

図2 アドレノメデュリンの発見

ヒト褐色細胞腫抽出液の強塩基性ペプチド分画の陽イオン交換(CM)HPLC. 血小板中cAMP増加活性を有したペプチドとして, VIP, CGRP-I, CGRP-IIが最初単離され, アドレノメデュリン(AM)は矢印の小さなピークより発見された.

加を指標とした生理活性ペプチドのアッセイ系が確立できたところに, 4人の褐色細胞腫の患者が続けて入院し, それらの患者さんの協力もあり, 大量の褐色細胞腫の組織を入手することができた. 褐色細胞腫患者からの摘出腫瘍組織の抽出物についても検討したところ, 褐色細胞腫組織では正常副腎髄質(剖検組織)の約5-10倍という顕著なcAMP増加活性を有することが明らかとなった.

褐色細胞腫からのペプチド抽出については, 普通の組織はH₂Oで煮沸するのに対し, 1M酢酸中という酸性条件下で煮沸している. これは, 褐色細胞腫に含まれる大量のカテコールアミンとペプチドが副反応(恐らく酸化的にトリプトファンに反応する)を起こすことを防ぐためである. このことは, 大学院生時代に松尾・寒川研究室でウシ副腎髄質や褐色細胞腫からBAM

ペプチドやアドレノルフィンが発見されるのを見ていて知っていたことでできたことであり, ここでも大学院時代の経験が生かされた.

血小板中cAMP増加活性を強く示すPC組織(140g)を出発材料として, cAMP増加活性ペプチドの系統的検索に取りかかった. 粗ペプチド抽出物をSP-Sephadex(陽イオン交換樹脂)で分離すると, 活性の約90%は強塩基性画分に存在することから, 本画分をSephadex G-50によるゲル濾過で分離し, 分子量約3,000-5,000の領域に溶出された活性画分を更に陽イオン交換HPLCで分離した. その結果, 図2に示すように4つの主要な血小板中cAMP増加活性と多くの小さな活性が認められた. 主要活性ピークのP-1, P-2, P-3について逆相HPLCを繰り返して精製を進め, それぞれ純品として単離した後, シークエンサーによりアミノ酸配列の決

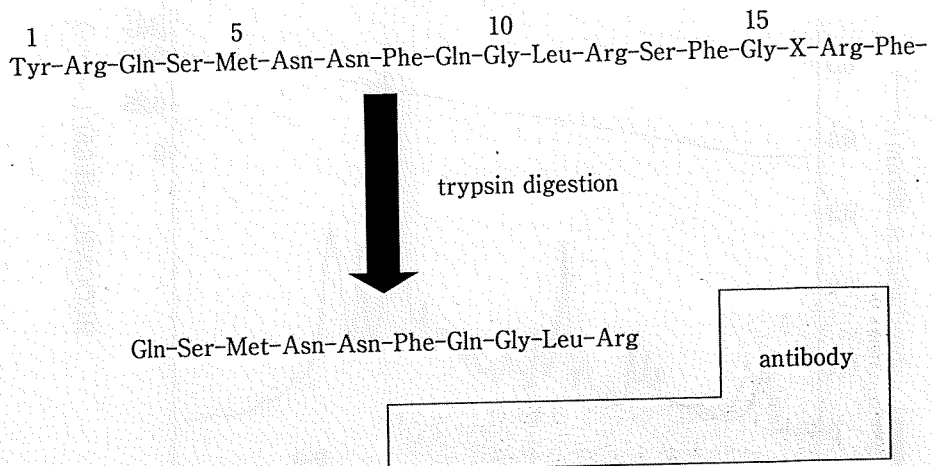


図3 最初に判明したAMのN末アミノ酸配列とトリプシン消化後のRIA

最初に判明したAMの配列はN末より18個のアミノ酸までであった。そのため、この配列をもとにトリプシン消化後にAM[3-12]が生成されることを利用し、AM[3-12]を認識するRIAを確立した。

定を行った。その結果、これらはP-1: vasoactive intestinal peptide (VIP), P-2: calcitonin gene related peptide (CGRP-I), P-3: CGRP-II とすべて既知の生理活性ペプチドであった¹⁾。新たなアッセイを用いたことで、新規ペプチドが発見できることを期待していただけに、既知ペプチドであったことがっかりしたが、これらのペプチドはいずれも強力な血管拡張性の降圧ペプチドとして知られており、本アッセイを用いることにより新しい降圧ペプチドの発見が期待された。引き続き、マイナー活性ピークについても順次単離、構造決定を進めたが、それらについてもVIPやCGRPのMet残基の酸化など既知ペプチドの修飾の結果生じた関連ペプチドであった。そのため、寒川先生からのアドバイスもあり、VIP、CGRPなどのRIAを確立し、VIP、CGRPの免疫活性を示さずに、血小板中cAMP増加活性を示す分画の単離・構造解析を行い、数十種類にも及ぶ既知ペプチドやその関連物質の単離、構造決定を虚仮(こけ)の一心で続けた。そして、強塩基性部に溶出される小さな活性ピークからついに新たな生理活性ペプチドを見いだした(図2)。

c. アドレノメデュリンの構造決定²⁾

しかし、やっとの思いで精製できたペプチドは約140gの褐色細胞腫よりわずか20pmolで

あった。精製ペプチドを気相式シークエンサーで分析したところ、運悪くペプチドシークエンサーのトラブルが発生し、N末より18番目のアミノ酸までしか構造決定できなかった(図3)。この段階で、新しいペプチドの存在が判明したが、18番目までのアミノ酸配列からは既知の生理活性ペプチドとの相同性が全く認められなかった。この時点で心配したこととしては、精製したペプチド自体が血小板中cAMP増加活性を有している場合は問題ないが、精製したペプチドピークに含まれる別の血小板中cAMP増加活性を有した極少量のペプチドが強力な活性を示している可能性を完全には否定できなかった。そこで、判明したアミノ酸配列より、図3で示すようなトリプシン消化後に生ずる10個のアミノ酸からなるペプチドに対するRIAを確立した。本RIAと血小板中cAMP増加活性を指標に、AMを多量に含有していた別の褐色細胞腫40gより再び精製を行い、300pmolのAMを精製することができた。当時は、300pmolでは52残基のペプチドの全構造決定を行うのに決して十分すぎる量ではなかったが、松尾・寒川グループで確立されていた微量ペプチド構造解析法により、アミノ酸分析、還元カルボキシメチル化後のN末端からのアミノ酸配列分析、酵素消化により断片化されたペプチドの配列分析、C末端

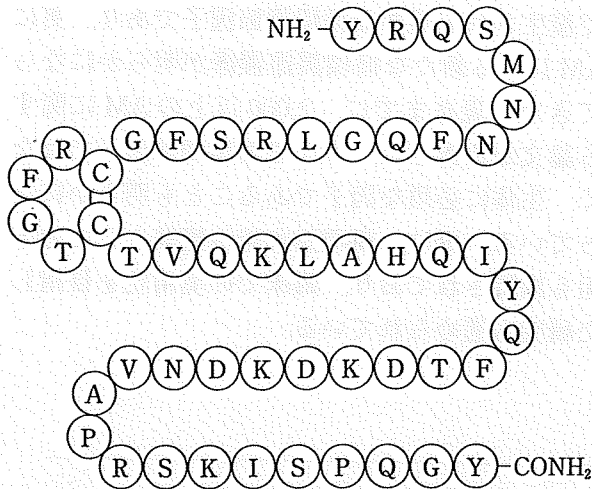


図4 ヒトアドレノメデュリン (AM)の全構造

ヒトAMは52個のアミノ酸よりなるペプチドで6個のアミノ酸よりなるリング構造をもち、C末端はアミド化されている。

部合成ペプチドとの比較によるC末端アミド構造の決定などを行った。このようにして、ついに新規ペプチドの(S-S)結合を含む全構造を決定することができた(図4)。

本ペプチドは副腎髄質由来の褐色細胞腫より発見され、また正常副腎髄質(adrenal medulla)にも高濃度存在することより、アドレノメデュリン(adrenomedullin: AM)と命名された。AMは52個のアミノ酸よりなり、1個のジスルフィド結合をもつ新しい生理活性ペプチドであることが判明した。C末端は他の幾つかの生理活性ペプチドでみられるようにアミド化されていた。

d. AM前駆体の構造とPAMPの発見³⁻⁵⁾

AMの生合成機構や生体内での役割を明らかにするため、AM遺伝子のcDNAクローニングを行い、前駆体の構造を明らかにした。図5に示すように、ヒトAM前駆体は、21個のシグナルペプチドを含む185個のアミノ酸よりなり³⁾、AMのシーケンスの両サイドは典型的なプロセッシングシグナル(LysArgもしくはArgArg)で囲まれていて、C末のTyrに続くGlyはアミドの供与体になると考えられる。また、AM配列のN末端側には生理活性ペプチドの構成性(constitutive)分泌の典型的なプロセッシングシグナルとされているArg-X-Arg-X-X-Argが存在している。このことは後に明らかにされてきたように、AMが副腎髄質などの内分泌組織以外の心血管系をはじめ多くの組織で発現されていることを考えると興味深い事実である。

更に、AMの前駆体には新しい生理活性ペプチドと考えられる興味あるアミノ酸配列が認められた³⁾。シグナルペプチドに続く proadrenomedullin のN末の20個のペプチドは、C末端のArgに続き、Gly-Lys-Argという典型的なアミド化シグナルが認められた。この事実は、N末の20個のペプチドのC末端がArgアミド構造を有した新しい生理活性ペプチドとして生合成される可能性を示唆し、このペプチドを proadrenomedullin N-terminal 20 peptide (PAMP)と命名した。我々は、PAMPをブタ副腎髄質や褐色細胞腫より単離構造決定すること

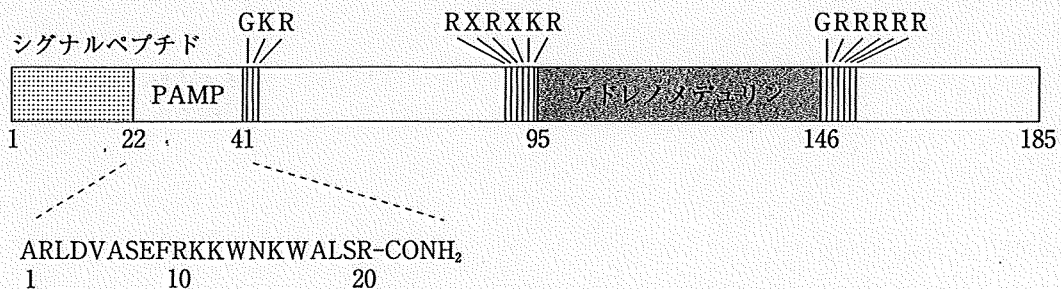


図5 ヒトアドレノメデュリン前駆体の模式図

ヒトAM前駆体は、21個のシグナルペプチドを含む185個のアミノ酸よりなり、AMのシーケンスの両サイドは典型的なプロセッシングシグナル(LysArgもしくはArgArg)で囲まれていて、C末のTyrに続くGlyはアミドの供与体になると考えられる。また、AM以外に、ヒトAM前駆体(proadrenomedullin)のN末の20個のペプチドは、C末端がArgアミド構造を有したペプチドとして生合成され、proadrenomedullin N-terminal 20 peptide(PAMP)と命名した。

で、生体内での存在を明らかにした^{4,5)}。また、PAMPも降圧活性を有したペプチドであることが判明したが、降圧の機序はAMとは異なることが明らかになり、両ペプチドが協調して生体内調節に関与している可能性が示唆されている。

おわりに

AMは副腎髄質由来の褐色細胞腫より発見されたが、その後の研究により、AMは心血管系

で産生される重要な循環調節因子であり、更にAMによる新たな循環調節機構が明らかになってきた。現在までに、2,000以上のAMに関する論文が報告され、単なる循環調節因子ではなく、生体に必須な因子であることも明らかになっている。更に、循環器疾患治療薬としての応用も期待されており、臨床での実用化を目指した研究も進められている。

■ 文 献

- 1) Kitamura K, et al: Isolation and characterization of peptides which act on rat platelets, from a pheochromocytoma. *Biochem Biophys Res Commun* 185: 134-141, 1992.
- 2) Kitamura K, et al: Adrenomedullin: a novel hypotensive peptide isolated from human pheochromocytoma. *Biochem Biophys Res Commun* 192: 553-560, 1993.
- 3) Kitamura K, et al: Cloning and characterization of cDNA encoding a precursor for human adrenomedullin. *Biochem Biophys Res Commun* 194: 720-725, 1993.
- 4) Kitamura K, et al: Identification and hypotensive activity of proadrenomedullin N-terminal 20 peptide (PAMP). *FEBS Lett* 351: 35-37, 1994.
- 5) Kuwasako K, et al: Human proadrenomedullin N-terminal 20 peptide (PAMP) in pheochromocytoma and normal adrenal medulla. *Biochem Biophys Res Commun* 211: 694-699, 1995.

1-j

話題のホルモン・受容体・酵素：最近の知見から

アドレノメデュリン(AM), PAMPとその受容体

北村和雄 (宮崎大学医学部内科学講座循環体液制御学分野)

Introduction

アドレノメデュリン(adrenomedullin; AM)は1993年に褐色細胞腫組織より発見された強力な血管拡張性の降圧作用を有する生理活性ペプチドであり、降圧系の重要な循環調節因子の1つであることが明らかになってきた。AMは副腎髄質以外にも心血管系組織を含め、生体内の幅広い組織で生合成されている。AMの作用としては、降圧作用以外にも、レニン・アルドステロン分泌抑制、ナトリウム利尿、心筋細胞肥大抑制、抗酸化、臓器保護作用などの多彩な作用を有している。AMの受容体に関しては、7回膜貫通型受容体である calcitonin receptor like receptor (CRLR) と receptor activity modifying protein 2 (RAMP2) および RAMP3 が共発現することで AM 受容体を形成する。

一方、AM前駆体からは proadrenomedullin N-terminal 20 peptide (PAMP) が別の生理活性ペプチドとして生合成される。AMとPAMPともに降圧作用を示すが、両ペプチドの作用機序は異なっており、共通の前駆体から生合成される2つのペプチドが協調して循環調節などに関与していると考えられる。

AMは血中にも存在しており、心不全、高血圧・腎不全、敗血症性ショックなどの患者では血中AM濃度が疾患の重症度に従って上昇していることが明らかになっている。これらの疾患においては、AMは降圧系の循環調節因子として作用するばかりではなく、抗炎症・臓器保護因子としての役割も果たしていることが示唆されている。さらに急性心筋梗塞などの疾患モデル動物では合成AM投与により、病態が改善することが示されており、AMが新しい医薬品として開発できる可能性が示唆されている。

アドレノメデュリン(AM)と PAMPの構造、分布、遺伝子

AMはヒト褐色細胞腫組織から発見された強力な血管拡張性ペプチドであ

り、特徴として分子内に6個のアミノ酸よりなるリング構造とC末端のアミド構造を有している(図1)^{1,2)}。ヒトAMは52個のアミノ酸よりなり、calcitonin gene related peptide (CGRP) やアミリンと

一部相同性を有し、1つのファミリーを構成している(図2)。最近、遺伝子側から検索することで、

AMに続くアドレノメデュリン2 (AM2) / intermedin (ITM) の存在が明らかにされた^{3,4)}。遺伝子構造から推定される

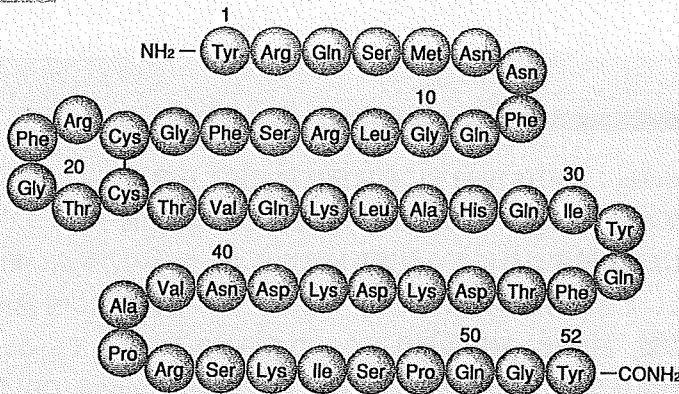
ヒトAM2/ITMの構造は、47個のアミノ酸からなり、AMと同様に6個のアミノ酸よりなるリング構造があり、C末はアミド化されている(図2)。AMとの構造上の相同性はそれほど高くなく、約25%である。今後、AM2の生体内での役割を明らかにすることで、AM研究の新たな展開が期待される。

AMはヒト副腎由来の褐色細胞腫から発見されたが、心房、心室、肺、腎臓などの組織にも副腎に匹敵するmRNAを認める(図3)。特に、血管内皮・平滑筋細胞での遺伝子発現は副腎を凌駕する。このほか、脳内や多くの末梢組織にも存在しており、AM mRNAの体内分布は実に広範である。

ヒトAMの前駆体の構造は、図4に示すように21個のシグナルペプチドを含む185個のアミノ酸よりなる⁵⁾。AM配列の両サイドは典型的なプロセッシングシグナル(LysArgもしくはArgArg)で囲まれていて、C末のTyrに続くGlyはC末端アミド構造の供与体になると考えられる。

AMの前駆体には新しい生理活性ペ

ヒトAM



ヒトPAMP

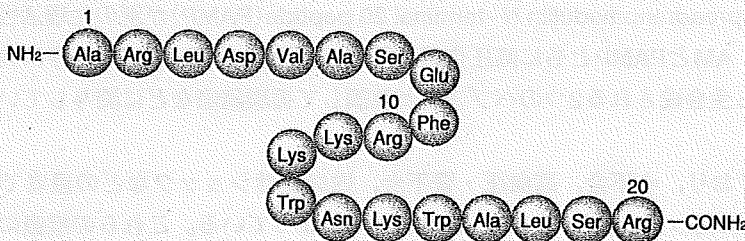


図1 ヒトアドレノメデュリン(AM)と proadrenomedullin N-terminal 20 peptide(PAMP)のアミノ酸配列(文献2より引用)

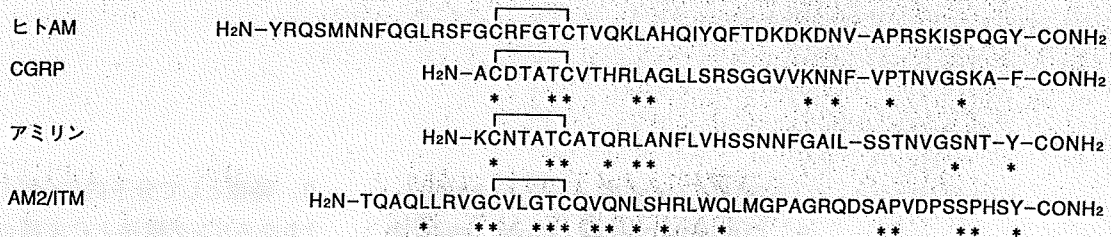


図2 ヒトアドレノメデュリン(AM)、CGRP、アミリン、アドレノメデュリン(AM)2 /intermedin(ITM)のアミノ酸配列の比較(文献5より改変引用)

* : ヒトアドレノメデュリンと共通のアミノ酸を示す。
□ : 6個のアミノ酸よりなるリング構造。

プチドと考えられる興味あるアミノ酸配列が認められた⁵⁾。シグナルペプチドに続く proadrenomedullin のN末の20個のアミノ酸からなるペプチドは、C末端がArgアミド構造を有した新しい生理活性ペプチドが proadrenomedullin よりAMとは別に生合成されることが明らかとなり、このペプチドはPAMPと命名された(図1, 4)。

ヒトAM遺伝子は11番染色体短腕上に存在し、プロモーター領域には転写調節因子の結合部位が数多く存在する⁵⁾(図4)。転写開始点近傍の activator protein (AP) -2の結合部位の集団(-68, -33bp)や核内因子-インター

ロイキン6(NF-IL6)の結合部位(-93, -85bp)の存在は、AP-2とNF-IL6が血管内皮のAM遺伝子を制御する重要な転写因子であることをうかがわせる。特に、NF-IL6は炎症の誘導物質(リポ多糖や腫瘍壊死因子、IL-1など)によって活性化され、これらの多くが血管内皮・平滑筋細胞でのAM産生を強力に促進する。

AMの作用

AMには多彩な作用が明らかにされたが、その特徴的な作用は強力な降圧

作用である。AMを麻酔下ラットに単回静注すると、30~60分間持続する強力な血管拡張を伴った降圧が観察される¹⁾。AMの心拍出量増加作用はAMが心臓に直接作用している可能性も考えられている。さらに、培養心筋細胞を用いた研究から、AMはアンジオテンシンIIによる心筋蛋白合成能の活性化を著明に抑制し、アンジオテンシンIIによる心筋肥大を抑制する作用があることが示唆されている⁶⁾。

AMは腎動脈に投与したとき、強力な水・ナトリウム利尿作用を示す。また、AMは副腎皮質からのアルドステロン分泌抑制作用、ラット下垂体前葉からの

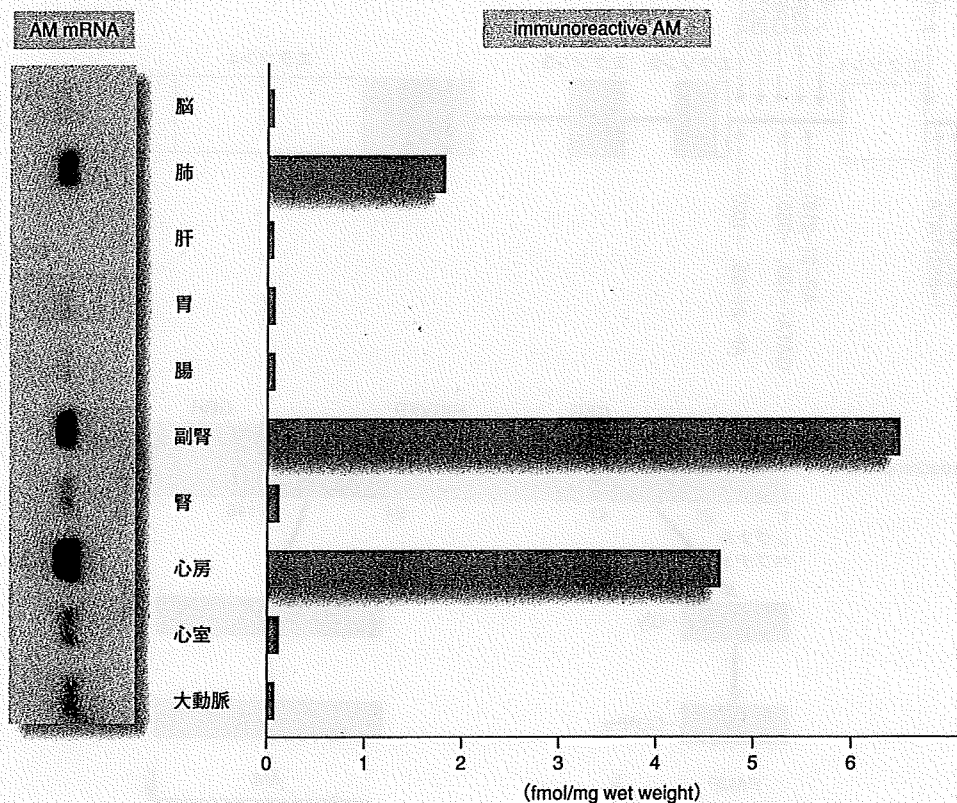


図3 ラット各組織のAMの濃度(右)と遺伝子発現(左)(文献5より引用)

副腎皮質刺激ホルモン(adrenocorticotrophic hormone ; ACTH)分泌抑制作用を有す。さらに、覚醒ラットの脳室にAMを投与すると、飲水行動の抑制、塩分摂取行動の抑制、バソプレシンの分泌抑制などが報告されている。このように、AMは末梢性にも中枢性にも水・電解質バランスの調節に関与している可能性がある。

現在までに明らかにされているAM

の作用を昇圧因子であるアンジオテンシンⅡと比較してみると、AMのほとんどの作用はアンジオテンシンⅡに拮抗することがわかる(表1)⁶⁾。AMがアンジオテンシンⅡに拮抗する内因性因子として、心臓・腎臓疾患における病態に重要な役割を果たしていることが予想される。

AM受容体

AMとCGRPは、産生部位や作用部位は異なるが、生理作用は類似しており、またAM作用の一部はCGRPアンタゴニストであるCGRP(8-37)でブロックされることから、AM受容体には独自の受容体とともにCGRPと共通の受容体が存在するものと推定されていた。その後、AM受容体に関しては、

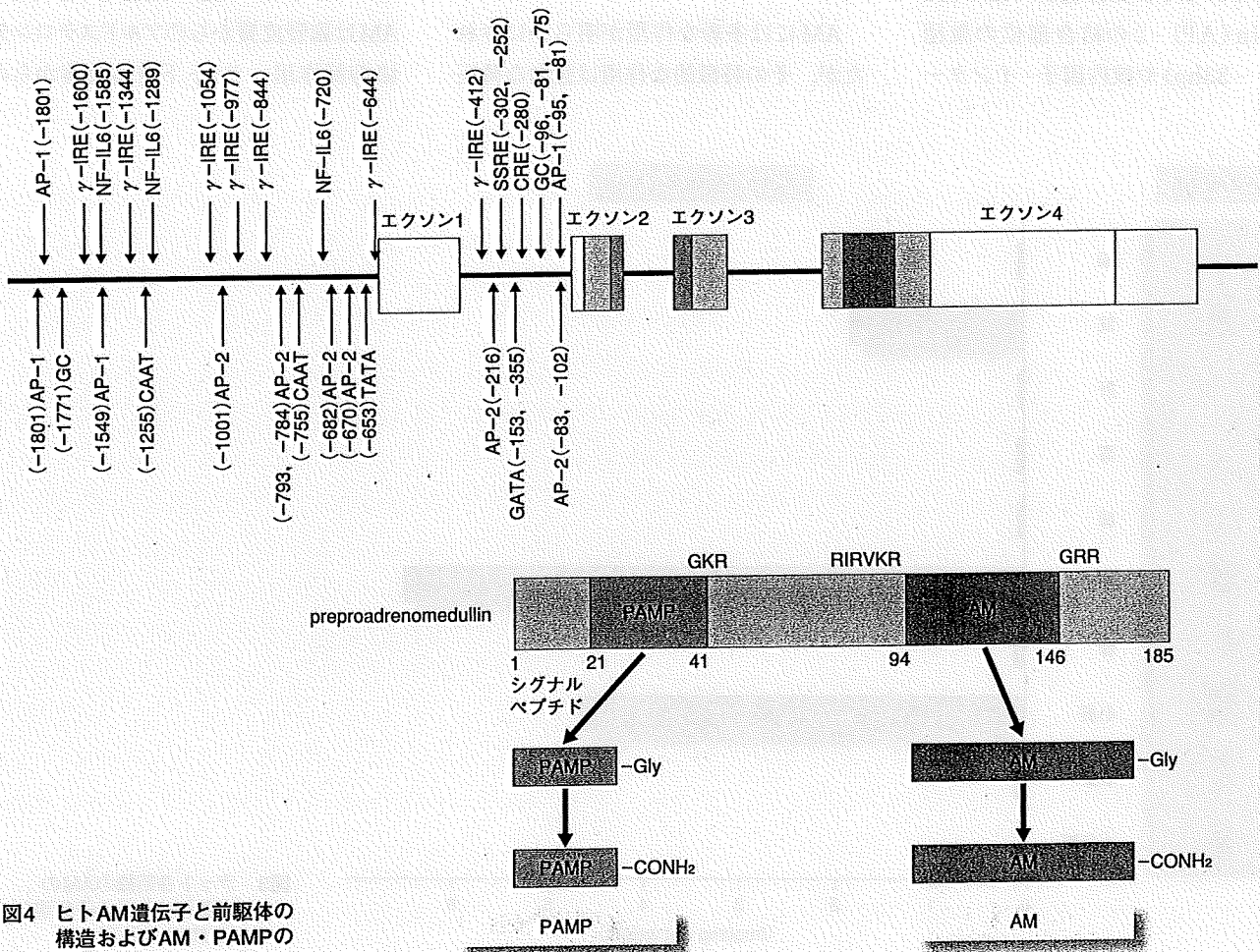


図4 ヒトAM遺伝子と前駆体の構造およびAM・PAMPの生合成(文献5より引用)

AMとCGRPが受容体としてCRLRという7回膜貫通G蛋白共役型受容体を共有することが明らかにされた^{7,8)}。AMとCGRPに対する特異性は、1回膜貫通型のRAMPとよばれる膜蛋白により規定され、RAMPがなければCRLR自体も膜表面に移行せず活性も示さない(図5)。RAMPにはRAMP1-3の相互に相同性を有する3種類の蛋白の存在が明らかにされており、CRLR + RAMP1でCGRPの、CRLR + RAMP2またはCRLR + RAMP3でAMの受容体を形成する。

さらに、どのRAMPもカルシトニン受容体2(CTR2)をAM受容体として機能させることが明らかになった。CTR2をHEK-293細胞に遺伝子導入したときのAMによるcAMPの反応性は弱い

が、各RAMPと共発現させると、比較的高い反応性を示す⁸⁾。しかし、カルシトニンの反応性は増強しない。CTR2はCRLRと異なり、単独でも細胞膜に発現できるが、単体の場合、AMの反応性は低い。このAMの反応は、AM(22-52)やCGRP(8-37)で抑制され

ず、カルシトニン拮抗薬のsalmon calcitonin (sCT) (8-32)で抑制される。

以上のように、RAMP・CRLR複合体やRAMP・CTR2複合体がAM受容体として機能しうることが示されている。

表1 アドレノメデュリンとアンジオテンシンⅡの作用の比較(文献6より引用)

	アドレノメデュリン	アンジオテンシンⅡ
血管	平滑筋弛緩 増殖抑制	平滑筋収縮 増殖促進・肥大・過形成
心臓	肥大抑制	肥大促進
腎	ナトリウム利尿	ナトリウム再吸収
アルドステロン	分泌抑制	分泌促進
バソプレシン	分泌抑制	分泌促進
飲水行動	抑制	促進
カテコラミン	分泌抑制	分泌促進
血圧	低下	上昇
体液量	減少	増加

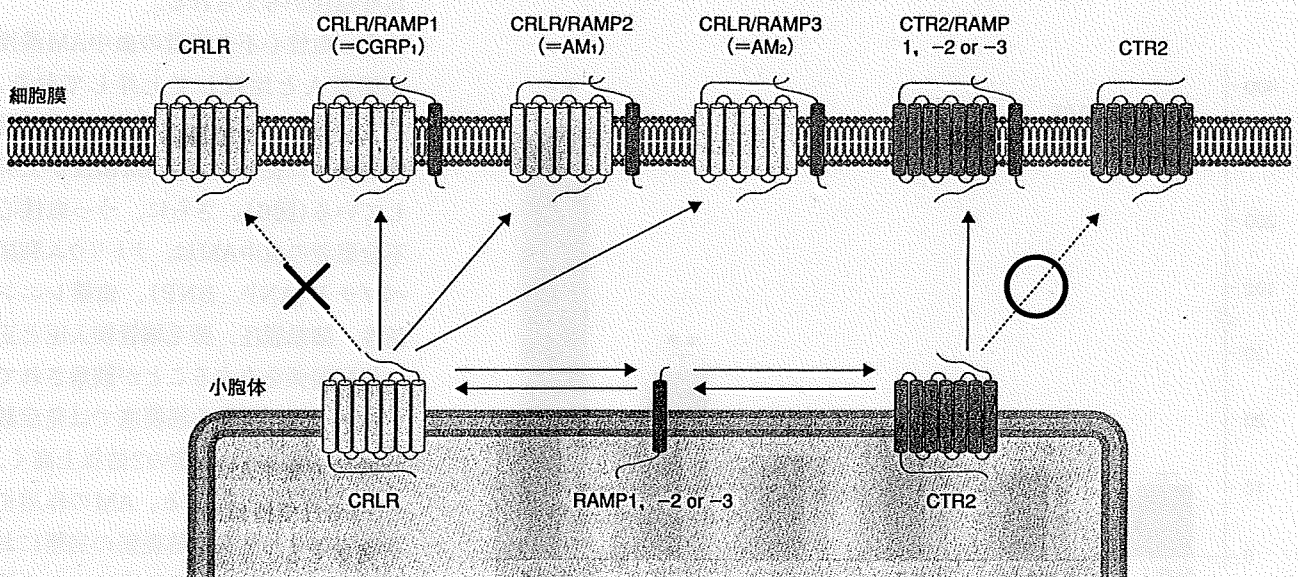


図5 AMが作用する受容体複合体(CRLR/RAMPおよびCTR2/RAMP)形成の模式図(文献8より引用)

生体内ではRAMP, CRLR, CTR2が重複して発現していることが多く、受容体レベルでもAM作用を制御していることが示唆され、今後これらの特色ある受容体の役割を解明することで、AMの多彩な作用や作用機序が明確になると期待されている。

PAMP

PAMPもAMと同じく副腎髄質や心房に高濃度に存在しているが、肺や腎臓でのPAMP濃度は低値である。PAMPを麻酔下ラットに投与すると速やかで強力な降圧活性が認められるが、持続時間はAMと比較して短時間である。PAMPは摘出血管には作用せず、PAMPの降圧機序として交感神経末梢からのカテコラミン放出抑制作用が報告されてい

る⁹⁾。これらのことからAMとPAMPという共通の前駆体から生成されたペプチドが異なる機序で降圧活性を示し、協調して循環調節に関与していると考えられる(図1)。PAMP受容体に関しては、cortistatin受容体のMrgX2がPAMP受容体として反応するとの報告¹⁰⁾もあるが、MrgX2が生体内でPAMP受容体として機能しているかどうかは不明である。

PAMPの作用に関しては、降圧作用以外にも多彩な作用を示すことが報告されている。副腎皮質に対しては、アンジオテンシンIIによるアルドステロンの分泌を抑制することが報告されている。また、下垂体のACTHの基礎分泌を濃度依存性に抑制することが報告されている。さらに、PAMPはきわめて強力な血管新生因子であることが示された¹¹⁾。PAMPの血管新生作用

はきわめて強力であり、血管新生を利用した血管閉塞性疾患の治療薬として臨床応用の可能性が指摘される一方、癌の増殖を促進する可能性も示唆されている。

AMの臨床的意義と臨床応用の可能性

ヒト血中にはAMが循環しており、各種疾患で血中濃度と病態との関連が検討されている¹²⁾。本態性高血圧症患者の血中AM濃度は、正常血圧者と比較して高値であることが示されており、さらに、臓器障害が進行するにしたがって、血中AM濃度が増加している。AMは高血圧症で重症度とともに増加し、増加したAMは降圧および臓器保護因子としての役割を果たしている可能性が考えられる。

うっ血性心不全患者の血中AM濃度が健常人と比較して上昇しており、ニューヨーク心臓協会(NYHA)の重症度が増すに従って血中AM濃度が上昇している(図6)。さらに、うっ血性心不全患者の血中AMは、ナトリウム利尿ペプチド(ANP, BNP)、血漿レニン活性、肺動脈圧、肺毛細管楔入圧と正の相関関係を有することが観察されている。一方、急性心筋梗塞では発症数時間で血漿AMは正常の2倍以上高く、2~3日で極値に達する。AMの作用を考慮すると、急性心筋梗塞の病態においてはAMが末梢血管抵抗減少や心筋を保護する方向に働いていると考えら

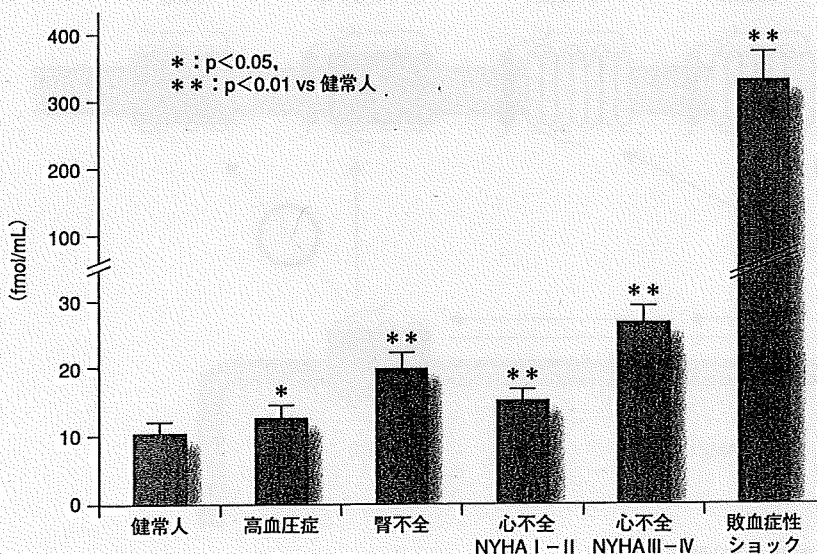


図6 各種疾患における血中AM濃度(文献12より引用)

れる。実際、急性心筋梗塞モデル動物へのAM投与の有用性が示されており、臨床での実用化も期待されている¹³⁾。

血中AMが著明に増加する病態としてエンドトキシン・ショックが注目されている(図6)。敗血症性ショック患者のAMの血中濃度は健常成人の血中濃度に比べて著明に増加しており、100倍以上になる症例もみられる。一方、同様に血圧低下を示す出血性ショック、心原性ショックなどでも血

中AMは上昇しているが、健常成人の数倍程度であり、AMが敗血症性ショックの病態に、ほかのショックより深くかかわっていることを推測させる。敗血症性ショックでのAMの意義については、AMが敗血症性ショック動物モデルの臓器障害を軽減させて死亡率を改善することが示されており、増加した内在性AMが抗炎症・臓器保護物質として作用していることが示唆される。



AMとPAMPは共通の前駆体から合成される降圧系の因子として、多彩な機能を有するきわめて重要な生理活性ペプチドであることがわかり、AMとPAMPによる新たな生体内調節機構が存在することが明らかとなった。今後はAMとPAMPを臨床に応用するためのトランスレーショナルリサーチの進展が期待される。

■ 文献

- 1) Kitamura K, Kangawa K, Kawamoto M, et al: Adrenomedullin: a novel hypotensive peptide isolated from human pheochromocytoma. *Biochem Biophys Res Commun* 192: 553-560, 1993.
- 2) 北村和雄, 寒川賢治: アドレノメデュリンとPAMP. 「わが国における循環調節ペプチド・因子研究のサクセスストーリー」(早藤弘, 編). 日本臨床社, 東京, 1999, p41-53.
- 3) Takei Y, Inoue K, Ogoshi M, et al: Identification of novel adrenomedullin in mammals: a potent cardiovascular and renal regulator. *FEBS Lett* 556(1-3): 53-58, 2004.
- 4) Roh J, Chang CL, Bhalla A, et al: Intermedin is a calcitonin/CGRP family peptide acting through the CRLR/RAMP receptor complexes. *J Biol Chem* 279(8): 7264-7274, 2004.
- 5) Kitamura K, Kangawa K, Eto T: Biochemistry of adrenomedullin. in "Adrenomedullin in cardiovascular disease" (Nishikimi T, ed). Springer, New York, 2005, p1-16.
- 6) 北村和雄: アドレノメデュリンの循環器系における役割. *循環器科* 57: 134-140, 2005.
- 7) Mclatchie LM, Fraser NL, Main MJ, et al: RAMPs regulate the transport and ligand specificity of the calcitonin-receptor-like receptor. *Nature* 393: 333-339, 1998.
- 8) 桑迫健二, 北村和雄: アドレノメデュリン受容体の薬理学的特徴および病態生理学的意義. *分子心血管病* 6: 471-478, 2005.
- 9) Shimosawa T, Ito Y, Ando K, et al: Proadrenomedullin NH(2)-terminal 20 peptide, a new product of the adrenomedullin gene, inhibits norepinephrine overflow from nerve endings. *J Clin Invest* 96(3): 1672-1676, 1995.
- 10) Kamohara M, Matsuo A, Takasaki J, et al: Identification of MrgX2 as a human G-protein-coupled receptor for proadrenomedullin N-terminal peptides. *Biochem Biophys Res Commun* 330: 1146-1152, 2005.
- 11) Martinez A, Zudaire E, Portal-Nunez S, et al: Proadrenomedullin NH2-terminal 20 peptide is a potent angiogenic factor, and its inhibition results in reduction of tumor growth. *Cancer Res* 64: 6489-6494, 2004.
- 12) 北村和雄, 江藤胤尚: アドレノメデュリン. 広範囲血液・尿化学検査 免疫学的検査 その数値をどう読むか. *日本臨床* 63: 592-594, 2005.
- 13) 加藤文司, 芦塚伸也, 鶴田敏博, 桑迫健二, 北村和雄: アドレノメデュリンの基礎と新たな可能性. *循環器科* 64: 448-455, 2008.

VI. 遺伝子研究

原因候補遺伝子

アドレノメデュリン遺伝子

Adrenomedullin gene

桑迫健二¹ 加藤丈司¹ 北村和雄²**Key words** : アドレノメデュリン, 遺伝子発現, 高血圧, CAリピート, 単一塩基変異多型(SNP)

はじめに

高血圧や炎症, 低酸素(虚血)などによって誘導された種々の転写因子が, アドレノメデュリン(AM)ゲノム遺伝子のプロモーター領域に結合すると, AMのmRNA発現が亢進する¹⁾. AMのmRNAは中枢から末梢まで広く発現し, 受容体(2種)の発現分布ともおおよそ一致するため, 局所で産生分泌されたAMは主にオートクリン・パラクリン因子として多彩な臓器保護効果を発揮する¹⁻³⁾. 肥満は高血圧やインスリン抵抗性を惹起し, 更にはこれらの合併症を招く. 最近, AMは脂肪細胞からアクティブに分泌されるアディポカインとしても注目されており, 少なくとも3種の転写因子が脂肪細胞でのAM発現調節に関与していることが判明した^{4,5)}.

本稿では, AM遺伝子の発現調節機構を中心に最新の知見を交えながら概説する.

1. AM mRNAの体内分布

AMはヒト副腎由来の褐色細胞腫から発見されたが⁶⁾, 心房, 心室, 肺, 腎臓などの組織にも副腎に匹敵するmRNAを認める. 特に, 血管内皮・平滑筋細胞での遺伝子発現は副腎を凌駕する. このほか, 脳内や多くの末梢組織にも低発現しており, AM mRNAの体内分布は実に広範

である. 血管内皮・平滑筋細胞をはじめ多くの主要な細胞がAMのmRNA量と連動してペプチドを分泌することから, AMの分泌は主に遺伝子発現レベルで制御されていると考えられる.

2. AMゲノム遺伝子の構造解析と転写調節機構

ヒトAMゲノム遺伝子(11番染色体短腕上に分布)のプロモーター領域には, 転写調節因子の結合部位が数多く存在する^{1,4)}. ヒト大動脈由来内皮細胞では, 転写開始点の近傍に存在するAP-2の結合部位の集団(-68~-33bp)とNF-IL6の結合部位(-93~-85bp)が欠失すると, AM遺伝子の転写活性は大幅に減少する. それゆえ, AP-2とNF-IL6はヒト血管内皮のAM遺伝子を制御する重要な転写因子である. AP-2はホスホリパーゼCやプロテインキナーゼCによって活性化される. 一方, NF-IL6は炎症の誘導物質(リポ多糖や腫瘍壊死因子, IL-1など)によって活性化され, これらの多くが血管内皮・平滑筋細胞でのAM産生を強力に促進する.

マウス線維芽細胞に由来する3T3-L1前駆脂肪細胞(preadipocyte)の初期分化ではAMとAM₁受容体(後述)のmRNA発現が低下するが, 分化が進むにつれ両者の発現は増加する⁷⁾. 別

¹Kenji Kuwasako, Johji Kato: Frontier Science Research Center, University of Miyazaki 宮崎大学 フロンティア科学実験総合センター 生命科学研究部門 生理活性物質探索分野 ²Kazuo Kitamura: Circulation and Body Fluid Regulation, Faculty of Medicine, University of Miyazaki 宮崎大学医学部 内科学講座 循環体液制御学分野

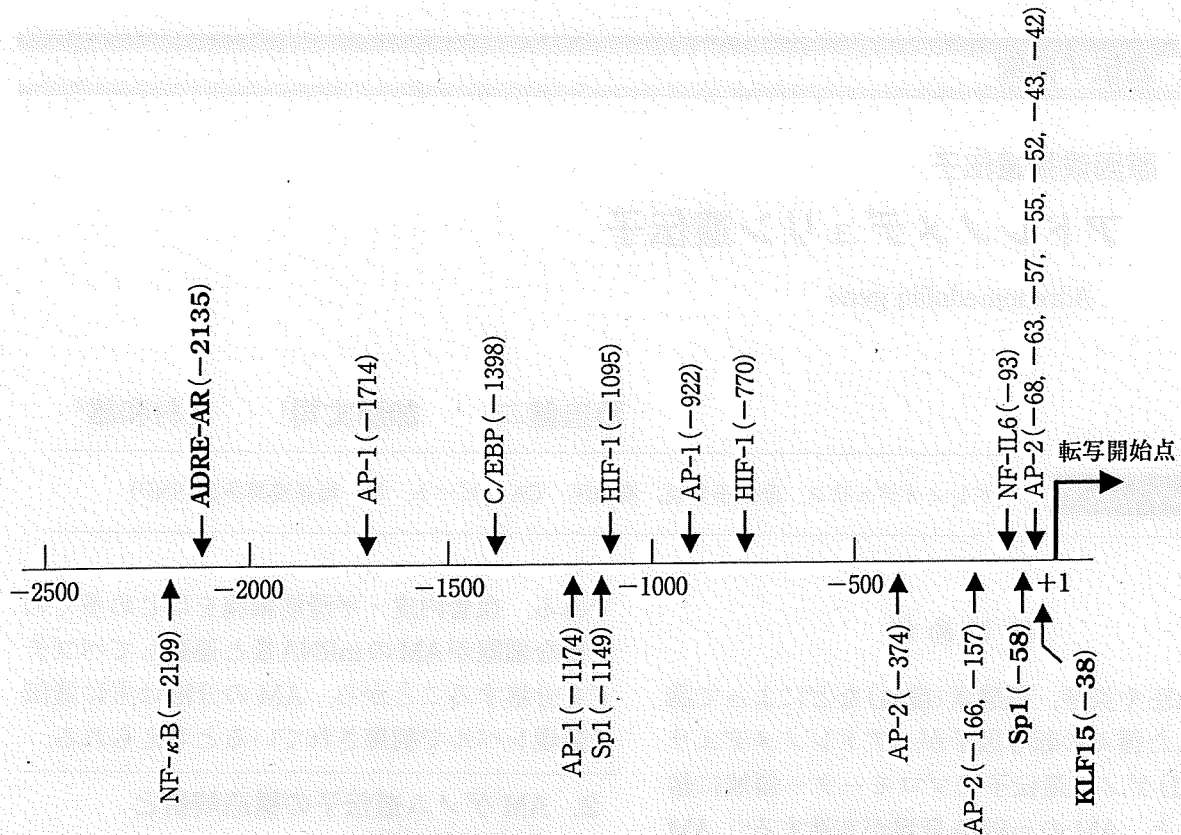


図1 ヒトAMゲノム遺伝子のプロモーター領域に認められる
主な転写調節因子結合部位(文献⁴⁾より改変)

()内の数字はコンセンサスシーケンスの始めの塩基の番号を意味する。図に示す以外にも数多くの転写調節因子(cAMP反応性要素やシアーストレス反応性要素など)の結合部位が存在する。

NF- κ B: nuclear factor- κ B, ADRE-AR: adipocyte differentiation-related regulatory element for AM gene repression, Sp1: stimulating protein 1, AP-1: activator protein 1, AP-2: activator protein 2, HIF-1: hypoxia-inducible factor-1, NF-IL6: nuclear factor for interleukin-6 expression, C/EBP: CCAAT/enhancer binding protein, KLF15: Krüppel-like factor 15.

の前駆脂肪細胞でも同様な所見がみられ、外因性のAMはこの細胞の分化を促進する⁶⁾。しかしながら、3T3-L1脂肪細胞(adipocyte)の分化初期にはAM発現は低下しない⁴⁾。高橋らはヒトAMゲノム遺伝子の欠失体を分化初期の3T3-L1前駆脂肪細胞に導入し、-2135~-2100の領域の欠失によりAM発現が著明に低下することを見いだした⁴⁾。この領域に結合する転写因子は未知である可能性が高く、adipocyte differentiation-related regulatory element for AM gene repression(ADRE-AR)と命名された⁴⁾。ある抑制因子がADRE-AR結合タンパクに作用するとAM発現が低下する機序が想定されている。ADRE-ARには(G/A)AAA配列が3カ所存在

(5'-GAAATGAAAGTAAAA-3')し、この15の塩基からなる配列はマウスと同一である⁴⁾。一方、ヒト間葉系骨髄細胞由来の脂肪細胞の初期分化ではAMのmRNA発現が亢進しており、ヒトAMゲノム遺伝子の-58~-39に結合するSp1によって制御されていることが判明した⁴⁾。この転写因子はほかのアディポカイン(レプチンやレジスチン、アディポネクチンなど)の発現も誘導する。ごく最近、転写因子のKLF15がヒトAMゲノム遺伝子のプロモーター領域の-38~-34(CACCC配列)に結合して、AMの発現を低下させることがわかった⁵⁾。この現象は3T3-L1の前駆脂肪細胞と脂肪細胞の両方で観察される。食事性や遺伝性(*ob/ob*)の肥満マ

表 1 各種病態での AM と受容体 (CRLR/RAMP 複合体) の mRNA 発現の変化および AM の役割

病態	対象		AM	CRLR	RAMP2	RAMP3
敗血症	ラット (+リポ多糖)	肺	↑	↓	↓	↑
		大動脈	↑	ND	ND	ND
高血圧	ラット (+脳卒中)	左心室	↑	↑	↑	ND
心筋梗塞	ラット (+左冠動脈結紮)	左心室	↑	ND	↑	ND
		心房	↑	↑	↑	ND
		心室	↑	↑	↑	ND
		左心室	↑	↑	↑	↑
心不全	ラット (+圧負荷)	左心室	↑	↑	↑	↑
	ラット (+容量負荷)	左心室	↑	↑	↑	→
		腎臓	↑	→	→	→
心筋症	ラット (+イソプロテレノール)	心臓	↑	ND	↑	ND
腎症	ラット (+片側尿管結紮)	患側腎	→	↑	↑	→
食塩負荷	ラット (+8% 食塩)	副腎	↑	↑	↑	→
		腎臓	↑	↑	→	↑
肥満	ラット (+高脂肪食)	内臓脂肪	↑	↑	↑	ND
		皮下脂肪	→	→	→	ND

AM: アドレノメデュリン, CRLR: カルシトニン受容体様受容体, RAMP: 受容体活性調節タンパク, ND: 未測定.

ウスの脂肪組織では, KLF15 発現の低下と AM 発現の増加が確認されている. このように, 脂肪細胞には AM の発現を制御する複数の機序が存在する.

3. 各病態での AM と受容体の mRNA 量の変化および AM の役割

各組織の AM はその mRNA 量に連動して分泌され, 主にオートクリン・パラクリン因子として 2 つの AM 受容体に作用する. 受容体活性調節タンパク (RAMP) がカルシトニン受容体様受容体 (CRLR) を細胞膜に輸送すると AM 受容体 (CRLR/RAMP2 複合体 = AM₁ 受容体および CRLR/RAMP3 複合体 = AM₂ 受容体) が形成される⁹⁾. 動物の種を問わず, AM の特異性が高いのは AM₁ 受容体である²⁾.

表 1 に示すように, AM は循環系や内分泌代謝系の多くの病態で発現が亢進している²⁾. 体内の AM が著明に増加する敗血症以外の病態で, AM 受容体の発現も亢進していることから, AM と受容体はこれらの病態を是正する方向に機能していると考えられる. 敗血症において, 多くの臓器の AM₁ 受容体が down-regulation する中, 肺や脾臓, 胸腺などの免疫系の臓器では

RAMP3 発現が亢進している. 容量負荷による心不全や片側尿管結紮による腎症において, 各 AM 受容体の発現変化は異なる. 食塩負荷による同一モデルでも副腎と腎臓における各受容体の発現変化は異なる. したがって, 各々の AM 受容体の役割は, 病態や臓器によって異なっていると考えられる.

酸化ストレスを強力に抑制してインスリン抵抗性を改善させる AM は脂肪細胞からもアクティブに分泌され, その血中濃度が肥満患者の body mass index に比例して増加することから, 新たなアディポカインとして注目されている. ラットに高脂肪食を摂取させると, 内臓脂肪での AM と AM₁ 受容体の mRNA 発現は著明に増加するが, 皮下脂肪では増加しない⁷⁾. しかも, 大動脈や腎臓, 心臓, 肝臓での AM 発現は有意に減少する⁷⁾. それでも血中の AM は有意に増加することから, 内臓脂肪で AM の果たす役割は大きいと考えられる. ごく最近, AM は脂肪細胞の分化のみならず脂肪分解も促進することが明らかになった⁸⁾. 脂肪分解作用はプロテインキナーゼ A と ERK に依存している. イソプロテレノールもプロテインキナーゼ A 依存性に脂肪分解を促進するが, ERK には依存しない. 更

各病態でのAMの役割

- ・多臓器保護
- ・心筋の肥大と間質の線維化を抑制
- ・心筋のアポトーシス/酸化ストレス/リモデリングを抑制
- ・血管新生と骨髄細胞の動員を促進
- ・心筋収縮性と心拍出量を促進
(心筋酸素消費量の増大(-))
- ・ナトリウム利尿
- ・心肥大と線維化を抑制
- ・細胞増殖と線維化を抑制
- ・アルドステロン分泌を抑制
- ・ナトリウム利尿
- ・脂肪細胞の分化/脂肪分解/糖取り込みを促進

(文献⁹⁾より改変)

に、AMはPI3K/Aktを介して脂肪細胞内への糖の取り込みを促進させることが明らかになった⁸⁾。

4. AMとAM受容体構成タンパクの遺伝子欠損マウスでの検討

AM前駆体からはAM以外に、もう一つの生理活性ペプチドのPAMP(proadrenomedullin N-terminal 20 peptide)が生合成される¹⁾。PAMPは降圧や血管新生を惹起する。AMとPAMPの遺伝子をダブルで欠損させると、ホモ接合体マウスは胎生致死(死因は胎児水腫)となり、ヘテロ接合体では血圧が約10mmHg上昇する¹⁰⁾。AM遺伝子を単独欠損させると、ホモ接合体は胎生致死となるが、リンパ管系や血管系の異常は認められず、ヘテロ接合体の血圧上昇もみられない¹¹⁾。

AMに最も特異的な受容体の構成タンパクであるCRLRとRAMP2の遺伝子をそれぞれ単独欠損させたホモ接合体マウスでは、いずれも胎生致死で、リンパ管新生の著明な低下がみられる¹²⁾。実際、*in vitro*では、AMはERKを活性化

してリンパ管内皮細胞を増殖させる¹²⁾。しかしながら、CRLRはRAMP1とともにカルシトニン遺伝子関連ペプチド受容体を形成し⁹⁾、RAMP2はCRLR以外の複数の受容体にも作用するため¹³⁾、CRLRとRAMP2の単独欠損マウスでみられた胎児水腫がAM受容体形成不全のみに起因するかは明らかでない。

5. AMの遺伝子多型

ヒトAMゲノム遺伝子の3'末端から4kb下流にCAリピートが存在し、日本人のCAリピートには11回、13回、14回、15回、19回のものがある^{1,14)}。日本人の本態性高血圧患者は、健常者に比べてCAを19回繰り返す頻度が高いとする報告¹⁾とそうでないとする報告¹⁴⁾がある。また、ヒトAM遺伝子には、転写開始点から上流-3053bpと下流+2367bpに単一塩基変異多型(SNP)が存在する(それぞれA-3053G, G+2367A)¹⁴⁾。CAリピートにこれらのSNPを組み合わせて解析すると、健常者と本態性高血圧患者のハプロタイプ(13種)の分布は有意に異なる(特にA-G-19ハプロタイプの頻度は高血圧群で高い¹⁴⁾。しかも、タンパク尿をもつ群は、もたない群よりA-G-19ハプロタイプの頻度が高い¹⁴⁾。以上より、本態性高血圧症において、A-G-19ハプロタイプはタンパク尿の予知マーカーになりうる。

おわりに

AMはそのままでは経口投与できず、血中の半減期も短いため、持続静注・皮下注や吸入に加えて、viral vectorやgelatinによる遺伝子導入実験も行われてきた^{1,15,16)}。遺伝子導入により動物の標的臓器に発現したAMは、高血圧性臓器障害や脳梗塞、心筋梗塞、末梢動脈閉塞の発症進展を抑制する^{1,14,15)}。今後は、経口投与可能な低分子化合物の開発のみならず、安全で発現性や持続性に優れた遺伝子導入療法の開発も望まれる。

■ 文 献

- 1) Ishimitsu T, et al: Pathophysiologic and therapeutic implications of adrenomedullin in cardiovascular disorders. *Pharmacol Ther* 111: 909-927, 2006.
- 2) Kuwasako K, et al: Adrenomedullin receptors: pharmacological features and possible pathophysiological roles. *Peptides* 25: 2003-2012, 2004.
- 3) Kato J, et al: Adrenomedullin: a protective factor for blood vessels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25: 2480-2487, 2005.
- 4) Li Y, et al: Adrenomedullin is a novel adipokine: Adrenomedullin in adipocytes and adipose tissues. *Peptides* 28: 1129-1143, 2007.
- 5) Nagare T, et al: The Krüppel-like factor KLF15 inhibits transcription of the adrenomedullin gene in adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 379: 98-103, 2009.
- 6) Kitamura K, et al: Adrenomedullin: a novel hypotensive peptide isolated from human pheochromocytoma. *Biochem Biophys Res Commun* 192: 553-560, 1993.
- 7) Fukai N, et al: Concomitant expression of adrenomedullin and its receptor components in rat adipose tissues. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 288: E56-E62, 2005.
- 8) Iemura-Inaba C, et al: Role of adrenomedullin system in lipid metabolism and its signaling mechanism in cultured adipocytes. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 295: R1376-R1384, 2008.
- 9) McLatchie L-M, et al: RAMPs regulate the transport and ligand specificity of the calcitonin-receptor-like receptor. *Nature* 393: 333-339, 1998.
- 10) Shindo T, et al: Vascular abnormalities and elevated blood pressure in mice lacking adrenomedullin gene. *Circulation* 104: 1964-1971, 2001.
- 11) Shimosawa T, et al: Adrenomedullin, an endogenous peptide, counteracts cardiovascular damage. *Circulation* 105: 106-111, 2002.
- 12) Fritz-Six K, et al: Adrenomedullin signaling is necessary for murine lymphatic vascular development. *J Clin Invest* 118: 40-50, 2008.
- 13) Sexton PM, et al: Modulating receptor function through RAMPs: can they represent drug targets in themselves? *Drug Discovery Today* 14: 413-419, 2009.
- 14) Kobayashi Y, et al: Haplotype-based case-control study revealing an association between the adrenomedullin gene and proteinuria in subjects with essential hypertension. *Hypertens Res* 28: 229-236, 2005.
- 15) Tokunaga N, et al: Adrenomedullin gene transfer induces therapeutic angiogenesis in a rabbit model of chronic hind limb ischemia: benefits of a novel nonviral vector, gelatin. *Circulation* 109: 526-531, 2004.
- 16) Iwase T, et al: Adrenomedullin enhances angiogenic potency of bone marrow transplantation in a rat model of hindlimb ischemia. *Circulation* 111: 356-362, 2005.

