
ンパ管の本数に異常は認められなかったのに対し、リン
パ管の異常拡張が特徴的に認められ (図5)、白血球及
び肥満細胞の有意な増加が認められた。

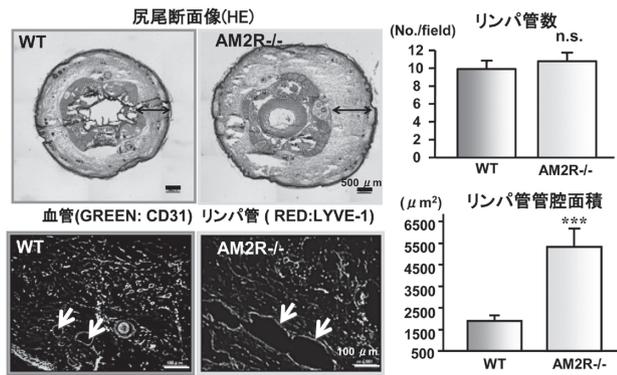


図5 AM2R^{-/-}マウスにおけるリンパ管病理所見

ドレナージ評価を行うためにマウスの耳介部、尾部に
インドシアニングリーン (ICG) を皮下に注射したとこ
ろ、AM2R^{-/-}では野生型マウスに比較して、リンパ管
ドレナージの不良が認められた (図6)。

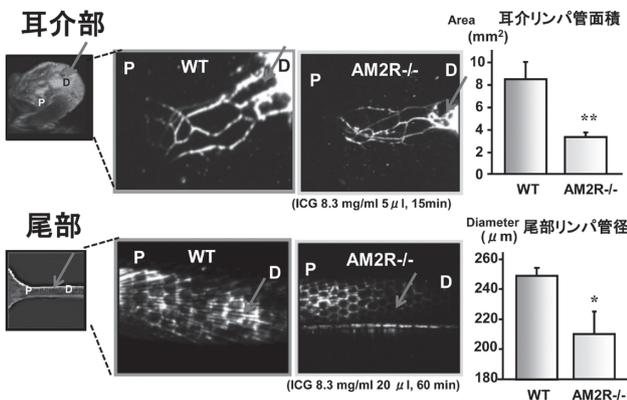


図6 AM2R^{-/-}における耳介部、尾部のリンパ管ドレ
ナージ機能評価

さらに小腸リンパ管におけるドレナージ機能を評価す
るため、高脂肪食負荷後の腸管リンパ管、乳び管を観察
したところ、AM2R^{-/-}では野生型に比較して、脂質の
吸収遅延が認められ、腸管の病理所見では乳び管の拡張

不全が認められた (図7)。

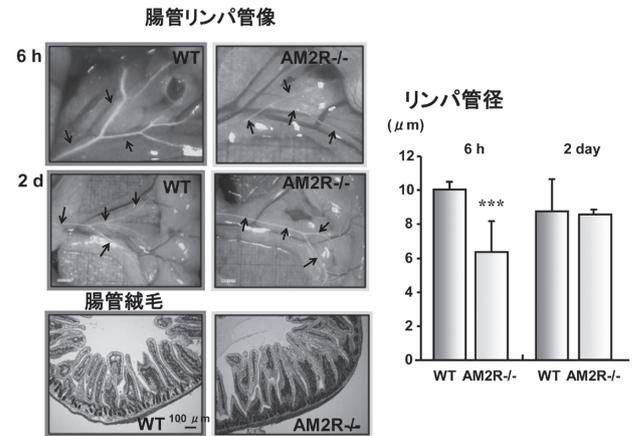


図7 AM2R^{-/-}における小腸脂質ドレナージ機能評価

また、腸間膜に於いては、リンパ液流速と蠕動数が著
明に低下していることが確認され、AMの反応性実験を
行ったところ、野生型ではAMを添加すると血管、リン
パ管の拡張が認められるのに対し、AM2R^{-/-}では、血
管の拡張反応は認められたが、リンパ管の拡張反応は認
められなかった (図8)。

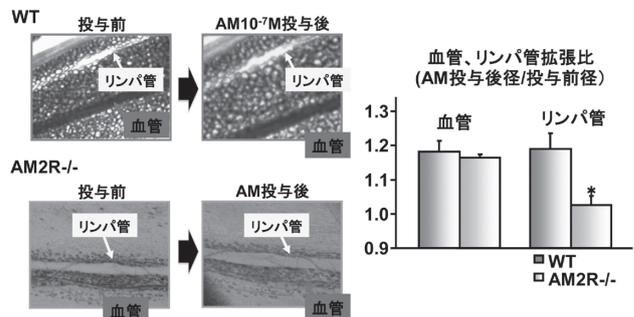


図8 AM2R^{-/-}腸管におけるAM反応性評価

AM2R^{-/-}リンパ管内皮細胞機能評価

尾部浮腫モデルにおいて、新生リンパ管のリンパ管内
皮細胞を電子顕微鏡にて観察したところ、AM2R^{-/-}では、
リンパ管内皮細胞の形態異常や、ミトコンドリアの空胞
変性、繫留フィラメントの形成不全などが特徴的に観察
された (図9)。

アドレノメデュリンは、複数の受容体システム“AM1R, AM2R”を介し、血管・リンパ管の分化と脈管系恒常性を制御する

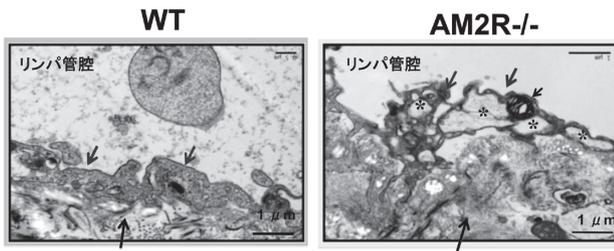


図9 尾部リンパ浮腫モデルにおけるAM2R-/-新生リンパ管内皮細胞電子顕微鏡像

AM2R-/-におけるリンパ管内皮細胞の機能異常の可能性を考え、胎仔リンパ管内皮細胞を初代培養し、Scratch-Wound assayによって細胞遊走能の評価を行った。その結果、AM2R-/-のリンパ管内皮細胞では、野生型マウスに比べて、遊走能の低下が認められた(図10上段)。さらに、AM添加を行ったところ、野生型由来のリンパ管内皮細胞では遊走能が亢進するのに対し、AM2R-/-では遊走能の変化は認められなかった(図10下段)。

さらにWestern blotによる解析では、AM添加により、培養リンパ管内皮細胞では細胞生存シグナルであるAktの活性化が見られたが、AM2R-/-では、野生型に比較してAkt活性化が抑制されていることが確認された。

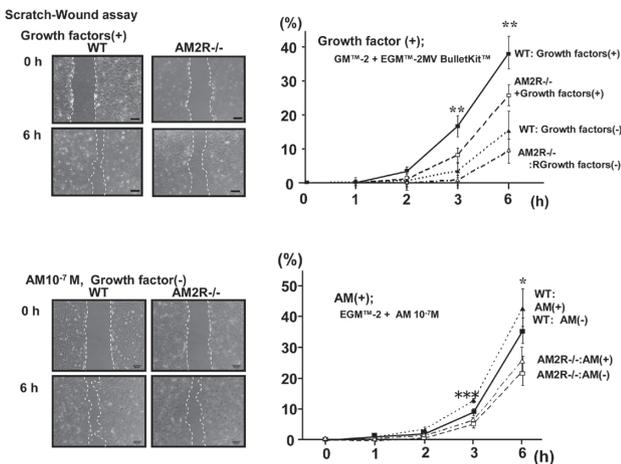


図10 AM2R-/-リンパ管内皮細胞の遊走性評価

AM2R-/-の成体におけるリンパ管発生異常

角膜の展開標本を用いて、リンパ管染色を行ってみたところ、AM2R-/-は、角膜内リンパ管の著明な発達不良が確認された(図11)。この様に、AM2R-/-では、胎児のリンパ管発生異常が認められないものの、成体においては、サブクリニカルなレベルのリンパ管の発生異常

が存在することが明らかとなった。

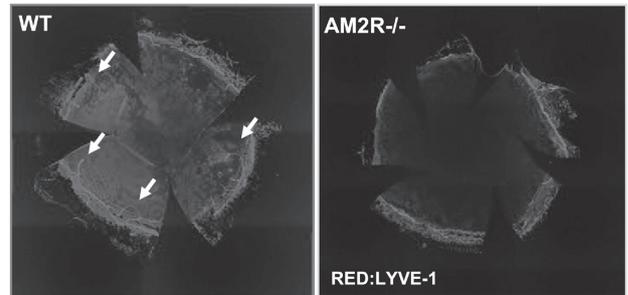


図11 AM2R-/-角膜展開標本におけるリンパ管病理染色像

以上の結果よりAM1R系が発生における血管新生と成体における血管恒常性を制御していることに対し、AM2R系が一部のリンパ管新生と成体におけるリンパ管機能制御を司っており、この二つの系の機能制御により脈管系全体の恒常性を制御していることが初めて明らかとなった(図12)。

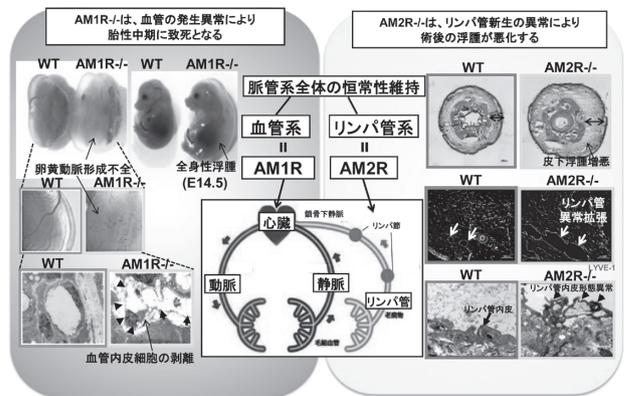


図12 脈管系におけるAM1R, AM2Rの機能分化

参考文献

1. Kitamura K, Kangawa K, Kawamoto M, Ichiki Y, Nakamura S, et al. (1993) Adrenomedullin: a novel hypotensive peptide isolated from human pheochromocytoma. *Biochem Biophys Res Commun* 192: 553-560.
2. Kano H, Kohno M, Yasunari K, Yokokawa K, Horio T, et al. (1996) Adrenomedullin as a novel antiproliferative factor of vascular smooth muscle cells. *J Hypertens* 14: 209-213.
3. Miyashita K, Itoh H, Sawada N, Fukunaga Y, Sone M, et al. (2003) Adrenomedullin promotes proliferation and migration of cultured endothelial

- cells. *Hypertens Res* 26 Suppl: S93-98.
4. Iwasaki H, Eguchi S, Shichiri M, Marumo F, Hirata Y (1998) Adrenomedullin as a novel growth-promoting factor for cultured vascular smooth muscle cells: role of tyrosine kinase-mediated mitogen-activated protein kinase activation. *Endocrinology* 139: 3432-3441.
 5. McLatchie LM, Fraser NJ, Main MJ, Wise A, Brown J, et al. (1998) RAMPs regulate the transport and ligand specificity of the calcitonin-receptor-like receptor. *Nature* 393: 333-339.
 6. Kuwasako K, Cao YN, Nagoshi Y, Kitamura K, Eto T (2004) Adrenomedullin receptors: pharmacological features and possible pathophysiological roles. *Peptides* 25: 2003-2012.
 7. Shindo T, Kurihara Y, Nishimatsu H, Moriyama N, Kakoki M, et al. (2001) Vascular abnormalities and elevated blood pressure in mice lacking adrenomedullin gene. *Circulation* 104: 1964-1971.
 8. Nishimatsu H, Hirata Y, Shindo T, Kurihara H, Kakoki M, et al. (2002) 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.
 9. Ichikawa-Shindo Y, Sakurai T, Kamiyoshi A, Kawate H, Inuma N, et al. (2008) The GPCR modulator protein RAMP2 is essential for angiogenesis and vascular integrity. *J Clin Invest* 118: 29-39.
 10. Koyama T, Ochoa-Callejero L, Sakurai T, Kamiyoshi A, Ichikawa-Shindo Y, et al. (2013) Vascular endothelial adrenomedullin-RAMP2 system is essential for vascular integrity and organ homeostasis. *Circulation* 127: 842-853.