

## 生体内恒常性制御システムを標的とした、生活習慣病と慢性臓器障害治療薬の創出

新藤隆行, 桜井敬之, 神吉昭子

信州大学医学部医学科 循環病態学教室

### 【研究の背景】

慢性臓器障害は、高齢者の健康寿命を著しく悪化させる最大の原因であり、急速に未曾有の高齢化社会へと突入しつつある我が国においては、その制圧が大きな課題である。慢性臓器障害とは、生活習慣病などの種々の原因により、長期間にわたり各臓器の機能障害が続く状態であり、発症は緩やかであるが、多くは進行性・難治性である。病気のメカニズムに注目すると、慢性臓器障害は生体内恒常性維持のための調節システムの異常と、その修復過程の破綻状態と考えられる。この恒常性維持において中心となるのが、生体内生理活性分子群である。

アドレノメデュリン (AM) は、血管をはじめ、全身で広く産生される生理活性ペプチドである。我々はこれまで循環系調節ホルモンとされてきた AM が、エネルギー代謝や、小胞体ストレス制御などにより、各細胞や臓器の恒常性そのものに必須の因子であることを明らかとした。AM は臓器保護作用、組織再生作用、抗炎症作用などの多彩な生理活性を有し、その応用が期待されている。一方で、AM の様な生理活性ペプチドは血中半減期が短く、慢性疾患への応用に制限がある。

そこで我々は、AM の受容体側の解析を進めた。AM は、カルシトニン、カルシトニン遺伝子関連ペプチド (CGRP)、アミリン、インターメディンなどと共にスーパーファミリーを形成し、これらは共通の 7 回膜貫通型 G タンパク共役型受容体、CLR を部分的に共用している。CLR には受容体活性調節タンパク RAMP が 1 対 1 で結合する。RAMP には 3 種のサブアイソフォームが存在するが、我々は、インプットとしてもたらされた生理活性因子の情報を、各 RAMP が巧妙に情報処理、翻訳を行うことで、アウトプットとしての生理機能の多様性を生み出すのではないかと考えた。

### 【目 的】

本研究の目的は、①各種の遺伝子改変マウスなどを用いて、RAMP システムによる生体内恒常性維持機構と、ストレス応答障害から引き起こされる疾患の発症メカニズムを解明することである。さらに②低分子化合物などを応用し、RAMP システムに人為的に介入し、これを操作する方法を開発することで、新たな創薬につなげることを目標とした。

### 【方法および結果】

#### 1. AM-RAMP2 系による血管恒常性維持機構と、血管・臓器保護薬への展開

我々はこれまで、AM および RAMP2 のホモノックアウトマウス (-/-) が、共に血管の発生異常により胎性中期に致死となること、さらに血管内皮細胞特異的 RAMP2<sup>-/-</sup>も、その多くが血管の構造異常と全身性浮腫により出生直前に致死となることから、AM-RAMP2 系が血管の発生、特に血管内皮細胞の発生、分化に必須の因子であることを明らかとした。

一方、成体の血管における AM-RAMP2 系の意義の詳細は不明であった。そこで、成体が得られる RAMP2 ヘテロノックアウトマウス (RAMP2<sup>+/-</sup>) を用いて、大腿動脈に Wire injury を行い、新生内膜形成を検討した。4 週間後、RAMP2<sup>+/-</sup> では野生型マウス (WT) に比較して、有意に新生内膜形成が亢進し、再内皮化の抑制、平滑筋増殖の亢進、新生内膜、外膜のマクロファージ浸潤亢進、炎症性サイトカインや酸化ストレスレベルの亢進を認めた。

次に、成体において血管内皮細胞 RAMP2 欠損を誘導することができる、誘導型血管内皮細胞特異的 RAMP2<sup>-/-</sup> (DI-E-RAMP2<sup>-/-</sup>) を作成して同様の検討を行ったところ、新生内膜形成の著明な亢進が確認された。さらに、骨髄由来幹細胞の

関与を検討するため、骨髄移植を行なったところ、RAMP2<sup>+/-</sup>から WT に骨髄移植を行なったマウスでは、RAMP2<sup>+/-</sup>と同等の新生内膜形成が認められた。以上から、AM-RAMP2 系は、血管内皮再生作用、抗炎症作用、抗酸化ストレス作用により新生内膜形成を抑制すること、さらにこうした血管保護作用には骨髄由来血管前駆細胞の関与が示唆された<sup>1)</sup>。

さらに我々は、DI-E-RAMP2<sup>-/-</sup>は加齢と共に、血管の恒常性が失われ、血管の障害に伴う血管の慢性炎症を自然発症することを見出した。我々は、血管内皮細胞において、RAMP2 が低分子量 G タンパク Rac1 の活性化を介し、細胞膜直下のアクチンリングの形成と、VE カドヘリンによる内皮細胞間接着に関わり、血管内皮の恒常性を制御していることを明らかとした。興味深いことに、DI-E-RAMP2<sup>-/-</sup>では、その病変が血管だけに限定されず、各臓器の慢性炎症が引き起こされ、心肥大・肝硬変・水腎症などの臓器障害が自然発症した。一方、これらの臓器障害は、RAMP2 遺伝子導入によりレスキューされた<sup>2,3)</sup>。

以上の結果から、RAMP2 活性化薬の血管・臓器保護薬としての応用が期待される。

## 2. AM-RAMP2 系による血管恒常性維持と、癌転移抑制薬への展開

AM および RAMP2 は様々な癌組織でも発現している。我々は、DI-E-RAMP2<sup>-/-</sup>を用いて、成体において血管の RAMP2 欠損を誘導することで、癌の増殖と転移における AM-RAMP2 系の意義を検討した。

DI-E-RAMP2<sup>-/-</sup>では、皮下移植したメラノーマや肉腫の原発巣における血管新生と腫瘍増殖が抑制される一方で、足底部にメラノーマ細胞を移植し、一旦それを切除した後には生じる自然肺転移が著明に亢進していた。DI-E-RAMP2<sup>-/-</sup>における原発巣の腫瘍血管では、血管内皮細胞が間葉系細胞マーカー陽性となり、細胞間接着が障害され異常増殖を認めるなど、内皮間葉系転換亢進を伴う血管構造不安定化が確認され、癌の転移促進つながらと考えられた。一方、RAMP2 欠損誘導後の肺では、細胞骨格異常を伴う内皮細胞の構造異常や血管透過性亢進が生じ、傷害を受けた血管壁では、マクロファージの集簇を認めた。さらに DI-E-RAMP2<sup>-/-</sup>の肺では腫瘍細胞遊走因子の高発現を認め、転移予定先臓器における「転移前土壌」形成が促進していると考えられた。一方 RAMP2 過剰発現マウスでは、腫瘍細胞の血管内皮への接着や、遠隔臓器への転移が抑制され、生存率が改善し、AM-RAMP2 系の活性化による癌転移抑制効果が示された<sup>4,5)</sup>。

以上の結果から、AM-RAMP2 系の血管恒常性機構に着目することで、原発巣摘出後の転移予防のためのアジュバントセラピーなどに、その応用展開が期待される。

## 3. RAMP2 結合低分子化合物のスクリーニング

これまで、各々の RAMP サブタイプに特異的に結合しうる低分子化合物は存在しなかった。本研究では RAMP2 に結合する新しい低分子化合物のスクリーニングを行なった。東大創薬機構の 28 万個の低分子化合物ライブラリーから、RAMP2 の立体構造解析データを元にして、低分子化合物候補を抽出した。ヒト型 CLR と RAMP2 の安定過剰発現細胞株を作成し、時間分解蛍光 TR-FRET 法によって細胞内 cAMP レベルを高感度に定量化するアッセイ系を構築した。これにより、RAMP2 に対するアゴニスト、アンタゴニスト活性を持つ候補物質を複数得ることに成功した。現在これらのリード化合物に対して側鎖修飾により水溶性と安定性を上げる合成展開を進め、最適化を進めている。

### 【考 察】

本研究において、一連の遺伝子改変マウスの解析から、各 RAMP を標的とした創薬研究を進める上での POC を得る事が出来た。さらに RAMP を標的とした治療法開発に向けて、RAMP2 特異的なアゴニスト、アンタゴニスト作用を有する低分子化合物候補を複数得る事が出来た。

### 【臨床的意義・臨床への貢献度】

RAMP システムの様な生体内恒常性を制御する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、新しい創薬のパラダイムになると期待される。RAMP システムを足掛かりとして、生理活性因子の情報制御システムによる生体内恒常性維持機構を明らかとし、新たな治療法開発へと展開することが今後の課題である。

【参考・引用文献】

1. Xian X, Sakurai T, Kamiyoshi A, Ichikawa-Shindo Y, Tanaka M, Koyama T, Kawate H, Yang L, Liu T, Imai A, Zhai L, Hirabayashi K, Dai K, Tanimura K, Liu T, Cui N, Igarashi K, Yamauchi A, Shindo T. Vasoprotective Activities of the Adrenomedullin-RAMP2 System in Endothelial Cells. *Endocrinology* 2017; 158:1359-1372
2. Koyama T, Ochoa-Callejero L, Sakurai T, Kamiyoshi A, Ichikawa-Shindo Y, Inuma N, Arai T, Yoshizawa T, Iesato Y, Lei Y, Uetake R, Okimura A, Yamauchi A, Tanaka M, Igarashi K, Toriyama Y, Kawate H, Adams RH, Kawakami H, Mochizuki N, Martinez A, Shindo T. Vascular endothelial adrenomedullin-RAMP2 system is essential for vascular integrity and organ homeostasis. *Circulation* 2013; 127:842-853
3. Koyama T, Sakurai T, Kamiyoshi A, Ichikawa-Shindo Y, Kawate H, Shindo T. Adrenomedullin-RAMP2 System in Vascular Endothelial Cells. *J Atheroscler Thromb* 2015; 22:647-653
4. Tanaka M, Koyama T, Sakurai T, Kamiyoshi A, Ichikawa-Shindo Y, Kawate H, Liu T, Xian X, Imai A, Zhai L, Hirabayashi K, Owa S, Yamauchi A, Igarashi K, Taniguchi S, Shindo T. The endothelial adrenomedullin-RAMP2 system regulates vascular integrity and suppresses tumour metastasis. *Cardiovasc Res* 2016; 111:398-409
5. Dai K, Tanaka M, Kamiyoshi A, Sakurai T, Ichikawa-Shindo Y, Kawate H, Cui N, Wei Y, Tanaka M, Kakihara S, Matsui S, Shindo T. Deficiency of the adrenomedullin-RAMP3 system suppresses metastasis through the modification of cancer-associated fibroblasts. *Oncogene* 2020; 39:1914-1930