

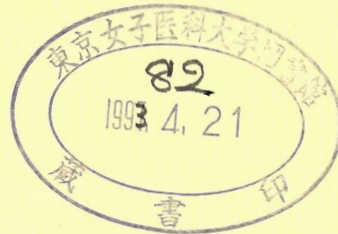
46

心房性ナトリウム利尿ペプチド受容体の発
達薬理的研究

課題番号：03670111

平成4年度科学研究費補助金（一般研究C）
研究成果報告書

平成5年3月



研究代表者 村木 篁
(東京女子医科大学・医学部・教授)

はしがき

小児の生理機能は成人と異なるため、小児の薬物療法は成人とちがった注意を要することは明らかである。発達薬理学では生後発育に伴い、薬物代謝が如何に変わるかが主に研究されて来たが、薬物感受性が発達によりどのように変動するかについての研究は研究方法が難しいこともあって少ない。我々はカルバコール・モルヒネ等の薬物が血中cGMPを増加する作用を研究する間にこれら薬物の作用が生後発達に伴い著しく変動することを見出した。心房性ナトリウム利尿ペプチド (ANP) は、グアニル酸シクラーゼを内蔵するANP-A および -B 受容体に作用して組織cGMP 含量を増加しその生理作用をあらわすと考えられる。本研究ではANPのcGMP増加作用が発達に伴い如何に変動するかを研究し、発達の間を受容体数の変動によって薬物感受性が変わる可能性のあることを明らかにし、薬物感受性の発達薬理の解明の一助としたいと考えた。

平成4年度科学研究費補助金 一般研究 (C)

研究課題 心房性ナトリウム利尿ペプチド受容体の発達薬理的研究
課題番号 03670111

研究組織

研究代表者 村木 篁 (東京女子医科大学医学部教授)

研究分担者 塚原富士子 (東京女子医科大学医学部助手)

研究経費

平成3年度 1700千円

平成4年度 300千円

合計 2000千円

研究発表

(1) 学会誌等

T.Muraki, K.Irie, Y.Uchida, T. Nomoto:

Developmental changes in the effects of atrial natriuretic peptide on tissue cyclic GMP content and particulate guanylate cyclase activity of aorta, kidney and lung of rats. *Europ J Pharmacol* 226 : 311-315, 1992

(2) 口頭発表

村木 篁・野本照子：心房性ナトリウム利尿ペプチドで刺激されるグアニル酸シクラーゼの発達による変動。第18回発達薬理・薬物治療研究会 平成3年8月 東京（学会抄録 発達薬理・薬物治療研究会雑誌 5: 49-51, 1992）

研究成果

1. 血中 cGMP を増加する薬物の薬効の発達に伴う変動

cGMP を産生するグアニル酸シクラーゼには可溶性酵素と膜結合性酵素とがあり、可溶性酵素は2量体ヘム蛋白であり NO で活性化される。ANP サブタイプ中 A および B はグアニル酸シクラーゼを分子中に内蔵し、膜結合性グアニル酸シクラーゼに属する。我々は、カルバコールやニトロプルシッドナトリウムの投与によりラット血中 cGMP が増加することを明らかにした（第1表）。カルバコールの cGMP 増加作用は生後2週齢で最大となり、後成長と共に減少する。これに対しニトロプルシッドナトリウムの作用は発達と共に増加し、成熟ラットで最大となった。ニトロプルシッドナトリウムは自動的に NO を生成して可溶性グアニル酸シクラーゼを活性化するので、恐らく血中 cGMP 産生に関与する可溶性グアニル酸シクラーゼは発達と共に増加すると考えられる。カルバコールはコリン受容体に作用し、NO 合成酵素を活性化しアルギニンから NO を産生して作用するので、カルバコールとニトロプルシッドナトリウムの発達とを比較すると、コリン受容体または NO 合成酵素活性が生後2週齢以後退縮するのではないかと考えられる。血中 cGMP は肺・腸管等に由来していると考えられるが、それら臓器のコリン受容体・NO 合成酵素が、生後2週齢以後退縮するかどうか不明であり、今後の研究課題である。

2. ANP の cGMP 産生作用の発達による変動

ANP の組織 cGMP 含量増加作用および組織ホモジェネートのグアニ

ル酸シクラーゼ活性化作用とが発達に伴いどのように変動するかを研究した。この方法ではグアニル酸シクラーゼを欠くANP-C受容体の変動は知ることができない。ANPは静注により血中cGMPを増加し降圧利尿作用を発揮するが、新生仔では手技的に困難なため、この実験は行なえず、代わりにin vitroでのANPの作用を研究した。

薬物無添加時の組織cGMP含量（基礎値）は、大動脈・心・腎では発達と共に減少し、成熟ラットで最小となった。肺スライスでは発達による基礎値の変動は明らかでない。新生仔大動脈ではcGMP含量基礎値が特に高値であるがその意義は不明である。ANP添加によるcGMP含量の増加は、大動脈・肺・腎で認められたが心では明らかでなく、心では内因性ANPの関与があるためと考えた。ANPによるスライスcGMP含量増加作用は、発達に伴い肺で増加、腎で減少、大動脈ではほぼ不変であった。

以上からANPの作用は発達により変動することが明らかであり、その変動の方向は臓器により異なることが示唆された。

3. ANPのグアニル酸シクラーゼ活性化作用の発達による変動

組織cGMP値には可溶性グアニル酸シクラーゼ及び、膜結合性グアニル酸シクラーゼの両方が関与しているので、ANPの作用する膜結合性酵素活性が発達に伴い変動するかを調べた。用いた粗酵素標本は組織ホモジェネートの100, 000×g 60分遠心沈渣を1回バッファーで洗滌し、可溶性グアニル酸シクラーゼを可及的除去したものである。ANP無添加時の膜標本によるcGMP産生量は大動脈>肺>腎>心の順であり、大動脈で特に高値を示すのは、大動脈のcGMP含量の高いことと一致する。

大動脈・肺・腎では0.1 μ m ANP添加によりcGMP産生は増加するが心では増加しなかった。少なくとも大動脈、肺、腎ではグアニル酸シクラーゼ内蔵型ANP受容体が存在し、その活性は大動脈>肺>腎の順である。ANPで刺激されるグアニル酸シクラーゼ活性は大動脈では発達により変動せず、肺では発達により増加、腎では逆に減少し組織cGMP含量の発達的変動と一致した変化を示した。即ち、ANP受容体量も、発達に伴う変動の方向が臓器により異なることが明らかになっ

た。

3. ANPとCNPの活性の比較

ANP受容体の発達による変動が組織により異なる原因の1つとして、ANP受容体サブタイプが組織によりちがった発達の変動をする可能性がある。この点を知る目的でANP-A受容体アゴニストANP（ラット1-28）ANP-B受容体アゴニストCNP（1-22）の効果がいかに異なるかを検討した（第2表）。同濃度のラットANPとCNPは肺・腎の膜結合性グアニル酸シクラーゼ活性を同程度に増強し差がなかった。また、膜結合性グアニル酸シクラーゼ活性は肺では新生仔<成熟ラット、腎では新生仔>成熟ラットであり、前述の結果を確認した。これからANP-A及びANP-B受容体は少なくとも、腎および肺では同様の発達の変動を示す。膜結合性グアニル酸シクラーゼの発達の変動が臓器により異なるのは、ANP受容体サブタイプの発達が異なるためではないと思われる。

4. ANP大動脈弛緩作用の発達による変動

ANPの生理作用に発達による変動があるか否か、大動脈弛緩作用について調べた。グアニル酸シクラーゼに強い発達の変動を示す肺ではANPの生理作用は明らかでなく、又、腎に対する作用を研究するには、新生仔にANPを静注したり採尿することが必要であるが手技的に難しかったので、今回は実験しなかった。

ANPの大動脈弛緩作用の研究はウィスター今道系雄性ラットの2、8および16週齢を用いた。ラットを断頭後、胸部大動脈を摘出し長さ1~1.5 mmのリング標本を作成した。標本はKrebs - Henseleit液を満たしたUFER マイクロ・イージーマグヌス装置（岸本医科産業）にセットし、O₂ 95%、CO₂ 5%の混合ガスを通気し、37±3℃で実験した。0.3g（2週齢）または1g（8および16週齢）の荷重下の張力をアイソトニックトランスデューサー（TB651T、日本光電）およびアイソトニックアンプ（EF-601G、日本光電）を介して記録した。

上記の静止時張力で60分間標本を安定させた後、標本の50mMKClによる収縮反応を確認し、洗滌後40分間の回復時間においてノルエピネフリン（NE） 3×10^{-7} M（NEによる収縮のEC₈₅に相当）による収縮反

応を得た。NEによる収縮反応が平衡に達した後、ANPを累積的に追加して、弛緩反応を観察した。弛緩反応はNEによる収縮高を100%とした。

ラット胸部大動脈標本はANPに対し濃度依存性の弛緩反応を示した(図1および2)。8および16週齢の血管では $ANP10^{-9}M$ より弛緩反応を生じたが、2週齢では、 $3 \times 10^{-9}M$ より反応が得られた。2週齢より8週齢血管で反応性が高い傾向が見られたが、 $10^{-9}M$ 以外では有意な差ではなかった。16週齢血管は8週齢に比べ、ANPによる弛緩反応に減弱傾向が見られたが、ANPによる反応性に有意差はなかった。2週齢と16週齢との間には、有意な差は見られなかった。ANPのラット胸部大動脈弛緩作用の EC_{50} 値は2週齢(4.5 ± 0.76) $\times 10^{-9}M$ ($n=4$)、8週齢(2.2 ± 0.60) $\times 10^{-9}M$ ($n=4$)、16週齢(3.3 ± 1.21) $\times 10^{-9}M$ ($n=3$)であった。

新生仔大動脈は細く実験できなかったが少なくとも2週齢以後ではANPのグアニル酸シクラーゼに対する作用と同様に大動脈弛緩作用にも発達的変動は見られなかった。

5. ANP受容体遺伝子発現の検出

ANP受容体cDNAをプローブとし、組織より抽出した全RNAとハイブリダイズさせるノーザンブロットにより、ANP受容体遺伝子発現の検出を試みた。ウシ型ANP受容体A、B、Cサブタイプクローン(BoARc(372 bp), BoBRc(372bp), BoCRc(1.9kb))は東工大広瀬茂久教授より供与されたものを用いた。プラスミドよりインサートを切り出し $[^{32}P]$ dCTPを用い、マルチプライム法でラベルしてcDNAプローブとした。組織より抽出した全RNA20 μ gを1%アガロースゲルで電気泳動し、ナイロン膜(Hybond N)にトランスファーし、800万cpmの ^{32}P ラベルプローブ/bagと60 $^{\circ}C$ 1夜インキュベートして、ハイブリダイズ後1 \times SSC, 0.1%SDS、および0.5 \times SSC, 0.1%SDSで洗い、オートラジオグラフィーでmRNAを検出した。ANP受容体A、B、Cサブタイプ共に明瞭なバンドは認められず、受容体mRNAを証明でなかった。この原因はmRNA量が少ないか又は用いたプローブがウシであったためラットとホモロジーが少なく、良くハイブリダイズしなかったかが考

えられた。

リボプローブを用いる ribonuclease protection assay はcDNAを用いるノーザンブロットより感度が良いと思われるので、現在上記クローンよりcRNAを調製しsolution hybridizationによりレセプターmRNAを検出する準備中である。

一方、Sugaらにより (Endocrinology 130:229,1992) 用いられた合成オリゴヌクレオチドプライマーを用い、reverse transcriptase-PCR法によりANP-A、-B受容体のmRNAをcDNAとして増幅し定量する実験を行なった。ANP-A受容体には2648～3361bp部位を増幅するプライマー対を用い、ANP-B受容体には850～1347bp部位を増幅するプライマー対を用いた。組織より抽出した全RNAをランダムプライマーを用い逆転写酵素でcDNAに転写した後、上記プライマー対を用いてPCR法を行ないcDNAの増幅検出を試みた。種々の温度・時間の組み合わせを試み、肺およびこう丸RNAよりANP-A受容体cDNAフラグメントを増幅できたが、安定した結果が得られるよう更に実験条件を検討中である。しかし、最近の報告によれば (Biochem Biophys Res Commun 189: 610, 1992) ANP-A、ANP-B受容体共に肝臓以外ほとんどすべての組織で同様に発現していることが知られた。

我々も今後、PCR法によりANP受容体遺伝子発現が発達によりどう変動するか検討して行く予定である。

第1表 ラット血中 cGMP 濃度の発達による変動

| | 血中 cGMP (pmol/ml) (mean ± SE) | | |
|-------|-------------------------------|----------------------|-------------------------------|
| | 生食 (10ml/kg) | カルバコール (0.5mg/kg) | ニトロプルシッド ナトリウム (5mg/kg) |
| 新生仔 | 4.3 ± 0.4 | 6.9 ± 0.6* | 13.9 ± 1.7* |
| 2週齢 | 18.9 ± 4.4 | 158.1 ± 13.5* | 68.3 ± 4.1* |
| 成熟ラット | 18.5 ± 3.2 | 37.1 ± 7.3* | 97.7 ± 9.2* |

血中 cGMP は薬物皮下投与 10 分後に測定

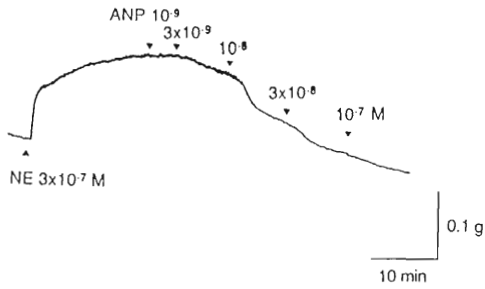
実験動物数 5 ~ 12 匹 *P < 0.05 (生食に対し)

第2表 ラット ANP および CNP の膜結合性グアニル酸シクラーゼ活性に及ぼす影響

| | | グアニル酸シクラーゼ活性 (pmol cGMP / mg タン白 / 5分) (mean ± SE) | |
|---|-------------|---|---------------|
| | | 新生仔 | 成熟ラット (9週齢) |
| | 薬物 (1μM) | | |
| 腎 | — | 15.6 ± 1.6 | 6.0 ± 1.0 |
| | ラット ANP | 27.2 ± 3.1* | 11.9 ± 1.9* |
| | CNP | 28.3 ± 3.2* | 9.2 ± 0.5* |
| 肺 | — | 20.2 ± 2.3 | 88.6 ± 5.7 |
| | ラット ANP | 36.4 ± 3.3* | 131.6 ± 17.4* |
| | CNP | 40.7 ± 4.0* | 125.3 ± 15.9* |

*P<0.05 (薬物無添加に対し)
(6回の実験の平均)

2W



8W

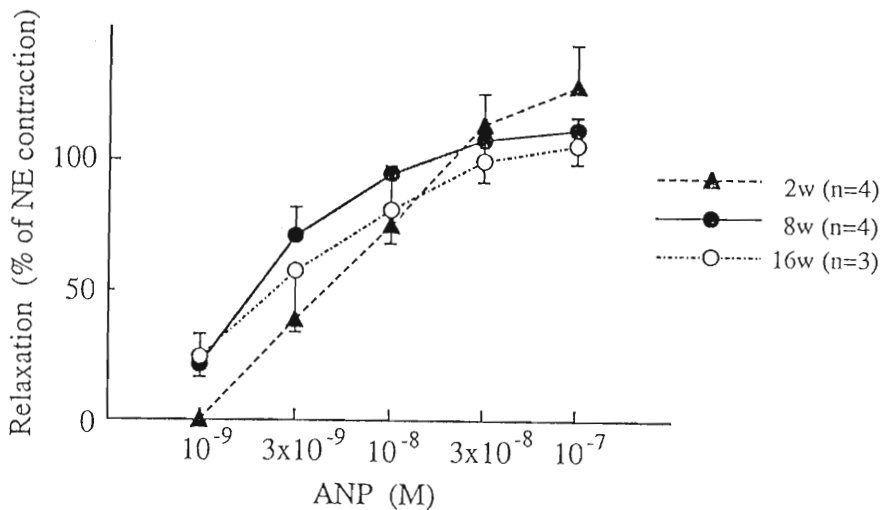
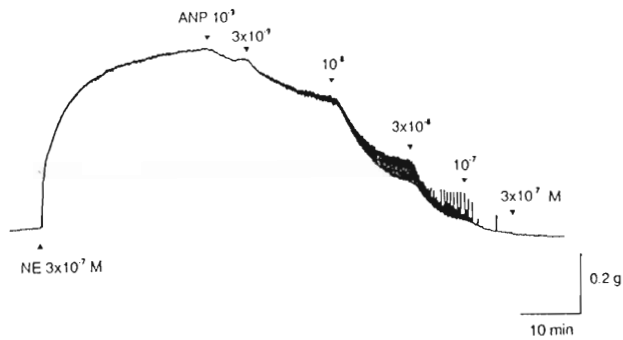


図1. 2週齢ラット胸部大動脈のANPによる弛緩反応。
上：2週齢、下：8週齢。

図2. 2、8および16週齢ラット胸部大動脈のANPによる弛緩反応の濃度作用曲線。

大動脈のリング状標本を、0.3 g (2週齢) または1 g (8および16週齢) の荷重下に、予めノルエピネフリン (NE) 3×10^{-7} Mで収縮させ、プラトーに達したところで、ANP $10^{-9} \sim 10^{-7}$ Mを累積的に浴中に添加した。NEによる収縮反応を100%として表現。値は平均値±標準誤差。