

9848 塩分嗜好性に関与する新たなペプチドであるアドレノメデュリンと
その関連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
分子生理学的検討

助成研究者：山下 博 (産業医科大学 医学部)
共同研究者：渋谷 泉 (産業医科大学 医学部)
上田 陽一 (産業医科大学 医学部)
芹野 良太 (産業医科大学 医学部)

アドレノメデュリン (adrenomedullin; AM) は北村らにより、副腎髄質由来ヒト褐色細胞腫から発見されたペプチドホルモンである。AMは末梢血管拡張性の強力な降圧作用、腎臓からのナトリウム利尿およびナトリウムに対する嗜好性を抑制する作用を有することが報告されている。

今回我々は、AMの視床下部一下垂体系における存在様式および下垂体後葉に軸索輸送されている可能性、AMのオキシトシン分泌に対する作用、さらにAMのスーパーファミリーペプチドと考えられているproadrenomedullin N-terminal 12 peptide (PAMP-12)、PAMP-20、calcitonin gene-related peptide (CGRP) およびAmylinの神経分泌ニューロンへの作用についてFos蛋白を指標に検討した。コルヒチン前投与および下垂体摘除ラットの視床下部室傍核および視索上核におけるAM免疫陽性細胞および線維の染色性が増加した。コルヒチン前投与および下垂体摘除ラットにおいて正中隆起内層にAM免疫陽性線維とAM免疫陽性の数珠状の小結節が観察された。覚醒ラットにAM (1, 10 μ g/10 μ l) を側脳室内に投与することにより血液中オキシトシン濃度が著明に増加した。覚醒ラットにAMを側脳室内に投与すると、室傍核大細胞群腹内側部、小細胞群および視索上核背側部に限局してFos蛋白陽性細胞が見られた。PAMP-12を側脳室内に投与すると、室傍核および視索上核全域に弱いFos蛋白の発現が見られた。PAMP-20を側脳室内に投与すると、室傍核および視索上核全域に強いFos蛋白の発現が見られた。CGRPを側脳室内に投与すると、室傍核大細胞群および視索上核全域に強いFos蛋白の発現が見られた。Amylinおよびvehicleを側脳室内に投与すると、室傍核および視索上核全域にFos蛋白の発現がほとんど見られなかった。

したがって、AMは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視床下部で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。AMおよびAM関連ペプチドの視床下部室傍核および視索上核への作用をFos蛋白の発現を指標に検討したところ、異なる作用が見い出された。これらの生理学的意義については今後の検討が必要である。

9848 塩分嗜好性に関与する新たなペプチドであるアドレノメデュリンとその関連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検討

助成研究者：山下 博 (産業医科大学 医学部)
共同研究者：渋谷 泉 (産業医科大学 医学部)
上田 陽一 (産業医科大学 医学部)
芹野 良太 (産業医科大学 医学部)

1. 研究目的

アドレノメデュリン (adrenomedullin; AM) は北村らにより、副腎髄質由来ヒト褐色細胞腫から発見されたペプチドホルモンである[1]。AMは末梢血管拡張性の強力な降圧作用、腎臓からのナトリウム利尿およびナトリウムに対する嗜好性を抑制する作用を有することが報告されている。また、AMは末梢組織だけでなく脳内でも産生されることが明らかとなっている。

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統合・制御されている。視床下部室傍核および視索上核に存在する神経分泌ニューロンは軸索を下垂体後葉に投射し、下垂体後葉ホルモン (バゾプレッシンおよびオキシトシン) を下垂体門脈中に分泌する。バゾプレッシンは腎臓に作用して水分の再吸収による抗利尿作用を有する。オキシトシンは、乳汁分泌・子宮筋収縮作用のみならず、ナトリウム利尿作用をも有することが報告されている。視床下部における神経分泌ニューロンはバゾプレッシンおよびオキシトシンを産生しているだけではなく、種々の生理活性物質とも共存している。我々は、AM[2]をはじめウロコルチン[3,4]、PTHrP[5,6]、PACAP[7]、神経型NO合成酵素[8,9]と下垂体後葉ホルモンとの共存とその生理的意義について検討してきた。

今回我々は、AMの視床下部一下垂体系における存在様式および下垂体後葉に軸索輸送されている可能性、AMのオキシトシン分泌に対する作用、さらにAMのスーパーファミリーペプチドと考えられているproadrenomedullin N-terminal 12 peptide (PAMP-12)、PAMP-20、calcitonin gene-related peptide (CGRP) およびAmylinの神経分泌ニューロンへの作用についてFos蛋白を指標に検討した。

2. 研究方法

実験にはすべてウイスター系成熟雄ラットを用いて、以下の実験を行った。薬物の脳室内注入のために、ネンブタール麻酔下で側脳室上方1mmの位置にガイドカ

ニューレを挿入し、頭蓋骨にデンタルセメントで固定し、少なくとも5日間の回復期間を置いた。

2.1 AMの視床下部一下垂体系における存在様式および下垂体後葉に軸索輸送されている可能性

ウイスター系成熟雄ラットの側脳室内にコルヒチン（100 μ g/ラット）を投与し、2日後にネンブタール麻酔下で灌流固定を行った。コントロールラットには、側脳室内に生理食塩水を投与した。また、下垂体摘除ラットおよびコントロール（sham-operated）ラットは、手術5日後にネンブタール麻酔下で灌流固定を行った。脳を取り出し、2日間の後固定後に視床下部を含む脳切片（厚さ40 μ m）を作製し、抗アドレノメデュリン抗体を用いてavidin-biotin peroxidase complex（ABC）法により免疫組織化学的染色を行った。

2.2 AMのオキシトシン分泌に対する作用

覚醒下のウイスター系成熟雄ラット側脳室にAM（1, 10 μ g/10 μ l）を投与して、5分、10分および15分後に断頭し、体幹部から血液を採取した。血清を遠心分離後、ラジオイムノアッセイ法によりオキシトシン濃度を測定した。

2.3 AM、PAMP-12、PAMP-20、CGRPおよびAmylinの神経分泌ニューロンへの作用

覚醒下のウイスター系成熟雄ラット側脳室にAM、PAMP-12、PAMP-20、CGRPおよびAmylinを10 μ g/10 μ lを投与して90分後にネンブタール麻酔下で灌流固定を行った。コントロールラットには、側脳室内に生理食塩水（10 μ l）を投与した。脳を取り出し、2日間の後固定後に視床下部を含む脳切片（厚さ40 μ m）を作製し、抗Fos蛋白抗体を用いてABC法により免疫組織化学的染色を行った。

3. 研究結果

3.1 AMの視床下部一下垂体系における存在様式および下垂体後葉に軸索輸送されている可能性

コルヒチン前投与および下垂体摘除ラットの視床下部室傍核および視索上核におけるAM免疫陽性細胞および線維の染色性が増加した（Fig. 1）。AM免疫陽性細胞の視床下部における分布をFig. 2に示した。AM免疫陽性細胞は室傍核および視索上核に多く分布していた（Fig. 2）。コルヒチン前投与および下垂体摘除ラットにおいて正中隆起内層にAM免疫陽性線維とAM免疫陽性の数珠状の小結節が観察された（Fig. 3）。

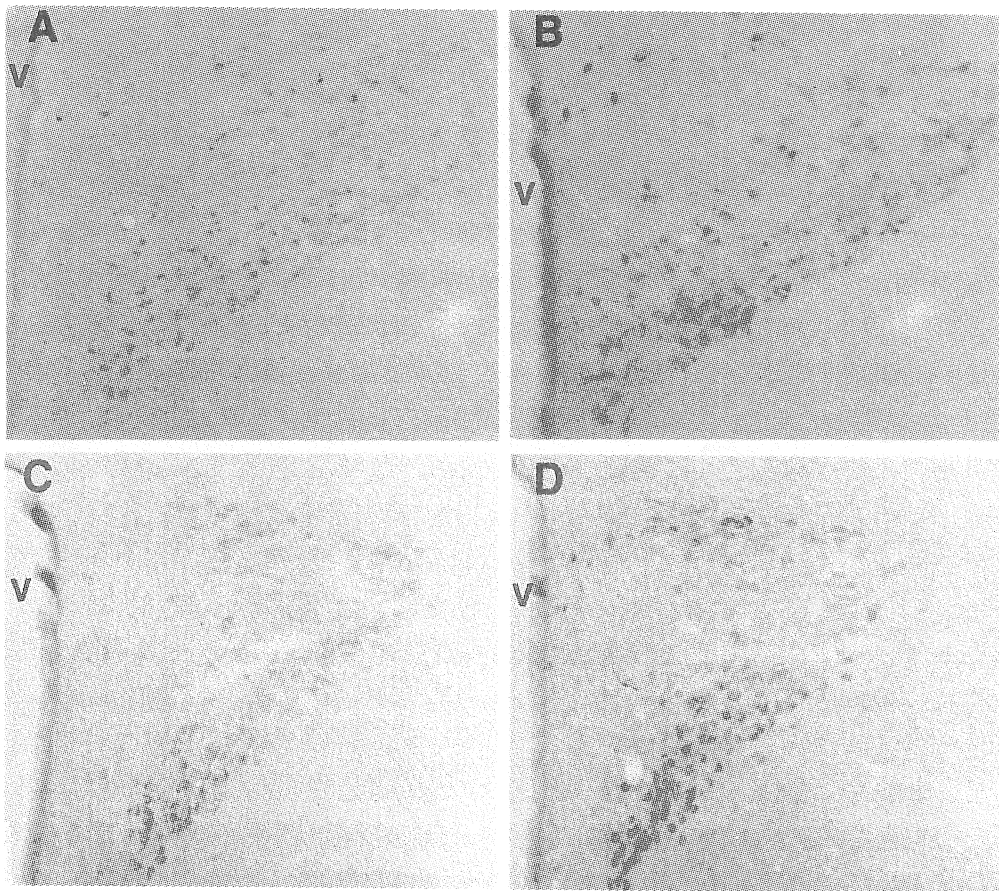


Fig. 1 Effects of colchicine-treatment and hypophysectomy on adrenomedullin (AM)-like immunoreactivity in the rat paraventricular nucleus. A, brain section was obtained from a vehicle-treated rat; B, brain section from a colchicine-treated rat; C, brain section from a sham-operated rat; D, brain section from a hypophysectomized rat. v: the third ventricle. The scale bar is 50 μ m.

3.2 AMのオキシトシン分泌に対する作用

覚醒ラットにAM (1, 10 μ g/10 μ l) を側脳室内に投与することにより血液中オキシトシン濃度が著明に増加した (Fig. 4)。高濃度のAM (10 μ g) の側脳室投与5分、10分および15分後では血液中オキシトシン濃度が有意に増加していた (Fig. 4)。

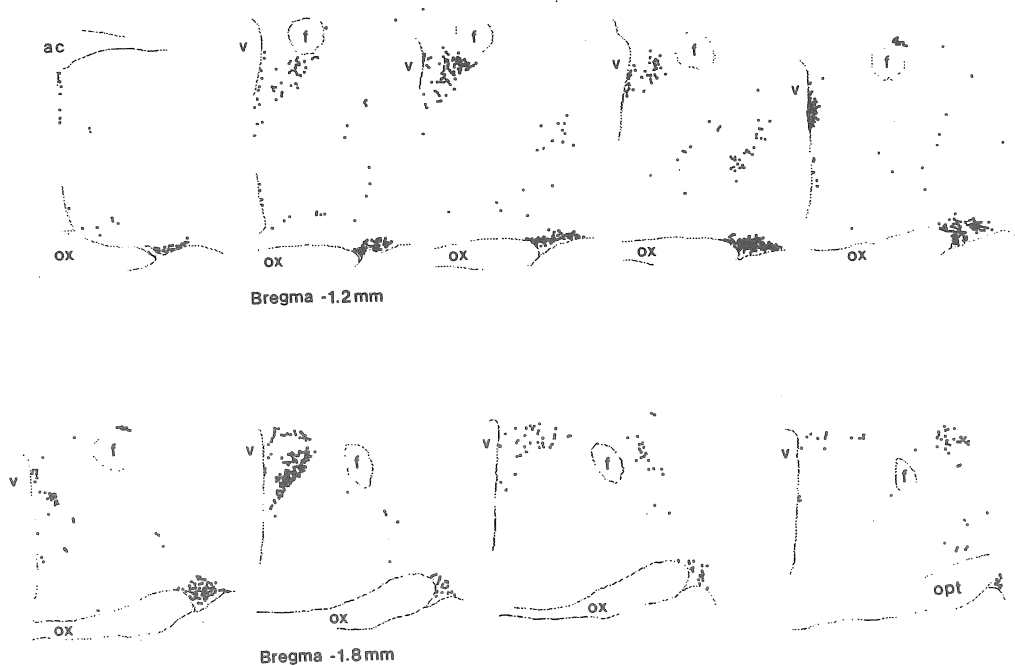


Fig. 2 Distribution of adrenomedullin-like immunoreactive (AM-LI) neurons in the rat hypothalamic area. Every fourth slice was used for the mapping. The thickness of the section was 40 μm . ac: anterior commissure, f: fornix, v: the third ventricle, ox: optic chiasma, opt: optic tract. The closed circle indicates an AM-LI neuron.

3.3 AM、PAMP-12、PAMP-20、CGRPおよびAmylinの神経分泌ニューロンへの作用

覚醒ラットにAM (10 $\mu\text{g}/10\mu\text{l}$) を側脳室内に投与すると、室傍核大細胞群腹内側部、小細胞群および視索上核背側部に限局してFos蛋白陽性細胞が見られた (Fig. 5&6A)。PAMP-12 (10 $\mu\text{g}/10\mu\text{l}$) を側脳室内に投与すると、室傍核および視索上核全域に弱いFos蛋白の発現が見られた (Fig. 5&6B)。PAMP-20 (10 $\mu\text{g}/10\mu\text{l}$) を側脳室内に投与すると、室傍核および視索上核全域に強いFos蛋白の発現が見られた (Fig. 5&6C)。CGRP (10 $\mu\text{g}/10\mu\text{l}$) を側脳室内に投与すると、室傍核大細胞群および視索上核全域に強いFos蛋白の発現が見られた (Fig. 5&6D)。Amylin (10 $\mu\text{g}/10\mu\text{l}$) およびvehicleを側脳室内に投与すると、室傍核および視索上核全域にFos蛋白の発現がほとんど見られなかった (Fig. 5&6E, F)。

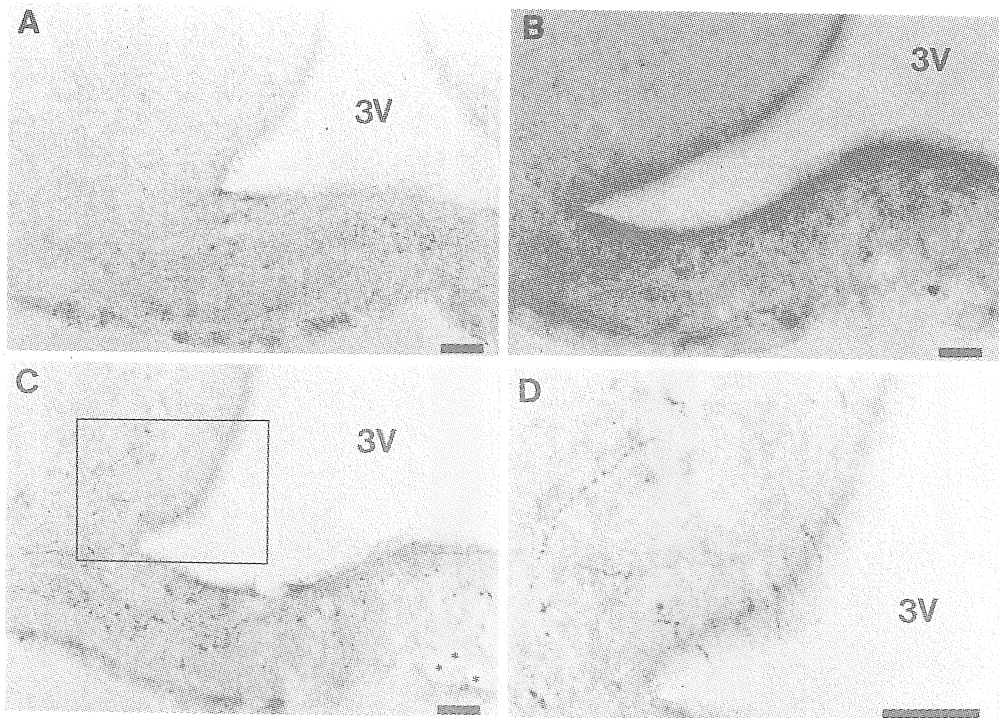


Fig.3 Effects of colchicine-treatment and hypophysectomy on adrenomedullin (AM)-like immunoreactivity in the rat median eminence. A, brain section was obtained from a sham-operated rat; B, brain section from a colchicine-treated rat; C, brain section from a hypophysectomized rat; D, an enlargement of the boxed area in 'C'. The arrowheads indicate varicosities of the AM-LI fibers in the median eminence. 3V: the third ventricle. The scale bars are 50 μ m.

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たが、そのAMが下垂体後葉に運ばれているかどうかは不明であった[2]。今回、軸索輸送を止めるコルヒチン前処置および下垂体摘除により視床下部一下垂体系の経路にAM陽性線維が観察された[10]。したがって、視床下部に存在するAM産生細胞から軸索流により下垂体後葉にAMが運ばれていることが確かめられた。さらに、一部脳室周囲にもAM免疫陽性線維が見られたことから、脳室内へのAMの分泌も推測された。

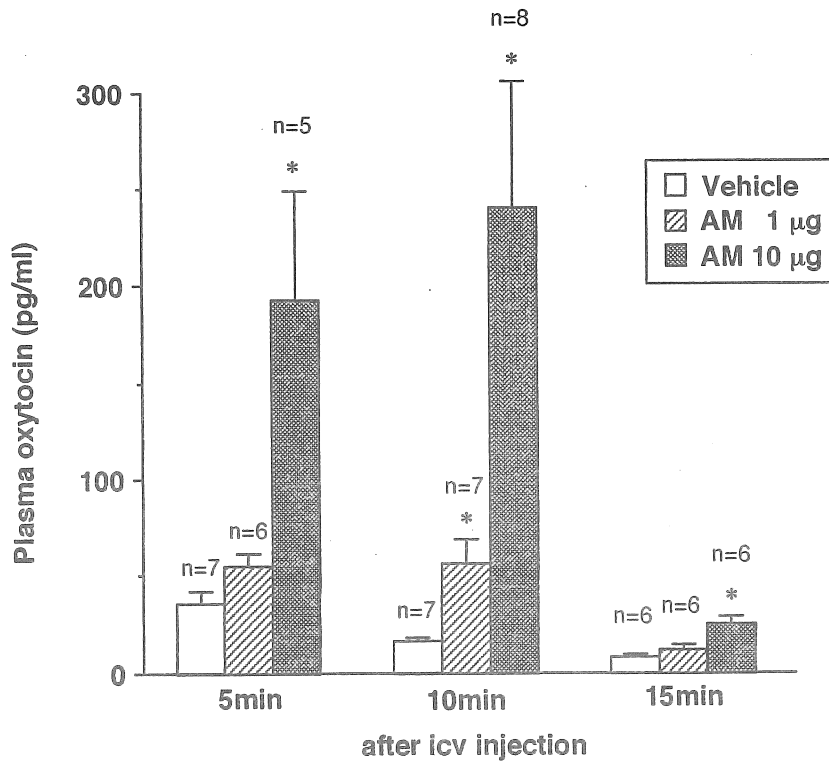


Fig.4 Effects of centrally administered adrenomedullin (AM) on the plasma oxytocin level in conscious rats. Values represent mean \pm S.E.M. * P <0.05 compared with vehicle-treated rats. n: number of rats.

AMの脳室内投与により、血液中のバゾプレッシン濃度は変化しないが、バゾプレッシン分泌刺激に対しては抑制的に作用することが報告されている。オキシトシンの分泌に対するAMの作用は知られていなかったが、本研究により脳室内投与したAMは強力にオキシトシン分泌を引き起こすことが明らかとなった[11]。したがって、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視床下部で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る。

AMはアミノ酸の相同性は低いが類似のペプチドと生理作用を含めてスーパーファミリーがあると考えられている。それらのペプチドの視床下部室傍核および視索上核への作用をFos蛋白の発現を指標に検討したところ、異なる作用が見い出された。これらの生理学的意義については今後の検討が必要である。

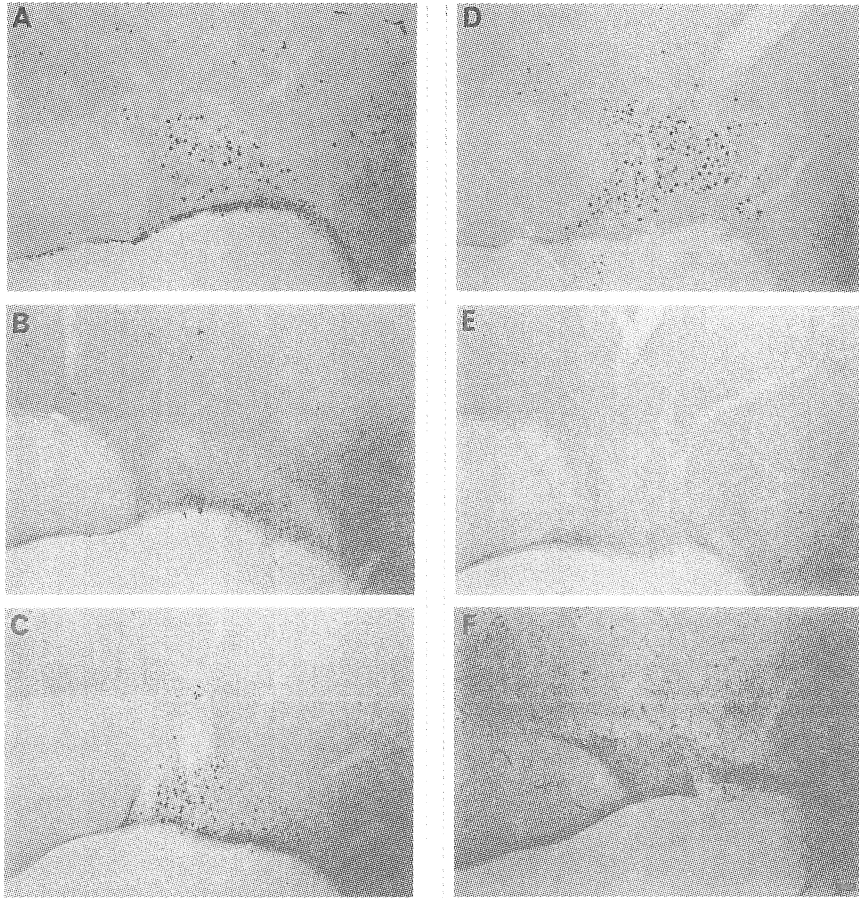


Fig.5 Effects of central administration of AM (A), PAMP-12 (B), PAMP-20 (C), CGRP (D), amylin (E) and vehicle (F) on Fos-like immunoreactivity in the rat supraoptic nucleus. The scale bar is 50 μ m.

5. 今後の課題

昨年、AMとCGRPの受容体に関する新知見が報告された[12]。この受容体機構の神経分泌ニューロンおよび中枢神経系における役割は今後の重要な課題である。我々は、視床下部における神経ペプチドの作用を多角的に解析中である[2-11,13]。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受容体の解析および細胞内情報伝達系について検討していく必要がある。さらに、AMと塩分嗜好性やナトリウムの生体内での維持機構との相互連関について検討していく必要がある。

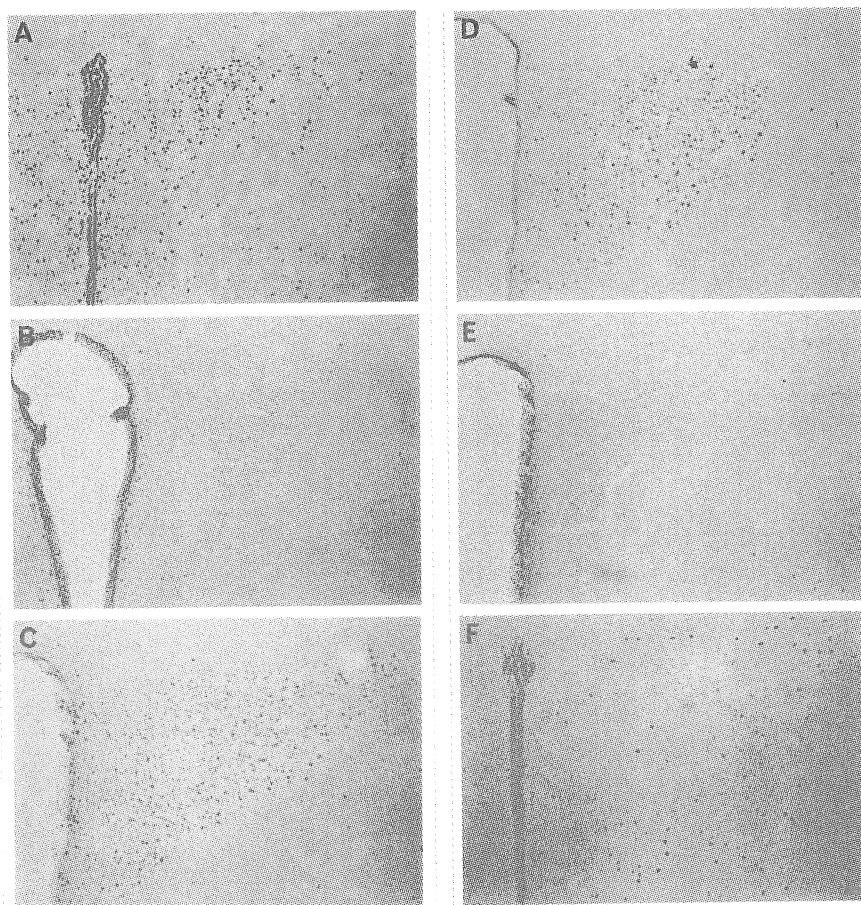


Fig.6 Effects of central administration of AM (A), PAMP-12 (B), PAMP-20 (C), CGRP (D), amylin (E) and vehicle (F) on Fos-like immunoreactivity in the rat paraventricular nucleus. The scale bar is 50 μ m.

6. 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. 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.
3. Hara, Y., Ueta, Y., Isse, T., Kabashima, N., Shibuya, I., Hattori, Y. and Yamashita, H. Increase of urocortin-like immunoreactivity in the rat hypothalamo-neurohypophysial system after salt loading and hypophysectomy. *Neurosci. Lett.*, 227: 127-130, 1997.
4. Hara, Y., Ueta, Y., Isse, T., Kabashima, N., Shibuya, I., Hattori, Y. and Yamashita, H.

- Increase of urocortin-like immunoreactivity in the rat supraoptic nucleus after dehydration but not food deprivation. *Neurosci. Lett.*, 229: 65-68, 1997.
5. Tokunaga, M., Ueta, Y., Isse, T., Hara, Y., Tanaka, K., Yamamoto, S., Kabashima, N., Shibuya, I., Hattori, Y. and Yamashita, H. PTH-related peptide-like immunoreactivity in the median eminence, paraventricular and supraoptic nuclei in colchicine-treated rats. *Brain Res.*, 774: 216-220, 1997.
 6. 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.
 7. Nomura, M., Ueta, Y., Serino, R., Yamamoto, Y., Shibuya, I. and Yamashita, H. Effects of centrally administered pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide on *c-fos* gene expression and heteronuclear RNA for vasopressin in rat paraventricular and supraoptic nuclei. *Neuroendocrinology*, 69: 167-180, 1999.
 8. Ueta, Y., Levy, A., Lightman, S.L., Hara, Y., Serino, Y., Nomura, M., Shibuya, I., Hattori, Y. and Yamashita, H. Hypovolemia upregulates the expression of neuronal nitric oxide synthase gene in the paraventricular and supraoptic nuclei of rats. *Brain Res.*, 790: 25-32, 1998.
 9. Ueta, Y., Levy, A., Powell, M.P., Lightman, S.L., Kinoshita, Y., Yokota, A., Shibuya, I. and Yamashita, H. Neuronal nitric oxide synthase gene expression in human pituitary tumours: a possible association with somatotroph adenomas and growth hormone-releasing hormone gene expression. *Clin. Endocrinol.*, 49: 29-38, 1998.
 10. Ueta, Y., Hara, Y., Setiadji, V.S., Isse, T., Shibuya, I., Kitamura, K., Kangawa, K., Matsuo, H., Eto, T., Hattori, Y. and Yamashita, H. Adrenomedullin-like immunoreactivity in the rat hypothalamo-neurohypophysial tract. *Peptides*, 20, 1999 (*in press*).
 11. Serino, R., Ueta, Y., Hara, Y., Nomura, M., Yamamoto, Y., Shibuya, I., Hattori, Y., Kitamura, K., Kangawa, K., Russell, J.A. and Yamashita, H. Centrally administered adrenomedullin increases plasma oxytocin level with induction of *c-fos* messenger ribonucleic acid in the paraventricular and supraoptic nuclei of the rat. *Endocrinology*, 140: 2334-2342, 1999.
 12. McLatchle, L.M., Fraser, N.J., Main, M.J., Wise, A., Brown, J., Thompson, N., Solari, R., Lee, M.G. and Foord, S.M. RAMPs regulate the transport and ligand specificity of the calcitonin-receptor-like receptor. *Nature*, 393: 333-339, 1998.

13. Yamamoto, Y., Ueta, Y.; Date, Y., Nakazato, M., Hara, Y., Serino, R., Nomura, M., Shibuya, I., Matsukura, S. and Yamashita, H. Down regulation of the *prepro-orexin* gene expression in genetically obese mice. *Mol. Brain Res.*, 65: 14-22, 1999.

Effects of adrenomedullin (AM) and AM-related peptides on the
hypothalamo-neurohypophysial system: molecular physiological aspects

Hiroshi Yamashita, Izumi Shibuya, Yoichi Ueta and Ryota Serino

Department of Physiology, University of Occupational and Environmental Health, Japan

Summary

It is well known that the hypothalamus and neuroendocrine system have an important role in regulating sodium intake and sodium balance in a body. Adrenomedullin (AM), a potent hypotensive peptide, has natriuretic effects on the kidney and suppressive effects of salt appetite via central nervous system. Although we demonstrated that AM-like immunoreactivity (LI) co-exists with either arginine vasopressin (AVP)-LI or oxytocin-LI in the paraventricular (PVN) and supraoptic nuclei (SON) of rats, the transportation of AM from the AM-containing cells in the hypothalamus to the posterior pituitary has not been confirmed because there was an apparent lack of AM-LI fibers in the hypothalamo-neurohypophysial tract and posterior pituitary. In the present study, we examined the effects of colchicine-treatment and hypophysectomy on AM-LI in the hypothalamo-neurohypophysial tract of rats. Abundant AM-LI fibers and varicosities were found in the hypothalamo-neurohypophysial tract and internal zone of the median eminence in the colchicine-treated and hypophysectomized rats.

Intracerebroventricular administration of AM (1, 10 μ g) caused a significant increase in the plasma oxytocin level in conscious rats. Central administration of AM caused a marked induction of Fos-LI in the PVN and the dorsal parts of the SON. Central administration of AM, proadrenomedullin N-terminal (PAMP)-12, PAMP-20, calcitonin gene-related peptide (CGRP), amylin and vehicle caused a different induction of Fos-LI in the PVN and SON.

These results suggest that AM and AM-related peptides may have an important role to modulate the neurosecretory cells in the hypothalamus and be involved in the central regulation of sodium balance in a body.