

氏 名（本籍）	さ とう ふみ とし 佐 藤 文 俊
学 位 の 種 類	博 士 （ 医 学 ）
学 位 記 番 号	医 博 第 1 2 9 7 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 8 年 3 月 26 日
学 位 授 与 の 条 件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研 究 科 専 攻	東 北 大 学 大 学 院 医 学 系 研 究 科 （ 博 士 課 程 ） 内 科 学 系 専 攻
学 位 論 文 題 目	脳 にお け る adrenomedullin : ラジ オ イ ム ノ ア ッ セイ と 免 疫 組 織 化 学 に よ る 検 討

（ 主 査 ）

論 文 審 査 委 員 教 授 阿 部 圭 志 教 授 名 倉 宏

教 授 近 藤 尚 武

論文内容要旨

【目 的】

Adrenomedullin (AM) は褐色細胞より単離された 52 個のアミノ酸からなる、強力な血管拡張作用を有するペプチドだが、脳における存在は明らかにされていない。AM が脳において神経制御物質として働く可能性を調べるため、ヒト AM1-52 に対する高感度の radioimmunoassay (RIA) を開発し、ヒト脳各領域の免疫活性 AM (IR-AM) の濃度を測定した。ヒト視床下部及び副腎における AM の局在を明らかにするために免疫染色を行なった。また副腎腫瘍、神経節芽腫及び神経芽腫における AM の病態生理学的役割を明らかにするため、腫瘍組織中の IR-AM を測定し比較検討した。さらにヒトとラットにおける AM の分布の相異を明らかにするためにラットの脳及び末梢組織の IR-AM を測定した。

【方法及び結果】

ヒト AM の RIA は以下の方法で確立した。ヒト AM1-52 を標準物質に用い、抗ヒト AM1-52 抗体 (ペプチド研) を使用し、クロラミン T 法で作製した ¹²⁵I-ヒト AM1-52 を使用し、第二抗体法で分離し測定した。最小測定感度は 0.5fmol/tube (危険率 5%) であった。このアッセイは他のペプチド (α CGRP, NPY, GRH, somatostatin, CRH, AVP, VIP) との交叉反応は全て 0.001% 以下であった。

IR-AM はヒト脳組織の検討した全ての領域に検出された (0.26–1.4pmol/g wet weight)。視床 (1.40 ± 0.39 pmol/g wet weight, mean \pm SEM), 視床下部 (1.28 ± 0.48), 橋 (0.73 ± 0.27) の順で高濃度であった。ヒト正常副腎 (12.6 ± 1.0 pmol/g wet weight, n=7) と比較するとこれらの濃度は 5–10% であった。褐色細胞腫 (4.5 ± 1.5 , n=11), 神経節芽腫 (2.0 ± 1.3 , n=4) 及び神経芽腫 (0.55 ± 0.21 , n=3) にも IR-AM は存在したが副腎より低値であった。副腎皮質腫瘍には殆ど検出されなかった。

組織抽出物の逆相 HPLC での IR-AM の分析では、ヒト脳、副腎、褐色細胞腫、神経節芽腫及び神経芽腫の IR-AM は合成ヒト AM1-52 と同一部位に流出ピークを示した。

ラット AM の RIA はラット AM を標準物質に伴い、抗ヒト AM1-52 抗体 (自家製) を使用し、クロラミン T 法で作製した ¹²⁵I-ラット AM を使用した。自家製の抗体はヒト AM1-52 を家兎に免疫して作製し、ラット AM の RIA ではラット AM と最も良く交叉する抗体を使用した。最小測定感度は 2.0fmol/tube (危険率 5%) であった。ヒト AM と同様にその他のペプチドとの交叉反応は 0.001% 以下であった。SD ラット (n=6) の脳組織及び末梢組織の検討した全ての領

域に IR-AM は検出された。ラット脳では小脳 ($2.33 \pm 0.18 \text{ pmol/g wet weight}$), 視床下部 ($2.26 \pm 0.81 \text{ pmol/g wet weight}$), 大脳皮質 ($1.45 \pm 0.15 \text{ pmol/g wet weight}$) の順で高濃度であり, ラット末梢組織では下垂体後葉 ($23.0 \pm 3.8 \text{ fmol/gland}$) 及び前葉 ($39.7 \pm 10.0 \text{ fmol/gland}$), 小腸 ($4.72 \pm 0.49 \text{ pmol/g wet weight}$), 脾臓 ($3.58 \pm 0.78 \text{ pmol/g wet weight}$), 副腎 ($3.22 \pm 0.70 \text{ pmol/g wet weight}$) の順であった。

AM の免疫染色はペプチド研製あるいは自家製の抗 AM1-52 抗体を使用し, Vector ABC kit を用いて ABC 法で行った。AM 陽性神経細胞は視床下部の室傍核, 視索上核及び漏斗部に認め, 室傍核では大細胞と小細胞はともに陽性を染色された。視索上核及び漏斗部ではそれぞれ大細胞及び小細胞が陽性に染色された。副腎では髄質の細胞が陽性に染色された。合成ヒト AM1-52 による抗 AM 抗体の吸収試験では陽性所見は吸収された。

【考 察】

今回の研究で初めてヒト及びラットの脳に IR-AM が高濃度存在することを明らかにした。特にヒトもラットも視床下部で IR-AM が高濃度であった。ラット末梢では下垂体に IR-AM が高濃度存在した。また免疫染色でヒト視床下部の室傍核, 視索上核及び漏斗部に AM が局在することを明らかにした。この事実から AM が視床下部-下垂体機能に深く関与している可能性が考えられる。最近 AM が下垂体からの ACTH 分泌を抑制すること, ラット脳に AM 結合部位が存在すること, AM が中枢性に飲水を抑制すること等の生理作用についての報告がなされたが, これら他からの報告とともにこの研究によって, AM が脳において神経伝達物質, 神経制御物質及び神経ホルモンとして働いている可能性が強く示唆された。

審査結果の要旨

Adrenomedulin (AM) は 1993 年、褐色細胞腫より単離された 52 個のアミノ酸からなるペプチドである。AM は calcitonin gene-related peptide (CGRP) と C 端 (16-52) で約 27% の homology があり、強力な血管拡張作用を有する。生物学的作用として、ラット血小板の cAMP の上昇作用、麻酔ラットにおいて血圧降下作用、モルモットでの気管支拡張作用、イヌにおいて腎血流量の増加と Na 利尿促進作用等が報告されている。AM の前駆物質の mRNA は褐色細胞腫、副腎髄質、心室、腎及び肺にその発現が認められているが、脳においては殆ど検出されず、免疫活性 AM (IR-AM) も殆ど検出されていないことから、今までは AM は脳組織には存在しないと考えられていた。しかし最近、AM が下垂体前葉の培養細胞において ACTH の基礎分泌及び corticotropin releasing hormone (CRH) 刺激による ACTH 分泌を抑制すること、AM ラット脳室内投与にて飲水が抑制されること、さらに視床下部を含むラット脳において AM の結合部位が観察されることなどの報告が相次いでいる。これらは AM が脳、特に視床下部において重要な神経制御物質として働いていることを示唆すると考えられる。免疫組織化学を用いてヒトの choroid plexus に IR-AM が存在するとの報告はあるが、ヒト視床下部における AM の免疫組織化学的研究は未だなされていない。

本研究ではヒト AM1-52 に対する抗体を用いた AM の高感度の radioimmunoassay (RIA) を開発し、ヒト脳抽出物から免疫活性 AM の検出を可能とした。この方法を用いて初めてヒト脳に IR-AM が高濃度存在することを示した。また HPLC によってヒト脳中の IR-AM が主に AM1-52 であることを明らかにした。ヒト脳中の IR-AM の濃度は副腎での濃度の約 5-10% であった。免疫組織学的に視床下部の室傍核、視索上核及び漏斗部に AM の陽性細胞が存在することが明らかになったことから、ヒト脳では AM は神経細胞からも産生され得ると考えられる。

この研究によって AM がヒト脳に存在し、ヒト視床下部の室傍核や視索上核及び漏斗部の神経細胞に局在することが初めて明らかにされた。本研究は AM がヒト脳において産生され、神経伝達物質、神経制御物質及び神経ホルモンとして働いている可能性を示唆したものであり、十分学位論文に値するものである。