

9639 ナトリウム利尿ペプチドおよび塩分調節に関与するペプチドの視床下部神経分泌ニューロンに対する作用の分子生理学的解析

助成研究者：山下 博(産業医科大学 医学部)
 共同研究者：澁谷 泉(産業医科大学 医学部)
 上田 陽一(産業医科大学 医学部)
 梶島 成利(産業医科大学 医学部)

食塩は生命の維持にとって不可欠である。生体内で塩および水分の恒常性を維持するために、ペプチドホルモンのような種々の生理活性物質が関与しており、脳とりわけ視床下部において巧妙に統合・制御されている。塩および水分の恒常性維持に働くペプチドホルモンの代表的なものとして、下垂体後葉ホルモン(バゾプレッシン(AVP)およびオキシトシン(OXT))、ナトリウム利尿ペプチド(ANP, BNPおよびCNP)、アンギオテンシンIIおよびアドレノメデュリン(AM)が挙げられる。AVPおよびOXTは視床下部室傍核および視索上核で産生され、下垂体後葉から分泌される。この部位には、ナトリウム利尿ペプチドおよびAMも存在することを我々は見出した。今回、電気生理学的手法に加えて近年急速に進歩を遂げた分子生物学的手法のうち*In situ*ハイブリダイゼーション法およびカルシウム画像解析法を導入し、新たな降圧ペプチドであるAMに焦点を絞り、AVPおよびOXT産生ニューロンに対する作用機序についての検討を行なった。

実験にはウイスター系雄ラットを用いた。パッチクランプ法を用いて、視床下部視索上核の単一神経分泌ニューロンから電気記録を行なったところAM (10^{-7} M)で、明らかな外向き電流が流れた。また、記録した神経分泌ニューロンへの興奮性入力を示すシナプス電流の頻度には、明らかな影響は見られなかった。単離した神経分泌ニューロンにAM (10^{-7} M)を投与して、蛍光色素(Fura-2)を用いて細胞内カルシウムの動態を測定した。その結果、AMを投与している間、細胞内カルシウム濃度が増加する細胞が見い出された。AM (1, 10 μ g/10 μ l)の脳室内投与30分後の室傍核および視索上核での*c-fos* mRNAの発現は著明に増加していた。AM (5 μ g/10 μ l)を脳室内投与して、直後、30、60および180分後の視索上核および室傍核での*c-fos* mRNAの発現は、30分後が最も増加しており、180分後には消失した。AM受容体拮抗剤(AM22-52, 10, 100 μ g/5 μ l)およびAM (1 μ g/5 μ l)を脳室内投与して30分後の視索上核および室傍核の*c-fos* mRNAの発現を調べたところ、AMによる*c-fos* mRNAの発現は、AM受容体拮抗剤の前投与で著明に抑制された。以上のように、今回我々はAVPおよびOXTを産生し下垂体後葉から分泌する神経内分泌ニューロンの神経活動がAMにより修飾されることを示した。

9639 ナトリウム利尿ペプチドおよび塩分調節に関与するペプチドの視床下部神経分泌ニューロンに対する作用の分子生理学的解析

助成研究者：山下 博(産業医科大学 医学部)
共同研究者：澁谷 泉(産業医科大学 医学部)
上田 陽一(産業医科大学 医学部)
椛島 成利(産業医科大学 医学部)

1. 研究目的

食塩は生命の維持にとって不可欠である。生体内で塩および水分の恒常性を維持するために、ペプチドホルモンのような種々の生理活性物質が関与しており、脳とりわけ視床下部において巧妙に統合・制御されている。塩および水分の恒常性維持に働くペプチドホルモンの代表的なものとして、下垂体後葉ホルモン(バゾプレッシン(AVP)およびオキシトシン(OXT))、ナトリウム利尿ペプチド(ANP, BNPおよびCNP)、アンギオテンシンIIおよびアドレノメデュリン(AM)が挙げられる。AVPは腎に作用して水の再吸収を行ない、OXTはナトリウム利尿作用を有することも報告されている。ナトリウム利尿ホルモンは、強力なナトリウム利尿作用を有し、AVP、アンギオテンシンIIなどの昇圧ホルモンと拮抗的に作用する。最近、AMが副腎髄質に大量に存在し、ナトリウム利尿およびナトリウムに対する指向性を抑制することにより降圧作用を引き起こすことが報告された。AVPおよびOXTは視床下部室傍核および視索上核で産生され、下垂体後葉から分泌される。この部位には、ナトリウム利尿ペプチドおよびAMも存在することを我々は見出し、これらのペプチドが、この部位で神経伝達物質もしくは神経修飾物質として働く可能性を提言した[5, 9]。我々は、これまで一貫してAVPおよびOXT産生ニューロンに対する種々の循環関連ペプチドホルモンの作用機序について電気生理学的手法を用いて明らかにしてきたが[2, 8]、今回は電気生理学的手法に加えて近年急速に進歩を遂げた分子生物学的手法のうち*In situ*ハイブリダイゼーション法[6]およびカルシウム画像解析法を導入し[4]、新たな降圧ペプチドであるAMに焦点を絞り、AVPおよびOXT産生ニューロンに対する作用機序についての検討を行なった。

2. 研究方法

実験にはウイスター系雄ラットを用いて、視床下部室傍核および視索上核の神経分泌ニューロン(AVPおよびOXT産生細胞)に焦点を当てて以下のアプローチにより研究を行なった。

2.1 電気生理学的アプローチ

ウイスター系成熟雄ラットを断頭後、脳をすばやく取り出し、スライス標本(150 μ m)を作成し、人工脳脊髄液で灌流(1.5ml/min)した。ホールセルおよびナイスタチン穿孔パッチクランプ法の両者を用いて、赤外線顕微鏡下で視床下部視索上核の神経分泌ニューロンから電気記録を行なった[2]。この灌流液中にAMを加えて、単一ニューロンから記録したイオン電流及びシナプス入力に対する影響を膜電流レベルで検討した。

2.2 カルシウム画像解析によるアプローチ

ウイスター系幼若雄ラット(生後10-20日)を断頭後、脳をすばやく取り出し、スライス標本(300 μ m)を作成した。視索上核を含む組織を切り出し、蛋白分解酵素で処理後、ピペットを用いて機械的に神経分泌ニューロンを単離した。単離した神経分泌ニューロンから蛍光色素(Fura-2)によって可視化された細胞内カルシウムの動態を画像解析装置を用いて測定した[4]。

2.3 *In situ* ハイブリダイゼーション法を用いた分子生物学的アプローチ

ネンプター麻酔下(50mg/kg体重)で、脳定位固定装置を用いてラット左側脳室上方1mmのところガイドカニューレを刺入し、歯科用セメントで固定した。5日間の回復期間後、AMを覚醒下でラット脳室内に投与した。断頭後、脳をすばやく取り出し、ドライアイス上で凍結した。クリオスタットを用いて、12 μ mの凍結切片を作成し、-80 $^{\circ}$ Cに保存した。4%ホルマリン(5min)で固定後、脱イオン、脱水および脱脂を行なった。ハイブリダイゼーションバッファー溶液に³⁵SでRI標識したラット*c-fos*遺伝子に相補的な合成オリゴヌクレオチドプローブ(48mer、138-185塩基)を加えて、18-20時間インキュベーション(37 $^{\circ}$ C)した。洗浄は、1xSSC溶液で15分間x4回(55 $^{\circ}$ C)および30分間x2回(室温)を行なった。乾燥後、スライドをHyperfilm(アマシャム)に7-14日間露光した。

2.3.1 AM(1, 10 μ g/10 μ l)を脳室内投与して、30分後に断頭した。

2.3.2 AM(5 μ g/10 μ l)を脳室内投与して、0、30、60および180分後に断頭した。

2.3.3 AM受容体拮抗剤(AM22-52)(10, 100 μ g/5 μ l)およびAM(1 μ g/5 μ l)を脳室内投与して、30分後に断頭した。

3. 研究結果

3.1 電気生理学的アプローチ

パッチクランプ法を用いて、視床下部視索上核の単一神経分泌ニューロンから電

気記録を行ない、この灌流液中にAM (10^9 - 10^6 M) を加えて、単イオン電流及びシナプス入力に対する影響を検討した。その結果、 10^7 Mで、明らかな外向き電流が流れた (Fig. 1)。また、記録した神経分泌ニューロンへの興奮性入力を示すシナプス電流の頻度には、明らかな影響は見られなかった (Fig. 2)。

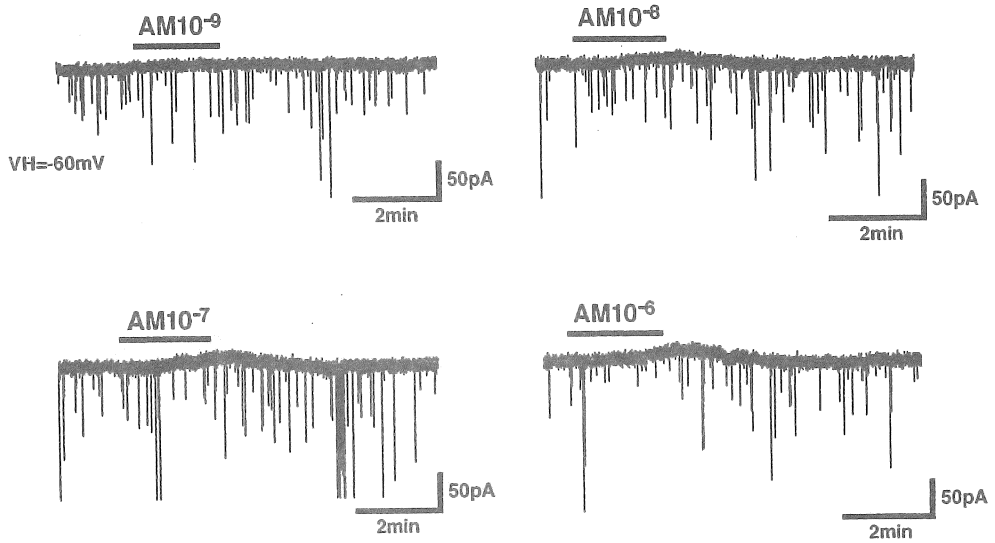


Fig. 1 Effects of adrenomedullin (AM) on a neuron in the supraoptic nucleus (SON)
Perforated patch clamp recordings were performed in the slice preparation.

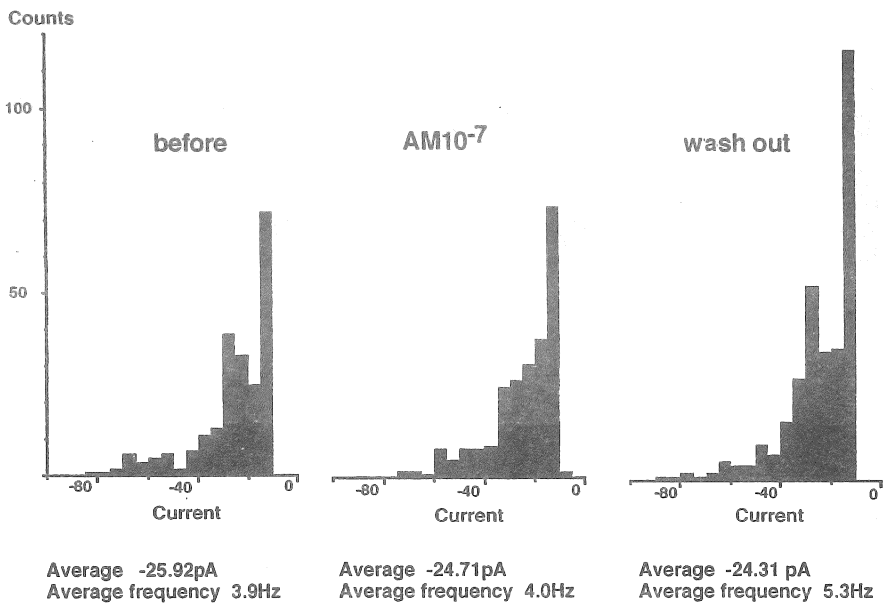


Fig. 2 Effects of adrenomedullin (AM) on the synaptic current amplitude histograms of excitatory postsynaptic currents (EPSCs)

3.2 カルシウム画像解析によるアプローチ

単離した神経分泌ニューロンにAM (10^{-7} M) を投与して、蛍光色素(Fura-2)を用いて細胞内カルシウムの動態を測定した。その結果、AMを投与している間、細胞内カルシウム濃度が増加する細胞が見い出された (Fig. 3)。

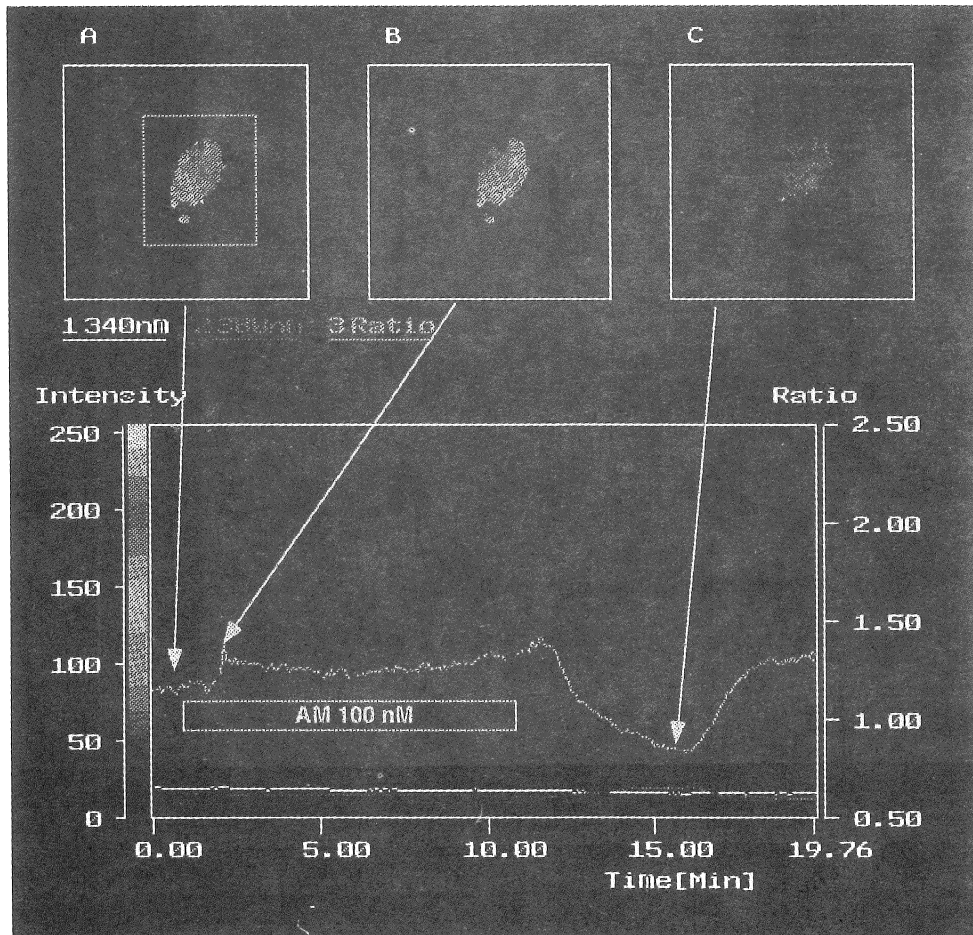


Fig. 3 Effects of adrenomedullin (AM) on intracellular Ca^{2+} concentration of a dissociated neuron from the supraoptic nucleus (SON)

3.3 分子生物学的アプローチ

3.3.1 AM (1, 10 $\mu\text{g}/10\mu\text{l}$) を脳室内投与して30分後の室傍核および視索上核での c-fos mRNA の発現をコントロールと比較して、著明に増加していた (AM1 μg 投与 : 室傍核で3.9倍、視索上核で3.4倍、AM10 μg 投与 : 室傍核で12.5倍、視索上核で9.1倍、各6匹) (Fig. 4)。

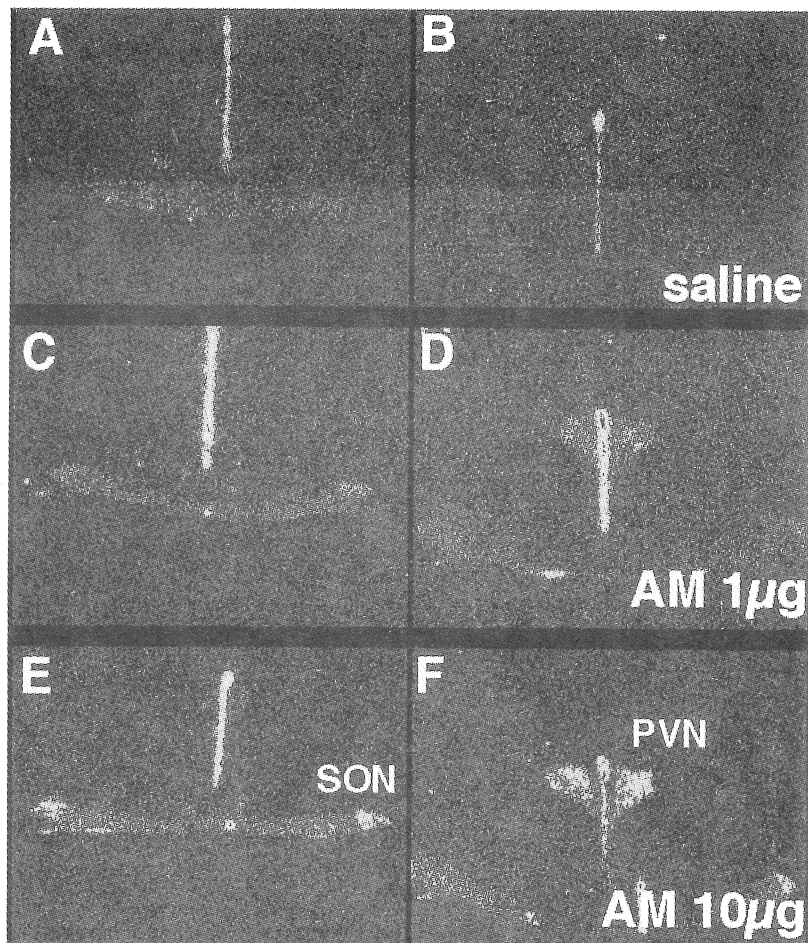


Fig. 4 Effects of central administration of adrenomedullin (AM) (saline, 1 and 10 μ g) on the expression of *c-fos* gene in the supraoptic (SON)(A, C and E) and paraventricular nuclei (PVN) (B, D and F)

3.3.2 AM (5 μ g/10 μ l) を脳室内投与して、直後、30、60および180分後の視索上核および室傍核での*c-fos* mRNAの発現は、30分後が最も増加しており、180分後には消失した (Fig. 5)。

3.3.3 AM受容体拮抗剤 (AM22-52, 10, 100 μ g/5 μ l) およびAM (1 μ g/5 μ l) を脳室内投与して30分後の視索上核および室傍核の*c-fos* mRNAの発現を調べたところ、AMによる*c-fos* mRNAの発現は、AM受容体拮抗剤の前投与で著明に抑制された。

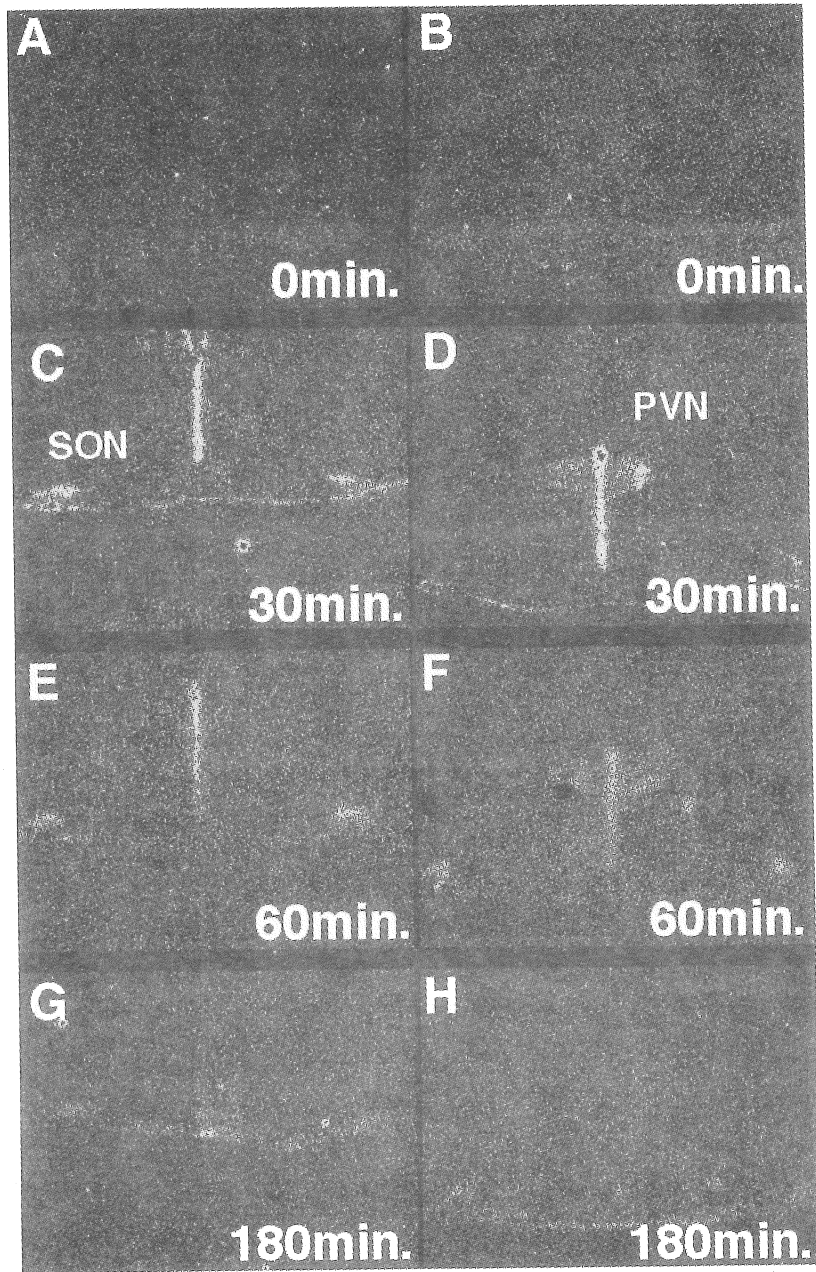


Fig. 5 The expression of c-fos gene 0, 30, 60 and 180 min after central administration of adrenomedullin (AM)(5 μ g) in the supraoptic (SON)(A, C, E and G) and paraventricular nuclei (PVN)(B, D, F and H)

4. 考察

我々は、AM免疫陽性細胞がラット視床下部室傍核および視索上核に多数存在することを見出し、AMがこれらの部位でオートクライン・パラクラインとして作用する可能性を提言した[5, 9]。今回、視索上核の神経分泌細胞にAMを投与すると膜電位が変化すること、神経分泌細胞の細胞内カルシウムが増加すること、およびAMを脳室内に投与すると室傍核および視索上核のc-fos mRNAが増加し、この反応はAM拮抗剤により消失することを示した。

AMを脳室内投与すると、Hypovolemiaが誘発するナトリウム摂取の促進を抑制することが最近報告された。また、腎臓に直接作用してナトリウム利尿を引き起こすことやアルドステロン分泌を抑制することも報告されている。したがって、末梢、中枢にかかわらずAMが生体のナトリウム維持機構に深く関与していることが示唆される。

今回の我々の結果は、バゾプレッシンおよびオキシトシンを産生し、下垂体後葉から分泌する神経内分泌細胞の神経活動がAMにより修飾されることを示した。したがって、抗利尿作用をもつバゾプレッシンおよびナトリウム利尿作用が見い出されているオキシトシンの分泌を修飾することにより生体内のナトリウム維持機構に関与している可能性が示唆された。

5. 今後の課題

我々は、現在、種々の神経ペプチドの作用を多角的に解析中である[1, 2, 3, 4, 7]。それらの結果を踏まえ、今後、AMの神経分泌ニューロンへの作用機序や中枢内での生理的役割を解明していく必要がある。また、AM受容体を同定することにより、その細胞内情報伝達系を解明していくことも重要な課題である。さらに、ナトリウム利尿ホルモンとの相互連関についての検討も必要である。

6. 文献

1. Nagatomo, T., Shibuya, I., Kabashima, N., Harayama, N., Ueta, Y., Toyohira, Y., Uezono, Y., Yanagihara, N., Izumi, F., Wada, A. and Yamashita, H. Proadrenomedullin N-terminal 20 peptide (PAMP) reduces inward currents and Ca^{2+} rises induced by nicotine in bovine adrenal medullary cells. *Life Sci.*, 59(20): 1723-1730.
2. Nagatomo, T., Inenaga, K. and Yamashita, H. Transient outward current in adult rat supraoptic neurones with slice patch-clamp technique: inhibited by angiotensin II. *J. Physiol. (London)*, 485.1: 87-96.

3. Osajima, A., Uezono, Y., Tamura, M., Kitamura, K., Mutoh, Y., Ueta, Y., Kangawa, K., Kawamura, M., Eto, T., Yamashita, H., Izumi, F., Takasugi, M. and Kuroiwa, A. Adrenomedullin-sensitive receptors are preferentially expressed in cultured rat mesangial cells. *Eur. J. Pharmacol.*, 315: 319-325, 1996.
4. Tanaka, K., Shibuya, I., Nagatomo, T., Yamashita, H. and Kanno, T. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide causes rapid Ca^{2+} release from intracellular stores and long lasting Ca^{2+} influx mediated by Na^{+} influx-dependent membrane depolarization in bovine adrenal chromaffin cells. *Endocrinology*, 137: 956-966, 1996.
5. Ueta, Y., Kitamura, K., Isse, T., Shibuya, I., Kabashima, N., Yamamoto, S., Kangawa, K., Matsuo, H., Eto, T. and Yamashita, H. Adrenomedullin-immunoreactive neurons in the paraventricular and supraoptic nuclei of the rat. *Neurosci. Lett.*, 202: 37-40, 1995.
6. Ueta, Y., Levy, A., Chowdrey, H.S. and Lightman, S.L. Hypothalamic nitric oxide synthase gene expression is regulated by thyroid hormones. *Endocrinology*, 136: 4182-4187, 1995.
7. Yamamoto, S., Morimoto, I., Yanagihara, N., Zeki, K., Fujihira, T., Izumi, F., Yamashita, H. and Eto, S. Parathyroid hormone-related peptide-(1-34)[PTHrP-(1-34)] induces vasopressin release from the rat supraoptic nucleus in vitro through a novel receptor distinct from a type I or type II PTH/PTHrP receptor. *Endocrinology*, 138: 2066-2072, 1997.
8. Yamashita, H., Inenaga, K., Cui, L.-N., Nagatomo, T., Ueta, Y. and Shibuya, I. Chemical control of vasopressin and oxytocin neurons in the supraoptic nucleus. *Neurohypophysis: Recent progress of vasopressin and oxytocin research*, 197-204, 1995.
9. 山下博 中枢におけるアドレノメデュリン 現代医療28(11)2837-2840, 1996.

Effects of natriuretic polypeptides and sodium-related peptides on the hypothalamic neurosecretory neurons: molecular and physiological aspects

Hiroshi Yamashita, Izumi Shibuya, Yoichi Ueta and Narutoshi Kabashima
Department of Physiology,
University of Occupational and Environmental Health, Japan

Summary

The hypothalamus and neuroendocrine system is known to have an important role in the integrative regulation of sodium balance in a body. We have examined the effects of natriuretic polypeptides and sodium-related peptides on the hypothalamic neurosecretory neurons, using morphological, electrophysiological and molecular techniques. In the present study we examined the effects of adrenomedullin (AM) that is a new potent hypotensive and natriuretic peptide on membrane potential, excitatory postsynaptic currents (EPSCs), intracellular Ca^{2+} concentrations and the expression of the *c-fos* gene in the rat hypothalamic neurosecretory neurons. The outward currents were observed in the adult rat supraoptic (SON) neurons of the slice preparation, using perforated patch-clamp technique. On the other hand, the recorded EPSCs were not affected by the administration of AM in the perfused solution. Ca^{2+} imaging method using fura-2 revealed that AM caused a marked increase of intracellular Ca^{2+} concentrations in the neuron isolated from the immature rat SON. The effects of central administration of AM on the expression of the *c-fos* gene in the hypothalamus were also examined by *in situ* hybridization histochemistry. Intracerebroventricular (icv) administration of AM caused a remarkable increase in the expression of the *c-fos* gene in the SON and paraventricular nucleus (PVN) in a dose and time dependent manner. The induction of the *c-fos* gene reached the peak at 30 min after central administration of AM. The effects of AM on the induction of the *c-fos* gene was blocked by pretreatment with AM receptor antagonist (AM22-52). These results suggest that AM may have an important role to modulate the neuronal activity of neurosecretory neurons in the hypothalamus and be involved in the central regulation of sodium balance in a body.