

助成番号 0732

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

新藤 隆行

信州大学大学院医学系研究科臓器発生制御医学講座

概要 【目的】血管作動物質は、循環ホメオスターシス維持に中心的役割を果たすと共に、その制御系の破綻は、疾患の発症にも深く関わっている。アドレノメデュリン(AM)は、血管拡張作用をはじめとした多彩な生理活性を持つペプチドであり、その産生異常は、高血圧、心不全、腎不全などの疾患発症にも関与していると考えられている。本研究では、AM及び、AMの受容体活性調節タンパクである RAMP2 に着目し、各々のノックアウトマウスを用いて、高血圧及び心不全における AM-RAMP2 システムの病態生理学的意義を検討した。

【方法・結果】AM ノックアウトマウス、RAMP2 ノックアウトマウス共に、ホモ接合体は胎生中期に致死となったが、ヘテロ接合体は、外見上異常を認めず、成体が得られた。生理食塩水負荷及び、アンジオテンシン II 負荷により、AM ヘテロノックアウトマウスは、野生型マウスに比較し、心肥大、心臓線維化の亢進と、心機能の低下を認め、心肥大や線維化に関わる遺伝子発現の亢進を認めた。また培養心筋細胞のタンパク合成能、心線維芽細胞の増殖能は、AM ノックアウトマウスで亢進していた。一方、RAMP2 ヘテロノックアウトマウスでは、野生型マウスと比較して大きな変化を認めなかった。そこで次に、RAMP2 遺伝子に対する Flox マウスと、心筋細胞特異的に発現する α MHC 遺伝子のプロモータを用いた Cre リコンビナーゼトランスジェニックマウスの交配により、タモキシフェン誘導により、心筋細胞特異的に RAMP2 がターゲティングされるマウスを樹立した。心臓特異的な RAMP2 ホモノックアウトマウスでは、心拡大、心臓線維化の亢進と、心機能の低下が認められた。

【考察】内因性の AM-RAMP2 系は、高血圧、心不全などの病態において、臓器保護的に働いていることが示された。AM-RAMP2 系は、今後新たな治療標的としても注目される。

1. はじめに

アドレノメデュリン(adrenomedullin: AM)は、1993年 Kitamura K, Kangawa Kらによって、ヒトの褐色細胞腫組織から分離同定されたペプチドである¹。副腎髄質(adrenal medulla)に高濃度存在することよりアドレノメデュリンと命名されたが、正常副腎の他、全身の組織に広範に分布し、血管においては血管内皮細胞や、平滑筋細胞から分泌される。特に血管内皮細胞での発現は副腎の約20倍以上であり、同じく血管内皮由来の血管収縮因子エンドセリン-1に匹敵する。AMは当初、血管拡張作用を有する血管作動性ペプチドとして注目されたが、その後の研究か

ら血圧調節作用以外にも、水、ナトリウム利尿作用、強心作用、細胞増殖、分化、遊走の調節、抗炎症作用、抗アポトーシス作用、抗酸化作用、ホルモン分泌調節作用、など多彩な生理活性を持つペプチドであることが分かってきた^{2,3}。血中AM濃度は、高血圧、心不全、腎不全などにおいて、その重症度と共に上昇することから、各病態への関与も示唆されている⁴。

一方、AMの受容体システムについては巧妙な制御系が知られている。AM受容体であるCRLRには、これに重合する複数の受容体活性制御タンパクRAMPが存在し、受容体CRLRとRAMPの組み合わせパターンにより、受

容体機能が調整され、AM の生理作用の多面性を生み出していると考えられている⁵。今後 AM やその関連物質を、治療薬として応用検討していくためには、RAMP の病態生理学的意義を明らかとしていくことが必須と考えられる。本研究は、AM 及び RAMP2 ノックアウトマウスを用い、高血圧及び心不全における AM-RAMP2 システムの病態生理学的意義を検討する事を目的とした。

2. 方法と結果

2.1 AMKO マウスにおける検討

AM ノックアウトマウス (AMKO) ホモ接合体は、既に我々が報告している通り、胎生中期に致死である⁶。そこで、AM の発現量が各臓器で半分に低下しているが、外見上異常を認めず、成体が得られるヘテロ接合体 (AM+/-) を用い、野生型マウス (WT) との比較検討を行った。AM+/- 及び WT マウスに対し、生理食塩水負荷及び、アンジオテンシン II (AngII) 3.2 mg/kg/日の持続投与を行い、高血圧及び心肥大を誘発した。負荷 14 日後、心エコーによる左室壁厚と心機能評価を行い、病理学的に心肥大、心線維化を評価した。更に心肥大関連遺伝子の発現を検討した。

次に AM+/- 及び WT 新生児より心筋細胞、心線維芽細胞を初代培養して、AngII 投与時の心筋細胞のタンパク合成能、ERK 活性化、線維芽細胞の増殖能を比較した。

AM+/- マウスでは、WT に比して、左室壁の肥厚と、心体重比の増加を認めた (図 1A)。更に心筋間質及び冠動脈周囲線維化の増強を認め、冠動脈周囲線維化部分の面積/血管内腔の面積比 (PVF/VA) の検討では、AM+/- で有意な上昇を認めた (図 1B)。心エコーによる検討では、AM+/- マウスにおいて、心機能低下が確認された。心臓における各遺伝子の発現を検討した結果、負荷前には AM+/- と WT マウスの間で有意な差を認めなかったが、負荷後の心臓においては、心肥大関連遺伝子としてアンジオテンシン変換酵素遺伝子の発現亢進、また線維化関連遺伝子として TGF-β、I 型コラーゲン遺伝子の発現亢進を、AM+/- の方でより強く認めた。逆にカルシウムハンドリングに関わる sarco/endoplasmic reticulum calcium ATPase-2 (SERCA2) の発現は AM+/- で低下していた。

次に、心筋細胞を初代培養し、AngII 刺激を行ったところ、タンパク合成能の亢進や、ANP の発現亢進、Extracellular signal-regulated kinase (ERK) 活性化亢進が

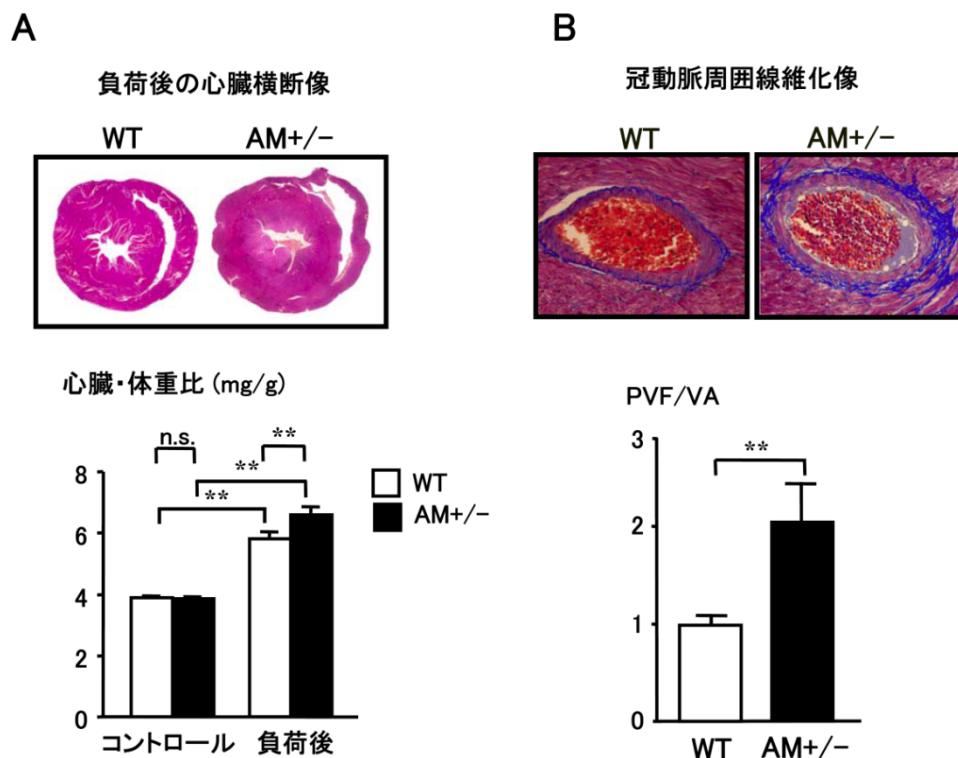


図 1.

認められたが、その変化は AM^{+/-} で顕著であった。更に心線維芽細胞の培養系での検討でも、心線維芽細胞の増殖能、I型コラーゲンの発現は、WT に比して、AM^{+/-} でより亢進していた。

以上から、内因性の AM が、心肥大、心線維化、心不全の進展抑制に働いていることが明らかとなった。

2.2 RAMP2 ノックアウトマウスにおける検討

AM ノックアウトマウスが胎生致死となる胎生中期の血管においては、RAMP2 の高発現を認めるため、我々は、血管における AM シグナルの中心が、RAMP2 によって担われている可能性を考えた。そこで、これを検証するため、本研究では RAMP2 特異的ノックアウトマウスを新たに樹立した⁷。RAMP2 ノックアウトマウスホモ接合体 (RAMP2^{-/-}) は、胎生中期に致死であり、血管の発達異常 (図2A) と共に、著明な浮腫が認められた (図2B)。以上の所見は、AM ノックアウトマウスホモ接合体 (AM^{-/-}) と共通する所見であった。Real-time PCR による定量評価において、RAMP2^{-/-} 胎仔では、代償性の AM の発現亢進を認めたが、AM 受容体本体である CRLR や、その他の

RAMP 発現量には変化を認めなかった。この結果から、発生の段階においては、3 種類存在する RAMP サブインフォームの間に相補性がない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ヘテロ接合体 (RAMP2^{+/-}) は、外見上異常を認めなかったが、各臓器における RAMP2 の発現は、WT マウスの半分程度まで減少していた。逆に AM の発現は、WT マウスに比較して上昇傾向を認めた。RAMP2^{+/-} を用いて、2.1 の実験と同様に、生理食塩水負荷及び、AngII 負荷を 14 日間施行し、病理学的変化、遺伝子発現変化を検討したが、AM^{+/-} と異なり、RAMP2^{+/-} では、WT と比較して大きな差を認めなかった。

2.3 心臓特異的 RAMP2 ノックアウトマウスにおける検討

そこで次に、Cre-loxP システムを用いて RAMP2 遺伝子のコンディショナルターゲティングを試みた。RAMP2 遺伝子に対する Flox マウスを樹立し、ホモ化した後、心筋細胞特異的に発現する α MHC 遺伝のプロモータを用いた Cre

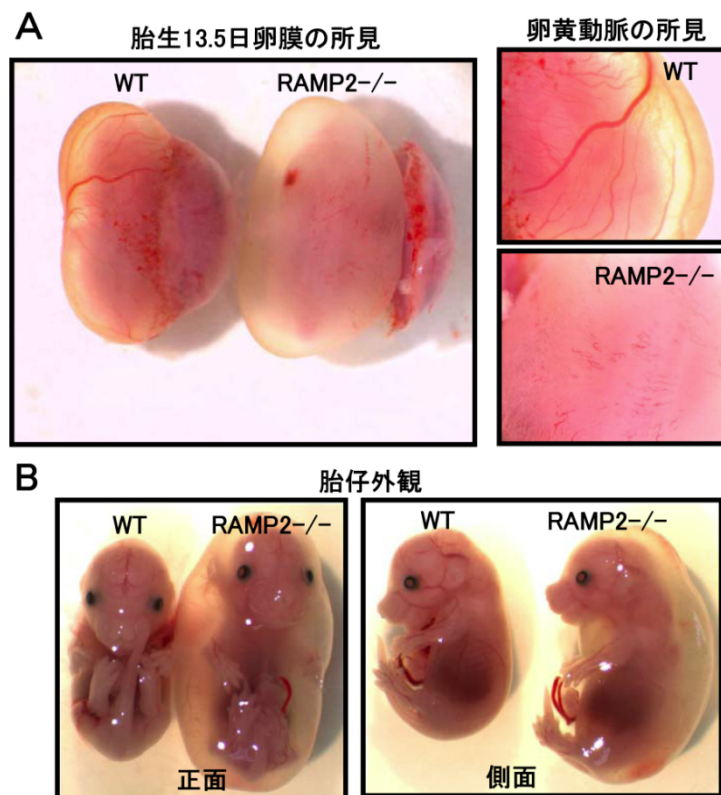


図 2.

リコンビナーゼトランスジェニックマウスとの交配により、タモキシフェン誘導 (30 mg/kg/day) により、心筋細胞特異的に RAMP2 がターゲティングされるマウス (H-RAMP2^{-/-}) を樹立した。

タモキシフェン誘導 7 日目、H-RAMP2^{-/-} では、心拡大 (図 3A) に加え、心臓間質や冠動脈周囲に著明な線維化を認め (図 3B)、心機能の低下が認められた。H-RAMP2^{-/-} の心臓では、BNP、I 型コラーゲン遺伝子の発現亢進を認める一方で、SERCA2 の発現低下が認められた。更に H-RAMP2^{-/-} では、NADPHoxidase のサブユニットである p22phox、p47phox、p67phox の遺伝子発現亢進が認められた。電顕による観察では、H-RAMP2^{-/-} の心臓において、Z-line や gap junction 構造の乱れ、筋原線維の走行の乱れ、心筋細胞の変性、間質における細胞外マトリックスの増加といった変化が確認された。

3. 考 察

本態性高血圧患者の血中 AM 濃度は正常血圧者と比較して高値である。更に高血圧の重症度が増すに従って血中 AM 濃度は上昇する。また腎血管性高血圧や原発性アルドステロン症では血中 AM 濃度が高値であることが報告されている。AM は血管拡張により体血管抵抗を減らすと共に、水、ナトリウム利尿に働き降圧をもたらす事から、

AM はこれらの病態において産生量が増加することで、代償性に血圧を低下させていることが推測される。

実験 2. 1 の結果から、AM は、単に代償性に血圧を低下させるだけでなく、高血圧の病態において、心筋細胞の肥大抑制、線維芽細胞の増殖抑制に働く事で、臓器保護に働いている事が示された。AM は、高血圧に伴う臓器障害に対して、治療薬の候補となる可能性も考えられる。

しかしながら、AM はペプチドであり、血中半減期も短いため、それ自体を治療薬として応用するには多くの制約もある。そこで実験 2. 2、2. 3 では、AM の受容体システムに注目し、AM 受容体活性調節タンパクである RAMP2 の病態生理学的意義についても検討を行った。RAMP2^{-/-} は、AM^{-/-} と同様に、血管の発達不全により、胎生致死となることから、AM の血管新生作用が RAMP2 によって制御されていることが明らかとなった。また心臓特異的な RAMP2 ホモノックアウトマウスでは、タモキシフェン誘導後、心臓線維化と心機能低下を認める事から、内因性の AM-RAMP2 系が、強力な臓器保護作用を有する事が示された。心臓特異的な RAMP2 ホモノックアウトマウスでは、心臓における NADPHoxidase の亢進を認める事から、AM-RAMP2 系による臓器保護作用のメカニズムとして、酸化ストレス抑制作用などが推測される。RAMP2 は AM に代わる治療標的としても注目される。

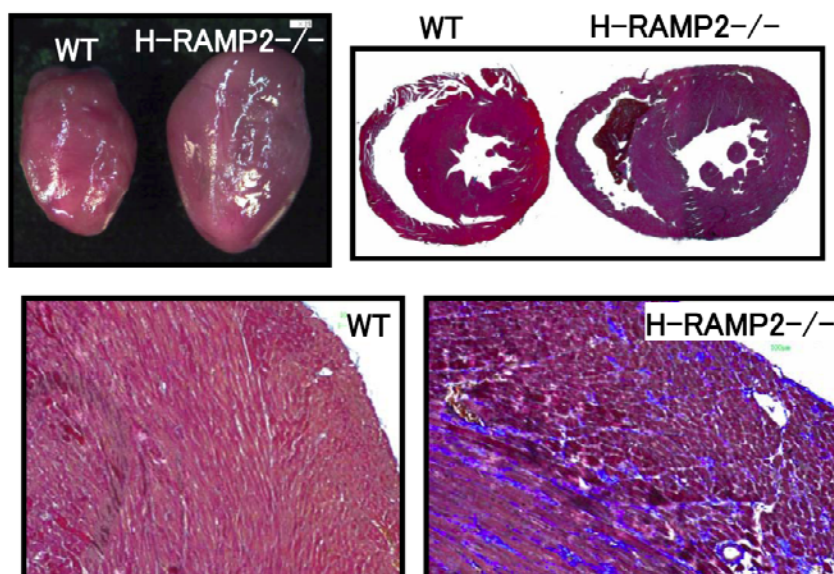


図 3.

4. 今後の課題

高血圧負荷により、RAMP2^{+/+} 成体は、AM^{+/+} で見られた程の心臓の変化を示さなかった。これが他の RAMP サブアイソフォームによる代償機転によるものかどうか、今後の更なる検討が必要である。

謝 辞

本研究を遂行するに当たり、ご援助を賜りました財団法人ソルト・サイエンス研究財団に厚く御礼を申し上げます。

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): 553-560.
2. Eto T. A review of the biological properties and clinical implications of adrenomedullin and proadrenomedullin N-terminal 20 peptide (PAMP), hypotensive and vasodilating peptides. *Peptides.* 2001; 22(11): 1693-1711.
3. Hinson JP, Kapas S, Smith DM. Adrenomedullin, a multifunctional regulatory peptide. *Endocr Rev.* 2000; 21(2): 138-167.
4. Tanaka M, Kitamura K, Ishizaka Y, Ishiyama Y, Kato J, Kangawa K, Eto T. Plasma adrenomedullin in various diseases and exercise-induced change in adrenomedullin in healthy subjects. *Intern Med.* 1995; 34(8): 728-733.
5. 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): 333-339.
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): 1964-1971.
7. Ichikawa-Shindo Y, Sakurai T, Kamiyoshi A, Kawate H, Inuma N, Yoshizawa T, Koyama T, Fukuchi J, Imuro 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.

No. 0732

Pathophysiological Roles of Adrenomedullin Receptor Activity-Modifying Protein, RAMP2 in Salt-Sensitive Hypertension and Heart Failure

Takayuki Shindo

Graduate School of Medicine, Shinshu University

Summary

Vasoactive peptides play central roles in the cardiovascular homeostasis, however imbalance between them may be the cause of various diseases. Adrenomedullin (AM) is a peptide originally identified as a vasodilating substance and it is now recognized as a pleiotropic peptide. Abnormality of AM production may be closely related with various diseases, such as hypertension, heart failure, and renal failure. In this study, we focused on AM and its receptor activity-modifying protein, RAMP2. Using knock out mice of AM and RAMP2, we investigated the pathophysiological roles of AM-RAMP2 system in hypertension and heart failure.

Both AM^{-/-} and RAMP2^{-/-} embryo died in utero at midgestation. In contrast, AM^{+/-} and RAMP2^{+/-} were apparently normal and we could obtain adult animals. Under the salt and angiotensin II (Ang II)-loading, AM^{+/-} showed enhanced cardiac hypertrophy, cardiac fibrosis, and reduced cardiac function compared with wild-type mice. AM^{+/-} also showed enhanced upregulation of hypertrophy and fibrosis-related genes in the heart. Protein synthesis of cardiac myocytes and proliferation of cardiac fibroblasts were both enhanced in AM^{+/-}. In contrast, RAMP2^{+/-} did not show significant changes compared with wild-type mice. Therefore, we next generated cardiac myocyte-specific RAMP2^{-/-} mice by crossbreeding RAMP2-flox mice with α MHC-Cre recombinase transgenic mice, in which RAMP2 can be deleted by tamoxifen-treatment. Cardiac myocyte-specific RAMP2^{-/-} mice showed cardiac dilatation, enhanced cardiac fibrosis, and reduced cardiac function.

These results show that endogenous AM-RAMP2 system work as organ-protective manner in hypertension and heart failure. AM-RAMP2 system could be a novel therapeutic target.