

心血管作動性因子と成人病及び老化に関する研究

(研究課題番号 H10 - 長寿 - 030)

平成10年度 厚生科学研究費補助金 (長寿科学総合研究事業)

研究報告書

平成11年3月

主任研究者 寒川賢治
国立循環器病センター研究所
生化学部 部長

心血管作動性因子と成人病及び老化に関する研究

(研究課題番号 H10-長寿-030)

平成10年度 厚生科学研究費補助金 (長寿科学総合研究事業)

研究報告書

心血管作動性因子と成人病及び老化に関する研究

主任研究者 寒川 賢治（国立循環器病センター研究所 部長）

心血管作動性因子（アドレノメデュリン，Na利尿ペプチド，エンドセリン，アンジオテンシンII）による心血管系の調節，保護，再構築などの機能制御機序の解析を行った。また、BNP ノックアウトマウスの解析により、BNP が局所調節因子として心筋線維化抑制作用を有すること、グアニリンファミリーの水・電解質代謝調節ホルモンとしての意義を明らかにすると共に、HDL 受容体；SR-BI の遺伝子発現調節の解析を行った。

〔研究組織〕

- 寒川賢治（国立循環器病センター研究所 生化学部長）
- 中尾一和（京都大学大学院医学研究科 臨床病態医科学第二内科教授）
- 木村定雄（千葉大学大学院医学研究科 高次機能系統統合機能学教授）
- 宮本 薫（群馬大学生体調節研究所 生理活性物質センター助教授）
- 平田恭信（東京大学大学院医学系研究科 循環器内科講師）
- 南野直人（国立循環器病センター研究所 研究機器管理室長）
- 中里雅光（宮崎医科大学第三内科講師）
- 小室一成（東京大学大学院医学系研究科 循環器内科講師）

にされつつある。さらに最近我々が発見した新しい心血管作動性因子、アドレノメデュリン（AM）と関連ペプチド（PAMP）も、心疾患、高血圧や動脈硬化などの血管代謝障害に深く関与すると考えられている。しかし、心血管系の機能調節における作用機序、各因子間の相互作用、発現調節などの詳細な機序については不明な点が多く残されている。

本研究では、上記因子とそれらの受容体による心血管系の機能制御のメカニズムの解明と、そのバランスの乱れや異常による成人病の発症や老化進展について、分子生物学、発生工学的手法を中心に用いて解明するとともに、診断、治療への応用を目指したものである。

A. 研究目的

生体機能の老化を考える上で心血管系は最も重要な器官であり、その機能の低下や異常は種々の成人病や老化の進展に深く関わる。近年、心血管作動性因子、特にアンジオテンシンII、Na利尿ペプチド、エンドセリン等のペプチド性因子とその受容体に関する生化学的、分子生物学的研究が大きく展開し、その全体像が明らか

B. 研究方法

本年度は、新しい心血管作動性因子であるアドレノメデュリン（AM）をはじめとして、アンジオテンシンII、Na利尿ペプチド、エンドセリン、グアニリンとそれらの受容体及びHDL受容体；SR-BIについて、発現調節、機能解析、病態生理的意義の検討を行い、これらの成人病の病態と老化への関与を探った。また、診断及び治

療応用に向けての基礎的検討も行った。

C. 研究結果 及び D. 考察

1) アドレノメデュリン(AM)の発現調節,

機能解析及び病態生理的意義

①アドレノメデュリンの多角的な機能解析

AMは生体内の多くの細胞から分泌され、その産生及び機能の異常は成人病と深く関連すると考えられる。線維芽細胞株では由来組織に関わらず活発なAM産生が確認され、その産生調節は血管平滑筋細胞に類似し、炎症性サイトカイン、LPS、ステロイドなどで亢進した。Swiss 3T3線維芽細胞では細胞増殖を促進すること、IL-6産生をTNFなどと相乗的に亢進することが明らかになった。単球/マクロファージ系の培養細胞株や初代培養細胞においてもAMが産生され、マクロファージへの分化、活性化に相関して強く促進された。その産生調節は炎症性サイトカインに類似し、AMはRAW264.7細胞でのLPS刺激で亢進したTNF- α やIL-6産生をAM最大で50%抑制した。間質系、血球系細胞でもAMは活発に産生され、炎症や動脈硬化など関連している可能性が示唆された。

②アドレノメデュリン(AM)の遺伝子発現調節

AMは血管拡張に基づく著明な降圧作用を有し、心血管系の保全に役割を担う循環調節因子であると考えられ、心血管の老化の制御にも深く関与すると考えられる。AMの敗血症性ショックへの関与を明らかにするため、イヌを用いたショックモデルを作製し、AM遺伝子発現の組織分布及びその変化を詳細に検討した。血中AM濃度の顕著な上昇と共に、全身の主要動静脈において、AM mRNAの発現は増加しており、AMがショック時の重篤な低血圧に関与すると考えられた。また循環器系以外の臓器でもAM遺伝子発現の変化が認められ、AMが複雑な敗血症性ショックの病態において、循環動態以外の面でも関与する可能性が示唆された。

2) 脳性ナトリウム利尿ペプチド(BNP)の

臨床診断的意義の検討と治療への応用

BNPの成人病及び老化における病態生理的意義と臨床応用への可能性を明らかにするため、BNPノックアウトマウスを開発し、表現型を解析した。129/SvマウスBNP遺伝子の第1, 第2エクソンをネオマイシン耐性遺伝子で置換したターゲティングベクターを用いてBNPノックアウトマウスを作製した。BNPノックアウトマウスには、明らかな高血圧や心肥大は認められなかったが、心室において巣状の線維化が観察され、ACE, TGF- β_3 及びI型コラーゲン遺伝子発現亢進が認められた。これらの結果は、BNPが循環調節と共に局所調節因子としても心筋の線維化抑制作用を有することを示唆するものである。

3) 心血管系における2種類のエンドセリン

受容体発現のスイッチ機構と動脈硬化

高血圧、動脈硬化に関与するエンドセリン(ET)がET受容体拮抗薬存在下で示す多様な応答の生化学的基盤を解析した。(1)ET_A・ET_B受容体を共発現したCHO細胞を作製し、ET-1結合及び機能解析を行った結果、ET_A/ET_B共存系ではET_B拮抗薬によりET_Bから置換遊離したET-1がET_Aに結合することを証明した。実例として、ウサギ肺動脈血管でET_B拮抗薬の投与により、ET_Aを介する収縮増強作用があることを示した。(2)リン酸化非依存の脱感作機構の1つとして、G蛋白質シグナル調節蛋白質の心血管系における解析を行い、RGS4, 5, 10が発現することを明らかにし、ET受容体の機能抑制作用を持つことを示した。

4) 動脈硬化の発症・進行における内因性血管作

動物質の病態生理的役割の検討

アドレノメデュリン(AM)の病態生理的役割を明らかにするため、腎における低酸素下でのAMの動態をin vitroの系で検討した。イヌ尿管(MDCK)、ラットメサンギウム(RMG)、ラ

ット大動脈平滑筋(RSM)培養細胞を低酸素下に置きAM, AM mRNAレベルを測定し、またAM遺伝子の低酸素による転写活性とAM mRNAの安定性についてMDCK細胞で検討した。低酸素刺激によりMDCK細胞, RMG細胞, RSM細胞のAM mRNAと培養上清中のAM濃度は有意に増加した。ヒトAM遺伝子を含むvectorを導入したMDCK細胞では低酸素刺激下でもルシフェラーゼ活性の上昇を認めず、またAM mRNAの半減期は低酸素下, 20%酸素下ともに約2時間であった。以上のように、低酸素下の腎では様々な細胞でAMの発現が亢進することが明らかになった。

5) 心臓リモデリングにおけるアンジオテンシン(AT) IIの役割

心筋梗塞後左室リモデリングにおけるAT IIの役割を知る目的で、AT II 1a型受容体のノックアウトマウスに心筋梗塞を作り、左室リモデリングの程度について野性型マウスと比較検討した。心筋梗塞後1カ月間における死亡率は、野性型マウスにおいて有意に高かった。ノックアウトマウスでは心筋梗塞後1週間では、左室リモデリングに関して野性型マウスと違いが認められなかったが、心筋梗塞後4週間においては、野性型マウスにおいて左室の拡大、線維化が顕著であり、右室及び肺重量の増加が認められた。遺伝子発現レベルでも、野性型マウスの心室においてコラーゲン遺伝子の発現が有意に上昇していた。梗塞後左室リモデリングにおいて、特に1週間から4週間の後期においてAT IIが必須であることが明らかとなった。

6) 水・電解質代謝におけるグアニリンファミリーの基礎的, 臨床的研究

心不全, 腎疾患及び胃酸分泌におけるウログアニリンの病態生理学的意義を明らかにするために、塩負荷とウログアニリンの関係、心不全や腎疾患での血漿ウログアニリン濃度の変化、心カテによる心臓からのウログアニリン分泌を

検討し、また胃内分泌細胞におけるグアニリン, ウログアニリン, GC-Cの遺伝子発現についても解析した。尿中ウログアニリン排泄量は Na^+ , K^+ , Cl^- , cGMP排泄量と有意な正の相関を示し、また血漿ウログアニリン濃度はネフローゼ症候群で非ネフローゼ症候群より有意に高かった。ウログアニリンの血漿濃度は、心不全の重症度と相関し、心不全患者では心臓から分泌されることが示唆された。ウログアニリンは、胃ではenterochromaffin-like (ECL)細胞で産生される。ウログアニリンは、心不全患者の心機能を評価するマーカーの1つであり、体液量調節に密接に関与することが示唆された。

7) コレステロール代謝関連受容体の発現調節に関する研究

老化に伴い増加してくる動脈硬化, 心筋梗塞などの疾患には、血管平滑筋細胞へのコレステロールの取り込みが深く関与している。本研究では、最近HDL受容体として注目を集めるSR-BIの遺伝子発現調節の解析を行った。その結果SR-BI遺伝子上流には、TATA like sequenceが存在し、さらに4カ所のSp1結合部位と思われる配列が存在し、最も下流に存在するSp1結合部位にはNGFI-A/WT-1結合部位と重複した配列が存在すること、また、ルシフェラーゼアッセイの結果から、SR-BI遺伝子発現はcAMPの影響下に有ることを明らかにした。

E. 結論

心血管作動性ペプチドとその受容体による心血管系の調節, 保護, 再構築などの機能制御機序の解析を行った。また、BNPの心筋の線維化抑制作用、ウログアニリンの心不全患者の心機能マーカーとしての可能性及びHDL受容体としてのSR-BIの遺伝子発現調節が明らかになった。

G. 知的所有権の取得状況

なし

アドレノメデュリンの遺伝子発現調節と機能解析

主任研究者 寒川 賢治（国立循環器病センター研究所 部長）

アドレノメデュリン(AM)は血管拡張に基づく著明な降圧作用をもち、心血管系の保全に役割を担う循環調節因子であると考えられ、心血管の老化の制御にも深く関与すると考えられる。AMの敗血症性ショックへの関与を明らかにするため、イヌを用いたショックモデルを作製し、AM遺伝子発現の組織分布及びその変化を詳細に検討した。全身の主要動静脈において、AMのmRNAの発現は増加しており、AMがショック時の重篤な低血圧に関与すると考えられた。また循環器系以外の臓器でもAM遺伝子発現の変化が認められ、AMが複雑な敗血症性ショックの病態において、循環動態以外の面でも関与する可能性が示唆された。

A. 研究目的

心房性ナトリウム利尿ペプチドやエンドセリンの発見により新しい循環調節機序が明らかになってきたように、心血管作動性の新しい因子及びその受容体を同定することは循環調節研究の新領域への展開が期待できる。

我々は、ラット血小板中のcAMP増加活性を指標とした *in vitro* のアッセイ系を用いて、ヒト褐色細胞腫組織より新しいペプチドを発見し、その単離、構造決定を行い、これを“アドレノメデュリン(adrenomedullin, AM)”と命名した。AMは52残基のアミノ酸よりなり、分子内に一個のジスルフィド結合とC末端アミド構造を有し、ラットに経静脈投与した時、強力で長時間持続する降圧活性を示す。

AMは、副腎のみならず心臓、腎臓、肺、血管壁など広く循環器系の臓器に発現し、循環血液中にも存在すると共に、循環器疾患において血中濃度の上昇が見られることから、心血管系の調節に関与する新しい循環ホルモンであると考えられる。また最近、我々はAMの遺伝子構造も

明らかにすると共に、AMが血管内皮及び血管平滑筋細胞で多量に産生され、オートクリン及びパラクリンの局所因子としても機能している可能性を示した。

このようにAMは、循環ホルモン及び局所因子として、血管拡張作用を介して心血管系の保全に重要な役割を担う新しい循環調節因子であると言える。一方、成人病の発症あるいは老化の進展の制御にも深く関与するものと考えられ、AMの遺伝子発現調節とその機能の解明は心血管系と老化の関連を考える上でも重要である。

本研究では、イヌの敗血症性ショックモデルを用いて、広範な臓器あるいは血管でのAM遺伝子の発現を詳細に検討することにより、AMの病態生理学的意義について考察を加えた。

B. 研究方法

1) 敗血症性ショックモデルの作成

平均体重約10 kgの雑種成犬2頭及びビーグル犬2頭について、チオペンタール20mg/kgを

静注した後、気管内挿管のうえ、セボフルランで麻酔を維持した。パンクロニウム投与により対象を調節呼吸下におき、 $FiO_2 = 0.4$ としてノルモカプニアになるように換気を調節した。観血的持続的動脈圧測定のため右大腿動脈に20ゲージの留置針を刺入、左大腿動脈と右大腿静脈にもそれぞれ採血及び薬剤または生理食塩水投与の目的で同様の処置をした。2頭をコントロールとし、残る2頭についてリポポリサッカライド(LPS)を2mg/kgの用量で静注した。この時間を0として、30分後、1時間後、2時間後、3時間後、4時間後に各4 mlの採血をした。その後脱血死させ、各臓器及び血管を速やかに採取し、液体窒素にて凍結保存した。

2) 血中AM濃度の測定

イヌの全血(動脈血)は、採血直後Trasyrol(500 KIU/ml)及びEDTA・2Na(1.5mg/ml)を加えた後、血漿を分離した。血漿を等量の生理食塩水(40 mM HClを含む)で希釈し、Sep-Pak C18 カートリッジにてAMを抽出後、抗ヒトAM抗体(ヒトAMのC末端部配列 hAM[40-52]を抗原としたポリクローナル抗体/#172CI-7)を用いてラジオイムノアッセイ(RIA)にて測定をした。尚、本抗血清はヒトAMと同等にラット及びイヌAMを認識する。

3) AM遺伝子発現の解析

採取した臓器をTRIzol Reagent中で破碎し、total RNAを抽出した。心血管系以外の各臓器については、その後さらにOligotex-dT30を用いてpoly(A)⁺ RNAを抽出した。血管に関してはtotal RNA各20 µg、他臓器はpoly(A)⁺ RNA各5 µgを最終濃度18%のホルムアルデヒドを含む1%アガロースゲルにて電気泳動し、ナイロンメンブレンにトランスファー後、紫外線で固定した。イヌAMのcDNA(塩基No.1-839)を[α -32P]dCTPで標識し、これをプローブとしてノーザンハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイズバッファの組成は、1%

ドデシル硫酸ナトリウム(SDS), 5 x SSPE (0.75 M NaCl, 43.25 mM $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$, 6.25 mM EDTA pH 7.4), 40%ホルムアミド, 5 x Denhardt's solution (0.1% polyvinyl pyrrolidone, 0.1% ficoll, 0.1% bovine serum albumin), 100mg/ml salmon sperm DNAとし、42°C, 3時間のプレハイブリダイゼーションの後、同温度で18時間ハイブリダイゼーションを行った。メンブレンは2 x SSC, 0.1% SDSのバッファで50°C, 30分の洗浄を2回行った後、イメージアナライザー(BAS 5000)にて解析した。対比する内部標準にはGAPDH (glyceraldehyde - 3 - phosphate dehydrogenase) のmRNAを用いた。

C. 研究結果

LPSを投与した結果、約5分後には収縮期血圧が150 mmHgから60 mmHgに下降し、約20分後に徐々に上昇したが、80 mmHg前後から回復せず、終始乏尿などのショック症状を呈した。血中 immunoreactive (ir) AM濃度は敗血症性ショックモデルにおいてLPS投与4時間後に32 fmol/mlに達し、投与前値に比較して約15倍の上昇を認めた。AM遺伝子は検討した各臓器において発現が認められ、LPS投与によって多くの臓器でそのmRNAは上昇した。以下にその結果を示す。

①循環器系の主要動静脈においてAMの遺伝子発現は、肺静脈と下大静脈を除いて2~3倍に上昇しており、なかでも肝動脈は約10倍と顕著に上昇した。一方、心臓では上昇が認められなかった。

②脳神経系では、大脳、小脳、視床下部、脊髄について検討した。視床下部のAM mRNAは、コントロール群では発現量が少なかったが、LPS投与群では3倍に増加した。大脳、小脳では1.2倍前後、脊髄でも約3倍の増加を認めた。

③消化管では、食道、胃、十二指腸、回腸、結腸に

ついて検討した。コントロール群においてAMの発現が多く認められた胃や結腸では、LPSの投与によってmRNAの発現に変化がなかったのに対して、発現の少なかった十二指腸や回腸では1.5~2倍程度増加した。食道ではコントロール群でも発現が多かったが、LPS投与群でも2.5倍程度の増加を認めた。

④充実性臓器として、肝臓、脾臓、腎臓(皮質、髄質)、副腎、精巣について検討した。肝臓、脾臓、副腎は、正常イヌでAMが多く発現している臓器であり、LPSの投与によって1.2倍前後とわずかな増加を示した。腎臓は、皮質で2倍近くの増加を認めたのに対して、髄質では変化がなかった。また、精巣でも変化しなかった。

D. 考察

AMは、ヒト褐色細胞腫から単離された、強力な降圧活性を持つペプチドであり、新しい循環調節因子として様々な循環器疾患との関連が検討されている。敗血症性ショックの患者においてもその血中濃度が著しく上昇し、末梢血管抵抗、肺血管抵抗の減少との相関が認められ、AMがショックの際に血管拡張性の低血圧の一因となる可能性が示唆された。また、利尿作用や気管支拡張作用といった様々な生理活性も報告されていることから、敗血症性ショックという症候群において、AMの作用は循環作動性に限局できない可能性が考えられる。本研究は、AMの敗血症性ショックへの関与を検討する上でのスクリーニングとして広く臓器を採取し、AMの遺伝子発現を詳細に検討した。この点においてイヌの敗血症性ショックモデルは有用であり、その後の生理学的検討などを含め、様々な発展が期待できる。

我々は、まず循環調節因子としてのAMを考え、主要動静脈でどのような遺伝子発現変化を来しているかを検討した。イヌの敗血症性ショックモデルでは、例えば肝動静脈や腎動静脈と

いったラットでは検討し得なかった血管各部位での遺伝子発現を検討することが可能であった。その結果、肺静脈を除く全身の主要動静脈において、AMの遺伝子発現は平均して2~3倍の増加を認めた。血管でのAMは、内皮及び平滑筋に発現し、またそのレセプターも同様の分布を示すことから、オートクリンあるいはパラクリンの局所因子と考えられている。これを考慮してAMの作用が局所的なものであると限定しても、敗血症の際に全身の主要血管においてAMの遺伝子発現が増加していることは、結果としてAMが低血圧の一端を担う可能性を示唆する。さらに、本実験でのLPS投与4時間後の血中irAM濃度は、イヌの腎血流量を増加させる血中濃度として報告されている13 fmol/mlを凌駕しており、AMが全身的な循環ホルモンとして作用する可能性もあると考えられる。一方、持続的なAMの血中投与によって低血圧を作成した上で、AMの臓器血流分布への影響を検討した報告では、AMが肝臓や腎臓などへの血流分布を増加させる可能性について言及している。本研究でも、血管各部位において一様に遺伝子の発現増加が認められたわけではなく、例えば肝動脈での増加程度は他の血管に比較して高かった。検討したモデルが少数であるため、有意に上昇しているとは断定できないが、血管部位によって遺伝子発現に差違のある可能性がある。敗血症の場合に増加したAMが、主要臓器の血流分布にどのように影響しているのか、その生命維持への関与という視点は、治療法への接点ともいえよう。

次に、循環器系以外の臓器でのAM遺伝子発現について検討した。コントロール群において、検討した全ての臓器にAMの遺伝子発現が認められた。敗血症によるその変化は、臓器によって様々であり、循環動態とは関係が薄いと思われる臓器でも著明な変化を来した。中枢神経系では、検討した各部分に微量ながらもAM

遺伝子が発現していたが、LPS投与によって視床下部での著明な発現増加が認められた。視床下部は、視索上核や室傍核に免疫組織化学染色によってAMが確認されており、同一ニューロンにバゾプレッシンやオキシトシンの局在も報告されている。AMが脳内の中枢性循環調節因子として機能する可能性も検討されており、興味深い結果であるといえよう。また消化管では、食道や十二指腸、回腸でAM mRNAの強い発現増加を認めた。これに対して胃や結腸ではLPS非投与群において既にAMが強く発現していたが、LPSの影響による変化はむしろ小さかった。十二指腸や回腸で増加したAM mRNAがどの細胞由来であるかは今後の検討が必要である。正常ヒト、ブタ、ラットにおいて消化管上皮腺細胞にAM免疫陽性細胞が存在することから、上皮腺細胞や消化管に浸潤した炎症細胞などの可能性も推察され、消化管病変との関係も検討されるべきであろう。さらに充実性臓器に関して、本研究では肝臓、脾臓、腎臓、副腎、精巣での影響を検討した。コントロールのイヌでは、精巣を除くいずれの臓器にも明瞭にAM mRNAのバンドが認められ、敗血症によって肝臓、脾臓、副腎では約1.5倍前後、また腎臓皮質では約2倍の増加が見られたが、腎臓髄質では約0.7倍、精巣でも約0.9倍と減少傾向あるいは不変といえる結果であった。充実性臓器では、その増加したAMのmRNAが、豊富に含まれる血管あるいは血球由来である可能性も否めないが、腎臓の皮質と髄質の相違から、各々の構成細胞における発現の差によるものと考えられよう。

以上より、敗血症性ショックモデルにおいて各臓器のAM発現は様々な影響を受けることが推察された。敗血症において血中濃度が高くなる炎症性のメディエーター、例えば腫瘍壊死因子(TNF)やインターロイキン-1などは、培血管平滑筋細胞でのAM遺伝子発現を促進することから、AMもあるいはサイトカインストームの

一因子として敗血症性ショックにおける種々の病態に関与することが考えられる。AMは血管平滑筋に直接働きかけ血管を弛緩させると同時に、血管内皮の遊離Ca²⁺を上昇させ、内皮由来の一酸化窒素合成酵素(eNOS)を活性化して一酸化窒素(NO)を誘導することにより、間接的にも血管拡張を惹起するといわれている。血管作動因子としてNOとの関連や時間経過などの検討を含めて、今後その役割の解明が必要である。さらに、敗血症患者あるいは本研究のモデルにおいても、血中irAM濃度が大きく上昇することが明らかとなったが、その由来臓器(または組織)は判明していない。様々な血管や臓器でAM遺伝子の発現が増加したことから、特定の臓器由来ではなく、全身の血管及び臓器由来である可能性も高い。

AMは、敗血症モデルにおいて、多くの臓器で遺伝子発現の変化が認められたが、その意義の解析は敗血症の病態を解明する上で重要であると考えられる。

E. 結論

AMは、敗血症の際に全身の主要な血管でその遺伝子発現が増加した。これは、AMの血管拡張作用が局所的な作用であるにしても、全身性低血圧の一因となると思われる。また、AMは循環器系以外の臓器においても遺伝子発現の変化を示すことから、敗血症の病態に多方面から関与する可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- ① Y. Ono, M. Kojima, K. Okada, K. Kangawa, cDNA cloning of canine adrenomedullin and its gene expression in the heart and blood vessels in endotoxin shock. *Shock*, 10: 243-247, 1998.

- ② Y. Yoshitomi, T. Nishikimi, S. Kojima, M. Kuramochi, S. Takishita, H. Matsuoka, A. Miyata, H. Matsuo, K. Kangawa, Plasma levels of adrenomedullin in patients with acute myocardial infarction. *Clin Sci (Colch)*, 94:135-139, 1998.
- ③ F. Yoshihara, T. Nishikimi, T. Horio, C. Yutani, S. Takishita, H. Matsuo, T. Ohe, K. Kangawa, Chronic infusion of adrenomedullin reduces pulmonary hypertension and lessens right ventricular hypertrophy in rats administered monocrotaline. *Eur J Pharmacol*, 355 : 33-39, 1998.
- ④ Y. Miyao, T. Nishikimi, Y. Goto, S. Miyazaki, S. Daikoku, I. Morii, T. Matsumoto, S. Takishita, A. Miyata, H. Matsuo, K. Kangawa, H. Nonogi, Increased plasma adrenomedullin levels in patients with acute myocardial infarction in proportion to the clinical severity. *Heart*, 79 : 39-44, 1998.
- ⑤ T. Horio, T. Nishikimi, F. Yoshihara, N. Nagaya, H. Matsuo, S. Takishita, K. Kangawa, Production and secretion of adrenomedullin in cultured rat cardiac myocytes and nonmyocytes : stimulation by interleukin-1beta and tumor necrosis factor - alpha . *Endocrinology*, 139 : 4576-4580, 1998.
- ⑥ K. Kario, T. Nishikimi, F. Yoshihara, S. Takishita, R. Yamaoka, T. Matsuo, H. Matsuo, T. Mitsuhashi, K. Shimada, K. Kangawa, Plasma levels of natriuretic peptides and adrenomedullin in elderly hypertensive patients : relationships to 24 h blood pressure. *J Hypertens*, 16 : 1253-1259, 1998.
- ⑦ K. Kitamura, J. Kato, M. Kawamoto, M. Tanaka, N. Chino, K. Kangawa, T. Eto, The intermediate form of glycine-extended adrenomedullin is the major circulating molecular form in human plasma. *Biochem Biophys Res Commun*, 244 : 551-555, 1998.
- ⑧ A. Kubo, N. Minamino, Y. Isumi, T. Katafuchi, K. Kangawa, K. Dohi, H. Matsuo, Production of adrenomedullin in macrophage cell line and peritoneal macrophage. *J Biol Chem*, 273 : 16730-16738, 1998.
- ⑨ K. Abe, T. Minegishi, M. Tano, T. Hirakawa, M. Tsuchiya, K. Kangawa, M. Kojima and Y. Ibuki, Expression and effect of adrenomedullin on rat granulosa cell. *Endocrinology*, 139 : 5263-5266, 1998.
- ⑩ N. Shinoki, T. Kawasaki, N. Minamino, K. Okahara, A. Ogawa, H. Ariyoshi, M. Sakon, J. Kambayashi, K. Kangawa and M. Monden, Shear stress down-regulates gene transcription and production of adrenomedullin in human aortic endothelial cells. *J Cell Biochem*, 71 : 109-115, 1998.
- ⑪ T. Ishimitsu, A. Miyata, H. Matsuoka, K. Kangawa, Transcriptional regulation of human adrenomedullin gene in vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 243 : 463-470, 1998.
- ⑫ T. Nishikimi, Y. Hayashi, G. Iribu, S. Takishita, Y. Kosakai, N. Minamino, A.

Miyata, H. Matsuo, M. Kuro, K. Kangawa, Increased plasma adrenomedullin concentrations during cardiac surgery. Clin Sci (Colch), 94 : 585-590, 1998.

⑬ T. Nishikimi, T. Horio, F. Yoshihara, N. Nagaya, H. Matsuo, K. Kangawa, Effect of adrenomedullin on cAMP and cGMP levels in rat cardiac myocytes and nonmyocytes. Eur J Pharmacol, 353 : 337-344, 1998.

⑭ T. Tsuruda, J. Kato, K. Kitamura, K. Kuwasako, T. Imamura, Y. Koiwaya, T. Tsuji, K. Kangawa, T. Eto, Adrenomedullin: a possible autocrine or paracrine inhibitor of hypertrophy of cardiomyocytes. Hypertension, 31 : 505-510, 1998.

G. 知的所有権の取得状況

なし

研究協力者

小野 紫 (国立循環器病センター研究所)

児島将康 (国立循環器病センター研究所)

成人病及び心血管老化における心血管ホルモンの
臨床診断的意義の検討と治療への応用

分担研究者 中尾一和（京都大学大学院医学研究科臨床病態医科学 第二内科 教授）

BNPの生理的・病態生理的意義の解明を目指して、BNPノックアウトマウスを開発し、表現型を解析した。129/SvマウスBNP遺伝子の第1、第2エクソンをネオマイシン耐性遺伝子で置換したターゲティングベクターを用いてBNPノックアウトマウスを作製した。BNPノックアウトマウスには、明らかな高血圧や心肥大は認められなかったが、心室において巣状の線維化が観察され、ACE、TGF- β_3 、及びI型コラーゲン遺伝子発現亢進が認められた。本研究ではBNPノックアウトマウスの作製に成功し、BNPが局所調節因子として心筋線維化抑制作用を有することが明らかになった。

A. 研究目的

1984年に心臓より心房性ナトリウム利尿ペプチド（ANP）が単離同定されたのに引き続き、1988年と1990年に相次いでブタ脳より脳性ナトリウム利尿ペプチド（BNP）とC型ナトリウム利尿ペプチド（CNP）が発見され、体液量・血圧調節系としてのナトリウム利尿ペプチドファミリーの生理的・病態生理的意義が注目されるようになり、その臨床応用が期待されている。我々は既にANPとBNPがそれぞれ主に心房と心室から分泌される心臓ホルモンとして作用するのに対し、CNPは血管内皮細胞やマクロファージで産生される局所調節因子として作用することを証明し、ナトリウム利尿ペプチドファミリーが強力な利尿、ナトリウム利尿、降圧作用、血管平滑筋細胞増殖抑制作用により、心不全、心筋梗塞、高血圧、動脈硬化等の循環器疾患の病態形成に重要な役割を果たしている可能性を示してきた。

本研究は、発生工学的手法により、BNP欠損

マウスを作製し、BNPの生理的・病態生理的意義の解明と臨床応用を目指すものである。

B. 研究方法

129/SvマウスBNP遺伝子の第1、第2エクソンをネオマイシン耐性遺伝子に置換したターゲティングベクターを用いてキメラマウス作製後、germline transmissionを確認した。これらの生殖キメラマウスを交配して得られるヘテロ接合体から更にホモ接合体（ノックアウトマウス）を作製した。心臓におけるANP、BNP及びskeletal α -actin、SRCa²⁺-ATPase、ET-1、TGF- $\beta_{1,3}$ 、I型コラーゲン $\alpha 1$ 鎖(Col $\alpha 1$ (I))の遺伝子発現はノーザンブロット法にて検討し、ACE遺伝子発現はRT-PCR法にて検討した。心臓におけるANPとBNP濃度は各々の特異的ラジオイムノアッセイにて測定した。マウスの心臓を組織学的に検討し、血圧・脈拍は、Tail-cuff法にて測定し、血圧の食塩感受性を0.7%標準食塩食あるいは8.0%高食塩食にて4週間飼育

後に検討した。尿量と尿中ナトリウム排泄量も検討した。

C. 研究結果

129/SvマウスBNP遺伝子をクローニングし、得られたBNP遺伝子の第1、第2エクソンをネオマイシン耐性遺伝子にて置換したターゲティングベクターを作製し、電気穿孔法にて129/Svマウス由来のES細胞に導入し、G418とガンシクロビルを用いたポジティブ・ネガティブ選択と、相同組換え領域の5'側及び3'側に隣接した染色体DNA断片をプローブとしたサザンブロット解析により、相同組換え体を選別した。この相同組換え体ES細胞をC57BL/6Jマウス胚にマイクロインジェクションし、得られた雄性キメラマウスを雌性C57BL/6Jマウスと交配することにより、germline transmissionを確認した。これらの生殖キメラマウスを雌性C57BL/6Jあるいは129/SvJと交配して得られるF1世代のヘテロ接合体同士を交配し、ノックアウトマウスの作製に成功した。F2世代の個体の4週齢における遺伝子型の分布を検討したところ、メンデルの法則から推定されるものよりも有意にホモ接合体が少なかった。

心房及び心室におけるBNP遺伝子発現は、ヘテロ接合体においては野生型の約50%であり、ホモ接合体においては検出されなかった。また、心房及び心室のBNP濃度はヘテロ接合体では野生型の約20%であり、ホモ接合体においては測定感度以下であった。以上より、ホモ接合体において、BNPを完全に欠損することが確認された。

心房におけるANP遺伝子発現には有意の変化は認められなかったが、心室では野生型と比較して、ヘテロ接合体では約5倍の、ホモ接合体では10倍以上の亢進が認められた。また、心房のANP濃度は有意の変化は認められなかったが、心室では野生型と比較してヘテロ接合体では約

10倍、ホモ接合体では約30倍に上昇していた。

0.7%標準食塩食あるいは8.0%高食塩食のいずれにおいてもBNPノックアウトマウスと野生型あるいはヘテロ接合体の血圧には有意の差は認められなかった。又、野生型、ヘテロ接合体、あるいはホモ接合体のすべてにおいて、0.7%標準食塩食と比較して、8.0%高食塩食では、尿量、尿中ナトリウム排泄量ともに約10倍に増加していたが、遺伝子型の間には有意の差は認められなかった。BNPノックアウトマウスのヘマトクリット値と血清Na⁺、K⁺、及びアルドステロン濃度は、野生型及びヘテロ接合体と比較して有意の差は認められなかった。

20週齢のBNPノックアウトマウスにおいて、野生型及びヘテロ接合体と比較して有意の心肥大は認められなかった（心臓重量体重比：+/+, 4.8 ± 0.1mg/g; +/-, 5.2 ± 0.1mg/g; 4.8 ± 0.1mg/g; P=0.17）。20週齢のBNPノックアウトマウスの心室組織像をマッソン・トリクローム染色にて検討したところ、約半数の個体において多発性の巣状の線維化が認められた。この組織所見は野生型マウスの心室においては認められなかった。更に、BNPノックアウトマウスの心室筋細胞の筋線維の構造を透過型電顕にて検討したところ、一部の心筋細胞において、筋原線維の配列の乱れやsarcomereのsupercontractionが認められた。これらの所見は、心筋症患者や心筋症ハムスターの心室において報告されているものと類似しており、引き続き心筋細胞の巣状壊死と心筋の線維化が発生すると考えられる。

20週齢のBNPノックアウトマウスの心室において、心室肥大マーカーとして広く用いられているskeletal α -actin及びSR Ca²⁺-ATPase遺伝子発現を検討した。BNPノックアウトマウスの心室では野生型と比較してskeletal α -actin及びSR Ca²⁺-ATPase遺伝子発現に変化は認められなかった。一方、BNPノックアウトマウスではANP遺伝子発現の著しい亢進が認め

られた。この遺伝子発現の亢進は、心室心筋の電顕所見と心筋線維化に反応して生じたものと考えられる。又、心筋線維化の発症と進展に関与するとされるET-1、TGF- β_1 、TGF- β_3 、I型コラーゲン $\alpha 1$ 鎖(Col $\alpha 1(I)$)、ACEの遺伝子発現を検討した。心室のET-1及びTGF- β_1 の遺伝子発現には、BNPノックアウトマウスと野生型マウス間に有意の差は認められなかったが、心室のTGF- β_3 、Col $\alpha 1(I)$ 、及びACE遺伝子発現は、BNPノックアウトマウスにおいて有意に亢進していた。

D. 考察

本研究により、BNPは心室局所において、ACEやTGF- β の発現を抑制することにより、心筋線維化の発生と進展を抑制している可能性が示唆された。心筋線維化が進展すると心室の拡張機能が障害され、心筋血流の低下を生じ、心機能の低下からさらには心不全に至ることが知られている。従って、BNPの心筋線維化抑制作用は、心機能の維持に重要と考えられる。又、BNPノックアウトマウスの心室において、著明なANP産生亢進が認められるが、心室筋へのストレスに反応した心筋局所における遺伝子発現亢進が、BNPと比較してANPは緩やかであるために、ANPのみでは線維化を抑制できないものと考えられる。

ANPは主に心房から生合成・分泌され、循環ホルモンとして降圧・利尿作用をもたらすのに対して、BNPは主に心室にて生合成され、局所調節因子として心筋線維化に対して拮抗作用をもたらす。このように、心臓は異なる機能的意義を有する2つのナトリウム利尿ペプチドを生合成することにより体液量調節に関与するのみならず、心筋線維化を抑制して心臓自体の機能維持に寄与していることが示唆された。

E. 結論

BNPノックアウトマウスの作製に成功し、BNPが心室の局所因子として心筋線維化抑制作用を有することが明らかになった。

F. 研究発表

1. 論文発表

- ① A. Yasoda, Y. Ogawa, M. Suda, N. Tamura, K. Mori, Y. Sakuma, H. Chusho, K. Shiota, K. Tanaka, K. Nakao. Natriuretic peptide regulation of endochondral ossification: Evidence for possible roles of C-type natriuretic peptide/guanylyl cyclase-B pathway. *J Biol Chem*, 273: 11695-11700, 1998.
- ② S. Suga, H. Itoh, Y. Komatsu, H. Ishida, T. Igaki, J. Yamashita, K. Doi, T-H. Chun, T. Yoshimasa, I. Tanaka, K. Nakao. Regulation of endothelial production of C-type natriuretic peptide by interaction between endothelial cells and macrophages. *Endocrinology*, 139: 1920-1926, 1998.
- ③ Y. Miyamoto, Y. Saito, N. Kajiyama, M. Yoshimura, Y. Shimasaki, M. Nakayama, S. Kamitani, M. Harada, M. Ishikawa, K. Kuwahara, E. Ogawa, I. Hamanaka, N. Takahashi, T. Kaneshige, H. Teraoka, T. Akamizu, N. Azuma, Y. Yoshimasa, T. Yoshimasa, H. Itoh, I. Masuda, H. Yasue, K. Nakao. Endothelial nitric oxide synthase gene is positively associated with essential hypertension. *Hypertension*, 32: 3-8, 1998.
- ④ Y. Shimasaki, H. Yasue, M. Yoshimura, M. Nakayama, K. Kugiyama, H. Ogawa, E. Harada, T. Masuda, W. Koyama, Y. Saito, Y. Miyamoto, Y. Ogawa, K. Nakao.

Association of the missense Glu298Asp mutation of the endothelial nitric oxide synthase gene with myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*, 36 : 1506-1510, 1998.

- ⑤ J. Yamashita, T. Yoshimasa, H. Arai, J. Hiraoka, K. Takaya, Y. Miyamoto, Y. Ogawa, H. Itoh, K. Nakao. Identification of cis - elements of the human endothelin - A receptor gene and inhibition of the gene expression by the decoy strategy. *J Biol Chem*, 273 : 15993-15999, 1998.
- ⑥ M. Inoue, H. Itoh, M. Ueda, T. Naruko, A. Kojima, R. Komatsu, K. Doi, Y. Ogawa, N. Tamura, K. Takaya, T. Igaki, J. Yamashita, T.-H. Chun, K. Masatsugu, A.E. Becker, K. Nakao. Vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in human coronary atherosclerotic lesions: Possible pathophysiological significance of VEGF in progression of atherosclerosis . *Circulation*, 98 : 2108-2116, 1998.
- ⑦ 小川佳宏, 田村尚久, 中所英樹, 中尾一和. ナトリウム利尿ペプチドファミリー過剰発現マウスとノックアウトマウス. *循環器専門医*, 6 : 207-213, 1998.

2. 学会発表

- ① N. Tamura, Y. Ogawa, H. Chusyo, M. Suda, M. Kasahara, H. Itoh, I. Tanaka, M. Katsuki, K. Nakao. Brain natriuretic peptide (BNP) as a defense against cardiac fibrosis. *American Heart Association 71st Scientific Sessions* , 1998.
- ② N. Tamura, Y. Ogawa, H. Chusyo, M.

Suda, Y. Saito, H. Itoh, M. Katsuki, K. Nakao. Generation of brain natriuretic peptide (BNP) - deficient mice. 17th scientific Meeting of the International Society of Hypertension, 1998.

- ③ Y. Ogawa, K. Nakao. BNP transgenic and knock - out mice . The 1st International Symposium Cardiovascular Endocrinology and Metabolism, 1998.
- ④ 田村尚久, 小川佳宏, 中所英樹, 須田道雄, 斉藤能彦, 伊藤 裕, 中尾一和. 脳性ナトリウム利尿ペプチド(BNP)ノックアウトマウスの開発. 第62回日本循環器学会学術集会, 1998.
- ⑤ 田村尚久, 小川佳宏, 中所英樹, 須田道雄, 伊藤 裕, 斉藤能彦, 勝木元也, 中尾一和. 脳性ナトリウム利尿ペプチド(BNP)ノックアウトマウスの開発と解析. 第71回日本内分泌学会学術総会, 1998.
- ⑥ 小川佳宏, 中尾一和. 多機能分子としてのナトリウム利尿ペプチドファミリーの分子機構. 第35回日本生化学会通常総会, 1998.

G. 知的所有権の取得状況

なし

心血管における2種のエンドセリン受容体発現のスイッチ機構の解析

分担研究者 木村定雄（千葉大学大学院医学研究科高次機能系統合機能学 教授）

循環器疾患に密接に関与するエンドセリン(ET)がET受容体拮抗薬存在下で示す多様な応答の生化学的基盤を解析した。1) $ET_A \cdot ET_B$ 受容体を共発現したCHO細胞を作製し、ET-1結合及び機能解析を行った結果、 ET_A/ET_B 共存系では ET_B 拮抗薬により ET_B から置換遊離したET-1が ET_A に結合することを証明した。実例として、ウサギ肺動脈血管で ET_B 拮抗薬投与により ET_A を介する収縮増強作用があることを示した。2) リン酸化非依存の脱感作機構の1つとして、G蛋白質シグナル調節蛋白質の心血管系における解析を行い、RGS4, 5, 10が発現することを明らかにし、ET受容体の機能抑制作用を持つことを示した。

1. 序

7回膜貫通型受容体を介した生体情報の伝達には、三量体G蛋白質と効果器が必須である。アゴニストの受容体刺激後、受容体はG蛋白質を介して、種々のイオンチャネルや細胞質酵素(PLC, ACなど)を活性化して多様な細胞内情報系を作りだしている。生体は細胞外の様々な量の多様な情報を取捨選択して適切な応答をしているが、そのために生体は必要に応じて外界からの情報に対して感受性を変えて適切な応答をする脱感作や適応、順応、耐性などと呼ばれる感受性調節機構をもっている。既知の蛋白質キナーゼ(Aキナーゼ, Cキナーゼ, G蛋白質共役受容体キナーゼGRKなど)の受容体リン酸化による感受性調節機構に加えて、最近、三量体G蛋白質活性を調節するRGS(G蛋白質シグナル調節蛋白質)が発見された。RGS蛋白質ファミリーは約120残基のRGSドメイン構造を共通に持ち、G蛋白質 α サブユニットと結合して、そのGTPase活性を促進するGAP(GTPase活性化蛋白質)活性を持つ。つまり、RGS蛋白質は活性化型

G蛋白質のGTPの加水分解を促進してGDP結合型G蛋白質にして不活性化し、最終的には受容体機能を低下(脱感作)させる。当初、RGS蛋白質は、線虫や酵母において産卵能や増殖能の抑制を行う物質として同定されたが、高等動物においてもこのファミリーに属する約20種の蛋白が報告されており、脱感作現象に関与するG蛋白質共役受容体情報の新しい調節因子としてその解明が期待されている。

我々はこれまで一貫してエンドセリン受容体を介する組織・細胞の多様な応答性の研究に従事し、2種類のエンドセリン受容体では説明できない不思議な応答現象を観察し、その生化学的分子基盤を追跡してきた。強力な血管収縮作用を持つ3種エンドセリン(ET)は、G蛋白質と共役する2種のET受容体(ET_A , ET_B)を介した細胞内情報伝達系により作用を発揮する。しかし、これまでに我々は、1) 2種のET受容体を同時発現する血管や非血管組織では、エンドセリン(ET-1)刺激は見かけ上4種の多様な応答(拮抗薬感受性 ET_{A1} , ET_{B1} 型; 拮抗薬非感受性

ET_{A2}, ET_{B2}型)を生み出し、既知の2種の拮抗薬感受性型受容体(ET_{A1}, ET_{B1}型)では説明できないことを示してきた。さらに、2) ET_B受容体欠損マウスを用いた研究より、胃平滑筋におけるET_{B1}, ET_{B2}型という2種の応答は1種のET_B受容体遺伝子に由来することを明らかにし、応答の多様性を産み出す細胞内機構が存在することを指摘した。また、3) モルモット腸管の収縮は、ET_A受容体の10倍量のET_B受容体が存在するにもかかわらずET_A受容体を介して生じ、血管が両受容体がどちらも収縮に寄与するのと異なり、腸管平滑筋ではあたかもET_B受容体が脱感作されているように観察され、受容体以降の情報伝達系の細胞内選択機構があることを指摘した。

これらの結果をふまえて、昨年度は、1) 受容体脱感作と関連が深いGRK2(G蛋白質共役受容体キナーゼ2)とET_B受容体の共発現実験を行った。ET_B野生型受容体ではエンドセリン刺激により強い脱感作(細胞内Ca放出能の減弱、IP₃産生の減少)が生じ、βアドレナリン受容体と同様GRK2によるリン酸化を受け、脱感作と密接な関連を持つことが推定された。しかし、多数のリン酸化部位を含むC末端部欠損ET_B受容体は効果器への情報伝達は正常であり、脱感作も野生型と同程度観察されるにもかかわらず、全くリン酸化されなかった。このことから、GRK2のキナーゼ活性以外の非リン酸化機構による脱感作システムの存在の可能性が考えられた。一方、2) ET_B受容体遺伝子の変異が原因で結腸部の壁内神経細胞が先天的に欠如するため巨大結腸の形になるヒスシユスプルング病において、我々は日本における孤発例の巨大結腸症患者31名よりET_B受容体のアミノ酸変異3例を新たに検出した。1例はホモ(-/-)型であるが、他の2例はヘテロ型(+/-)でも発症していた。変異受容体の発現細胞による機能解析の結果、1例(+/-)の変異型はアゴニスト結合は正常であるが、細胞内応答が野生型受容体に比べて異常に低

く、他例(-/-)は細胞膜への受容体の輸送異常であった。残る1例(+/-)は野生型と同活性を持ち多型と推定された。ホモ型(-/-)患者の発症は細胞膜受容体の著明な減少により説明可能であるが、ヘテロ型(+/-)患者に見られるように、推定50%の変異型と50%の野生型ET_B受容体の共発現が何故発症するかは不明である。ET_B受容体欠損マウスへのET_B受容体の再導入実験では、50%野生型・50%変異型ET_B受容体が発現している場合では巨大結腸症が見られない。このように野生型と変異型受容体がともに発現している患者が何故発症するかはもちろん他の遺伝子変異との組み合わせによることも考えられるが、7回膜貫通受容体ではあまり考慮されなかった野生型・変異型受容体の二量体形成による野生型受容体の機能的抑制(脱感作)を行っている可能性もあるので解析する必要がある。このように2種のET受容体が共存して発現している細胞や組織において観察される細胞の応答が多様な生理応答を表すには、前述のリン酸化非依存の脱感作機構の存在からも示唆されたように、アゴニスト・受容体・G蛋白質というカップリング以降に、RGS蛋白質などによるさらに新しい調節システムの存在が予測される。

それ故、今年度は、1) エンドセリン(ET)-1がET受容体拮抗薬存在下で示す多様な応答が、2種の受容体ET_A・ET_B間の相互作用により生じる可能性を検討するため、ET_A及びET_B受容体共発現細胞におけるET-1の結合及び機能特性の解析、2) エンドセリン受容体を含む7回膜貫通型受容体の応答制御を司るG蛋白質制御因子(RGS)の心血管組織における発現、その受容体シグナルに対する抑制効果を解析した。

2. エンドセリンA及びエンドセリンB受容体共発現細胞におけるエンドセリン-1の結合及び機能特性の解析：拮抗薬による2種のET受容体間におけるリガンドの移動

A. 研究目的

エンドセリン(ET)の受容体にはET_AとET_Bの二種が存在するが、拮抗薬を用いるとその二種の受容体のみでは説明できない応答が生じる。そこで、これらの多様性が、ET_A・ET_B間の相互作用により生じている可能性について検討した。

B. 研究方法

ヒトET_A及びET_Bを各単独発現及び2種受容体を共発現したCHO細胞を作製し、細胞を用いた表面受容体と¹²⁵I ET-1の結合実験、また細胞内情報伝達系の関与のない細胞膜を用いた¹²⁵I ET-1の結合実験、細胞内カルシウム濃度測定、チミジン取り込み実験を行った。また、ウサギ肺動脈血管を用いた収縮薬理実験を行った。

C. 研究結果

1) ET_A/ET_B共発現細胞(CHO_{AB})において、¹²⁵I ET-1の結合は、選択的ET_Bリガンド単独では全く置換されず、ET_A拮抗薬BQ-123共存下でのみET_Bリガンドにより置換されるという奇異な現象を認めた。この現象は、氷冷下でも、膜分画のみでも、ET_A・ET_B各単独発現細胞を適切な量比で混ぜた状態でも認められた。従ってこの現象には、細胞内情報伝達系や、細胞膜上でのET_A/ET_Bヘテロ二量体形成は関与しないと考えられた。

2) ET_B受容体リガンド単独での結合置換が認められないCHO_{A/B}細胞においても、ET_B作動薬は、細胞内カルシウム濃度上昇、チミジン取り込み増加作用を示し、またET-1によるチミジン取り込みの増加は、ET_A拮抗薬とET_B拮抗薬の併用によって拮抗され、ET_Bは正常に機能していることが示された。

3) ウサギ肺動脈のET-1による収縮は、ET_B拮抗薬により増強され、その増強はET_A拮抗薬で抑制された。

D. 考察

以上のことから、1) ET_A/ET_B共存系では、ET_BリガンドによりET_Bから置換遊離した¹²⁵I ET-1がET_Aにトラップされ、ET_Bリガンドによる結合置換が認められない結果になることが示された。2) ウサギ肺動脈では、この過程でET_Aに結合したET-1が、ET_Aを介する作用を示したと考えられた。このことは、受容体と拮抗薬相互作用に新たな機序が存在することを示したものであり、循環器疾患治療薬として開発の進んでいるET_B拮抗薬の臨床応用に際して、血管部位によりET_A/ET_Bの存在量比が異なるために拮抗効果が部位により多様に変化する可能性を示唆し、使用目的により十分な配慮をする必要があることを示したものである。

3. 三量体G蛋白質シグナル調節蛋白質(RGS)

による心血管系における7回膜貫通受容体シグナルの新しい調節機構の解析

A. 研究目的

本研究は、心・血管平滑筋における収縮型から合成型の変化に伴う内在的RGSの発現状態解析とRGSによるエンドセリン・アンジオテンシンなどに対する細胞応答変化を解析し、リン酸化非依存性のRGSによるG蛋白質シグナル調節蛋白質としての生理的・病態的意義を評価することを目的とする。本年度は、1) 心血管平滑筋上に存在するRGS蛋白質の解析、2) 7回膜貫通G蛋白質共役型受容体及びRGS蛋白質の共発現による培養細胞系を用いたRGS導入効果の解析を行った。また、3) 特定のRGSに結合するG蛋白質αサブユニットの解析を行った。

B. 研究方法

1) 心・血管平滑筋における内在性RGS蛋白の解析

ラット心臓・大動脈、培養血管平滑筋細胞及び培養血管内皮細胞に特徴的に発現している

RGS を約 20 種の RGS 特異的 primer により、PCR 法にて解析した。

2) c-myc タグ付きの RGS1, 2, 4, 5, 8, 16, Z1, GAIP の発現ベクターを作製し、アンジオテンシン受容体 AT1a を安定発現させた 293 細胞、ヒト心臓由来 Girardi 細胞、ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) に一過性に発現させ、エンドセリン、アンジオテンシン、カルバコール、ATP、ヒスタミンに対する細胞内 Ca 応答の解析を行った。

3) RGS と G 蛋白質 α サブユニットの結合特性の解析は、ラット脳や 293 細胞より調整した膜に His タグ付き RGS を加えて種々の条件下で反応し、可溶化・キレート樹脂処理・SDS-PAGE・ウェスタンブロット後、RGS と結合する G 蛋白質 α サブユニットを各種特異的抗体で検出した。

C. 研究結果

1) RGS 蛋白質の各種組織での発現解析

RGS の局在を解析してみるとラット神経組織・網膜においては一般に多種類の RGS (1, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14 など) が発現しているが、ラット心血管系及び平滑筋組織では、RGS4, 5, 10 の 3 種が主要なものであった。しかし、胸部大動脈由来の培養平滑筋細胞では、RGS10 のみが主に発現し、RGS4 と RGS5 の発現はほとんど見られなかった。

2) RGS4・RGS5 と G 蛋白質 α サブユニットの結合の解析

ラット脳及びヒト 293 細胞由来の膜と RGS4, RGS5 との結合蛋白質の解析では、両者 RGS とともに Gi (1, 2, 3), Go, Gq/ α_{11} と結合能を持つことが判明した。他の RGS の G 蛋白質 α との結合特性の解析は現在進行中である。

3) 293 細胞及び Girardi 細胞への RGS 発現の効果

種々のアゴニスト応答を解析した結果、293 細胞は安定導入したアンジオテンシン受容体 AT1a 以外に内在性の受容体としてエンドセリ

ン (ET_A) 受容体とアセチルコリン (M) 受容体を発現しており、また、Girardi 細胞は内在性の受容体として、ヒスタミン受容体 (H1)、エンドセリン受容体 (ET_B) 及び ATP 受容体を発現していることが判明した。これらの受容体のアゴニスト刺激後の細胞内情報伝達が各種 RGS の一過性発現により、どのように変化するかを細胞内 Ca 濃度の変動測定で追跡した。RGS1, 2, 4, 5, 8, 16, Z1, GAIP の発現により、各種アゴニストによる細胞内 Ca 濃度上昇は著しく抑制された (最大 60~70% 抑制)。その抑制の程度は、RGS の発現程度に依存し、また、受容体の発現密度により抑制の程度は変動した。すなわち、RGS を強発現させると、高濃度のアゴニスト (100 nM) 刺激に対してもすでに抑制が見られるが、RGS の低い発現条件下では、高濃度のアゴニスト刺激では抑制が見られないが、低濃度アゴニスト刺激に対しては抑制が観察された。一方、今回の AT1a 受容体のように発現が内在性発現の他の受容体に比べて著しく高い 293 細胞は、RGS の発現が高濃度の場合には、Ang II 刺激は 100 nM でも他のエンドセリン (ET-1)、カルバコール刺激と同様に抑制されるが、中濃度の RGS 発現では、Ang II の高濃度刺激では抑制されず、低濃度刺激の場合のみ抑制された。しかし、エンドセリン、カルバコールの刺激は、その中濃度の RGS 発現でも強い抑制が見られた。さらに RGS 発現を低濃度にすると、Ang II 受容体は抑制されずに、低濃度のエンドセリン・カルバコール刺激のみが抑制された。Girardi 細胞や HUVEC 細胞においてもほぼ同様の RGS 導入による抑制効果が観察されており、その生理的病的役割の解析を現在進めている。

D. 考察 及び E. 結論

以上の実験から、1) 血管平滑筋の収縮型から合成型への変化は、細胞増殖能の大きな変化と、血管作動性物質に対する受容体応答の変化を伴

うが、この変動とRGS4, 5の発現が密接に関与している可能性が考えられる。また、2) 約200残基のRGS蛋白質ファミリーであるRGS1, 2, 4, 5, 8, 16, Z1, GAIPの発現はアゴニストによる細胞内Ca濃度の上昇能アッセイでは、ほぼ同一の抑制傾向を示すことが判明した。3) それらの抑制作用はRGSとG蛋白質 α との結合実験から、Gi, Go, Gq/ β サブユニットを介して行われると推定される。4) 細胞に発現するRGS蛋白質の発現密度に依存して、アゴニスト刺激による受容体シグナルは抑制される。さらに、5) 細胞に発現する受容体密度により、RGS蛋白質の発現による受容体シグナルの抑制効果は異なることが判明した。つまり、AT1a受容体発現細胞に見られたように、ある受容体の発現密度が高く、RGS発現密度が低い場合には、アンジオテンシンのシグナルは抑制されないが、エンドセリンやアセチルコリン受容体シグナルは抑制されるという、見かけ上の選択性が生じることも判明した。

現在、ほ乳類RGS蛋白質ファミリーは約20種類と多く、詳細なRGS発現量と受容体情報の抑制との関連の定量的解析はc-mycタグ付きRGSを用いて現在進行中である。また、現在、各種RGS特異的抗体を作製中であり、内在性RGS蛋白質の発現変動がアゴニスト刺激や他のサイトカイン刺激などでどの程度変化するかを検討する予定である。

また、RGSはG蛋白質との結合は他の報告でもGi(1, 2, 3), Go, Gq/ β に限られているが、我々はGsと結合するRGSを検出しており、現在解析中である。さらに、我々はG蛋白質共役受容体キナーゼ2 (GRK2)による受容体シグナルのリン酸化非依存性の脱感作機構を報告(印刷中)しているが、GRKそのものがG蛋白質 α と結合し、RGS機能を持つ可能性を証明する実験を現在行っている。

F. 研究発表

1. 論文発表

- ① H. Tanaka, K. Moroi, J. Iwai, H. Takahashi, N. Ohnuma, S. Hori, M. Takimoto, M. Nishiyama, T. Masaki, M. Yanagisawa, S. Sekiya, S. Kimura. Novel mutations of the endothelin B receptor gene in patients with Hirschsprung's disease and their characterization. J Biol Chem, 273 : 11378-11383, 1998.
- ② T. Shibasaki, K. Moroi, M. Nishiyama, J. Zhou, A. Sakamoto, T. Masaki, K. Itoh, T. Haga, S. Kimura. Characterization of the carboxyl terminal - truncated endothelin B receptor coexpressed with G protein-coupled receptor kinase 2. Biochem Mol Biol Int (in press).

2. 学会発表

- ① 長谷川洋, 西山真理子, 単 麗華, 諸井佳代子, 周 静, 真崎知生, 増田善昭, 木村定雄. エンドセリン受容体ET_A, ET_B共発現細胞における [¹²⁵I] ET-1結合特性の解析について. 第71回日本薬理学会年会, Jpn J Pharmacol, 76 : I-77, 1998.
- ② 柴崎忠雄, 諸井佳代子, 西山真理子, 阪本英二, 伊藤和光, 芳賀達也, 木村定雄. エンドセリンB受容体の脱感作機構の解析. 第71回日本薬理学会年会, Jpn J Pharmacol, 76 : I-108, 1998.

G. 知的所有権の取得状況

なし