

論文の内容の要旨

論文題目 内因性アドレノメデュリンが血管緊張および虚血再灌流障害に
及ぼす影響の検討

アドレノメデュリントランスジェニック/ノックアウトマウスを用いた研究

指導教官 北村唯一 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成9年4月入学

医学博士課程

外科学（泌尿器外科学）専攻

氏名 西松寛明

論文要旨

【緒言】

アドレノメデュリン (AM) はヒトの褐色細胞腫から分離された強力な血管拡張性ペプチドである。体内を循環している AM は主に血管壁から分泌されており、血管緊張調節に重要な役割を果たしていると推測されている。一方、AM は血小板の cyclic adenosine monophosphate (cAMP) の増加活性をモニターして発見された経緯より、当初は cAMP が唯一の血管拡張作用に対する second messenger と考えられていた。また AM はその構造の相同性から、calcitonin gene-related peptide (CGRP) ファミリーの一員と考えられた。最近、AM と CGRP は一部、共通の受容体を介した作用を有することが証明されているが、両者の細胞内情報伝達の詳細は不明である。AM は内皮依存性の血管拡張作用を示し、cyclic guanosine monophosphate (cGMP) がもう一つの second messenger であることが示されている。我々はすでに、血管内皮剥離やグアニル酸シクラーゼ阻害剤により AM の血管拡張反応が低下することや、灌流腎において AM が一酸化窒素 (NO) の遊離を増加させること、NO 合成阻害薬により NO 遊離や血管拡張反応が低下することを示してきた。以上の事実から、

AMによる血管拡張反応は少なくとも一部は、NO-cGMP系を介するものと考えられる。AMは高血圧、心不全、腎不全の症例でその血漿濃度が上昇していることが報告されている。AMが血管拡張作用やNa利尿作用を有することから、AMはこれらの病態に代償的に作用している可能性がある。しかしながら内因性のAMが循環調節系にどのような役割を担っているかは不明な点が多い。また、AMは少なくともその内皮依存性の血管拡張反応にNOが関わっていることを述べたが、NOは様々な心血管系への作用を有している一方で、虚血・再灌流障害に対する役割に関しては議論が分かれるところである。我々は以前、急性腎不全では内皮由来のNOの産生が増加し、腎組織障害を緩和することを示した。内因性のAMがこの様な病態にどのように関わっているかをさらに明らかにするために、発生工学的手法を用いてAMの機能解析を行った。

【方法】

1. トランスジェニックマウス (TG) およびノックアウトマウス (KO)

Shindo, Kuriharaらの開発したマウスを解析した。AMTGは、AMが主に血管から分泌されることに着目し、血管特異的な遺伝子プロモーターを応用して内因性AMを過剰発現させた。具体的には、エンドセリン-1 (ET-1) が血管内皮細胞に高い選択性を持って発現していることに着目し、このET-1プロモーター領域の下流に、0.7kbのラットAMcDNAを結合した導入遺伝子を作成し、マウス受精卵に導入してAMを過剰発現させたAMTGマウスを確立した。またAM遺伝子のプロモーター領域約1.3kbおよびexon 1-4をネオマイシン耐性遺伝子で置換するようにtargeting vectorを作成することによりAMKOマウスを確立した。KOはホモ接合体が胎生13.5日で致死に至ることから、ヘテロ接合体を今回の検討に用いた。大動脈や腎臓におけるAMの発現レベルは、TGにおいて約200-500%と増加し、KOにおいては約50%に低下していた。

2. AMの血管拡張作用の検討

これらのマウスを用いて、内因性のAMの血管系や腎臓における役割を検討した。生後12週齢で雄のTG、KO、ならびに同腹の野生型マウス(WT)を用いて胸部大動脈の血管反応を調べた。それぞれのマウスから胸部大動脈を摘出し、等尺性張力を測定した。前収縮には 10^{-6} mol/Lのノルエピネフリンを用いた。内皮の有無によってそれぞれアセチルコリン (ACh)、AM、CGRPに対する張力の変化を観察した。次いで、内皮の剥離、NO合成阻害薬であるL-NG arginine methyl ester (L-NAME)、AM受容体拮抗薬であるAM(22-52)やCGRP(8-37)、

そして cGMP 特異的な phosphodiesterase 阻害薬である E-4021 の大動脈張力に及ぼす影響を検討した。大動脈輪の弛緩の程度は最高張力からの減少率にて示した。

またこれらのマウスの右腎を単離灌流し、腎灌流圧 (RPP) を測定した。腎静脈からの流出灌流液は NO 測定装置に接続した。灌流液中に 10^{-7} mol/L のアンジオテンシン II と 10^{-5} mol/L のインドメサシンを加えることにより灌流圧を約 100mmHg (100 ± 7 mmHg) に維持した。この単離灌流腎モデルにおいて、ACh、AM、AM(22-52)、CGRP(8-37)、L-NMMA、E-4021 による腎灌流圧の変化を検討した。

3. 虚血性急性腎不全モデルの作成

さらに、これらのマウスで両側の腎動脈を 45 分圧迫閉塞し後に閉塞を解除して生じる急性腎不全モデルを作成し、虚血再灌流 24 時間後に BUN 測定のための採血後、腎臓を灌流固定し、Bowman 嚢腔の拡大、尿細管腔の拡張・壊死、尿細管上皮の脱落および円柱の程度による damage score を組織学的に検討した。これらを L-NAME の前投与下でも測定した。また AM が NO 産生に与える影響を検討するため、正常ならびに虚血再灌流後 24 時間の腎臓髓質を用いて、 ^{14}C で標識した L-アルジニンがシトルリンに変換される効率からカルシウム依存性と非依存性の NO 合成酵素 (NOS) の活性を測定した。

【結果】

TG では同腹の WT に比較して、平均血圧で約 15mmHg の血圧低下を示したが、KO では WT に比べて平均血圧で 10mmHg 程度の血圧上昇を示した。大動脈リング標本での検討では、ACh、AM そして CGRP 等の内皮依存性血管拡張物質は用量依存性に大動脈の張力を低下させたが、その程度は、WT や KO に比べて TG で有意に低下していた ($\% \Delta$ tension [10^{-5}M ACh]: KO -85.1 ± 8.7 , WT -51.9 ± 7.8 , TG -40.3 ± 7.3 , $p < 0.01$)。また内皮を剥離することにより三群間の有意差は消失した。内皮剥離による AM ならびに CGRP の血管拡張反応は 50% 以上減弱した。AM 受容体拮抗薬である AM(22-52) と CGRP(8-37) の投与により、3 群とも血管収縮作用を示した。これらの拮抗薬は WT や KO に比べて、TG において強かった ($\% \Delta$ tension [10^{-6}M CGRP(8-37)]: KO 24.0 ± 2.3 , WT 51.2 ± 3.0 , TG 74.6 ± 5.0 , $p < 0.01$)。また AM 受容体拮抗薬の作用は、内皮を剥離することにより有意差が消失した。E-4021 は単独投与にて用量依存性に血管を拡張させ、L-NAME は血管緊張を増加し、

その程度は TG>WT>KO の順であった (% Δ tension [10^{-7} M E-4021]: KO -18.7 \pm 1.9、WT -25.4 \pm 1.5、TG -35.7 \pm 2.4, p<0.05)。また L-NAME ならびに E-4021 の効果は内皮を剥離することにより減弱した。

単離灌流腎での検討では、腎灌流圧の基礎値は、KO、WT に比較して TG で有意に低下していた (KO 162 \pm 6, WT 135 \pm 7, TG 93 \pm 6 mmHg, p<0.01)。ACh、AM や CGRP は用量依存的に RPP を減少させたが、その血管拡張の程度は、KO や WT に比較して TG で減弱していた (% Δ RPP [10^{-8} M CGRP]: KO -62 \pm 3%, WT -55 \pm 2%, TG -39 \pm 7%, p<0.01)。一方、L-NMMA では TG でより強い血管収縮を示した。AM 受容体拮抗薬での検討では大動脈リング標本での検討結果と同様で、RPP を増加させ、その程度も TG>WT>KO の順であった (% Δ RPP [10^{-6} M CGRP(8-37)]: KO +49 \pm 9%, WT +94 \pm 13%, TG +135 \pm 18%, p<0.01)。

急性腎不全モデルの検討では TG において血中 BUN 値の上昇は軽度であった (BUN: KO 104 \pm 5, WT 98 \pm 15, TG 38 \pm 7 mg/dl, p<0.05)。また renal damage score も TG において WT や KO より有意に少なかった (KO 4.04 \pm 0.13, WT 3.16 \pm 0.12, TG 1.96 \pm 0.17, p<0.05)。これらの有意差は、L-NAME の前投与によって消失した。

NOS 活性の検討結果では、Ca 依存性の NOS において TG>WT>KO の順で活性の上昇を認めた ([14 C]-citrulline(pmol/min/mg protein): KO 4.47 \pm 0.54、WT 5.73 \pm 0.51、TG 8.90 \pm 0.91, p<0.05)。Ca 非依存性の NOS 活性は全群で低かった。

【考察および結語】

AM の血管拡張作用は内皮剥離、L-NAME の投与により著明に減弱する一方、E-4021 の投与により拡張したことから、AM の血管緊張調節機序は内皮依存性であり、少なくとも一部は NO-cGMP 系を介していると考えられた。またこれらの薬物による反応が TG で増強し、KO で減弱していたことより、内因性の AM が NO-cGMP 系を活性化していることが明らかとなった。さらに AM 受容体拮抗薬は TG のみならず WT でも血管緊張を亢進したことから、内因性の AM は血管緊張の生理的調節に重要な役割を担っていると考えられた。また AM を過剰発現させることによって虚血・再灌流障害から腎組織を保護することが出来、その機序として AM の NO 遊離能によることが考えられた。