

平成12年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究

重点研究報告書

第2分野

生体機能調節等の解明に関する研究

目 次

文献No	課題番号			
20000937A	21008	血管壁細胞の抗血栓性機能の制御機構の解明と新規抗血栓薬の開発	加藤 久雄	1
938A	21019	組織内脂肪蓄積の予防及びGLUT4の発現増加を目指したインスリン抵抗性治療法の研究	江崎 治	14
939A	21045	慢性呼吸器疾患の発症機構の解明と医療への応用	斎藤 博久	18
940A	21052	閉経後骨粗鬆症の発症機構の解明とその予防と治療薬に関する研究	宮浦 千里	25
942A	21067	細菌感染に関与する病原遺伝子の発現機構の解明とその制御法の開発	渡辺 治雄	33
943A	21073	脳循環障害による神経細胞死の発症機序の解析と治療法の開発	内村 英幸	38
944A	21079	疾患モデルマウスを用いたβ-ガラクトシドシスの病態解析と治療への応用	松田潤一郎	46
945A	21081	精神疾患の分子メカニズムの解明と新しい診断・治療法の開発への応用	西川 徹	53
946A	21086	新しい生体防御調節物質の機能と作用の解析	鈴木 和男	60
948A	21089	感染症が誘発する自己免疫疾患病態の解明とその医療への応用に関する研究	大川原明子	68
949A	21092	生体膜脂質を介する細胞機能調節機構の解明とその医療への応用	西島 正弘	80
950A	21096	免疫・内分泌系による神経系の障害機構の解明とその制御	田平 武	88
951A	21102	移植免疫寛容とマイクロキメリズムに関する基礎的研究	木村 廣光	92
952A	21104	G蛋白質共役型受容体の個体レベルでのゲノム機能評価	辻本 豪三	98
953A	21107	難治性腎疾患の病態解明と医療への応用に関する研究	藤本純一郎	111
954A	21110	食細胞による感染防御機構の解明と医療への応用	綱脇 祥子	118
955A	21121	抗酸化機能調節に及ぼす運動と栄養の影響に関する研究	樋口 満	126
956A	21130	神経変性疾患における神経細胞死の分子機構の解析	桃井 隆	134
957A	21142	C型肝炎ウイルスに対するインターフェロン(IFN)の治療効果を増強する新薬の開発研究	小長谷昌功	144
958A	21150	グリア細胞の機能調節による神経疾患治療法の開発	高坂 新一	149
959A	21166	新規破骨細胞形成抑制因子(OCIF)とそのリガンドである破骨細胞分化因子(ODF)の生理的役割の解明と医療への応用	高橋 直之	160
960A	21177	コレステロール代謝・動脈硬化関連遺伝子の発現調節因子の検索	松本 明世	167
961A	21179	血圧調節物質・動脈硬化起因物質などに関する分子生物学的、生化学的研究	南野 直人	178
964A	21215	アトピー性皮膚炎自然発症(NC)マウスを用いた皮膚掻痒症の発症機序の解明と新規治療薬の創製	廣田 直美	183
965A	21224	ヒト血液細胞情報伝達の解明とオリゴヌクレオチドを用いた治療法の開発	湯尾 明	193
966A	21225	癌化とウイルス感染を制御する細胞内情報伝達分子を標的とする薬剤の探索	松田 道行	200

20000969A	21228	細胞内シグナル伝達の解明による創薬シーズの探索	上原 至雅	……	204
968A	21234	スフィンゴ脂質の情報伝達の研究と抗血栓症薬開発	望月 直樹	……	208
969A	21279	中枢神経系におけるATP受容体の機能の解析と医療への応用	井上 和秀	……	213
941A	22055	宿主の防御機能動態と感染機構の解明と医療への応用	高津 聖志	……	221
949A	22088	ビタミンE欠乏性脊髄小脳失調症の病態解明と治療法の確立に関する研究	水澤 英洋	……	228
962A	22183	炎症・アレルギー性疾患の発症機構の解明と医療への応用	清水 孝雄	……	233
963A	22194	コレステロール代謝を標的とした抗動脈硬化薬開発のための基盤研究	新井 洋由	……	237

血圧調節物質・動脈硬化起因物質などに関する分子生物学的、生化学的研究

所 属 国立循環器病センター研究所
研究機器管理室
研究者 南野 直人

分担研究者

- (1) 塩野義製薬(株) 医科学研究所 坂田 恒昭
(2) プロテオミックス研究所 次田 皓

要 旨

アドレノメデュリン (AM) 等の循環調節因子の血圧調節、動脈硬化への寄与を探るため、産生調節機構や炎症制御機能などを解析し、CRLR/RAMP 受容体における AM の特異性決定機構を検討した。マウス脳、ヒト血漿等のプロテオーム解析を展開した。

1. 研究目的

循環器系は生命活動の基盤であるため、そのホメオスタシス維持には精密、多重の調節機構が存在し、循環器疾患はその乱れにより生ずると考えられる。多数の循環調節因子が複雑に関与する血圧調節や血管再構築機序を解明し、高血圧症や動脈硬化症の新しい診断、治療法を開発するため、本研究では循環調節因子の発見とその機能解明を目指した研究を総合的に実施する。具体的には、血管壁細胞など循環系関連細胞を対象として、セカンドメッセンジャーなどを指標とする高感度かつ再現的で、未知因子検索に有効な生物活性測定法を開発し、これまでに確立したペプチド精製技術を活用して新規循環調節因子の探索を推進する。

アドレノメデュリン (AM) は、カルシトニン遺伝子関連ペプチド (CGRP) スーパーファミリーに属する強力な血管弛緩性ペプチドで、強い降圧活性などを発揮する。しかし、その受容体はこれまでに例のない複雑な調節系を有しており、真に機能する受容体は未だ明確となっていないため、その制御機構の解明を目指す。また、AM は循環調節因子として血圧調節や動脈硬化発症に関連するとともに、炎症性サイトカイン、内毒素等により産生が亢進することが明らかとなった。本研究では、血管壁細胞や周辺細胞で産生される AM の血圧調節や動脈硬化発症等への関与の検討や、高感度、特異的測定法の開発などにより診断、治療法の創出を目指した研究を実施する。

さらに、プロテオーム解析技術の高度化を図り、正常マウス脳、正常ヒト血漿中の蛋白を数多く分離同定するとともに、老化マウス、遺伝子欠損マウス等の疾患モデルマウスの脳及びアルツハイマー病、老人性痴呆患者血漿中の蛋白を正常対象と比較することにより、その病因の解明も目指す。

2. 研究方法

(1) ラット、ヒト、ブタ、ウシの各血管内皮細胞、平滑筋細胞や循環器系に関連する細胞を対象に、高感度のカルシウム、cAMP、cGMPなどを指標とする測定系を開発したので、これらを用いてブタ脳抽出物を出発材料に新規循環調節因子の精製を実施した。

(2) ラット新生児より調製した初代培養の皮膚線維芽細胞、心筋細胞と心臓線維芽細胞などを用い、これまで培養細胞株などで実施してきた成果を確認する。AM産生調節は特異的ラジオイムノアッセイ法、AMやサイトカインの遺伝子発現量はリアルタイム定量的PCR法、IL-6産生量はMH60.BSF2細胞を用いたバイオアッセイ法で測定し、NO産生量は蛍光測定キットを使用した。また、IgA腎症患者と健常者を対象とし、末梢血由来の単核球画

分を調製した。RNA を RNazol で抽出し、逆転写後リアルタイム定量的 PCR 法にて AM や サイトカインなどの遺伝子発現量を測定した。

(3) 血管平滑筋細胞(VSMC)もエンドセリン(ET)を活発に産生することが分かったため、SDラット血管平滑筋細胞(VSMC)を使用しET産生調節機構を解析した。ET-1量は特異的ラジオイムノアッセイにより測定し、分泌物のクロマト分析等も実施した。

(4) AM受容体やCGRP受容体を構成するCRLR、RAMPタンパクを安定発現する細胞株を構築し、受容体特異性と糖鎖付加の関連を調べる。部位特異的変異導入法により、CRLRの糖鎖付加部位に変異を導入した変異型CRLRの発現系を作製し、RAMP発現系と共発現し、リガンド結合能とシグナル伝達能を野生型と比較する。また、変異型CRLRのN末端にFLAGを導入し、膜表面への発現を解析する。

(5) マウス脳の5部位、5時期の25検体を二次元電気泳動法(2-DE)で分離し、染色・画像解析後、スポットのアミノ酸配列決定と蛋白質の同定を行う。P53遺伝子ノックアウトマウスと正常のマウス脳及び発癌した肺の蛋白質の2-DEによる比較を行う。ヒト正常女性、正常老人、アルツハイマー患者、老人性痴呆患者の血漿を2-DEで分離し、PVDF膜に電気転写後クマシー染色し、スポットのN末端配列の解析、apoE、Tau-1、プレセニリン等の抗体で抗体染色を行う。プロテオーム解析の基礎技術としてヒドラジンヒドラートをを用いた蛋白質の特定分解方法の確立と、他の相当法との特異性を検討する。

3. 研究成果

(1) 反応性の良いラット血管内皮細胞、平滑筋細胞等を用いて、カルシウム、cAMP、cGMPなどを指標として精製に必要な活性測定が可能となった。平滑筋細胞で観測された活性ピークはCGRP、VIP、PACAとその一部が修飾、酸化あるいは分解して生じたペプチドであった。また、他の細胞を用いた活性測定も開始し、未同定のピークの単離、構造決定を進めている。

(2) 初代培養ラット線維芽細胞(皮膚、心臓)のAM産生調節は、Swiss3T3細胞や血管平滑筋細胞と極めて類似し、ダイナミックに調節されていたが、心筋細胞はほとんど変動しなかった。IL-6の遺伝子発現や産生では、皮膚や心臓の線維芽細胞、心筋細胞を問わず、AMはIL-1 β や炎症性カインと相乗的な亢進作用を示した。一方、IL-1 β で誘導された皮膚線維芽細胞のTNF- α 遺伝子発現はAMにより20%にまで抑制された。

心臓組織においてAMは主に線維芽細胞から産生され、IL-1 β 存在下の線維芽細胞のNO産生を約3倍に、ETの基礎分泌量を約50%抑制することも分かった。これらの結果より、心臓ではAMは線維芽細胞を中心に機能を発揮していると推定された。心臓線維芽細胞、心筋細胞の産生するAM及びCGRP様免疫活性物質を分析した結果、AMは多量に産生されるがCGRPは有意に産生されないことが確認された。

IgA腎症患者の末梢血単核球におけるAM、CNP、VEGF、IL-6、IL-1 β 遺伝子発現を測定した結果、健常者とIgA腎症患者間ではAMの遺伝子発現に減少傾向が認められた。IgA腎症患者を軽度、中等度、重度の3群に分け比較したところ、AMの遺伝子発現が重度群で減少しており、AMとCNP、VEGFとIL-1 β の遺伝子発現量の間には正相関が認められた。

(3) 血管平滑筋細胞のET産生量は内皮細胞の約10%で、その産生調節を内皮細胞と比較すると、TGF- β (増加)、フォルボールエステル(抑制)とFCS(増加)のみが共通で、無変動を除くと大きな相違が観測された。特に、トロンピンは平滑筋細胞ではET産生を抑制したが、内皮細胞では促進した。また、平滑筋細胞と内皮細胞の産生するET分子種を検討すると、内皮細胞では活性型ETが90%以上を占めるが、平滑筋細胞では不活性なbig ET-1が80%であり、内皮細胞表面のみでbig ET-1からET-1への変換が認められた。

(4) ツニカマイシン処理によりCRLR/RAMP1, CRLR/RAMP3, CRLR/RAMP2発現細胞の細胞膜は、いずれの場合もリガンド結合能が非発現細胞と同程度に低下していた。CRLRの66、118、123番目のアスパラギンをグルタミンに置換した受容体を各RAMPと共発現させた細胞の膜画分において、AM、CGRPのいずれのリガンドについても123番目を置換したものと3箇所全置換したものは、結合能が著減したが、66番目、118番目を置換したものは結合能に変化がなかった。同じ細胞をリガンドで刺激した場合、123番目と全置換

したものは細胞内 cAMP が全く上昇しなかったが、66 番目、118 番目を置換したものは、野生型と匹敵する反応性を示した。また 2 箇所を置換した変異型 CRLR も作製したが、66 番目、118 番目の同時置換変異のみが野生型と同様の反応性を示した。

各変異型 CRLR の N 末端に FLAG のエピトープを付け、RAMP1、RAMP2 と共発現させて膜局在を調べたところ、全置換変異型と RAMP1 では 50%、RAMP2 では 18%が膜に局在し、123 番変異型と RAMP1 では 84%、RAMP2 では 40%の局在を示した。66 番目、118 番目の置換変異型は野生型とほぼ同程度の膜局在であった。

(5) マウス脳の 5 部位・5 齢のプロテオーム解析で、25 の 2-DE 像より 1118 の蛋白スポットを得た。301 ヶを解析した結果、124 の蛋白の配列が得られ、97 の蛋白はデータベース登録済みで、この研究で新しく 27 スポットを追加した。脳部位ごとの比較から 58 の変化スポットが見出され、この内 17 の蛋白を同定し、年齢で変化する 17 スポットを見出し、9つを同定できた。

P53 ノックアウトマウスで発癌した肺のプロテオーム解析では 1008 スポットが得られ、12 スポットは特異的増減を示し、その内 4 個の蛋白を同定できた。脳では 23 の蛋白質スポットの消失と 30 スポットの増加を見出し、その内各々 5 と 7 スポットが同定できた。

正常ヒト血漿プロテオーム解析では約 350 のスポットを得て、その内 72 スポットの蛋白質を同定した。14 人の患者の血漿サンプルの解析から計 240 スポットの同定をし、配列から 175 スポット、抗体との反応より 41 スポットの計 216 蛋白質を同定した。アルツハイマー患者 5 名中 3 人から Apolipoprotein E4 を同定し、その他アルツハイマー関連蛋白質 7 種も同定できた。

ヒドラジンヒドラートを用いる分解は Asn-C 側で特異的に分解し、無水ヒドラジンをを用いた従来法の副反応を十分押さえ、且つ O- 及び N-糖を糖蛋白質から外すことができた。Asp-C の分解反応を 0.2%のペンタフロロプロピオン酸で行うと Thr/Ser のリン酸は約半分、Tyr のリン酸は完全に脱離した。また Thr/Ser-N の切断のチオエステル反応では Tyr のスルホン基を完全に脱離し、C 末端のアミド基も分解した。

4. 考 察

ラット血管内皮細胞、平滑筋細胞を用いてセカンドメッセンジャーであるカルシウム、cAMP、cGMPなどを指標とし、ブタ脳を出発材料として精製を実施した。平滑筋細胞で観測された活性ピークは CGRP、VIP、PACAPとその一部が修飾、酸化あるいは分解して生じたペプチドであったが、本活性測定法の感度、再現性は高く、内因性ペプチドの数パーセント以下のペプチドまで鋭敏に検出できた。活性測定法の有効性は確認できたので、多様な細胞系に本システムを適用し、継続してスクリーニングを行いたい。

これまでの研究より、血管系細胞よりも線維芽細胞が炎症反応のモデルとして適当と判断されたため、今年度はラット新生児の皮膚及び心臓の初代培養線維芽細胞を用いてこれまでの研究成果を検討しところ、従来の細胞株と一致した結果が得られた。皮膚線維芽細胞では IL-1 β と AMによる IL-6 の相乗的増加作用、TNF- α 遺伝子発現抑制作用が確認された。現在多種のサイトカインや成長因子の発現測定システムを作成し検討を続けている。また心臓においても、線維芽細胞と心筋細胞で AMと炎症性サイトカインの IL-6 産生の相乗効果が確認された。興味深いことに心臓内の AM、ET、NO産生の中心は線維芽細胞であり、サイトカインと連携しながら産生を調整する姿が浮かび上がってきた。

最近、栗原らは血管系での AM過剰発現マウスを作成し、このマウスでは血管傷害後の内膜肥厚、臓器傷害、内毒素による死亡率など著しく抑制されることを見出している。これらの現象と AM過剰発現の関係は明確ではないが、状況証拠からは AMの血管拡張作用とともに、NO産生促進、炎症性サイトカイン産生抑制が大きなポイントと考えられる。今後、組織、生体レベルでの AM効果について検討を加えて行きたい。

IgA 腎症患者では尿中 AM量の減少を見出していたが、末梢血単核球でも重症患者で AM遺伝子発現量が減少していた。この結果は、AMが CNP等と共同して腎糸球体のメサンギウム細胞の増殖を抑制しており、その遺伝子発現や産生の減少が結果として増殖促進的な環境が作り、病態形成の原因の一つとなっていると推定された。

平滑筋細胞のET産生量は内皮細胞の10%にすぎないが、大、中血管では無視できない寄与をしていると考えられる。平滑筋細胞と内皮細胞の産生調節が相違すること、分泌分子型も異なること、平滑筋細胞由来ETは内皮細胞表面で初めて活性型に変換されることなどより、両細胞の産生するETの意味は異なると推定され、今後平滑筋細胞由来ETの生理的役割の解明が必要である。

AMとCGRPは同じスーパーファミリーに属すが、通常膜7回貫通型受容体(CRLR)だけでは十分な特異性が発揮されず、新規1回膜貫通型RAMPとの共発現により特異性が決定されると報告されているが、RAMP1,2,3との発現の組合せだけでは説明できない部分も多く、その詳細は不明である。従来よりCRLRの特異性決定にはN末端の細胞外ドメインにある3個所の糖鎖付加が影響することが指摘されているため、その部位と影響について解析した。その結果、CRLRのN末端の細胞外ドメインに存在するアスパラギン結合型糖鎖付加がリガンドの結合に重要であることが証明できた。CRLRの予想される3ヶ所の糖鎖付加部位に置換変異を導入し、リガンド結合能、cAMP産生能を検討した結果、N末端の細胞外ドメインの最もC末端側の123番目のアスパラギン残基の糖鎖付加がリガンドの結合及びシグナル伝達に重要であると結論できた。

プロテオーム解析技術の向上は、発現蛋白に関する包括的ファクトデータ集積とその質的向上に不可欠である。本年度は蛋白スポット同定にN末端からの直接解析以外に、ペプチドマスフィンガープリント自動分析器を用いて分解ペプチドの質量分析による同定を行う方法を一般化した。また蛋白分解には開発したAsp-C等の化学分解をIn-gelで行うことに成功し、さらにリン酸基の位置決定にも幾つか成功した。ヒト血漿の実験では、アルツハイマー病に関しては一応まとまったデータが得られ、さらに抗体を用いて検査技術として使用できる素地を作りつつある。マウス脳のプロテオーム解析は分析数を更に増加させ、組織間での蛋白発現の特性、加齢変化などのデータを完成していく必要がある。次の段階として、使用組織量を一匹当たりの量とし、絶対量の変化についての情報が得られるよう試みたい。P53ノックアウトマウスの例のように、以上の成果を基礎とした応用研究も更に展開して行く予定である。

5. 結 論

新しく確立したセカンドメッセンジャーを指標とする活性測定法が新規ペプチドの検索に向けた感度や有効性を保持することが確認された。現在まで、新規ペプチドの発見には至っていないが、継続した探索を実施する。

AMは血管拡張作用以外に、炎症や動脈硬化発症の調節因子として機能している可能性が高く、内因性の新しい炎症や増殖の抑制メディエーターとして注目される。ETは血管平滑筋細胞からも産生されるが、内皮細胞由来のETとは機能的分担が行われている可能性が高いと推定された。

従来から懸案であったAMとCGRP受容体の特異性決定におけるCRLRの構造と機能の解析を進め、CRLRのN末端部に存在する123番目のアスパラギンへの糖鎖付加が、AMやCGRPの特異的レセプターの機能発現に必須であることがわかった。

プロテオーム解析に役立つ蛋白質の特異的化学分解をAsn-Cについて確立し、修飾基の同定に役立つ反応を見出した。また20 μ Lの少量で検査技術として役立つ方法の開発、構造解析の高感度自動化等の研究を進め、ヒト血漿(老人、アルツハイマーなど)での特異蛋白の検出、マウス脳の部位、加齢での蛋白質発現の特異性、ノックアウトマウスでの蛋白発現の解析などを実施した。

6. 研究発表

① Kubo, A., Nishitani, Y., Minamino, N., Kikumoto, K., Kurioka, H., Nishino, T., Iwano, M., Kangawa, K., Dohi, K. Adrenomedullin gene transcription is decreased in peripheral blood mononuclear cells of patients with IgA nephropathy. *Nephron*, 85, 201-206 (2000)

② Shindo, T., Kurihara, H., Maemura, K., Kurihara, Y., Kuwaki, T., Izumida, T.,

- Minamino, N., Ju, K.H., 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*, 101, 2309-2316 (2000)
- ③Tomoda, Y., Kikumoto, K., Isumi, Y., Katafuchi, T., Tanaka, A., Kangawa, K., Dohi, K., Minamino, N. Cardiac fibroblasts are major production and target cells of adrenomedullin in the heart *in vitro*. *Cardiovasc. Res.*, 49, 721-730 (2001)
- ④Sugo, S., Minamino, N., Shoji, H., Isumi, Y., Nakao, K., Kangawa, K., Matsuo, H. Regulation of endothelin-1 production in cultured rat vascular smooth muscle cells. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 37, 25-40 (2001)
- ⑤Kamitani, S. and Sakata T. Glycosylation of human CRLR at Asn123 is required for ligand binding and signaling, *Biochim. Biophys. Acta.* in press.
- ⑥Nabetani, T., Miyazaki, K., Tsugita, A.: Chemical specific cleavage of asparaginyl peptide bond with a geous hydrozine vapors and its reaction on port-translational modification group, *Protein. Res. Comm. Biochem. Cell Mol. Biol.*, in press
- ⑦Tsugita, A., Miyazaki, K., Nabetani, T., Nozawa, T., Kamo, M., Kawakami, T.: Application chemical selective cleavage methods to analyze post-translational modification in protein. *J. Proteomics*, in press
- ⑧Ueno, I., Sakai, T., Yamaoka, M., Yoshida, R., Tsugita, A. : Analysis of blood plasma proteins in patients of Alzheimer's disease by two-dimensional electrophoresis, sequence homology and immuno-detection. *Electrophoresis*, 21, 1832-1845 (2000)
- ⑨Tsugita, A., Kawakami, T., Uchida, T., Sakai, T., Kamo, M., Matsui, T., Watanabe, Y., Morimasa, T., Hosokawa, K., Toda, T.: Proteome analysis of mouse brain: Two-dimensional electrophoresis profiles of tissue proteins during the course of aging. *Electrophoresis*, 21, 1853-1871 (2000)
- ⑩Araki, N., Morimasa, T., Sakai, T., Tokuoh, H., Ynoue, S., Miyazaki, K., Abe, K., Saya, H., Tsugita, A. Comparative analysis of brain tissue proteins from the p53 deficient mice by two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis*, 21, 1880-1889 (2000)

平成12年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究
重点研究報告書

第2分野

生体機能調節等の解明に関する研究

平成13年11月30日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号

共同ビル（小伝馬町駅前）4F

電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

印刷 株式会社 ソーラン社