

研究報告書

研究課題名：
受容体活性調節タンパクの機能解明と血管新生および
血管合併症治療への応用

(研究領域:「代謝と機能制御」)

研究者氏名: 新藤 隆行

(研究期間: 2006年10月1日～2010年3月31日)

研究報告書

1. 研究課題名

受容体活性調節タンパクの機能解明と血管新生および血管合併症治療への応用

2. 氏名

新藤 隆行

3. 研究のねらい

アドレノメデュリン(AM)は、心血管系をはじめ、全身の組織で広範に産生される 52 個のアミノ酸からなるペプチドである。AM は強力な血管拡張作用を有する降圧物質として発見されたが、それ以外にも多彩な生理活性を有することが明らかとなってきた。AM と、生活習慣病を中心とした多くの病態との関連も示唆されている。

我々はこれまで AM とその関連因子の遺伝子操作動物の解析などから、これらの病態生理学的意義を検討してきた。AM ヘテロノックアウトマウス(AM+/-)では、血圧上昇や、心血管系に傷害が加わった際、動脈硬化や臓器障害の増悪が認められるのに対し、AM 過剰発現マウスは逆に抵抗性を示すことから、AM が抗動脈硬化作用、臓器保護作用を有することを報告した。一方、AM ノックアウトマウスのホモ接合体(AM-/-)は血管の発達が未熟であり、胎生中期にびまん性出血や浮腫が原因で致死であることから、AM が血管新生そのものに必須であることを初めて明らかとした。更に成体に AM を投与したときにも血管新生促進効果が確認されることから、AM の虚血性疾患などへの治療応用も期待される。

一方、AM の受容体システムについては、巧妙な制御系が報告されている。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、同一の G タンパク共役型受容体(GPCR)である CRLR (calcitonin receptor like receptor)を共用している。CRLR は、受容体活性調節タンパク RAMP (receptor activity modifying protein) 1、2、3 のいずれかと重合する事により、リガンドである AM や CGRP などの AM ファミリー因子との親和性が制御されており、こうした受容体システムの巧妙さが、AM の生理機能の多様性を生み出していると予想される。

本研究は、RAMP システムの病態生理学的意義とそのメカニズムを明らかとする共に、血管新生療法や、血管合併症などに対する新規治療法開発へと展開させることを目的とした。

4. 研究成果

AM-RAMP2系と血管新生

AM ノックアウトマウスが致死となる胎生中期の血管において、複数の RAMP サブアイソフォームの中でも、特に RAMP2 の発現が亢進している事に着目し、血管における AM の機能が主として RAMP2 によって制御されている可能性を考え、まず RAMP2 単独ノックアウトマウスを樹立した。RAMP2 ホモノックアウトマウス(RAMP2-/-)は、AM-/-同様、胎生中期に致死であり、AM-/-と同様の血管の発達不全と共に、著明な浮腫や出血、心嚢水貯留が認められた(図1A)。RAMP2-/-では、卵膜上を走る卵黄動脈の発達が抑制されており、電顕による観察では、卵黄動脈の血管内皮細胞の基底膜からの剥離が認められた(図1B)。また、大動脈では、血管壁の4型コラーゲン及びアクチンの発現低下が認められ、血管壁の菲薄化と、層状構造の破綻が観察された(図2)。以上の所見から、RAMP2-/-では、血管構成細胞は正常に分化するが、脆弱な血管構造のため、循環開始と共に浮腫や出血を生じることが示唆された。

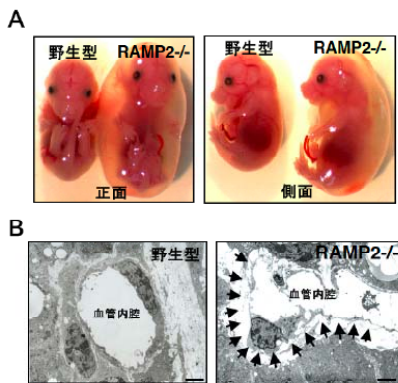


図1 RAMP2ノックアウトマウス(RAMP2^{-/-})胎仔の外観と血管構造の異常

A. マウス胎仔外観
B. 卵黄動脈の電顕像 Bar=2 μ m

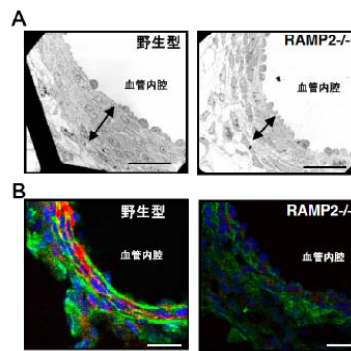


図2 RAMP2ノックアウトマウス(RAMP2^{-/-})胎仔の大動脈壁構造の異常

A. 血管壁の電顕像 (矢印=平滑筋層)
B. 免疫染色像 (緑=4型コラーゲン、赤=平滑筋層) Bar=25 μ m

次に、遺伝子発現の変化を検討したところ、RAMP2^{-/-}では、胎児の血管における4型コラーゲンなどの基底膜構成因子、VE-カドヘリンやクロロゲン 5 など、血管内皮細胞のアドヘレンスジャンクション、タイトジャンクションを構成する因子の低下が認められた。更に、RAMP2^{-/-}においては、代償性の AM の発現亢進を認めたが、GRLR や、その他の RAMP 発現に変化を認めず、RAMP2 欠損により、血管の発生における機能的 AM 受容体が失われること、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 系が必須であることが初めて明らかとなった。

一方、RAMP2 ノックアウトマウスのヘテロ接合体(RAMP2^{+/-})では、血管における RAMP2 の発現が半減していたが、大きな外観上の異常を認めず、成体が得られた。RAMP2^{+/-}成体を用いて、マトリジェルプラグアッセイや、大動脈標本を用いた大動脈リングアッセイを行ったところ、RAMP2^{+/-}では、野生型と比較して、血管形成の減弱が観察された。更に、AM^{+/-}と同様に、虚血時の血管再生能の低下も観察されたことから、成体における AM の血管新生作用においても、AM-RAMP2 系が中心的役割を担っているものと考えられた。更に、RAMP2^{+/-}成体では、ヒスタミン皮下注射による皮下浮腫モデル、傷害性脳浮腫モデルなどの各種の浮腫の病態モデルにおいて、血管透過性の亢進が認められたことから、AM-RAMP2系が、成体における血管構造安定化にも寄与していることが推測された。

次に、AM-RAMP2 系を賦活化した場合、実際に血管新生の亢進や、血管構造安定化が得られるか検討するため、ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)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樹立し、細胞機能の変化を検証した。RAMP2 過剰発現細胞では、アポトーシスが抑制されており、マトリジェル培養での管腔形成は著明に亢進していた。また、管腔形成は PI3K 阻害剤と PKA 阻害剤により抑制された。RAMP2 過剰発現細胞では、コントロール細胞と比較して、基底膜構成因子、細胞接着因子の遺伝子発現亢進が認められた。RAMP2 過剰発現内皮細胞を半透膜フィルター上で単層培養し、蛍光標識デキストランの透過を蛍光プレートリーダーで計測することで血管内皮細胞の透過性を評価した結果、RAMP2 過剰発現内皮細胞では透過性が抑制されていることが確認された。更に、過酸化水素処理後、RAMP2 過剰発現内皮細胞では、コントロール細胞と比較して、タイトジャンクション構造がより多く保たれているのが確認された。以上より、血管内皮細胞の AM-RAMP2 系を選択的に賦活化させることにより、管腔形成の亢進に加えて、血管構造の安定化が得られることが証明された。

AM-RAMP2 系を標的とすることで、従来の血管再生療法の問題であった、再生血管の退縮や、浮腫などの弱点を克服し、構造的、機能的に安定した血管を作出する新たな血管新生療法への応用、更に、AM-RAMP2 系の血管透過性抑制作用、抗浮腫作用を応用することで、難治性浮腫の新規治療法開発への展開などが視野に入る。

血管・心臓特異的ジーンターゲティングによる RAMP2 の機能解析

続いて我々は、血管における RAMP2 の意義を直接明らかとするために、血管内皮細胞特異的 RAMP2 ノックアウトマウス(E-RAMP2^{-/-})を樹立した。E-RAMP2^{-/-}の 95%は出生直前に致死であり、全身性の浮腫を認めた。一方で、血管の RAMP2 発現が 2 割程度残存する 5%の E-RAMP2^{-/-}は、成体が得られた。成体の E-RAMP2^{-/-}では、血管壁構造の異常に加え、腎系球体硬化症などの自然発症が認められた。さらに、肺、肝臓、腎臓などの主要臓器の血管周囲に、著明な炎症細胞浸潤が認められた。

以上の結果から、発生段階および成体期共に、AM-RAMP2 系が、血管新生および血管恒常性維持に必須であることが明らかとなった。

一方、薬剤投与誘導型心筋特異的 RAMP2 ノックアウトマウス(C-RAMP2^{-/-})では、ターゲティング誘導後、心拡大と心拍出低下を認め、拡張型心筋症様変化が認められた。C-RAMP2^{-/-}では、心不全や線維化マーカー、ゼラチナーゼ、NADPH オキシダーゼなどの発現亢進に加え、レニン-アンジオテンシン系関連因子の発現亢進が認められた。また早期の段階で、ミトコンドリアの膨化などの異常が認められた。

以上の結果から、心筋における AM-RAMP2 系は、酸化ストレスや、心リモデリングの制御に加え、心ミトコンドリア機能維持を介して、心保護的に働いている事が明らかとなった。

5. 今後の展開

AM-RAMP2 系は血圧低下作用、血管内皮保護作用、抗酸化作用、細胞機能維持などを介して、心血管病の病態の各局面において、生体に保護的に作用していると考えられる。RAMP2 を標的とすることで、AM の生理作用を制御できる可能性があり、RAMP2 は、AM に代わる治療標的分子となりうる。AM-RAMP2 系の分子メカニズムを明らかとしていくことで、今後新たな治療薬開発への展開が期待される。

一方、これまで RAMP2 と相同の働きをしていると思われていた RAMP3 であるが、そのノックアウトマウスを作成したところ、心血管系の発達には異常を認めず、両者の間には相補性がないことが明らかとなった。RAMP サブアイソフォーム間の機能分化が、AM の生理機能の多様性を制御している可能性がある。現在、各組織特異的なジーンターゲティングや、RAMP の立体構造解析などによるアプローチを進めており、引き続きの検討により、RAMP システムの全体像を明らかとしていきたい。

6. 研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Yuka Ichikawa-Shindo, Takayuki Sakurai, Akiko Kamiyoshi, Hisaka Kawate, Nobuyoshi Iinuma, Takahiro Yoshizawa, Teruhide Koyama, Junichi Fukuchi, Satoshi Iimuro, Nobuo Moriyama, Hayato Kawakami, Toshinori Murata, Kenji Kangawa, Ryoza Nagai, Takayuki Shindo, The GPCR modulator protein RAMP2 is essential for angiogenesis and vascular integrity, *J. Clin. Invest.*, vol. 118, 29-39 (2008)
2. Kusano S, Kukimoto-Niino M, Akasaka R, Toyama M, Terada T, Shirouzu M, Shindo T, Yokoyama S, Crystal structure of the human receptor activity-modifying protein 1 extracellular domain, *Protein Sci.*, vol. 17, 1907-1914 (2008)
3. Sakurai T, Kamiyoshi A, Watanabe S, Sato M, Shindo T, Rapid zygosity determination in mice by SYBR Green real-time genomic PCR of a crude DNA solution, *Transgenic Res.*, vol. 17, 149-155 (2008)
4. Shinoda Y, Ogata N, Higashikawa A, Manabe I, Shindo T, Yamada T, Kugimiya F, Ikeda T, Kawamura N, Kawasaki Y, Tsushima K, Takeda N, Nagai R, Hoshi K, Nakamura K, Chung UI, Kawaguchi H, Kruppel-like factor 5 causes cartilage degradation through transactivation of matrix metalloproteinase 9, *J. Biol. Chem.*, vol. 283, 24682-24689 (2008)

5. Kamiyoshi A, Sakurai T, Shindo Y, Iinuma N, Kawate H, Yoshizawa T, Koyama T, Muto S, Shindo T, Endogenous α -calcitonin gene-related peptide mitigates liver fibrosis in chronic hepatitis induced by repeated administration of concanavalin A, *Liver International*, vol. 29, 642-649 (2009)
6. Iinuma N, Sakurai T, Kamiyoshi A, Ichikawa-Shindo Y, Arai T, Yoshizawa T, Koyama T, Uetake R, Kawate H, Muto S, Tagawa Y, Miyagawa S, Shindo T, Adrenomedullin in sinusoidal endothelial cells play protective roles against cold injury of liver, *Peptides*, in press

(2)特許出願

研究期間累積件数:2件

発明者:新藤隆行

発明の名称:代謝症候群の治療もしくは予防剤、検査方法、検査薬、及び代謝症候群の治療薬の候補化合物のスクリーニング方法

出願人:科学技術振興機構

1. 国内出願 出願日:2007年11月26日
2. 国際出願 出願日:2008年11月21日

(3)その他の成果

(A)学会発表

1. 新藤隆行、血管新生、血管構造安定化におけるアドレノメデュリンの役割、第7回日本再生医療学会総会(名古屋)(2007年3月14日)
2. 新藤隆行、アドレノメデュリンとその関連因子の発生、病態における意義、第7回循環器再生医療研究会(東京)(2007年5月12日)
3. 神吉昭子、桜井敬之、飯沼伸佳、市川優佳、河手久香、新藤隆行、内因性カルシトニン遺伝子関連ペプチド(CGRP)の臓器保護作用、第80回日本内分泌学会学術総会(東京)(2007年6月15日)
4. 新藤隆行、受容体活性調節タンパク RAMP2の発生、病態における意義の解明、第2回 Vascular Biology Innovation Conference(東京)(2007年8月26日)
5. 新藤隆行、アドレノメデュリンとその関連因子の発生、病態における意義、第48回日本脈管学会(松本)(2007年10月25日)
6. 新藤隆行、アドレノメデュリンと血管疾患、第15回日本血管生物医学会(福岡)(2007年11月29日)
7. 新藤隆行、GPCR modulator protein RAMP2 is essential for angiogenesis and vascular integrity、第72回日本循環器学会(福岡)(2008年3月28日)
8. Takayuki Shindo, Pathophysiological roles of Adrenomedullin-RAMP system in cardiovascular diseases, CV Expert Forum in Seoul, Seoul, Korea (2008/5/3)
9. Takayuki Shindo, GPCR modulator protein RAMP2 is essential for angiogenesis and vascular integrity, 15th International Vascular Biology Meeting, Sydney, Australia (2008/6/4)
10. 新藤隆行、アドレノメデュリン-RAMP2 を標的とした、メタボリックシンドローム及び動脈硬化症の新規治療法開発、第50回日本老年医学会学術集会(千葉)(2008年6月21日)
11. 小山晃英、新藤隆行、発生および病態におけるアドレノメデュリン-RAMP2 システムの役割、第6回 LSF 研究会(東京)(2008年7月12日)
12. 新藤隆行、食塩感受性高血圧及び心不全発症における、アドレノメデュリン受容体活性調節タンパク RAMP2 の病態生理学的意義の解明、第20回ソルトサイエンス研究財団研究発表会(東京)(2008年7月29日)
13. 新藤隆行、発生および病態におけるアドレノメデュリン-RAMP システムの意義、第1回

- 臨床研究フォーラム(静岡)(2008年8月9日)
14. 新藤隆行、発生および病態におけるアドレノメデュリン-RAMPシステムの意義、第57回福岡心臓血管研究会(福岡)(2008年9月1日)
 15. 新藤優佳、新藤隆行、The GPCR modulator protein RAMP2 is essential for angiogenesis and vascular integrity、第31回日本高血圧学会(札幌)(2008年10月9日)
 16. 新藤隆行、血管作動性物質と血管新生、卓風会総会講演会(長野)(2008年10月18日)
 17. Takayuki Shindo, Receptor activity-modifying protein2 (RAMP2) is essential for angiogenesis and vascular integrity, AHA2008, New Orleans, USA (2008/11/12)
 18. 新藤優佳、新藤隆行、アドレノメデュリン-RAMP2 システムによる、血管新生、血管構造安定化作用の解明、第12回日本心血管内分泌代謝学会学術集会(熊本)(2008年11月28日)
 19. 新藤優佳、新藤隆行、アドレノメデュリン-RAMP2 システムによる血管新生および血管構造維持機構、第38回日本心臓血管作動物質学会(岡山)(2009年2月6日)
 20. 新藤隆行、研究最前線～心血管作動性物質とその病態生理学的意義、第16回高血圧・心血管医学内科セミナー(前橋)(2009年2月16日)
 21. 新藤隆行、RAMP2, a novel regulator of angiogenesis, vascular integrity, and homeostasis、第73回日本循環器学会学術集会総会(大阪)(2009年3月21日)
 22. 新藤隆行、アドレノメデュリン受容体活性調節システムとその病態生理学的意義、第6回CEMフォーラム(京都)(2009年4月4日)
 23. 新藤優佳、新藤隆行、アドレノメデュリン-RAMP2 システムは、血管新生、血管構造安定化、血管恒常性維持に必須である、第82回日本内分泌学会学術集会(前橋)(2009年4月24日)
 24. 新藤隆行、アドレノメデュリン受容体活性調節システムとその病態生理学的意義、第6回GPCR研究会(東京)(2009年5月8日)
 25. Takayuki Shindo, RAMP2 is the Key Determinant of the Vascular Functions of Adrenomedullin, 10th International Symposium on Mechanisms of Vasodilatation, Miyagi, Japan (2009/6/1)
 26. 新藤隆行、アドレノメデュリンとその受容体システム、第24回老化促進モデルマウス(SAM)研究協議会(松本)(2009年7月9日)
 27. 新藤優佳、新藤隆行、血管特異的コンディショナルターゲティングによるAM-RAMP2システムの病態生理学的意義の解明、動脈硬化 Update 2009(東京)(2009年9月5日)
 28. 吉沢隆浩、桜井敬之、神吉昭子、小山晃英、新藤優佳、川上速人、新藤隆行、アドレノメデュリン-RAMP2 システムによる心保護作用、第32回日本高血圧学会(大津)(2009年10月2日)
 29. 小山晃英、桜井敬之、神吉昭子、吉沢隆浩、新藤優佳、川上速人、新藤隆行、血管の発生および恒常性維持におけるアドレノメデュリン-RAMP2 システムの役割、第32回日本高血圧学会(大津)(2009年10月2日)
 30. 小山晃英、桜井敬之、神吉昭子、吉沢隆浩、新藤優佳、川上速人、新藤隆行、アドレノメデュリン-RAMP2 システムによる血管・リンパ管新生と恒常性維持機構の解明、第17回日本血管生物医学会(東京)(2009年10月9日)
 31. 新藤隆行、アドレノメデュリンとその受容体調節システムの病態生理学的意義の解明(高峰譲吉研究奨励賞受賞講演)、第13回日本心血管内分泌代謝学会(さいたま)(2009年10月23日)
 32. Takayuki Shindo, RAMP2 is the Key Determinant of the Vascular Functions of Adrenomedullin, CVEM 2010, Nara, Japan (2010/4/1)
- (B)受賞
1. 第21回国際高血圧学会 JSH Award(2006年10月15日)
 2. 第2回Vascular Biology Innovation Conference 最優秀賞(2007年8月26日)

3. 第 13 回高峰譲吉研究奨励賞(2009 年 10 月 23 日)

(C) 著作物

1. 新藤隆行, 血管新生のメカニズムを活用し, 新しい治療法の開発をめざす, メディカルバイオ, 2008 年 1 月号, P88-91
2. 新藤隆行, TOPICS 血管構造安定化の機序を解明 アドレノメデュリン機能発揮に RAMP2 が必須, メディカルトリビューン, vol. 41, 73 (2008)
3. 新藤隆行, 循環体液調節ペプチド、最近の進歩-アドレノメデュリン受容体の新たな機能, 循環器科, vol. 64, 461-467 (2008)
4. 新藤隆行, From Bench to Bedside~アドレノメデュリンと血管新生, Vascular Medicine, vol. 5, 71-76 (2009)
5. 新藤優佳, 桜井敬之, 神吉昭子, 小山晃英, 吉沢隆浩, 新藤隆行, アドレノメデュリン-RAMP2 システムによる血管新生および血管構造維持機構, 血管, vol. 32, 33-35 (2009)
6. 新藤優佳, 新藤隆行, GPCR modulator protein RAMP2 is essential for angiogenesis and vascular integrity, 分子心血管病, vol. 10, 422-424 (2009)