

# 新しい生体内ホメオスターシス維持機構に基づく アンチエイジング法の開発

信州大学大学院医学系研究科循環病態学講座

新藤 隆行、桜井 敬之、神吉 昭子

Adrenomedullin (AM), originally identified as a vasodilating peptide, is now recognized to be a pleiotropic molecule possessing various bioactivities. We have reported that knockout mice deficient in AM or RAMP2, an AM-receptor accessory protein, show embryonically lethal, and proved that RAMP2 is the critical determinant of the vascular functions of AM. However, not only in the vascular system, AM and RAMP2 are highly expressed in adipose tissue. To clarify the pathophysiological roles of AM-RAMP2 system in adult, we performed conditional gene targeting of RAMP2. Using gene-targeted mice, we found that AM-RAMP2 system plays critical roles of maintaining homeostasis in adult. AM-RAMP2 system can thus be a novel therapeutic target of anti-aging.

## 1. 緒言

生体は、健康な状態を維持していく上で、様々な恒常性維持(ホメオスターシス)の制御システムを有している。生体内生理活性物質とその受容体システムは、元来生体が備えたホメオスターシス制御システムの一つであるが、一方でその調節異常は、老化現象の進行や様々な生活習慣病の原因となる。こうしたホメオスターシス制御システムを統合的に理解し、人為的に介入・操作することができれば、様々な病気の予防やアンチエイジング法の開発につながる事が期待される。

アドレノメデュリン(adrenomedullin:AM)は、ヒト褐色細胞腫から分離された生理活性ペプチドである<sup>1)</sup>。AMは血管、心臓、腎臓など様々な臓器で産生・分泌され、血管拡張作用、抗酸化作用、抗炎症作用、臓器保護作用など多彩な生理活性を有する因子である。AMは脂肪組織にも由来し、血中の1/4は脂肪組織由来とされている。また、ヒトの血中AM濃度は肥満に伴い上昇し、Body mass indexに相関することも報告されており<sup>2)</sup>、AMはメタボリックシンドロームの病態にも重要な役割を持つと考えられている。

一方、AM受容体はGタンパク共役型受容体であるCLR(calcitonin receptor-like receptor)という7回膜貫通型受容体であるが、CLRには、RAMP(receptor activity-modifying protein)という1回膜貫通型タンパクが結合し、受容体機能を制御している<sup>3)</sup>。RAMPには1、2、3の3種類のサブアイソフォームがあり、CLRがRAMP2またはRAMP3と結合することによりAM受容体として機能する。



Anti-aging based on a novel system maintaining homeostasis in the body

Takayuki Shindo\*, Takayuki Sakurai, Akiko Kamiyoshi

Department of Cardiovascular Research, Shinshu University Graduate School of Medicine

我々はこれまでに、AMとAMの受容体活性調節タンパクであるRAMP2のノックアウトマウスを樹立し、AMホモノックアウトマウス(AM<sup>-/-</sup>)とRAMP2ホモノックアウトマウス(RAMP2<sup>-/-</sup>)では、共に血管形成異常や浮腫が認められ、胎生致死となることを明らかにした。このことから、AMの血管における機能がRAMP2によって規定されていることがはじめて明らかとなった<sup>4,5)</sup>。

本研究では、通常のジーンターゲティングの方法に加えて、Cre-loxPシステムを用いたコンディショナルターゲティングの方法により、血管あるいは脂肪組織特異的なRAMP2ノックアウトマウスを作成し、成体におけるAM-RAMP2システムによる、ホメオスターシス制御機構の詳細なメカニズムについて検討を行った。

## 2. 実験

RAMP2のエクソン2~4の両側にloxPサイトを配置したRAMP2<sup>lox</sup>マウスを樹立し、CAG-Creトランスジェニックマウスと交配することで、全身でRAMP2を欠損するマウス(RAMP2<sup>-/-</sup>)を作成した。ホモノックアウトマウス(RAMP2<sup>-/-</sup>)は胎生致死となるため、成体が得られるヘテロノックアウトマウス(RAMP2<sup>+/-</sup>)を用いて検討を行った。次に血管におけるRAMP2の病態生理学的意義を明らかとするために、RAMP2<sup>lox</sup>マウスと、血管内皮細胞特異的にCreリコンビナーゼを発現するvascular endothelial (VE)-cadherin Creトランスジェニックマウスを交配し、Cre-loxPシステムにより、血管内皮細胞特異的なRAMP2ノックアウトマウス(E-RAMP2<sup>-/-</sup>)を作成した。さらに脂肪細胞特異的にCreリコンビナーゼを発現するaP2CreトランスジェニックマウスとRAMP2<sup>lox</sup>マウスを交配し、脂肪細胞特異的なRAMP2ノックアウトマウス(A-RAMP2<sup>-/-</sup>)を作成した。

これらの遺伝子改変マウスを用いて、野生型(WT)マウスと表現型を比較検討することで、RAMP2欠損に伴う生体内ホメオスターシス破綻と老化との関係について検討を行った。

### 3. 結果

全身型のRAMP2ヘテロノックアウトマウス(Conventional RAMP2<sup>+/-</sup>)は成体まで成長し、外見上の変化は認めないが、1年齢を超える加齢マウスでは、肺、腎臓、肝臓といった主要な臓器に血管炎様の細胞浸潤が自然発症し、胸部大動脈では、早期老化マーカーであるSA-β-gal染色陽性の所見が認められた。さらに、炎症性接着因子であるICAM-1, VCAM-1が、8週齢の若年期から発現が亢進していた。一方、E-RAMP2<sup>-/-</sup>では、RAMP2<sup>+/-</sup>より、病変がさらに早期に出現した(図1)。血管炎様の所見は若年期でも認められ、6ヶ月齢程になると、より著明となった。浸潤細胞は、CD3やF4/80陽性細胞が多いことからTリンパ球やマクロファージの浸潤による慢性炎症が生じていることが示唆された。

これらの炎症細胞浸潤のメカニズムを検討するために、WTとRAMP2<sup>+/-</sup>マウスから、肝臓類洞内皮細胞を初代培養し、マクロファージの接着実験を行った。RAMP2<sup>+/-</sup>由来の内皮細胞では、WTと比較して、マクロファージの接着性が亢進していた。また、Real-time PCR法により内皮細胞の遺伝子発現を検討したところ、RAMP2<sup>+/-</sup>の肝臓類洞内皮細胞では、VCAM-1の発現亢進、eNOSの発現低下が認められた。これらのことから、RAMP2発現が低下したマウスでは、加齢と共に血管の恒常性が失われ、炎症性接着因子の発現が亢進することで、炎症細胞が接着しやすくなり、各臓器内の血管炎症の原因になると考えられた。

一方で、E-RAMP2<sup>-/-</sup>のほとんどは、周産期に致死であったが、一部のE-RAMP2<sup>-/-</sup>では成体が得られ、これらを用いて病理学的解析を中心に解析を進めた。E-RAMP2<sup>-/-</sup>の肝臓においては、6ヶ月齢以上の加齢マウスで、肝硬変

様の形態変化が認められた(図2)。肝臓組織のSirius red染色による検討では、通常の肝硬変とは異なり、線維化は肝細胞側ではなく、血管の走行に沿って進行していた。

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

以上の結果から、血管内皮細胞のRAMP2が失われると、血管の恒常性が障害を受け、加齢と共に、各臓器の機能不全の原因になると考えられた。

一方、A-RAMP2<sup>-/-</sup>マウスは、普通食投与下において5週齢の若年期よりWTマウスと比較して体重が有意に増加した(図4)。A-RAMP2<sup>-/-</sup>は、白色脂肪組織においてRAMP2遺伝子がWTマウスの約30%に低下していることが確認された。エネルギー消費を調べるため、呼吸代謝測定を行った結果、普通食投与下において、A-RAMP2<sup>-/-</sup>はWTマウスと比較して、明期、暗期ともに酸素消費量の低下と呼吸商の上昇が見られた(図5)。呼吸商が上昇していることから、脂肪を消費しにくく、肥満になりやすいと考えられた。

次に、病理解析を行った。A-RAMP2<sup>-/-</sup>はWTマウスと比較して、個々の脂肪細胞が肥大化し(図6A)、間質におけるF4/80免疫染色陽性のマクロファージ浸潤も増加していた(図6B)。さらに加齢マウスでは、脂肪組織間質の著明な線維化の亢進が認められた(図6C)。また、皮下脂肪組織において、若年期より皮下脂肪層の肥厚と(図7A)、

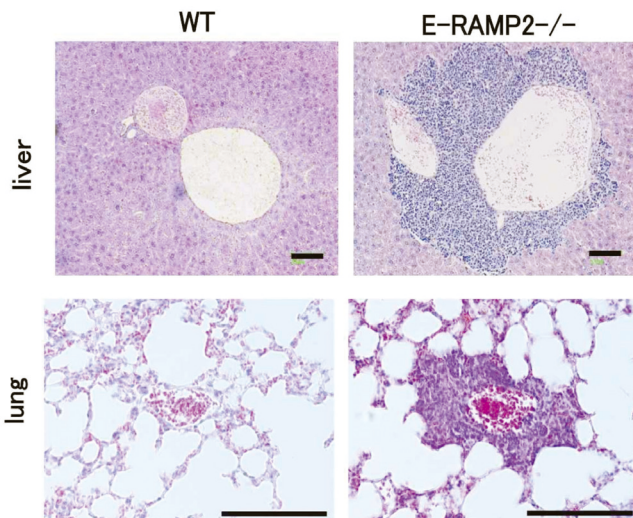


図1 6ヶ月齢E-RAMP2<sup>-/-</sup>マウスの肝臓と腎臓の病理像 (Scale bars = 100μm)

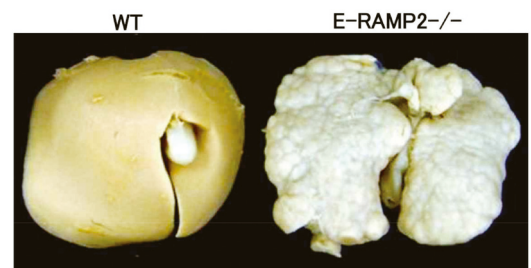


図2 6ヶ月齢E-RAMP2<sup>-/-</sup>マウスの肝臓の外観

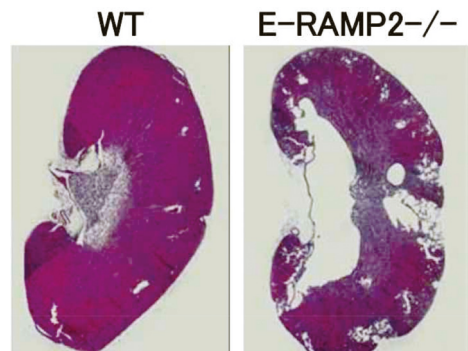


図3 6ヶ月齢E-RAMP2<sup>-/-</sup>マウスの腎臓の断面像

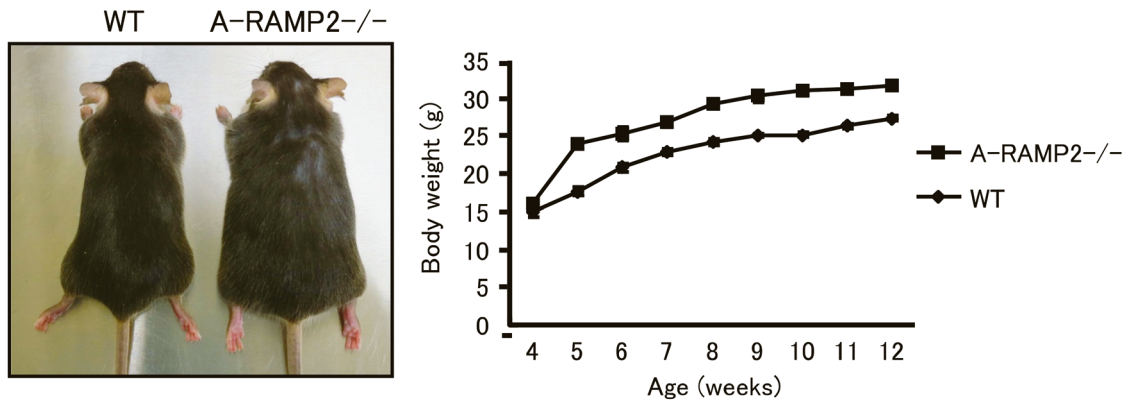


図4 A-RAMP2<sup>-/-</sup> マウスの外観と体重増殖曲線

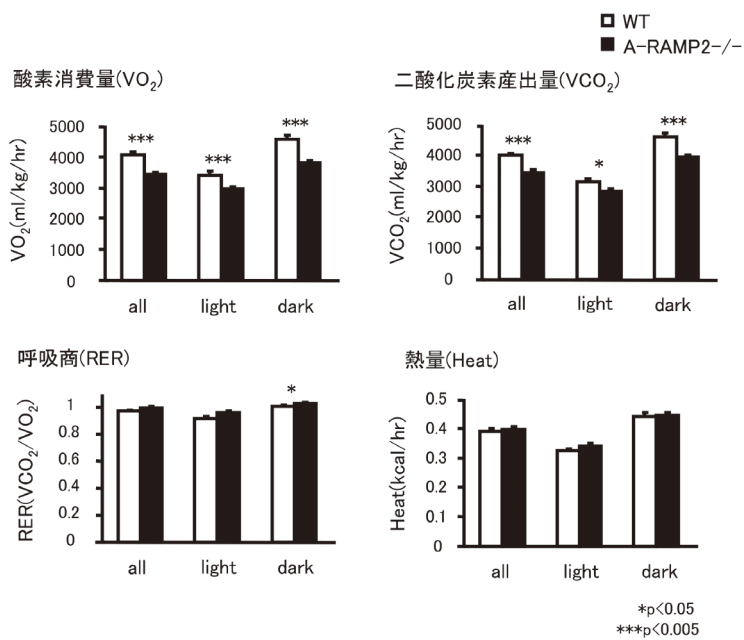


図5 A-RAMP2<sup>-/-</sup> マウスの呼吸代謝測定

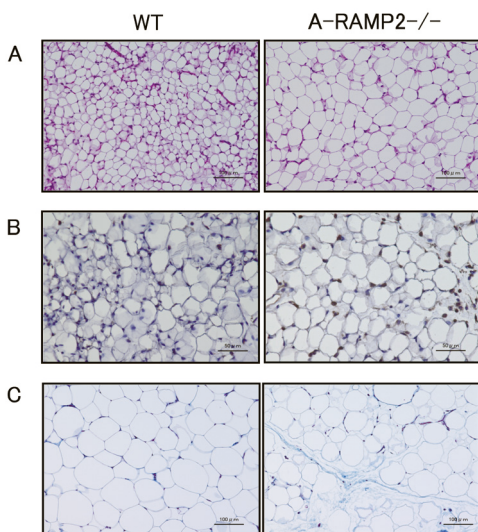


図6 A-RAMP2<sup>-/-</sup> マウスの白色脂肪組織の病理像  
A: HE 染色  
B: F4/80 免疫染色  
C: Masson Trichrome 染色

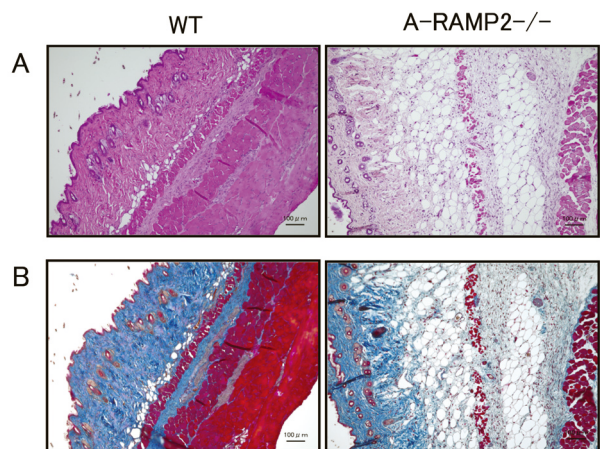


図7 A-RAMP2<sup>-/-</sup> マウスの皮下脂肪組織の病理像  
A: HE 染色  
B: Masson Trichrome 染色

線維化の亢進が認められた (図 7B)。A-RAMP2<sup>-/-</sup>では、皮下組織において、ビメンチン免疫染色陽性の線維芽細胞の数も増加しており、トリジンブルー陽性の肥満細胞の数も増加していた。Real-time PCR法により皮膚における遺伝発現を検討したところ、A-RAMP2<sup>-/-</sup>ではRAMP2の発現がWTの4割程度まで低下し、一方でAMは代償性に約3倍に増加していた。A-RAMP2<sup>-/-</sup>の皮膚ではTNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , MCP-1といった炎症性サイトカイン、ケモカインの発現がWTの2倍程度まで発現亢進しており、一方で、IL-10といった抗炎症性サイトカインは2割程度まで発現が抑制されていた。

脂肪細胞には、エネルギーを蓄積する白色脂肪細胞の他にも、熱産生を行う褐色脂肪細胞、白色脂肪組織中に存在し、熱産生を行うベージュ脂肪細胞が存在し、それぞれが異なる機能を有する。

そこで次に、褐色脂肪組織の解析を行った。褐色脂肪組織においては、白色脂肪組織と同様にA-RAMP2<sup>-/-</sup>ではRAMP2遺伝子が野生型マウスの約20%に低下していることが確認された。褐色脂肪組織のリアルタイムPCRによる遺伝子発現解析により、普通食投与下において、A-RAMP2<sup>-/-</sup>は野生型マウスと比較して、脂肪酸酸化系遺伝子であるACSL1とミトコンドリア関連遺伝子であるATP synthase, COX IV, UCP1などの発現低下が見られた。従って、褐色脂肪組織のミトコンドリア機能の維持とエネルギー消費にも、AM-RAMP2システムが関与していると考えられた。

一方、鼠径部皮下脂肪組織は、若年期には褐色脂肪様の脂肪細胞(ベージュ脂肪細胞)が多く見られるが、加齢と共に、白色脂肪細胞の割合が増加する。A-RAMP2<sup>-/-</sup>マウスの鼠径部皮下脂肪組織においては、野生型マウスと比較して若年期に白色脂肪細胞の割合が多いことから、白色脂肪細胞の分化制御にもAM-RAMP2システムが関与していることが示唆された。

以上の結果から、RAMP2は、脂質の代謝と共に、炎症や線維化抑制など、脂肪組織の恒常性に関与しており、その破綻は、肥満や皮膚の老化の原因となると考えられた。

#### 4. 考 察

E-RAMP2<sup>-/-</sup>の主要臓器では、血管炎様の細胞浸潤が認められた。これらの血管炎様の所見は、若年期でも認められるが、生後6ヶ月ほど経過した個体において、より広範囲に現れた。肝臓では、血管炎様の細胞浸潤のみならず、肝硬変様の形態変化が確認できた。活性化されたマクロファージが多数確認できることから、慢性炎症が起きていることが示唆された。また、線維化は中心静脈周辺から広がるのではなく、類洞内皮細胞に沿って進行していることから、類洞内皮細胞の障害が、肝線維化の原因となっている

ことが予想された。E-RAMP2<sup>-/-</sup>の肝臓、腎臓における、superoxide、酸化脂質、NADPH oxidaseの亢進が確認された。AMには、強力な酸化ストレス抑制効果があることから、酸化ストレスの亢進が、E-RAMP2<sup>-/-</sup>において臓器障害を促進した、もう一つの原因と考えられた。

一方、脂肪組織は様々なアディポカインを産生する臓器であり、生体の恒常性維持に重要な役割を担うが、AMも脂肪組織から多く分泌されている。A-RAMP2<sup>-/-</sup>では、普通食下でも肥満を発症し、酸素消費量の低下を認めることからAMはアディポカインの一つとして、生体内の代謝恒常性を直接制御していると考えられた。興味深いのは、A-RAMP2<sup>-/-</sup>では、皮下脂肪組織においても、若年期より皮下脂肪層の肥厚と、線維化の亢進を認め、老化現象に似た組織像を示したことである。RAMP2は皮膚の恒常性維持にも係わっていることから、美容上のアンチエイジングについても、重要なターゲットとなりうる可能性がある。

#### 5. 総 括

生体のホメオスタシス維持において、生体内生理活性分子群は重要な機能を有しており、老化現象とは、これらの生体内生理活性分子によるホメオスタシス機構が、環境に応じて適応や変容を繰り返し、徐々に調節異常が蓄積した状態とも考えられる。従って、生理活性分子によるホメオスタシスのメカニズムの包括的な解析を進めることで、アンチエイジングや、健康長寿のための新しい予防・治療法につながることを期待される。

今回、コンディショナルターゲットングの手法を用いることで、生理活性ペプチドAMと、その受容体活性調節タンパクであるRAMP2の生体内ホメオスタシス維持における意義を示すことができた。AM-RAMP2系は、アンチエイジングや、新しい予防・治療法開発のための良いターゲット分子として期待される。

#### (引用文献)

- 1) Kitamura K, Kangawa K, Kawamoto M, Ichiki Y, Nakamura S, Matsuo H, Eto T: Adrenomedullin: a novel hypotensive peptide isolated from human pheochromocytoma. *Biochem Biophys Res Commun* 1993, 192:553-60.
- 2) Nomura I, Kato J, Tokashiki M, Kitamura K: Increased plasma levels of the mature and intermediate forms of adrenomedullin in obesity. *Regulatory peptides* 2009, 158:127-31.
- 3) McLatchie LM, Fraser NJ, Main MJ, Wise A, Brown J, Thompson N, Solari R, Lee MG, Foord SM: RAMPs regulate the transport and ligand specificity of the calcitonin-receptor-like receptor. *Nature* 1998, 393:333-9.

4) Shindo T, Kurihara Y, Nishimatsu H, Moriyama N, Kakoki M, Wang Y, Imai Y, Ebihara A, Kuwaki T, Ju KH, Minamino N, Kangawa K, Ishikawa T, Fukuda M, Akimoto Y, Kawakami H, Imai T, Morita H, Yazaki Y, Nagai R, Hirata Y, Kurihara H: Vascular abnormalities and elevated blood pressure in mice lacking adrenomedullin gene. *Circulation* 2001, 104:1964-71.

5) Ichikawa-Shindo Y, Sakurai T, Kamiyoshi A, Kawate H, Inuma N, Yoshizawa T, Koyama T, Fukuchi J, Iimuro S, Moriyama N, Kawakami H, Murata T, Kangawa K, Nagai R, Shindo T: The GPCR modulator protein RAMP2 is essential for angiogenesis and vascular integrity. *J Clin Invest* 2008, 118:29-39.