

erodimers may due to the cell backgrounds, transfection methods, way of wash-out of agonist, animal species of CLR and other differences.

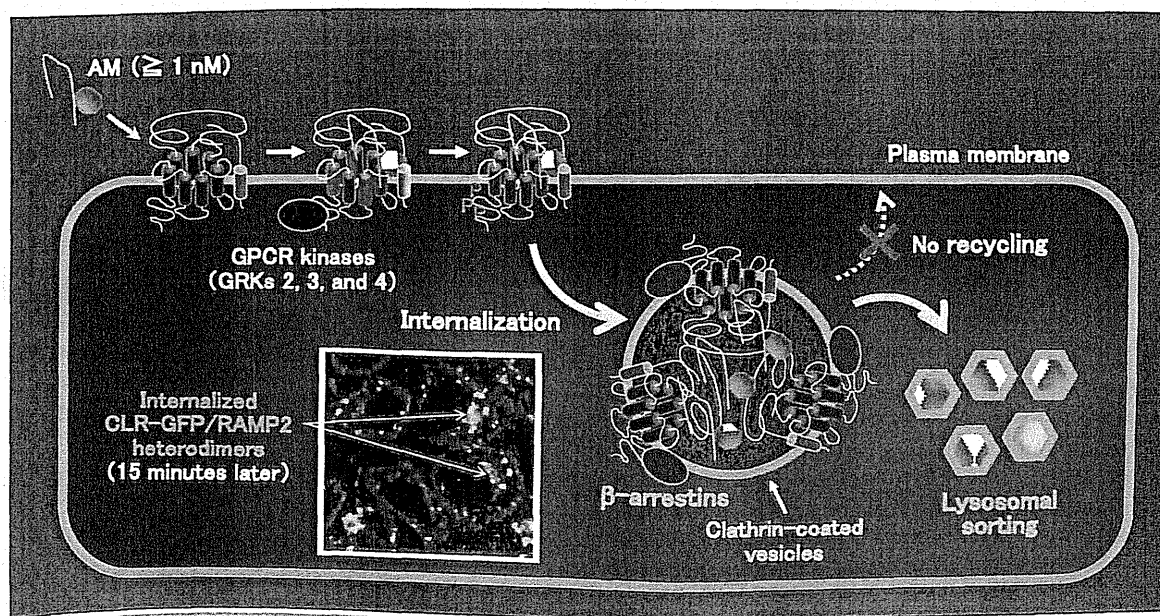
Among the Family B GPCRs that can interact with RAMPs, four receptors also undergo clathrin-mediated internalization (e.g., the rat VPAC<sub>1</sub> [112], the hPTH1 [113], the rat glucagon receptor [97] and the secretin receptor [114]) (Table 2). The CTR can also internalize. After the removal of the respective agonists, the rabbit CTR [48], the hVPAC<sub>1</sub> [46], the hPTH1 [108] and the rat glucagon receptor [107] could be recycled back to the cell surface for resensitization (Table 2). On the other hand, the secretin receptor failed to resensitize, although there was no evidence of whether the internalized receptor is forwarded to the degradation pathway [106] (Table 2).

Unlike other RAMP-interacting GPCRs, the rabbit CTR is constitutively internalized [48]. Interestingly, the efficient recycling of the CTR was dependent on the interaction of the CTR C-tail with the actin-binding protein 'filamin' [48]. That is, the absence of the association between filamin and the CTR C-tail led to a marked decrease in recycling of the receptor from the endosomes to the cell surface and the rapid degradation of the receptor [48] (Table 2). Family A and C GPCRs interact with filamin [115-116]. It has been suggested that unlike the CT<sub>(a)</sub>, the insert-positive isoform of the CTR, CT<sub>(b)</sub>, is poorly internalized [13]. The existence (CT<sub>(b)</sub>) or non-existence (CT<sub>(a)</sub>) of 16 amino acids in the first intracellular loop could affect interactions with intracellular proteins and the internalization kinetics of both CTR isoforms. However, further experiments are needed to determine this.

### 6.3. RAMP-Mediated GPCR Trafficking

Although short, the C-tails of the three RAMPs, especially hRAMP3, contain potential sites for interaction with other proteins [55-56]. The C-tail of hRAMP3, but not that of hRAMP2, possesses a classical type I PDZ (PSD-95/Disc-large/ZO-1) binding motif (Thr-Leu-Leu) [55-56]. The binding of *N*-ethylmaleimide (NSF) to the PDZ motif of hRAMP3 promotes the slow recycling of internalized CLR/RAMP3 heterodimers in HEK-293 cells [109]. Although the C-tails of rat and mouse RAMP3 contain an Arg-Leu-Leu sequence instead of a PDZ motif, NSF also promoted the recycling of rat CLR/RAMP3 heterodimers [109]. However, in a subsequent study, the overexpression of NSF failed to promote the recycling of the recombinant human CLR/RAMP3 in HEK-293 cells [51]. In addition, the overexpression of NSF did not alter the agonist-induced internalization of the human CLR/RAMP3 [51] and secretin receptor/hRAMP3 heterodimers [7]. The PDZ motif of hRAMP3 interacted with the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger regulatory factor-1 (NHERF-1), resulting in the complete inhibition of CLR/RAMP3 internalization [117]. In this case, NHERF-1 is tethered to the surface of the AM receptor and to the actin cytoskeleton. In contrast, the additional co-expression of NHERF-1 failed to affect the internalization of the secretin receptor/hRAMP3 heterodimers [7].

The C-tails of the three RAMPs, similar to that of the CLR, also contains potential phosphorylation and ubiquitination sites (Ser/Thr and Lys, respectively) [55-56]. However, Hilaret *et al.* [49] clearly showed that in HEK-293 cells overexpressing human CLR/RAMP1 heterodimers, CGRP



**Fig. (4).** Intracellular trafficking of the human CLR/RAMP2 heterodimer. Upon binding of AM (1 nM or more), three GPCR kinases (GRK2, GRK3 and GRK4) phosphorylate the Ser/Thr-rich region of the hCLR C-tail [30], after which probably  $\beta$ -arrestins bind to the phosphorylated sites as seen in CLR/RAMP1 heterodimer [49], thereby promoting the internalization of the CLR/RAMP2 heterodimer through a clathrin-dependent pathway [50]. Thereafter, the internalized heterodimeric receptor is targeted to the lysosome for degradation [50]. Similarly, the CLR/RAMP1 heterodimer is internalized and degraded via the same pathway as the CLR/RAMP2 heterodimer [49, 50]. On the other hand, the internalized CLR/RAMP3 heterodimer can be recycled back to the plasma membrane, when *N*-ethylmaleimide-sensitive factor (NSF) interacts with the PDZ domain (Thr-Leu-Leu) of the hRAMP3 C-terminal end [109].

rapidly promotes the phosphorylation of the hCLR but not hRAMP1. It is therefore unlikely that  $\beta$ -arrestins bind to the hRAMP1. On the other hand, receptor ubiquitination is essential for proper trafficking to lysosomes [118]. Unexpectedly, deleting the respective C-tails from the three hRAMPs had no effect on lysosomal sorting of the hCLR, even though HEK-293 cells used abundantly expressed endogenous ubiquitin [51].

hRAMP3 mediates hCLR internalization much less efficiently than hRAMP2 [51]. Interestingly, the complete deletion of the C-tail from hRAMP3 [51] or the substitution of the hRAMP3 TMD with the hRAMP2 TMD [119] markedly enhanced the AM-induced internalization of the hCLR without changing the targeting of CLR to the cell surface or AM binding affinity and potency. It is therefore unlikely that the truncation and substitution of hRAMP3 promoted AM-induced conformational changes in the heterodimeric receptors would alter the binding of AM, the interaction of the receptor with G proteins or both. Instead, it seems likely that the structural changes of hRAMP3 favor the interaction of GRKs with the CLR C-tail, enhancing the binding of  $\beta$ -arrestins to the phosphorylated CLR. Additional experiments are needed to confirm this.

The effect of the co-expression of RAMPs on the internalization of related GPCRs has been shown [7]. The co-expression of each RAMP did not alter the rate or extent of internalization of the secretin receptor [7]. Therefore, additional experiments will be needed to confirm whether each RAMP modulates the cellular trafficking of the CTR, the VPAC<sub>1</sub>, the PTH1, the PTH2 and the glucagon receptor.

#### 6.4. The Effect of GRKs on the Internalization of GPCRs That Interact with RAMPs

Although there are over 800 known GPCRs in the human genome, it is surprising that only seven GRKs (GRK1 through GRK7) have been identified [54]. These GRKs are functionally grouped into three classes: GRK1-like (GRK1 and GRK7), GRK2-like (GRK2 and GRK3) and GRK4-like (GRK4, GRK5 and GRK6). GRK1 and GRK7 are primarily expressed in the retina. GRK2 and GRK3 are widely expressed, although GRK2 is present at higher levels in tissues. GRK4 is found mostly in the testis and proximal tubule of the kidney. GRK5 and GRK6 are widely distributed among tissues [120]. Thus, most GPCRs in the body are regulated through four non-visual GRKs: GRKs 2, 3, 5 or 6.

Similar to the three RAMPs [15, 55], the CLR is also widely expressed in the body [15]. Recently, GRK2, GRK3 or GRK4, but not GRK5 and GRK6, has been shown to predominantly associate with a Ser/Thr-rich region extending from Ser449 to Ser467 in the hCLR C-tail, significantly enhancing the internalization of the human CLR/RAMP2 heterodimers [30] (Table 2 and Fig. (4)). Likewise, the internalization of the rat glucagon receptor was enhanced through the overexpression of GRK2, GRK3 or GRK5 (Table 2), and the glucagon receptor internalization was increased through the overexpression of  $\beta$ -arrestins 1 and 2 [97].

However, there is no information concerning the effects of overexpressed GRKs on the agonist-mediated internalization of other RAMP-based GPCRs. Instead, there are many

reports showing that the overexpression of GRKs exhibited enhanced receptor desensitization (e.g., the rat VPAC<sub>1</sub> [112], the secretin receptor [121-122], the rat PTH1 [123] and the porcine CGRP receptor [124]) (Table 2).

The overexpression of non-visual GRKs (GRK2 through GRK6) produced significant increases in the VIP-induced phosphorylation of the rat VPAC<sub>1</sub> receptor [112]. Moreover, these GRKs exhibited enhanced receptor desensitization: GRKs 3, 5 and 6 > GRK2 > GRK4 [112]. On the other hand, GRKs 2, 3 and 5, but not GRKs 4 and 6, significantly increased agonist-stimulated phosphorylation and desensitization of the secretin receptor [122]. As both the VPAC<sub>1</sub> and the secretin receptor undergo clathrin-mediated internalization [112, 114], the GRK-mediated phosphorylation of these receptors is thought to promote the subsequent binding of  $\beta$ -arrestins for the respective receptor internalization.

In another study, the overexpression of GRK6 selectively inhibited secretin-stimulated cAMP accumulation (or enhanced secretin receptor desensitization) in NG108-15 cells: mouse neuroblastoma x rat glioma hybrid cells [121]. The co-transfection of either GRKs 2, 3 or 5 with the rat PTH1 receptor inhibited PTH-induced cAMP generation, whereas the co-transfection of GRK4 or GRK6 had no effect on PTH1 receptor signaling [123]. In this case, the C-tail, but not the third intracellular loop, of the PTH1 receptor was required for receptor desensitization [123]. On the other hand, GRK6, but not GRK2 and GRK5, promoted the CGRP-mediated desensitization of the overexpressed porcine CGRP receptor [124].

There have also been reports concerning the effect of GRK2-K220R, a dominant-negative GRK2 mutant (DN-GRK2), on CT signaling in Chinese hamster ovary (CHO) cells, which endogenously express CTR and GRKs 2, 5 and 6, but not GRK3 and 4 [125]. The stable expression of DN-GRK2 inhibited GRK2-mediated substrate phosphorylation by approximately 40% and markedly impaired CT-mediated desensitization of cAMP formation [125]; however, there are no reports concerning the effect of DN construct on the activity of GRK5 or GRK6.

#### 6.5. Potential Drug Targeting for GRKs and RAMP-Complexed GPCRs in Cardiac Diseases

GRKs critically influence the function of most GPCRs, including the RAMP-interacting-GPCRs (Table 2). Among the non-visual GRKs, GRK2 and GRK5 are involved in the pathogenesis and development of cardiovascular disease states; increased GRK2 expression results in hypertension, cardiac and aortic hypertrophy and heart failure, while increased GRK5 expression leads to hypertension, heart failure and cardiomyopathy [53-54, 126]. Similar to the AM receptors [18, 127], the VPAC<sub>1</sub> receptor has beneficial effects in hypertension, heart failure and myocardial fibrosis [128-129]. These RAMP-interacting receptors are desensitized through the overexpression of GRK2, GRK5 or both (Table 2). Therefore, GRK2 and GRK5 have been considered promising targets for cardiac diseases. Recently, potent inhibitors of the GRK2/3 superfamily have been developed based on the crystal structures of bovine GRK2 and its related homology modeling [130]; however, no additional information is

available. On the other hand, no selective inhibitors of the GRK4/5/6 superfamily have been developed. In addition to the development of the selective inhibitors of GRKs, the development of small molecules that reduce the transcription of individual GRK isoforms could also be useful for the treatment of cardiac diseases.

## CONCLUSIONS AND FUTURE PERSPECTIVES

The discovery of three RAMPs, multi-functional accessory proteins, has dramatically changed the concept of the molecular basis of GPCRs. RAMPs preferentially interact with Family B GPCRs. In this review, we proposed that both the ECL3 and helix 8 play key roles in the agonist-mediated activation of the RAMP-complexed GPCRs, especially the two AM receptors. Moreover, we also mentioned the current view of the agonist-induced trafficking (internalization and recycling or lysosomal sorting) of the RAMP-complexed GPCRs and the roles of RAMPs and GRKs in their trafficking.

Although so far, over 700 articles on RAMPs have been published since the discovery of RAMPs, many unresolved issues remain with respect to the agonist-mediated activation and trafficking of the RAMP-interacting GPCRs, including the three CLR/RAMP heterodimers. For instance, the mechanism(s) of lysosomal sorting of AM and CGRP receptors remain unknown, but the establishment of strategies for promoting receptor internalization and recycling (see section 6.3.) could be important means for the persistent signaling of both peptides.

## CONFLICT OF INTEREST

The author(s) confirm that this article content has no conflicts of interest.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported in part through Grants-in-Aid for Scientific Research from the Ministry of Education, Culture, Sports Science and Technology, Japan and a research grant from the Takeda Science Foundation.

## LIST OF ABBREVIATIONS

AM	=	Adrenomedullin
AMY	=	Amylin
CGRP	=	Calcitonin (CT) gene-related peptide
CLR	=	CT receptor (CTR)-like receptor
CRF <sub>1</sub>	=	Corticotropin-releasing factor 1 receptor
CRF <sub>2</sub>	=	Corticotropin-releasing factor 2 receptor
CT	=	Calcitonin
C-tail	=	Cytoplasmic C-terminal tail
CTR	=	CT receptor
ECD	=	Extracellular N-terminal domain or ectodomain
ECL	=	Extracellular loop
GPCR	=	G protein-coupled receptor

GHRH	=	Growth hormone-releasing hormone
GIP	=	Glucose-dependent insulinotropic polypeptide
GLP-1	=	Glucagon-like peptide-1
GLP-2	=	Glucagon-like peptide-2
GRK	=	GPCR kinase
Helix 8	=	Eighth $\alpha$ -helix
PAC <sub>1</sub>	=	PACAP 1 receptor
PACAP	=	Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide
PTH1	=	Parathyroid hormone 1 receptor
PTH2	=	Parathyroid hormone 2 receptor
RAMP	=	Receptor activity-modifying protein
TMD	=	Transmembrane (TM) domain
VIP	=	Vasoactive intestinal peptide
VPAC <sub>1</sub>	=	VIP/PACAP 1 receptor
VPAC <sub>2</sub>	=	VIP/PACAP 2 receptor

## REFERENCES

- [1] Barwell, J.; Gingell, J.J.; Watkins, H.A.; Archbold, J.K.; Poyner, D.R.; Hay, D.L. Calcitonin and calcitonin receptor-like receptors: common themes with family B GPCRs? *Br. J. Pharmacol.*, **2012**, *166* (1), 51-65.
- [2] Poyner, D.R.; Hay, D.L. Secretin family (Class B) G protein-coupled receptors - from molecular to clinical perspectives. *Br. J. Pharmacol.*, **2012**, *166* (1), 1-3.
- [3] Wootten, D.; Lindmark, H.; Kadmiel, M.; Willcockson, H.; Caron, K.M.; Barwell, J.; Drmota, T.; Poyner, D.R. Receptor Activity Modifying Proteins (RAMPs) Interact with the VPAC(2) Receptor and CRF(1) Receptors and modulate their function. *Br. J. Pharmacol.*, **2012**.
- [4] McLatchie, L.M.; Fraser, N.J.; Main, M.J.; Wise, A.; Brown, J.; Thompson, N.; Solari, R.; Lee, M.G.; Foord, S.M. RAMPs regulate the transport and ligand specificity of the calcitonin-receptor-like receptor. *Nature*, **1998**, *393* (6683), 333-339.
- [5] Couvineau, A.; Laburthe, M. VPAC receptors: structure, molecular pharmacology and interaction with accessory proteins. *Br. J. Pharmacol.*, **2012**, *166* (1), 42-50.
- [6] Muff, R.; Buhlmann, N.; Fischer, J.A.; Born, W. An amylin receptor is revealed following co-transfection of a calcitonin receptor with receptor activity modifying proteins-1 or -3. *Endocrinology*, **1999**, *140* (6), 2924-2927.
- [7] Harikumar, K.G.; Simms, J.; Christopoulos, G.; Sexton, P.M.; Miller, L.J. Molecular basis of association of receptor activity-modifying protein 3 with the family B G protein-coupled secretin receptor. *Biochemistry*, **2009**, *48* (49), 11773-11785.
- [8] Sexton, P.M.; Poyner, D.R.; Simms, J.; Christopoulos, A.; Hay, D.L. Modulating receptor function through RAMPs: can they represent drug targets in themselves? *Drug Discov. Today*, **2009**, *14* (7-8), 413-419.
- [9] Morfis, M.; Christopoulos, A.; Sexton, P.M. RAMPs: 5 years on, where to now? *Trends Pharmacol. Sci.*, **2003**, *24* (11), 596-601.
- [10] Christopoulos, A.; Christopoulos, G.; Morfis, M.; Udawela, M.; Laburthe, M.; Couvineau, A.; Kuwasako, K.; Tilakaratne, N.; Sexton, P.M. Novel receptor partners and function of receptor activity-modifying proteins. *J. Biol. Chem.*, **2003**, *278* (5), 3293-3297.
- [11] Muff, R.; Born, W.; Fischer, J.A. Adrenomedullin selectivity of calcitonin-like receptor/receptor activity modifying proteins. *Hypertens. Res.*, **2003**, *26* Suppl, S3-8.
- [12] Hay, D.L.; Howitt, S.G.; Conner, A.C.; Schindler, M.; Smith, D.M.; Poyner, D.R. CL/RAMP2 and CL/RAMP3 produce pharmacologically distinct adrenomedullin receptors: a comparison

- of effects of adrenomedullin22-52, CGRP8-37 and BIBN4096BS. *Br. J. Pharmacol.*, 2003, 140 (3), 477-486.
- [13] Poyner, D.R.; Sexton, P.M.; Marshall, I.; Smith, D.M.; Quirion, R.; Born, W.; Muff, R.; Fischer, J.A.; Foord, S.M. International Union of Pharmacology. XXXII. The mammalian calcitonin gene-related peptides, adrenomedullin, amylin, and calcitonin receptors. *Pharmacol. Rev.*, 2002, 54 (2), 233-246.
- [14] Hay, D.L.; Walker, C.S.; Poyner, D.R. Adrenomedullin and calcitonin gene-related peptide receptors in endocrine-related cancers: opportunities and challenges. *Endocr. Relat. Cancer*, 2011, 18 (1), C1-14.
- [15] Kuwasako, K.; Cao, Y.N.; Nagoshi, Y.; Kitamura, K.; Eto, T. Adrenomedullin receptors: pharmacological features and possible pathophysiological roles. *Peptides*, 2004, 25 (11), 2003-2012.
- [16] Smillie, S.J.; Brain, S.D. Calcitonin gene-related peptide (CGRP) and its role in hypertension. *Neuropeptides*, 2011, 45 (2), 93-104.
- [17] Ejaz, A.; LoGerfo, F.W.; Pradhan, L. Diabetic neuropathy and heart failure: role of neuropeptides. *Expert rev. Mol. Med.*, 2011, 13, e26.
- [18] Kuwasako, K.; Kitamura, K.; Nagata, S.; Hikosaka, T.; Takei, Y.; Kato, J. Shared and separate functions of the RAMP-based adrenomedullin receptors. *Peptides*, 2011.
- [19] Gibbons, C.; Dackor, R.; Dunworth, W.; Fritz-Six, K.; Caron, K.M. Receptor activity-modifying proteins: RAMPing up adrenomedullin signaling. *Mol. Endocrinol.*, 2007, 21 (4), 783-796.
- [20] Standfuss, J.; Edwards, P.C.; D'Antona, A.; Fransen, M.; Xie, G.; Oprian, D.D.; Schertler, G.F. The structural basis of agonist-induced activation in constitutively active rhodopsin. *Nature*, 2011, 471 (7340), 656-660.
- [21] Simpson, L.M.; Wall, I.D.; Blaney, F.E.; Reynolds, C.A. Modeling GPCR active state conformations: the beta(2)-adrenergic receptor. *Proteins*, 2011, 79 (5), 1441-1457.
- [22] Topiol, S.; Sabio, M. X-ray structure breakthroughs in the GPCR transmembrane region. *Biochem. Pharmacol.*, 2009, 78 (1), 11-20.
- [23] Wess, J.; Han, S.J.; Kim, S.K.; Jacobson, K.A.; Li, J.H. Conformational changes involved in G-protein-coupled-receptor activation. *Trends Pharmacol. Sci.*, 2008, 29 (12), 616-625.
- [24] Mustafi, D.; Palczewski, K. Topology of class A G protein-coupled receptors: insights gained from crystal structures of rhodopsins, adrenergic and adenosine receptors. *Mol. Pharmacol.*, 2009, 75 (1), 1-12.
- [25] Langer, I. Conformational switches in the VPAC(1) receptor. *Br. J. Pharmacol.*, 2012, 166 (1), 79-84.
- [26] Conner, A.C.; Hay, D.L.; Simms, J.; Howitt, S.G.; Schindler, M.; Smith, D.M.; Wheatley, M.; Poyner, D.R. A key role for transmembrane prolines in calcitonin receptor-like receptor agonist binding and signalling: implications for family B G-protein-coupled receptors. *Mol. Pharmacol.*, 2005, 67 (1), 20-31.
- [27] Chugunov, A.O.; Simms, J.; Poyner, D.R.; Dehouck, Y.; Rooman, M.; Gilis, D.; Langer, I. Evidence that interaction between conserved residues in transmembrane helices 2, 3, and 7 are crucial for human VPAC1 receptor activation. *Mol. Pharmacol.*, 2010, 78 (3), 394-401.
- [28] Conner, A.C.; Simms, J.; Barwell, J.; Wheatley, M.; Poyner, D.R. Ligand binding and activation of the CGRP receptor. *Biochem Soc Trans.*, 2007, 35 (Pt 4), 729-732.
- [29] Kuwasako, K.; Kitamura, K.; Nagata, S.; Hikosaka, T.; Kato, J. Structure-function analysis of helix 8 of human calcitonin receptor-like receptor within the adrenomedullin 1 receptor. *Peptides*, 2011, 32 (1), 144-149.
- [30] Kuwasako, K.; Kitamura, K.; Nagata, S.; Hikosaka, T.; Kato, J. Function of the cytoplasmic tail of human calcitonin receptor-like receptor in complex with receptor activity-modifying protein 2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2010, 392 (3), 380-385.
- [31] Conner, M.; Hicks, M.R.; Dafforn, T.; Knowles, T.J.; Ludwig, C.; Staddon, S.; Overduin, M.; Gunther, U.L.; Thome, J.; Wheatley, M.; Poyner, D.R.; Conner, A.C. Functional and biophysical analysis of the C-terminus of the CGRP-receptor; a family B GPCR. *Biochemistry*, 2008, 47 (32), 8434-8444.
- [32] Perrin, M.H.; Grace, C.R.; Riek, R.; Vale, W.W. The three-dimensional structure of the N-terminal domain of corticotropin-releasing factor receptors: sushi domains and the B1 family of G protein-coupled receptors. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 2006, 1070, 105-119.
- [33] Grace, C.R.; Perrin, M.H.; Gulyas, J.; Digruccio, M.R.; Cantle, J.P.; Rivier, J.E.; Vale, W.W.; Riek, R. Structure of the N-terminal domain of a type B1 G protein-coupled receptor in complex with a peptide ligand. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007, 104 (12), 4858-4863.
- [34] Grace, C.R.; Perrin, M.H.; DiGrucchio, M.R.; Miller, C.L.; Rivier, J.E.; Vale, W.W.; Riek, R. NMR structure and peptide hormone binding site of the first extracellular domain of a type B1 G protein-coupled receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2004, 101 (35), 12836-12841.
- [35] Siu, F.Y.; Stevens, R.C. RAMP-ing up class-B GPCR ECD structural coverage. *Structure*, 2010, 18 (9), 1067-1068.
- [36] Neumann, J.M.; Couvineau, A.; Murail, S.; Lacapere, J.J.; Jamin, N.; Laburthe, M. Class-B GPCR activation: is ligand helix-capping the key? *Trends Biochem. Sci.*, 2008, 33 (7), 314-319.
- [37] Hoare, S.R. Mechanisms of peptide and nonpeptide ligand binding to Class B G-protein-coupled receptors. *Drug Discov. Today*, 2005, 10 (6), 417-427.
- [38] Pioszak, A.A.; Xu, H.E. Molecular recognition of parathyroid hormone by its G protein-coupled receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2008, 105 (13), 5034-5039.
- [39] Runge, S.; Thogersen, H.; Madsen, K.; Lau, J.; Rudolph, R. Crystal structure of the ligand-bound glucagon-like peptide-1 receptor extracellular domain. *J. Biol. Chem.*, 2008, 283 (17), 11340-11347.
- [40] Parthier, C.; Kleinschmidt, M.; Neumann, P.; Rudolph, R.; Manhart, S.; Schlenzig, D.; Fanghanel, J.; Rahfeld, J.U.; Demuth, H.U.; Stubbs, M.T. Crystal structure of the incretin-bound extracellular domain of a G protein-coupled receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2007, 104 (35), 13942-13947.
- [41] Grace, C.R.; Perrin, M.H.; Gulyas, J.; Rivier, J.E.; Vale, W.W.; Riek, R. NMR structure of the first extracellular domain of corticotropin-releasing factor receptor 1 (ECD1-CRF-R1) complexed with a high affinity agonist. *J. Biol. Chem.*, 2010, 285 (49), 38580-38589.
- [42] Sun, C.; Song, D.; Davis-Taber, R.A.; Barrett, L.W.; Scott, V.E.; Richardson, P.L.; Pereda-Lopez, A.; Uchic, M.E.; Solomon, L.R.; Lake, M.R.; Walter, K.A.; Hajduk, P.J.; Olejniczak, E.T. Solution structure and mutational analysis of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide binding to the extracellular domain of PAC1-RS. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2007, 104 (19), 7875-7880.
- [43] Kusano, S.; Kukimoto-Niino, M.; Hino, N.; Ohsawa, N.; Okuda, K.; Sakamoto, K.; Shirouzu, M.; Shindo, T.; Yokoyama, S. Structural basis for extracellular interactions between calcitonin receptor-like receptor and receptor activity-modifying protein 2 for adrenomedullin-specific binding. *Protein science: a publication of the Protein Society*, 2012, 21 (2), 199-210.
- [44] Bisello, A.; Manen, D.; Pierroz, D.D.; Usdin, T.B.; Rizzoli, R.; Ferrari, S.L. Agonist-specific regulation of parathyroid hormone (PTH) receptor type 2 activity: structural and functional analysis of PTH- and tuberoinfundibular peptide (TIP) 39-stimulated desensitization and internalization. *Mol. Endocrinol.*, 2004, 18 (6), 1486-1498.
- [45] Garrido, J.L.; Wheeler, D.; Vega, L.L.; Friedman, P.A.; Romero, G. Role of phospholipase D in parathyroid hormone type 1 receptor signaling and trafficking. *Mol. Endocrinol.*, 2009, 23 (12), 2048-2059.
- [46] Langlet, C.; Langer, I.; Vertongen, P.; Gaspard, N.; Vanderwinden, J.M.; Robberecht, P. Contribution of the carboxyl terminus of the VPAC1 receptor to agonist-induced receptor phosphorylation, internalization, and recycling. *J. Biol. Chem.*, 2005, 280 (30), 28034-28043.
- [47] Marie, J.C.; Rouyer-Fessard, C.; Couvineau, A.; Nicole, P.; Devaud, H.; El Benna, J.; Laburthe, M. Serine 447 in the carboxyl tail of human VPAC1 receptor is crucial for agonist-induced desensitization but not internalization of the receptor. *Mol. Pharmacol.*, 2003, 64 (6), 1565-1574.
- [48] Seck, T.; Baron, R.; Horne, W.C. Binding of filamin to the C-terminal tail of the calcitonin receptor controls recycling. *J. Biol. Chem.*, 2003, 278 (12), 10408-10416.
- [49] Hilairat, S.; Belanger, C.; Bertrand, J.; Laperriere, A.; Foord, S.M.; Bouvier, M. Agonist-promoted internalization of a ternary complex between calcitonin receptor-like receptor, receptor activity-modifying protein 1 (RAMP1), and beta-arrestin. *J. Biol. Chem.*, 2001, 276 (45), 42182-42190.
- [50] Kuwasako, K.; Shimekake, Y.; Masuda, M.; Nakahara, K.; Yoshida, T.; Kitaura, M.; Kitamura, K.; Eto, T.; Sakata, T. Visualization of the calcitonin receptor-like receptor and its

- receptor activity-modifying proteins during internalization and recycling. *J. Biol. Chem.*, **2000**, *275* (38), 29602-29609.
- [51] Kuwasako, K.; Cao, Y.N.; Chu, C.P.; Iwatsubo, S.; Eto, T.; Kitamura, K. Functions of the cytoplasmic tails of the human receptor activity-modifying protein components of calcitonin gene-related peptide and adrenomedullin receptors. *J. Biol. Chem.*, **2006**, *281* (11), 7205-7213.
- [52] Ribas, C.; Penela, P.; Murga, C.; Salcedo, A.; Garcia-Hoz, C.; Jurado-Pueyo, M.; Aymerich, I.; Mayor, F., Jr. The G protein-coupled receptor kinase (GRK) interactome: role of GRKs in GPCR regulation and signaling. *Biochim. Biophys. Acta*, **2007**, *1768* (4), 913-922.
- [53] Gurevich, E.V.; Tesmer, J.J.; Mushegian, A.; Gurevich, V.V. G protein-coupled receptor kinases: more than just kinases and not only for GPCRs. *Pharmacol. Ther.*, **2012**, *133* (1), 40-69.
- [54] Premont, R.T.; Gainetdinov, R.R. Physiological roles of G protein-coupled receptor kinases and arrestins. *Ann. Rev. Physiol.*, **2007**, *69*, 511-534.
- [55] Sexton, P.M.; Albiston, A.; Morfis, M.; Tilakaratne, N. Receptor activity modifying proteins. *Cell Signal*, **2001**, *13* (2), 73-83.
- [56] Hay, D.L.; Poyner, D.R.; Sexton, P.M. GPCR modulation by RAMPs. *Pharmacol. Ther.*, **2006**, *109* (1-2), 173-197.
- [57] ter Haar, E.; Koth, C.M.; Abdul-Manan, N.; Swenson, L.; Coll, J.T.; Lippke, J.A.; Lepre, C.A.; Garcia-Guzman, M.; Moore, J.M. Crystal structure of the ectodomain complex of the CGRP receptor, a class-B GPCR, reveals the site of drug antagonism. *Structure*, **2010**, *18* (9), 1083-1093.
- [58] 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.*, **2008**, *17* (11), 1907-1914.
- [59] Steiner, S.; Born, W.; Fischer, J.A.; Muff, R. The function of conserved cysteine residues in the extracellular domain of human receptor-activity-modifying protein. *FEBS Lett.*, **2003**, *555* (2), 285-290.
- [60] Simms, J.; Hay, D.L.; Wheatley, M.; Poyner, D.R. Characterization of the structure of RAMP1 by mutagenesis and molecular modeling. *Biophys. J.*, **2006**, *91* (2), 662-669.
- [61] Simms, J.; Hay, D.L.; Bailey, R.J.; Konycheva, G.; Bailey, G.; Wheatley, M.; Poyner, D.R. Structure-function analysis of RAMP1 by alanine mutagenesis. *Biochemistry*, **2009**, *48* (1), 198-205.
- [62] Kuwasako, K.; Kitamura, K.; Uemura, T.; Nagoshi, Y.; Kato, J.; Eto, T. The function of extracellular cysteines in the human adrenomedullin receptor. *Hypertens. Res.*, **2003**, *26* Suppl, S25-31.
- [63] Qi, T.; Hay, D.L. Structure-function relationships of the N-terminus of receptor activity-modifying proteins. *Br. J. Pharmacol.*, **2010**, *159* (5), 1059-1068.
- [64] Hilaiet, S.; Foord, S.M.; Marshall, F.H.; Bouvier, M. Protein-protein interaction and not glycosylation determines the binding selectivity of heterodimers between the calcitonin receptor-like receptor and the receptor activity-modifying proteins. *J. Biol. Chem.*, **2001**, *276* (31), 29575-29581.
- [65] Heroux, M.; Breton, B.; Hogue, M.; Bouvier, M. Assembly and signaling of CRLR and RAMP1 complexes assessed by BRET. *Biochemistry*, **2007**, *46* (23), 7022-7033.
- [66] Heroux, M.; Hogue, M.; Lemieux, S.; Bouvier, M. Functional calcitonin gene-related peptide receptors are formed by the asymmetric assembly of a calcitonin receptor-like receptor homodimer and a monomer of receptor activity-modifying protein-1. *J. Biol. Chem.*, **2007**, *282* (43), 31610-31620.
- [67] Kuwasako, K.; Kitamura, K.; Nagata, S.; Kato, J. Flow cytometric analysis of the calcitonin receptor-like receptor domains responsible for cell-surface translocation of receptor activity-modifying proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2009**, *384* (2), 249-254.
- [68] Qi, T.; Ly, K.; Poyner, D.R.; Christopoulos, G.; Sexton, P.M.; Hay, D.L. Structure-function analysis of amino acid 74 of human RAMP1 and RAMP3 and its role in peptide interactions with adrenomedullin and calcitonin gene-related peptide receptors. *Peptides*, **2011**, *32* (5), 1060-1067.
- [69] Tilakaratne, N.; Christopoulos, G.; Zumpfe, E.T.; Foord, S.M.; Sexton, P.M. Amylin receptor phenotypes derived from human calcitonin receptor/RAMP coexpression exhibit pharmacological differences dependent on receptor isoform and host cell environment. *J. Pharmacol. exp. ther.*, **2000**, *294* (1), 61-72.
- [70] Kuwasako, K.; Cao, Y.N.; Nagoshi, Y.; Tsuruda, T.; Kitamura, K.; Eto, T. Characterization of the human calcitonin gene-related peptide receptor subtypes associated with receptor activity-modifying proteins. *Mol. Pharmacol.*, **2004**, *65* (1), 207-213.
- [71] Morfis, M.; Tilakaratne, N.; Furness, S.G.; Christopoulos, G.; Werry, T.D.; Christopoulos, A.; Sexton, P.M. Receptor activity-modifying proteins differentially modulate the G protein-coupling efficiency of amylin receptors. *Endocrinology*, **2008**, *149* (11), 5423-5431.
- [72] Rasmussen, S.G.; DeVree, B.T.; Zou, Y.; Kruse, A.C.; Chung, K.Y.; Kobilka, T.S.; Thian, F.S.; Chae, P.S.; Pardon, E.; Calinski, D.; Mathiesen, J.M.; Shah, S.T.; Lyons, J.A.; Caffrey, M.; Gellman, S.H.; Steyaert, J.; Skiniotis, G.; Weis, W.I.; Sunahara, R.K.; Kobilka, B.K. Crystal structure of the beta2 adrenergic receptor-Gs protein complex. *Nature*, **2011**, *477* (7366), 549-555.
- [73] Oldham, W.M.; Hamm, H.E. Heterotrimeric G protein activation by G-protein-coupled receptors. *Nature reviews. Mol. cell biol.*, **2008**, *9* (1), 60-71.
- [74] Hofmann, K.P.; Scheerer, P.; Hildebrand, P.W.; Choe, H.W.; Park, J.H.; Heck, M.; Ernst, O.P. A G protein-coupled receptor at work: the rhodopsin model. *Trends Biochem. Sci.*, **2009**, *34* (11), 540-552.
- [75] Choe, H.W.; Kim, Y.J.; Park, J.H.; Morizumi, T.; Pai, E.F.; Krauss, N.; Hofmann, K.P.; Scheerer, P.; Ernst, O.P. Crystal structure of metarhodopsin II. *Nature*, **2011**, *471* (7340), 651-655.
- [76] Wheatley, M.; Wootten, D.; Conner, M.T.; Simms, J.; Kendrick, R.; Logan, R.T.; Poyner, D.R.; Barwell, J. Lifting the lid on GPCRs: the role of extracellular loops. *Br. J. Pharmacol.*, **2012**, *165* (6), 1688-1703.
- [77] Peeters, M.C.; van Westen, G.J.; Li, Q.; Ijzerman, A.P. Importance of the extracellular loops in G protein-coupled receptors for ligand recognition and receptor activation. *Trends Pharmacol. Sci.*, **2011**, *32* (1), 35-42.
- [78] Hawtin, S.R.; Simms, J.; Conner, M.; Lawson, Z.; Parslow, R.A.; Trim, J.; Sheppard, A.; Wheatley, M. Charged extracellular residues, conserved throughout a G-protein-coupled receptor family, are required for ligand binding, receptor activation, and cell-surface expression. *J. Biol. Chem.*, **2006**, *281* (50), 38478-38488.
- [79] Lawson, Z.; Wheatley, M. The third extracellular loop of G-protein-coupled receptors: more than just a linker between two important transmembrane helices. *Biochem. Soc. Trans.*, **2004**, *32* (Pt 6), 1048-1050.
- [80] Li, J.; Edwards, P.C.; Burghammer, M.; Villa, C.; Schertler, G.F. Structure of bovine rhodopsin in a trigonal crystal form. *J. Mol. Biol.*, **2004**, *343* (5), 1409-1438.
- [81] Palczewski, K.; Kumasaka, T.; Hori, T.; Behnke, C.A.; Motoshima, H.; Fox, B.A.; Le Trong, I.; Teller, D.C.; Okada, T.; Stenkamp, R.E.; Yamamoto, M.; Miyano, M. Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science*, **2000**, *289* (5480), 739-745.
- [82] Barwell, J.; Conner, A.; Poyner, D.R. Extracellular loops 1 and 3 and their associated transmembrane regions of the calcitonin receptor-like receptor are needed for CGRP receptor function. *Biochim. biophys. acta*, **2011**, *1813* (10), 1906-1916.
- [83] Kuwasako, K.; Hay, D.L.; Nagata, S.; Hikosaka, T.; Kitamura, K.; Kato, J. The third extracellular loop of the human calcitonin receptor-like receptor is crucial for the activation of adrenomedullin signalling. *Br. J. Pharmacol.*, **2012**, *166* (1), 137-150.
- [84] Qi, T.; Christopoulos, G.; Bailey, R.J.; Christopoulos, A.; Sexton, P.M.; Hay, D.L. Identification of N-terminal receptor activity-modifying protein residues important for calcitonin gene-related peptide, adrenomedullin, and amylin receptor function. *Mol. Pharmacol.*, **2008**, *74* (4), 1059-1071.
- [85] Faussner, A.; Bauer, A.; Kalatskaya, I.; Schussler, S.; Seidl, C.; Proud, D.; Jochum, M. The role of helix 8 and of the cytosolic C-termini in the internalization and signal transduction of B(1) and B(2) bradykinin receptors. *The FEBS journal*, **2005**, *272* (1), 129-140.
- [86] Wess, J.; Han, S.J.; Kim, S.K.; Jacobson, K.A.; Li, J.H. Conformational changes involved in G-protein-coupled-receptor activation. *Trends in Pharmacological Sciences*, **2008**, *29* (12), 616-625.
- [87] Tetsuka, M.; Saito, Y.; Imai, K.; Doi, H.; Maruyama, K. The basic residues in the membrane-proximal C-terminal tail of the rat

- melanin-concentrating hormone receptor 1 are required for receptor function. *Endocrinology*, 2004, 145 (8), 3712-3723.
- [88] Swift, S.; Leger, A.J.; Talavera, J.; Zhang, L.; Bohm, A.; Kuliopulos, A. Role of the PAR1 receptor 8th helix in signaling: the 7-8-1 receptor activation mechanism. *J. Biol. Chem.*, 2006, 281 (7), 4109-4116.
- [89] Sano, T.; Ohyama, K.; Yamano, Y.; Nakagomi, Y.; Nakazawa, S.; Kikyo, M.; Shirai, H.; Blank, J.S.; Exton, J.H.; Inagami, T. A domain for G protein coupling in carboxyl-terminal tail of rat angiotensin II receptor type 1A. *J. Biol. Chem.*, 1997, 272 (38), 23631-23636.
- [90] Delos Santos, N.M.; Gardner, L.A.; White, S.W.; Bahouth, S.W. Characterization of the residues in helix 8 of the human beta1-adrenergic receptor that are involved in coupling the receptor to G proteins. *J. Biol. Chem.*, 2006, 281 (18), 12896-12907.
- [91] Zhao, M.M.; Gaivin, R.J.; Perez, D.M. The third extracellular loop of the beta2-adrenergic receptor can modulate receptor/G protein affinity. *Mol. Pharmacol.*, 1998, 53 (3), 524-529.
- [92] Couvineau, A.; Lacapere, J.J.; Tan, Y.V.; Rouyer-Fessard, C.; Nicole, P.; Laburthe, M. Identification of cytoplasmic domains of hVPAC1 receptor required for activation of adenylyl cyclase. Crucial role of two charged amino acids strictly conserved in class II G protein-coupled receptors. *J. Biol. Chem.*, 2003, 278 (27), 24759-24766.
- [93] Findlay, D.M.; Houssami, S.; Lin, H.Y.; Myers, D.E.; Brady, C.L.; Darcy, P.K.; Ikeda, K.; Martin, T.J.; Sexton, P.M. Truncation of the porcine calcitonin receptor cytoplasmic tail inhibits internalization and signal transduction but increases receptor affinity. *Mole. Endocrinol.*, 1994, 8 (12), 1691-1700.
- [94] Unson, C.G.; Cypess, A.M.; Kim, H.N.; Goldsmith, P.K.; Carruthers, C.J.; Merrifield, R.B.; Sakmar, T.P. Characterization of deletion and truncation mutants of the rat glucagon receptor. Seven transmembrane segments are necessary for receptor transport to the plasma membrane and glucagon binding. *J. Biol. Chem.*, 1995, 270 (46), 27720-27727.
- [95] Huang, Z.; Chen, Y.; Pratt, S.; Chen, T.H.; Bambino, T.; Shoback, D.M.; Nissenson, R.A. Mutational analysis of the cytoplasmic tail of the G protein-coupled receptor for parathyroid hormone (PTH) and PTH-related protein: effects on receptor expression and signaling. *Mol. Endocrinol.*, 1995, 9 (9), 1240-1249.
- [96] Holtmann, M.H.; Roettger, B.F.; Pinon, D.I.; Miller, L.J. Role of receptor phosphorylation in desensitization and internalization of the secretin receptor. *J. Biol. Chem.*, 1996, 271 (38), 23566-23571.
- [97] Krilov, L.; Nguyen, A.; Miyazaki, T.; Unson, C.G.; Williams, R.; Lee, N.H.; Ceryak, S.; Bouscarel, B. Dual mode of glucagon receptor internalization: role of PKCalpha, GRKs and beta-arrestins. *Experimental Cell Research*, 2011, 317 (20), 2981-2994.
- [98] Kelly, E.; Bailey, C.P.; Henderson, G. Agonist-selective mechanisms of GPCR desensitization. *Br. J. Pharmacol.*, 2008, 153 Suppl 1, S379-388.
- [99] Pitcher, J.A.; Freedman, N.J.; Lefkowitz, R.J. G protein-coupled receptor kinases. *Ann. Rev. Biochem.*, 1998, 67, 653-692.
- [100] Platta, H.W.; Stenmark, H. Endocytosis and signaling. *Current Opinion in Cell Biology*, 2011, 23 (4), 393-403.
- [101] Jean-Alphonse, F.; Hanyaloglu, A.C. Regulation of GPCR signal networks via membrane trafficking. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 2011, 331 (2), 205-214.
- [102] Drake, M.T.; Shenoy, S.K.; Lefkowitz, R.J. Trafficking of G protein-coupled receptors. *Cir. Res.*, 2006, 99 (6), 570-582.
- [103] Sever, S. Dynamin and endocytosis. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 2002, 14 (4), 463-467.
- [104] Prossnitz, E.R. Novel roles for arrestins in the post-endocytic trafficking of G protein-coupled receptors. *Life Sci.*, 2004, 75 (8), 893-899.
- [105] Oakley, R.H.; Laporte, S.A.; Holt, J.A.; Caron, M.G.; Barak, L.S. Differential affinities of visual arrestin, beta arrestin1, and beta arrestin2 for G protein-coupled receptors delineate two major classes of receptors. *J. Biol. Chem.*, 2000, 275 (22), 17201-17210.
- [106] Mundell, S.J.; Kelly, E. The effect of inhibitors of receptor internalization on the desensitization and resensitization of three Gs-coupled receptor responses. *Br. J. Pharmacol.*, 1998, 125 (7), 1594-1600.
- [107] Krilov, L.; Nguyen, A.; Miyazaki, T.; Unson, C.G.; Bouscarel, B. Glucagon receptor recycling: role of carboxyl terminus, beta-arrestins, and cytoskeleton. *American journal of physiology. Cell physiol.*, 2008, 295 (5), C1230-1237.
- [108] Wang, B.; Bisello, A.; Yang, Y.; Romero, G.G.; Friedman, P.A. NHERF1 regulates parathyroid hormone receptor membrane retention without affecting recycling. *J. Biol. Chem.*, 2007, 282 (50), 36214-36222.
- [109] Bomberger, J.M.; Parameswaran, N.; Hall, C.S.; Aiyar, N.; Spielman, W.S. Novel function for receptor activity-modifying proteins (RAMPs) in post-endocytic receptor trafficking. *J. Biol. Chem.*, 2005, 280 (10), 9297-9307.
- [110] Nikitenko, L.L.; Blucher, N.; Fox, S.B.; Bicknell, R.; Smith, D.M.; Rees, M.C. Adrenomedullin and CGRP interact with endogenous calcitonin-receptor-like receptor in endothelial cells and induce its desensitisation by different mechanisms. *J. Cell Sci.*, 2006, 119 (Pt 5), 910-922.
- [111] Cottrell, G.S.; Padilla, B.; Pikios, S.; Roosterman, D.; Steinhoff, M.; Grady, E.F.; Bunnett, N.W. Post-endocytic sorting of calcitonin receptor-like receptor and receptor activity-modifying protein 1. *J. Biol. Chem.*, 2007, 282 (16), 12260-12271.
- [112] Shetzline, M.A.; Walker, J.K.; Valenzano, K.J.; Premont, R.T. Vasoactive intestinal polypeptide type-1 receptor regulation. Desensitization, phosphorylation, and sequestration. *J. Biol. Chem.*, 2002, 277 (28), 25519-25526.
- [113] Ferrari, S.L.; Behar, V.; Chorev, M.; Rosenblatt, M.; Bisello, A. Endocytosis of ligand-human parathyroid hormone receptor 1 complexes is protein kinase C-dependent and involves beta-arrestin2. Real-time monitoring by fluorescence microscopy. *J. Biol. Chem.*, 1999, 274 (42), 29968-29975.
- [114] Walker, J.K.; Premont, R.T.; Barak, L.S.; Caron, M.G.; Shetzline, M.A. Properties of secretin receptor internalization differ from those of the beta(2)-adrenergic receptor. *J. Biol. Chem.*, 1999, 274 (44), 31515-31523.
- [115] Zhang, M.; Breitwieser, G.E. High affinity interaction with filamin A protects against calcium-sensing receptor degradation. *J. Biol. Chem.*, 2005, 280 (12), 11140-11146.
- [116] Lin, R.; Karpa, K.; Kabbani, N.; Goldman-Rakic, P.; Levenson, R. Dopamine D2 and D3 receptors are linked to the actin cytoskeleton via interaction with filamin A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2001, 98 (9), 5258-5263.
- [117] Bomberger, J.M.; Spielman, W.S.; Hall, C.S.; Weinman, E.J.; Parameswaran, N. Receptor activity-modifying protein (RAMP) isoform-specific regulation of adrenomedullin receptor trafficking by NHERF-1. *J. Biol. Chem.*, 2005, 280 (25), 23926-23935.
- [118] Wojcikiewicz, R.J. Regulated ubiquitination of proteins in GPCR-initiated signaling pathways. *Trends in Pharmacological Sciences*, 2004, 25 (1), 35-41.
- [119] Kuwasako, K.; Kitamura, K.; Nagata, S.; Nozaki, N.; Kato, J. Characterization of the single transmembrane domain of human receptor activity-modifying protein 3 in adrenomedullin receptor internalization. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2012, 420 (3), 582-587.
- [120] Gainetdinov, R.R.; Premont, R.T.; Caron, M.G.; Lefkowitz, R.J. Reply: receptor specificity of G-protein-coupled receptor kinases. *Trends Pharmacol. Sci.*, 2000, 21 (10), 366-367.
- [121] Ghadessy, R.S.; Willets, J.M.; Kelly, E. G protein-coupled receptor kinase 6 (GRK6) selectively regulates endogenous secretin receptor responsiveness in NG108-15 cells. *Br. J. Pharmacol.*, 2003, 138 (4), 660-670.
- [122] Shetzline, M.A.; Premont, R.T.; Walker, J.K.; Vigna, S.R.; Caron, M.G. A role for receptor kinases in the regulation of class II G protein-coupled receptors. Phosphorylation and desensitization of the secretin receptor. *J. Biol. Chem.*, 1998, 273 (12), 6756-6762.
- [123] Flannery, P.J.; Spurney, R.F. Domains of the parathyroid hormone (PTH) receptor required for regulation by G protein-coupled receptor kinases (GRKs). *Biochem. Pharmacol.*, 2001, 62 (8), 1047-1058.
- [124] Aiyar, N.; Disa, J.; Dang, K.; Pronin, A.N.; Benovic, J.L.; Nambi, P. Involvement of G protein-coupled receptor kinase-6 in desensitization of CGRP receptors. *Eur. J. Pharmacol.*, 2000, 403 (1-2), 1-7.
- [125] Horie, K.; Insel, P.A. Retrovirally mediated transfer of a G protein-coupled receptor kinase (GRK) dominant-negative mutant enhances endogenous calcitonin receptor signaling in Chinese hamster ovary cells. GRK inhibition enhances expression of receptors and receptor mRNA. *J. Biol. Chem.*, 2000, 275 (38), 29433-29440.

- [126] Harris, D.M.; Cohn, H.I.; Pesant, S.; Eckhart, A.D. GPCR signalling in hypertension: role of GRKs. *Clin. Sci.*, **2008**, *115* (3), 79-89.
- [127] Kuwasako, K.; Kitamura, K.; Nagata, S.; Kato, J. Molecular Basis of Adrenomedullin 1 Receptor Function and Its Roles in the Cardiovascular System. *Curr. Hyperten. Rev.*, **2011**, *7* (4), 207-216.
- [128] Sawmiller, D.R.; Henning, R.J.; Cuevas, J.; Dehaven, W.I.; Vesely, D.L. Coronary vascular effects of vasoactive intestinal peptide in the isolated perfused rat heart. *Neuropeptides*, **2004**, *38* (5), 289-297.
- [129] Dvorakova, M.C. Cardioprotective role of the VIP signaling system. *Drug news Perspect.*, **2005**, *18* (6), 387-391.
- [130] Thal, D.M.; Yeow, R.Y.; Schoenau, C.; Huber, J.; Tesmer, J.J. Molecular mechanism of selectivity among G protein-coupled receptor kinase 2 inhibitors. *Mol.Pharmacol.*, **2011**, *80* (2), 294-303.

## アドレノメデュリンの展開研究

北村和雄

宮崎医科大学医学部内科学講座循環体液制御学分野

### ◎ はじめに

アドレノメデュリン(adrenomedullin; 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作用を有する生理活性ペプチドである。循環器疾患や炎症性疾患では産生が増加し、心血管保護作用、血管新生作用や抗炎症作用など多彩な生理作用を有することが判明しており、近年AMを治療薬として応用するための臨床研究が実施されている。ここでは、AMの基礎的事項の概説に加えて、最近実施されているAMを利用した急性心筋梗塞や炎症性腸疾患に対する展開研究について紹介する。

### ◎ アドレノメデュリン(AM)の構造と生合成

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1A)<sup>1)</sup>。ヒトAMは52個のアミノ酸より成り、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。また、AMに続くアドレノメデュリン2(AM2)の存在が明らかにされている<sup>2)3)</sup>。AMとの構造上の相同性はそれほど高くなく、AM2の生体内での役割を明らかにすることで、新たな展開が期待される。

AMは正常の副腎髄質にも高濃度存在しているが、ほかの組織でも広く生合成・分泌されている。褐色細胞腫組織や副腎では高濃度のadrenomedullin messenger ribonucleic acid(AMmRNA)が認められるが、肺、腎、心臓、血管などの主要な組織でも、副腎髄質に匹敵するAMmRNAが発現している。特に、血管

内皮培養細胞や線維芽培養細胞からは大量のAMが分泌されている<sup>4)</sup>。また、各種の炎症性サイトカインや血管作働物質などがAMの生合成分泌を調節している可能性が示されている。

ヒトAMの前駆体の構造は、図1Bに示すように21個のシグナルペプチドを含む185個のアミノ酸より成る<sup>5)</sup>。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AMのアミド構造の供与体になると考えられる。

さらに、AM前駆体のシグナルペプチドに続くpro-adrenomedullinのN末の20個のアミノ酸から成るペプチドは、C末端がアルギニン(arginine; Arg)アミド構造を有した新しい生理活性ペプチド“proadrenomedullin N-terminal 20 peptide(PAMP)”として生合成される(図1B)。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。また、AMとPAMPの中間部からはmidregional pro-adrenomedullin(MR-proADM)が生合成される(図1B)。MR-proADMは生物学的な活性は認められないが、各種疾患での診断薬のマーカーとして注目されている<sup>6)</sup>。

### ◎ AMの主な作用

AMは循環器系を含め幅広い組織で生合成されており、循環器系以外の作用にも多彩な作用を有することが明らかになっている(表)<sup>7)</sup>。AMは強力な血管拡張による血圧低下作用を示すが、その作用は血管平滑筋への直接作用が主体であり、一部、一酸化窒素(nitric oxide; NO)分泌を介する作用もある。一方、覚醒ヒツジにAMを静注すると、降圧とともに心拍数



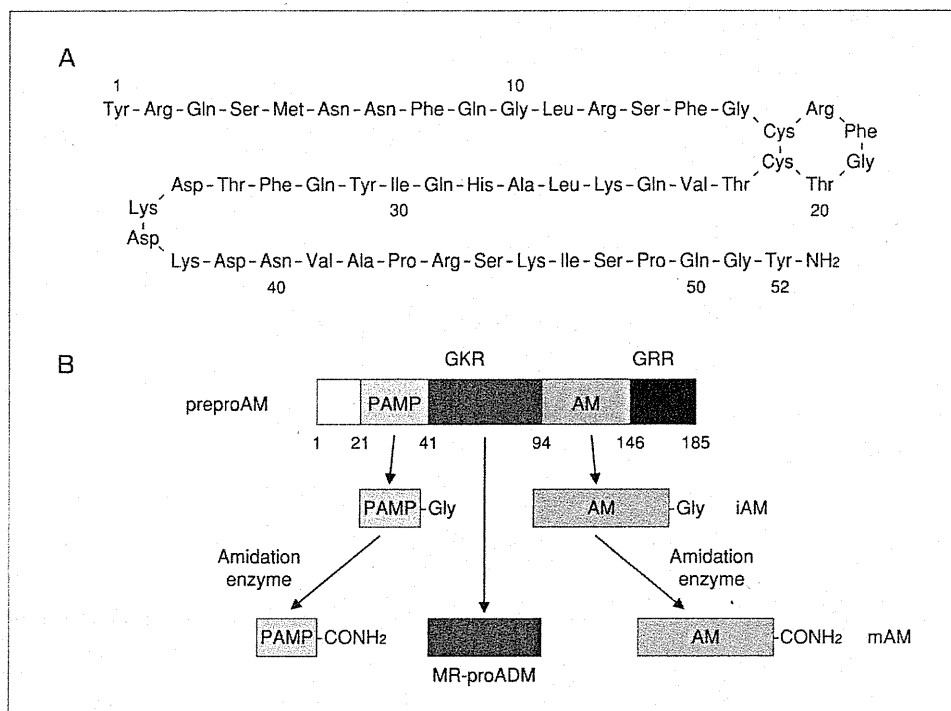


図1 ヒトアドレノメデュリン(AM)の構造と生合成  
 A: ヒトAMのアミノ酸配列.  
 B: ヒトAM前駆体の構造とAM, proadrenomedullin N-terminal 20 peptide(PAMP)およびmid-regional pro-adrenomedullin (MR-proADM)の生合成.

と心拍出量は増加する<sup>8)</sup>。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。また、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抑制し、心筋肥大抑制作用があることが示唆されている<sup>9)</sup>。

AMは体液量の調節にも重要な関与をしている。AMは腎動脈に投与した時、強力な水・ナトリウム利尿作用を示す<sup>10)</sup>。また、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副腎皮質刺激ホルモン(adrenocorticotrophic hormone; ACTH)分泌抑制作用を有す。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、摂食行動の抑制、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<sup>10)</sup>。

AM遺伝子欠損マウス homo接合体では、胎生致死であることが示されている。homo接合体では、卵膜上を走る卵黄動脈の発達が未熟であるとともに、血

表 アドレノメデュリン(AM)の代表的作用

血管拡張	血管拡張
利尿・Na利尿	利尿・Na利尿
強心作用	強心作用
アルドステロン産制抑制	アルドステロン産制抑制
酸化ストレス抑制	酸化ストレス抑制
血管平滑筋増殖抑制	血管平滑筋増殖抑制
心肥大・線維化抑制	心肥大・線維化抑制
心・腎・脳の虚血耐性	心・腎・脳の虚血耐性
炎症性サイトカイン抑制	炎症性サイトカイン抑制
抗菌効果	抗菌効果
SIRSでの臓器保護作用	SIRSでの臓器保護作用
胃腸炎改善	胃腸炎改善
血管新生・安定化	血管新生・安定化
アポトーシス抑制	アポトーシス抑制
粘膜上皮細胞増生	粘膜上皮細胞増生
骨髄細胞の末梢への動員	骨髄細胞の末梢への動員

管壁の構造自体に大きな異常を認め、血管新生作用や血管形成作用はAMの本質的な作用と思われる<sup>11)</sup>。さらに、虚血組織においてAMが血管新生を促進し病態を改善することが複数の施設から報告されてい

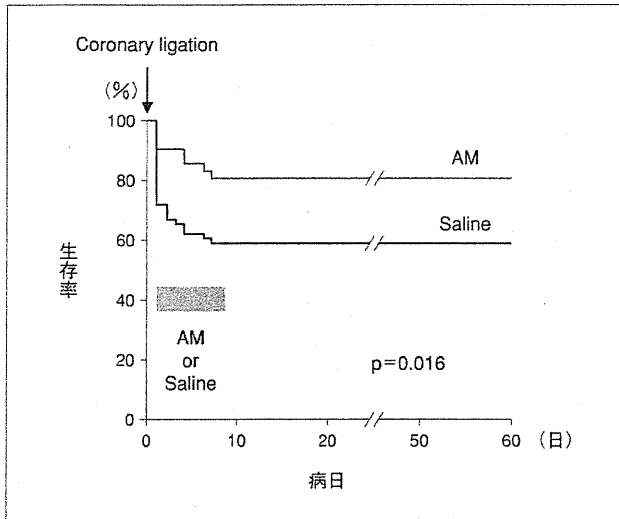


図2 急性心筋梗塞モデルラットにおけるAM投与による生存率改善効果

(文献14より改変引用)

る<sup>12)</sup>。AMの血管新生作用のメカニズムとしては血管内皮細胞に働き、phosphoinositide 3-kinase (PI3K)-Akt, ERK-MAPK, focal adhesion kinase (p125FAK) を介して血管内皮細胞の生存・遊走・増殖を促すことが報告されている。さらに、平滑筋細胞においては、AMはcAMPを介して血管拡張に働くことに加え、PI3K-Aktを介して平滑筋の遊走促進に働く<sup>13)</sup>。そのため、vascular endothelial growth factor (VEGF) と異なり、内皮細胞のみでなく平滑筋細胞を伴った成熟な血管を再生可能と考えられる。以上のような特色あるAMの血管新生作用の応用を目指して、国立循環器病研究センターと宮崎大学医学部で、血行再建術の適応とならない患者の末梢動脈疾患〔パーヴァー病と閉塞性動脈硬化症 (arteriosclerosis obliterans; ASO)〕に対して、AM単独、あるいは末梢血単核移植術とAM投与を併用する臨床研究が開始されている。

### ● 心筋梗塞におけるAMの病態生理学的意義と治療応用への可能性

急性心筋梗塞では発症数時間で血中AMは正常の2倍以上高く、2～3日で極値に達する。AM値と末

梢血管抵抗との間に有意な負の相関がみられるので、急増したAMは心筋梗塞の病態において末梢血管抵抗減少の方向に働いていると推定される。また、ラット急性心筋梗塞モデルの心筋におけるAM発現が増加している。著者らは、左冠動脈結紮によりラット急性心筋梗塞モデルを作製して、左室リモデリングや予後へのAMの効果を観察した<sup>14)</sup>。急性心筋梗塞急性期に1週間AMを投与したところ、生存率が改善し(図2)、9週後には左室非梗塞部の心筋細胞肥大と線維化が抑制され(左室リモデリングの抑制)、心不全の指標としての肺重量と左室拡張末期圧が改善した(図3)。急性心筋梗塞モデル動物に対するAM投与の有用性は、複数の施設より報告され、急性期における短期間の静脈内投与により病態と予後の改善効果が得られる可能性がある。

AMはアポトーシス抑制効果や組織再生効果があり、再灌流時の心筋障害にも効果があることが示されている<sup>15)</sup>。ラット虚血再灌流モデルを用いた検討では、AM投与により梗塞域が著明に縮小した。心筋細胞のアポトーシスは著明に抑制されており、その結果、心不全の指標となる左室拡張末期圧の上昇はAM投与により有意に抑制された。これらの効果はPI3K阻害薬併用により減弱することから、一部はPI3K-Akt経路を介した心筋細胞のアポトーシス抑制が関与することが考えられる。また、AMは心筋梗塞が発症後の骨髄内の血管内皮前駆細胞の虚血領域へ動員を増強することでも、組織修復を促進する可能性が示唆されている。

最近、国立循環器病研究センターから急性心筋梗塞患者へのAM投与治療の安全性と有効性が報告された<sup>16)</sup>。10例の急性心筋梗塞患者に対し、通常の再灌流療法に加え再灌流前からAM投与が開始され、その後12時間のAM(0.0125～0.025 μg/kg/分)が投与された。2例に血圧低下がみられたが、3カ月後の左室壁運動は有意に改善し、心臓MRで評価した梗塞サイズは有意に縮小していた。実験モデルでのデータばかりでなく臨床研究での急性心筋梗塞患者に対する有用性が示された意義は大きく、今後の開発が

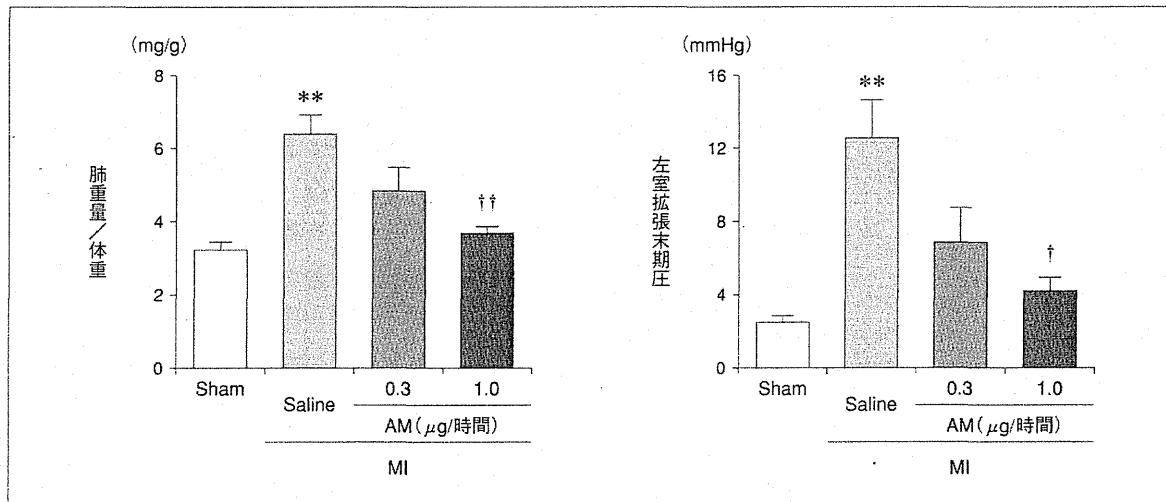


図3 急性心筋梗塞モデルラットにおける急性期AM投与による慢性期の心不全改善効果

\*\* $p < 0.01$ , vs Sham, † $p < 0.05$ , †† $p < 0.01$ , vs Saline-MI

(文献14より改変引用)

期待される。

### ● 炎症性腸疾患におけるAMの病態生理学的意義と治療応用への可能性

前述したように、血管平滑筋培養細胞へのinterleukin (IL)-1やtumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ , lipopolysaccharide (LPS)などの炎症性サイトカインの刺激によりAMの遺伝子発現が著明に亢進する。実際に、敗血症に伴う全身性炎症反応症候群(systemic inflammatory response syndrome; SIRS)患者において血中AM濃度が著明に上昇していることも明らかとなり<sup>17)</sup>、炎症との関連が注目されている。また、敗血症モデルマウスへAMを投与すると、血行動態の改善が認められるだけでなく、血漿中TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6などの炎症性サイトカインが減少することが判明している<sup>18)</sup>。このように、生体レベル、細胞レベルいずれにおいても、AMが炎症状態に対して抑制的に作用することが確認されており、今後、さまざまな炎症性疾患への治療への応用が期待される。

消化管においてもAMは食道から大腸まで広く分布しており、特に胃と大腸での発現が強い。胃潰瘍患者の潰瘍周辺組織においてもAMが強く発現してお

り<sup>19)</sup>、AMは胃粘膜傷害モデルラットに対して抗潰瘍作用を示すことが明らかとなっている<sup>20)</sup>。また、ヒト大腸癌および実験腸炎関連大腸癌において癌組織でAMの発現が増強しており、癌細胞の発育へ関与する可能性が報告されている<sup>21)</sup>。

AMが炎症惹起状態において抗炎症作用を示すことに加え、胃粘膜障害モデルに対し粘膜保護・潰瘍改善効果を示すことから、下部消化管における炎症(inflammatory bowel disease; IBD)に対しても抗炎症効果を有する可能性が考えられ、筆者らは酢酸誘発性大腸潰瘍モデルラットを用いてAMの抗潰瘍効果を検討した<sup>22)23)</sup>。ラット大腸の漿膜下に酢酸を注入することにより大腸人工潰瘍モデルを作成し、AMを経肛門的に5日間連日投与した。その結果、AM投与群では対照群と比較してAM用量依存的に潰瘍面積が縮小しており、組織学的検討でも潰瘍部への炎症細胞浸潤が軽度であった(図4)。さらに、実験的腸炎の汎用モデルであるデキストラン硫酸(dextran sulfate sodium; DSS)腸炎モデル対しAMを注腸投与したところ、AM投与群は対照群に比し、体重減少、下痢、血便が著しく軽減し、病理組織学的所見でも好中球や炎症細胞の浸潤、粘膜びらんが顕著に

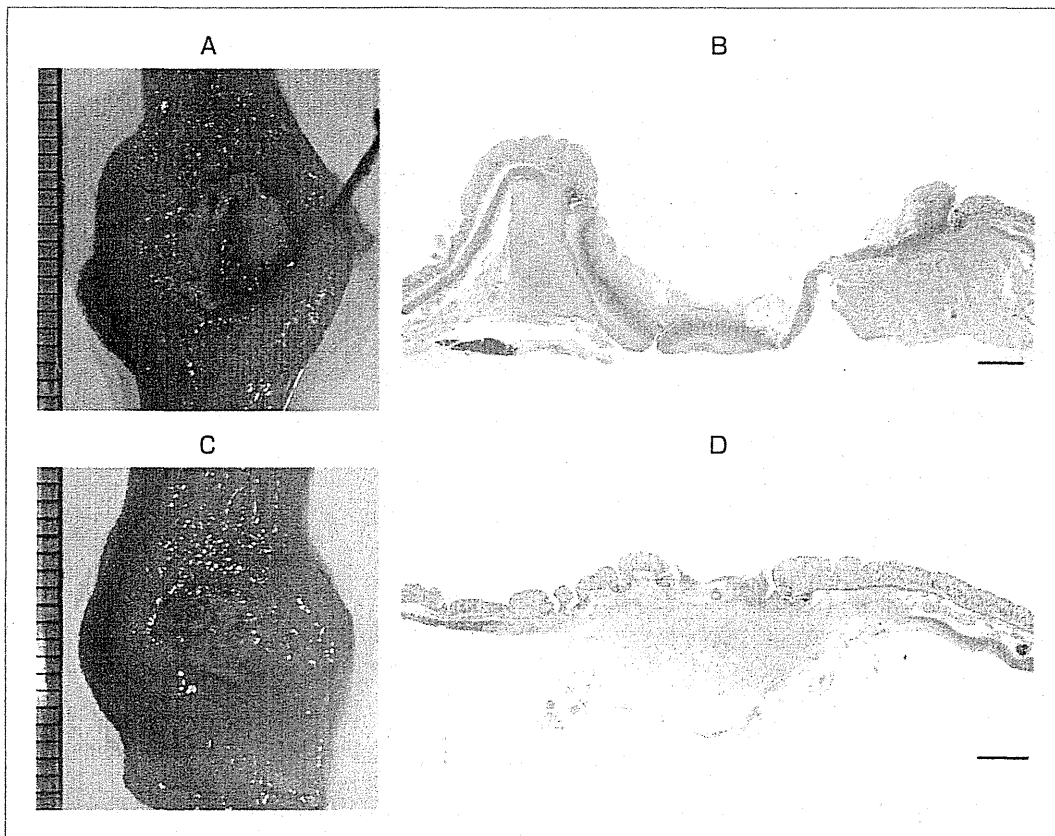


図4  
酢酸誘発性大腸潰瘍に  
対するAM注腸の治療  
効果  
A：対照群肉眼像  
B：対照群拡大像  
C：AM投与群肉眼像  
D：AM投与群拡大像  
(文献22, 26より改変引用)

軽減した<sup>24)</sup>。興味深いことに、大腸上皮間T細胞(intraepithelial T lymphocytes; IEL)からのサイトカイン産生の検討では、AM投与群において炎症性サイトカインであるINF- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-6の産生が有意に抑制され、さらに制御性サイトカインであるtransforming growth factor(TGF)- $\beta$ の増加が認められた。また、AM投与群では対照群に比し、大腸腸内細菌数の減少がみられたことも、腸炎改善効果の一因と考えられた<sup>24)</sup>。実験腸炎モデル動物に対するAMの有効性は、当教室以外にも複数の施設から報告されており、トリニトロベンゼンスルホン酸(trinitrobenzenesulfonic acid; TNBS)誘発腸炎モデル動物などの異なった腸炎モデルや腹腔内投与などの異なった投与方法でも効果があることが示されている<sup>25)</sup>。

以上の基礎的研究と、健常人や循環器疾患患者に対する臨床研究を基盤として、われわれは難治性潰瘍性大腸炎患者に対する臨床研究を開始している。60

歳代女性で強力静注療法と血球除去療法にて加療したが寛解導入が得られなかった難治性潰瘍性大腸炎患者に、AMの持続静脈投与(1.5pmol/kg/分、8時間/日、12日間)を行ったところ、顕著な粘膜再生がみられ、潰瘍が治癒し寛解に導入できた(図5)<sup>26)</sup>。

近年わが国では、食生活の欧米化により、潰瘍性大腸炎の患者数の急速な増加がみられており、今後さらに増加が懸念されている。それに伴い、ステロイドに抵抗性を示す難治性潰瘍性大腸炎も増加してきており、特色ある粘膜新生作用や強力な抗炎症作用を有したAMの難治性潰瘍性大腸炎治療薬としての開発が期待される。

## ● 結語

AMは、循環器系をはじめとする生体内の幅広い組織で生合成・分泌され、循環器系に対し多彩な作用を有している重要なペプチドである。さらに、AMの

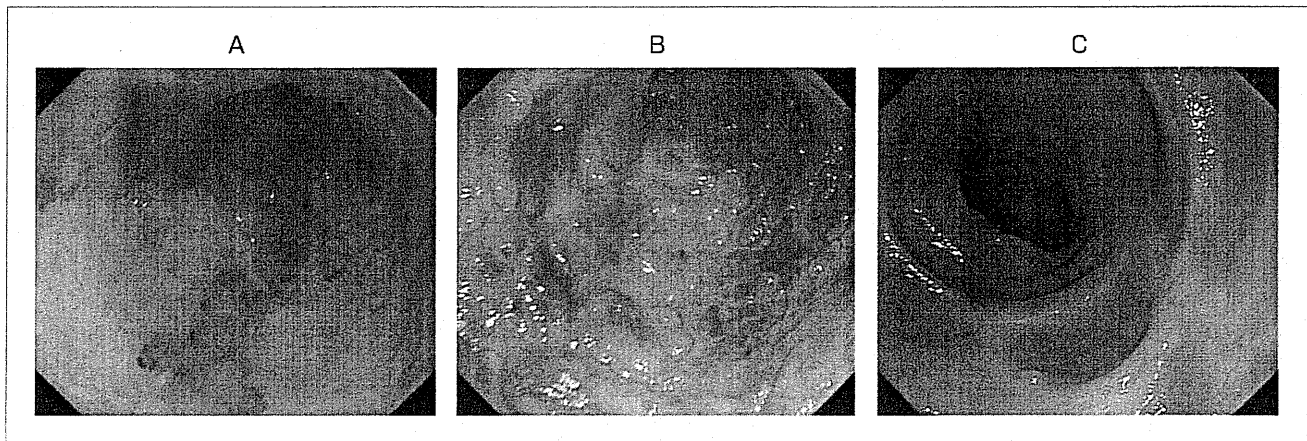


図5 難治性潰瘍性大腸炎患者へのAM投与による内視鏡所見の改善

A: 治療前, B: AM投与2週間後, C: AM投与3カ月後


(文献23, 26より改変引用)

新たな作用として、臓器保護作用、抗炎症作用、血管新生作用などが明らかとなり、循環器疾患ばかりではなくAMの臓器保護作用や抗炎症作用を利用した疾患への治療薬としての実用化が期待されている。

AMはヒトの体内に存在する生理活性物質であり抗原性がないことから、医薬品となった場合は長期にわたり安全に使用できる可能性が期待されている。

## 文 献

- 1) Kitamura K, Kangawa K, Kawamoto M, et al : Adrenomedullin : a novel hypotensive peptide isolated from human pheochromocytoma. *Biochem Biophys Res Commun* 1993 ; 192 : 553-560
- 2) Takei Y, Inoue K, Ogoshi M, et al : Identification of novel adrenomedullin in mammals : a potent cardiovascular and renal regulator. *FEBS Lett* 2004 ; 556 : 53-58
- 3) Roh J, Chang CL, Bhalla A, et al : Intermedin is a calcitonin/calcitonin gene-related peptide family peptide acting through the calcitonin receptor-like receptor/receptor activity-modifying protein receptor complexes. *J Biol Chem* 2004 ; 279 : 7264-7274
- 4) Minamino N, Kikumoto K, Isumi Y : Regulation of adrenomedullin expression and release. *Microsc Res Tech* 2002 ; 57 : 28-39
- 5) Kitamura K, Sakata J, Kangawa K, et al : Cloning and characterization of cDNA encoding a precursor for human adrenomedullin. *Biochem Biophys Res Commun* 1993 ; 194 : 720-725
- 6) Potocki M, Ziller R, Mueller C : Mid-regional pro-adrenomedullin in acute heart failure : a better biomarker or just another biomarker? *Curr Heart Fail Rep* 2012 ; 9 : 244-251
- 7) Kato J, Kitamura K : Adrenomedullin Peptides. Handbook of Biologically Active Peptides, Second Edition. San Diego : Academic Press ; 2013. p.1361-1368
- 8) Yañdle TG, Cooper GJ, Coy DH, et al : Beneficial hemodynamic and renal effects of adrenomedullin in an ovine model of heart failure. *Circulation* 1997 ; 96 : 1983-1990
- 9) Tsuruda T, Kato J, Kitamura K, et al : Adrenomedullin : a possible autocrine or paracrine inhibitor of hypertrophy of cardiomyocytes. *Hypertension* 1998 ; 31 : 505-510
- 10) Nicholls MG : Hemodynamic and hormonal actions of adrenomedullin. *Braz J Med Biol Res* 2004 ; 37 : 1247-1253
- 11) Shindo T, Kurihara Y, Nishimatsu H, et al : Vascular abnormalities and elevated blood pressure in mice lacking adrenomedullin gene. *Circulation* 2001 ; 104 : 1964-1971
- 12) Miyashita K, Itoh H, Sawada N, et al : Adrenomedullin provokes endothelial Akt activation and promotes vascular regeneration both in vitro and in vivo. *FEBS Lett* 2003 ; 544 : 86-92
- 13) Nagaya N, Mori H, Murakami S, et al : Adrenomedullin : angiogenesis and gene therapy. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2005 ; 288 : R1432-1437
- 14) Nakamura R, Kato J, Kitamura K, et al : Adrenomedullin administration immediately after myocardial infarction ameliorates progression of heart failure in rats. *Circulation* 2004 ; 110 : 426-431
- 15) Okumura H, Nagaya N, Itoh T, et al : Adrenomedullin infusion attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent pathway. *Circulation* 2004 ; 109 : 242-248
- 16) Kataoka Y, Miyazaki S, Yasuda S, et al : The first clinical pilot study of intravenous adrenomedullin administration in patients with acute myocardial infarction. *J*



*Cardiovasc Pharmacol* 2010 ; 56 : 413

- 17) Ueda S, Nishio K, Minamino N, et al : Increased plasma levels of adrenomedullin in patients with systemic inflammatory response syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 1999 ; 160 : 132
- 18) Yang S, Zhou M, Fowler DE, Wang P. Mechanisms of the beneficial effect of adrenomedullin and adrenomedullin-binding protein-1 in sepsis : down-regulation of proinflammatory cytokines. *Crit Care Med* 2002 ; 30 : 2729
- 19) Hashimoto H, Akimoto M, Maeda A, et al : Changes in vasoactive substances during gastric ulcer healing. *J Cardiovasc Pharmacol* 2000 ; 36 : S278
- 20) Hikosaka T, Tsuruda T, Nagata S, et al : Adrenomedullin production is increased in colorectal adenocarcinomas : its relation to matrix metalloproteinase-9. *Peptides* 2011 ; 32 : 1825
- 22) Ashizuka S, Ishikawa N, Kato J, et al : Effect of adrenomedullin administration on acetic acid-induced colitis in rats. *Peptides* 2005 ; 26 : 2610
- 23) Ashizuka S, Inatsu H, Inagaki-Ohara K, et al : Adrenomedullin as a potential therapeutic agent for inflammatory bowel disease. *Curr Protein Pept Sci* 2013 ; 14 : 246-255
- 24) Ashizuka S, Inagaki-Ohara K, Kuwasako K, et al : Adrenomedullin treatment reduces intestinal inflammation and maintains epithelial barrier function in mice administered dextran sulphate sodium. *Microbiol Immunol* 2009 ; 53 : 573
- 25) Gonzales-Rey E, Fernandez-Martin A, Chorny A, Delgado M : Therapeutic effect of urocortin and adrenomedullin in a murine model of Crohn's disease. *Gut* 2006 ; 55 : 824
- 26) Ashizuka S, Kita T, Inatsu H, Kitamura K : Adrenomedullin : a novel therapy for intractable ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2013 ; 19 : E26-27

## 特集

## ストローマからみた心血管病

ストローマをターゲットとした  
心血管病の治療\*鶴田 敏博\*\*  
北村 和雄\*\*Key Words : stroma, myofibroblast, angiogenesis,  
MMP, inflammation

## はじめに

超高齢化社会となったわが国では、高血圧症や動脈硬化を基盤とした疾患の患者数は増加しており、しばらくこの傾向は続くと思われる。また、薬剤の開発や医療技術・器具の革新により、以前は死に至らしめた重篤な心血管病患者の生命予後は改善した。しかし、その効果は suboptimal であり、新たな視点での診断マーカーや治療法の実現が必要である。「ストローマ細胞」は、細胞外マトリックス増生に関与する線維芽細胞、毛細血管、免疫担当細胞、炎症細胞、壁細胞(pericyte)などを総称する。これらの細胞群は心血管の構築や機能を維持する上において必須であり、低酸素や血行力学的負荷などの刺激に応答し適応するためのさまざまな細胞内分子伝達機構を活性化する<sup>1)</sup>。また、「ストローマ細胞」は心ポンプ機能や心筋細胞の生存にも影響する。一方で「ストローマ細胞」が不適切に長期間活性化すると組織リモデリングは進行し、心不全や動脈硬化・動脈瘤といった病態に陥る。過度な心線維化は心筋の拡張障害を招き、心房筋・心室筋における不整脈の発生母地となる。「ストローマ細胞」は老化と高血圧、動脈硬化関連疾患

の発生・進展に介在する重要な細胞群で、その活性機序を理解することにより、老化に伴う心血管病を予防かつ進展を抑制できる可能性がある。本稿では「ストローマ」をターゲットとした心血管病の治療と題して、①transforming growth factor(TGF)- $\beta$ 、筋線維芽細胞への形質変換の制御、②血管新生の制御、③マトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)の制御、④慢性炎症・代謝の制御に着目して、最近の知見を交えて概説する。

## 心臓ストローマ

心臓はいまでもなく心筋細胞からなるが、心筋細胞(線維)間にはコラーゲンをはじめとする細胞外マトリックスが分布する。心筋細胞は全体容積の75%を占めるが、その細胞数は30~40%に過ぎず、残りの60~70%の細胞群は「ストローマ細胞」である<sup>2)3)</sup>。その大部分は線維芽細胞であり、少数であるがマクロファージ、マスト細胞、樹状細胞が間質に分布する。末梢血管抵抗の増大に伴い心筋細胞は肥大し、線維芽細胞は増生して細胞外マトリックスの沈着が亢進する。また、上述の心筋組織内で血球系細胞数も増加する。高齢者では傷害心筋の修復機構は乏しく、コラーゲンネットワークも障害され収縮不全に陥りやすい<sup>4)</sup>。

\* Therapeutic strategy targeting for stromal cells in cardiovascular diseases.

\*\* Toshihiro TSURUDA, M.D., Ph.D. &amp; Kazuo KITAMURA, M.D., Ph.D.: 宮崎大学医学部内科学講座循環体液制御学分野(〒889-1692 宮崎県宮崎市清武町木原5200); Department of Internal Medicine, Circulatory and Body Fluid Regulation, Faculty of Medicine, University of Miyazaki, Miyazaki 889-1692, JAPAN

### 血管ストローマ

大動脈は内膜、中膜、外膜の3層からなる。中膜は1層の平滑筋細胞とその両側のエラスチンとコラーゲンが平滑筋細胞と層状ユニットを形成し血管構築を保つ。外膜には線維芽細胞、炎症細胞や微小血管が分布する。ずり応力や壁応力に対抗して平滑筋細胞や外膜線維芽細胞は増殖し、細胞外マトリックスの産生能が亢進する。加齢に伴い血管内皮細胞機能は低下し、肥厚した内膜にはコラーゲン、フィブロネクチン、プロテオグリカンといった細胞外マトリックスが沈着する<sup>5)</sup>。また、中膜のエラスチンの含有量は減少し、特に腎動脈分岐部下の腹部大動脈の減少は著しい。エラスチンの半減期は40~70年と非常に長く、成人ではエラスチンは合成されないため<sup>6)</sup>、代償性にコラーゲン合成が亢進する。動脈硬化プラーク巣には、マクロファージ、Tリンパ球など種々の炎症細胞が集簇し、炎症性サイトカインを産生・分泌する。大動脈中膜~外膜側にも動脈硬化の進行度に伴い、マクロファージ、リンパ球やマスト細胞などが集簇し、後述の栄養血管(vasa vasorum)が増殖する。

### TGF- $\beta$ と筋線維芽細胞への形質転換の制御

筋線維芽細胞(myofibroblast)は超微細形態学上、線維芽細胞と平滑筋細胞の中間に位置し、細胞質内に $\alpha$ -アクチンを持ち収縮能を有する<sup>7)</sup>。筋線維芽細胞への形質転換に伴い、細胞分裂・増殖能、傷害局所への遊走能が亢進し、細胞外マトリックスの産生能が増強する。しかし、その活性が遷延すると(病的な)線維化を呈する。筋線維芽細胞は急性心筋梗塞後の治癒過程<sup>8)</sup>、高血圧性肥大大心<sup>9,10)</sup>、冠動脈形成(拡張)術後<sup>11)</sup>、一過性に観察される。TGF- $\beta$ は線維芽細胞を筋線維芽細胞へ形質転換させる強力な因子として知られる。TGF- $\beta$ は高血圧性肥大大心<sup>10)</sup>、心房細動を有する心房筋や不全心室筋内に強く発現する<sup>12)</sup>。アンジオテンシンII、アルドステロンなどの血管作動性物質<sup>7,13,14)</sup>、NAD(P)H oxidase(Nox)4や $\alpha$ 11 integrin<sup>15,16)</sup>はTGF- $\beta$ /Smadシグナリングを介して、もしくは互いに協調して筋線維芽細胞

への形質転換を促す。さらにTGF- $\beta$ は内皮細胞を間葉系様細胞に形態変化させ(endothelial mesenchymal transition: EndMT)、傷害された心筋局所での線維芽細胞の~30%はEndMT由来である<sup>17,18)</sup>。それゆえ、TGF- $\beta$ /Smad系への介入(TGF- $\beta$ の中和、TGF- $\beta$ 受容体阻害、Smadシグナリングの阻害)ならびにその上流のTGF- $\beta$ 産生・活性を亢進させる分子や刺激因子の制御は線維化抑制の候補としてあげられる<sup>9)</sup>。B-typeナトリウム利尿ペプチド/cGMPはTGF- $\beta$ にかかわる遺伝子発現を制御して線維化を抑制する<sup>19)</sup>。可溶性グアニリルシクラーゼ/cGMPやアドレノメデュリン/cAMPシグナリングはともに抗線維化作用を有し<sup>20)</sup>、その機序にTGF- $\beta$ 発現抑制と筋線維芽細胞への形質転換抑制が含まれた<sup>10)</sup>。大動脈瘤壁でもTGF- $\beta$ の発現が亢進するが、TGF- $\beta$ が瘤形成に対して保護因子であるか促進因子かは定かでない。マルファン症候群のマウスモデルで上行大動脈は拡大するが、TGF- $\beta$ シグナリングは瘤形成促進にかかわる<sup>21)</sup>。一方、アンジオテンシンII投与下のアポリポプロテインE欠損マウスに抗TGF- $\beta$ 抗体を投与すると腎動脈分岐上部大動脈の瘤形成が促進するので、TGF- $\beta$ は瘤形成抑制因子と考えられる<sup>22)</sup>。

### 血管新生の制御

心筋線維間を走行する毛細血管は酸素や栄養を心筋細胞へ供給する経路として重要である。血管新生は組織の低酸素により誘導されるhypoxia inducible factor(HIF)-1とvascular endothelial growth factor(VEGF)が重要な役割を担う<sup>23)</sup>。血管新生抑制効果を有する分子標的抗がん剤は心不全の発症を高める確率の高いことが知られる<sup>24)</sup>。不全心では心筋細胞の肥大に比べて毛細血管数が相対的に少なく<sup>25)</sup>、VEGF-Bの遺伝子導入<sup>26)</sup>や内因性の血管新生阻害因子(angiotatin, endostatin, tumstatin)を抑制<sup>27)</sup>することにより代償性心肥大から収縮不全への移行を抑制できたと報告される。血管周囲の線維芽細胞はVEGF, fibroblast growth factor(FGF)2、後述のMMPの産生源であり、これらは協調してcapillary tube formationを促す<sup>28,29)</sup>。一方、大動脈壁の栄養は血管内腔側からの拡散と外膜から血管壁を貫く栄養血管(vasa



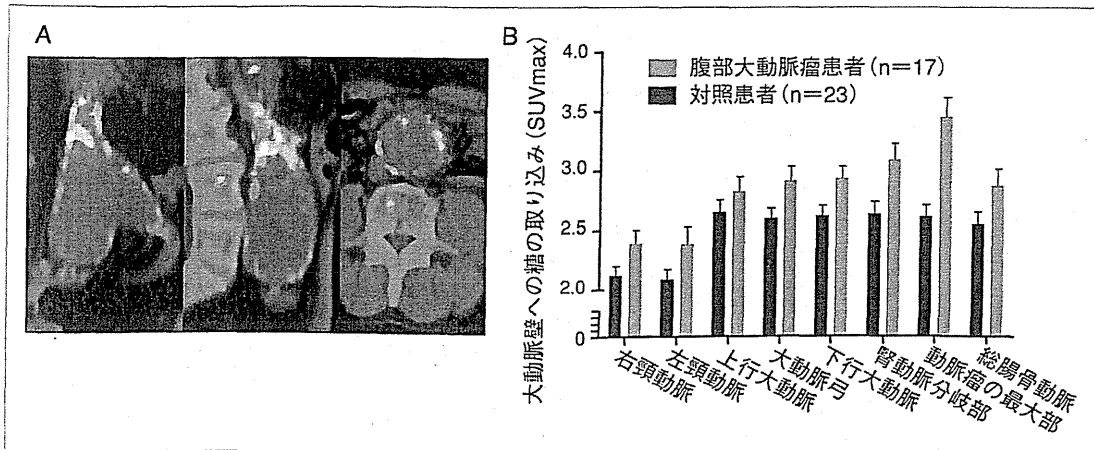


図1 62歳男性、腹部大動脈瘤患者(最大瘤径62 mm)のPET-CT像(A)と腹部大動脈瘤患者における18-fluoro-deoxyglucose (FDG)の大動脈壁への取り込み(B)  
 18-FDGの取り込みは腹部大動脈瘤部位のみならず、拡張していないほかの部位の大動脈でも対照群と比較して亢進しており、腹部大動脈瘤は血管慢性炎症の部分現象と捉えることができる。(文献<sup>45</sup>を改変)

vasorum)による。内膜および中膜の内側1/3は動脈内腔の流血からの浸透によって栄養されるが、ユニット数が29以上になるとvasa vasorumが血管外膜側を栄養するようになるという<sup>30</sup>。胸部大動脈の中膜ユニット数が56であるのに対して腹部大動脈は28であるため、腹部大動脈の中膜には無血管領域が存在し、中膜が菲薄化しやすい要因となる。低酸素によるHIFやVEGF遺伝子の誘導は加齢とともに減少するため中膜の菲薄化に拍車がかかる<sup>31</sup>。一方で、動脈硬化の程度とvasa vasorumの密度には正の相関がある<sup>32</sup>。ヒト冠動脈プラーク内の微小血管の97%はvasa vasorum由来とされる<sup>33</sup>。腹部大動脈瘤の進展にもvasa vasorumの増生が関与することが示唆される<sup>34</sup>。新生血管の増生に伴い炎症細胞を局所へ動員することになり<sup>35</sup>、動脈硬化プラークや血管壁自体を脆弱化させ、病態を修飾する可能性がある<sup>36)~38)</sup>。以上から、心血管病の進展に血管新生が有用か、もしくは害となるかは個々の病態によると思われる。

### MMPの制御

細胞外マトリックスの不適切な改変は病態を修飾する可能性があり、治療標的となる。細胞外マトリックスの代謝回転は合成と分解のバランスによるが、分解を司る主役はMMPファミリー

である。MMPは細胞外マトリックスを消化する酵素群で20種類以上からなる<sup>39</sup>。線維芽細胞、マクロファージ、マスト細胞などの「ストローマ細胞」はMMPの重要な産生細胞である。加齢による心線維化は細胞外マトリックス合成能の亢進よりは、MMP-1、2活性の低下によるところが大きいという<sup>40</sup>。これらは内因性阻害因子であるtissue inhibitor of MMP (TIMP)により制御される。一方、心筋梗塞後の治癒機転や不全心ではコラーゲンの増生が観察されるが、同時にMMP活性も亢進しており心拡大や心室瘤といった病態へ進行する<sup>39)41)</sup>。アンジオテンシン II やアルドステロンは線維化を促進するが、これらの阻害薬は細胞外マトリックスの代謝回転を介して生命予後の改善に寄与すると考えられる (RALES, EPHEBUS study)。血管壁は加齢によりエラスチンの断片化(fragmentation)が観察されるが、これはMMP-2活性の亢進による<sup>5</sup>。また、MMPは細胞接着や細胞の生存・遊走にも関与することが明らかとなっている。さらにMMP-14は「線維化促進因子」としての一面を有し<sup>42</sup>、ネットとしての細胞外マトリックスの制御機構は大変複雑である。以上より、正常な細胞外マトリックス代謝に影響しない特異的な阻害剤の開発と時・空間的に活性化される個々のMMP/TIMPの動向を把握した治療戦略が必要である。

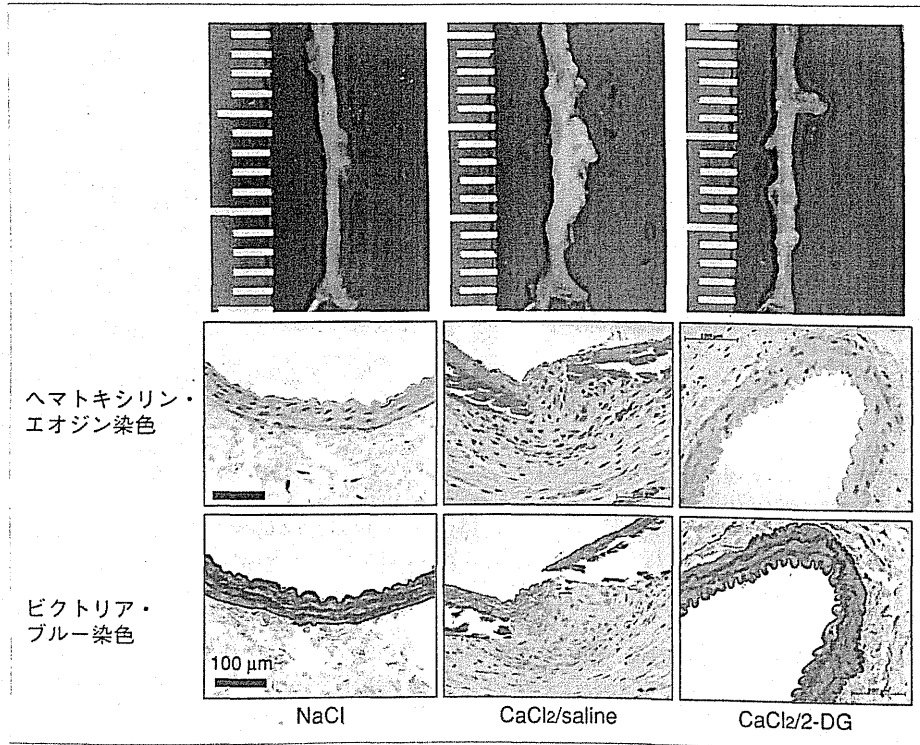


図2 2-デオキシグルコース(2-DG)の腹部大動脈瘤形成抑制効果  
塩化カルシウム(CaCl<sub>2</sub>)塗布による腹部大動脈瘤マウスモデルに2-DG(1g/日)を1か月間腹腔内投与すると瘤形成が抑制(予防)できた。ビクトリア・ブルー染色では2-DG投与により大動脈壁内のエラスチン構造が比較的保たれていることを示している。NaCl: 塩化ナトリウム  
(文献<sup>45</sup>を改変)

### 慢性炎症・代謝の制御

心臓へ圧負荷を加えると線維化に先行してマクロファージは心筋間質へ集簇することから<sup>9)</sup>、炎症の制御は心血管リモデリングの治療標的になると考えられる。マクロファージは本来、傷害された心筋細胞の除去にあたるはずであるが、炎症性サイトカインやMMPの不適切な産生・活性は細胞外マトリックスの改変に関与する。われわれは、「マスト細胞」が腹部大動脈瘤壁の中～外膜側に瘤径に応じて分布し、その進展に関連性のあることを報告した<sup>33)</sup>。マスト細胞が遺伝的に欠損したラットでは野生型に比べて腹部大動脈瘤が形成されにくく、さらにマスト細胞膜安定化剤トラニラストを野生型ラット動脈瘤モデルへ投与すると瘤形成が抑制された。その機序としては、マスト細胞はマクロファージと協調してMMP-9産生を促し、その間にはインター

フェロン $\gamma$ が介在していた。

マクロファージは糖利用率が高く、positron emission tomography(PET)では頸動脈や上行大動脈の動脈硬化プラークに一致して18-fluoro-deoxyglucose(FDG)が集積する<sup>44)</sup>。われわれは人工血管置換術を行う予定の腹部大動脈瘤患者17例にPET-CTを行ったところ、対照群(23例)と比べ18-FDGの取り込みが増加することを見出した(図1-A, B)<sup>45)</sup>。術中に瘤壁を採取し、18-FDG取り込み部位に対応した瘤壁のglucose transporter(GLUT)-3の蛋白発現の間には有意な相関のあることを明らかにした。GLUT-3発現の主な細胞はCD68陽性マクロファージであった。マクロファージはMMP-9の主な産生源であり、腹部大動脈瘤の進展・破裂に関与することが知られる。そこでわれわれは、マクロファージの糖代謝を制御することにより、動脈瘤の進展抑制効果を発揮できないかと仮説を立てた。培養マクロファ-

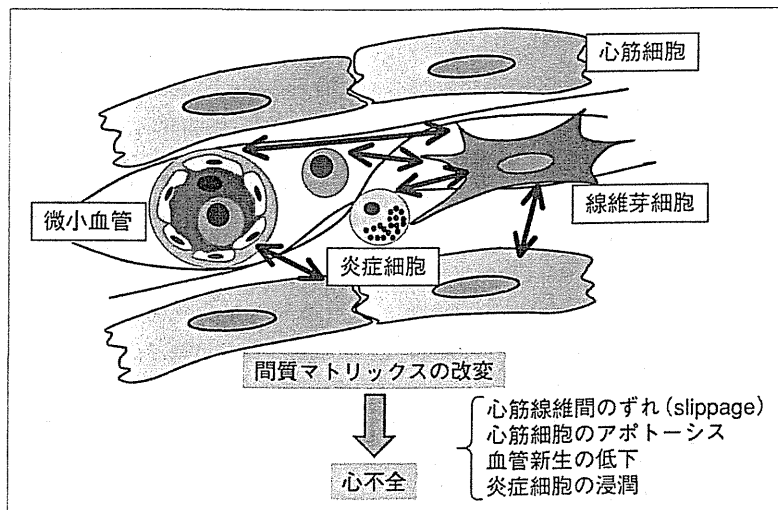


図3 ストロマ細胞群からみた心臓内の細胞間クロストーク

ジ細胞にグルコースアナログである 2-デオキシグルコース (2-DG) を投与すると MMP-9 活性が低下した。また、塩化カルシウム塗布マウス腹部大動脈瘤モデルへ 2-DG を投与すると瘤形成が抑制されることを見出した (図 2)。この知見は炎症と代謝からストロマ細胞を制御することにより細胞外マトリックス改変を制御できる可能性があることを示唆する。

おわりに

図 3 にストロマ細胞からみた心臓内の細胞間グロストークを描いた。ストロマ細胞は心血管の構築・機能に必須な要素であるばかりでなく、病態の進展機序に深くかかわっている。また、ストロマ細胞の機能は加齢に伴い変化し病態を修飾する可能性がある。ネットワークとしてみたその制御は大変複雑であるが、心血管ストロマを構成する細胞群のさらなる理解が新規の診断法や治療法の開発に必要と考えられる。

文 献

1) Takeda N, Manabe I, Uchino Y, et al. Cardiac fibroblasts are essential for the adaptive response of the murine heart to pressure overload. *J Clin Invest* 2010 ; 120 : 254.  
 2) Zak R. Cell proliferation during cardiac growth. *Am*

*J Cardiol* 1973 ; 31 : 211.  
 3) Frank JS, Langer GA. The myocardial interstitium : its structure and its role in ionic exchange. *J Cell Biol* 1974 ; 60 : 586.  
 4) Biernacka A, Frangogiannis NG. Aging and cardiac fibrosis. *Aging Dis* 2011 ; 2 : 158.  
 5) Lakatta EG, Levy D. Arterial and cardiac aging : major shareholders in cardiovascular disease enterprises : Part I : aging arteries : a "set up" for vascular disease. *Circulation* 2003 ; 107 : 139.  
 6) Shah PK. Inflammation, metalloproteinases, and increased proteolysis : an emerging pathophysiological paradigm in aortic aneurysm. *Circulation* 1997 ; 96 : 2115.  
 7) Powell DW, Mifflin RC, Valentich JD, et al. Myofibroblasts. I. Paracrine cells important in health and disease. *Am J Physiol* 1999 ; 277 : C1.  
 8) Willems IE, Havenith MG, De Mey JG, et al. The alpha-smooth muscle actin-positive cells in healing human myocardial scars. *Am J Pathol* 1994 ; 145 : 868.  
 9) Kuwahara F, Kai H, Tokuda K, et al. Transforming growth factor- $\beta$  function blocking prevents myocardial fibrosis and diastolic dysfunction in pressure-overloaded rats. *Circulation* 2002 ; 106 : 130.  
 10) Tsuruda T, Kato J, Hatakeyama K, et al. Antifibrotic effect of adrenomedullin on coronary adventitia in

- angiotensin II-induced hypertensive rats. *Cardiovasc Res* 2005 ; 65 : 921.
- 11) Wilcox JN, Okamoto E, Nakahara K, et al. Perivascular responses after angioplasty which may contribute to postangioplasty restenosis : a role for circulating myofibroblast precursors? *Ann N Y Acad Sci* 2001 ; 947 : 68.
  - 12) Rahmutula D, Marcus GM, Wilson EE, et al. Molecular basis of selective atrial fibrosis due to overexpression of transforming growth factor- $\beta$ 1. *Cardiovasc Res*. In press 2013.
  - 13) Lenga Y, Koh A, Perera AS, et al. Osteopontin expression is required for myofibroblast differentiation. *Circ Res* 2008 ; 102 : 319.
  - 14) Campbell SE, Katwa LC. Angiotensin II stimulated expression of transforming growth factor- $\beta$ 1 in cardiac fibroblasts and myofibroblasts. *J Mol Cell Cardiol* 1997 ; 29 : 1947.
  - 15) Cucoranu I, Clempus R, Dikalova A, et al. NAD(P)H oxidase 4 mediates transforming growth factor-beta1-induced differentiation of cardiac fibroblasts into myofibroblasts. *Circ Res* 2005 ; 97 : 900.
  - 16) Talior-Volodarsky I, Connelly KA, Arora PD, et al.  $\alpha$ 11 integrin stimulates myofibroblast differentiation in diabetic cardiomyopathy. *Cardiovasc Res* 2012 ; 96 : 265.
  - 17) Zeisberg EM, Tarnavski O, Zeisberg M, et al. Endothelial-to-mesenchymal transition contributes to cardiac fibrosis. *Nat Med* 2007 ; 13 : 952.
  - 18) Ghosh AK, Bradham WS, Gleaves LA, et al. Genetic deficiency of plasminogen activator inhibitor-1 promotes cardiac fibrosis in aged mice : involvement of constitutive transforming growth factor-beta signaling and endothelial-to-mesenchymal transition. *Circulation* 2010 ; 122 : 1200.
  - 19) Kapoun AM, Liang F, O'Young G, et al. B-type natriuretic peptide exerts broad functional opposition to transforming growth factor- $\beta$  in primary human cardiac fibroblasts : fibrosis, myofibroblast conversion, proliferation, and inflammation. *Circulation* 2004 ; 94 : 453.
  - 20) Masuyama H, Tsuruda T, Kato J, et al. Soluble guanylate cyclase stimulation on cardiovascular remodeling in angiotensin II-induced hypertensive rats. *Hypertension* 2006 ; 48 : 972.
  - 21) Habashi JP, Judge DP, Holm TM, et al. Losartan, an AT1 antagonist, prevents aortic aneurysm in a mouse model of Marfan syndrome. *Science* 2006 ; 312 : 117.
  - 22) Wang Y, Ait-Oufella H, Herbin O, et al. TGF-beta activity protects against inflammatory aortic aneurysm progression and complications in angiotensin II-infused mice. *J Clin Invest* 2010 ; 120 : 422.
  - 23) Pugh CW, Ratcliffe PJ. Regulation of angiogenesis by hypoxia : role of the HIF system. *Nat Med* 2003 ; 9 : 677.
  - 24) Tocchetti CG, Gallucci G, Coppola C, et al. The emerging issue of cardiac dysfunction induced by antineoplastic angiogenesis inhibitors. *Eur J Heart Fail* 2013 ; 15 : 482.
  - 25) Sano M, Minamino T, Toko H, et al. p53-induced inhibition of Hif-1 causes cardiac dysfunction during pressure overload. *Nature* 2007 ; 446 : 444.
  - 26) Huusko J, Lottonen L, Merentie M, et al. AAV9-mediated VEGF-B gene transfer improves systolic function in progressive left ventricular hypertrophy. *Mol Ther* 2012 ; 20 : 2212.
  - 27) Nikolova A, Ablasser K, Wyler von Ballmoos MC, et al. Endogenous angiogenesis inhibitors prevent adaptive capillary growth in left ventricular pressure overload hypertrophy. *Ann Thorac Surg* 2012 ; 94 : 1509.
  - 28) Hughes CC. Endothelial-stromal interactions in angiogenesis. *Curr Opin Hematol* 2008 ; 15 : 204.
  - 29) Berthod F, Germain L, Tremblay N, et al. Extracellular matrix deposition by fibroblasts is necessary to promote capillary-like tube formation in vitro. *J Cell Physiol* 2006 ; 207 : 491.
  - 30) Scotland RS, Vallance PJ, Ahluwalia A. Endogenous factors involved in regulation of tone of arterial vasorum : implications for conduit vessel physiology. *Cardiovasc Res* 2000 ; 46 : 403.
  - 31) Rivard A, Berthou-Soulie L, Principe N, et al. Age-dependent defect in vascular endothelial growth factor expression is associated with reduced hypoxia-inducible factor 1 activity. *J Biol Chem* 2000 ;