

最新のトピックス

血管内皮細胞の機能保持による体内恒常性制御
—アドレノメデュリン-RAMP2シグナルによって—

信州大学医学系研究科疾患予防医科学系専攻循環病態学講座

小山 晃 英

I はじめに

血管は全身に分布して、生体機能の維持に必須の役割を果たす。一方で、血管の障害は、癌、脳卒中、心臓病の3大生活習慣病の病態にも深く関わっている。さらに、血管の恒常性維持の調節システムの異常と、その修復過程の破綻は、様々な慢性臓器障害の原因となる。血管の恒常性維持において中心となるのが、血管内皮細胞である。血管内皮細胞は、体内最大の臓器間ネットワークを形成し、様々な生理活性分子を産生する¹⁾²⁾。ナトリウム利尿ペプチド、エンドセリン、アドレノメデュリンなどの重要な生体内生理活性分子の発見は我が国でなされ、その後の研究も我が国が世界をリードしてきた。これらの分子は、多彩な生理活性を有し、生体内恒常性維持において重要な役割を果たす。

II アドレノメデュリンと受容体システム

アドレノメデュリン (Adrenomedullin: AM) は、血管をはじめ全身の組織で広範に産生される血管作用性物質である。AM は、血管新生作用、抗炎症作用、抗酸化作用などを有し、臓器障害や動脈硬化に抵抗性を示すことが報告されている。現在、国立循環器病研究センターでは重症下肢末梢動脈閉塞症 (慢性閉塞性動脈硬化症・バージャー病) 症例に対して、臨床応用され、宮崎大学では炎症性腸疾患に対し臨床試験が行われている。さらに、高血圧、心不全、腎不全などで血中濃度が上昇することから、各疾患への関与も示唆されてきた。

AM ノックアウトマウス (AM^{-/-}) は、胎生期の血管の発達が未熟であり、血管の構造に異常を認め、胎生致死となる³⁾。このことから、AM が血管の発生に必須であることが明らかとなった。一方、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、calcitonin-receptor-like receptor (CLR) という7回膜貫通Gタンパク共役型受容体を共有している⁴⁾。AM と CGRP に対する CLR の特異性は、1回膜貫通型タンパクである受容体活性調節タンパク receptor-activity-modifying-protein (RAMP) により規定されていると考えられている。RAMP には、RAMP1, 2, 3の3種類が報告されている。CLR+RAMP1の組み合わせは主としてCGRPの受容体として作用し、CLR+RAMP2, CLR+RAMP3では、主としてAM受容体として機能する。我々はこれまで、RAMPのノックアウトマウスの中で、RAMP2ノックアウトマウス (RAMP2^{-/-}) のみが、AM^{-/-}の表現形を再現し、血管の発達不全により胎生致死となることを報告してきた⁵⁾。

III 血管内皮細胞におけるアドレノメデュリン-RAMP2システム

A 血管内皮細胞特異的 RAMP2 ノックアウトマウス胎生期の表現形

血管における RAMP2の病態生理学的意義を明らかにするために、血管内皮細胞特異的な RAMP2^{-/-} (E-RAMP2^{-/-}) を作製した。E-RAMP2^{-/-}は、全身型の RAMP2^{-/-}と比較して、胎生後期まで発生段階が進むものの、表現形が強いものでは、周産期に全身性の著明な浮腫が認められ、ほとんどの個体で、周産期での死亡が確認された。血管の電顕像からは、平滑筋細胞に変化は認められないが、内皮細胞では基底膜からの部分的な剥離が確認された。

B 血管内皮細胞特異的 RAMP2 ノックアウトマウス成体期の表現形

コンディショナルターゲットングによるE-RAMP2^{-/-}では、RAMP2欠損の浸透率は100%ではない。E-RAMP2^{-/-}のうち、RAMP2遺伝子発現が一部残った個体では成体が得られた。成体のE-RAMP2^{-/-}は、野生型マウスと比較して血圧が低下しており、胸部大動脈の病理所見では、収縮性が失われたように血管が

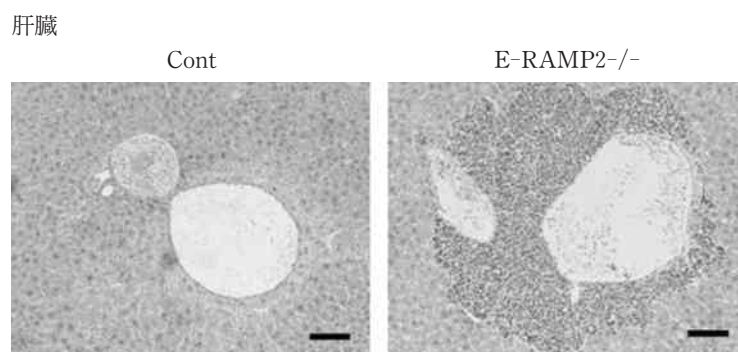


図1 6カ月齢マウスの肝臓の病理像

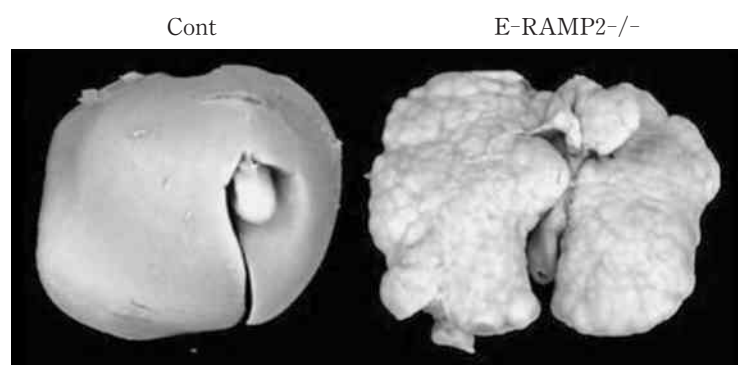


図2 6カ月齢マウスの肝臓の外観

拡張していた。電顕による観察では、内皮細胞の基底膜からの剥離と、平滑筋層の断裂化が観察された。これらの結果から、E-RAMP2^{-/-}成体では、血管内皮細胞のみならず、平滑筋細胞にも構造異常を認め、両者の機能障害を生じていることが示唆された。

全身型の RAMP2ヘテロノックアウトマウス (RAMP2^{+/-}) は成体まで成長し、外見上の変化は認めないが、12カ月齢を超える加齢マウスでは、肺、腎臓、肝臓といった主要な臓器に血管炎様の細胞浸潤が自然発症し、胸部大動脈では、組織老化の指標となる SA-β-gal 染色陽性の所見が認められる。さらに、炎症性接着因子である ICAM-1, VCAM-1の発現が、若年期から亢進している。一方、E-RAMP2^{-/-}では、RAMP2^{+/-}より、病変が早期から出現した (図1)。血管炎様の所見は若年期でも認められ、6カ月齢程になると、より著明となった。

これらの細胞浸潤のメカニズムを検討するために、野生型と RAMP2^{+/-}から、肝臓類洞内皮細胞を初代培養し、マクロファージの接着実験を行った。RAMP2^{+/-}由来の内皮細胞では、野生型と比較して、マクロファージの接着性が亢進していた。また、内皮細胞

の遺伝子発現を検討したところ、RAMP2^{+/-}の肝臓類洞内皮細胞では、VCAM-1の発現亢進、eNOSの発現低下が認められた。

E-RAMP2^{-/-}の肝臓においては、6カ月齢以上の一部のマウスで、肝硬変様の形態変化が認められた (図2)。通常の肝硬変とは異なり、線維化は肝細胞側ではなく、血管の走行に沿って進行していた。

E-RAMP2^{-/-}の腎臓では、水腎症と多発性嚢胞腎が自然発症し、嚢胞の周囲に線維化が著明であった (図3)。さらに、糸球体も拡大しており、糸球体硬化症を伴っていると考えられた。電顕像からは、糸球体において、足突起の融合、基底膜の肥厚、内皮細胞と基底膜の部分的離開などが確認された。

C 薬剤誘導型血管内皮細胞特異的 RAMP2 ノックアウトマウスの表現形

E-RAMP2^{-/-}は、得られる成体が少ないため、成体期の解析に限界があった。このため、次に薬剤誘導性により、オンデマンドに内皮細胞の RAMP2を欠損させることができる drug induced-E-RAMP2^{-/-} (DI-E-RAMP2^{-/-}) を作成した。このマウスでは、RAMP2の欠損誘導とともに、血管透過性の亢進によ

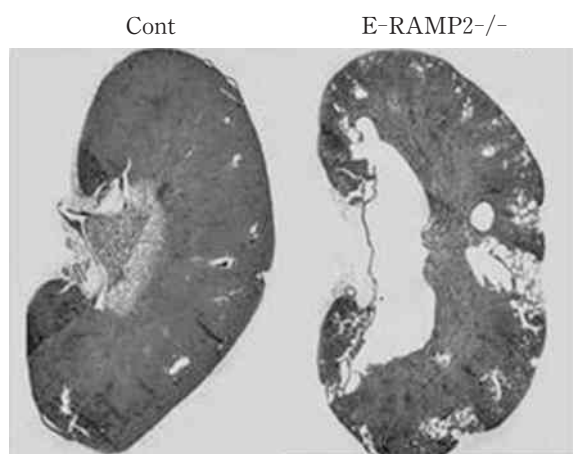


図3 6カ月齢マウスの腎臓の断面像

る、著しい全身性の浮腫を認めた。さらに、RAMP2欠損誘導早期から内皮細胞の接着因子の発現の亢進と、腎糸球体内皮細胞の構造異常が認められた。このマウスの病態における機能を確認するために、下肢虚血モデルを作製し解析を行った。DI-E-RAMP2^{-/-}では、血管新生機能が低下しており、対照群と比較して血流の回復遅延、毛細血管の発達不全、間質の浮腫の増悪などが認められた。

文 献

- 1) Higashi Y, Noma K, Yoshizumi M, Kihara Y: Endothelial function and oxidative stress in cardiovascular diseases. *Circ J* 73: 411-418, 2009
- 2) Mochizuki N: Vascular integrity mediated by vascular endothelial cadherin and regulated by sphingosine 1-phosphate and angiotensin-1. *Circ J* 73: 2183-2191, 2009
- 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* 104: 1964-1971, 2001
- 4) 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* 393: 333-339, 1998
- 5) 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* 118: 29-39, 2008

IV おわりに

今回の一連のノックアウトマウスの解析結果は、血管内皮細胞のRAMP2という、単独の因子の異常が、発生・成体での双方の血管の恒常性維持の破綻をもたらすことを示した初めての知見である。本研究により、AMの発生における血管新生作用が、主として血管内皮細胞のRAMP2によって規定されていることが明らかとなった。成体においても血管内皮細胞のRAMP2の急性欠損により、血管新生低下、血管透過性亢進など、血管の機能不全を生じる。さらにRAMP2の慢性欠損により、内皮細胞の恒常性が破綻し、血管の老化が亢進し、最終的に全身の臓器不全を引き起こすことが示された。

生理活性ペプチドそのものは血中半減期が短いため、慢性疾患の治療薬として応用するには制約がある。これに対し、受容体側の調節因子である膜タンパクRAMPを標的とすれば半減期の問題はなく、慢性疾患への応用に道が拓ける。AM-RAMP2システムの血管恒常性維持機構の解明は、これまで有効な手段がなかった慢性炎症と慢性臓器不全の新しい治療法開発に繋がることが期待される。