

イヌ敗血症性ショックモデルにおける アドレノメデュリン遺伝子の発現分布

小野 紫*

要 旨

血管拡張性の強い降圧性ペプチドであるアドレノメデュリン (AM) の敗血症性ショックへの関与を明らかにするため、イヌを用いたショックモデルを作製し、AM 遺伝子発現の組織分布およびその変化を、臓器、血管で詳細に検討した。全身の主要動静脈において、AM の mRNA の発現は増加しており、AM がショック時の重篤な低血圧に関与すると考えられた。また循環器系以外の臓器でも AM 遺伝子の変化が認められ、特に視床下部、十二指腸、回腸、腎臓皮質などで増加した。以上の結果から、AM が複雑な敗血症性ショックの病態において、循環動態以外の面でも関与する可能性が示唆された。

緒 言

アドレノメデュリン (AM) は、ラット血小板中の cyclic AMP の増加活性を指標に、ヒト褐色細胞腫から単離された、52個のアミノ酸からなる血管拡張性の降圧活性を持つペプチドである^{1,2)}。これまでに心不全、腎不全、高血圧などの循環器系疾患との関連が報告されており^{3,4)}、新しい循環調節因子として注目されている。敗血症においても、敗血症患者の血中 AM 濃度が、健常人と比較して著明に上昇しており、循環性ホルモンとしてショック時の低血圧などの病態に関わる可能性が示唆されている^{5,6)}。AM の血管拡張作用の機序のひとつとして、血管内皮細胞の遊離 Ca^{2+} 濃度の上昇を介して、一酸化窒素合成酵素

(eNOS) を活性化、一酸化窒素 (NO) を誘導することが考えられており、NO との関連を含め、AM が重篤な低血圧を惹起する一因である可能性は高い⁷⁾。また AM は、レセプターの分布などから、その血管拡張作用が、オートクリンあるいはパラクリンといった局所因子としての作用によるともされている^{8~11)}。AM とショック時の低血圧との因果関係を明らかにするためには、その産生部位の詳細な検討が必要である。一方 AM は、循環調節だけでなく、気管支拡張作用や利尿作用など様々な生理活性を有することが明らかになりつつあり^{12,13)}、敗血症性ショックという複雑な症候群においてどのような役割を果たすのか、興味深い物質である。本研究では、イヌを用いた敗血症性ショックモデルを用いて、広範な臓器あるいは血管での AM 遺伝子の発現を詳細に検討することにより、AM の病態生理学的意義について考察を加えた。

方 法

1. 敗血症性ショックモデルの作成

平均体重約10 kgのイヌ(雑種)2頭およびイヌ(ビーグル)2頭について、チオペンタール20 mg/kgを静注した後、気管内挿管の上、セボフルランで麻酔を維持した。バンクロニウム投与により対象を調節呼吸下におき、 $\text{FiO}_2=0.4$ として、ノルモカプニアになるように換気を調節した。右大腿動脈に観血的持続的動脈圧測定のため、20ゲージの留置針を刺入、左大腿動脈と右大腿静脈にもそれぞれ採血および薬物または生理食塩水投与の目的で、同様の処置をした。2頭をコントロールとし、残る2頭についてリポポリサッカライド

*帝京大学医学部麻酔科学講座

(LPS : E. coli serotype 026 : B6 Difco) を 2 mg/kg の用量で静注した. この時間を 0 として, 30 分後, 1 時間後, 2 時間後, 3 時間後, 4 時間後に各 4 ml の採血をした. その後脱血死させ, 各臓器および血管を速やかに採取し, 液体窒素にて凍結保存した.

2. 血中 AM 濃度の測定

イヌの全血 (動脈血) は, 採血直後 Trasylol (500 KIU/ml), EDTA · 2Na (1.5 mg/ml) を加えて混和し, 遠心分離して血漿を採取した. さらに血漿を等量の生理食塩水 (40 mM HCl を含む) で希釈し, Sep-Pak C18 カートリッジにて AM を抽出後, 抗ヒト AM 抗体 (ヒト AM の C 末端部配列 hAM [40-52] を抗原としたポリクローナル抗体 / # 172CI-7, 国立循環器病センター研究所, 寒川賢治先生より供与) を用いてラジオイムノアッセイ (RIA) にて濃度測定をした. 尚, 本抗血清はヒト AM と同等にラット, イヌ AM を認識している. 本実験に用いた抗血清および RIA 法の詳細については, すでに報告されている¹⁴⁾.

3. AM 遺伝子発現の解析

採取した臓器を TRIzol Reagent (Life Technologies) 中で破碎し, total RNA を抽出した. 心血管系以外の各臓器については, その後さらに Oligotex-dT30 (Takara Shuzou Co. Ltd.) を用いて poly(A)⁺RNA を抽出した. 血管に関しては total RNA 各 20 μ g, 他臓器は poly(A)⁺RNA 各 5 μ g を最終濃度 18% のホルムアルデヒドを含む 1% アガロースゲルにて電気泳動し, ナイロンメンブレン (Bio-Rad 社 Zeta Probe) にトランスファー後, 紫外線で固定した. イヌの cDNA (塩基 No. 1-839) を [α -³²P] dCTP で標識し, これをプローブとしてノーザンハイブリダイゼーションを行った. ハイブリダイズバッファーの組成は, 1% ドデシル硫酸ナトリウム (SDS), 5 \times SSPE (0.75 M NaCl, 43.25 mM NaH₂PO₄ · 2H₂O, 6.25 mM EDTA pH 7.4), 40% ホルムアミド, 5 \times Denhardt's solution (0.1% polyvinyl pyrrolidone, 0.1% ficoll, 0.1% bovine serum albumin), 100 mg/ml salmon sperm DNA とし, 42 $^{\circ}$ C, 3 時間のプレハイブリダイゼーションの後, 同温度, 18 時間でハイブリダイゼーションを行った. メンブレンは 2 \times SSC, 0.1

% SDS のバッファーで 50 $^{\circ}$ C, 30 分の洗浄を 2 回行った後, イメージアナライザー (Fujifilm, BAS 5000) にて解析した. 対比する内部標準として GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) の mRNA を用いた.

結 果

LPS を投与した結果, 約 5 分後には収縮期血圧が 150 mmHg から 60 mmHg に下降し, 約 20 分後に徐々に上昇したが, 80 mmHg 前後から回復せず, 終始乏尿などのショック症状を呈していた. 血中 immunoreactive (ir) AM 濃度は敗血症性ショックモデルにおいて LPS 投与 4 時間後, 32 fmol/ml に達し, 投与前値に比較して約 15 倍の上昇を認めた (図 1). AM は検討した各臓器において遺伝子発現が認められ, LPS 投与によって, 多くの臓器でその mRNA は上昇した. 以下にその結果を示す.

循環器系の主要動静脈において AM の遺伝子発現は, 肺静脈と下大静脈を除いて 2~3 倍に上昇しており, 中でも肝動脈は, 約 10 倍と顕著に上昇した. 一方, 心臓では上昇が認められなかった (図 2-(1), (2), 3-(1)).

脳, 神経系では, 大脳, 小脳, 視床下部, 脊髄について検討した. 視床下部の AM mRNA は, コントロール群では発現量が少なかったが, LPS 投与群では 3 倍に増加した. 大脳, 小脳では 1.2

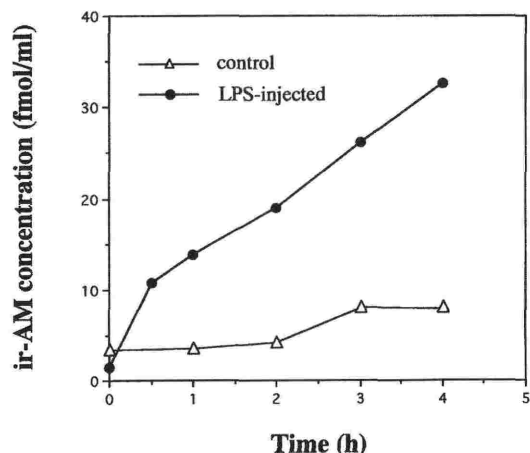


図 1 敗血症性ショックモデルにおける血中 ir-AM 濃度の推移

(●) - 敗血症性ショックモデル △ - コントロール群)

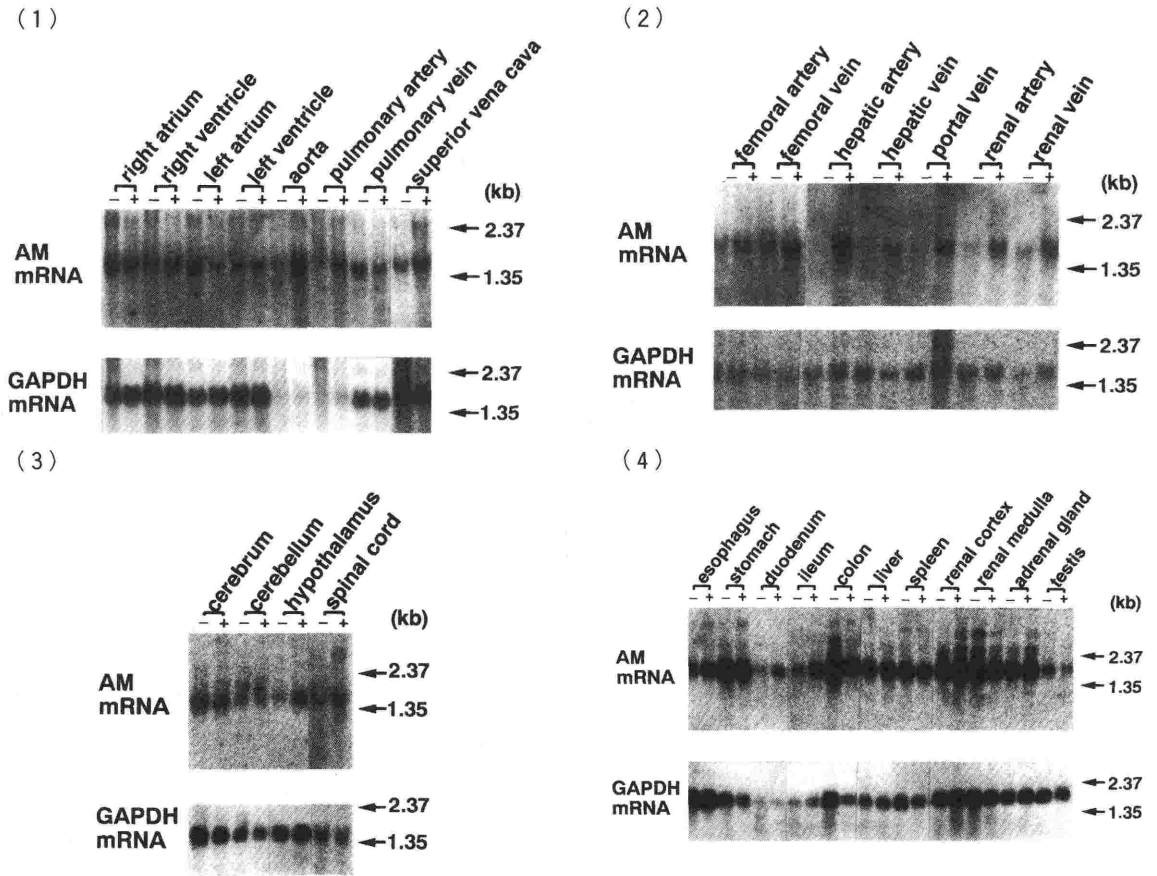


図2 LPS投与の有無による臓器別AM遺伝子の発現—ノーザンブロット解析
 (1) 心臓および血管 (2) 血管 (3) 脳神経系 (4) 消化管, 充実性臓器

倍前後, 脊髄でも約3倍の増加を見た(図2-(3), 3-(2)).

消化管では, 食道, 胃, 十二指腸, 回腸, 結腸について検討した. コントロール群において発現が多く認められた胃や結腸では, LPSの投与によってmRNAの発現に変化がなかったのに対して, 発現の少なかった十二指腸や回腸では1.5-2倍程度増加した. 食道では, コントロール群でも発現が多かったが, LPS投与群でも2.5倍程度の増加を認めた(図2-(4), 3-(3)).

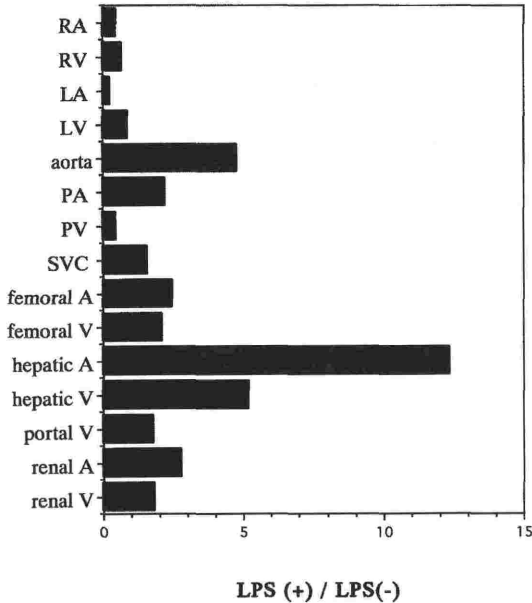
充実性臓器として, 肝臓, 脾臓, 腎臓(皮質, 髄質), 副腎, 精巣について検討した. 肝臓, 脾臓, 副腎は, 正常イヌでAMが多く発現している臓器であり, LPSの投与によって1.2倍前後の増加を示した. 腎臓は, 皮質と髄質を肉眼的に分割した結果であるが, 皮質で2倍近くの増加を認

めたのに対して, 髄質では変化がなかった. 精巣でも変化しなかった(図2-(4), 3-(3)).

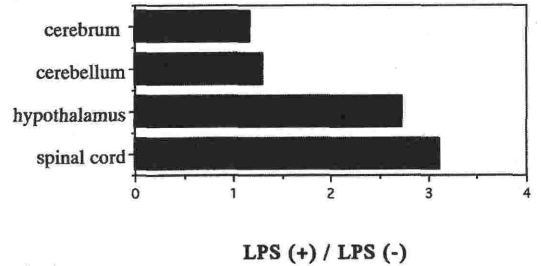
考 案

AMは, ヒト褐色細胞腫から単離された, 強い降圧活性を持つペプチドであり¹⁾, 新しい循環調節因子として様々な循環器疾患との関連が検討されている^{3,4)}. 敗血症性ショックの患者においても, その血中濃度が著しく上昇することが報告され, 末梢血管抵抗, 肺血管抵抗の減少との相関が認められており^{5,6)}, AMがショックの際に血管拡張性の低血圧の一因となる可能性を示唆する. また, 利尿作用や気管支拡張作用といった様々な生理活性も報告されていることから^{12,13)}, 敗血症性ショックという症候群において, AMの作用は循環作動性に局限できない可能性が考えられる.

(1)



(2)



(3)

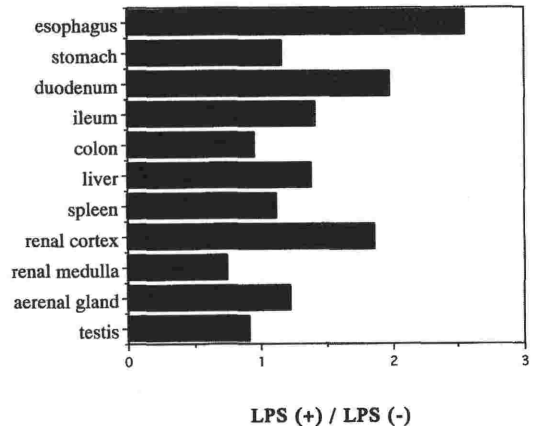


図3 LPS投与の有無による臓器別AM遺伝子の発現—内部標準 GAPDH mRNA との比をもとに比較—イメージアナライザーによる解析

(1) 心臓, 血管 (RA, right atrium; RV, right ventricle; LA, left atrium; LV, left ventricle; PA, pulmonary artery; PV, pulmonary vein; SVC, superior vena cava) (2) 脳神経系 (3) 消化管, 充実性臓器

本研究は、AMの敗血症性ショックへの関与を検討する上でのスクリーニングとして、広く臓器を採取し、AMの遺伝子発現を検討することを目標にした。この点においてイヌの敗血症性ショックモデルは有用であり、その後の生理学的検討などを含め、様々な発展が期待できる。

我々は、まず循環調節因子としてのAMを考え、主要動静脈でどのような遺伝子発現変化を来しているかを検討した。イヌの敗血症性ショックモデルでは、例えば肝動静脈や腎動静脈といったラットでは検討し得なかった血管各部位での遺伝子発現を検討することが可能であった¹⁵⁾。その結果、肺静脈を除く全身の主要動静脈において、AMの遺伝子発現は平均して2~3倍の増加を見た。血管でのAMは、内皮または平滑筋に発現し、またそのレセプターも同様の分布を示すという報告から、オートクリンあるいはパラクリンと

いう局所的な因子と考えられている^{8~11)}。これを考慮してAMの作用が局所的なものであると限定しても、敗血症の際に全身の主だった血管においてAMの遺伝子発現が増加していることは、結果としてAMが低血圧の一端を担う可能性を示唆する。さらに、本実験でのLPS投与4時間後の血中ir-AM濃度は、イヌの腎血流量を増加させる血中濃度として報告されている13 fmol/mlを凌駕しており¹³⁾、AMが全身的な循環ホルモンとして作用する可能性もあると考えられる。一方、持続的なAMの血中投与によって低血圧を作成した上で、AMの臓器血流分布への影響を検討した報告では、AMが肝臓や腎臓などへの血流分布を増加させる可能性について言及している¹⁶⁾。本研究でも、血管各部位において一様に遺伝子の発現増加が認められたわけではなく、例えば肝動脈での増加程度は他の血管に比較して高かった。検

討したモデルが少数であるため、有意に上昇しているとは断定できないが、血管部位によって遺伝子発現に差違のある可能性がある。敗血症の場合に増加したAMが、主要臓器の血流分布にどのように影響しているのか、その生命維持への関与という視点は、治療法への接点ともいえよう。

次に、循環器系以外の臓器でのAM遺伝子発現について検討した。コントロール群において、検討した全ての臓器にAMの遺伝子発現が認められた。敗血症によるその変化は、臓器によって様々であり、循環動態とは関係が薄いと思われる臓器でも、著明な変化を来した。まず中枢神経系では、検討した各部分に微量ながらもAM遺伝子が発現していたが、LPS投与によって視床下部での強い発現増加が認められた。視床下部は、視索上核や室傍核に免疫組織化学染色によってAMが確認されており、同一ニューロンにバゾプレッシンの局在も報告されている^{17,18)}。AMが脳内の中枢性循環調節因子として機能する可能性も検討されており¹⁹⁾、興味深い結果であるといえよう。また、消化管では、食道や十二指腸、回腸でAM mRNAの強い発現増加を認めた。これに対して胃や結腸ではLPS非投与群において既にAMが強く発現していたが、LPSの影響による変化はむしろ小さかった。十二指腸や回腸で増加したAM mRNAは、どの細胞由来であるかは今後の検討が必要であるが、正常ヒト、ブタ、ラットの消化管上皮腺細胞にAM免疫陽性細胞が存在することから、腸管上皮細胞がまず考えられる²⁰⁾。加えて消化管に浸潤した炎症細胞などの可能性も推察され²¹⁾、消化管病変との関係も検討されるべきであろう。さらに充実性臓器に関して、本研究では肝臓、脾臓、腎臓、副腎、精巣での影響を検討した。コントロールのイヌでは、精巣を除くいずれの臓器にも明瞭にAM mRNAのバンドが認められ、敗血症によって肝臓、脾臓、副腎では、約1.5倍前後、また腎臓皮質では約2倍の増加が見られたが、腎臓髓質では約0.7倍、精巣でも約0.9倍と減少傾向あるいは不変といえる結果であった。充実性臓器では、その増加したAMのmRNAが、豊富に含まれる血管あるいは血球由来である可能性も否めないが、腎臓の皮質と髓質の相違から、各々の構成細胞における発現の差によるものと考えられよう。

以上より、敗血症性ショックモデルにおいて各臓器のAM発現は様々に影響を受けることが推察された。敗血症において血中濃度が高くなる炎症性のメディエーター、例えば腫瘍壊死因子(TNF)やインターロイキン-1などは、培養血管平滑筋細胞でのAM遺伝子発現を促進することから²²⁾、AMもあるいはサイトカインストームの一因子として敗血症性ショックにおける種々の病態に関与することが考えられる。AMはまた、血管平滑筋に直接働きかけ血管を弛緩させると同時に、血管内皮の遊離Ca²⁺を上昇させ、内皮由来の一酸化窒素合成酵素(eNOS)を活性化して、一酸化窒素(NO)を誘導することにより、間接的にも血管拡張を惹起するといわれている⁷⁾。循環作動因子としてNOとの関連を含め、時間経過などの検討を加えながら、その役割を検討することが必要である。さらに、敗血症患者あるいは本研究のモデルにおいても、血中ir-AM濃度が大きく上昇することが認められたが、その由来臓器(または組織)は判明していない。様々な血管や臓器でAM遺伝子の発現が増加したことから、特定の臓器由来ではなく、全身の血管および臓器由来である可能性も高い。

AMは、敗血症モデルにおいて、多くの臓器で遺伝子発現が変化した。その意味を解析することは、敗血症の病態を解明する上で重要であると考えられる。

結 論

AMは、敗血症の際に全身の主要な血管でその遺伝子発現が増加した。これは、AMの血管拡張作用が局所的な作用であるにしても、全身性低血圧の一因となると思われる。また、循環器系以外の臓器においても変化を示すことから、AMが敗血症の病態に多方面から関与する可能性が示唆された。

謝 辞

本研究にあたって、ご指導を戴いた国立循環器病センター研究所、寒川賢治先生、児島将康先生、帝京大学医学部麻酔科学講座、岡田和夫教授、藤岡 丞先生に心から御礼申し上げます。

また、動物実験にご協力を戴いた帝京大学医学部麻酔科学講座、手塚新吉先生に深く感謝いたし

ます。

なお本研究は、科学技術庁科学技術振興調整費 (COE 研究費) により助成された。

文 献

- 1) Kitamura K, Kangawa K, Kawamoto M, et al : Adrenomedullin: A novel hypotensive peptide isolated from human pheochromocytoma. *Biochem Biophys Res Commun* 192 : 553-560, 1993
- 2) Kitamura K, Sakata J, Kangawa K, et al : Cloning and characterization of cDNA encoding a precursor for human adrenomedullin. *Biochem Biophys Res Commun* 194 : 720-725, 1993
- 3) Nishikimi T, Saito Y, Kitamura K, et al : Increased plasma levels of adrenomedullin in patients with heart failure. *J Am Coll Cardiol* 26 : 1424-1431, 1995
- 4) Ishimitsu T, Nishikimi T, Saito Y, et al : Plasma levels of adrenomedullin, a newly identified hypotensive peptide, in patients with hypertension and renal failure. *J Clin Invest* 94 : 2158-2161, 1994
- 5) Hirata Y, Mitaka C, Sato K, et al : Increased circulating adrenomedullin, a novel vasodilatory peptide, in sepsis. *J Clin Endocrinol Metab* 81 : 1449-1453, 1996
- 6) Nishio K, Akai Y, Murai Y, et al : Increased plasma concentrations of adrenomedullin correlate with relaxation of vascular tone in patients with septic shock. *Crit Care Med* 25 : 953-957, 1997
- 7) Shimekake Y, Nagata K, Ohta S, et al : Adrenomedullin stimulates two signal transduction pathways, cAMP accumulation and Ca²⁺ mobilization, in bovine aortic endothelial cells. *J Biol Chem* 270 : 4412-4417, 1995
- 8) Sugo S, Minamino N, Kangawa K, et al : Endothelial cells activity synthesize and secrete adrenomedullin. *Biochem Biophys Res Commun* 201 : 1160-1166, 1994
- 9) Sugo S, Minamino N, Shoji H, et al : Production and secretion of adrenomedullin from vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 203 : 719-726, 1994
- 10) Eguchi S, Hirata Y, Kano H, et al : Specific receptors for adrenomedullin in cultured rat vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett* 340 : 226-230, 1994
- 11) Kato J, Kitamura K, Kangawa K, et al : Receptors for adrenomedullin in human vascular endothelial cells. *Eur J Pharmacol* 289 : 383-385, 1995
- 12) Heaton J, Lin B, Chang J-K, et al : Pulmonary vasodilation to adrenomedullin: a novel peptide in humans. *Am J Physiol* 268 : H2211-H2215, 1995
- 13) Ebara T, Miura K, Okumura M, et al : Effect of adrenomedullin on renal hemodynamics and functions in dogs. *Eur J Pharmacol* 263 : 69-73, 1994
- 14) Ichiki Y, Kitamura K, Kangawa K, et al : Distribution and characterization of immunoreactive adrenomedullin in human tissue and plasma. *FEBS Lett* 338 : 6-10, 1994
- 15) Shoji H, Minamino N, Kangawa K, et al : Endotoxin markedly elevates plasma concentration and gene transcription of adrenomedullin in rat. *Biochem Biophys Res Commun* 215 : 531-537, 1995
- 16) 湯川博美, 菊田好則, 手塚新吉ら : アドレノメデュリン投与による低血圧麻酔時の体内血流分布への影響. *Journal of Anesthesia* 11 : S321, 1997
- 17) Ueta Y, Kitamura K, Isse T, et al : Yamashita H Adrenomedullin-immunoreactive neurons in the paraventricular and supraoptic nuclei of the rat. *Neurosci Lett* 202 : 37-40, 1995
- 18) Satoh F, Takahashi K, Murakami O, et al : Immunocytochemical localization of adrenomedullin-like immunoreactivity in the human hypothalamus and the adrenal gland. *Neurosci Lett* 203 : 207-210, 1996
- 19) Takahashi H, Watanabe TX, Nishimura M, et al : Centrally induced vasopressor and sympathetic responses to a novel endogenous peptide, adrenomedullin, in anesthetized rats. *Am J Hypertens* 7 : 478-482, 1994
- 20) Washimine H, Asada Y, Kitamura K, et al : Immunohistochemical identification of adrenomedullin in human, rat, and porcine tissue 103 : 251-254, 1995
- 21) 久保篤史, 南野直人, 片淵 剛ら : 単球・マクロファージ系細胞株およびマウス腹腔マクロファージにおけるアドレノメデュリン (AM) の産生. *生化学* 69 : S 753, 1997
- 22) Sugo S, Minamino N, Shoji H, et al : 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

Gene Expression of Adrenomedullin in Canine Endotoxin Shock Model

Yukari Ono*

*Department of Anesthesiology, Teikyo University School of Medicine, Tokyo, Japan

Gene expression of adrenomedullin (AM), a novel hypotensive peptide originally isolated from human pheochromocytoma, was investigated in the canine endotoxin shock model.

Two mg/kg of lipopolysaccharide (LPS) or saline was administered into the canine femoral vein, and the whole blood was collected every 1 hr to measure the plasma concentration of immunoreactive (ir) AM. Four hrs after LPS administration, the dogs were sacrificed by removing the blood, and tissues were collected immediately to extract RNA.

Northern blot analysis showed detectable transcripts of AM in all of the organs and blood vessels. By LPS treatment, gene expression of AM increased in almost

all of the blood vessels and another many tissues, e. g. the hypothalamus, the spinal cord, ileum, renal cortex, etc.

In this study, endotoxin shock caused up to a 15-fold augmentation of plasma concentrations of ir-AM. The plasma concentrations of AM also increased in patients of sepsis. Though the origin of this increased AM has not been revealed, it is prospected that AM is secreted from the various tissues and blood vessels. And the augmentation of AM transcripts in all of the arteries and the veins is one of the factors for the hypotension with the septic shock. In addition, AM may play important roles in the extra-cardiovascular tissues in this syndrome.

Key words : Adrenomedullin, Northern blot analysis, Endotoxin shock, Dog

(Circ Cont 19 : 99~105, 1998)