

# AM-RAMPシステムを標的とした、閉経後代謝障害へのアプローチ

信州大学医学部医学科 循環病態学教室 田中 愛

## 要 約

アドレノメデュリン(AM)は、多彩な生理活性を有するペプチド因子である。AMとそのファミリー因子の受容体であるCLRには、RAMPという1回膜貫通型タンパクが結合することで、多彩な生理活性が生み出されると考えられている。我々はこれまでAM-RAMP系の心血管系恒常性維持作用を明らかとしてきた。一方、AMとRAMPは共に、脂肪組織をはじめとした代謝系においても高発現が認められるが、その意義の多くは不明である。我々はこれまで、RAMP2ヘテロノックアウトマウス(RAMP2<sup>+/-</sup>)オスにおいては、高脂肪食負荷時に野生型オスマウスと比較して、内臓脂肪肥満による体重増加がみられることを見出した。本研究では、メスマウスに対して卵巣摘出した後、高脂肪食負荷を行うことで、閉経後代謝障害におけるAM-RAMP系の病態生理学的意義を検討した。RAMP2<sup>+/-</sup>メスに対して卵巣摘出と高脂肪食負荷を行なった場合は、野生型メスマウスと比べて体重に大きな差を認めなかった。これに対し、RAMP3ノックアウトマウス(RAMP3<sup>-/-</sup>)メスに対して卵巣摘出と高脂肪食負荷を行なった場合は、野生型メスマウスと比べて体重増加、酸素消費量の低下、耐糖能異常、内臓脂肪肥満、および脂肪肝の増悪を認めた。以上の結果から、AM-RAMP2系のみならず、AM-RAMP3系も代謝制御において重要な役割を有することが明らかとなった。一方で、閉経後代謝障害における病態生理学的意義には、RAMP2、3の両者に差異が存在する可能性が考えられた。特にエストロゲン-エストロゲン受容体系とAM-RAMP2、3系のクロストークが予想されるが、詳細なメカニズムについては、今後のさらなる検討が必要である。

## 緒 言

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り、元々血管拡張性物質として同定された。その後の研究から、AMは心血管系に加えて、全身の様々な臓器、細胞で産生、分泌され、循環調節作用に加えて、抗酸化作用、抗炎症作用など多彩な生理活性を有することが明らかとなってきた。また、ヒトの血中AM濃度は、肥満に伴い上昇し、BMI(body mass index)に相関することも報告されており<sup>1</sup>、AMと肥満、メタボリックシンドロームとの関連が示唆されている。

一方、AMの受容体については、特徴的なシステムが知られている。Gタンパク共役型受容体であるCLR(calcitonin receptor-like receptor)に、RAMP(receptor activity-modifying protein)という1回膜貫通型タンパクが結合すると、AMとそのファミリー因子の受容体として機能する<sup>2</sup>。RAMPには1、2、3の3種類のサブアイソフォームが存在し、CLRがRAMP2またはRAMP3と結合することにより、

AMに親和性の高い受容体として機能するようになる。

我々はこれまでに、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、血管形成異常や全身性浮腫が発症し、共に胎生致死となることを報告してきた。このことから、AMの血管における機能が、主としてRAMP2によって規定されていること、さらにAM-RAMP2系の心血管系における病態生理学的意義<sup>3-6</sup>を明らかとしてきた。一方、AMとRAMPは脂肪組織などの代謝系組織においても高発現が認められる<sup>7, 8</sup>が、その役割や、肥満、メタボリックシンドロームにおける病態生理学的意義は不明な点が多い。我々はこれまで、RAMP2ノックアウトマウス(RAMP2<sup>-/-</sup>)オスにおいては、高脂肪食負荷時に野生型マウスと比較して、内臓脂肪肥満による体重増加や脂肪肝の増悪がみられることを明らかとした。

一方で、従来の生活習慣病研究は、主として中年男性を標準として、病態とその推移、診断、治療法などが検討されてきた。しかし、同じ疾患に対す

るリスクファクターでもその寄与度に性差があること、同じ治療法でもその効果には性差があることが明らかになりつつある。最近の疫学的研究から、男性に比較して女性は長寿であるものの、疾患を伴わない健康寿命については男女ほとんど差がないこと。虚血性心疾患の発症率は男性の方が高いものの、閉経後はその差がなくなること。複数のリスクファクターが重なった場合、それによる虚血性心疾患の死亡率上昇は女性の方が高いことなどが指摘されるようになった。こうした背景から、加齢性疾患の性差医療の基盤となる研究の推進が期待されることである。

これまでの我々の研究は、オスのノックアウトマウスを用いての解析が中心であった。本研究では、加齢性疾患の性差医療に向けて、メスのノックアウトマウスを用いて卵巣摘出による閉経モデルを作成し、閉経後代謝障害におけるAM-RAMP系の病態生理学的意義を検討することとした。

## 方法

RAMP2ヘテロノックアウトマウス(RAMP2<sup>+/-</sup>)メス、RAMP3ホモノックアウトマウス(RAMP3<sup>-/-</sup>)メス、およびコントロールとして野生型メスマウスを用いた。左右の側腹部を切開し、卵巣周囲脂肪をクレンメで挟んで、卵巣および子宮を創外に引き出し、子宮と卵巣の間を絹糸で結紮した後、両側の卵巣を摘出した。卵巣摘出手術を行なったマウスに対して、1週間の経過観察の後、10週間の高脂肪食(総エネルギーの内32%が脂肪)負荷を行った。

週1回の体重測定を行い、高脂肪食負荷10週間において、オキシマックス等流量システムにより呼吸代謝測定を行った。16時間の絶食の後に、1g/kgのGlucoseを経口投与し、経口糖負荷試験(OGTT)を行なった。

実験終了時に採血を行い、血中トランスアミナーゼ、中性脂肪、遊離脂肪酸、総コレステロール値を計測した。さらに、脂肪組織、および肝臓を摘出し、白色脂肪組織(子宮周囲脂肪組織)、および肝臓の病理解析(HE染色)を行った。さらに、リアルタイムPCRにより白色脂肪組織の遺伝子発現解析を行った。

動物実験は、学内専門委員会での審査、承認を受けた上で実施した。

## 結果

### (1) 卵巣摘出RAMP2ノックアウトマウスにおける代謝障害の評価

RAMP2ホモノックアウトマウスは胎生致死である、そこでRAMP2ヘテロノックアウトマウス(RAMP2<sup>+/-</sup>)メスおよび野生型メスマウスに対して卵巣摘出あるいはSham手術処置を行い、高脂肪食負荷を行った。RAMP2<sup>+/-</sup>メスおよび野生型メスマウスは共に卵巣摘出によって体重が増加した。しかしながらオスマウスとは異なり、RAMP2<sup>+/-</sup>メスでは野生型メスマウスと比べて、大きな体重の差は認められなかった。

### (2) 卵巣摘出RAMP3ノックアウトマウスにおける代謝障害の評価

次に、もう一つのRAMPサブアイソフォームであるRAMP3について検討を進めた。卵巣摘出を行ったマウスは、RAMP3ホモノックアウトマウス(RAMP3<sup>-/-</sup>)メス、野生型メスマウス共に、Sham手術群よりも体重の増加を認めたが、RAMP3<sup>-/-</sup>は野生型マウスよりも、体重増加が亢進していた(図

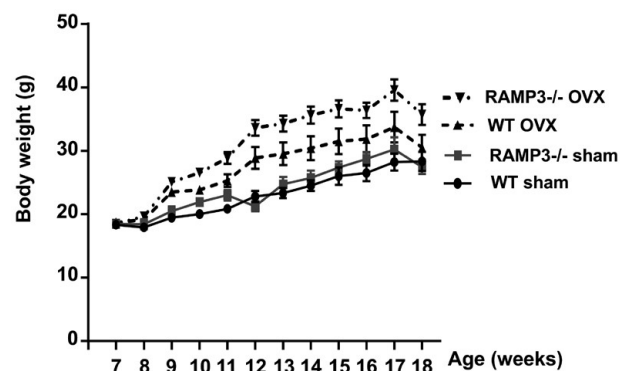


図1.

RAMP3ノックアウトマウス(RAMP3<sup>-/-</sup>)と野生型マウス(WT)の卵巣摘出群(OVX)、およびsham手術群(sham)の、高脂肪食負荷時の体重の推移

1)。摂餌量は、Sham手術群に比べて、卵巣摘出群で低下を認めたが、RAMP3<sup>-/-</sup>、野生型マウス間では大きな差を認めなかった。

呼吸ガス分析においては、暗期、明期共に、卵巣摘出群はSham手術群よりも酸素消費量(VO<sub>2</sub>)の低下を認めたが、卵巣摘出RAMP3<sup>-/-</sup>においてVO<sub>2</sub>低下はより顕著であった(図2)。

血清脂質検査では、卵巣摘出RAMP3<sup>-/-</sup>において、コレステロール値の軽度上昇を認めたが、中性脂肪、遊離脂肪酸レベルには、各群に大きな変化は見られ

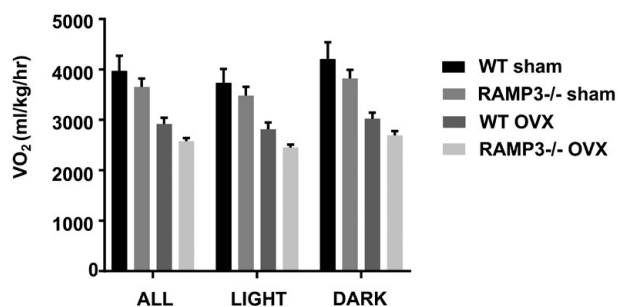


図2.

RAMP3ノックアウトマウス(RAMP3<sup>-/-</sup>)と野生型マウス(WT)の卵巣摘出群(OVX)、およびsham手術群(sham)の、高脂肪食負荷時の呼気ガス分析(酸素消費量) ALL:明期+暗期、LIGHT:明期、DARK:暗期

なかった。次に糖負荷試験を行ったところ、卵巣摘出群はSham手術群よりも血糖値の上昇を認めたが、卵巣摘出RAMP3<sup>-/-</sup>において、血糖値の上昇はより顕著であった。

肝機能検査では、卵巣摘出群において、AST値、ALT値の上昇を認めたが、特にRAMP3<sup>-/-</sup>において顕著であった。肝重量も、卵巣摘出RAMP3<sup>-/-</sup>において上昇していた。これを反映して、病理組織検査では、卵巣摘出RAMP3<sup>-/-</sup>において、著明な脂肪肝

が確認された(図3)。

内臓脂肪重量は、腸間膜脂肪、腎臓周囲脂肪、子宮周囲脂肪のいずれも、卵巣摘出群はSham手術群よりも上昇しており、RAMP3<sup>-/-</sup>においてより顕著であった。また脂肪組織の病理では、卵巣摘出RAMP3<sup>-/-</sup>において脂肪細胞のサイズの増大が見られた(図4)。

脂肪組織における遺伝子発現の検討では、卵巣摘出群において、脂肪分解に関わる $\beta$ 3アドレナリン受容体( $\beta$ 3AR)、Adipose Phospholipase A2(AdPLA2)、Perilipinなどの発現低下が認められたが、これらの遺伝子発現低下は、野生型マウスに比べ、RAMP3<sup>-/-</sup>においてより顕著であった。

### 考察

様々な生体内の液性生理活性因子は、心血管系および代謝系制御の双方において重要な意義を有することが知られている。アドレノメデュリン(AM)は、心血管系をはじめ、全身の組織で広く産生される生理活性を有するペプチドである。AMとその受容体

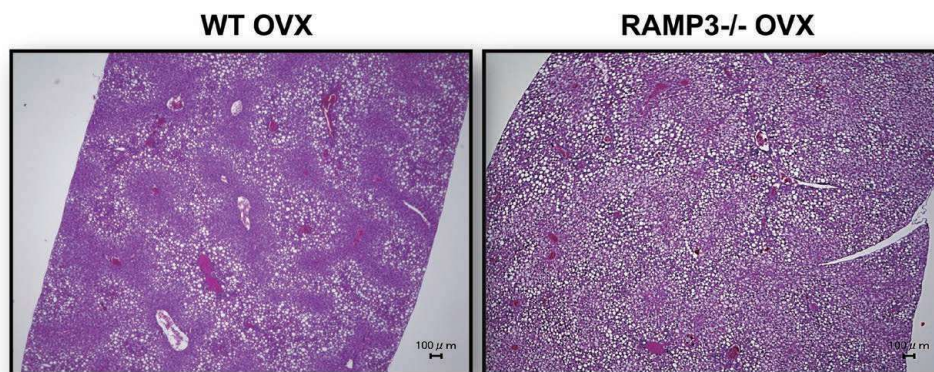


図3.

RAMP3ノックアウトマウス(RAMP3<sup>-/-</sup>)と野生型マウス(WT)の卵巣摘出群(OVX)の、高脂肪食負荷時の肝臓の病理所見(HE染色)

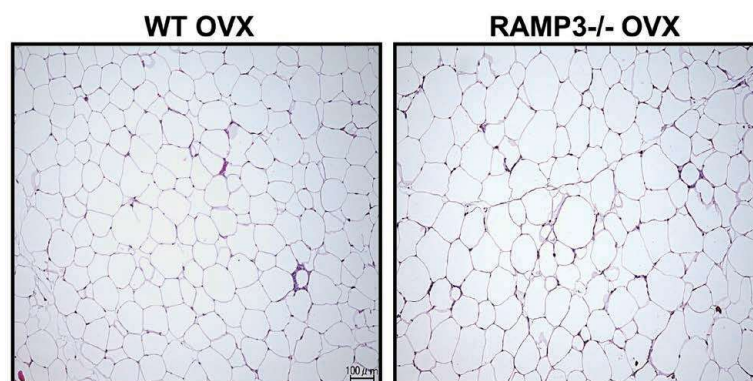


図4.

RAMP3ノックアウトマウス(RAMP3<sup>-/-</sup>)と野生型マウス(WT)の卵巣摘出群(OVX)の、高脂肪食負荷時の内臓脂肪組織の病理所見(HE染色)

システムは、脂肪細胞においても高発現していることから、我々は、これまで主として循環調節因子として研究されてきたAMが、生体内の代謝制御にも重要な働きを有する可能性を考え、検討を進めてきた。

AMの受容体CLRには、受容体活性調節タンパクRAMPが結合し、受容体機能を制御している。RAMPには1、2、3の3種類のサブアイソフォームが存在するが、CLRがRAMP2またはRAMP3と結合することにより、AMに親和性の高い受容体として機能することが知られている。しかしながら、RAMP2とRAMP3の機能分化や、各々の病態生理学的意義については、不明な点が多い。

今回の研究ではまず、閉経後代謝障害におけるAM-RAMP2系の意義を明らかとするため、卵巣摘出術を行ったRAMP2 $\pm$ メスの検討を行った。sham手術群ではRAMP2 $\pm$ メスの体重は野生型メスマウスと比べて軽度増加していたが、卵巣摘出群ではRAMP2 $\pm$ メス、野生型メスマウスともに体重の増加を認め、両者の体重の差を認めなくなった。これらの結果から、RAMP2 $\pm$ メスでは、RAMP2 $\pm$ オスほどの代謝の変化が生じず、また、エストロゲン減少に起因した体重の増加は、RAMP2 $\pm$ と野生型に同程度に生じると考えられた。メスにおいては、エストロゲンシグナルによる抗肥満作用がオスよりも強力に作用しており、AM-RAMP2系の減少の影響を受けにくい可能性が考えられる。またAM-RAMP2系の抗肥満作用が、エストロゲンシグナルを介したものであると仮定した場合、メスの卵巣摘出によりエストロゲンシグナルが減弱した状況下では、AM-RAMP2系の減少の影響を受けにくくなっている可能性なども考えられる。

一方で、RAMP3 $\pm$ メスにおいては、卵巣摘出により、野生型マウスと比較して体重増加を認めた。エストロゲンシグナルの減少の影響により、AM-RAMP3系欠損による体重増加が増強されたと考えられる。

今回の検討では、卵巣摘出による体重増加は、RAMP3 $\pm$ にのみ見られたため、以後の検討は、RAMP3 $\pm$ を中心に行ったが、卵巣摘出RAMP3 $\pm$ では、野生型に比べて、体重増加の他、酸素消費量の減少、耐糖能の低下、脂肪肝や内臓脂肪肥満を認め、脂肪組織における脂肪分解系因子の発現の低下が認められた。以上の結果から、AM-RAMP2系の

みならず、AM-RAMP3系も代謝制御において重要な役割を有することが明らかとなった。

AMおよびRAMPとエストロゲンとの関係については、複数の報告がある。網羅的遺伝子解析から、エストロゲンおよびエストロゲン受容体によって直接発現制御を受ける因子として、AMおよびRAMP3が挙げられている<sup>9</sup>。さらに、RAMP3が、Gタンパク共役型のエストロゲン受容体1(GPER1)として知られる、Gタンパク共役受容体30(GPR30)と相互作用することなどが報告されている<sup>10</sup>。

本研究の結果から、AM-RAMP2、3系は、共に心血管系の機能制御のみならず、代謝制御においても重要な役割を持つことが明らかとなった。一方で、閉経後代謝障害における病態生理学的意義においては、RAMP2、3の両者に差異が存在する可能性が考えられた。エストロゲン-エストロゲン受容体系とAM-RAMP2、3系のクロストークが予想されるが、詳細なメカニズムについては、今後のさらなる検討が必要である。

## 参考文献

1. Nomura I, Kato J, Tokashiki M, et al. : Increased plasma levels of the mature and intermediate forms of adrenomedullin in obesity. *Regul Pept* 2009, 158:127-31.
2. McLatchie LM, Fraser NJ, Main MJ, et al. : RAMPs regulate the transport and ligand specificity of the calcitonin-receptor-like receptor. *Nature* 1998, 393:333-9.
3. Shindo T, Kurihara Y, Nishimatsu H, et al. : Vascular abnormalities and elevated blood pressure in mice lacking adrenomedullin gene. *Circulation* 2001, 104:1964-71.
4. Niu P, Shindo T, Iwata H, et al. : Protective effects of endogenous adrenomedullin on cardiac hypertrophy, fibrosis, and renal damage. *Circulation* 2004, 109:1789-94.
5. Ichikawa-Shindo Y, Sakurai T, Kamiyoshi A, et al. : The GPCR modulator protein RAMP2 is essential for angiogenesis and vascular integrity. *J Clin Invest* 2008, 118:29-39.
6. Koyama T, Ochoa-Callejero L, Sakurai T, et al. : Vascular endothelial adrenomedullin-RAMP2 system is essential for vascular integrity and organ homeostasis. *Circulation* 2013, 127:842-53.
7. Nambu T, Arai H, Komatsu Y, et al. : Expression of the adrenomedullin gene in adipose tissue. *Regul Pept* 2005, 132:17-22.
8. Iemura-Inaba C, Nishikimi T, Akimoto K, et al. : Role of adrenomedullin system in lipid metabolism and its signaling mechanism in cultured adipocytes. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2008, 295:R1376-84.

9. Watanabe H, Takahashi E, Kobayashi M, et al. : The estrogen-responsive adrenomedullin and receptor-modifying protein 3 gene identified by DNA microarray analysis are directly regulated by estrogen receptor. *J Mol Endocrinol* 2006, 36:81-9.
10. Lenhart PM, Broselid S, Barrick CJ, et al. : G-protein-coupled receptor 30 interacts with receptor activity-modifying protein 3 and confers sex-dependent cardioprotection. *J Mol Endocrinol* 2013, 51:191-202.

### **Abstract**

Adrenomedullin (AM) is a peptide with a variety of biological activities. The receptor for AM and its family of peptides, CLR, binds with one of the sub-isoforms of receptor activity-modifying protein RAMPs, which regulates the various activities of these peptides. We have demonstrated that the AM-RAMP system maintains cardiovascular homeostasis. On the other hand, both AM and RAMPs are highly expressed in adipose tissue and other metabolic systems, but the significance of this is largely unknown. We found that male RAMP2 heterozygous knockout mice (RAMP2<sup>+/-</sup>) showed weight gain due to visceral obesity when exposed to a high-fat diet compared to wild-type male mice. In the present study, we investigated the pathophysiological significance of the AM-RAMP system in postmenopausal metabolic disorders in female mice by ovariectomy followed by a high-fat diet. Ovariectomy and high-fat feeding of RAMP2<sup>+/-</sup> female mice did not result in significant differences in body weight compared to wild-type female mice. In contrast, ovariectomy and a high-fat diet in female RAMP3 homozygous knockout mice (RAMP3<sup>-/-</sup>) resulted in increased body weight, decreased oxygen consumption, impaired glucose tolerance, visceral obesity, and worsened fatty liver compared to wild-type female mice. These results indicate that not only the AM-RAMP2 system but also the AM-RAMP3 system plays an essential role in metabolic regulation. On the other hand, the pathophysiological significance in postmenopausal metabolic disorders may be different between RAMP2 and RAMP3. In particular, crosstalk between the estrogen-estrogen receptor system and the AM-RAMP2 and 3 systems is expected, but further investigation of the detailed mechanism is necessary.