DOCA食塩高血圧ラットの肺と腎臓における ナトリウム利尿ペプチド受容体の変動

浜松医科大学内科学第二講座

劉 麗 梅, 吉 見 輝 也

The Changes of Natriuretic Peptide Receptors (NP-R) for Lung and Kidney in DOCA-salt Hypertensive Rats

Li-Mei LIU, Teruya YOSHIMI

Second Division, Department of Internal Medicine, Hamamatsu University School of Medicine, Hamamatsu, 431-31, Japan

To elucidate the pathophysiological significance and the regulation of natriuretic peptide receptors (NP-R) in hypertension, we investigated the changes of NP-R in the lung, renal cortex and medulla using radioreceptor assay. We also examined the concentrations of atrial natriuretic peptide (ANP) and brain natriuretic peptide (BNP) in the atria and ventricles and plasma ANP concentration by specific radioimmunoassays. Elevated plasma ANP level, decreased atrial ANP concentration and increased ventricular ANP and BNP contents were observed in the DOCA-salt group when compared with the control group ($p < 0.01$). The ratio of BNP/ANP in the ventricle of the DOCA-salt rats was 50% of the control rats. The elevated plasma ANP secreted from the heart seems to reflect a defensive compensatory mechanism to counteract hypertension, and that ANP is the major natriuretic peptide secreted from the cardiac ventricle in DOCA-salt hypertensive rats. Scatchard plot analysis revealed that the maximal binding capacities (Bmax) of NP-R of the lung and renal cortex in DOCA-salt rats were significantly decreased from 71.0 ± 10.4 to 38.4 ± 5.9 ($p < 0.05$) and from 32.7 ± 1.8 to 21.7 ± 0.4 (fmol/mg. protein) ($p < 0.01$) compared with those in the control rats. The values of Bmax of the renal medulla between the two groups were not different. There was no significant change in the apparent dissociation constant (Kd) in the lung, renal cortex and medulla between the two groups. A competitive binding study using ^{125}I -rANP₁₋₂₈ and C-ANF₄₋₂₃, a biologically silent clearance receptor (C-receptor) specific ligand, revealed that C-receptors are abundantly present in the renal cortex, while a relatively small quantity of C-receptor was detected in the renal medulla. In the lung, a substantial amount of C-receptor was detected. In the DOCA-salt treated rats, C-receptors were decreased in the lung and renal cortex compared with the control rats. These results indicate that the down-regulation of NP-R, especially C-receptor, was induced in the lung and renal cortex when plasma ANP levels were elevated in DOCA-salt hypertensive rats. In conclusion, our results suggest that down-regulation of C-receptor in the lung and kidney contributes to maintaining higher plasma ANP levels and maybe responsible for the counter-regulatory role of endogenous ANP in DOCA-salt rats. Our results show that the down-regulation of NP-R in the lung was larger than that in the kidney, suggesting that the lung may play a dominant role in the regulation of the clearance of ANP through C-receptors in vivo.

Keywords: Atrial natriuretic peptide (ANP), Natriuretic peptide receptor (NP-R), C-ANF₄₋₂₃, C-receptor, DOCA-salt hypertensive rat.

は じ め に

ナトリウム利尿ペプチドファミリーを構成する三種類のペプチド, 心房性ナトリウム利尿ペプチド (Atrial natriuretic peptide, ANP), 脳性ナトリウム利尿ペプチド (Brain natriuretic peptide, BNP) およびC-タイプナトリウム利尿ペプチド (C-type natriuretic peptide, CNP) は心臓ホルモン, 神経ホルモン, あるいは局所ホルモンとして体液, 血圧調節に関与している^{1)~8)}。その中で代表的な心臓ホルモンであるANPとBNPはそれぞれ心房と心室で生合成され, 共に血液中に分泌されることが証明されている^{7)~10)}。

ANPとBNPの受容体としては, 細胞表面に存在する少なくとも三種類のナトリウム利尿ペプチド受容体 (NP-R) が知られている。この中の二種類は膜型グアニル酸シクラーゼそのものであり, それぞれGC-AとGC-Bと命名され, cGMPを介してナトリウム利尿ペプチドの生物作用を発現しているB-受容体 (biologically active receptors) であり¹¹⁾, 他の一種類は細胞内情報伝達機構を持たず, ナトリウム利尿ペプチドのクリアランスに関与すると考えられているC-受容体である^{12)~15)}。

現在まで, 種々の動物実験において高血圧症, 心不全におけるANPの分泌とその受容体の変動に関して報告が成されている。DOCA (Deoxycorticosterone Acetate) 食塩高血圧ラットでは体液量増加とこうけつあつのため, 心房と心室のANP合成と分泌が亢進し, 血液中のANP濃度が上昇すること, およびANPの上昇に正相関して血液中のcGMPが増加することが報告された¹⁶⁾¹⁷⁾。一方, DOCA食塩高血圧ラットでは血管平滑筋および腎糸球体のNP-Rは逆に減少するという報告も見られる¹⁸⁾¹⁹⁾。しかしながら, これらの研究ではNP-Rのサブタイプに関しては不明であり, その意義は必ずしも明らかではなかった。

NP-Rの発現調節に関しては, Hirataらは培養血管平滑筋細胞のC-受容体はANPに容量依存性にDown-regulationされることを明らかにした²⁰⁾²¹⁾。またCahill, KishimotoらはC-受容体のDown-regulationはB-受容体を介しておこることをラット血管平滑筋細胞を用いて報告している²²⁾²³⁾。これらのin vitroの報告はナトリウム利尿ペプチドの合成と分泌が増加している状態においてはC-受容体がDown-regulationを受け, ナトリウム利尿ペプチドの作用を強めている可能性を示唆しているが, in vivoにおけるC-受容体のDown-regulationについては明らかではない。

今回, 我々はDOCA食塩高血圧ラットの心房, 心室のANP, BNPおよび血液中のANPを既報のRadioimmunoassay (RIA) 法^{24)~26)}で測定すると共に, 肺と腎臓のNP-Rについても検討し, 対照ラットと比較した。C受容体についてはC受容体に高親和性で, 特異的に結合する合成リガンドC-ANF₄₋₂₃ (des [Gln¹⁸, Ser¹⁹, Gly²⁰, Leu²¹, Gly²²] ANF₄₋₂₃-NH₂)¹⁵⁾を用いて検討した。

材 料 と 方 法

1. DOCA食塩高血圧ラットの作製

9週齢の雄性Wistar系ラット (体重200~230g) をDOCA食塩高血圧群と対照群として各々8匹ずつに分けた。DOCA食塩高血圧群には週に一回DOCA (Deoxycorticosterone Acetate) (Sigma Chemical Co.) 20mgを0.2mlのCorn oil中に溶解して筋肉注射し, 1%食塩水を飲料水とした。対照群には0.2mlのCorn oilを週に一回筋肉注射し, 水を飲料水とした。8週間後にTail-cuff manometerを使用して, 収縮期血圧 (SBP) を測定し, 実験に供した。飼料は2群共にLabo MR Breeder R (Nihon Nosan Kogyo K.K.) を用い, 室内の照明は12時間サイクルの自動調節で行った。

2. ANPおよびBNPの抽出とRadioimmunoassay (RIA)

8週間後のDOCA食塩高血圧ラットと対照ラットを断頭し, 1mg/ml Na₂EDTA, 500KIU/ml aprotininを含

む遠心管に採血後、心臓の大血管を剥離し、心房を切り離した。重量測定後、心房と心室のcontaminationを防ぐために心室を尖部より二分の一で切り分け、心尖部を心室として採取した。血中ANP濃度はそれぞれ冷却遠心後の血漿をSep-pak C₁₈ カラム (Milipore Corporation, Milford, Massachusetts, USA) を用いて抽出し、凍結乾燥後、0.1 % Bovine Serum Albumin (BSA), 500KIU/ml aprotinin, 1mmol/l Na₂EDTA, 0.02 % Sodium azide を含むpH7.4のPhosphate bufferに溶解し、既報のRIAにて測定した^{24)~26)}。心房と心室は10倍量の1M酢酸中で10分間煮沸し、冷却後、ホモジナイズし、10,000×gで30分間遠心後、上清のANPとBNPをRIAにて測定した²⁴⁾²⁵⁾。α-rANP₁₋₂₈とrBNP₃₂をChloramine T法に従い、それぞれヨード化した²⁷⁾。¹²⁵I-α-rANP₁₋₂₈の特異活性は4MBq/μg、¹²⁵I-BNP₃₂の特異活性は0.83MBq/μgであった。

3. 受容体の調製

断頭したラットから採取した腎臓を氷の上でメスを用いて肉眼的に皮質と髄質に切り分けた。腎皮質、髄質と肺はそれぞれShimonakaらの方法に従い、以下に述べるように細胞膜を可溶化した¹⁹⁾。ラットの肺、腎皮質、腎髄質に5倍量のHomogenization buffer [1mM NaHCO₃, 5mM Na₂EDTA, 0.5mM Phenyl Methyl Sulfonyl Fluoride (RMSF), 5 μg/ml pepstatin (Sigma Chemical Co.), 5 μg/ml Leupeptin (Sigma Chemical Co.), pH8.3] を加え、Waring blenderにて2分間ホモジナイズし、5000×gにて30分間冷却遠心分離し、得られた沈渣にHomogenization bufferを加えてさらに3回、20mM PBS (pH7.4) にて1回、上記の操作を繰り返した。得られた沈渣を4倍量のBinding buffer [10mM EDTA, 0.5mM PMSF, 5 μg/ml Pepstatin, 5 μg/ml Leupeptin, 0.5 % Triton X-100 (Sigma Chemical Co.) を含む20mM PBS (pH7.4)] を加え、4℃で12時間混和後、10,000×gで30分間冷却遠心分離し、得られた上清を膜分画とした。-70℃に凍結保存し、NP-Rの測定に用いた。

4. 受容体結合実験

Binding buffer 80 μlに20 μlの膜分画 (80~100 μg protein) を加え、置換実験には¹²⁵I-α-rANP₁₋₂₈ (10,000cpm) を含むBinding buffer 100 μl, およびα-rANP₁₋₂₈ (最終濃度: 10⁻¹²M~10⁻⁸M) 或いはC-ANF₄₋₂₃ (最終濃度: 10⁻¹²M~10⁻⁷M) を含むBinding buffer 100 μlを加えた。飽和実験には¹²⁵I-α-rANP₁₋₂₈ (最終濃度: 5pM~200pM) を含むBinding buffer 100 μlを加え、それぞれ4℃で24時間Incubationした。B/F分離は4℃でSeparation buffer [0.03 % Charcoal, 0.3 % Dextran T70 を含む50mM Tris-HCl buffer pH7.4] 300 μlを加えて、混和後3000×gで30分間冷却遠心分離して行った。10⁻⁹Mの過剰量非標識ANP存在下の結合をもって非特異的結合 (NSB) とした。

5. 蛋白定量

Lowry法に従い、膜分画の蛋白定量を行った²⁸⁾。Bovine Serum Albumin (BSA) を標準蛋白とした。

6. 統計分析

結果はmean ± SEで表示し、Student's t-testで統計分析を行った。

結 果

対照ラットとDOCA食塩高血圧ラット間において、体重では差を認めなかったが、収縮期血圧、心房重量と心室重量はDOCA食塩高血圧ラットで有意に増加した (表1)。血漿ANP濃度はDOCA食塩高血圧ラットで64.1 ± 13.3fmol/mlと対照ラットの28.4 ± 3.8fmol/mlに比し、有意に上昇したが、血漿BNP濃度は測定不能であった (図1)。ANPの心房組織濃度と含量はDOCA食塩高血圧ラットで対照ラットに比し、それぞれ33.0 %と25.0 %と有意に減少した。一方、心室ANP濃度は5倍、含量は5.5倍に有意に上昇した。BNPの心房濃度、含量には有意差がなかったが、心室ではDOCA食塩高血圧ラットで濃度が2.4倍、含量

が2.7倍に有意に上昇した（図2）。BNPとANPの含量比（BNP/ANP）は心房ではDOCA食塩高血圧ラットが3.3%，対照ラットが2.3%と有意にDOCA食塩高血圧ラットで高値であったが，心室ではDOCA食塩高血圧ラットが12.1%，対照ラットが約24.6%と逆にDOCA食塩高血圧ラットで有意に低値であった（ $p<0.01$ ）。

DOCA食塩高血圧ラットの腎皮質，腎髄質の重量は対照ラットに比し，有意に増加したが，肺の重量には差がなかった（表1）。

$^{125}\text{I}-\alpha\text{-rANP}_{1-28}$ を用いた受容体結合実験の結果から肺NP-Rの最大結合能（Bmax）はDOCA食塩高血圧ラットでは $38.4 \pm 5.9\text{fmol/mg. protein}$ と対照ラットの $71.0 \pm 10.4\text{fmol/mg. protein}$ に比し有意に減少した（ $p<0.05$ ）。腎皮質NP-Rの最大結合能（Bmax）もDOCA食塩高血圧ラットでは $21.7 \pm 0.5\text{fmol/mg. protein}$ と対照ラットの $32.7 \pm 1.8\text{fmol/mg. protein}$ に比し，有意に減少した（ $p<0.01$ ）。一方，腎髄質NP-Rの最大結合能（Bmax）は両群間に有意差がなかった（図3，表2）。解離定数（Kd）はDOCA食塩高血圧ラットと対照ラットとの間には腎皮質，腎髄質および肺は共に有意差がなかった。対照ラットでは肺，腎皮質と腎髄質のC受容体の割合は55.0%，65.0%，30.0%であり，C受容体に特異的に結合するC-ANF₄₋₂₃による $^{125}\text{I}-\alpha\text{-rANP}_{1-28}$ の結合阻害能（IC₅₀より）は対照ラットで腎皮質＞肺＞腎髄質の順に高かった（図4）。肺のC受容体の含量はDOCA食塩高血圧ラットの $12.7 \pm 2.0\text{fmol/mg. protein}$ と対照ラットの $39.1 \pm 5.7\text{fmol/mg. protein}$ に比し，有意に減少した（ $p<0.05$ ）。腎皮質のC受容体の含量もDOCA食塩高血圧ラットの $11.3 \pm 0.2\text{fmol/mg. protein}$ と対照ラットの $21.3 \pm 1.2\text{fmol/mg. protein}$ に比し，有意に減少した（ $p<0.01$ ）。腎髄質ではDOCA食塩高血圧ラットのC受容体の含量は対照ラットのより軽度減少したが，有意な変動ではなかった。B受容体はDOCA食塩高血圧ラットと対照ラットとの間には肺，腎皮質および腎髄質共に有意差がなかった。

Table 1 Systolic Blood Pressures and Tissue weights in DOCA-salt rats and Control rats.

	Control	DOCA-salt
Systolic Blood Pressure(mmHg)	120.0 $\pm$ 3.5	154.0 $\pm$ 1.7**
Body Weight (g)	311.2 $\pm$ 13.7	287.1 $\pm$ 3.6
Tissue weight (mg)/100g body weight		
Atrium (mg)	13.4 $\pm$ 0.8	16.8 $\pm$ 1.6*
Ventricle (mg)	255.4 $\pm$ 3.1	327.7 $\pm$ 9.6**
Lung (mg)	45.7 $\pm$ 3.4	48.6 $\pm$ 1.6
Kidney (mg)	62.5 $\pm$ 2.1	85.9 $\pm$ 2.2**
Renal cortex (mg)	34.2 $\pm$ 1.5	49.0 $\pm$ 1.4**
Renal medulla (mg)	28.3 $\pm$ 0.7	36.9 $\pm$ 1.6**

Values are expressed as means $\pm$ s.e.m. *; $p<0.05$, **; $p<0.01$, compared with values of control rats.

Fig. 1 Concentrations of atrial natriuretic peptide (ANP) and brain natriuretic peptide (BNP) in Plasma, Atrium and Ventricle of DOCA-salt hypertensive rats (■) and Control rats (□). Values are expressed as means $\pm$ s.e.m., for eight rats per group. **:p<0.01, versus control rats.

Fig. 2 Contents of atrial natriuretic peptide (ANP) and brain natriuretic peptide (BNP) in atrium and ventricle of DOCA-salt hypertensive rats (■) and Control rats (□). Values are expressed as means $\pm$ s.e.m., for eight rats per group. **:p<0.01, versus control rats.

Table 2 Binding parameters of ^{125}I - α -rANP to solubilized membranes of the lung, renal cortex and medulla in DOCA-salt rats and Control rats.

Tissue	Group	Kd (pM)	Bmax (fmol/mg.protein)
Lung	Control	4.8 ± 0.5	71.0 ± 10.4
	DOCA-salt	5.6 ± 0.8	$38.4 \pm 5.9^*$
Renal cortex	Control	2.9 ± 0.4	$32.7 \pm 1.8^\Delta$
	DOCA-salt	3.0 ± 0.2	$21.7 \pm 0.4^{**}$
Renal medulla	Control	4.0 ± 0.4	$37.1 \pm 5.7^\Delta$
	DOCA-salt	4.1 ± 0.3	30.2 ± 3.2

Bmax=Maximal binding capacity, Kd=Dissociation constant. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ vs control. $^\Delta$: $p < 0.01$ vs Bmax of lung in control. Values are expressed as means $\pm$ s.e.m. for five rats per group.

Fig. 3 Scatchard plot analyses of specific ^{125}I - α -rANP binding in lung, renal cortex and medulla in DOCA-salt rats (●) and Control rats (○). The plots represent means for five determinations per group. Kd and Bmax are shown in Table 3.

Fig. 4 Competition between ^{125}I - α -rANP $_{1-28}$ and increasing concentrations of α -rANP $_{1-28}$ or C-ANF $_{4-23}$ for three determinations per group. (○) and (●) are for α -rANP $_{1-28}$, (△) and (▲) are for C-ANF $_{4-23}$ in Control and DOCA-salt rats respectively.

考 察

今回DOCA食塩高血圧ラットの血漿ANP濃度は対照ラットの2.3倍に上昇したが、心房ANPの濃度は対照の67.0%に有意に減少した。この心房ANP濃度の減少は細胞外液の増加によるANP分泌増加の結果と考えられる¹⁷⁾²⁹⁾³⁰⁾。我々は大動脈弁閉鎖不全ラットにおいて心房からのANP分泌の亢進下では心房ANP mRNAが増加しているにも拘らず、心房のANP濃度は有意な減少を示すことを報告している²⁴⁾。実際にItohらはDOCA食塩高血圧ラットの心房ANP mRNAが有意に増加し、心房でANPの合成が増加していることを報告している¹⁷⁾。またDOCA食塩高血圧ラットの心室は肥大を示すと同時にANP濃度は5倍、含量は5.5倍に著明に上昇した。DOCA食塩高血圧ラット、自然発症高血圧ラット (SHR)、脳卒中易発症高血圧自然発症ラット (SHR-SP)、心不全患者の心室ではANP mRNAが著明に増加し、心室からのANPが亢進することが報告されている^{9)17)31)~33)}。従って、DOCA食塩高血圧ラットでは心房と心室のANP合成と分泌が亢進し、心房だけでなく、心室も血中のANP上昇に寄与していると考えられる。増加した血中ANPはDOCA食塩高血圧ラットにおいて体液調節と降圧の代償防御機序に関与していると考えられる。

BNPは主に心室で生合成され、分泌される心臓ホルモンである^{7~10)}。ヒトの血漿BNP濃度は心不全において、その重症度に応じて著しく上昇し、ANP濃度を凌駕することも報告されている³⁴⁾。従ってヒトにおいてはBNPは心室機能を反映すると考えられている。DOCA食塩高血圧ラットでは心室BNPの含量は対照ラットに比し、2.7倍に増加したが、BNPとANPの含量比 (BNP/ANP) ではDOCA食塩高血圧ラットは対照ラットの1/2に低下していた。従ってDOCA食塩高血圧ラットにおいては心室でのBNPの増加はANPに比較して少なく、ヒトの心不全とは異なり、ANPが主要な心室ホルモンであると考えられる。この心室におけるANPのBNPに対する相対的な増加は脳卒中易発症自然発症高血圧ラット (SHR-SP) においても報告されており⁹⁾、ヒトとラットの種属差による可能性も考えられた。

¹²⁵I- α -rANPを用いた飽和結合実験より肺のNP-Rの最大結合能 (Bmax) は腎臓に比し大きいことが明らかとなった (表2)。Ouraも肺が最大のANP結合容量を持っていることを報告している³⁵⁾。肺にあるNP-Rは主にクリアランスに関与するC受容体であることが指摘されているが³⁶⁾³⁷⁾、我々の結合実験の結果からも対照ラットの肺ではC受容体がNP-Rの55.0%を占めていた。図4に示したごとく、DOCA食塩高血圧ラットではC受容体のみ高親和性で、特異的に結合を示すリガンドC-ANF₄₋₂₃¹⁵⁾による¹²⁵I- α -rANPの結合阻害能 (IC₅₀より) が対照ラットよりも低下していることから肺の受容体数の減少はC受容体のDown-regulationが関与していることを示唆している。さらにDOCA食塩高血圧ラットの肺ではNP-RのBmaxは対照ラットに比較し45.9%の減少を認めた。この時、C受容体はNP-Rの37.2%減少し、B受容体には有意な変動がなかったことよりC受容体のDown-regulationが明らかとなった。

腎皮質ではC受容体がNP-R全体の90%以上を占めていると報告¹⁵⁾³⁶⁾されているが、我々の結合実験結果から対照ラットの腎皮質ではC受容体がNP-Rの65.0%存在していた。DOCA食塩高血圧ラットのC-ANF₄₋₂₃による¹²⁵I- α -rANPの結合阻害が対照ラットのよりも低下していることからDOCA食塩高血圧ラット腎皮質でもC受容体がDown-regulationされていることが示唆された。また、腎皮質ではDOCA食塩高血圧ラットのNP-RのBmaxは対照ラットに比較し33.6%の減少を示したが (図3, 表2)、これもC受容体の減少がNP-Rの30.6%の減少と一致しているので、腎皮質ではC受容体のDown-regulationが明らかとなった。C受容体が減少したにもかかわらず、解離定数 (Kd) には変化がないのは α -rANPに対するC受容体とB受容体のKdに差がないためと考えられた³⁸⁾。

一方、腎髄質NP-RのBmaxはDOCA食塩高血圧ラットと対照ラットの間には差がなかった。これは図4に示すように対照ラットのC-ANF₄₋₂₃による¹²⁵I- α -rANP結合阻害が腎皮質に比し小さいことから、腎髄質

にはC受容体が少ないために、C受容体のDown-regulationの影響が少なかったためと考えられる。実際に腎髄質のNP-Rは皮質と対照的に主に膜型グアニル酸シクラーゼB受容体であることが報告されているが¹⁵⁾³⁹⁾、我々の結合実験結果もB受容体の70%以上の存在を示した。

以上の結果からDOCA食塩高血圧ラットにおいては肺と腎皮質のNP-Rが減少し、特にDOCA食塩高血圧ラットの肺のNP-Rの減少は腎臓より著しい結果を示すことが明らかとなった。この減少は血中ANPの上昇によりC受容体がDown-regulationされるためと考えられた。ヒトにおいても鬱血性心不全 (CHF)、本態性高血圧患者では血漿ANPが上昇し、C受容体のみが存在する血小板はNP-RのDown-regulationが生じると報告されている⁴⁰⁾⁴¹⁾。DOCA食塩高血圧ラットで示された血漿ANPの上昇に伴う肺と腎臓皮質のC受容体のDown-regulationは血中ANPレベルを維持し、生物作用を持続させる生体の代償機序の一つだと考えられる。特に、肺は広い毛細血管表面積を持ち、肺動脈のANP濃度が大動脈のANPに匹敵していることを考え合わせれば、DOCA食塩高血圧ラットにおいて腎臓よりも肺のC受容体のDown-regulationが著しかった結果は血中ANPのC受容体を介した動態には肺の関与が腎臓のそれよりも大きいことを示している。

DOCA食塩高血圧ラットでは上昇した血中ANPとcGMPレベルが正相関を呈していることが報告されており¹⁷⁾⁴²⁾⁴³⁾、DOCA食塩高血圧ラットのB受容体がC受容体とは異なり、Down-regulationされないことが示唆されている。さらに自然発症高血圧ラット (SHR) においてはSHRの血中ANPが上昇しているにもかかわらず、B受容体だけが存在する腎乳頭体では対照WKYとの間にNP-Rの有意な差はないこと、また、一腎性Goldblatt型Volume expansion高血圧 (1K1C) では血中ANPが高値となるが、B受容体が主である副腎³⁶⁾ではNP-RがDown-regulationされていないことが報告されている³⁸⁾⁴⁴⁾。

DOCA食塩高血圧ラットでは体液量増加と高血圧のため、血漿ANP濃度が代償的に上昇し、降圧、体液調節に働いていると考えられるが、この生体の防御機序を維持するにはC受容体のDown-regulationによって血中からANPのクリアランスが減少されることが生体に有利に働くと考えられる。

NP-Rの主な発現器官の肺と腎臓にC受容体が大量に分布し、血漿ANPの上昇時にDown-regulationされることはNP-Rの生理的役割の一つが血中からのANPのクリアランスであることを示している。しかし、C受容体にはB受容体とは異なる生物作用がある可能性も残されており、特に肺におけるC受容体の病態生理的意義に関してはさらに検討する必要がある。ナトリウム利尿ホルモンの代謝にはNeutral endopeptidase (NEP) も関与しているため、各種病態におけるNEPの生物活性についても今後検討する必要がある。

ま と め

- 1) DOCA食塩高血圧ラットにおいて、血漿ANP濃度の上昇、心房ANPの減少、心室のANPの増加を観察した。心房BNPには変化なく、心室BNPの増加はANPに比較して少なく、DOCA食塩高血圧ラットではBNPではなく、ANPが主要な心室ホルモンであると考えられた。
- 2) 対照ラットにおいては肺のNP-Rの最大結合能 (Bmax) が腎皮質と腎髄質のそれより大きく ($p < 0.01$)、この中でC受容体の占める割合は腎皮質、肺、腎髄質の順に高かった。
- 3) DOCA食塩高血圧ラットの肺と腎皮質のNP-RのBmaxは対照ラットに比べて、それぞれ45.9%、33.6%有意に減少し、C受容体のDown-regulationを観察した。腎髄質のNP-RのBmaxには有意の変化がなかった。

結 語

DOCA食塩高血圧ラットでは心臓からのANPとBNPの合成の亢進とC受容体の豊富な肺と腎皮質におけ

る受容体のDown-regulationが認められた。一方、B受容体の豊富な腎髄質ではDown-regulationは認められず、Na利尿ペプチドの生物作用を維持するのに合目的に受容体の調節が行われていると考えられた。

謝辞

稿を終えるにあたり、終始研究の御指導、御校閲を頂いた田中一成先生、貴重なアドバイスを頂いた小松勝利先生、小谷仁人先生および協力してくださった浜松医科大学第二内科の方々に深謝致します。

文 献

- 1) de Bold AJ, Borenstein HB, Veress AT, and Sonnenberg H. A rapid and potent natriuretic response to intravenous injection of atrial myocardial extract in rats. *Life Sci* 1981;28:89-94
- 2) Atlas SA, Kleinert HD, Camargo MJ, Januszewicz A, Sealey JE, Laragh JH, Schilling JW, Lewicki JA, Johnson LK, and Maack T. Purification, sequencing and synthesis of natriuretic and vasoactive rat atrial peptide. *Nature* 1984;309:717-7, 19
- 3) Currie MG, Geller DM, Cole BR, Galluppi GR, and Needleman P. Purification and sequence analysis of bioactive atrial peptides (atriopeptins). *Science* 1984;223:67-69
- 4) Flynn TG, de Bold ML, de Bold AJ. The amino acid sequence of an atrial peptide with potent diuretic and natriuretic properties. *Biochem Biophys Res Commun* 1983;117:859-865
- 5) Tanaka I, Misono KS, Inagami T. Atrial natriuretic factor in rat hypothalamus, atria and plasma: determination by specific radioimmunoassay. *Biochem Biophys Res Commun*. 1984;124:663-668
- 6) Sudoh T, Kanagawa K, Minamino N, Matsuo H. A new natriuretic peptide in porcine brain. *Nature* 1988;332:78-81
- 7) Ogawa Y, Nakao K, Mukoyama M, Shirakami G, Itoh H, Hosoda K, Saito Y, Arai H, Suga S, Jougasaki M, et al. Rat brain natriuretic peptide-tissue distribution and molecular form. *Endocrinology* 1990;126:2225-2227
- 8) Sudoh T, Minamino N, Kanagawa K, Matsuo H. C-type natriuretic peptide (CNP): a new member of natriuretic peptide family identified in porcine brain. *Biochem Biophys Res Commun* 1990;168(2):863-870
- 9) Ogawa Y, Nakao K, Mukoyama M, Hosoda K, Shirakami G, Arai H, Saito Y, Suga S, Jougasaki M, Imura H. Natriuretic peptides as cardiac hormones in normotensive and spontaneously hypertensive rats. The ventricle is a major site of synthesis and secretion of brain natriuretic peptide. *Circ Res* 1991;69:491-500
- 10) Nakamura S, Naruse M, Naruse K, Kawana M, Nishikawa T, Hosoda S, Tanaka I, Yoshimi T, Yoshihara I, Inagami T, et al. Atrial natriuretic peptide and brain natriuretic peptide coexist in the secretory granules of human cardiac myocytes. *Am J Hypertens* 1991;Nov 4(11):909-912
- 11) Chinkers M, Garbers DL. Signal transduction by guanylyl cyclase. *Annu Rev Biochem* 1991;60:553-575
- 12) Kuno T, Andresen JW, Kamisaki Y, Waldman SA, Chang LY, Saheki S, Leitman DC, Nakane M, Murad F. Co-purification of an atrial natriuretic factor receptor and particulate guanylate cyclase from rat lung. *J Biol Chem*. 1986;261:5817-5823
- 13) Fuller F, Porter JG, Arfsten AE, Miller J, Schilling JW, Scarborough RM, Lewicki JA, Schenk DB. Atrial natriuretic peptide clearance receptor, complete sequence and functional expression of cDNA clones. *J Biol Chem*. 1988;263(19):9395-9401
- 14) Shimonaka M, Saheki T, Hagiwara H, Ishido M, Nogi A, Fujita T, Wakita K, Inada Y, Kondo J, Hirose S. Purification of atrial natriuretic peptide receptor from bovine lung. Evidence for a disulfide-linked subunit structure. *J Biol Chem*. 1987;262:5510-5514
- 15) Maack T, Suzuki M, Almeida FA, Nussenzweig D, Scarborough RM, Mcenroe GA, Lewicki JA. Physiological role of silent receptors of atrial natriuretic factor. *Science* 1987;238:675-678
- 16) Itoh H, Nakao K, Mukoyama M, Yamada T, Hosoda K, Shirakami G, Morii N, Sugawara A, Saito Y, Shino S. Chronic blockade of endogenous atrial natriuretic polypeptide (ANP) by monoclonal antibody against ANP accelerates the development of hypertension in spontaneously hypertensive and deoxycorticosterone acetate-salt-hypertensive rats. *J Clin Invest* 1989;84(1):145-154
- 17) Itoh H, Nakao K, Mukoyama M, Arai H, Yamada T, Saito Y, Shino S, Hosoda K, Shirakami G, Suga S. Pathophysiological Role of Augmented Atrial Natriuretic Polypeptide Gene Expression in DOCA-salt Hypertension; Effects of Atrial Natriuretic Polypeptide Monoclonal Antibody. *Am J Hypertens* 1991;4:39-44
- 18) Gauquelin G, Schiffrin EL, Cantin M, Garcia R. Specific binding of atrial natriuretic factor to renal glomeruli in Doca and Doca-salt-treated rats correlation with atrial and plasma levels. *Biochem Biophys Res Commun* 1987;145:522-531
- 19) Schiffrin EL, St Louis J. Decreased density of vascular receptors for atrial natriuretic peptide in DOCA-salt hypertensive rats. *Hypertension* 1987;9:504-512
- 20) Hirata Y, Hirose S, Takara S, Takagi Y, Matsubara H. Down-regulation of atrial natriuretic peptide receptor and cyclic GMP response in cultured rat vascular smooth muscle cells. *Eur J Pharmacol* 1987;135:439-442

- 21) Hirata Y, Takata S, Takagi Y, Matsubara H, Omae T. Regulation of atrial natriuretic peptide receptors in cultured vascular smooth cells of rat. *Biochem Biophys Res Commun* 1986;138(1):405-412
- 22) Cahill PA, Redmond EM, Keenan AK. Vascular atrial natriuretic factor receptor subtypes are not independently regulated by atrial peptides *J Biol Chem*. 1990;265(35):21896-21906
- 23) Kishimoto T, Nakao K, Suga S, Hosoda K, Yoshimasa T, Itoh H, Imura H. Down-regulation of C-receptor by natriuretic peptides via ANP-B receptor in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol*. 1993 Oct;265(4 pt 2):H1373-1379
- 24) Morita H, Tanaka I, Oda T, Ichiyama A, Yamazaki T, Uematsu T, Nakashima M, Yoshimi T. Atrial natriuretic peptide messenger RNA and peptide in rats with aortic valve insufficiency. *Peptides* 1990;11(4):843-847
- 25) Komatsu K, Tanaka I, Funai T, Ichiyama A, Yoshimi T. Increased level of Atrial natriuretic peptide messenger RNA in the hypothalamus and brainstem of spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens* 1992;10:17-23
- 26) Komatsu K, Tanaka I, Yoshimi T, Funai T, Ichiyama A. Natriuretic peptide と高血圧. SHR における ANP と BNP について. *血液と循環* 1991;5(1):32-38
- 27) Hunter WM, Greenwood FC. Preparation of Iodine-131 Labeled Human Growth Hormone of High Specific Activity. *Nature* 1962;194:495-496
- 28) Lowry OH, Rosebrough NJ, Lewis Farr A and Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265-275
- 29) Sugimoto T, Ishii M, Hirata Y. Increased release of atrial natriuretic polypeptides in rats with DOCA-salt hypertension. *Life Sci* 1986;38:1351-1358
- 30) Sakamoto T, Nakao K, Sugawara A. Effect of DOCA and Salt Loading on atrial and plasma levels of atrial natriuretic polypeptide. *Peptide Chemistry* 1986;Osaka, Japan. pp373-378
- 31) Saito Y, Nakao K, Arai H, Nishimura K, Okumura K, Obata K, Takemura G, Fujiwara H, Sugawara A, Tamada T. Augmented expression of atrial natriuretic polypeptide gene in ventricle of human failing heart. *J Clin Invest* 1989;83:298-305
- 32) Arai H, Nakao K, Saito Y, Morii N, Sugawara A, Yamada T, Itoh H, Shino S, Mukoyama M, Ohkubo H. Augmented expression of atrial natriuretic polypeptide gene in ventricles of spontaneously hypertensive rats (SHR) and SHR-stroke prone. *Circ Res* 1988;62:926-930
- 33) Yasue H, Obata K, Okumura K, Kurose M, Ogawa H, Matsuyama K, Jougasaki M, Saito Y, Nakao K, Imura H. Increased secretion of atrial natriuretic polypeptide (ANP) from the left ventricle in patients with dilated cardiomyopathy. *J Clin Invest*. 1989;83:46-51
- 34) Mukoyama M, Nakao K, Obata K, Jougasaki M, Yoshimura M, Morita E, Hosoda K, Suga S, Ogawa Y, Yasue H. Augmented secretion of brain natriuretic peptide in acute myocardial infarction. *Biochem Biophys Res Commun* 1991;180(1):431-436
- 35) Ou LC, Yen S, Sardella GL. Dose atrial natriuretic factor protect against right ventricular overload? II. Tissue binding. *J Appl physiol* 1989;67:1612-1616
- 36) Suga S, Nakao K, Mukoyama M. Natriuretic Peptide Receptor. *J Jpn Coll Angiol* 1990;30:1239-1244
- 37) Klinger JR, Moalli R, Warburton RR, Wrenn DS, Hill NS. C-receptor ligand blocs pulmonary clearance of atrial natriuretic peptide in isolated rat lungs. *Proc Soc Exp Biol Med* 1992;201:154-158
- 38) Martin ER, Lewicki JA, Scarborough RM, Ballermann BJ. Expression and regulation of ANP receptor subtypes in rat renal glomeruli and papillae. *Am J Physiol* 1989;257:F649-657
- 39) Fontoura BM, Nussenzweig DR, Pelton KM, Maack T. Atrial natriuretic factor receptors in cultured renomedullary interstitial cells. *Am J Physiol* 1990;258:C692-699
- 40) Schiffrin EL. Decreased density of binding sites for atrial natriuretic peptide on platelets of patients with severe congestive heart failure. *Clin Sci* 1988;74:213-218
- 41) Schiffrin EL, St Louis J, Essiembre R. Platelet binding sites and plasma concentration of atrial natriuretic peptide in patients with essential hypertension. *J Hypertens* 1988;6:565-572
- 42) Murad F, Leiman DC, Bennett BM, Molina C, Waldman SA. Regulation of guanylate cyclase by atrial natriuretic factor and the role of cyclic GMP in vasodilation. *Am J Med Sci* 1987;294:139-143
- 43) Hamet P, Tremblay J, Pang SC, Skuherska R, Schiffrin EL, Garcia R, Cantin M, Genest J, Palmour R, Ervin FR. Cyclic GMP as mediator and biological marker of atrial natriuretic factor. *J Hypertens* 1986;Suppl4:S49-56
- 44) Schiffrin EL, St Louis J, Garcia R, Thibault G, Gartin M, Genest J. Vascular and Adrenal Binding Sites for Atrial Natriuretic Factor; Effects of Sodium and Hypertension. *Hypertension* 1986;vol 8(Suppl. I):I-141-I-145

(受付日: '94. 8.31)

(採択日: '94.11.28)