

論文の内容の要旨

論文提出者氏名	山内 啓弘
論文審査担当者	主査 菅野 祐幸 副査 多田 剛 ・ 田淵 克彦
論文題目	Functional differentiation of RAMP2 and RAMP3 in their regulation of the vascular system (脈管系制御における RAMP2 と RAMP3 の機能分化)
<p>(論文の内容の要旨)</p> <p>〔背景と目的〕 アドレノメデュリン(AM)は、血管拡張作用をはじめ、血管新生作用、抗酸化ストレス作用、抗炎症作用など多彩な生理活性を有する心脈管作動物質である。我々は AM の機能の多様性を制御するメカニズムを解明するため、AM の受容体システムに着目した。AM およびそのファミリーペプチドの受容体である 7 回膜貫通型 G タンパク共役型受容体 CLR には、RAMP と呼ばれる受容体補助蛋白が結合する。RAMP は 3 つの α ヘリックス構造からなる長い細胞外ドメインを有し、CLR と RAMP の細胞外ドメイン同士が結合することにより、リガンドに対するバインディングポケットが形成されると考えられている。RAMP には 1~3 までのサブアイソフォームが存在し、いずれも体内に広く分布しているが、各 RAMP の相同性は約 30% 程度である。RAMP サブアイソフォームのうち RAMP2 または RAMP3 のいずれか 1 つが CLR に結合することにより、AM と親和性の高い受容体として機能する。しかし、これまで RAMP2 と RAMP3 の脈管系における機能的な差異は不明なままであった。本研究では、RAMP2 と RAMP3 について、胎生期から全身で遺伝子欠損させたマウス、あるいは成体において各組織特異的に遺伝子欠損を誘導できるマウスを樹立し、胎生期における脈管系の発生と、成体において遺伝子欠損誘導後の脈管系の変化を観察し、両者の機能分化を検討した。</p> <p>〔結果〕 RAMP2 ノックアウトマウス(-/-)は、胎生期に全身の浮腫や出血により致死となったが、成体での遺伝子欠損誘導後には血管炎や臓器障害が自然発症することから、AM-RAMP2 系は血管の発生と恒常性維持双方に必須である事が示された。一方、RAMP3-/-は胎生期の血管発生の異常は認められず、正常に出生し、成体が得られた。RAMP3-/-成体における腫瘍移植モデルでの腫瘍血管新生の検討では、腫瘍内血流、血管密度共に、野生型マウスと差を認めなかった。腹部大動脈切片を用いた Aortic Ring モデルによる ex vivo での検討でも、RAMP3-/-は野生型と同程度の血管新生能を示した。さらに下肢虚血モデルを用いて虚血性血管新生を評価したところ、レーザー Doppler による血流回復、病理切片における血管密度、各種血管新生因子の発現のいずれも両群の間に差は認められなかった。</p> <p>次に、リンパ管について解析を進めた。術後リンパ浮腫モデルでは、血管、リンパ管特異的 RAMP2-/-共に、浮腫の程度に変化を認めなかったが、RAMP3-/-のみで浮腫の増悪を認めた。RAMP3-/-では、新生リンパ管数、血管数に変化はないものの、リンパ管の異常拡張、間質浮腫の増悪、炎症細胞浸潤の亢進が認められた。AM の持続投与による浮腫の治療実験を行ったところ、野生型では浮腫の軽減が認められるのに対し、RAMP3-/-では浮腫の軽減は認められなかった。さらに、インドシアニン グリーンを用いた耳介、尾部のリンパ管造影では、RAMP3-/-においてリンパ管ドレナージの不良が認められた。腸管リンパ管の乳糜輸送の検討では、RAMP3-/-において脂質の吸収遅延が認められた。腸間膜リンパ管のライブイメージングを行ったところ、RAMP3-/-では小腸リンパ管のリンパ流速が著明に低下していた。また、RAMP3-/-では、AM 投与によって血管の拡張反応は見られるが、リンパ管に反応が見られなかった。電子顕微鏡によるリンパ管内皮の観察では、RAMP3-/-において、リンパ管内皮の形成不全、ミトコンドリアの空胞変性、繫留フィラメントの形成不全が特徴的に観察された。胎児よりリンパ管内皮細胞を初代培養行なったところ、RAMP3-/-では、リンパ管関連因子の発現低下が認められ、Scratch assay において、RAMP3-/-リンパ管内皮細胞は野生型と比べ遊走能が低下していた。RAMP3-/-リンパ管内皮細胞の遊走能の低下は、AM 添加によっても改善は認められず、AM-RAMP3 系の破綻による結果であると考えられた。さらに RAMP3-/-リンパ管内皮細胞では、細胞生存シグナルである Akt の活性化低下が認められた。</p> <p>〔結論〕 以上の結果から、AM-RAMP2 系が発生段階の血管新生、成体での血管恒常性を制御しているのに対し、AM-RAMP3 系は成体でのリンパ管機能を制御している事がはじめて明らかとなった。AM-RAMP 系は、RAMP2、3 の機能分化により脈管系全体の恒常性を制御する生体内システムであり、将来、新たな治療標的として期待される。</p>	