

遺伝子の発現には、上流-140bp付近にある3カ所のGCボックスが必須であることを明らかにした。これらのGCボックスにはSp1及びSp3が結合しSR-BI遺伝子の発現を促進する事を明らかにした。本研究により、コレステロール輸送に関連するSR-BI遺伝子の転写調節は、他のステロイド合成遺伝子群とは異なりSp1ファミリーが重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

F. 研究発表

2. 学会発表

- ① 水谷哲也, 峯岸 敬, 宮本 薫, Scavenger Receptor Class B Type 1 (SR-B1) 遺伝子の転写活性化領域の同定. 第72回日本内分泌学会学術総会. 1999, 5, 横浜. 日本内分泌学会雑誌. 75 (1), 98, 1999, 4.
- ② 水谷哲也, 宮本 薫. *StAR* (Steroidogenic Acute Regulatory protein) 及び *SR-BI* (Scavenger receptor class B type I) の発現調節. 第15回北陸内分泌・代謝懇話会福井例会. 1999, 6. 福井.
- ③ 宮本 薫. 高密度リポ蛋白質受容体SR-BI (Scavenger receptor class B type I) の発現調節. 第3回分子血管リモデリング研究会. 1999, 8, 御殿場.

G. 知的所有権の取得状況

なし

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

アドレノメデュリンのヒト血管内皮細胞におけるアポトーシスの抑制作用

分担研究者 平田 恭信（東京大学医学部循環器内科 講師）

アドレノメデュリンは血管壁から分泌されて血管緊張の調節ばかりでなく細胞増殖や分化の調節にも関与していると考えられている。我々はアドレノメデュリンの内皮細胞のアポトーシスに及ぼす影響を検討した。ヒト臍帯静脈の内皮細胞は血清除去培地で培養するとアポトーシスを生ずる。アドレノメデュリンを投与すると用量依存的に核濃縮及び細胞死を減少させた。しかしアドレノメデュリンはBcl-2を変化させなかった。cAMPアナログや細胞内cAMP増加作用を有する物質には抗アポトーシス作用は見られなかった。一酸化窒素(NO)合成阻害薬であるL-NAMEの存在下ではアドレノメデュリンのこの作用は抑制された。1~10 μ MのNO供与体であるニトロプルシッドソーダは抗アポトーシス作用を示した。このニトロプルシッドソーダの作用は可溶性グアニリルシクラーゼの阻害で変化せず、また8-br-cGMPにも抗アポトーシス作用は認められなかった。これらのことからアドレノメデュリンおよびNOは内皮細胞のアポトーシスをcGMP非依存性に抑制すると考えられる。これらの現象が生体内でも認められればアドレノメデュリンは循環調節作用以外の機序によっても抗老化作用を発揮すると考えられる。

A. 研究目的

アドレノメデュリンは強力な血管拡張ペプチドとして発見された^[1]。我々はこの作用はcAMPを介するばかりでなく、血管内皮細胞由来のNOを介することを明らかにした^[2,3]。NOは単に血管拡張作用を有するばかりでなく、血小板の凝集を抑制し、また白血球の内皮細胞への接着を阻害するなど抗動脈硬化作用を有する。このことはアドレノメデュリンも同様の抗動脈硬化作用を発揮し得ることを示唆する。事実、アドレノメデュリンは種々の細胞で産生され血管平滑筋細胞やメザンギウム細胞などでは増殖、分化あるいは遊走を調節することが示された。従ってアドレノメデュリンはオートクリン・パラクリン機構により細胞や組織のリモデ

リングに関与している可能性がある。

アドレノメデュリンは高血圧、心不全や腎不全などで血中濃度が増加し^[4]、敗血症性ショックでは著しく増加する^[5]。これらの臨床所見はアドレノメデュリンの病態生理的役割について2つの相反する仮説を導くと考えられる。一つにはアドレノメデュリンは疾病の成因に関与する可能性があることである。血管壁からのアドレノメデュリンの産生はTNF- α , IL-1 β あるいはリポポリサッカライドによって著明に増加する^[6]。従って、アドレノメデュリンは炎症反応を促進し、敗血症では血圧低下に寄与するかもしれない。一方、アドレノメデュリンによる血管拡張は障害組織への血流を増加させる。またこの作用は高血圧や心不全でも有益と考えら

れ、アドレノメデュリンは病的刺激に対して自己防衛的に作用するのかもしれない。近年、細胞の増殖・分化あるいは動脈硬化・老化に細胞死、特にアポトーシスの関与が示されている。またNOはアポトーシスは発生に重要な役割を果たしていることについても多くの報告がある。これらのことから本研究ではアドレノメデュリンが血管細胞においてアポトーシスへ何らかの影響を及ぼしているかどうかを調べた。

B. 研究方法

ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) を2%のFBSを含むEGM-2培地で培養した。アポトーシスは血清除去EBM培地でアドレノメデュリンの存在下、非存在下で24~36時間培養して誘発した。細胞の形態的变化はHoechst 33258で染色し、位相差蛍光顕微鏡で観察した。また同様の無血清培地で48時間培養した際の細胞死の割合をMTSアッセイで調べ、アドレノメデュリン投与の影響を検討した。アポトーシス関連蛋白であるBcl-2、Bcl-xやBaxはWestern blot法にて測定した。HUVEC培養上清中のNO濃度はNOの蛍光標識物質であるdiaminofluoresceins (DAF)を用いて測定した⁷⁾。同様に培養上清中のアドレノメデュリン濃度はimmunoradiometric assayにより測定した。

(倫理面への配慮)

本研究はヒトを対象とした研究は行っていない。また、実験動物を用いた研究では、実験動物飼養及び保管に関する基準、当施設における実験動物委員会の指針に基づき、実験動物愛護を配慮して行った。

C. 研究結果

無血清培地中のHUVECは細胞が萎縮し核が濃縮し、アポトーシスに特徴的な形態を示した。細胞死はアドレノメデュリンの投与により 10^{-6} M

以上で有意に抑制された。このHUVECのアドレノメデュリン分泌速度は $2.9 \pm 0.3 \text{fmol/ml/24hrs}$ であったが、 20ng/ml の $1L-1\beta$ により113倍にも増加した。

VEGFやbFGFの内皮細胞における抗アポトーシス作用はBcl-2ファミリー蛋白の変化を伴うことが知られている。事実、この無血清処理HUVECにおいて 50ng/ml のVEGFはBcl-2の発現を著明に増加させた。しかしアドレノメデュリンはアポトーシス蛋白であるBcl-xやBcl-2を変化させなかった。アドレノメデュリンは内皮細胞内のAMPを増加させる。DbcAMP、8-Br-cAMPあるいはforskolinはいずれも無血清によるHUVECのアポトーシスを抑制しなかった。

一方、我々はアドレノメデュリンにNO遊離作用があることを繰り返し報告してきた。そこでNO合成阻害薬であるL-NAMEの存在下でアドレノメデュリンの作用を調べるとアドレノメデュリンの抗アポトーシス作用は消失した。さらに $10 \mu\text{M}$ のニトロプルシッドソーダにも同様の抗アポトーシス作用を認めた。 $0.1 \mu\text{M}$ のアドレノメデュリン投与時の培養上清中のDAF蛍光濃度は対照の 28.8 ± 1.4 から 33.1 ± 0.7 ($p < 0.05$)と増加し、 $10 \mu\text{M}$ のニトロプルシッドソーダでは 40.5 ± 1.0 ($p < 0.01$)にまで増えた。NOのアポトーシスへの影響には多くの研究があるものの異論が多い。そこで広範囲の濃度のニトロプルシッドソーダを投与すると $1 - 10 \mu\text{M}$ のニトロプルシッドソーダは抗アポトーシス作用を示したが、それ以上の濃度のニトロプルシッドソーダは用量依存性に細胞死を増加させた。従来より低濃度NOはcGMPを、高濃度のNOはperoxynitriteを介して作用すると考えられているので、8-Br-cGMP、グアニリルシクラーゼの阻害薬であるODQあるいはperoxynitriteのスカベンジャーであるSODを投与してニトロプルシッドソーダの効果を調べ

た。その結果、ニトロプルシッドソーダの抗アポトーシス作用は変化しなかった。

D. 考察

本研究ではアドレノメデュリンはVEGF^[9]よりは弱いものの、内皮細胞のアポトーシスを抑制する作用を認めた。この機序としてアドレノメデュリンによって遊離されたNOがcGMPに依存せずに作用したと考えられた。アドレノメデュリンのもう一つのセカンドメッセンジャーであるcAMPには抗アポトーシス作用は見られず、これはKatoら^[9]の報告を支持する。近年NOがcaspaseのS-ニトロシル化によってcaspaseを不活化することが示されている^[10,11]。Caspaseは細胞内システインプロテアーゼでその活性化はアポトーシスに必須である。アドレノメデュリンはNOを遊離することによって直接的にcaspaseに作用した可能性が考えられる。

一方、NOは心筋細胞、血管平滑筋細胞あるいは内皮細胞においてむしろアポトーシスを促進するとの報告もある^[12]。我々が本研究で示したようにNOはその濃度によりアポトーシスに関して二相性の作用を発揮すると考えられる。特に高濃度のNOは活性酵素と反応してperoxynitriteを産生し、細胞毒性に働くと考えられる。本研究の限界としてはKatoら^[9]の報告によればアドレノメデュリンは 10^{-6} Mで既に抗アポトーシス作用を発揮していること、培養上清中のアドレノメデュリン濃度が 10^{-7} Mよりはるかに低いことがあろう。しかしこれは種あるいは細胞特異的な現象である可能性があり、またIL-1 β によりアドレノメデュリン濃度が著増したこと、アドレノメデュリンの局所濃度はさらに高いことなどが推測され、実際にin vivoでも生じうる現象と考えられる。

E. 結論

アドレノメデュリンが細胞の生存因子として

作用している可能性を示した。様々な病的状態ではアドレノメデュリンの分泌増加により、障害因子に対して組織保護的に働く可能性がある。したがってアドレノメデュリンはその循環調節作用以外の機序によっても血管の動脈硬化あるいは老化に抑制的に作用している可能性が考えられる。

引用文献

1. Kitamura K, Kangawa K, Kawamoto M, Ichiki Y, Nakamura S, Matsuo H and Eto T. Adrenomedullin: a novel hypotensive peptide isolated from human pheochromocytoma. *Biochem Biophys Res Commun.* 192: 553 - 560, 1993.
2. Hirata Y, Hayakawa H, Suzuki Y, Suzuki E, Ikenouchi H, Kohmoto O, Kimura K, Kitamura K, Eto T, Kangawa K, Matsuo H and Omata M. Mechanisms of adrenomedullin - induced vasodilation in the rat kidney. *Hypertension.* 25: 790 - 795, 1995.
3. Hayakawa H, Hirata Y, Kakoki M, Suzuki Y, Nishimatsu H, Nagata D, Suzuki E, Kikuchi K, Nagano T, Kangawa K, Matsuo H, Sugimoto T and Omata M. Role of nitric oxide - cGMP pathway in adrenomedullin - induced vasodilation in rat. *Hypertension.* 33: 689 - 693, 1999.
4. Ishimitsu T, Nishikimi T, Saito Y, Kitamura K, Eto T, Kangawa K, Matsuo H, Omae T and Matsuoka H. Plasma levels of adrenomedullin, a newly identified hypotensive peptide, in patients with hypertension and renal failure. *J Clin Invest.* 94: 2158

- 2161, 1994.
5. Nishio K, Akai Y, Murao Y, Doi N, Ueda S, Tabuse H, Miyamoto S, Dohi K, Minamino N, Shoji H, Kitamura K, Kangawa K and Matsuo H. Increased plasma concentrations of adrenomedullin correlate with relaxation of vascular tone in patients with septic shock. *Crit Care Med.* 25 : 953 – 957, 1997.
 6. Sugo S, Minamino N, Shoji H, Kangawa K, Kitamura K, Eto T and Matsuo H. 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.
 7. Nakatsubo N, Kojima H, Kikuchi K, Hirata Y, Maeda D, Imai Y, Irimura T and Nagano T. Direct evidence of nitric oxide production from bovine aortic endothelial cells using new fluorescence indicators: diaminofluoresceins. *FEBS Lett.* 427 : 263 – 266, 1998.
 8. Kato H, Shichiri M, Marumo F and Hirata Y. Adrenomedullin as an autocrine/paracrine apoptosis survival factor for rat endothelial cells. *Endocrinology.* 138 : 2615 – 2620, 1997.
 9. Gerber H – P, Dixit V and Ferrara N. Vascular endothelial growth factor induces expression of the antiapoptotic proteins Bcl – 2 and A1 in vascular endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 273 : 13313 – 13316, 1998.
 10. Reed JC. Double identity for proteins of the Bcl – 2 family. *Nature.* 387 : 773 – 776, 1997.
 11. Mannick JB, Hausladen A, Liu L, Hess DT, Zeng M, Miao QX, Kane LS, Gow AJ and Stamler JS. Fas – induced caspase denitrosylation. *Science.* 284 : 651 – 654, 1999.
 12. Suenobu N, Shichiri M, Iwashina M, Marumo F and Hirata Y. Natriuretic peptides and nitric oxide induce endothelial apoptosis via a cGMP – dependent mechanism. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 19:140 – 146, 1999.
- F. 研究発表
1. 論文発表
 - 1) Matsumoto A, Momomura S, Sugiura S, Fujita H, Aoyagi T, Sata M, Omata M, Hirata Y : The effect of nitric oxide on gas exchange in patients with congestive heart failure. *Ann Intern Med* 130 : 40 – 44, 1999
 - 2) Kakoki M, Hirata Y, Hayakawa H, Nishimatsu H, Suzuki Y, Nagata D, Suzuki E, Kikuchi K, Nagano T, Omata M: Effects of vasodilatory α – adrenoceptor antagonists on endothelium – derived nitric oxide release in rat kidney. *Hypertension* 33 : 467 – 471, 1999.
 - 3) Hayakawa H, Hirata Y, Kakoki M, Suzuki Y, Nishimatsu H, Nagata D, Suzuki E, Kikuchi K, Nagano T, Kangawa K, Matsuo H, Sugimoto T, Omata M : Role of nitric oxide – cGMP pathway in adrenomedullin – induced vasodilation in rat. *Hypertension* 33: 689 – 693, 1999.
 - 4) Kimura K, Suzuki N, Mise N, Oba S, Miyashita K, Kamiyo A, Tojo A, Hirata Y, Goto A, Omata M: Vasodilating effects of celiprolol, a beta – adrenoceptor

- blocker, on renal microcirculation in rats. *Curr Therap Res Clin Exp* 60 : 31 – 36,1999.
- 5) Matsumoto A, Hirata Y, Kakoki M, Nagata D, Momomura S, Sugimoto T, Tagawa H, Omata M : Increased excretion of nitric oxide in exhaled air of patients with chronic renal failure. *Clin Sci* 96 : 67 – 74,1999.
 - 6) Kakoki M, Hirata Y, Hayakawa H, Tojo A, Nagata D, Suzuki E, Kimura K, Goto A, Kikuchi K, Nagano T, Omata M: Effects of hypertension, diabetes mellitus and hypercholesterolemia on endothelin type B receptor – mediated nitric oxide release from rat kidney. *Circulation* 99 : 1242 – 1248, 1999.
 - 7) Nagata D, Hirata Y, Suzuki E, Kakoki M, Hayakawa H, Goto A, Ishimitsu I, Minamino N, Ono Y, Kangawa K, Matsuo H, Omata M: Hypoxia – induced adrenomedullin production in the kidney. *Kidney Int* 55 : 1259 – 1267, 1999.
 - 8) Nagata D, Kakoki M, Hayakawa H, Goto A, Omata M, Hirata Y : Molecular mechanisms of endothelin – 1 – induced cell cycle progression : Involvement of extracellular signal – regulated kinase , protein kinase C and phosphatidylinositol 3 – kinase at distinct points. *Circ Res* 84 : 611 – 619, 1999.
 - 9) Matsumoto A, Itoh H, Yokoyama I, Aoyagi T, Sugiura S, Hirata Y, Kato M, Momomura S : Kinetics of oxygen uptake at onset of exercise relates to that of cardiac output, but not of arterio – venous oxygen difference in patients with chronic heart failure. *Am J Cardiol* 83 (A8) : 1573 – 1576, 1999.
 - 10) Aoyagi T, Yonekura K, Etoh Y, Matsumoto A, Yokoyama I, Sugiura S, Momomura S, Hirata Y, Baker DL, Perlasamy M : The sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} – ATPase (SERCA2) gene promoter activity is decreased in response to severre left ventricular pressure – overload hypertrophy in rat hearts. *J Mol Cell Cardiol* 31 : 919 – 926,1999.
 - 11) Minami M, Atarashi K, Ishiyama A, Hirata Y, Goto A, Omata M : Pressor hyperreactivity to mental and hand – grip stresses in patients with hypercholesterolemia. *J Hypertens* 17 : 185 – 192,1999.
 - 12) Hosoda T, Komuro I, Shiojima I, Hiroi Y, Harada M, Murakawa Y, Hirata Y, Yazaki Y : Familial artial septal defect and atrioventricular conduction disturbance associated with a point mutation in the cardiac homeobox gene *csx/nkx2 – 5* in a Japanese patient. *Jpn Circ J* 63 : 425 – 426,1999
 - 13) Kakoki M, Matsumoto A, Nagata D, Kobayakawa N, Kimura K, Momomura S, Hirata Y : Analysis of nitric oxide in the exhaled air of patients with chronic glomerulonephritis. *Clinical Nephrol* 52 : 83 – 90, 1999.
 - 14) Kojima H, Urano Y, Kikuchi K, Higuchi T, Hirata Y, Nagano T : Fluorescent indicators for imaging nitric oxide production. *Angewandte Chemie International Edition* 38 : 3209 – 3212,1999.

- 15) Kakoki M, Hirata Y, Hayakawa H, Suzuki E, Nagata D, Tojo A, Nishimatsu H, Kikuchi K, Nagano T, Omata M : Effects of tetrahydrobiopterin on endothelial dysfunction in rats with ischemic acute renal failure. *J Am Soc Nephrol* 11 : 301 - 309, 2000.
- 16) Suzuki E, Nagata D, Yoshizumi M, Kakoki M, Goto A, Omata M, Hirata Y : Reentry into the cell cycle of contact -- inhibited vascular endothelial cells by a phosphatase inhibitor : possible involvement of extracellular signal -- regulated kinase and phosphatidylinositol 3 - kinase. *J Biol Chem* 275 : 3637 - 3644, 2000.
- 17) Sata M, Kakoki M, Nagata D, Nishimatsu H, Suzuki E, Aoyagi T, Sugiura S, Kojima H, Nagano T, Kangawa K, Matsuo H, Omata M, Nagai R, Hirata Y : Adrenomedullin and nitric oxide inhibit human endothelial cell apoptosis via a cGMP - independent mechanism. *Hypertension*, in press.
2. 学会発表
- 1) 佐田政隆、青柳昭彦、杉浦清了、鈴木越、平田恭信、矢崎義雄、小俣政男、Walsh K : 血管内皮細胞による Fas ligand 発現の生理的意義ならびにその遺伝子治療への応用. 第 63 回日本循環器学会総会、東京、3.27 - 29.1999
- 2) 佐田政隆、青柳昭彦、杉浦清了、鈴木越、平田恭信、矢崎義雄、小俣政男、Walsh K : 酸化 LDL は内因性 caspase 阻害分子 FLIP レベルを低下させ、Fas/Fas リガンドを介したアポトーシスを血管内皮細胞に誘発する. 第 63 回日本循環器学会総会、東京、3.27 - 29.1999.
- 3) 長田太助、鈴木越、鹿子木将夫、早川宏、木村健二郎、後藤淳郎、小俣政男、矢崎義雄、平田恭信 : GATA6 転写因子によるメサンギウム細胞の増殖抑制およびその細胞内機序に関する検討. 第 63 回日本循環器学会総会、東京、3.27 - 29.1999.
- 4) 佐田政隆、青柳昭彦、杉浦清了、鈴木越、平田恭信、矢崎義雄、小俣政男、Walsh K : 血管内皮細胞による Fas リガンド発現の調節ならびにその生理的意義. 第 63 回日本循環器学会総会、東京、3.27 - 29.1999.
- 5) 松本晃裕、江藤陽子、百村伸一、平田恭信、矢崎義雄 : 呼気ガス分析指標 - 呼気終末 CO₂ 分圧、酸素摂取量時定数. 第 63 回日本循環器学会総会、東京、3.27 - 29.1999.
- 6) 佐田政隆、青柳昭彦、杉浦清了、鈴木越、平田恭信、矢崎義雄、小俣政男、Walsh K : Fas リガンド遺伝子導入による新生内膜形成抑制ならびに細胞性免疫反応制御. 第 63 回日本循環器学会総会、東京、3.27 - 29.1999.
- 7) 大庭成喜、小路武彦、鈴木尚江、宮下和久、上條敦子、藤乗嗣泰、平田恭信、後藤淳郎、藤田敏郎、小俣政男、木村健二郎 : 尿細管アポトーシスにおける Bax, Bcl - 2 系と Fas, Fas ligand 系の相互作用 - lpr/lpr マウスを用いた検討 - . 第 42 回日本腎臓学会学術総会、横浜、6.26 - 28, 1999.
- 8) 上條敦子、大庭成喜、菅谷健、宮下和久、鈴木尚江、藤乗嗣泰、平田恭信、後藤淳郎、藤田敏郎、小俣政男、木村健二郎 : マウス虚血再灌流腎におけるにおける K 型脂肪酸結合蛋白 (K - FABP) およびヘムオキシナーゼ 1 (HO - 1) の発現の検討. 第 42 回日本腎臓学会学術総会、横浜、6.26 - 28, 1999.
- 9) 上條敦子、大庭成喜、菅谷健、山之内昌也、野又康博、平野紀仁、鈴木尚江、宮下和久、藤乗嗣泰、平田恭信、後藤淳郎、藤田敏郎、小俣政男、木村健二郎 : ヒト糸球体疾患に

- おける近位尿細管脂肪酸結合蛋白 (L-FABP) 発現の臨床的意義の検討.第42回日本腎臓学会学術総会、横浜、6.26 - 28、1999.
- 10) 宮下和久、藤乗嗣泰、大庭成喜、上條敦子、鈴木尚江、平田恭信、後藤淳郎、小俣政男、藤田敏郎、木村健二郎：内因性腎尿細管抗原による膜性腎症モデルの作成.第42回日本腎臓学会学術総会、横浜、6.26 - 28、1999.
- 11) Hirata Y： The role of ACEI and ARA in the treatment of hypertension with renal damage. 10th Sino - Japanese symposium on cardiology. Sept. 24 - 25, 1999, Hangzhou, China
- 12) 長田太助、鈴木越、吉栖正生、鹿子木将夫、木村健二郎、後藤淳郎、小俣政男、平田恭信：GATA - 6転写因子による細胞増殖抑制作用の細胞内機序に関する検討。第22回日本高血圧学会総会、香川、10.21 - 23、1999
- 13) 鈴木越、長田太助、吉栖正生、鹿子木将夫、木村健二郎、後藤淳郎、小俣政男、平田恭信：血管内皮細胞の接触阻止による増殖停止の細胞内機序に関する検討。第22回日本高血圧学会総会、香川、10.21 - 23、1999.
- 14) 鹿子木将夫、新藤隆行、西松寛明、栗原裕基、藤乗嗣泰、早川宏、栗原由紀子、長田太助、鈴木越、木村健二郎、後藤淳郎、永井良三、矢崎義雄、小俣政男、平田恭信：アドレノメデュリン (AM) の一酸化窒素 (NO) 遊離および虚血灌流障害に及ぼす役割 - トランスジェニックマウスを用いての検討 - .第22回日本高血圧学会総会、香川、10.21 - 23、1999.
- 15) 平田恭信、鈴木越、長田太助、鹿子木将夫：腎不全の進行と血管作働物質。ワークショップ4：慢性腎不全の進行を阻止する試み - 新しい薬物療法の可能性 - .第29回日本腎臓学会東部学術大会、宇都宮、10.22 - 23、1999.
- 16) 平田恭信：シンポジウム NOと循環器疾患：高血圧とNO.第36回日本臨床生理学会、千葉、10.28 - 30、1999.
- 17) Sata M, Kakoki M, Nagata D, Nishimatsu H, Suzuki E, Aoyagi T, Sugiura S, Kojima H, Nagano T, Kangawa K, Matsuo H, Omata M, Nagai R, Hirata Y： NO - mediated inhibition of human endothelial cell apoptosis. Adrenomedullin as a survival factor. 72nd Scientific Sessions of American Heart Association, Georgia, USA, Nov. 7 - 10, 1999,
- 18) 西松寛明、鹿子木将夫、新藤隆行、栗原裕基、早川宏、栗原由紀子、長田太助、鈴木越、木村健二郎、後藤淳郎、永井良三、矢崎義雄、小俣政男、平田恭信：アドレノメデュリントランスジェニックマウスのNO遊離能の検討.第3回日本心血管内分泌代謝学会、東京、11.26 - 27、1999.
- 19) 長田太助、鈴木越、平田恭信：GATA - 6転写因子によるメサンギウム細胞増殖抑制作用の細胞内機序に関する検討.第3回日本心血管内分泌代謝学会、東京、11.26 - 27、1999.

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）

特異的受容体を発現する細胞で、アドレノメデュリンはIL-1 β 刺激により亢進したTNF- α 産生を迅速かつ強力に抑制した。また、全身性炎症反応症候群（SIRS）患者の血中アドレノメデュリン濃度と重篤度との間に強い正相関が認められ、診断指標に使用できる可能性が示された。アドレノメデュリンは炎症反応に相関して各種細胞における産生が亢進し、炎症サイトカイン産生の調節を通して炎症抑制的に機能していると推定された。

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強力な血管拡張性ペプチドで、強い降圧作用を示す。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などが成人病発症に繋がると考えられる。昨年度までの研究により、血管平滑筋細胞や内皮細胞のみならず、マクロファージや間質系の線維芽細胞がAM遺伝子を活発に発現しAMを分泌すること、これらの細胞における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などを明らかにしてきた。

この過程でAMと炎症との関連が強く示唆されたため、本年度の研究では特異的受容体を発現する線維芽細胞において腫瘍壊死因子（TNF- α ）などの炎症性サイトカイン産生に対するAMの効果を調べるとともに、敗血症を中心とした全身性炎症反応症候群（SIRS）患者における血中AM濃度や他の体液性因子濃度と病態との関連を検討した。本研究は、AMの生理的意義の解明だけではなく、各種成人病発症機構の解明や診断、治療法開発への基盤を形成す

るものである。

B. 研究方法

1) 線維芽細胞の培養と培養上清の調製

AM特異的受容体を発現するマウス胎児由来 Swiss 3T3 細胞は、6穴プレートで10%ウシ胎児血清含有DMEM培地で培養した。コンフルエントに達した直後に刺激物質などを添加した培地を入れ替え、48時間後まで経時変化、24時間後の用量依存性等を検討した。

2) TNF- α 産生量及び遺伝子発現量の測定

TNF- α 産生量は、マウス由来L929細胞に対する細胞毒性を指標とした生物活性検定法により測定した。L929細胞は、24穴プレートで10%ウマ血清含有MEM培地で24時間培養した後、Swiss 3T3細胞の培養上清、あるいは標準TNF- α を添加し、アクチノマイシンD（0.5 μ g/ml）とヨードラベルデオキシウリジン（0.1 μ Ci/ml）存在下で24時間培養した。上清除去後、細胞を氷冷した生食で洗浄し、更に核分画に取り込まれた放射活性を抽出して測定した。抗TNF- α 中和抗体を反応特異性の確認に使用した。

TNF- α 遺伝子発現量の測定には、リアルタイム定量的PCRを使用した。培養上清調製と同様の方法にて0~8時間培養した細胞より、RNAをGTC法にて抽出し、逆転写を行った。得られたcDNAを定量的PCR用特異的蛍光プローブの存在下、TNF- α 特異的、GAPDH特異的プライマーと増幅した。内部標準としてのGAPDH mRNA量で添加試料量の補正を、経時的な蛍光増加量と既知量の標準cDNAに基づく定量によりTNF- α mRNA量を測定した。

3) SIRS患者における血中AM濃度と他のパラメータの測定

奈良医大救急科に入院した敗血症患者89名(火傷10名、肺炎6名、外傷11名、外傷性ショック16名、重症敗血症16名、敗血症性ショック30名)と健常者13名を対象とし、大学の研究倫理委員会の許可並びに患者のインフォームドコンセントを得て実施した。血中AM濃度は逆相C18カラムで濃縮後、特異的ラジオイムノアッセイ法にて測定し、TNF- α 、インターロイキン6(IL-6)、IL-8、plasminogen activator inhibitor (PAI-1)濃度はELISA法にて測定した。外傷性及び敗血症性ショックの重篤度はAPACHE-IIスコアで、多臓器不全の重篤度はMOFスコアで評価した。

(倫理面への配慮)

本研究はヒトを対象とした研究は行っていない。また、実験動物を用いた研究では、実験動物飼養及び保管に関する基準、当施設における実験動物委員会の指針に基づき、実験動物愛護を配慮して行った。

C. 研究結果

1) 培養線維芽細胞におけるTNF- α 産生量、遺伝子発現量とAMの効果

今回使用したSwiss 3T3細胞の24時間におけるTNF- α 基礎分泌量は4.1 pg/mlであった。AMの単独投与では、100 nMまで全く変化

を与えなかった。一方、炎症性サイトカインのIL-1 β (1 ng/ml)は、TNF- α 産生量を24時間で約4倍に増加した。このIL-1 β 刺激下におけるTNF- α 産生量を、AMは0.1nMから100 nMまでに用量依存的に最大で23%まで抑制した。また、このAMの作用は抗TNF- α 中和抗体で完全に抑制された。AM関連ペプチドであるカルシトニン遺伝子関連ペプチド(CGRP)やアミリンもTNF- α 産生を抑制したが、その強度はAMの数%、1%程度であった。AMと同様に細胞内cAMPを増加するPACAPとVIPは無効であった。この反応を遺伝子発現レベルで見ると、TNF- α 産生量とはほぼ平行するがより顕著な形で認められ、最大で18%までTNF- α mRNA量を抑制した。一方、IL-1 β 産生に対するAMの効果も検討したが、有意な変動は認められなかった。

AMのTNF- α 産生抑制作用につき、受容体アンタゴニストを用いて特異性を検討すると、AM特異的受容体アンタゴニストのAM [22-52]で完全に解除され、CGRP特異的受容体アンタゴニストのCGRP [8-37]では弱くしか解除されなかった。更に細胞内情報伝達系について検討するため、H-89、H-7、PD98059、genistein等を添加して検討したところ、AMによるTNF- α 産生抑制効果はプロテインキナーゼA系の阻害により消失したが、他のMAPキナーゼ、プロテインキナーゼC、チロシンキナーゼ系の阻害剤では影響を受けなかった。

次に、AMのTNF- α 産生抑制作用の時間依存性を48時間まで検討したところ、IL-1 β 刺激下のTNF- α 産生は48時間まで増加するが、最初の10時間まで急増し、その後は増加率が大きく低下した。基礎分泌量も10時間以降は極めて低い水準となった。AMの添加によってIL-1 β 刺激下のTNF- α 産生も大きく減少し、10時間以降の産生量は基礎分泌レベルまで低下した。一方、TNF- α mRNA量はIL-1 β 刺激で1時間後

に約13倍まで急速に増加し、8時間後には無刺激レベルに戻ったが、AMは1時間後のTNF- α mRNA量を22%にまでに抑制し、その効果は4時間まで有意であった。

2) 全身性炎症反応症候群 (SIRS) における血中AM濃度

健常者の血中AM濃度は平均5.1 fmol/mlで、SIRS患者では平均88.4 fmol/mlであった。原因別に分類した全ての群で有意な上昇を認めたが、重症敗血症や敗血症性ショックだけでなく、火傷や外傷性ショックなどでも大きな上昇が観測された。腎機能低下がAM濃度上昇に繋がる可能性があるため血清クレアチニン値により腎機能を評価すると、外傷及び重症敗血症では弱い正相関があったため、以降の検討は外傷性及び敗血症性ショック患者について行った。

外傷性及び敗血症性ショック患者のTNF- α 、IL-6、IL-8、PAI-1等の炎症性サイトカイン、炎症関連蛋白の血中濃度は、全て正常者の上限を上回っていた。外傷性ショック患者、敗血症性ショック患者のTNF- α 濃度は平均で健常者の6倍、28倍、IL-6濃度は87倍、270倍と顕著に上昇していることが確認された。一方、AM濃度はそれぞれ8倍、38倍の上昇であったが、P値はTNF- α とともに最も低い値を示した。AM濃度とこれら4種の炎症関連蛋白濃度の相関性を見ると、外傷性ショック患者ではいずれとも相関しないが、敗血症性ショック患者ではTNF- α 濃度と高い相関性を示した。

次に、AM濃度及びこれら4種の炎症関連蛋白濃度と症状 (APACHE-II) や多臓器不全 (MOF) の重篤度を比較すると、外傷性ショック患者ではIL-6とAPACHE-IIスコアとの間に相関が認められただけであった。敗血症性ショック患者では、AM、TNF- α 、IL-6、IL-8濃度とAPACHE-IIスコアとの間に相関が認められ、AM、TNF- α 、IL-8、PAI-1濃度とMOFス

コアとの間にも相関が認められた。

D. 考察

AMはヒト褐色細胞腫より単離されたが、我々の研究により血管内皮細胞、平滑筋細胞が主要な産生細胞の一つ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でAM産生が確認された。これらの細胞におけるAM産生調節は非常に類似しており、炎症性サイトカイン、LPSで強く亢進する。この事実は、AMが血圧調節因子としてだけではなく、炎症などの制御、病態との関連においても重要であることを強く示唆すると考えられる。

マクロファージ由来のRAW264.7細胞において、AMはLPS刺激により誘導されるTNF- α 産生とIL-6産生を抑制するが、線維芽細胞では強力にIL-6産生を促進し、細胞増殖も促進することが、昨年度の研究によりわかった。そこで特異的受容体を発現するSwiss 3T3細胞を用いて炎症性サイトカインとAMとの関連を検討したところ、TNF- α 産生の基礎分泌量を変動しないが、IL-1 β 刺激下では生理的濃度でTNF- α 産生や遺伝子発現を20%にまで抑制することが明らかとなった。また、AMのTNF- α 産生抑制効果は既知のペプチドの中で最も強力と考えられる。

AMのTNF- α 産生抑制効果は、AM特異的受容体およびプロテインキナーゼA系を介することが分かり、Swiss 3T3細胞以外でも特異的受容体を発現する細胞や組織では同様の効果が誘導可能と推定される。また、その作用は極めて迅速で、IL-1 β によるTNF- α 遺伝子発現を1時間以内に抑制することが示された。しかし、IL-1 β 産生に関してはRAW264.7細胞、Swiss 3T3細胞とも抑制効果は観測されず、今後この相違の検討が必要である。

以上の結果を総合すると、炎症性サイトカイ

ンは普遍的な AM 産生促進物質であるため、その存在下で亢進した AM 産生はオートクリン、パラクリン的に作用し、結果として炎症性サイトカイン産生を抑制し、炎症抑制的に機能している可能性が高い。AM が多様な細胞で産生されることも、この視点から理解可能かもしれない。

全身性炎症反応症候群 (SIRS) の中でも、敗血症性ショックについては血中 AM 濃度が著増していることを報告したが、本研究により多様な形態の SIRS で血中 AM 濃度の上昇が明確となった。この濃度は、既報の種々の循環器疾患患者の血中濃度よりも高く、AM が炎症関連因子としても機能していることを強く示唆する。

腎臓における AM 代謝の問題を除くため外傷性ショック及び敗血症性ショック患者に限定しても、血中 AM 濃度の上昇は極めて顕著で、血中 TNF- α 濃度と極めて類似した挙動を取ることにもわかった。APACHE-II 及び MOF スコアに基づき症状の重篤度との関連を比較すると、外傷性ショック患者では IL-6 濃度が最もよく相関しが、敗血症性ショック患者では AM、TNF- α 、IL-8 濃度との間に相関性が認められ、中でも AM 濃度が最も強い相関性を示すことがわかった。この結果、SIRS 患者の中でも敗血症性ショック患者において AM が極めて有効な診断マーカーであり、多臓器不全の予測にも有用であると期待される。

E. 結論

AM は循環調節因子として強力に血管を拡張する以外に、血管壁細胞、間質系細胞、マクロファージをはじめとする多様な細胞で炎症性サイトカインや内毒素などの刺激により産生され、炎症の調節因子として機能している可能性が高くなった。特に、炎症性サイトカイン産生を抑制していると推定され、内因性の炎症抑制性メディエーターとしての機能が注目される。

種々の全身性炎症反応症候群患者において顕著な血中 AM 濃度の上昇が認められたことは、炎症反応自身が AM 産生の亢進と強く結びついていることを示すものである。敗血症性ショック患者においては、AM がショックや多臓器不全の重篤度の極めて良い指標となる可能性が示された。

種々の成人病で血中 AM 濃度に上昇していることは、高血圧症などの血圧調節以外に、AM が成人病発症の基礎となる全身の細胞機能調節の上でも、炎症関連症状などを中心に重要な機能を担っていると推定された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- ① S. Ueda, K. Nishio, N. Minamino, A. Kubo, Y. Akai, K. Kangawa, H. Matsuo, Y. Fujimura, A. Yoshioka, K. Masui, N. Doi, Y. Murao and S. Miyamoto. Increased plasma levels of adrenomedullin in patients with systemic inflammatory response syndrome. Am J Resp Crit Care Med, 160 : 132 - 136, 1999
- ② Y. Isumi, A. Kubo, T. Katafuchi, K. Kangawa and N. Minamino. Adrenomedullin suppresses interleukin-1 β -induced tumor necrosis factor - α production in Swiss 3T3 cells. FEBS Lett, 463 : 110 - 114, 1999

2. 学会発表

- ① 友田芳夫、井角能隆、片淵剛、寒川賢治、南野直人、心筋細胞と非心筋細胞におけるアドレノメデュリンの産生とその機能。第72回日本内分泌学会学術総会、1999。
- ② 南野直人、線維芽細胞におけるアドレノメ

デュリンの産生とその意義. 第3回アドレノメデュリン研究会. 1999.

- ③ 井角能隆,久保篤史、片淵剛、友田芳夫、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TNF- α 産生抑制作用.第3回日本心血管内分泌代謝学会総会 1999.

- ④ N. Minamino, K. Kangawa and H. Matsuo. Natriuretic peptides and adrenomedullin: New peptidergic regulators of the vascular function. 第4回アジア微小循環学会. 2000.

G. 知的所有権の取得状況

なし

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

水・電解質代謝におけるグアニリンファミリーの生理学的意義に関する研究

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1997年に単離された酸性ペプチドである。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、cyclicGMP産生を促進して、腎臓と消化管での水・Na⁺の吸収抑制とCl⁻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。これまでにわれわれは、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点について解析をすすめた。

1. uroguanylinは経静脈投与で利尿作用、natriuresis、kaliuresisを引き起こす。また、単離した腎臓で尿中へのナトリウム・カリウム・水の分泌増加が認められている。筆者らは、高塩食負荷ラットにおいて低塩食と比較してuroguanylinが増加し、これがNa、K、Cl、cGMPと相関することを報告している。これらの報告は腎においてuroguanylinが水・電解質平衡に関与していることを示唆している。

さまざまなレベルの腎障害患者で、血漿uroguanylinと血清クレアチニンは相関している。慢性腎不全の患者は特に末期腎不全患者では、糸球体濾過率や機能するネフロン減少によりNa、K、水が蓄積される。しかし透析患者におけるuroguanylinの動態は、充分には解明されていない。今回、血液・腹膜透析患者において血漿uroguanylin濃度を測定し、患者の臨床的状态と比較した。

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らかにするために、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cyclicGMP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. 対象

13人の正常コントロール群（男性7人、女性6人、平均年齢 27.5 ± 1.0 [SEM] 歳、76人の維持血液透析患者群（男性43人、女性33人、平均年齢 57.7 ± 1.6 歳）および腹膜透析患者群（男性のみ10人、平均年齢 40.2 ± 3.8 歳）を解析した。血液透析患者の原疾患は、慢性糸球体腎炎7人、糖尿病21人、腎硬化症6人、多発性嚢胞腎3人、膠原病8人、痛風腎3人、その他の疾患8人、不明2人であった。腹膜透析患者の原疾患は慢性糸球体腎炎8人、不明2人であった。透析期間の平均は血液透析患者で 66.0 ± 7.5 月、腹膜透析患者で 27.0 ± 7.8 月であった。血液透析患者のうち38人はダイアライザーとして高透過性の合成膜であるPEPA膜（FLX、Nikkiso Co.）を、その他38人はPC膜（AMPC、Asahi Medical Co.）を使用し、透析した。

2. 方法

血液透析患者の採血は、透析前の午前9時に行い、正常コントロールは前日夜から絶食して早朝に行った。Randomに選んだPEPA膜で透析している患者7人、PC膜で透析している患者7人において透析終了時に採血した。心胸比は透析前の胸部X線で測定した。それぞれの患者のDry Weight (DW)は、透析前の体重や血圧や心胸比等によって決定し、毎月適正かどうか評価した。透析前増加量は透析前の体重からDWを引いて計算した。血液透析患者27人で β 2-ミクログロブリンを測定した。腹膜透析患者の採血は透析液交換前の11時から14時の間に行った。

血液を冷却したEDTA-2Na (1mg/ml blood)とアプロチニン(500unit/ml blood)を含んだポリプロピレンチューブに入れ、直後に 4°C 、3000 rpmで15分間遠心した。血漿は0.

9%の生理食塩水で2倍に希釈後、生理食塩水で平衡化したSep-pak C-18カートリッジにアプライし、0.1% TFAを含んだ60%アセトニトリル溶液でペプチドを抽出した。抽出液をuroguanylinのラジオイムノアッセイ(RIA)に供した。ヒトuroguanylin抗体は最終希釈濃度1:15,000でuroguanylinのみを特異的に認識した。本法によりuroguanylinは最低 $0.4\text{fmol}/\text{tube}$ から測定可能であり、RIAの標準曲線のhalf-maximum inhibitionは $4\text{fmol}/\text{tube}$ であった。

200例の心不全患者の血漿uroguanylin濃度を定量し、12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。

統計処理

データは平均値 \pm SEMで示した。相関はSimple linear regression analysisで決定した。P値は0.05以下を有意とした。Paired Students t-testを2群間の比較に用いた。

(倫理面への配慮)

本研究はヒトを対象とした研究は行っていない。また、実験動物を用いた研究では、実験動物飼養及び保管に関する基準、当施設における実験動物委員会の指針に基づき、実験動物愛護を配慮して行った。

C. 研究結果

透析前の血漿uroguanylinは $212.0 \pm 17.4\text{fmol}/\text{ml}$ で、正常コントロールの 5.0 ± 0.3 と比較し、有意に上昇していた。正常患者で、加齢とともにuroguanylin濃度は減少していた。血漿uroguanylinは体重増加量 ($r = 0.327$, $P < 0.01$)と透析歴 ($r = 0.258$, $p < 0.05$)に相関していた。平均血漿ウログアニリン濃度は腹膜透析患者で $245.3 \pm 39.5\text{fmol}/\text{ml}$ で正常コントロールより有意に高かったが ($P < 0.01$)、血液透析患者と有意差は認めなかった。ウログア

ニリンと血清電解質、収縮期拡張期血圧、心胸比に相関は認めなかった。

PEPA膜で血液透析を行っている患者の血漿 uroguanylin 濃度は血液透析前が 121.7 ± 13.4 fmol/ml で、透析後が 54.8 ± 6.2 fmol/ml と、透析中に有意に減少した。一方 PC 膜で行っている群では、前が 168.2 ± 18.4 fmol/ml、後が 211.4 ± 35.1 fmol/ml で有意な変化を認めなかった。透析前の血漿ウログアニリン濃度は PEPA 膜透析群が PC 膜透析群より低かったが、有意差は認めなかった ($P = 0.06$)。血液透析前の $\beta 2$ -ミクログロブリンは PEPA 膜透析群が PC 膜透析群より有意に低かった ($24.7 \pm 1.4 \mu\text{g/L}$ versus $33.7 \pm 2.7 \mu\text{g/L}$, $P < 0.01$)。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 \pm 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、カテーテル採血した血漿の解析により、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

筆者は、uroguanylin のレセプターが腎臓に存在していることをノーザン解析により確認している。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。

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と考えられる。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した。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 Kinoshita H, Fujimoto S, Fukae H, Yokota N, Hisanaga S, Nakazato M, Eto T: Plasma and urine levels of uroguanylin, a new natriuretic peptide, in nephrotic syndrome. *Nephron*, 81: 160 - 164, 1999.
- ② Date Y, Nakazato M, Yamaguchi H, Kangawa K, Kinoshita Y, Chiba T, Ueta Y, Yamashita H, Matsukura S: Enterochromaffin-like cell, a cellular

- source of uroguanylin in rat stomach. Endocrinology, 140 : 2398 – 2404, 1999.
- ③ Fujimoto S, Kinoshita H, Hara S, Nakazato M, Hisanaga S, Eto T : Immunohistochemical localization of uroguanylin in the human kidney. Nephron, 84 : 88 – 89, 2000.
- ④ Fukae H, Kinoshita H, Fujimoto S, Nakazato M, Eto T : Plasma concentration of uroguanylin in patients on maintenance dialysis therapy. Nephron, in press
- ⑤ 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 (XVII) 9 – 14 医学図書出版, 1999.
- ⑥ Kinoshita H, Nakazato M, Fujimoto S, Eto T : Significance of uroguanylin, a new natriuretic peptide, in renal diseases. Current Topics in Biochemical Research. RESEARCH TRENDS, in press

2. 学会発表

- ① 山口秀樹, 中里雅光, 伊達 紫, 松倉茂 : 水電解質代謝調節ペプチド uroguanylin の消化管における病態生理学的意義の検討. 第96回日本内科学会講演会, 1999.
- ② 宮里幹也, 中里雅光, 伊達 紫, 山口秀樹, 寒川賢治, 千葉 勉, 松尾壽之, 松倉 茂 : 胃粘膜細胞におけるラット guanylin, uroguanylin および GC-C の細胞局在と病態生理学的意義, 第72回日本内分泌学会総会, 1999.
- ③ 深江裕子, 木下 浩, 久永修一, 藤元昭一, 江藤胤尚, 中里雅光 : 血液透析及び腹膜透析患者における uroguanylin の動態. 第44回日本透析学会学術集会, 1999.
- ④ 中里雅光, 松倉 茂 : uroguanylin acts as

a natriuretic factor via guanylyl cyclase C. 81st Annual Meeting, Endocrine Society, 1999.

G. 知的所有権の取得状況

なし

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

アドリアマイシン心筋症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）

アドリアマイシンは心毒性を示し心筋症を誘導するがその機序は不明である。アドリアマイシン心筋症発症におけるアンジオテンシンⅡの役割について、アンジオテンシンⅡ 1型受容体ノックアウトマウスを用いて解析した。アドリアマイシンの投与により心筋細胞の死、ANP、CARP 遺伝子発現の低下、心筋線維の疎小化・変性、心機能の低下が認められた。これらの変化はいずれも1型受容体ノックアウトマウスでは認められず、また1型受容体拮抗薬の投与により抑制された。従って、アドリアマイシン心筋症の発症に、アンジオテンシンⅡ/AT1が関与していることが明らかとなった。

A. 研究目的

アドリアマイシンは強力な抗癌剤として広く用いられているが、副作用が多く、そのために使用量が制限されている。特に心毒性は大きな問題であり、原病は治療しても心不全により死亡するということが少なからず認められる。アドリアマイシンが心毒性を示す詳細な機序については未だ不明であるが、過酸化物の産生を介した細胞膜の酸化、DNAの傷害などが考えられている。種々のストレスにより、心臓の構造に変化が生じることを左室リモデリングとよぶが、最近左室リモデリングの形成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していることが、動物実験ばかりでなく臨床的にも明らかになってきた。そこで、我々はアンジオテンシンⅡ（AⅡ）の1a型受容体（AT1a）を欠失したノックアウトマウス（KOマウス）を用いて、アドリアマイシン心筋症発症にAⅡが関与しているか否かについて解析した。

B. 研究方法

1. 急性実験

AT1a遺伝子のコーディングエクソンをLac Zと入れ替えたKOマウス及び対象として野性型マウス（WTマウス）にアドリアマイシン20mg/kgを1回、腹腔内に注入した。野性型マウスにはAT1拮抗薬であるRNH-6270を1mg/kgの濃度でアドリアマイシン投与1日前と当日、浸透圧ポンプにて投与した。

2. 慢性実験

KOマウス及びWTマウスにアドリアマイシン1mg/kgを週1回12週間腹腔内投与した。RNH-6270を1mg/kgの濃度で浸透圧ポンプを用いて12週間投与した。各々のマウスについて体重測定後、心エコー、心電図等の生理学的検査を行った。と殺後、組織を固定し、ヘマトキシリン-エオジン染色、アザン染色を行い、光顕にて観察した。またin situでアポトーシス細胞を検出するためにTUNEL染色を行い、光顕にて陽性細胞数をカウントした。さらに、電顕を用いて詳細な組織学的検査を行った。さらに、ANP、BNP、CARP、MLC2vの遺伝子発現についてノーザン解析を行った。

(倫理面への配慮)

本研究はヒトを対象とした研究は行っていない。また、実験動物を用いた研究では、実験動物飼養及び保管に関する基準、当施設における実験動物委員会の指針に基づき、実験動物愛護を配慮して行った。

C. 研究結果

1. 急性実験

アドリアマイシン投与によりWTマウスにおいて心電図上異常は認めなかったが、心機能は%FSで45%→41%へと低下した。AT1拮抗薬を投与したWTマウス(FS45%)及びKOマウス(47%)はアドリアマイシン投与によっても心機能の低下は認めなかった。細胞の形態、線維化等、光顕では各群間に変化が認められなかったが、WTマウス心ではアドリアマイシン投与によりTUNEL陽性細胞数の増加を認め、電顕で心筋線維の疎小化、変性を認めた。ノーザン解析では、WTマウスにアドリアマイシンを投与した場合にANP、CARPのmRNAの減少を認めたが、AT1拮抗薬の投与をしたWTマウス及びKOマウスではこれら遺伝子の発現低下は認められなかった。

2. 慢性実験

WTマウスにおいて心機能はアドリアマイシンの投与により、45→38%(FS)と低下した。AT1拮抗薬投与のWTマウス(45%)、KOマウス(48%)では心機能の低下は認められなかった。光顕、TUNEL染色では各群間に有意な差を認めなかったが、アドリアマイシンを投与したマウス心において、電顕で心筋線維の疎小化、変性を認めた。その程度は、WTマウスにおいて顕著であり、AT1拮抗薬の投与したWTマウス、KOマウスでは有意に軽度であった。

D. 考察

1. 心機能

一般にヒトにおいて、アドリアマイシンの投与により急性期に一時的に、また慢性期には持続して心機能が低下することが知られている。今回の研究においてもアドリアマイシンの大量1回投与及び少量の慢性投与により、ともにWTマウスにおいて心機能の低下を認めた。ところが、AT1拮抗薬を投与したWTマウス、KOマウスでは心機能は低下しなかった。このことより、アドリアマイシンの投与による心機能の低下にアンジオテンシンII/AT1が関与していることが明らかとなった。

2. 組織学的検査

光顕では細胞の形態、線維化等に特に変化を認めなかったが、電顕により急性期はWTマウスにアドリアマイシンを投与した場合のみ、心筋線維の疎小化、変性を認めた。また慢性投与実験では、アドリアマイシンを投与した全ての群で同様な変化を認めたが、AT1拮抗薬を投与しなかったWTマウスにおいて特に顕著であった。さらにin situにおいて細胞死を検出するTUNEL法により、アドリアマイシンを急性に投与したWTマウスにおいてのみ、陽性細胞を認めた。このことはアドリアマイシンにより心筋線維の減少、心筋細胞の変性、心筋細胞死が誘導されること、さらにその過程においてアンジオテンシンII/AT1が重要な役割を果たしていることを示している。

3. 遺伝子発現

アドリアマイシンは心筋細胞において、心筋細胞特異的な遺伝子の発現を低下させると報告されているが、今回の研究においてもWTマウスに大量のアドリアマイシンを投与した場合にANPとCARPのmRNAの減少を認めた。このmRNAの変動もAT1拮抗薬の投与により消失し、KOマウスでは認められなかった。以上の結果は、アドリアマイシンによる心臓における遺伝子発現の低下にもアンジオテンシンII/AT1が関与していることを示している。

E. 結論

アドリアマイシンは大量投与により急性期に、少量投与により慢性期に心機能の低下、心筋細胞死、遺伝子発現の低下等の変化を惹起したが、これらの変化にはアンジオテンシンII/AT1が関与していた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- ① Aikawa R, Komuro I, Yamazaki T, Kudoh S, Zou Y, Zhu W and Yazaki Y. Rho Family Small G Proteins Play Critical Roles in Mechanical Stress – Induced Hypertrophic Responses in Cardiac Myocytes. *Circ Res*, 84 : 458 – 466, 1999.
- ② Harada K, Komuro I, Sugaya T, Murakami K and Yazaki Y. Vascular Injury Causes Neointimal Formation in Angiotensin II Type 1a Receptor Knockout Mice. *Circ Res*, 84 : 179 – 185, 1999.
- ③ Zou Y, Komuro I, Yamazaki T, Kudoh S, Uozumi H, Kadowaki T, Yazaki Y. Both Gs and Gi proteins are critically involved in isoproterenol – induced cardiomyocyte hypertrophy. *J Biol Chem* 274 : 9760 – 9770, 1999.
- ④ Yamazaki T, Komuro I, Zou Y, Yazaki Y. Hypertrophic responses of cardiomyocytes induced by endothelin – 1 through the protein kinase C – dependent but Src and Ras – independent pathways. *Hypertens Res* 22 : 113 – 119, 1999.
- ⑤ Saito S, Aikawa R, Shiojima I, Nagai R., Yazaki Y, Komuro I. Endothelin – 1 induces expression of

fetal genes. *FEBS Lett* 456 : 103 – 107, 1999.

- ⑥ Zhu W, Zou Y, Aikawa R, Harada K, Kudoh S, Uozumi H, Hayashi D, Gu Y, Nagai R, Yazaki Y, Komuro I. MAPK superfamily plays an important role in daunomycin – induced apoptosis of cardiac myocytes. *Circulation* 100 : 2100 – 2107, 1999.
 - ⑦ Harada K, Sugaya T, Murakami K, Yazaki Y, Komuro I. Angiotensin II type 1a receptor knockout mice display less left ventricular remodeling and improved survival after myocardial infarction. *Circulation* 100 : 2093 – 2099, 1999.
 - ⑧ Shimoyama M, Hayashi D, Takimoto E, Zou Y, Oka T, Uozumi H, Kudoh S, Shibasaki F, Yazaki Y, Nagai R, Komuro I. Calcineurin plays a critical role in pressure overload – induced cardiac hypertrophy. *Circulation* 100 : 2449 – 2454, 1999.
- ### 2. 学会発表
- ① Kudoh S, Hayashi D, Zou Y, Zhu W, Oka T, Hiroi Y, Nagai R, Yazaki Y, Komuro I. Ca²⁺ Plays a Critical Role in Mechanical Stretch – Induced BNP Gene Expression in Cardiac Myocytes. August 18 – 22, 1999, Salt Lake City, Utah. Scientific Conference on Molecular, cellular, and Integrated Physiological approaches to the Failing Heart (AHA)
 - ② Zou Y, Yao A, Zhu W, Kohmoto O, Kudoh S, Takahashi T, Yazaki Y, Komuro I. Ca²⁺ activates extracellular signal – regulated kinases through two