

循環調節ペプチド：血管系細胞が産生する 血管機能調節因子としての位置づけ

南野直人*

緒言

循環調節因子あるいは循環調節ペプチドは、腎臓、副腎、脳下垂体をはじめとする種々の組織で産生され、血中を循環して標的組織である心臓、血管などに至り、血管収縮・弛緩、心拍数増加をはじめとする広範な循環器系に対する作用を発揮する物質と定義することができよう。これは、産生組織、標的組織を循環器系より内分泌系に置き換えると、「ホルモン」と同等であることが分かる。つまり、血流を経て作用する生体内情報伝達物質のうち、循環器系に作用するものを「循環調節因子」として区別しているといえる。しかし、近年の急速な研究の進展はこれらの用語の境界を瞬間に低くし、近未来には完全に取り払ってしまうであろう。10~20年先には、循環調節因子、ホルモン、オータコイド、サイトカインなどの概念は消滅し、細胞間情報伝達物質としてまとめられ、各物質の性質などによってのみで分類されるようになるかもしれない、と個人的には推測している。

いずれにせよ我々の知識は限られており、「循環調節因子」や「循環調節ペプチド」という言葉や概念も学問の進歩における一時的な「過渡的現象」と考えた方がよいのかもしれない。このような戯言を取って諸賢に呈するのは、このような言葉の概念、あるいは言葉や文字そのものに幻惑され、その本質を見失う可能性が高いからである。もっと単純な物質名でも、時として誤解を招く。私どもが2番目に発見したナトリウム利尿ペプチド

は、脳より精製したため、Brain natriuretic peptide (BNP, 脳性ナトリウム利尿ペプチド)と命名された。その後の研究で、BNPを最も活発に産生しているのは心室であり、ANP(心房性ナトリウム利尿ペプチド)とともに、血圧低下、体液量減少に機能することが分かった。血中BNP濃度は心室負荷や心機能異常の極めて鋭敏な指標であることも示され、臨床検査に使用され始めている。通常はBNPという略号で済ませられるため誤解をあまり生じていないが、これが常に脳性ナトリウム利尿ペプチドと呼ばれていたなら、多少の混乱は避けられなかったであろう。名前の場合はまだ単純であるが、概念となると話は俄然ややこしくなる。前置きはさておき、本項では循環調節因子は標的である血管などからも活発に産生され機能しているということ、アドレノメデュリン(AM)を中心に、CNP(C型ナトリウム利尿ペプチド)、ET-1(エンドセリン-1)などを加えて紹介させていただきたい。

キーワード：アドレノメデュリン、PAMP、血管内皮細胞、血管平滑筋細胞、エンドトキシンショック、エンドセリン、CNP

血管壁におけるアドレノメデュリン(AM)の産生

AMは、1993年、ヒト褐色細胞腫より北村、寒川により発見されたペプチドで、精製組織(副腎髄質)に因みこのように命名された¹⁾。AMは発見当初より循環調節ペプチドと考えられ、実際血中を循環し、高血圧症、心不全、腎不全患者などで血中濃度の上昇することが確認されている。しかし、その後の研究により、副腎よりも標的と考

*国立循環器病センター研究所・研究機器管理室

えられた血管系細胞が主要な産生細胞で、ダイナミックな産生調節を受けることが明らかとなった。

a) AM と PAMP の構造および降圧活性

ヒト AM は52残基よりなり、ジスルフィド結合により形成される環状構造と C 末端アミド構造を有するのが特徴で、遺伝子関連ペプチド (CGRP), アミリンと類似性を保持し, CGRP スーパーファミリーを形成すると考えられる (図1) 前駆体の cDNA クローニング, ゲノム遺伝子構造が決定され^{2,3}, ヒト AM 遺伝子は第11染色体短腕部上の2.5 kb の領域にコードされ, 前駆体蛋白は185残基よりなる. AM 配列の N 末端側の R-X-R-X-K-R 配列は, 非内分泌細胞の構成的分泌における典型的切断シグナルで, C 末端側にはアミド化および切断シグナルが存在する. シグナルペプチドに続く20残基のペプチドの C 末端側にもアミド化シグナルが存在し, 生理活性ペプチドが生成する可能性が高いため, proadrenomedullin N-terminal 20 peptide (PAMP) と命名された. PAMP は全く新しいペプチドで, 生体内での存在, 降圧活性の保持も確認された⁴). つまり, AM 前駆体からは2種の異なった降圧性ペプチドが生成する.

AM をラット平滑筋細胞に投与すると, 細胞内 cAMP (cyclic adenosine monophosphate) を顕著

に増加するため, cAMP-プロテインキナーゼ A 系を経て弛緩活性を発揮すると考えられる (図2) 受容体結合実験でも平滑筋細胞における AM 受容体の存在が確認され^{5,6}, 平滑筋への作用はこの cAMP 増加によると考えられる. 培養ラット平滑筋細胞の受容体は CGRP と AM に同程度の親和性を示し, 両ペプチドで共有されている可能性が高い. また, 一酸化窒素 (NO) 合成阻害薬や遮断剤により血管弛緩作用が減弱することより, 内皮細胞/NO 系の関与も示された⁷). 内皮細胞の AM 受容体は AM に対する親和性が CGRP より強く, 細胞内 Ca²⁺濃度を増加し, NO合成酵素 (NOS) の活性化, NO 産生の促進を経て, 平滑筋細胞を弛緩すると考えられる⁸). AMは平滑筋と内皮細胞/NO 系への作用が重なり, 極めて強力な血管弛緩作用を惹起できるのであろう. 一方, PAMP は血管に対して明確な直接作用を示さない. 下澤らは交感神経終末からのノルエピネフリン分泌を, 加藤らは副腎髄質細胞からのカテコラミン分泌を PAMP が抑制することを報告した^{9,10}. この結果より, PAMP は交感神経系からのカテコラミン分泌抑制により血管収縮を抑制し, 血圧を低下すると考えられる. AM 前駆体は2種の降圧ペプチドを生成し, 一つは血管壁への直接作用, 一つは交感神経系の抑制作用により血管を協奏的に拡張すると推定される (図2).

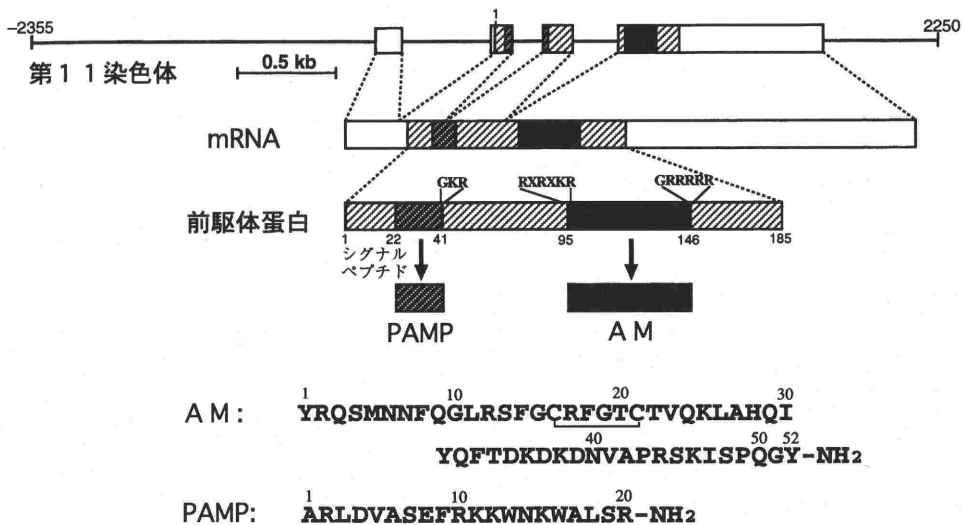


図1 ヒト AM 遺伝子, mRNA, 前駆体蛋白と AM, PAMP の構造

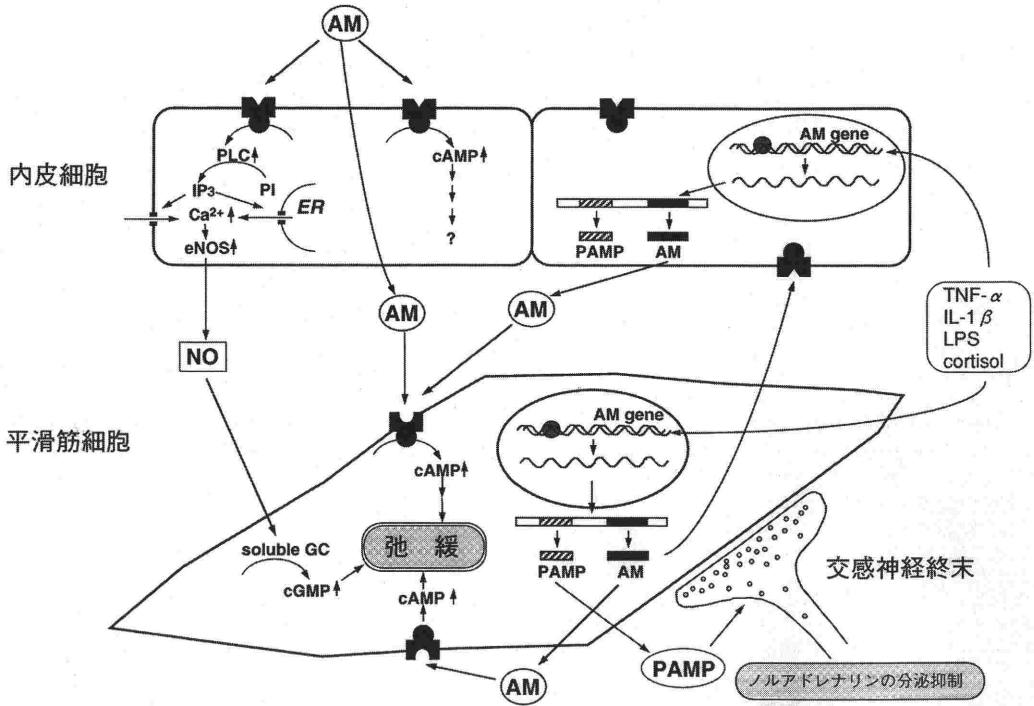


図2 血管内皮細胞，平滑筋細胞におけるアドレノメデュリン，PAMPの産生と作用機序

b) 血管平滑筋細胞，内皮細胞におけるAM産生調節と敗血症性ショック

AMは肺，心臓，腎臓などの組織にも副腎に近い濃度で分布するが，脳内濃度は極めて低く，遺伝子発現レベルでもこれに相当する結果が得られている。血中AMの起源を探るため，ラット組織や培養細胞を用いて検討を行った結果，最も活発にAM遺伝子を発現するのは内皮細胞，平滑筋細胞で，副腎の約20倍，4倍のmRNAが認められた(図3)。実際，ラット内皮細胞のAM分泌量はET-1 (endothelin-1)に匹敵し¹¹⁾，血管壁細胞が血中AMの主要産生細胞であることを示唆する。内皮細胞，平滑筋細胞は動物種によらずAMを活発に産生し，かつ多数のAM受容体が発現していることを考えると，産生されたAMはオートクリン，パラクリン因子として血管を拡張する可能性が強い。

血管壁におけるAMの機能を探るため，ラット内皮細胞，平滑筋細胞におけるAM産生調節

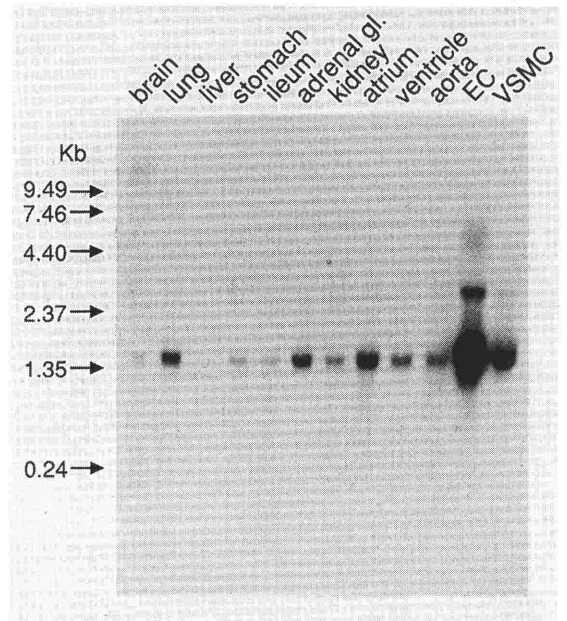


図3 ラット組織，血管内皮細胞，平滑筋細胞におけるアドレノメデュリンの発現 (各レーン50μgのtotal RNAを泳動した)

を検討したところ、最も強力に AM 産生を促進したのは TNF (tumor necrosis factor), IL-1 (interleukin-1), LPS (lipopolysaccharide) であった^{12,13}。これらは平滑筋細胞や内皮細胞に作用し、協同して AM 産生を増加させることも明らかとなった。一方、IFN- γ (interferon- γ) は AM 産生を抑制し、トランスフォーミング成長因子は内皮細胞では産生を抑制し、トロンピンは平滑筋細胞では産生を抑制するが内皮細胞では促進した。胎児血清は平滑筋細胞の AM 産生を促進し、内皮細胞では抑制した。糖質ステロイドは両細胞で強い産生刺激活性を示し、甲状腺ホルモンも弱い促進作用を示した。フォルボールエステルは低濃度で産生を亢進し、ET-1 は内皮細胞では抑制、平滑筋細胞では促進作用を示した¹²⁻¹⁵。全体として内皮細胞と平滑筋細胞の AM 産生は類似した調節を受けるため、両者から分泌される AM は協同して血管を弛緩させると考えられる (図 4)。

培養血管細胞系で TNF, IL-1, LPS が AM 産生を強く亢進することより、敗血症性ショック時に AM 産生が亢進している可能性が示唆される。

そこでラットに LPS (5 mg/kg) を静注し血中 AM 濃度を測定すると、3 時間後には約 20 倍に増加した¹⁶。同時に各組織の AM mRNA 量を測定すると、全組織で AM mRNA が増加していた。増加率は大動脈、肺、腸、肝臓で最も大きく、約 3 倍であった。大動脈では、内皮、平滑筋細胞の両方で遺伝子発現が亢進していた。誘導型 NOS (iNOS) mRNA は、無刺激時には全臓器で検出限度以下であったが、LPS 投与により肺、脾臓、大動脈、肝臓で強く発現した。しかし、胃、脳などでは全く検出されなかった。LPS により全組織で AM 遺伝子発現が増加するため、その大部分は血管壁細胞に由来すると推定された。LPS により免疫細胞なども TNF, IL-1 を産生し、その作用も重なり高い血中濃度が達成できるのであろう。

敗血症性ショック患者の血中 AM 濃度を測定したところ、すべての患者で AM 濃度は上昇し、平均値は 226.13 ± 66.44 fmol/ml と健常者 (5.05 ± 0.21 fmol/ml) の 45 倍に達し、最高値は 150 倍以上であった¹⁷。同様の血圧低下を来した出血性

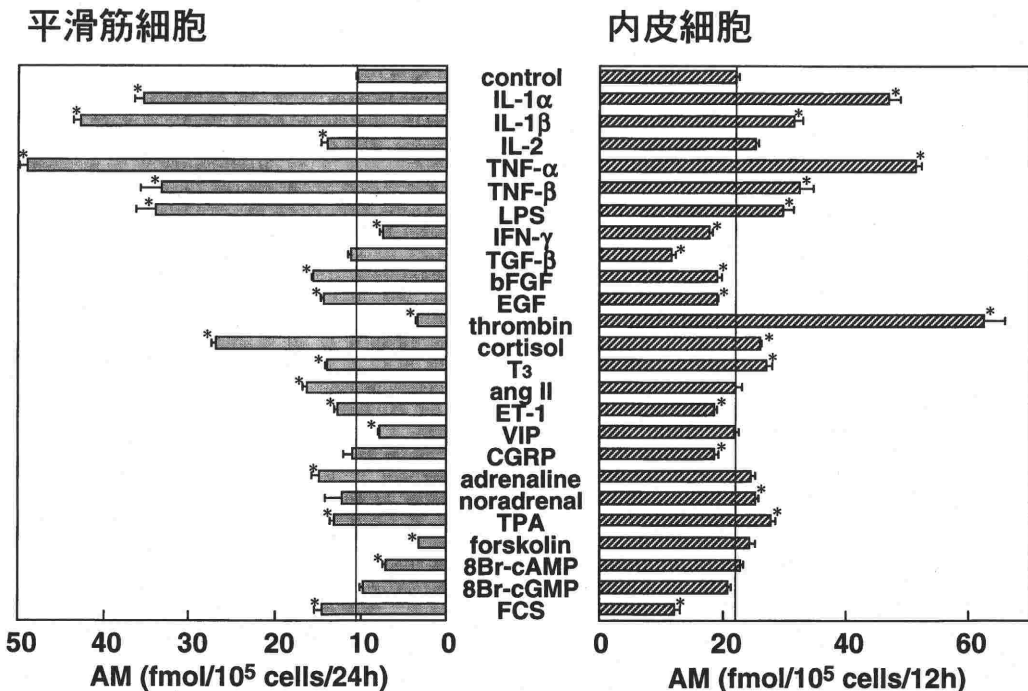


図 4 ラット血管内皮細胞、平滑筋細胞におけるアドレノメデュリンの産生調節

ショック患者の血中濃度は健常者の4倍に過ぎず、AM濃度の上昇が低血圧症発症に絡む病因的なものである可能性が示唆される。実際、血中AM濃度は心係数や体血管抵抗係数と高い相関性を示した。敗血症性低血圧症の原因物質にはNOが想定されているが、上記結果はAMも関与する可能性を示唆する。AMの発現亢進は本来臓器灌流の確保が目的であったが、ショック時には調節不能となり、過剰産生、低血圧症誘導に至るのである。

c) AMによる血管壁細胞の機能制御

TNF, IL-1は炎症を惹起する主要なサイトカインで、マクロファージやT細胞から多量に産生される。血管の損傷、炎症部位や動脈硬化巣の初期病変部では、多くの増殖因子やサイトカインが産生、分泌され、内皮細胞や平滑筋細胞もTNFやIL-1を産生することが示されている。また最近、酸化LDLやリゾフォスファチジルコリンが内皮細胞のAM産生を亢進することも確認した¹³⁾。これらの結果より、血管の病変部では内皮細胞、平滑筋細胞によるAM産生も亢進すると推定され、直接的には局所的血管弛緩を誘起すると考えられる。動脈硬化巣形成過程で中膜平滑筋細胞は収縮型より合成型に変化し、遊走とともに増殖を開始する。河野らは、胎児血清やアンジオテンシンが誘導する平滑筋細胞の増殖や遊走をAMが抑制することを報告している¹⁸⁻²⁰⁾。以上を総合すると、AMは平滑筋細胞の増殖抑制、遊走抑制作用も有し、その進展を抑制すると考えられる。

一方、内皮細胞にも多数の受容体が存在するが、AMの作用としては細胞内Ca²⁺濃度上昇によるNO産生亢進しか報告されていなかった⁸⁾。最近、加藤らはAMが血清除去により起こる内皮細胞のアポトーシスを24時間後で50%まで抑制すること、中和抗体で内因性AMを除去するとアポトーシスが2倍に増加することを報告した(図5)²¹⁾。平滑筋細胞の増殖、遊走抑制作用に続き内皮細胞に対する抗アポトーシス作用が確認されたことは、血管壁でAMが産生されると種々の有害刺激による内皮細胞の細胞死や平滑筋細胞の増殖、遊走が抑制されることを示し、炎症反応や動脈硬化巣形成の抑制へと繋がる可能性が高い。今後、遺伝

子導入などのin vivo系の実験により、血管弛緩以外の機能を明確にしていく必要がある。

d) 内皮細胞、平滑筋細胞以外におけるAMの産生と機能

我々は最近、線維芽細胞や単球/マクロファージ系細胞がAMを産生することを見いだした(図5)。線維芽細胞がペプチド性因子を産生すると従来想定されていなかったが、検討した3種の細胞で動物種、由来組織に関係なくAMは産生されており、産生量も内皮細胞や平滑筋細胞に匹敵し、基本的には平滑筋細胞に類似した機構により調節されていた^{22,23)}。単球/マクロファージ系細胞の基礎分泌量は多くないが、分化誘導因子やLPSなどの活性化因子により大きく増加することを確認している。この結果、血管を取り巻くほとんどの細胞においてAM産生が確認され、線維芽細胞やマクロファージも敗血症性ショック時にはAMを産生し、血中AM濃度の上昇に寄与している可能性が高い。

AMが幅広い組織や細胞で発現、産生され、受容体も広範に分布することは、AMが血管以外の細胞や組織で未同定の機能を有することを示唆する。実際、血管平滑筋細胞に対しAMは増殖抑制因子として機能するが、線維芽細胞(Swiss 3T3細胞)では増殖促進に作用する²²⁾。肺ガンなどに由来する腫瘍細胞株や気管支上皮細胞もAMを発現し、細胞増殖を促進することが示されている^{24,25)}。一方、腎でも種々の細胞でAMは産生され、メサンギウム細胞の増殖を抑制することが報告されている²⁶⁾。これらの結果は、AMが多様な細胞で産生され、循環調節因子やペプチドとしての「定義」を越えて機能することを示す。最近、我々はSwiss 3T3細胞のIL-6産生をAMが強力に促進することや²⁷⁾、逆に他の細胞ではサイトカイン産生を抑制することなどを見出しており、今後このようなデータを積み重ね、非循環調節ペプチドとしてのAMの本質的な機能を明らかにしていきたい。

血管壁におけるET-1の産生

ET-1は内皮細胞で分泌され、平滑筋細胞に作用する強力な内皮由来の血管収縮因子と認識されている。しかし、平滑筋細胞でも活発に産生、

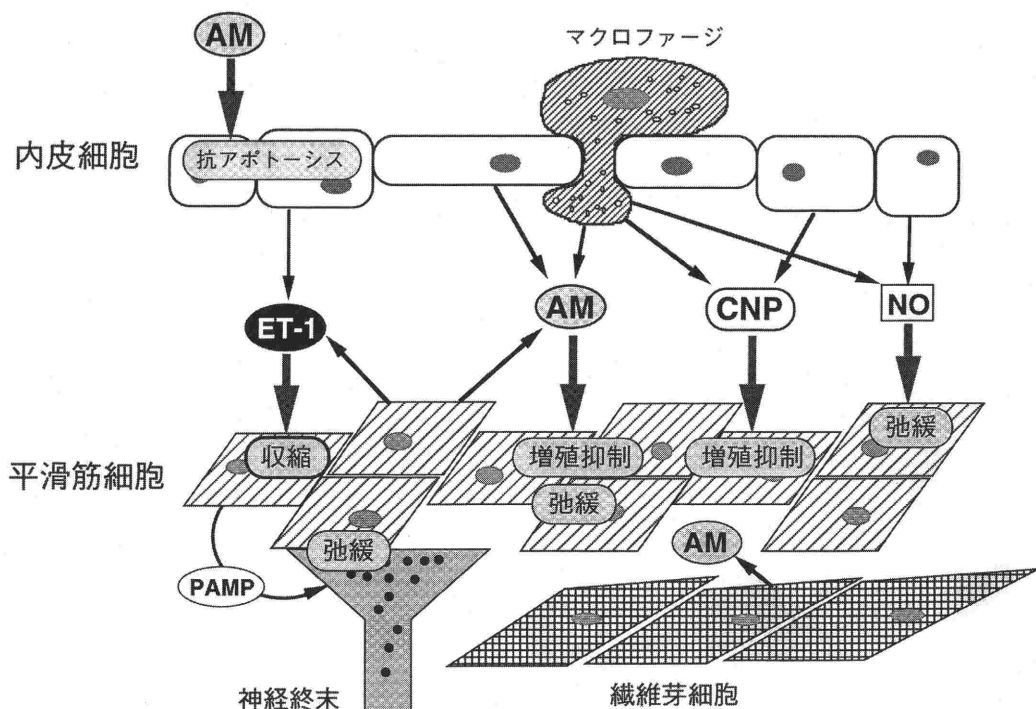


図5 血管壁周辺細胞における循環調節ペプチドの産生と機能

分泌されており、ラット平滑筋細胞では内皮細胞の1/5程度の分泌量である。各細胞の発現する受容体の特異性、分泌される分子型とプロセッシング酵素の発現部位などの要素が実際の作用には影響するため、活性量と分泌量は完全に相関しない可能性があるが、「標的」と考えられる平滑筋細胞でもET-1が活発産生されることは、我々のET-1に対する視点を変更するよう示唆していると思われる²⁸⁾。また、心臓では非心筋細胞の大部分を占める線維芽細胞でET-1は活発に産生されている²⁹⁾。ET-1が心筋細胞の強力な肥大促進因子であり、心筋の収縮リズムを加速、強化する因子でもあることも報告されている³⁰⁾。これらの点を考慮すると、ET-1も循環調節ペプチドの「定義」からはみ出す、将来有望な因子と考えると良いのではないだろうか。

血管壁におけるCNPの産生

CNPは、ブタ脳より我々が精製した第3のナトリウム利尿ペプチドで、ANP、BNPと異なり、降圧活性は極めて弱く、心臓では産生されない神

経ペプチドと考えられてきた。しかし、CNPの受容体であるGC-Bが末梢組織にも広範に分布するとともに、RT-PCR法などで増幅すると非常に少ない量であるがほとんどの組織でCNP mRNAの存在が確認された。我々は単球/マクロファージ系細胞が分化に従いCNPを分泌すること、菅らは血管内皮細胞がTGF、TNF、LPSなどの刺激によりCNPを多量に産生することを見出した^{31,32)}。平滑筋細胞のCNP産生については報告がないが、CNPは合成型平滑筋細胞の強力な増殖抑制因子で、直接投与や遺伝子導入により内膜肥厚が明確に抑制されることがわかっている。以上の点から、神経ペプチドと考えられてきたCNPも、従来の概念からややずれる循環調節ペプチドと考えねばならないであろう。

結 語

内皮細胞、平滑筋細胞におけるAM産生の同定より始まった研究をもとに、血管壁細胞が循環調節ペプチドの標的のみならず産生細胞でもある、という議論を一方向的に展開させていただいた。詳

細に検討すれば、まだまだ多くの物質が血管壁細胞で産生されることが確認されるであろう。循環調節ペプチド、ホルモン、サイトカインなどは我々が身勝手に与えた名前であり、生物あるいは自然はもっと大きな視点より細胞間の情報伝達を考え進化させてきたのであろう。「情報は双方向性で細胞に優劣はない」という考えに基づき、今後も研究を続けていきたい。

文 献

- 1) Kitamura K, Kangawa K, Kawamoto M, et al : Adrenomedullin: a novel hypotensive peptide isolated from human pheochromocytoma. *Biochem Biophys Res Commun* 192 : 553-560, 1993
- 2) Kitamura K, Sakata J, Kangawa K, et al : Cloning and characterization of cDNA encoding a precursor for human adrenomedullin. *Biochem Biophys Res Commun* 194 : 720-725, 1993
- 3) Ishimitsu T, Kojima M, Kangawa K, et al : Genomic structure of human adrenomedullin gene. *Biochem Biophys Res Commun* 203 : 631-639, 1994
- 4) Kitamura K, Kangawa K, Ishiyama Y, et al : Identification and hypotensive activity of proadrenomedullin N-terminal 20 peptide (PAMP). *FEBS Lett* 351 : 35-37, 1994
- 5) Ishizaka Y, Ishizaka Y, Tanaka M, et al : Adrenomedullin stimulates cyclic AMP formation in rat vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 200 : 642-646, 1994
- 6) Eguchi S, Hirata Y, Kano H, et al : Specific receptors for adrenomedullin in cultured rat vascular smooth muscle. *FEBS Lett* 340 : 226-230, 1994
- 7) Feng CJ, Kang B, Kaye AD, et al : L-NAME modulates responses to adrenomedullin in the hindquarters vascular bed of the rat. *Life Sci* 55 : PL433-438, 1994
- 8) Shimekake Y, Nagata K, Ohta S, et al : Adrenomedullin stimulates two signal transduction pathways, cAMP accumulation and Ca²⁺ mobilization, in bovine aortic endothelial cells. *J Biol Chem* 270 : 4412-4417, 1995
- 9) Shimosawa T, Ito Y, Ando K, et al : Proadrenomedullin NH₂-terminal 20 peptide, a new product of the adrenomedullin gene, inhibits norepinephrine overflow from nerve endings. *J Clin Invest* 96 : 1672-1676, 1995
- 10) Katoh F, Kitamura K, Niina H, et al : Proadrenomedullin N-terminal 20 peptide (PAMP), an endogenous anticholinergic peptide: Its exocytotic secretion and inhibition of catecholamine secretion in adrenal medulla. *J Neurochem* 64 : 459-461, 1995
- 11) Sugo S, Minamino N, Kangawa K, et al : Endothelial cells actively synthesize and secrete adrenomedullin. *Biochem Biophys Res Commun* 201 : 160-1166, 1994
- 12) Sugo S, Minamino N, Shoji H, et al : Interleukin-1, tumor necrosis factor and lipopolysaccharide additively stimulate production of adrenomedullin in vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 207 : 25-32, 1995
- 13) Isumi Y, Shoji H, Sugo S, et al : Regulation of adrenomedullin production in rat endothelial cells. *Endocrinology* 139 : 838-846, 1998
- 14) Sugo S, Minamino N, Shoji H, et al : Effects of vasoactive substances and cAMP related compounds on adrenomedullin production in cultured vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett* 369 : 311-314, 1995
- 15) Minamino N, Shoji H, Sugo S, et al : Adrenocortical steroids, thyroid hormones and retinoic acid augment the production of adrenomedullin in vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 211 : 686-693, 1995
- 16) Shoji H, Minamino N, Kangawa K, et al : Endotoxin markedly elevates plasma concentration and gene transcription of adrenomedullin in rat. *Biochem Biophys Res Commun* 215 : 531-537, 1995
- 17) Nishio K, Akai Y, Murao Y, et al : Increased plasma concentration of adrenomedullin correlate with relaxation of vascular tone in patients with septic shock. *Crit Care Med* 25 : 953-957, 1997
- 18) Kano H, Kohno M, Yasunari K, et al : Adrenomedullin as a novel antiproliferative factor of vascular smooth muscle cells. *J Hypertens* 14 : 209-213, 1996
- 19) Horio T, Kohno M, Kano H, et al : Adrenomedullin as a novel antimigration factor of vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 77 : 660-664, 1995
- 20) Kohno M, Yokokawa K, Kano H, et al : Adrenomedullin is a potent inhibitor of angiotensin II-induced migration of human coronary artery smooth muscle cells. *Hypertension* 29 : 1309-1313, 1997
- 21) Kato H, Shichiri M, Marumo F, et al : Adrenomedullin as an autocrine/paracrine apoptosis survival factor for rat endothelial cells. *Endocrinology* 138 : 2615-2620, 1997
- 22) Isumi Y, Minamino N, Katafuchi T, et al : Adrenomedullin production in fibroblasts: Its possible function as a growth regulator of Swiss 3T3 cells. *Endocrinology* 139 : 2552-2563, 1998
- 23) Kubo A, Minamino N, Isumi Y, et al : Adrenomedullin production is correlated with differentiation in human leukemia cell lines and peripheral blood monocytes. *FEBS Lett*, in press
- 24) Martinez A, Miller MJ, Unsworth EJ, et al : Expression of adrenomedullin in normal and human lung and in pulmonary tumors. *Endocrinology* 136 : 4099-4105, 1995
- 25) Martinez A, Elsasser TH, Muro-Cacho C, et al : Expression of adrenomedullin and its receptor in normal and malignant human skin: A potential pluripotent role in the integument. *Endocrinology* 138 : 5597-5604, 1997
- 26) Chini EN, Choi E, Grande JP, et al : Adrenomedullin suppresses mitogenesis in rat mesangial cells via cAMP pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 215 : 868-873, 1995
- 27) Isumi Y, Minamino N, Kubo A, et al : Adrenomedullin stimulates interleukin-6 production in Swiss 3T3 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 244 : 325-331, 1998
- 28) Hahn AWA, Resink TJ, Scott-Burden T, et al : Stimulation of endothelin mRNA and secretion in rat vascular smooth muscle cells: A novel function. *Cell Regul* 1 : 649-659, 1990
- 29) Harada M, Itoh H, Nakagawa O, et al : Significance of ventricular myocytes and nonmyocytes interaction during cardiocyte hypertrophy: Evidence for endothelin-1 as a paracrine hypertrophic factor from nonmyocytes. *Circu-*

- lation 96 : 3737-3744, 1997
- 30) Suzuki T, Tsuruda, A, Katoh S, et al : Purification of endothelin from a conditioned medium of cardiac fibroblastic cells using beating rate assay of myocytes cultured in a serum-free medium. J Mol Cell Cardiol 29 : 2087-2093, 1997
- 31) Suga S, Nakao K, Itoh H, et al : Cytokine-induced C-type natriuretic peptide secretion from vascular endothelial cells: Evidence for CNP as a novel autocrine/paracrine regulator from endothelial cells. J Clin Invest 90 : 1145-1149, 1992
- 32) Ishizaka Y, Kangawa K, Minanino N, et al : Isolation and identification of C-type natriuretic peptide in human monocytic cell line, THP-1. Biochem Biophys Res Commun 189 : 697-704, 1992