

アドレノメデュリンは自己分泌および傍分泌機序  
によって小胞体ストレスから膵 $\beta$ 細胞を保護する

末富 吏佐

山口大学大学院 医学系研究科

応用医工学系専攻 病態制御内科学

令和2年 1月

## 目次

1. 要旨	2
2. 背景	3
3. 対象と方法	4
4. 結果	8
5. 考察	17
6. 結語	19
7. 謝辞	19
8. 参考文献	20

## 1. 要旨

**目的と序論：**膵  $\beta$  細胞は小胞体ストレス（ER ストレス）に非常に敏感であり，ER ストレスは膵  $\beta$  細胞が細胞死に至る過程で主要な役割を果たす．一方，血管拡張性ペプチドとして知られているアドレノメデュリンは，さまざまな生理学的条件下で強力な臓器保護効果を発揮することが示されている．また，いくつかの研究においては，チアゾリジン薬には膵  $\beta$  細胞の保護効果があることも知られている．我々は，チアゾリジン薬であるピオグリタゾンが膵  $\beta$  細胞死を防ぐ分子メカニズムを解明していく過程でアドレノメデュリンが関与している可能性を考えた．そこで，ピオグリタゾンとの関連性を含めたアドレノメデュリン発現調節メカニズム，膵島におけるアドレノメデュリンの生理的役割について検討した．

**方法：**膵  $\alpha$ ， $\beta$  細胞株を用いて，ピオグリタゾンのアドレノメデュリンの発現に対する効果を解析した．アドレノメデュリンおよびアドレノメデュリン受容体発現に対する ER ストレスの影響を明らかにするために，小胞体ストレスを惹起するタプシガルギンによって処理された膵  $\beta$  細胞株である MIN6 細胞を解析した．さらに，視神経萎縮と若年発症インスリン依存性糖尿病を主徴とする Wolfram 症候群の原因遺伝子である *Wfs1* を欠損したマウス（以下 *Wfs1*<sup>-/-</sup>マウス）および *db/db* マウスの膵島を用いて解析した．アドレノメデュリンの細胞死への保護効果は，MIN6 細胞にアドレノメデュリンペプチドを添加もしくはアドレノメデュリン発現プラスミドを遺伝子導入することにより，評価した．

**結果：**ピオグリタゾンは PPAR $\gamma$  依存性メカニズムを介することで膵  $\beta$  細胞のアドレノメデュリン産生と分泌を増加させた．タプシガルギン処理によって MIN6 細胞内のアドレノメデュリンは増加し，Ramp2，Ramp3 と Cr1r で構成されているアドレノメデュリン受容体の発現も増加していた．さらに *Wfs1*<sup>-/-</sup>マウスと *db/db* マウスから分離された膵  $\beta$  細胞においても，アドレノメデュリンおよびアドレノメデュリン受容体発現は有意に増加していた．またアドレノメデュリンペプチド添加とプラスミドによるアドレノメデュリンの過剰発現は，タプシガルギンが誘導する細胞死から MIN6 細胞を保護する効果があることを見出した．

**結論：**ピオグリタゾンは，膵ラ氏島におけるアドレノメデュリンシグナルの増強により，ER ストレス誘発細胞死から膵  $\beta$  細胞を保護する可能性がある．また，膵  $\beta$  細胞におけるアドレノメデュリンシグナルは ER ストレスに対する自己防御メカニズムの 1 つである可能性が示唆された．以上のことから，アドレノメデュリンは糖尿病の新しい治療戦略のひとつとして期待しうる．

## 2. 背景

2型糖尿病の有病率は、高脂肪食や運動不足などの環境変化により、世界的にみて劇的に上昇している。2型糖尿病患者では、膵β細胞の機能障害と膵β細胞死による細胞量の減少が見られることが明らかになってきており、これらは2型糖尿病の発症や進展の要因であると考えられている。従って、この膵β細胞の機能障害と細胞死の分子メカニズムを解明することは、β細胞保護の観点から2型糖尿病に対する新しい治療法を開発するのに不可欠であるといえる。多くの2型糖尿病では多数の遺伝子が関与していると認識されている一方で、単一遺伝子の変異によって引き起こされる糖尿病も認められる(1)。単一遺伝子変異による糖尿病はまれであるが、病態生理学的な見地にたつてその事象を研究することは、膵β細胞の機能維持のメカニズムの解明には有意義である。

単一遺伝子変異による糖尿病のひとつである Wolfram 症候群は視神経萎縮、難聴、神経発達遅滞、若年発症糖尿病を主徴とする常染色体劣性の遺伝形態をとる予後不良の疾患である(4)。WFS1とWFS2遺伝子の欠損はそれぞれ Wolfram 症候群1および2を引き起こし、ほとんどの Wolfram 症候群の患者はWFS1遺伝子に変異を持っている(2, 3)。Wolfram 症候群の原因遺伝子WFS1は、小胞体膜に局在する100kDaの膜貫通蛋白質であるWFS1蛋白質(wolframin)をコードする(5)。wolframinは小胞体のカルシウムホメオスターシスの維持に関わることが示されており、その欠損はERストレスを引き起こす。また、wolframinは小胞体の転写活性因子であるATF6の活性を制御することによりERストレス応答に関与することも証明されている(5, 6)。ストレス条件下において、ATF6はwolframinの制御を離れて活性化され、ERストレス応答遺伝子の発現誘導を行う。WFS1の欠損は、ATF6の恒常的な活性化などを介してERストレスが惹起する膵β細胞機能障害と細胞死を誘導する(7, 8)。またWFS1遺伝子の遺伝子多型が2型糖尿病と関連していることも報告されている(9-12)。実際に、2型糖尿病の発症においても膵β細胞内で引き起こされるERストレスが発症・進展に関与しているという報告は多数ある(13)。従って、Wolfram 症候群の研究が2型糖尿病の新しい治療法につながる可能性も十分にあると考える。

我々は Wolfram 症候群でのβ細胞死のメカニズムを解明するために、Wfs1欠損マウスを用いた研究を進める中で、軽度の肥満がWfs1欠損マウスでのβ細胞障害を著しく加速し、糖尿病発症を導くこと、チアゾリジン薬がこのモデルでの膵β細胞を保護し、糖尿病発症を抑制することを見出した(7)。さらに、チアゾリジン薬であるピオグリタゾンが膵β細胞死を防ぐ分子メカニズムを解明していく過程でアドレノメデュリンが関与している可能性を考えた。そこで、ピオグリタゾンとの関連性を含めたアドレノメデュリン発現調節メカニズム、膵島における

アドレノメデュリンの生理的役割について検討した。

アドレノメデュリン (ADM) は、ヒト褐色細胞腫から同定された 52 個のアミノ酸より構成される血管拡張性ペプチドである (14)。ADM はカルシトニン/カルシトニン遺伝子関連ペプチド (CGRP) ファミリーの 1 つであり、受容体活性修飾蛋白である RAMP2 と RAMP3 が 7 回膜貫通蛋白質であるカルシトニン受容体様レセプター (CRLR) と結合し、それぞれ ADM 受容体 1, 2 と呼ばれる特異的受容体を構成する (15)。ADM は多岐にわたる種類の細胞より分泌され、自己分泌 (autocrine) および傍分泌 (paracrine) の両方のシステムで機能し、抗酸化、抗炎症、抗線維化および抗アポトーシスの効果をもっていると考えられている (16-18)。

糖尿病患者での血漿 ADM 濃度は増加しているとされている。糖尿病網膜症と血漿 ADM 濃度の関係も明らかになってきており (19-21)、糖尿病増殖網膜症の硝子体で ADM が増加していることが知られている (22, 23)。さらに ADM は血管透過性を亢進させるため、眼球ではむしろ炎症性変化をもたらす可能性もある (24, 25)。

ADM はさまざまな組織や臓器に広く分布し、種々の臓器に対する臓器保護作用を発揮する。本研究では、膵ラ氏島にターゲットを絞り、特に ER ストレス条件下での膵ラ氏島における ADM 発現とその抗アポトーシス効果に着目し解析を行った。

### 3. 対象と方法

#### マウス

全てのマウスは温度制御された 12 時間毎の明/暗サイクルのもと飼育した。ピオグリタゾン (武田薬品工業, Osaka, Japan) は、4 週齢から標準マウス用飼料に 0.01% (wt/wt) 混ぜて投与した。

Yellow agouti ( $A^y/a$ ) マウスは名古屋大学大学院医学系研究科の西村正彦教授より供与を受けた。 $Wfs1$  遺伝子欠損  $A^y/a$  マウスは、 $Wfs1^{-/-}$  マウスと  $A^y/a$  マウスを交配して作成した。雄の  $db/db$  マウスおよび非糖尿病コントロールは CLEA Japan (Tokyo, Japan) より購入した。

実験には雄のマウスを使用した。全ての実験のプロトコールは山口大学医学部動物実験倫理委員会の承認を受けている。

#### マイクロアレイ分析

マウスのトータル RNA は ISOGEN (Nippon Gene) と RNeasy kit (Qiagen) を使用して抽出した。ラベリングと Hybridization (Affymetrix Mouse Genome 430 2.0 Array) はクラボウ (Osaka, Japan) に委託した。

## 細胞培養と膝ラ氏島培養

マウス膝β細胞株 (MIN6 細胞) は大阪大学大学院医学系研究科の宮崎純一教授より供与を受けた。膝α細胞株 (α-TC1 細胞) は American Type Culture Collection (ATCC) より購入した。MIN6 細胞と α-TC1 細胞は 15%ウシ胎児血清と 71.5 μM の βメルカプトエタノールを加えた 25mM グルコース Dulbecco's modified Eagle's 培地で培養した。MIN6 細胞は 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 条件下で継代培養し, 継代数 23-30 で使用した。膝ラ氏島単離には C57BL/6 マウスを使用し, マウスの膝臓にコラゲナーゼによる灌流処理をした後にハンドピックアップにより単離した。

## RNA 抽出および定量的リアルタイム PCR

MIN6 細胞からのトータル RNA 抽出には, RNeasy Mini Kit (Qiagen) を使用した。マウスの膝ラ氏島からのトータル RNA 抽出には, Isogen (Nippon Gene, Japan) と RNeasy Mini Kit (Qiagen) を併用した。

cDNA は Superscript II Reverse Transcriptase (Life Technologies) で合成し, Power SYBR Green PCR Master Mix (Life Technologies) を使用して Step one Plus リアルタイム PCR システム (Applied Biosystems, CA, USA) にてリアルタイム PCR を行った。ΔCt 法を使用して各 mRNA 量を計算して求めた値を Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) で補正し, その平均値を測定結果とした。

全てのプライマーはマウス遺伝子用に設計し, その配列は以下の通りである。

*mGapdh* forward: 5'-AGTATGACTCCACTCACGGCAA-3'

*mGapdh* reverse: 5'-TCTCGCTCCTGGAAGATGGT-3'

*mDdit3* forward: 5'-GGAGGTCTTCCTCAGATG-3'

*mDdit3* reverse: 5'-GGACGCAGGGTCAAGAGTAG-3'

*mAdm* forward: 5'-CCCAGACTCTTGATCCATTCC -3'

*mAdm* reverse: 5'-GTAGCGTTTGACACGAATGTG -3'

*mRamp2* forward: 5'-CTCATCCCCTGAGGACAGC-3'

*mRamp2* reverse: 5'-TGCACCAGTCCTTGACAGAG-3'

*mRamp3* forward: 5'-CTGTCTGGAAGTGGTGCAAC-3'

*mRamp3* reverse: 5'-CTCGGTGCAGTTAGTGAAGC-3'

mCrlr forward: 5'-CAGAAGGCCTTTACTGCAATAGG-3'

mCrlr reverse: 5'-TCCCTGCTGCAACGTCATT-3'

### レポーターアッセイ

MIN6 細胞を 6 穴プレートで一晩培養した後に, Lipofectamin2000 (Thermofisher, CA, USA) を使用して ADM プロモーター下でルシフェラーゼを発現するレポーター (pGL プラスミド) を遺伝子導入した. 遺伝子導入 24 時間後に, 10  $\mu$ M ピオグリタゾン添加群と非添加群に分けた. 遺伝子導入 48 時間後に PicaGene LUC assay kit (Tokyo Ink, Japan) にてルシフェラーゼアッセイを行った. プロモーター活性は細胞蛋白質含有量に対して標準化した.

### クロマチン免疫沈降 (ChIP)

10  $\mu$ M ピオグリタゾン添加群とコントロール群の 2 種の MIN6 細胞を 10cm ディッシュで 48 時間培養後, 1 %ホルムアルデヒドで固定した. 固定後に EZ-ChIP chromatin immunoprecipitation kit (Merck Millipore, MA, USA) を使用して ChIP アッセイを行った. 細胞は溶解, 超音波処理した. 免疫沈降反応はウサギ IgG (Santa Cruz Biotechnology, TX, USA), 抗アセチル化ヒストン H3 (Merck Millipore, MA, USA) と抗 PPAR $\gamma$  (Santa Cruz Biotechnology, Tx, USA) を使用し, 4°C の条件下で一晩行った. PCR clean up columns (Qiagen, Germany) を使用してクロマチンを精製し, AmpliTaq Gold PCR Master Mix (Thermofisher, CA, USA) にて PCR を行った.

全てのプライマーはマウス遺伝子用に設計し, その配列は以下の通りである.

ADM-P1 forward: 5'- CAAACTTGGCAAGCACTCAG-3'

ADM-P1 reverse: 5'- AATGGGCTAGGACACACTCC-3'

ADM-P2 forward: 5'- CAAACTTGGCAAGCACTCAG-3'

ADM-P2 reverse: 5'- ACGGGTACTCCAAATGAAGG-3'

ADM-P3 forward: 5'- AAACCCCAATTTCCAATTCAG-3'

ADM-P3 reverse: 5'- GAAGGGGAACCAGAACAACACTC-3'

### 免疫蛍光抗体法

マウスの膵臓組織を採取し, 既報 (26) のような行程で行った. 染色前に組織切片に対して抗原賦活化を行い, その後切片をモルモット抗インスリン抗体 (1 :

4000 ; Sigma) とウサギ抗 ADM 抗体 (1:200 ; Santa Cruz Biotechnology) の 2 種の一次抗体で一晩培養した. 次に Fluorescein FITC および Cyanine Cy3 (1 : 200 ; Jackson ImmunoResearch Laboratories, PA, USA) と結合した二次抗体を使用した. 全イメージは BZ Analyzer (Keyence, Osaka, Japan) を使用し編集された.

### **アドレノメデュリンペプチド測定**

血清および培養液中に分泌された ADM 濃度は enzyme immunoassay (EIA) (Phoenix Pharmaceuticals, Inc., CA, USA) のプロトコールに従って測定した.

### **ADM ペプチド処理**

ラット ADM (1-50) とヒト ADM (22-52) は Peptide Institute (Osaka, Japan) より購入した. MIN6 細胞は 1  $\mu$ M タプシガルギン (TG) 添加もしくは非添加の状態で 0.1 または 100 nM の ADM ペプチドとともに 24 時間培養した.

### **ウエスタンブロット**

MIN6 細胞を cell lysis buffer (Cell Signaling Technology, MA, USA) で溶解し, タンパク質を抽出した. タンパク質を 4-20% gradient SDS-PAGE で分離後に Hybond ECL nitrocellulose membrane (GE Healthcare, Belgium) にブロットした. 用いた一次抗体は, cleaved caspase-3 (Asp175) (Cell Signaling) と  $\alpha$ -tubulin (Sigma-Aldrich, MO, USA) であった. いずれも抗体の希釈倍率は 1:1000 とした.

### **DNA 断片化の定量**

MIN6 細胞を 12 ウェルプレートで一晩培養した後に Lipofectamine 2000 (ThermoFisher, CA, USA) を用いて pCDNA-ADM または pCDNA-LacZ の遺伝子導入を行った. 遺伝子導入 24 時間後の MIN6 細胞を, 1  $\mu$ M TG の添加もしくは非添加の条件に分けて培養を行った. 遺伝子導入 48 時間後に浮遊した細胞および接着した細胞を溶解し, Quick Apoptotic DNA Ladder Detection Kit (BioVision Inc., CA, USA) を使用して DNA を調製した. その後, 各サンプル 20  $\mu$ L を 1.2% agarose/EtBr ゲルで電気泳動し定量化した.

### **細胞内 cAMP 濃度測定**

MIN6 細胞を 12 ウェルプレートで一晩培養した後に Lipofectamine 2000 (ThermoFisher, CA, USA) を用いて pCDNA-ADM または pCDNA-LacZ の遺伝子導入を行った. 遺伝子導入 24 時間後の MIN6 細胞に, 1  $\mu$ M TG の添加もしくは非添加の条件に分けて培養を行った. 遺伝子導入 48 時間後に細胞を 0.1 M HCL で溶解し



た. 細胞内 cAMP 濃度は、Cyclic AMP EIA kit (Cayman Chemical, MI, USA) を使用して測定した.

#### 統計解析

有意差検定は t 検定を用いて行った. データは平均±SEMとして提示され,  $P < 0.05$  となった場合に有意差ありと判断した.

## 4. 結果

### In Vivo および in Vitro における, 膵ラ氏島細胞での ADM mRNA 発現に対するピオグリタゾン (PIO) の直接効果の評価

本研究の元々の目的は, PIO が膵臓  $\beta$  細胞に直接作用することにより細胞死を防ぐ分子機構を解明することであった.

文献的考察から *Adm* は膵  $\beta$  細胞保護に関与する有力なターゲットと考え、その発現をリアルタイム PCR により確認したところ, PIO によって約 1.3 倍の有意な増加を確認することが出来た (図 1a). 定常状態における *Adm* mRNA 発現は, MIN6 細胞 (図 1b) よりも  $\alpha$ -TC1 細胞において有意に高かった. *Adm* mRNA 発現は 10  $\mu$ M PIO 存在下で 48 時間培養した  $\alpha$ -TC1 細胞で 1.3 倍, MIN6 細胞で 2.3 倍と, ともに有意に上昇していた (図 1b). 3 つの PPAR 応答エレメント (PPRE) 様領域を含む約 1.5 kb の *Adm* プロモーターフラグメント下でルシフェラーゼを発現するようにレポーター遺伝子を設計した. 48 時間の 10  $\mu$ M PIO 添加での培養は *Adm* プロモーター活性を 1.2 倍増加させた (図 1c). PPAR  $\gamma$  活性化を媒介した PIO による *Adm* 誘導は, ChIP アッセイにより確認した. MIN6 細胞において, PIO 存在下でのみ, PPAR  $\gamma$  が ADM プロモーターの特定の領域 (ADM-P3) に結合することがわかった (図 1d).

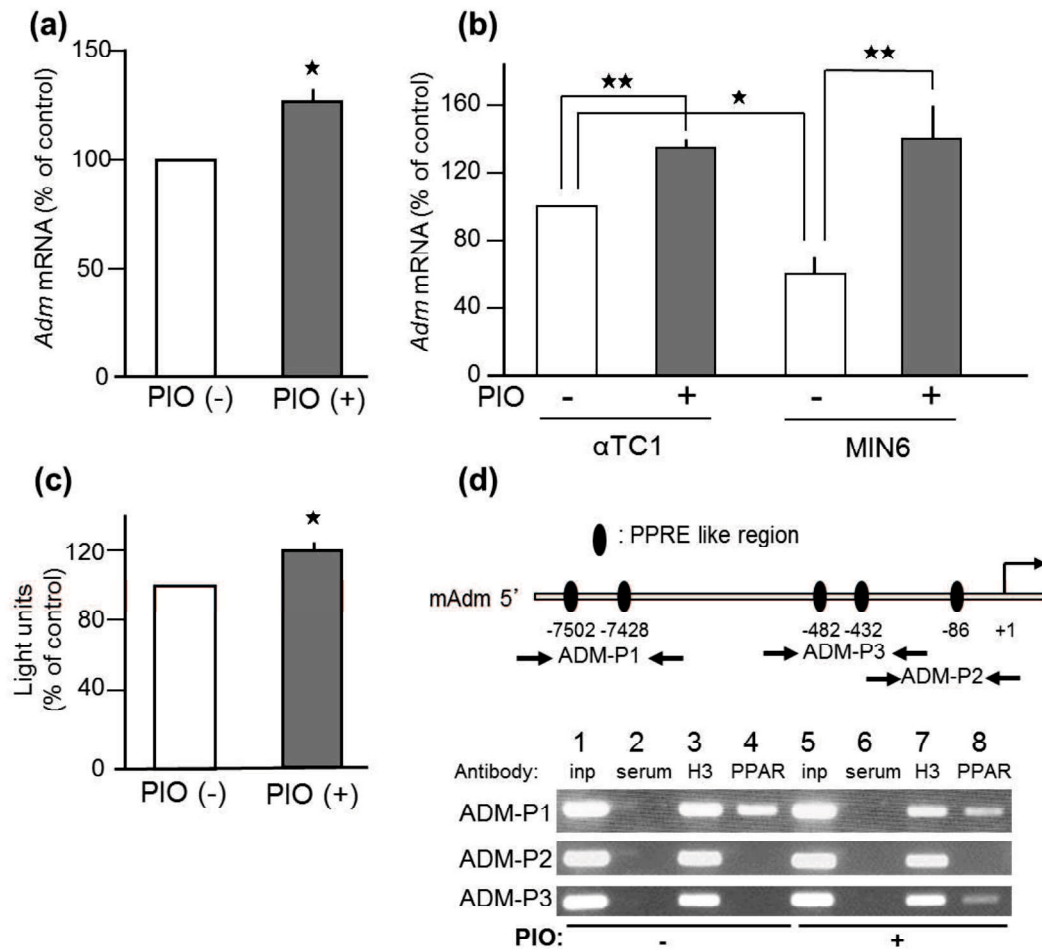


図1 膝ラ氏島における PIO 投与下での *Adm* mRNA 発現に対する効果

(a) 通常の飼料または 0.1%PIO 配合飼料で飼育された 8 週齢の  $A^y/a$  マウスより単離された膝ラ氏島における *Adm* mRNA の発現. Means  $\pm$  SEM (n=3) \*  $p < 0.05$ .

(b) 10  $\mu$ M PIO 添加または非添加下で 48 時間培養した  $\alpha$ -TC1 細胞もしくは MIN6 細胞における *Adm* mRNA の発現. Means  $\pm$  SEM (n=4) \*\*  $p < 0.01$ , \*  $p < 0.05$ .

(c) 10  $\mu$ M PIO 添加または非添加で培養した MIN6 細胞におけるマウス *Adm* プロモーターレポーター遺伝子活性. Means  $\pm$  SEM (n=3) \*  $p < 0.05$ .

(d) PIO 依存的な PPAR  $\gamma$  の *Adm* プロモーターへの結合. 10  $\mu$ M PIO 存在または非存在下で 48 時間培養した MIN6 細胞からクロマチンを抽出し各種抗体で免疫沈降を行った. Lane1 と 5, input DNA (inp) ; Lane2 と 6; normal rabbit IgG (serum) ; Lane3 と 7, anti-acetyl-Histone H3 (H3) ; Lane4 と 8, 抗 PPAR  $\gamma$  抗体 (PPAR).

#### *Wfs1*<sup>-/-</sup>マウスの膝ラ氏島における *Adm* と ADM 受容体の遺伝子発現

*Wfs1*<sup>+/+</sup>  $a/a$ , *Wfs1*<sup>+/+</sup>  $A^y/a$ , *Wfs1*<sup>-/-</sup>  $a/a$  と *Wfs1*<sup>-/-</sup>  $A^y/a$  マウスの膝ラ氏島におけ

る ER ストレスの評価は、ER ストレス関連蛋白質である CHOP (*Ddit3*) mRNA の相対的な発現量を測定することにより評価した。 *Ddit3* 発現は *Wfs1<sup>+/+</sup> a/a* マウスと比較すると、 *Wfs1<sup>-/-</sup> a/a* と *Wfs1<sup>-/-</sup> A<sup>y</sup>/a* マウスの膵ラ氏島で有意に上昇していた (図 2a) 。 *Ddit3* 発現増加に関連した *Adm* mRNA 発現は、 *Wfs1<sup>-/-</sup> a/a* と *Wfs1<sup>-/-</sup> A<sup>y</sup>/a* マウスの膵ラ氏島において *Wfs1<sup>+/+</sup> a/a* マウスの膵ラ氏島と比較し有意に上昇していた (図 2a, b) 。 一方、血清 ADM 濃度は *Wfs1<sup>+/+</sup> a/a* マウスと比較して、 *Wfs1<sup>-/-</sup> a/a* と *Wfs1<sup>-/-</sup> A<sup>y</sup>/a* マウスにおいても上昇していなかった (図 2c) 。 *Wfs1<sup>-/-</sup> A<sup>y</sup>/a* マウスの膵ラ氏島における内因性 ADM を蛍光免疫組織化学染色により分析した結果、増加した ADM は主に非  $\beta$  細胞で発現していた (図 2d) 。 ADM 受容体は、CRLR と RAMP2 もしくは RAMP3 とのヘテロダイマーである。 *Wfs1<sup>-/-</sup> a/a* マウスの膵ラ氏島における ADM 受容体発現の変化を、リアルタイム PCR で解析した。 *Ramp2*, *Ramp3*, *Crlr* mRNA は *Wfs1<sup>+/+</sup> a/a* マウスと比較し、 *Wfs1<sup>-/-</sup> a/a* マウスの膵ラ氏島で有意に増加していた (図 2e) 。

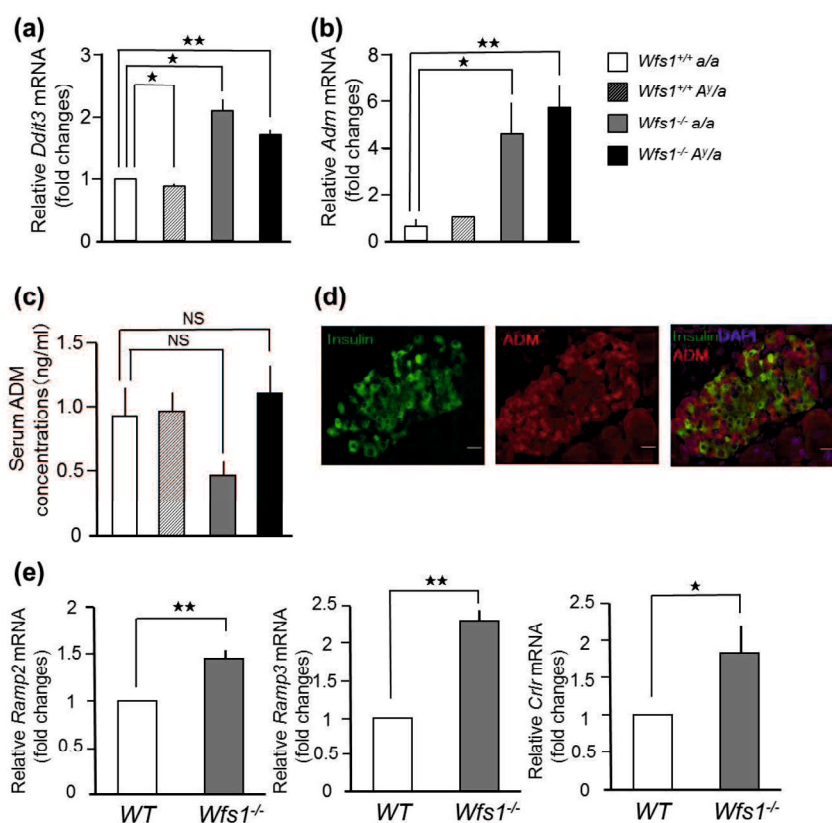


図 2 *Wfs1<sup>-/-</sup>* マウスの膵ラ氏島において *Adm* と ADM 受容体の発現は増加する

(a, b) *Wfs1<sup>+/+</sup> a/a*, *Wfs1<sup>+/+</sup> A<sup>y</sup>/a*, *Wfs1<sup>-/-</sup> a/a* と *Wfs1<sup>-/-</sup> A<sup>y</sup>/a* マウスの膵ラ氏島における *Ddit3* (a) および *Adm* (b) mRNA 発現をリアルタイム PCR にて分析した。各々の RNA は 8-10 週齢のマウスより単離された 100-400 個の膵ラ氏島から精製した。 means  $\pm$  SEM (*Ddit3*; n=3 mice/genotype, *Adm*; n=6 mice/genotype). \*\**p*

< 0.01, \* $p$  < 0.05. (c) 10 週齢  $Wfs1^{+/+} a/a$ ,  $Wfs1^{-/-} a/a$  と  $Wfs1^{-/-} A^y/a$  マウスの血漿 ADM 濃度を ELISA 法にて測定した. means  $\pm$  SEM (n=5-12 mice/genotype). NS:有意差なし. (d) 10 週齢  $Wfs1^{-/-} A^y/a$  マウスの膵ラ氏島における内因性 ADM の蛍光免疫組織化学染色. Scale bars, 20 $\mu$ m. (e) 8-10 週齢の  $Wfs1^{+/+} a/a$ ,  $Wfs1^{-/-} a/a$  マウスより単離した 200-400 個の膵ラ氏島における *Ramp2*, *Ramp3*, *Cr1r* mRNA の発現. means  $\pm$  SEM (n=3 or 5 mice/genotype). \*\* $p$  < 0.01, \* $p$  < 0.05. *Ddit3*, DNA damage inducible transcript 3. *A<sup>y</sup>/a*, yellow agouti. *Ramp*, Receptor activity-modifying protein. *Cr1r*, Calcitonin-receptor like receptor.

### ***db/db* マウスの膵ラ氏島における *Adm* と ADM 受容体遺伝子の発現**

*db/db* マウスの血糖値は野生型 (*WT*) と比較すると著明に高値であった (図 3a). *db/db* マウス (3.5 $\pm$ 0.7 ng/ml [mean  $\pm$  SEM]) の血清 ADM 濃度も *WT* (1.9  $\pm$  0.2 ng/ml [mean  $\pm$  SEM]) と比較すると高値であった (図 3b). *Ddit3* 発現量も *db/db* マウスの膵ラ氏島では *WT* よりも有意に上昇していた (図 3c). *Adm*, *Ramp2*, *Ramp3* および *Cr1r* mRNA 発現量も *WT* と比較して *db/db* マウスの膵ラ氏島では有意に増加していた (図 3d-g). *db/db* マウスの血清 ADM 濃度上昇は高血糖と関連しており, 主に血管系での ADM mRNA 発現と ADM 分泌が誘導されている可能性が高い. 一方,  $Wfs1^{-/-} a/a$  マウスの血糖値は正常 (11.3  $\pm$  0.51 mmol/L in  $Wfs1^{+/+} a/a$  and 10.1  $\pm$  0.38 mmol/L in  $Wfs1^{-/-} a/a$  [mean  $\pm$  SEM]) であったが, 膵ラ氏島の *Adm* mRNA の発現は有意に上昇していた (図 3b). 以上の結果より, 膵ラ氏島においては, 高血糖ではなく ER ストレスが膵局所での *Adm* 発現を促進する可能性があると考えられた.

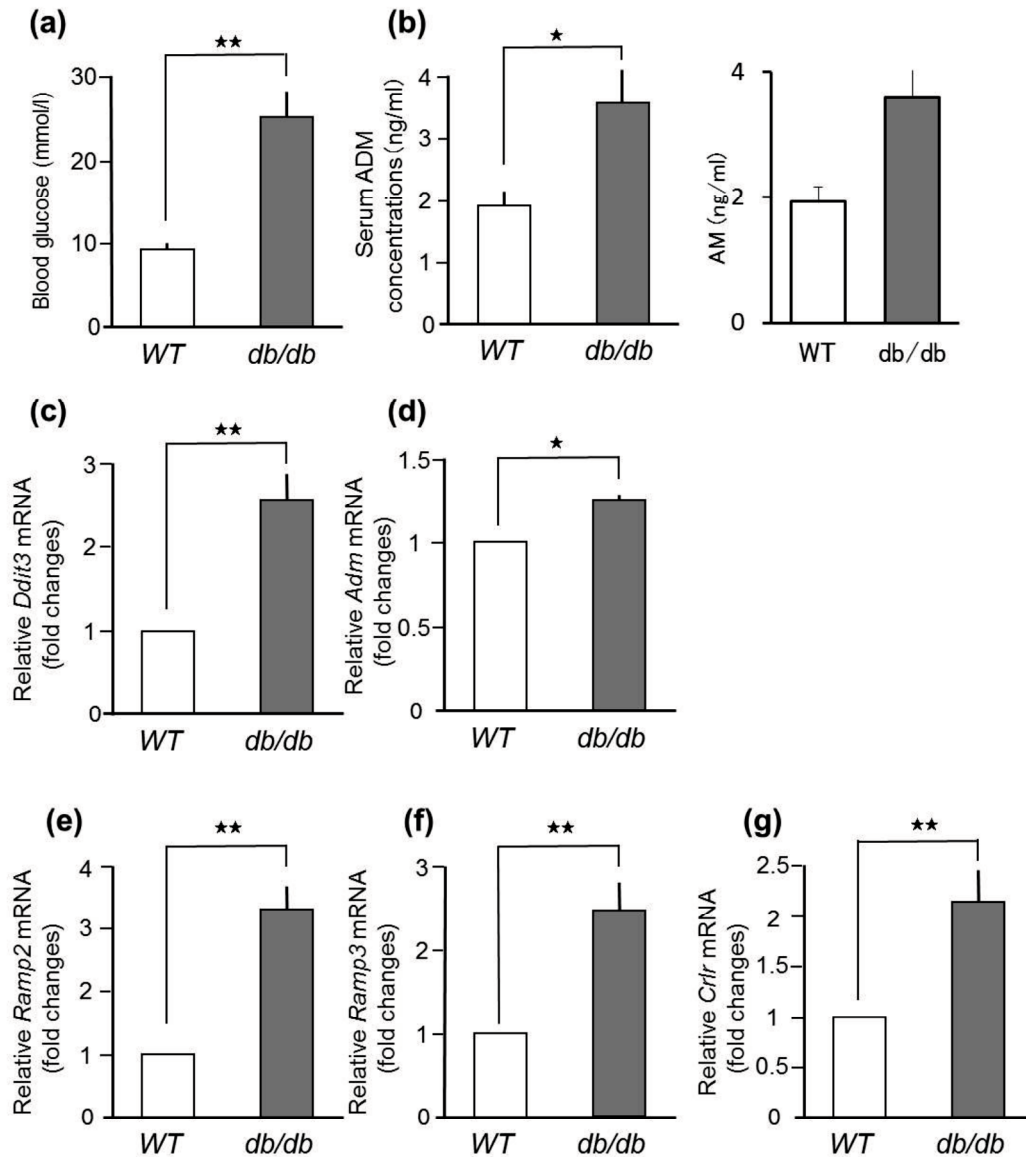


図3 *db/db* マウスの膵ラ氏島における *Adm* と ADM 受容体遺伝子発現は増加する  
 (a) 野生型 (*WT*) および *db/db* マウスの非空腹時血糖値. means  $\pm$  SEM (n=8 in each group). \*\*p < 0.01. (b) 10 週齢の *WT* および *db/db* マウスの血漿 ADM 濃度. means  $\pm$  SEM (*WT*, n=5; *db/db*, n=5). \*p < 0.05. (c-g) *WT* および *db/db* マウスの膵ラ氏島における *Ddit3* (c), *Adm* (d), *Ramp2* (e), *Ramp3* (f) と *Cr1r* (g) mRNA 発現量の解析. 各々の RNA は 8-10 週齢マウスから単離された 100-400 個の膵ラ氏島より抽出された. means  $\pm$  SEM (*WT*, n=4 mice; *db/db*, n=6 mice). \*\*p < 0.01, \*p < 0.05.

TG を添加して培養を行った MIN6 細胞における *Adm* と ADM 受容体の発現

*Adm* および ADM 受容体発現は、ER ストレスに関連して *Wfs1*<sup>-/-</sup> と *db/db* マウスの膵ラ氏島において増加していた。これらの結果は、*in vivo* での ER ストレス増加と *Adm* および ADM 受容体増加との興味深い関連性を示唆するものである。この関連性を *in vitro* で確認するために、我々は膵β細胞株である MIN6 細胞を TG 添加で培養し、*Adm* および ADM 受容体の発現量を調べた。*Ddit3* mRNA の発現はコントロール群と比して 20 倍に増加していた (図 4a)。1 μM TG 添加で 24 時間培養を行った MIN6 細胞において、*Adm* (9.3 倍)、*Ramp2* (1.47 倍)、*Ramp3* (3.55 倍) 及び *Crfr* (2.97 倍) といずれの遺伝子でも mRNA 発現の有意な増加を認めた (図 4b-e)。ADM 分泌においても、TG を添加した MIN6 細胞ではコントロールと比較して分泌量が明らかに上昇していた (図 4f)。

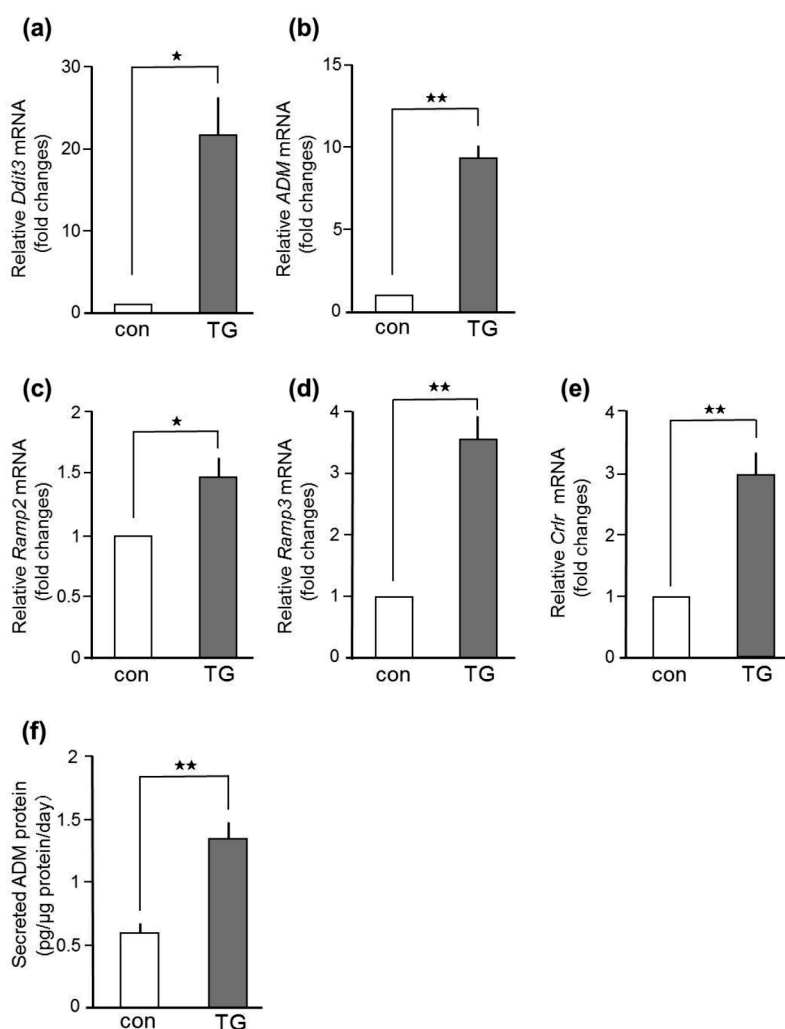


図 4 タプシガルジン (TG) 処理した MIN6 細胞において、*Adm* と ADM 受容体発現は増加していた。

DMSO 添加 (コントロール群) または 1 μM TG 添加にて 24 時間培養を行った MIN6 細胞より抽出した RNA を使用し、*Ddit3* (a)、*Adm* (b)、*Ramp2* (c)、*Ramp3* (d)

と *Cr1r* (e) の mRNA 量をリアルタイム PCR にて分析した. DMSO または 1  $\mu$ M TG 添加で 24 時間培養された MIN6 細胞の培養液を使用し, ELISA 法にて ADM 分泌量を測定した (f). ウェスタンブロットは  $\alpha$ -tubulin にて補正した. mean  $\pm$  SEM of 3-5 independent experiments. Welch' s t-test: \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ .

#### **ADM は, TG によって誘導される細胞死から MIN6 細胞を保護する**

我々は次に TG が添加された MIN6 細胞に対する ADM ペプチドの効果を検討した. MIN6 の細胞死は cleaved caspase-3 の発現を測定することにより解析した. rat ADM1-50 (full length) ペプチドとヒト ADM 22-52 (partial) ペプチドは, 100 nM では cleaved caspase-3 発現をそれぞれ 24%と 36%と有意に減少させたが, どちらのペプチドも 0.1 nM ではその効果が認められなかった (図 5a). 我々はまた, TG 処理した MIN6 細胞に対する ADM 過剰発現の抗アポトーシス効果についても検討した. MIN6 細胞の *Adm* の転写レベルは, LacZ 発現プラスミド (pCDNA3-LacZ) を遺伝子導入したコントロールと比較して, *Adm* 発現プラスミド (pCDNA-ADM) を遺伝子導入した細胞で著明な増加を認めた (図 5b). 転写レベルを反映して, ADM 発現プラスミドを遺伝子導入した MIN6 細胞においては, ADM 分泌が著明に増加していた (図 5c). ADM の過剰発現は, TG により誘導される cleaved-caspase3 の発現を 49%も減少させ (図 5d), DNA 断片化も 56%減少させた (図 5e).

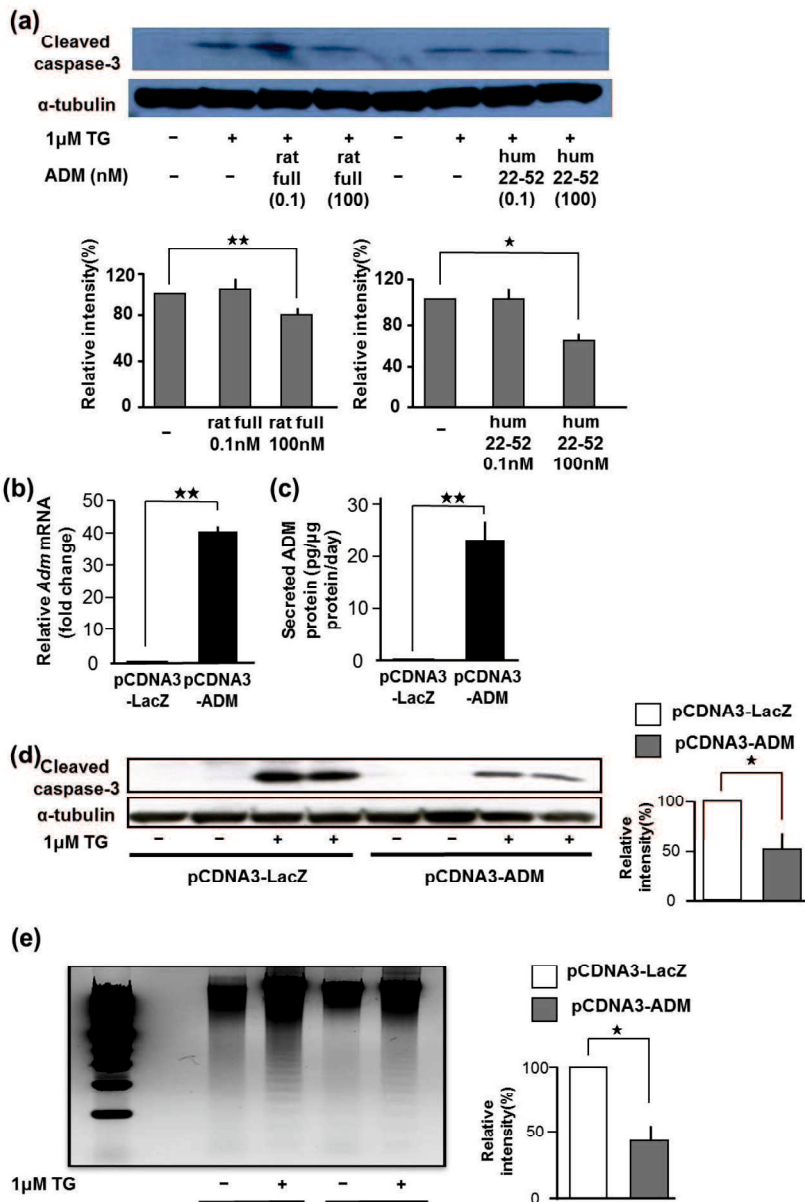


図5 ADMはTGによって誘導される細胞死からMIN6細胞を保護する

(a) 1  $\mu$ M TG を添加もしくは非添加と同時に、0.1 nM か 100 nM の rat full-length ADM または human partial ADM ペプチド (hum 22-52) の添加もしくは非添加で、MIN6 細胞を 24 時間培養した。培養後に cleaved caspase-3 を定量した。 $\alpha$ -tubulin をコントロールとして使用した。mean  $\pm$  SEM of four or five independent experiments. Welch's t-test: \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ . (b, c) MIN6 細胞に pCDNA3-LacZ または pCDNA3-ADM を遺伝子導入し、その細胞より全 RNA 抽出して *Adm* のリアルタイム PCR を行った (b)。同条件下で 24 時間培地中に分泌された ADM を ELISA 法により定量した。ADM 濃度は細胞溶解液中の蛋白質量で補正し



た (c) . means  $\pm$  SEM (n=4-8). Welch' s t-test:  $\star\star p < 0.01$ . (d) pCDNA3-LacZ (コントロール) または pCDNA3-ADM を遺伝子導入した MIN6 細胞において, TG (1  $\mu$ M) にて誘導された cleaved caspase-3 を測定した. means  $\pm$  SEM (n=4). Welch' s t-test:  $\star$ ,  $p < 0.05$ . (e) pCDNA3-LacZ (コントロール) または pCDNA3-ADM 遺伝子導入後の MIN6 細胞を 1  $\mu$ M TG の添加または無添加で培養し DNA の断片化を観察した, Welch' s t-test:  $\star$ ,  $p < 0.05$ .

### TG 添加によって減少した MIN6 細胞における細胞内 cAMP 濃度は ADM によって部分的に回復する

ADM は筋細胞と膵突起膠細胞の両方において cAMP を増加させることが報告されている (35, 48) . 我々は, ADM が細胞内 cAMP 濃度の上昇を介して TG が誘導する細胞死から MIN6 細胞を保護する可能性について検討した. ADM 発現プラスミド

(pCDNA3-ADM) または LacZ 発現プラスミド (pCDNA3-LacZ) をトランスフェクションした MIN6 細胞を, 1  $\mu$ M TG 添加または非添加で 24 時間培養した. 培養後に細胞内 cAMP 濃度を測定した. TG 添加によって, pCDNA-LacZ 遺伝子導入 MIN6 細胞の細胞内 cAMP 濃度は  $37.2 \pm 4.8$  pmol/mg protein から  $19.6 \pm 2.8$  pmol/mg protein へと著明に減少したが, pCDNA-ADM 遺伝子導入群では TG 処理後の細胞内 cAMP 濃度は  $30.5 \pm 2.5$  pmol/mg protein にとどまった (図 6) . この結果から, ADM の抗アポトーシス効果は, ER ストレスによる膵  $\beta$  細胞の細胞内 cAMP 濃度低下の抑制を部分的に介していることが示唆された.

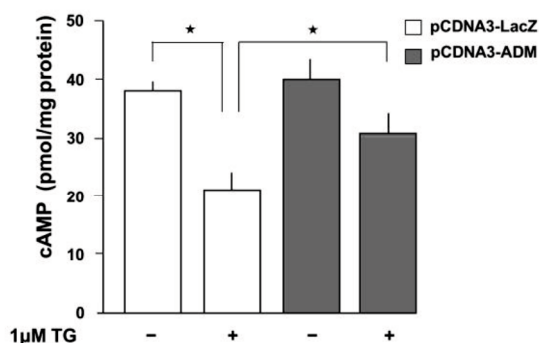


図 6 ADM は TG 処理によって引き起こされる細胞内 cAMP 濃度低下を部分的に抑制する

pCDNA3-LacZ または pCDNA3-ADM をトランスフェクションした MIN6 細胞を 1  $\mu$ M TG 添加または非添加で 24 時間培養した. 培養した細胞を 0.1mol/L HCL にて処理し cAMP を抽出し, ELISA 法にて定量を行った. 全ての値は細胞蛋白質濃度により標準化した. means  $\pm$  SEM (n=5). Welch' s t-test:  $\star$ ,  $p < 0.05$

## 5. 考察

本研究において、我々は、ADM と ADM 受容体の発現が、膵ラ氏島および膵β細胞株において、ER ストレスの増大によって増加することを示した。ADM シグナルの増加は、細胞内 cAMP 濃度の減少の部分的な抑制を伴って膵β細胞に抗アポトーシス効果をもたらすことも示した。

我々は以前、PIO 投与が *Wfs1*<sup>-/-</sup> *A<sup>y</sup>/a* マウスの高血糖と膵β細胞死を改善させることを報告した (7)。この報告では、マウスの WFS1 欠乏と過食による軽度肥満は ER ストレス誘導性の膵β細胞機能障害と細胞死を引き起こし、PIO 投与は *Wfs1*<sup>-/-</sup> *A<sup>y</sup>/a* マウスの膵ラ氏島の ER ストレスを軽減することを示している (7)。一般的に PIO は末梢におけるインスリン感受性を改善させることにより ER ストレスを軽減する。元々の今回の研究目的は、膵ラ氏島における ER ストレス誘発細胞死に対する PIO の直接効果とそのメカニズムを解明することであった。*Wfs1*<sup>-/-</sup> *A<sup>y</sup>/a* マウスにおける高血糖の影響を除外するために、*A<sup>y</sup>/a* マウスを使用しマイクロアレイを実施した。この結果をもとに ADM に着目し、*in vivo* および *in vitro* の両方で ADM mRNA 発現に対する PIO の影響を検討した。*In vivo* では、PIO は ADM 発現を軽度増加させた。*in vitro* では、膵αおよびβ細胞株において PIO により ADM 発現は顕著に増加した。さらに膵β細胞株である MIN6 細胞において、PIO は PPARγ 依存性のメカニズムを介して ADM 発現を増加させることも明らかになった。これらの結果は、少なくとも部分的には膵ラ氏島における ADM 発現の誘導を介して、PPARγ アゴニストが ER ストレス誘発細胞死から膵β細胞を保護する可能性があることを示している。

ADM の発現の増加は、疾病の有無に関わらず、様々な状況、様々な組織で確認されている (27, 28)。本研究で我々は、膵ラ氏島における ADM の増加が転写と分泌のどちらのレベルでも ER ストレスによって著明に増大することを明らかにした。*Ddit3* 発現の増加に関与して、*Wfs1*<sup>-/-</sup> *a/a* マウスおよび *Wfs1*<sup>-/-</sup> *A<sup>y</sup>/a* マウスの膵ラ氏島においては膵ラ氏島での *Adm* mRNA 発現は有意に増加していたが、血清 ADM 濃度は全く増加していなかった (図 2a-d)。ADM 受容体発現もまた、*Wfs1*<sup>-/-</sup> *a/a* マウスの膵ラ氏島において有意に増加していた (図 2e)。これらの結果より、ER ストレスが増大すると全身的というよりも膵ラ氏島局所において ADM の作用がより発揮されることが示唆された。

対照的に *db/db* マウスでは血漿 ADM 濃度は血糖値の増加と関連して著増しており (図 3a, b)、この結果はヒトでの報告とおおよそ一致する (19, 20)。高血糖が血管平滑筋細胞のプロテインキナーゼ C を介して ADM の発現を増やすという報告も認められる (19)。糖尿病モデルラットにおける大動脈組織での ADM 発現の上昇は、血管系における ADM 発現が、ヒトを含む糖尿病動物での血漿 ADM のソー

スとなっていることを示唆している (19) . 従って, *db/db* マウスにおける血漿 ADM 濃度の増加も血管系での ADM の発現増加に起因している可能性がある. 一方, *db/db* マウスの膵ラ氏島においても *Adm* および ADM 受容体 mRNA の発現は, *Ddit3* 発現の増加に比例して上昇していた. *Wfs1<sup>-/-</sup> a/a* マウスおよび *Wfs1<sup>-/-</sup> A<sup>+</sup>/a* マウスでの観察結果と合わせて考えると, ER ストレスが増加した状態においては, 血漿 ADM 濃度上昇とは無関係に ADM シグナルが膵ラ氏島で局所的に増強されることが示唆される.

さらに我々は,  $\beta$  細胞機能の調節における内因性 ADM の役割を検討し, 膵ラ氏島における ADM の抗アポトーシス効果は糖尿病治療に有用である可能性を示すことができた (図 5) . 膵  $\beta$  細胞では, インスリン分泌の必要性が高まると, インスリン合成に対する小胞体への負荷が高くなり, それが細胞ストレスとなる (29) . 慢性かつ高度の ER ストレス下では,  $\beta$  細胞死が引き起こされる可能性がある. 長期にわたる高血糖の持続は, ミトコンドリア内の代謝フラックスを増加させ, 活性酸素の過剰な産生を誘発することにより, 慢性的な酸化ストレスを引き起こす (30) . 糖尿病の膵ラ氏島で増加した多種の炎症性サイトカインもまた, 酸化ストレスと ER ストレスを誘発する (31, 32) . 一般的に, 血漿 ADM 濃度は酸化ストレスとは正の相関関係にあることが知られている (33) . 酸化ストレスと ER ストレスが共存している膵ラ氏島において, ADM シグナルは  $\beta$  細胞の恒常性維持に重要な役割を果たしていることが, 本研究の結果より推察される.

ADM は強力な血管拡張薬として機能し, その血管拡張作用は血管平滑筋細胞の cAMP と上皮細胞での一酸化窒素産生によって媒介されている (1, 34) . 我々は, 今回の研究で, MIN6 細胞の細胞内 cAMP 濃度が TG 添加によって低下することを実証し, ADM が ER ストレスによって低下した細胞内 cAMP 濃度を部分的に回復させることで抗アポトーシス効果をもたらすことを示した (図 6) . グルカゴン様ペプチド 1 (GLP-1) の抗アポトーシス効果は動物モデルにて証明されている (35, 36) . つまり ADM と GLP-1 は膵  $\beta$  細胞における共通の抗アポトーシスシグナル経路を共有している可能性がある.

ADM は血流調節の主要な役割を果たしており, 循環系および各臓器の血管において強力な血管拡張薬として機能している (38) . 加えて, ADM は血管系での抗アポトーシス効果および心臓内皮細胞での細胞増殖調節機能を有する心臓保護ペプチドであることが報告されている (39) . また ADM 投与により, 冠血管の血管拡張に応答した血管抵抗減少と血流増加による心拍出量増加が引き起こされることも観察されている (40) . 急性心筋梗塞患者に ADM を静脈内投与した最初の臨床試験では, 心臓の壁運動と梗塞範囲の改善を認めたとの報告もある (41) . ADM をベースとした治療戦略は, その心臓保護作用に加え, それとは独立した膵  $\beta$  細胞

の ER ストレスに対する細胞保護効果も期待できることから、新たな糖尿病の治療になる可能性を秘めている。

## 6. 結語

ADM と ADM 受容体発現は、ER ストレスの増大によって膵 $\alpha$ および $\beta$ 細胞にて増加する。ADM の自己分泌と傍分泌の増加は、ADM シグナル伝達を介して ER ストレスによる細胞内 cAMP 濃度低下を部分的に回復させ、膵 $\beta$ 細胞における抗アポトーシス効果を発揮することが示唆される（図 7）。

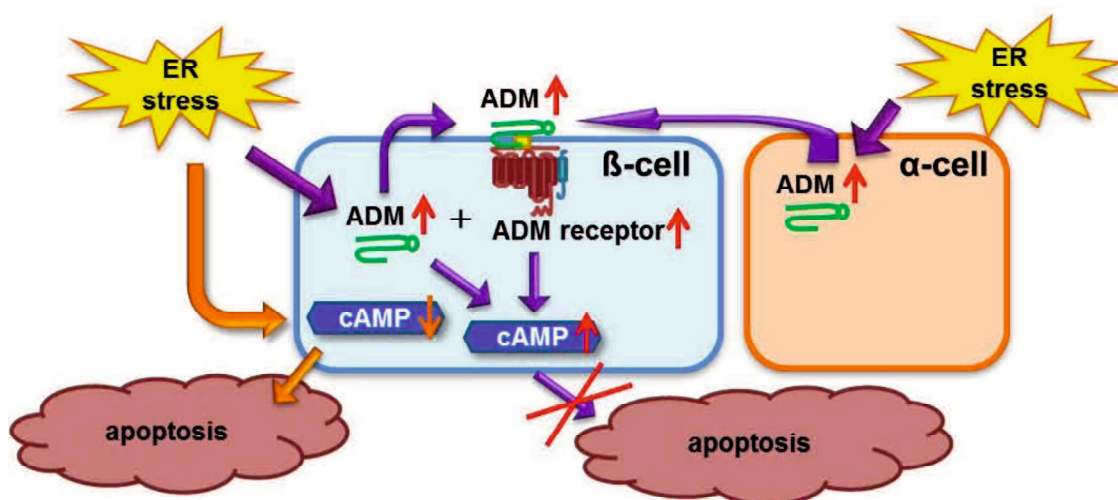


図 7 膵ラ氏島における ER ストレスと ADM シグナル伝達経路

## 7. 謝辞

この研究は、日本学術振興会からの助成金 (grant No. 26460489、23390080、15H04849)、および武田科学振興財団からの助成を受けている。

本研究を進めるにあたり、ご指導を頂いた田口昭彦先生、秋山優先生、太田康晴先生、谷澤幸生教授をはじめ当科研究室の皆様感謝申し上げます。

なお、本学位論文の主要部分は、Suetomi R, Ohta Y, Akiyama M, Matsumura T, Taguchi A, Yamamoto K, Kamatani T, Tanizawa Y. Adrenomedullin has a cytoprotective role against ER stress for pancreatic  $\beta$ -cells in autocrine and paracrine manners. *Journal of Diabetes Invest* 2020 in press に原著論文として発表したものです。

## 8. 参考文献

1. Feng CJ, Kang B, Kaye AD, *et al.* L-NAME modulates responses to adrenomedullin in the hindquarters vascular bed of the rat. *Life Sci* 1994; 55: PL433-438.
2. Rigoli L, Di Bella C. Wolfram syndrome 1 and Wolfram syndrome 2. *Curr Opin Pediatr* 2012; 24: 512-517.
3. Inoue H, Tanizawa Y, Wasson J, *et al.* A gene encoding a transmembrane protein is mutated in patients with diabetes mellitus and optic atrophy (Wolfram syndrome). *Nat Genet* 1998; 20: 143-148.
4. Ganie MA, Laway BA, Nisar S, *et al.* Presentation and clinical course of Wolfram (DIDMOAD) syndrome from North India. *Diabet Med* 2011; 28:1337-1342.
5. Fonseca SG, Fukuma M, Lipson KL, *et al.* WFS1 is a novel component of the unfolded protein response and maintains homeostasis of the endoplasmic reticulum in pancreatic beta-cells. *J Biol Chem* 2005; 280: 39609-39615.
6. Fonseca SG, Ishigaki S, Osowski CM, *et al.* Wolfram syndrome 1 gene negatively regulates ER stress signaling in rodent and human cells. *J Clin Invest* 2010; 120: 744-755.
7. Akiyama M, Hatanaka M, Ohta Y, *et al.* Increased insulin demand promotes while pioglitazone prevents pancreatic beta cell apoptosis in Wfs1 knockout mice. *Diabetologia* 2009; 52: 653-663.
8. Ishihara H, Takeda S, Tamura A, *et al.* Disruption of the WFS1 gene in mice causes progressive beta-cell loss and impaired stimulus-secretion coupling in insulin secretion. *Hum Mol Genet* 2004; 13: 1159-1170.

9. Cheurfa N, Brenner GM, Reis AF, *et al.* Decreased insulin secretion and increased risk of type 2 diabetes associated with allelic variations of the WFS1 gene: the Data from Epidemiological Study on the Insulin Resistance Syndrome (DESIR) prospective study. *Diabetologia* 2011; 54: 554-562.
10. Fawcett KA, Wheeler E, Morris AP, *et al.* Detailed investigation of the role of common and low-frequency WFS1 variants in type 2 diabetes risk. *Diabetes* 2010; 59: 741-746.
11. Minton JA, Hattersley AT, Owen K, *et al.* Association studies of genetic variation in the WFS1 gene and type 2 diabetes in U.K. populations. *Diabetes* 2002; 51: 1287-1290.
12. Sandhu MS, Weedon MN, Fawcett KA, *et al.* Common variants in WFS1 confer risk of type 2 diabetes. *Nat Gene* 39: 951-953, 2007.
13. Laybutt DR, Preston AM, Akerfeldt MC, *et al.* Endoplasmic reticulum stress contributes to beta cell apoptosis in type 2 diabetes. *Diabetologia* 2007; 50: 752-763.
14. Kitamura K, Kangawa K, Tanaka K, *et al.* Isolation of NPY-25 (neuropeptide Y[12-36]), a potent inhibitor of calmodulin, from porcine brain. *Biochem Biophys Res Commun* 1990; 169: 1164-1171.
15. McLatchie LM, Fraser NJ, Main MJ, *et al.* RAMPs regulate the transport and ligand specificity of the calcitonin-receptor-like receptor. *Nature* 1998; 393: 333-339.
16. Brain SD, Grant AD. Vascular actions of calcitonin gene-related peptide and adrenomedullin. *Physiol Rev* 2004; 84: 903-934.
17. Kato J, Tsuruda T, Kita T, *et al.* Adrenomedullin: a protective factor for blood vessels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25: 2480-2487.

18. Shimosawa T, Ogihara T, Matsui H, *et al.* Deficiency of adrenomedullin induces insulin resistance by increasing oxidative stress. *Hypertension* 2003; 41: 1080-1085.
19. Hayashi M, Shimosawa T, Fujita T. Hyperglycemia increases vascular adrenomedullin expression. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 258: 453-456.
20. Hayashi M, Shimosawa T, Isaka M, *et al.* Plasma adrenomedullin in diabetes. *Lancet* 1997; 350: 1449-1450.
21. Zakareia FA, Alderees AA, Al Regaiy KA, *et al.* Correlation of electroretinography b-wave absolute latency, plasma levels of human basic fibroblast growth factor, vascular endothelial growth factor, soluble fatty acid synthase, and adrenomedullin in diabetic retinopathy. *J Diabetes Complications* 2010; 24: 179-185.
22. Ito S, Fujisawa K, Sakamoto T, *et al.* Elevated adrenomedullin in the vitreous of patients with diabetic retinopathy. *Ophthalmologica* 2003; 217: 53-57.
23. Udono T, Takahashi K, Takano S, *et al.* Elevated adrenomedullin in the vitreous of patients with proliferative vitreoretinopathy. *Am J Ophthalmol* 1999; 128: 765-767.
24. Clementi G, Floriddia ML, Prato A, *et al.* Adrenomedullin and ocular inflammation in the rabbit. *Eur J Pharmacol* 2000; 400: 321-326.
25. Taniguchi T, Kawase K, Gu ZB, *et al.* Ocular effects of adrenomedullin. *Exp Eye Res* 1999; 69: 467-474.
26. Ohta Y, Kosaka Y, Kishimoto N, *et al.* Convergence of the insulin and serotonin programs in the pancreatic  $\beta$ -cell. *Diabetes* 2011; 60: 3208-3216.

27. Cheung BM, Tang F. Adrenomedullin: exciting new horizons. *Recent Pat Endocr Metab Immune Drug Discov* 2012; 6: 4-17.
28. Kato J, Kitamura K. Bench-to-bedside pharmacology of adrenomedullin. *Eur J Pharmacol* 2011; 764: 140-148.
29. Prentki M, Nolan CJ. Islet beta cell failure in type 2 diabetes. *J Clin Invest* 2006; 116: 1802-1812.
30. Robertson RP, Harmon J, Tran PO, *et al.* Glucose toxicity in beta-cells: type 2 diabetes, good radicals gone bad, and the glutathione connection. *Diabetes* 2003; 52: 581-587.
31. Chan JY, Biden TJ, Laybutt DR. Cross-talk between the unfolded protein response and nuclear factor- $\kappa$ B signalling pathways regulates cytokine-mediated beta cell death in MIN6 cells and isolated mouse islets. *Diabetologia* 2012; 55: 2999-3009.
32. Hasnain SZ, Borg DJ, Harcourt BE, *et al.* Glycemic control in diabetes is restored by therapeutic manipulation of cytokines that regulate beta cell stress. *Nat Med* 2014; 20: 1417-1426.
33. Katsuki A, Sumida Y, Urakawa H, *et al.* Increased oxidative stress is associated with elevated plasma levels of adrenomedullin in hypertensive patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2003; 26: 1642-1643.
34. Nishikimi T, Matsuoka H. Cardiac adrenomedullin: its role in cardiac hypertrophy and heart failure. *Curr Med Chem Cardiovasc Hematol Agents* 2005; 3: 231-242.
35. Farilla L, Hui H, Bertolotto C, *et al.* Glucagon-like peptide-1 promotes islet cell growth and inhibits apoptosis in Zucker diabetic rats. *Endocrinology* 2002; 143: 4397-4408.



36. Wang Q, Brubaker PL. Glucagon-like peptide-1 treatment delays the onset of diabetes in 8 week-old db/db mice. *Diabetologia* 2002; 45: 1263-1273.
37. Kwon G, Pappan KL, Marshall CA, *et al.* cAMP Dose-dependently prevents palmitate-induced apoptosis by both protein kinase A- and cAMP-guanine nucleotide exchange factor-dependent pathways in beta-cells. *J Biol Chem* 2004; 279: 8938-8945.
38. Horio T, Kohno M, Kano H, *et al.* Adrenomedullin as a novel antimigration factor of vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 1995; 77: 660-664.
39. Sata M, Kakoki M, Nagata D, *et al.* Adrenomedullin and nitric oxide inhibit human endothelial cell apoptosis via a cyclic GMP-independent mechanism. *Hypertension* 2000; 36: 83-88
40. Nagaya N, Kangawa K, Itoh T, *et al.* Transplantation of mesenchymal stem cells improves cardiac function in a rat model of dilated cardiomyopathy. *Circulation* 2005; 112:1128-1135.
41. Kataoka Y, Miyazaki S, Yasuda S, *et al.* The first clinical pilot study of intravenous adrenomedullin administration in patients with acute myocardial infarction. *J Cardiovasc Pharmacol* 2010; 56: 413-419.