



Increased level of atrial natriuretic peptied messenger RNA in the hypothalamus and brainstem of spontaneously hypertensive rats.

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-27 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 小松, 勝利 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/983

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博第 130号	学位授与年月日	平成 4年 3月26日
氏 名	小 松 勝 利		
論文題目	Increased level of atrial natriuretic peptide messenger RNA in the hypothalamus and brainstem of spontaneously hypertensive rats. (自然発症高血圧ラットの視床下部および脳幹部における心房性ナトリウム利尿ペプチドメッセンジャーRNA 量の増加)		

医学博士 小松 勝利
論文題目

Increased level of atrial natriuretic peptide messenger RNA in the hypothalamus and brainstem of spontaneously hypertensive rats.

(自然発症高血圧ラットの視床下部および脳幹部における心房性ナトリウム利尿ペプチドメッセンジャーRNA量の増加)

論文の内容の要旨

心房性ナトリウム利尿ペプチド(Atrial Natriuretic Peptide:ANP)は、1984年心房より単離同定されたナトリウム利尿・血管拡張作用を有するペプチドであるが、脳内にも存在し、神経ペプチドとして、体液・血圧の中樞性調節に関与していることが報告されている。しかし、中枢におけるANP mRNAに関する報告は極めて少なく、組織中ANP濃度に関しても一定の見解は得られていない。そこで、自然発症高血圧ラット(SHR)の視床下部および脳幹部におけるANP mRNA・ANPの含量を測定し、Wistar-Kyotoラット(WKY)と比較検討した。

<方法>

17週齢、雄のSHR、WKYを断頭し、採血後直ちに視床下部、脳幹部、心房、心室を取り出し、重量を測定した。組織からのtotal RNAの抽出はacid-guanidinium-thiocyanate-chloroform法で行った。Total RNAの収量は100 μ g/1視床下部、140 μ g/1脳幹部であった。Poly(A)⁺ RNAはOligo(dT)-latexを用いてtotal RNAより得た。回収率は8.4%であった。rat ANP cDNAのBgl IIフラグメントをプラスミドに挿入し、これを鋳型として³²P-CTPを標識に、SP6 RNAポリメラーゼで転写反応を行いRNAプローブを作成した。合成した³²P-RNAプローブを用いて各組織についてノーザンブロット解析を施行した。視床下部・脳幹部に関してはノーザンブロット解析では大量の試料を必要としたためRNase protection assayを行った。オートラジオグラフィの結果を、デンストメータで測定し、 β -actin mRNA量で補正して定量的比較を行った。ANPの血中濃度はEDTA・アプロチニンを含む遠心管に採血し、遠心後血漿をセパックC-18カラムで抽出し、凍結乾燥後、リン酸緩衝溶液に溶解し、RIAで測定した。組織中ANP濃度は、組織を10倍量のIM酢酸で10分間加熱し、冷却後、ホモジナイズして抽出した後、RIAにて測定した。

<結果>

SHRは、テールカフ法で収縮期血圧が、WKYに比し有意に高かった。体重、心房、視床下部、脳幹部の重量に差はなかったが、心室重量はSHRで有意に増加していた。ANPの血中濃度は、SHRで1.27倍と増加傾向を認めたが有意差はなかった。ANPの組織濃度については、心房・心室の濃度がSHRにおいてそれぞれ1.66倍、1.42倍と有意に増加していた。視床下部・脳幹部の濃度も、SHRにおいてそれぞれ2.0倍、1.8倍と有意に増加していた。組織内ANP mRNAレベルに関しては、心房・心室が、SHRでそれぞれ1.4倍、1.5倍だったが、有意差はなかった。視床下部・脳幹部のANP mRNAレベルは、それぞれ2.6倍、3.3倍と有意に増加していた。

<考察>

RNAプローブを作成し、ノーザンブロット解析を施行することによって、ラットANP mRNAが、視床下部および脳幹部に存在することを確認した。さらにRNase protection assayを用いて定量的評価を試みる事が可能となった。SHRの視床下部・脳幹部のANP mRNAおよびANPがWKYに比し増加していたことは、SHRの視床下部・脳幹部においてANPの合成が亢進していることを示唆し、循環ホルモンのみならず神経ペプチドとしても、高血圧に対して代償性に増加していると考えられた。

論文審査の結果の要旨

心房性ナトリウム利尿ペプチド(Atrial Natriuretic Peptide:ANP)は、心房から合成・分泌され、ナトリウム利尿、血管拡張作用を示す物質であるが、中枢神経にもその存在が報告され、神経ペプチドとして、体液平衡・血圧の調節にも関与していることが推定される。

申請者は、組織内ANP濃度および含量、ANP mRNA の発現量より中枢神経における ANP の産生を明らかにするため、高血圧発症モデル動物である自然発症高血圧ラット(SHR)を対象として以下の実験を行った。

17週齢の SHR および対照(Wistar-Kyotoラット:WKY)の雄ラットを用いて、断頭、採血後、視床下部(HT)、脳幹部(B)、心房(A)、心室(V)を直ちに摘出した。A、Vについては総 RNA を抽出、HT、Bについては Oligo(dT)-latex を用いて poly(A)⁺ RNA を抽出した。rat ANP cDNAのBgl IIフラグメントを鋳型として作製した³²P-RNA プローブを用いてノーザンブロット解析を行った。HT、BはANP mRNA 含量が微量のため RNase protection assay を行い、内部標準(β -actin mRNA)にて補正し、結果を定量的に比較した。組織、血液の ANP 濃度は、放射免疫学的測定法(RIA)により IR-ANP として測定した。

その結果、1) IR-ANP 濃度は、SHR において心臓(A、V)、脳(HT、B)ともに有意に増加していた。血中濃度も SHR が高かったが、この差は有意ではなかった。2) ANP mRNA も同様の傾向を示したが、脳(HT、B)では SHR において、有意の増加が認められた。したがって高血圧が発症している SHR では、脳内 ANP は、その濃度、組織含量、mRNA の発現のいずれにおいても、対照(WKY)より増加を示しており、申請者は、この増加は高血圧発症の代償機能ではないかと推論した。

以上の研究に対して

1. SHR の対照として WKY を用いた妥当性。
2. 実験における動物の条件(週齢、体重、ナトリウム摂取など)。
3. RNase protection assay の条件とその影響。

などについて質疑が行われた。申請者は、実験条件における制約と、導かれる推論の限界についても、良く理解しており、本論文に述べられた研究結果の妥当性が説明された。

この研究は、神経ペプチドとしても注目をあびている ANP の中枢神経における合成の促進を、SHR において、mRNA 発現のレベルにおいても明らかにしたものである。

以上によって本論文は博士(医学)の学位授与にふさわしいものと、審査委員会は全員一致で判定した。

論文審査担当者 主査 教授 五十嵐 良 雄

副査 教授 川 名 悦 郎 副査 教授 山 崎 昇

副査 助教授 小 田 敏 明 副査 助教授 西 村 正 彦