

厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）  
分担研究報告書

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

分担研究者 宮本 薫（群馬大学生体調節研究所 助教授）

コレステロールは動脈硬化や心筋梗塞などの疾患の要因のひとつとなる以外に、ステロイドホルモンの合成素材としても生体内で利用されている。SR-BI (Scavenger Receptor Class B Type I) は、最近新たに見いだされた HDL (High Density Lipoprotein) 特異的受容体であり、コレステロールの細胞内取り込みに深く関与している。本研究では、最近 HDL 受容体として注目を集める SR-BI のラット卵巣からのクローニングを行い、その構造決定および発現調節の解析を行った。

A. 研究目的

老化に伴い、動脈硬化や心筋梗塞などの疾患も急激に増加傾向をしめす。これらの疾患による死亡は、これからの高齢化社会を迎えて益々増加してくるものと想定される。そのため、動脈硬化や心筋梗塞などの疾患の原因となる因子の動態を明らかにしていくことが求められている。これら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ことはよく知られている。

本研究では、最近 HDL 受容体として同定され注目されている SR-BI 遺伝子をラット卵巣からサブトラクショナルクローニングによってクローニングし、その構造を決定した。本研究の目的は、SR-BI 遺伝子の発現調節と組織内分布を明らかにすることで、SR-BI 遺伝子の生体内における役割を明確にしていくことである。

B. 研究方法

SR-BI の遺伝子発現の調節を SR-BI 遺伝子上流域をクローニングし解析した。ラットジェノミックライブラリーから、SR-BI 遺伝子上流

域を単離した。ラット SR-BI cDNA をプローブとして用い、SR-BI 遺伝子上流域を含むクローンを単離した。このクローンをを用いて、SR-BI 遺伝子上流域の塩基配列を約 2.3 kb にわたって決定した。

次にラット SR-BI 遺伝子の転写開始領域を明らかにするため、プライマーエクステンション法を行った。ラット卵巣からトータル RNA を分離し、約 20 mg を放射性ラベルした SR-BI cDNA の 5' 末端部分とハイブリダイズした後、プライマーエクステンションを行い、プロダクトをゲル電気泳動して SR-BI の転写開始点を決定した。

次に得られた SR-BI プロモーター領域を用いてルシフェラーゼアッセイによる解析を行った。ラット SR-BI は、卵巣において LH による刺激で発現が誘導されることが明らかとなっているので、LH の主なセカンドメッセンジャーである cAMP の SR-BI プロモーター領域における反応性を、Leydig cell 由来でステロイド産生能を持つ MA<sup>-10</sup> 細胞、副腎皮質由来でステロイド産生能を持つ Y1 細胞、肝細胞由来の HepG2 細胞

胞および上皮性細胞株 HeLa 細胞を用いて検討した。

ラット SR-BI 遺伝子上流域 2.3kb をルシフェラーゼベクターに組み込み、上記の細胞にリポフェクタミン法を用いてトランスフェクトし、48 時間から 72 時間後に発現誘導されてくるルシフェラーゼを、インターナルコントロールとしてウミシイタケルシフェラーゼ活性を用い転写効率を補正し、検討した。

### C. 研究結果

昨年度の研究により、ラット SRBI はその塩基配列から、509 残基のアミノ酸からなる 2 回膜貫通型の細胞膜局在蛋白質であることが明らかとなった。チャイニーズハムスターおよびマウス SR-BI とはアミノ酸レベルで 89% および 92% の相同性を示した。ラット SR-BI は 10 カ所の糖鎖付加部位をもち、8 カ所のジスルフィド結合部位をもっている。このうち、ジスルフィド結合部位は 8 カ所のうち 6 カ所が、糖鎖付加部位は 10 カ所のうち 9 カ所が他の動物種の SR-BI でも保存されていた。ノーザンブロットによる解析では 2.5 kb に単一のバンドを示し、これは単離した cDNA の長さとは良く一致していた。

ノーザンブロット解析による組織分布は卵巣、精巣、副腎、肝臓に多く発現がみられ、特に卵巣においては PMSG および hCG の刺激により投与後 3 時間以内に著明にその発現が誘導された。一方卵胞発育を促進すると考えられている FSH では全く誘導されず、むしろ発現が抑制される傾向を見せた。この誘導パターンは卵巣における一連のステロイド合成酵素群の遺伝子誘導パターンが極めて類似していることから、卵巣においては SR-BI はステロイド合成のための基質となるコレステロールを供給することで、ステロイド合成関連遺伝子として一連のステロイド合成酵素群と同様の遺伝子発現調節を受けていることが示唆された。さらに *in situ* ハ

イブリダイゼーションによる解析で、SR-BI 遺伝子は卵巣内で theca interna 細胞に限局して存在することが明らかとなった。しかも卵巣内に存在する卵胞の大きさに関係なくすべての theca interna 細胞で SR-BI が誘導されていることが明らかとなった。また、成熟メスラットの卵巣では黄体細胞に特異的に SR-BI が発現していた。

これらの知見をもとに、本年度はラット SR-BI の発現調節をその遺伝子上流域をクローニングし検討した。その結果、SR-BI のプロモーター領域には TATA like sequence が存在し、さらに 4 カ所の Sp1 結合 site と思われる配列が存在することが明らかとなった。また最も下流に存在する Sp1 結合 site には NGFI-A/WT-1 結合 site と重複した配列が見られた。

次に、ラット SR-BI の転写開始点を明らかにするために、プライマーエクステンションを行った。その結果翻訳開始地点上流 128 base に転写開始点が存在することが明らかとなった。次に、ルシフェラーゼアッセイを用いた SR-BI 遺伝子の発現調節を検討した。その結果、SR-BI の発現には上流 121 bp が重要であり、さらにそこに含まれる 3 ヶ所の Sp1 結合領域が大きな役割を担っていることを明らかにした。

### D. 考察

動脈硬化は加齢に伴い増加する成人病と考えられるが、その主な成因として血管内膜層へのマクロファージの浸潤とそれに伴う血管平滑筋細胞およびマクロファージへのコレステロール取り込みによる泡沫化が挙げられる。動脈硬化巣へのコレステロールの取り込みは血中 LDL が主要な役割を果たしているが、一方 HDL は肝臓で血中コレステロールのリバースアップテイクに中心的な役割を果たし、血中コレステロールの調節に働いている。最近この HDL に対する特異的受容体が以前からスカベンジャー受容体ク

ラスBIと呼ばれていた膜蛋白質であることが明らかにされた。

我々は今回卵巣におけるコレステロール取り込みとそれに続くステロイド合成にかかわる遺伝子群をサブトラクションクローニング法を用いて数多く単離し、それらの中にSR-BI遺伝子が含まれることを発見した。SRBIの遺伝子発現調節についてはあまり知られていないが、少なくとも卵巣においてはゴナドトロピンの支配下にあり、他のステロイド合成関連遺伝子と同じ調節を受けていることが示唆される。また、その組織内局在も theca interna 細胞に限局しており、他のステロイド合成関連遺伝子群の局在と一致する。これらの事実はSR-BI遺伝子が卵巣においてはステロイド合成関連遺伝子として機能していることを示している。一方肝臓においては、HDL受容体はコレステロールのリバースアップテイクによって血中コレステロール値の調節を行っていると考えられている。これはSR-BIが卵巣と肝臓において全く異なる発現調節を受けていることを表している。一つの遺伝子の発現がどのようなメカニズムで全く異なる調節を受けるかを明らかにすることが、SR-BIの動脈硬化症における役割を知る上で必要不可欠であると考えられる。

#### E. 結論

SR-BI遺伝子全長のcDNAを単離し、その塩基配列を決定した後、さらに遺伝子上流域もクローニングし、その構造を明らかにした。SR-BIのプロモーター領域にはTATA like sequenceが存在し、さらに4カ所のSp1結合siteと思われる配列が存在することが明らかとなった。また最も下流に存在するSp1結合siteには、NGFI-A/WT-1結合siteと重複した配列が見られた。

次に、プライマーエクステンションの結果、翻訳開始地点上流128 baseに転写開始点が存在

することが明らかとなった。またルシフェラーゼアッセイを用いたSR-BI遺伝子の発現調節を検討したところ、SR-BIの発現には上流121bpが重要であり、さらにそこに含まれる3ヶ所のSp1結合領域が大きな役割を担っていることを明らかにした。

#### F. 研究発表

##### 2. 学会発表

- ① 水谷哲也, 園田美江, 宮本 薫, SR-BIの遺伝子発現調節. 第3回日本内分泌学会生殖内分泌分科会, 日本内分泌学会雑誌, 74(2): 564, 1998.

#### G. 知的所有権の取得状況

なし

## 虚血腎におけるアドレノメデュリンの産生機序に関する研究

分担研究者 平田 恭信（東京大学医学部循環器内科 講師）

低酸素刺激下においた培養血管平滑筋細胞、メザンギウム細胞、MDCK尿細管細胞はいずれも、AMのペプチドレベルでもmRNAレベルでも産生が増加した。この時の細胞培養上清を他の血管平滑筋細胞やMDCK尿細管細胞に加えるとcAMPが増加した。ヒトAM遺伝子上流-1534~+73bpを組み込んだ発現ベクターを導入した尿細管細胞でその責任部位を検討したが、サイトカインでは刺激されるものの低酸素刺激の応答はなかった。また同様にAM mRNAの安定性にも変化が見られなかった。

### A. 研究目的

我が国においても生活の欧米化に伴い、動脈硬化性の疾患が年々増加している。これらは最終的に虚血性臓器障害の形で生体の恒常性の維持が破綻されることが多い。したがって高齢化社会において動脈硬化の予防はもとより、虚血性臓器障害の発生機序の検討が今後ますます必要になる。その内、腎臓は低酸素状態に最も弱い臓器の一つである。低酸素による腎機能障害発生の正確なメカニズムは不明の部分も多いが、低酸素刺激によって生じる腎血管収縮も影響している可能性がある。最近の報告では、遷延する血管収縮にエンドセリン1(以下ET-1)の産生の増加<sup>1)</sup>や、NOの減少<sup>2)</sup>が関与する可能性が指摘されている。

アドレノメデュリン(以下AM)はヒト褐色細胞腫より単離同定された強力な降圧作用をもつペプチドだが<sup>3)</sup>、以前我々はAMには強力な腎血管弛緩作用があり、ナトリウム利尿作用を有することを報告した<sup>4)</sup>。また最近の他のグループの報告によると、AMは血管平滑筋においてPDGFやトロンビンによるET-1産生増加作用

を抑制することが示されており<sup>5)</sup>、AMが低酸素下の腎において増加するET-1などの血管収縮因子に拮抗する形で腎不全の進行を抑制している可能性も考えられる。そこで我々は、低酸素下でのAMの遺伝子発現の動態をin vivo, in vitroの系で解析した。つまり、in vivo, in vitroの系においてAM産生が低酸素下で増加するかどうかを確認することを第一の目的とした。また、もしそうであれば、そのメカニズムを調べることを第二の目的とし、ヒトAMのプロモータ領域の転写活性、およびAM mRNAの安定性について検討した。

### B. 研究方法

in vivoの実験では、雄性Wistarラットを使用した。左腎動脈を結紮し、右腎は未処置でコントロールとした。両側腎を術後3, 6, 20時間で摘出し、total RNAを抽出した。このin vivoの実験では、低酸素以外の因子の関与も考えられるので、低酸素の影響だけを解析する系としてin vitroの実験、つまり培養細胞のディッシュごと、低酸素状態に数時間置く実験を行った。

使用した細胞はイヌ腎集合管由来の MDCK 細胞、ラット血管平滑筋細胞 (VSMC)、ラットメサンギウム細胞である。酸素分圧 2% 未満の低酸素導入後、0, 3, 6, 12, 24 時間で total RNA を抽出し、AM mRNA をノーザンブロット法により評価した。

次に AM mRNA の転写調節を調べるため、ヒト AM プロモータ (-1534/+70bp)<sup>6)</sup> をルシフェラーゼ遺伝子上流に組み込んだプラスミドと導入効率補正用コントロールベクターを、ラット VSMC 及び MDCK 細胞に co-transfection した。12 時間低酸素、および IL-1 $\beta$  (50 U/ml), TNF- $\alpha$  (4000 U/ml), LPS (50 mg/ml) を含むサイトカインカクテル 12 時間刺激におけるルシフェラーゼ活性を調べた。

次に AM mRNA の安定性について検討した。まず、6 時間低酸素によって AM mRNA の発現レベルをあげておき、アクチノマイシン D 存在下に正常酸素および低酸素の状態に置き、0, 1, 2, 4 時間でトータル RNA を抽出し、ノーザンブロットによって AM mRNA の安定性を評価した。

産生される AM ペプチドの量を評価するため、培養液中の AM ペプチドをラジオイムノアッセイによって測定した。抗体は哺乳類 AM 共通の C-terminal アミド構造を認識する抗体を使用した。

また、産生された AM が従来知られている cAMP 産生増加を介した細胞内伝達系を実際に動かすかどうかを調べるため、ラジオイムノアッセイにて細胞内 cAMP 濃度を測定した。0.5 mmol/l IBMX 存在下に 6 時間低酸素状態においたラット VSMC 細胞内 cAMP 濃度をコントロール細胞と比較した。

### C. 研究結果

In vivo の腎動脈結紮実験では、腎血管の結紮 6 時間後より 1.6kb の AM mRNA が増え始め、20 時間後までそれが持続していた。次に、in

vitro の実験では、低酸素導入後、3 時間で MDCK 細胞での AM mRNA 発現は増加し始め、6 時間でピークとなり、12 時間まで増加していた。ラット VSMC では、AM mRNA の発現レベルは MDCK 細胞と比べると非刺激時でも高かったが、低酸素導入後 6 時間で mRNA が増え始め、24 時間後まで高いレベルが持続していた。ラットメサンギウム細胞では、MDCK 細胞、ラット VSMC と比べると AM mRNA の発現レベルは低酸素導入後でも低かった。しかし低酸素導入 12 時間後、24 時間後では AM mRNA の発現増加は有意であることが示された。次に、MDCK 細胞が低酸素で AM を産生するかどうか、ペプチドレベルでの検討では、低酸素下で MDCK 細胞培養液中に放出された AM peptide の量は、低酸素導入後 3, 6 時間において低酸素群に比べて高いことが示された。つまり低酸素下で AM 産生が増加することが mRNA レベルだけでなく、ペプチドレベルでも示された。しかし、低酸素群では、それ以降、AM peptide は減少し始めている。これは長時間の低酸素刺激による細胞障害により、AM 産生・培養液中への供給が低下していくからと考えられた。

次に低酸素による AM 産生増加のメカニズムについて検討した。ヒト AM プロモータをルシフェラーゼ遺伝子上流に組み込んだプラスミドをリポフェクション法でトランスフェクトしたラット VSMC において、12 時間低酸素群、12 時間サイトカインカクテル刺激群、および無刺激コントロール群の 3 群についてルシフェラーゼ活性を測定したところ、サイトカインカクテル群では無刺激コントロールに比べて 4 倍のルシフェラーゼ活性の増加が見られたが、低酸素刺激では有意な増加を認めなかった。

この部分のプロモータの転写活性が低酸素により上がらなかったため、次に AM mRNA の安定性についてみた結果を示す。アクチノマイシン D 5  $\mu$ g/ml 存在下に新たな転写を抑制した上で、

残存するAM mRNAをノーザンブロットによって評価したが、低酸素群、正常酸素群、どちらの群でもAM mRNAの半減期は約1.6時間であり、差を認めなかった。

低酸素刺激によるAMの産生亢進が実際に生理作用を表すレベルか否かをしらべるため、低酸素下ラットVSMC内のcAMPの動態を調べた。cAMP細胞内濃度は、低酸素6時間で、正常酸素群： $4.6 \pm 0.4$  pmol/ $10^5$  cells、低酸素群： $13.3 \pm 1.4$  pmol/ $10^5$  cellsと有意に低酸素群の方が高かった。

#### D. 考察

この研究において、我々は血管系以外の腎実質細胞でも低酸素刺激によってAMの産生が増加すること、それは転写レベルの増加に起因することを示した。以前のin situ hybridization<sup>7)</sup>やimmunohistochemistry<sup>8)</sup>の報告をみても、腎実質細胞においてAMが産生されており、腎機能の維持に何らかの役割を果たしていることが予想されており、今回の我々が報告した低酸素下での腎実質細胞のAM産生増加は、腎保護作用の方向に働いている可能性を示すものである。

増加したAMが病態・生理的な働きをしているかどうかしらべるために、低酸素下においたラットVSMCにおいて細胞内cAMPをラジオイムノアッセイで測定し、コントロール細胞よりも上昇していることを示した。この作用がAM特異的な作用なのかどうか調べるため、従来AM特異的拮抗ペプチドとして使われてきたAM[22-52]や、CGRP[8-37]を用いても、低酸素下でのcAMP増加は抑制できなかった。しかし、これらのinhibitorの特異性にはまだ議論の余地があり、低酸素下に産生されたAMがcAMP濃度を上昇させた可能性は十分あると考えられる。

エリスロポエチン、VEGFなどが低酸素刺激で産生が亢進することが知られているが、エリ

スロポエチン遺伝子の3'側、VEGFの5'側には、hypoxia-induciblefactor 1 (HIF-1)結合部位が存在し、低酸素下での発現亢進にはこの領域が重要であることが示されている<sup>9, 10)</sup>。また低酸素下のVEGF mRNAの安定性が上昇し、低酸素下のVEGF産生亢進に関与している可能性が示されている<sup>11)</sup>。我々が今回使った、ヒトAMプロモータ領域(-1534/+70 bp)には、HIF-1結合部位は存在せず、実際、低酸素下でのルシフェラーゼ活性の上昇も見られなかった。またmRNA安定性の変化も見られず、今回使ったプロモータ領域以外の部位が転写レベルで発現を調節している可能性が高いと考えられた。今回我々が用いた、ヒトAMの上流-1534/+70には明らかなHIF-1結合領域は認められない。しかし、更に上流、もしくはエリスロポエチンのように3'側にそれがある可能性も残されている。我々は、AMの上昇が既報のAM発現を誘導するサイトカインで最も強力なものであるTNF- $\alpha$ <sup>12)</sup>を介していないことを、ラット平滑筋細胞、およびMDCK細胞の培養系において、Western Blot法を用いて検討した。その結果、低酸素下においた両培養細胞の培養液、および細胞内でTNF  $\alpha$ の発現亢進がないことを確認している。今回用いたプロモータ領域がリポポリサッカライドを含むサイトカインカクテルによって転写活性を亢進したことも考えると、TNF  $\alpha$ 以外のサイトカインの関与も考えられる。ET-1が低酸素下の心筋細胞で発現が亢進すること、また虚血腎での腎不全にET-1が関与することが示されており<sup>13)</sup>、AMがその作用に拮抗する形で病態改善の方向に働くペプチドである可能性があると考えられる。

#### E. 結論

AMの産生は、低酸素下のwhole kidney、MDCK細胞、ラットメサンギウム細胞、血管平滑筋細胞で増えることを初めて報告した。AM

mRNAの安定性は低酸素下でも変化せず、また今回使用した、ヒトAM 5' flanking regionは低酸素によるAM mRNA発現増加には関係していないことが示された。この部分を用いたルシフェラーゼアッセイにおいて、サイトカインカクテルの刺激では転写活性の上昇が示されたことから、低酸素による転写活性上昇にはサイトカイン刺激とは異なる、他の部位の関与が示された。低酸素で産生が増加したAMは、細胞内cAMP上昇を介して細胞内に情報を伝達している可能性が示唆された。以上の結果より、AMはET-1などの血管収縮因子に拮抗して、低酸素下における腎血管トーンスを調節している可能性が考えられた。AMは低酸素が関与する急性腎不全においても重要な働きをする可能性が高く、今後、更なる解析が必要であると考えられる。

#### F. 引用文献

- 1) Kon V, Yoshioka T, et al: Glomerular actions of endothelin in vivo. *J Clin Invest*, 83 : 1762-1767, 1989.
- 2) Lieberthal W, Wolf E.F, Rennke H.G, et al: Renal ischemia and reperfusion impair endothelium - dependent vascular relaxation. *Am J Physiol*, 256 : F894-900, 1989.
- 3) Kitamura K, Kangawa K, et al : Adrenomedullin : a novel hypotensive peptide isolated from human pheochromocytoma. *Biochem Biophys Res Commun*, 192 : 553-560, 1993.
- 4) Hirata Y, Hayakawa H, Suzuki Y, et al : Mechanisms of adrenomedullin-induced vasodilation in the rat kidney. *Hypertension*, 25 : 790-795, 1995.
- 5) Kohno M, Kano H, Horio T, et al : Inhibition of endothelin production by adrenomedullin in vascular smooth muscle cells. *Hypertension*, 25 : 1185 - 1190, 1995.
- 6) Ishimitsu T, Kojima M, Kangawa K, et al : Genomic structure of human adrenomedullin gene. *Biochem Biophys Res Commun*, 203 : 631-639, 1994.
- 7) Cameron V.A, Fleming A.M, et al : Novel sites of adrenomedullin gene expression in mouse and rat tissues. *Endocrinology*, 139 : 2253-2264, 1998.
- 8) Jougasaki M, Wei C.M, Aarhus L.L, et al : Renal localization and actions of adrenomedullin : a natriuretic peptide. *Am J Physiol*, 268 : F657-663, 1995.
- 9) Beck I, Ramirez S, Weinmann R, et al : Enhancer element at the 3' -flanking region controls transcriptional response to hypoxia in the human erythropoietin gene. *J Biol Chem*, 266 : 15563-15566, 1991.
- 10) Liu Y, Cox S.R, Morita T, et al : Hypoxia regulates vascular endothelial growth factor gene expression in endothelial cells. Identification of a 5' enhancer. *Circ Res*, 77 : 638-643, 1995.
- 11) Shima D.T, Deutsch U, et al : Hypoxic induction of vascular endothelial growth factor (VEGF) in human epithelial cells is mediated by increases in mRNA stability. *FEBS Lett*, 370 : 203-208, 1995.
- 12) Sugo S, Minamino N, et al : Production and secretion of adrenomedullin from vascular smooth muscle cells : augmented production by tumor necrosis factor-alpha. *Biochem Biophys Res Commun*, 203 : 719-726, 1994.

- 13) Lopez-F.A, Gomez-G.D, et al: A role for endothelin in the maintenance of post-ischaemic renal failure in the rat. *J Physiol*, 444 : 513-522, 1991.

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- ① Nakatsubo N, Hirata Y, et al. Direct evidence of nitric oxide production from bovine aortic endothelial cells using new fluorescence indicators : diaminofluoresceins. *FEBS Lett*, 427 : 263-266, 1998.
- ② Kojima H, Hirata Y, et al. Detection and imaging of nitric oxide with novel fluorescent indicators : diamino - fluoresceins. *Anal Chem*, 70 : 2446-2453, 1998.
- ③ Kimura K, Hirata Y, et al. Effects of the beta - adrenoceptor blocker nipradilol on renal microcirculation in a rat model : A comparative study with propranolol. *Curr Ther Res Clin Exp*, 59 : 179-186, 1998.
- ④ Kimura K, Hirata Y, et al. Effects of barnidipine hydrochloride, a calcium channel blocker , on renal microcirculation in rats : A pilot study. *Curr Ther Res Clin Exp*, 59 : 826-834, 1998.
- ⑤ Nakatsubo N, Hirata Y, et al. Improvement of nitric oxide detection method using 2, 3-diaminonaphthalene and its application to evaluation of bovel nitric oxide synthase inhibitors. *Biol Pharm Bull*, 21 : 1247-1250, 1998.
- ⑥ Oba S, Hirata Y, et al. Relevance of periglomerular myofibroblasts in

progression of human glomerulo-nephritis. *Am J Kidney Dis*, 32 : 419-425, 1998.

- ⑦ Matsumoto A, Hirata Y, et al. Increased excretion of nitric oxide in exhaled air of patients with chronic renal failure. *Clin Sci*, 96 : 67-74, 1999.
- ⑧ Matsumoto A, Hirata Y, et al. The effect of nitric oxide on gas exchange in patients with congestive heart failure. *Ann Intern Med*, 130 : 40-44, 1999.
- ⑨ Kakoki M, Hirata Y, et al. Effects of vasodilatory  $\alpha$ -adrenoceptor antagonists on endothelium-derived nitric oxide release in rat kidney. *Hypertension*, 33 : 467-471, 1999.
- ⑩ Hayakawa H, Hirata Y, et al. Role of nitric oxide - cGMP pathway in adrenomedullin-induced vasodilation in rat. *Hypertension*, 33 : 689-693, 1999.

### 2. 学会発表

- ① 松本晃裕, 平田恭信, 他. 本態性高血圧症患者における安静時、運動時の一酸化窒素産生能の検討 : その呼気中排出量と血中代謝産物濃度の測定. 第62回日本循環器学会総会, 1998.
- ② 松本晃裕, 平田恭信, 他. Inhaled nitric oxide increase exercise capacity in patients with congestive heart failure. 第62回日本循環器学会総会, 1998.
- ③ 名越 洋, 平田恭信, 他. トロンボキサ A2 (TXA2) による培養血管平滑筋細胞 (VSMC) における誘導型一酸化窒素合成酵素 (iNOS) 発現抑制. 第62回日本循環器学会総会, 1998.
- ④ Nagata D, Hirata Y, et al. Hypoxia-inducedn adrenomedullin production



in the kidney. First International Symposium on Adrenomedullin and PAMP, 1998.

- ⑤ Kakoki M, Hirata Y, et al. Role of endogenous NO in hypertensive rats with ischemic acute renal failure. 17th International Society of Hypertension, 1998.
- ⑥ Hayakawa H, Hirata Y, et al. Effects of ACE-inhibition on endothelial function in diabetic rat kidney. 17th International Society of Hypertension, 1998.
- ⑦ Hayakawa H, Hirata Y, et al. Involvement of nitric oxide-cGMP pathway in the mechanisms of adrenomedullin-induced vasorelaxation. 52nd Annual Fall Conference and Scientific Sessions of the Council for High Blood Pressure Research, 1998.
- ⑧ Kakoki M, Hirata Y, et al. Effects of vasodilatory beta-blockers on nitric oxide release. 52nd Annual Fall Conference and Scientific Sessions of the Council for High Blood Pressure Research, 1998.
- ⑨ 平田恭信. 本態性高血圧症のモデルとしてのSHRの位置づけ: SHRの血圧調節における腎・体液性因子の役割. 第34回高血圧自然発症ラット学会, 1998.
- ⑩ 平田恭信. 血管作動物質と腎保護作用. 第2回日本心血管内分泌代謝学会, 1998.

G. 知的所有権の取得状況

なし

## アドレノメデュリンの多角的な機能解析と成人病発症との関連

分担研究者 南野直人（国立循環器病センター研究所研究機器管理室 室長）

アドレノメデュリンは、線維芽細胞、単球・マクロファージ系細胞でも産生されることが明らかとなった。線維芽細胞のアドレノメデュリン産生調節は平滑筋細胞と類似していたが、単球・マクロファージ系細胞では炎症性サイトカイン産生と類似し、分化・活性化とも相関していた。アドレノメデュリンはSwiss 3T3線維芽細胞の細胞増殖を促進し、IL-6産生を炎症性サイトカインと相乗的に亢進した。マクロファージ由来のRAW264.7細胞では、LPS刺激で亢進したTNF- $\alpha$ やIL-6産生をAMが最大で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と関連する可能性が示唆された。

### A. 研究目的

アドレノメデュリン(以下AMと省略)は褐色細胞腫より発見された降圧性ペプチドで、強力な血管弛緩作用を示す。AMは循環調節因子として血圧調節など機能し、その産生や情報伝達の異常が成人病発症につながると考えられる。昨年度までの研究により、血管平滑筋細胞(VSMC)や内皮細胞(EC)のみならず、間質系の線維芽細胞がAM遺伝子を活発に発現し、AMを産生、分泌すること、VSMC及びECにおけるAM産生は、炎症性サイトカイン、リポポリサッカライド(LPS)により増加することを示し、敗血症性ショック時の高い血中AM濃度の原因を明らかにしてきた。

この過程でAMと炎症との関連が示唆されたため、本年度の研究では、各種線維芽細胞におけるAM産生調節について詳細に検討し、その細胞増殖などに対する作用を明確にするとともに、炎症に深く関わる単球・マクロファージ系細胞におけるAM産生調節を検討し、さらに線維芽細胞、マクロファージ系細胞における炎症

性サイトカイン産生に対するAMの効果を評価した。これらの成果は、高血圧症、動脈硬化症をはじめとする各種成人病発症機構の解明や診断、治療法開発への基礎となるとともに、本ペプチドの生理的意義を調べる上で大きな情報を提供するものである。

### B. 研究方法

#### 1) 培養線維芽細胞におけるAMの産生調節、AM受容体の性質

マウス胎児由来Swiss 3T3細胞、ヒト皮膚由来Hs68細胞、ヒト肺由来NHLF細胞は、10%ウシ胎児血清含有DMEM培地などで培養し、コンフルエントに達した直後に培地を入れ替え、11種のサイトカイン、ホルモン、血管作動性物質を添加し、14時間に分泌されたAM免疫活性量を特異的ラジオイムノアッセイ法で測定した。受容体の性質は、結合アッセイ、cAMP産生を指標として検討した。

#### 2) 線維芽細胞の増殖に対するAMの効果

Swiss 3T3細胞をコンフルエントに到達後7

日間培養し、完全に静止期とした。これにAMや試薬をヨード標識デオキシウリジンとともに添加し、40時間後に核画分に取込まれた放射活性を測定した。また、モノクローナル抗体を用いてAMのオートクリン作用について検討した。

### 3) 線維芽細胞におけるAMの炎症性サイトカイン産生への効果

Swiss 3T3細胞のインターロイキン6 (IL-6)産生を、IL-6依存性に増殖するMH60.BSF細胞増殖を指標とするバイオアッセイ法にて測定した。また、サイトカイン類とAMの共投与によるIL-6産生の促進作用やその細胞内機構についても検討を行った。

### 4) 単球・マクロファージ系細胞におけるAMの産生と産生調節

マウス腹腔マクロファージ由来RAW264.7細胞、ヒト単球性白血病由来THP-1、HL-60細胞、さらにマウス腹腔マクロファージ、ヒト末梢血単球由来マクロファージにつき検討した。細胞培養は10%ウシ胎児血清含有DMEM培地やRPMI培地などで行い、DMEM培地で洗浄後、種々のサイトカイン、ホルモンやレチノイン酸やフォルボールエステルなどの分化因子を投与、あるいは共投与し、14時間あるいは40時間後の培養上清中のAM免疫活性量をSep-pak C<sub>18</sub>カラムで濃縮後、測定した。細胞の分化度は、MO-1抗原の発現量をフローサイトメトリーで測定し評価した。

### 5) 単球・マクロファージ系細胞におけるサイトカイン産生へのAMの効果

TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$ 濃度はELISA法により測定し、遺伝子発現はリアルタイム定量的PCR法にて測定した。AM産生は無刺激時とLPS刺激時について検討した。

### 6) 単球・マクロファージ系細胞におけるアセチルLDL取り込みへのAMの効果

THP-1細胞をAMの存在、非存在下で40時間LPSやフォルボールエステルで刺激した後、

蛍光標識アセチルLDLの取り込み量をフローサイトメトリーにより測定し、スカベンジャー受容体活性を評価した。

## C. 研究結果

### 1) 培養線維芽細胞におけるAM産生調節と受容体の特異性

NHLF細胞とHs68細胞は、ECを上回る多量のAM産生を分泌し、Swiss 3T3でもその約30分の1でVSMCと同程度の分泌が認められた。これらの線維芽細胞のAM産生を、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、LPSや糖質ステロイドが促進し、TGF- $\beta$ 、IFN- $\gamma$ 、フォルスコリンが抑制した。また、これらの線維芽細胞間でも、トロンビン以外では大きな違いは認められなかった。この結果、線維芽細胞のAM産生調節は、基本的にはVSMCと類似していることがわかった。

3種の線維芽細胞はいずれもAM受容体を発現するものの、Swiss 3T3細胞に発現する受容体は極めてAM特異的であり、結合アッセイにおけるIC<sub>50</sub>値は $6 \times 10^{-10}$ M、cAMP産生アッセイにおけるIC<sub>50</sub>値は $4 \times 10^{-10}$ Mと低い値を示した。CGRPは両アッセイ法でAMの0.1%程度の活性しか示さず、Swiss 3T3細胞がAMの機能を解析する上で有用であることが示された。これに対してヒト線維芽細胞はAM分泌量が多いものの、受容体はCGRPに対する親和性が高く、これらの相違について今後検討が必要である。

### 2) 線維芽細胞の増殖に対するAMの作用

静止期のSwiss 3T3細胞に対してAMは増殖促進的に機能することが確認された。特にインスリン存在下では、10%FCSの75%に相当する強い促進効果が認められた。この増殖促進作用はAM受容体拮抗薬であるAM[22-52]、およびプロテインキナーゼA(PKA)の阻害剤であるH-89により抑制された。Swiss 3T3細胞が分泌するAM様免疫活性物質はクロマト分析により天然のAMと同一であることを確認している

が、実際にこの細胞より分泌されたAM様免疫活性物質がSwiss 3T3細胞の増殖を促進し、AMに対する中和モノクローナル抗体が分泌されたAM様免疫活性物質の増殖促進活性を抑制することを確認した。この結果より、AMはオートクリン因子としてSwiss 3T3細胞の増殖調節に関与していると推定された。

### 3) 線維芽細胞のIL-6産生に対するAMの作用

線維芽細胞のIL-6産生は一般に細胞内cAMP増加因子により刺激を受けるため、AMとcAMPをセカンドメッセンジャーとする他のペプチドを比較した。AMは単独でIL-6産生を5.5倍に増加し、その $IC_{50}$ 値は $5 \times 10^{-10} M$ であった。CGRPとアミリンは弱くIL-6産生を刺激し、 $10^{-7} M$ でそれぞれ基礎値の2.5倍、1.5倍に産生を増加した。しかし、VIP、PACAPはIL-6産生を変化させなかった。AMによるIL-6産生は、細胞増殖と同様にAM受容体拮抗薬およびPKA阻害剤のH-89により抑制された。線維芽細胞のIL-6産生はTNF、IL-1 $\beta$ 、LPSなどの炎症誘導因子によりそれぞれ30倍、3.4倍、2.8倍増加するが、これにAMを共投与するとIL-6産生は相乗的に増加し、特にTNFとの共存下では基礎値の270倍にまで増加した。また、AMによるIL-6産生増強は遺伝子発現レベルで作用しており、時間経過の追跡により刺激後30分から1時間でピークに達する極めて迅速な反応であることが判明した。

### 4) 単球・マクロファージ系細胞におけるAM産生

THP-1細胞、HL-60細胞、RAW264.7細胞はいずれもAMを産生することを確認した。しかし、これらの細胞は小さく、細胞数あたりの基礎分泌量は比較的低い水準であった。THP-1細胞、HL-60細胞は白血病由来の未分化の細胞であるため、分化因子との関連を重点的に検討した。フォルボールエステル(TPA)で両細胞を分化させると、マクロファージの分化マーカーであるMO-1抗原の発現量に相関して、時間依

存的、TPAの濃度依存的にAM産生は亢進した。また、分化因子であるレチノイン酸は両細胞のAM産生を変化させないが、レチノイン酸存在下でLPS、TNF、TPAを作用させると相乗的なAM産生の亢進が認められた。HL-60細胞では、レチノイン酸とIFN- $\gamma$ の共存下でも相乗的な産生の亢進が認められた。

末梢血由来の顆粒球、リンパ球、単球でもAM産生は認められたが、単球を自家血清にて培養しマクロファージに誘導するとAM産生は単球の5倍に増加した。さらに、マクロファージのAM産生はLPS刺激により7倍に増加した。この結果より、血中の単球由来マクロファージも十分にAMを産生する能力を有し、敗血症などにおいてAM分泌細胞となることが確認された。

腹腔マクロファージ由来のRAW264.7細胞でも、TPA、レチノイン酸などの分化誘導因子がAM産生を2倍程度増強した。最も強い刺激因子はLPSで、AM産生を8倍程度増加したが、TNFとIL-1では全く刺激されなかった。また、酸化LDLなどもAM産生を促進することがわかった。一方、ECやVSMCと異なり、IFN- $\gamma$ はAM産生を促進し、糖質ステロイドは産生を抑制した。THP-1細胞などと同様にRAW264.7細胞でも、レチノイン酸とLPS、TPA、IFN- $\gamma$ との共投与によりAM産生は相乗的に増加したが、LPSと糖質ステロイドの共投与では、ステロイドの効果が優勢となりAM産生は抑制された。さらに、LPSとIFN- $\gamma$ は単独ではAM産生を刺激するが、共投与では逆に刺激効果が減少するという現象も観測された。

マウス腹腔マクロファージをLPSで刺激するとAM産生は亢進し、レチノイン酸と共存によりさらにAM産生が亢進するが、IFN- $\gamma$ との共存ではやはり産生が減少した。腹腔マクロファージも基本的にRAW264.7細胞と類似したAM産生調節を受けることが確認された。

#### 5) マクロファージ系細胞におけるAMのサイトカイン産生への影響

RAW264.7細胞において、AMを単独投与するとTNF- $\alpha$ 産生を約60%増加させた。LPSで刺激するとRAW264.7細胞のTNF- $\alpha$ 産生は100~400倍に増加し、これにAMを添加するとLPS量により多少異なるがTNF- $\alpha$ 産生量を最大で50%、TNF- $\alpha$  mRNA量を20~40%抑制することが示された。同時にIL-6、IL-1 $\beta$ の産生についても測定したところ、AMはLPSで刺激した際のIL-6産生量を20%、IL-6 mRNA量を15%抑制するが、IL-1 $\beta$ 産生には全く影響を与えなかった。

#### 6) マクロファージ系細胞におけるAMのアセチルLDL取り込みへの影響

マクロファージ系細胞はスカベンジャー受容体を発現するが、この受容体は動脈硬化や炎症を誘導する酸化LDLやLPSの取り込みや代謝に関連する。THP-1細胞のスカベンジャー受容体活性は、無刺激時にはAMにより変化しなかったが、フォルボールエステルやLPSで分化、刺激すると、AMはアセチルLDLの取り込みを増し、スカベンジャー受容体活性を増加させた。

### D. 考察

AMはヒト褐色細胞腫より単離されたものの、我々の研究により血管系細胞が主要な産生細胞であることが明らかとなった。さらに、血管を取りまく線維芽細胞や血管壁と強く相互作用するマクロファージ系細胞でもAM産生が確認されたため、これらにおけるAMの産生調節や機能に関する研究に着手した。

肺、皮膚、胎児由来と起源が異なる3種の線維芽細胞で活発にAMが産生され、特にヒト線維芽細胞ではこれまでに検討した細胞の中で最も高い分泌量が認められた。また分泌されたAM様免疫活性物質は、生物活性も有することを確認している。この結果、間質系の線維芽細胞も

AMの主要な産生組織と考える必要があり、細胞の普遍性や存在量を考慮すると、線維芽細胞の産生するAMの生理的寄与は大きいと推定される。線維芽細胞のAM産生調節はECやVSMCとほぼ一致し、炎症性サイトカインやLPSの存在する敗血症性ショック時には、多量のAM産生が可能と考えられる。これらの線維芽細胞はいずれもAM受容体を発現するが、特異的受容体を発現するSwiss 3T3細胞では、AMがオートクリン因子としてcAMP、PKA系を介して細胞増殖、IL-6産生を亢進することがわかった。特に、炎症性サイトカインやLPSの存在下でAMは相乗的にIL-6産生を促進し、IL-6産生量を1時間で100倍以上に増加するなど、AMが極めて強力なサイトカイン産生調節因子であることが明らかとなった。また、細胞増殖促進作用も10%胎児血清の75%と、ペプチド性因子としてはかなり高い値を示した。以上の結果より、AMは間質組織の線維芽細胞ではサイトカイン産生や細胞増殖のメディエーターであり、炎症や創傷治癒に関与することが示唆された。

検討した3種の単球・マクロファージ系細胞株はいずれもAMを産生し、これらの細胞のマクロファージへの分化や活性化に伴いAM産生が増加することが明らかとなった。分化誘導因子にサイトカインやLPSを共投与するとAM産生はさらに亢進し、その産生調節は血管系細胞や線維芽細胞と異なり炎症性サイトカインや一酸化窒素合成酵素に近いこともわかった。また、末梢血由来の顆粒球、リンパ球、単球、単球由来マクロファージ、腹腔マクロファージでもAMが産生され、いずれのマクロファージにおいてもLPS刺激でAM産生が強く亢進することは、生体内で敗血症性ショック時や炎症部位周辺でマクロファージよりAMが産生され機能することを示している。また、分泌されたAMはオートクリン因子として作用する可能性があり、LPS刺激したRAW264.7細胞のTNF- $\alpha$ 産

生をAMは最大で50%、IL-6産生を20%抑制すること、マクロファージ化したTHP-1細胞のアセチルLDL取り込みを抑制することなどが明らかとなった。AMがVSMCの増殖、遊走を抑制することを考慮すると、血管壁でマクロファージ系細胞よりAMが産生されると、動脈硬化抑制、炎症抑制につながると考えられる。

単球・マクロファージ系細胞のAM産生は細胞数あたりでは低いものの、分化刺激と他の刺激が重なると大きく増加し、細胞の集合により局所では高濃度のAMが存在することも可能と推定される。また、そのAM産生調節は血管系細胞とは異なり炎症性サイトカインや一酸化窒素合成酵素に近く、炎症性サイトカイン産生に対して抑制的に作用し、ペプチド性因子として新しい機能を有することが確認された。

#### E. 結論

AMは血管壁細胞、副腎、心臓、肺などで産生され、血管拡張因子として機能すると考えられてきた。本年度の研究により、AMが線維芽細胞でも由来組織や動物種によらず活発に産生され、血管壁細胞と類似した産生調節を受けるとともに、炎症時のサイトカイン産生や細胞増殖の調節因子として機能していることが示された。マクロファージ系細胞も細胞株のみならず末梢血や腹腔由来のマクロファージでAMが産生され、サイトカインや一酸化窒素合成酵素に近い産生調節を受けることが明らかとなった。また、AMはマクロファージ系細胞のTNF- $\alpha$ やIL-6の産生を抑制、スカベンジャー受容体を増加し、動脈硬化や炎症に対して抑制的に機能していると考えられた。線維芽細胞やマクロファージをはじめとする広範な細胞におけるAM産生と機能は、AMが収縮弛緩調節だけでなく動脈硬化症の発症にも関わるとともに、炎症反応における普遍的かつ重要な機能を有することを示唆するものである。特に血管系では、血管

壁細胞やその外側の線維芽細胞、内側のマクロファージなど全ての細胞からAM産生が確認され、AMはオートクリン、パラクリン因子として、血管機能を調整する上で重要な位置を占め、その異常は血管疾患をはじめ広範な成人病発症と関連する可能性が推定された。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- ① Y. Isumi, N. Minamino, A. Kubo, N. Nishimoto, K. Yoshizaki, M. Yoshioka, K. Kangawa, H. Matsuo. Adrenomedullin stimulates interleukin-6 production in Swiss 3T3 cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 244 : 325-331, 1998.
- ② Y. Isumi, N. Minamino, T. Katafuchi, M. Yoshioka, T. Tsuji, K. Kangawa, H. Matsuo. Adrenomedullin production in fibroblasts: Its possible function as a growth regulator of Swiss 3T3 cells. *Endocrinology*, 139 : 2552-2563, 1998.
- ③ A. Kubo, N. Minamino, Y. Isumi, K. Kangawa, K. Dohi, H. Matsuo. Adrenomedullin production is correlated with differentiation in human leukemia cell lines and peripheral blood monocytes. *FEBS Lett*, 426 : 233-237, 1998.
- ④ A. Kubo, N. Minamino, Y. Isumi, T. Katafuchi, K. Kangawa, H. Matsuo. Production of adrenomedullin in macrophage cell line and peritoneal macrophage. *J Biol Chem*, 273 : 16730-16738, 1998.
- ⑤ A. Kubo, H. Kurioka, N. Minamino, Y. Nishitani, H. Sato, T. Nishino, M. Iwano, H. Shiiki, K. Kangawa, H. Matsuo, K. Dohi. Plasma and urinary

levels of adrenomedullin in patients of chronic glomerulonephritis with proteinuria. *Nephron*, 80 : 227-230, 1998.

- ⑥ N. Shinoki, T. Kawasaki, N. Minamino, K. Okahara, A. Ogawa, H. Ariyoshi, M. Sakon, J. Kambayashi, K. Kangawa, M. Monden. Shear stress down-regulates gene transcription and production of adrenomedullin in human aortic endothelial cells. *J Cell Biochem*, 71 : 109-115, 1998.
- ⑦ K. Kikumoto, A. Kubo, Y. Hayashi, N. Minamino, S. Inoue, K. Dohi, K. Kitamura, K. Kangawa, H. Matsuo, H. Furuya. Increased plasma concentration of adrenomedullin in patients with subarachnoid hemorrhage. *Anesth Analg*, 87 : 859-863, 1998.

## 2. 学会発表

- ① A. Kubo, N. Minamino, Y. Isumi, T. Katafuchi, K. Kangawa, H. Matsuo. Production of adrenomedullin in monocytes /macrophages. 第80回アメリカ内分泌学会, 1998.
- ② 南野直人. アドレノメデュリンの血管壁および周辺細胞における産生とリモデリングにおける役割. 第27回日本心脈管作動物質学会, 1998.
- ③ 南野直人. アドレノメデュリン(AM)の多様な機能の解明に向けて. 第71回日本生化学会大会, 1998.
- ④ 井角能隆, 久保篤史, 南野直人, 片渕 剛, 寒川賢治, 松尾壽之. Swiss 3T3細胞におけるアドレノメデュリンのIL-6産生促進作用. 第2回日本心血管内分泌代謝学会, 1998.

G. 知的所有権の取得状況  
なし

## 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

分担研究者 中里 雅光（宮崎医科大学第三内科 講師）

uroguanylinは、グアニレートシクラーゼ結合C型受容体（GC-C）に対する内在性リガンドとして、哺乳類の腸管と尿から最近、単離されたペプチドである。胃でのguanylinとuroguanylinの細胞局在、遺伝子発現ならびにGC-Cの分布について検討し、uroguanylinが胃酸分泌調節に作用していることを明らかにした。各種腎疾患とuroguanylinの関連を解析し、uroguanylinが腎臓におけるナトリウム代謝と関連し、ネフローゼ症候群では体液量調節に何らかの役割を果たしていると考えられた。またuroguanylinは、心不全患者の心機能を評価するマーカーの1つであることを提示し、さらに心不全時に心臓からuroguanylinが分泌される可能性を示した。

### A. 研究目的

uroguanylinとguanylinは、グアニレート（GC）結合C型受容体（GC-C）に結合し、cyclic GMP産生を促進して、腎臓と消化管での水・Naの吸収抑制とCl<sup>-</sup>分泌を齎らす。両ペプチドuroguanylinとguanylinは50%のアミノ酸相同性を示し、その構造や情報伝達機構ならびに生理作用の共通性から1つのペプチドファミリーを形成している。これまでに我々は、ヒトとラットのuroguanylinとguanylinの構造解析、定量法、組織含量、体内分布、cDNAと遺伝子の塩基配列解析、構造機能相関について報告してきた。今回、下記の3点について解析を進めた。1) uroguanylinとguanylinの組織分布や細胞局在には差があり、異なる生理的役割を有する可能性がある。特にuroguanylinは酸性条件下において小腸粘膜からのHCO<sub>3</sub><sup>-</sup>分泌をより強く刺激することが明らかにされている。我々は生体内で最も酸性度の高い臓器である胃でのguanylin peptide familyの病態生理学的意義を解明するために、guanylinとuroguanylinの

細胞局在、遺伝子発現ならびにGC-Cの分布について検討した。

2) ネフローゼ症候群では、低アルブミン血症に伴う血漿浸透圧の低下とともに腎臓における水・ナトリウム代謝異常があり、浮腫が発症する。本症における浮腫の発症機序を明かにするために、ナトリウム摂取量と尿中uroguanylin排泄量ならびに尿中uroguanylin排泄量と電解質およびcyclic GMP排泄量を定量し、ナトリウム負荷とuroguanylinの関係を検討した。さらにネフローゼ症候群を含む慢性糸球体腎炎患者において血漿、尿中uroguanylin濃度を測定し、臨床データとの関係を検討し、病態との関わりについて解析した。

3) 心不全におけるuroguanylinの病態生理学的意義を検討し、心不全時における心臓からのuroguanylinの分泌を検討した。

### B. 研究方法

1) ラット胃粘膜をelutriation法により7分画（F1～F7）に分離した。各細胞分画の塗抹標本を



作成し、uroguanylin含有細胞を免疫組織化学的に同定した。各細胞分画よりRNAを抽出し、guanylin, uroguanylinおよびGC-Cの遺伝子発現をnorthern blottingとRT-PCRにより検討した。高ガストリン血症とenterochromaffin-like cell (ECL細胞)の過形成をきたすZollinger-Ellison症候群患者で、治療前後の血漿uroguanylin濃度を定量した。

2) 高塩食群(10 g/day, n=12)と低塩食群(7 g/day, n=16)の正常者について、尿中uroguanylin排泄量を定量した。健常群、慢性糸球体腎炎群、保存期腎不全群、血液透析群で血漿uroguanylin濃度を比較した。血漿uroguanylin濃度をネフローゼ症候群で非ネフローゼ症候群で比較し、さらにネフローゼ症候群の寛解期での血漿uroguanylin濃度を解析した。

3) 152例の心不全患者の血漿uroguanylin濃度を定量し、5例については心カテを行ない、前室間静脈、冠静脈洞、大動脈より採血し、uroguanylin濃度を比較した。

### C. 研究結果

1) uroguanylinは免疫組織化学的にヒスタミンと共存し、ソマトスタチンとの共存を認めなかったことから、ラット胃でのuroguanylin含有細胞はenterochromaffin-like (ECL)細胞であることが明らかになった。uroguanylin遺伝子は胃粘膜小型細胞分画(F1~F3)に強く発現し、壁細胞を主体とする大型細胞分画(F6, F7)には認められなかった。これはRIAによる免疫活性の分布とよく一致していた。guanylin免疫活性は免疫染色およびRIAでは検出できなかったが、RT-PCRにより胃粘膜細胞F1~F5にguanylin遺伝子発現を認めた。GC-C遺伝子は全細胞分画で発現していた。Zollinger-Ellison症候群4例のウログアニリン血漿濃度は平均65.3 fmol/mlで、正常者の5.2 fmol/mlに比べ有意に高く、プロトンポンプ阻害剤投与により

8.9 fmol/mlに低下した。

2) 慢性糸球体腎炎患者において、入院時の血漿uroguanylin濃度は血清蛋白、アルブミンと有意な負の相関関係を示した。血漿uroguanylin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く、同時に血圧、心胸比も高値を示した。また、ネフローゼ症候群では寛解期には血圧、心胸比の低下と共に血漿uroguanylin濃度の有意な低下を認めた。この血漿uroguanylin濃度の低下度はvolume retention (入院時の体重と寛解期の体重の差)と有意な相関を認めた。尿中uroguanylin排泄量はネフローゼ患者では非ネフローゼ患者より少なかった。高塩食群(10 g/day, n=12)では低塩食群(7 g/day, n=16)に比べて、尿中uroguanylin排泄量は有意に増加していた(137.8 ± 14.4 pmol/day vs. 95.1 ± 16.3 pmol/day, P<0.05)。尿中uroguanylin排泄量はNa<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>, cGMP排泄量と有意な正の相関関係を示した。RT-PCR法により、ヒト腎髄質にGC-Cの発現を認めた。血漿uroguanylin濃度は血清クレアチニン濃度と正の相関を示し、健常群と比較し、慢性糸球体腎炎群、保存期腎不全群、血液透析群では有意に高値であった。

3) NYHA分類による心不全の重症度とuroguanylinの血漿濃度との相関を検討した。各群のuroguanylin血漿濃度(平均±標準偏差)は、NYHA I (5.2 ± 0.4 fmol/ml), NYHA II (6.5 ± 0.6), NYHA III (7.3 ± 0.6), NYHA IV (17.8 ± 4.4)であった。正常群と比較するとNYHA III (P<0.05)とNYHA IV (P<0.01)は、有意に高かった。また心不全の重症度のパラメータである血漿BNP濃度とuroguanylin濃度は、r=0.47, p<0.0016で有意な相関を示したが、血漿ANP濃度とは相関を認めなかった。心不全患者では、前室間静脈と大動脈および冠静脈洞と大動脈の間でuroguanylin血漿濃度の増加を認め、心不全では心臓からuroguanylinが分泌

されることが明らかとなった。

#### D. 考察

胃における guanylin, uroguanylin および GC-C の存在は、これらの peptide が autocrine もしくは paracrine として水・電解質代謝調節に関与することを示唆している。今後、さらに胃酸分泌機構との関連を解明し、guanylin peptide family の新たな作用について検討する必要がある。

uroguanylin のレセプターが腎臓に存在していることを確認した。高塩食時には低塩食時より尿中 uroguanylin 排泄量が多いこと、尿中 uroguanylin 排泄量はナトリウム、cGMP 排泄量と有意に相関することより、腎臓におけるナトリウム排泄の調節に関係しているものと考えられた。ネフローゼ症候群において血圧、心胸比とともに血漿 uroguanylin 濃度は増加していた。また、その増加率は volume retention と相関していたことより uroguanylin が腎臓におけるナトリウム代謝と関連し、ネフローゼ症候群の volume 調節に何らかの役割を果たしていると考えられた。uroguanylin は、心不全患者の心機能を評価するマーカーの 1 つである。BNP と uroguanylin との解離する症例も存在するため、詳細な解析を行い考察する。

#### E. 結論

guanylin family は、ナトリウム利尿ホルモンと共に GC リガンドファミリーに属し、水・電解質代謝調節維持に作用する生理活性ペプチドである。特に uroguanylin は、腸管-腎臓連関を結びつける内分泌性因子である可能性がある。また本研究によりウログアニリンは胃酸分泌を生理的に調節している可能性が示された。さらに uroguanylin は心不全時には体液負荷を減少させるために心臓から分泌されることも示唆された。高齢者では消化管や腎臓における水・電

解質の吸収、排泄能の低下があり、容易に水・電解質の異常をきたすことが知られている。guanylin family はこれらの器官で水・電解質のホメオスタシスに積極的に関与している。今後の高齢者における水・電解質代謝異常における guanylin family の病態生理学的意義の解析が期待される。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- ① Nakazato M, Kangawa K, et al. Tissue distribution, cellular source and structural analysis of rat immunoreactive uroguanylin. *Endocrinology*, 139 : 5247-5254, 1998.
- ② Kinoshita H, Nakazato M, et al. Plasma and urine levels of uroguanylin, a new natriuretic peptide, in nephrotic syndrome. *Nephron*, 81 : 160-164, 1998.
- ③ Chino N, Nakazato M, Kangawa K, et al. Topological isomers of human uroguanylin: Interconversion between biologically active and inactive isomers. *FEBS Lett*, 421 : 27-31, 1998.
- ④ Date Y, Nakazato M, Kangawa K, et al. Enterochromaffin-like cell, a cellular source of uroguanylin in rat stomach. *Endocrinology* (in press).
- ⑤ 平塚雄聡, 中里雅光. デフェンシン: KEY WORD 呼吸器疾患, 先端医学社
- ⑥ 中里雅光. 水・NaCl 代謝調節に作用する新しい消化管ペプチドグアニリンファミリー消化管ホルモン. (印刷中)
- ⑦ 中里雅光, 松倉 茂. 水・NaCl 代謝調節に作用する新しい消化管ペプチドグアニリンファミリー. *日本内科学会雑誌*, 87 : 741-746, 1998.

⑧ 伊達 紫, 中里雅光, 松尾壽之. 新しい生理活性ペプチドファミリー - guanylin / uroguanylin - 構造、機能、発現調節と病態生理学的意義 -. 日本臨床, 224 : 2427-2432, 1998.

## 2. 学会発表

① 山口秀樹, 中里雅光. 水・電解質代謝調節ペプチドウログアニリンの消化管と腎でのイオントランスポートに関する研究. 第95回日本内科学会講演会, 1998.

② 中里雅光, 寒川賢治, 松尾壽之, 松倉 茂. 腸管性ナトリウム利尿ペプチドとしてのウログアニリンの生理作用に関する研究. 第12回 ANP 研究会, 1998.

③ 伊達 紫, 中里雅光, 寒川賢治, 松尾壽之, 松倉 茂. 消化管内分泌および管腔分泌系におけるラット uroguanylin の細胞局所と病態生理学的意義. 第12回 ANP 研究会, 1998.

④ 中里雅光, 寒川賢治, 松尾壽之, 松倉 茂. ヒト uroguanylin のトポロジー異性体の立体構造解析と病態生理学下での血漿濃度の変動. 第71回日本内分泌学会学術総会, 1998.

⑤ 山口秀樹, 中里雅光, 寒川賢治, 松尾壽之, 他. 腸管性ナトリウム利尿ペプチドとしてのウログアニリンの生理作用に関する研究. 第71回日本内分泌学会学術総会, 1998.

⑥ 伊達 紫, 中里雅光, 寒川賢治, 松尾壽之, 松倉 茂. 消化管内分泌および管腔分泌系におけるラット uroguanylin の細胞局所と病態生理学的意義. 第71回日本内分泌学会学術総会, 1998.

⑦ Nakazato M. Uroguanylin acts as a natriuretic factor via cuanylyl cycase C. FASEB Annual Meeting, 1998.

⑧ 中里雅光, 松倉 茂. NaCl代謝に作用する新たな消化管ペプチド uroguanylin の細胞生理と分子生物学的研究. 第5回消化管分子

機構研究会, 1998.

⑨ 山口秀樹, 中里雅光, 寒川賢治, 松尾壽之, 他. 心不全患者における血中 uroguanylin の分泌動態の検討, Increased plasma uroguanylin levels in patients with heart failure. 第2回日本心血管内分泌代謝学会, 1998.

⑩ 内山真由美, 中里雅光. 心疾患患者における血漿中心不全マーカーの比較. 第2回日本心血管内分泌代謝学会, 1998.

## G. 知的所有権の取得状況

なし

## 心臓リモデリングにおけるアンジオテンシンⅡの役割

分担研究者 小室 一成（東京大学大学院医学系研究科循環器内科 講師）

心筋梗塞後左室リモデリングにおけるアンジオテンシンⅡの役割を知る目的で、アンジオテンシン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アンジオテンシンⅡが必須であることが明らかとなった。

### A. 研究目的

心筋梗塞により血液の供給が途絶えると、その部分は壊死に陥り、線維組織によりおきかえられる。一方対側の心筋は、代償的に肥大を示し、収縮機能も亢進する。線維化は心臓の破裂を防ぎ、収縮の足場を強くするために重要であり、また肥大も壁ストレスを減少させるための一種の適応現象である。従ってこのような梗塞後の変化は、個体にとって重要な変化であるが、多くの場合徐々に心機能が低下し、心拡大が生ずる。心臓の内径が拡大すると壁ストレスが上昇するので、悪循環に陥り、心臓の機能は益々低下する。この心筋梗塞後におこる一連の心臓の形態の変化を、心筋梗塞後の“左室リモデリング”と呼んでおり、梗塞後の予後を決定する上で重要である。適応現象として生じた左室リモデリングがどのような機序で悪循環に陥るかは、循環器領域における大きな問題であるが、この左室リモデリングに心筋局所に存在するレニン-アンジオテンシン系が重要な役割をもっ

ていることが、動物実験ばかりでなく臨床的にも報告されている。しかし、それらの報告は主にアンジオテンシン変換酵素阻害剤（ACEI）が左室リモデリングの抑制に有効であるというものであり、本当にレニン-アンジオテンシン系の最終産物であるアンジオテンシンⅡ（AⅡ）が重要であるのか、それともブラジキニンの増加によるのか不明である。そこで、我々はAⅡの1a型受容体（AT1a）を欠失したノックアウトマウスを用いて、心筋梗塞後の左室リモデリングにおけるAⅡの役割について解析した。

### B. 研究方法

AT1a遺伝子のコーディングエクソンをLacZと入れ替えたノックアウトマウス（KOマウス）及び対象として野性型マウス（WTマウス）の前下行枝冠動脈を結紮し、心筋梗塞を作成した。通常、梗塞巣が40%以上より大きい場合に、左室リモデリングがおこるとされていることから、前下行枝の近位部を結紮した。梗塞作成後