



培養ラット脳内毛細血管内皮細胞のc-GMP産生に及ぼす心房性ナトリウム利尿ペプチドおよびC-タイプナトリウム利尿ペプチドの効果

中村, 秀美

(Citation)

神戸大学医学部紀要, 58(4):229-237

(Issue Date)

1998-03

(Resource Type)

departmental bulletin paper

(Version)

Version of Record

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/00177399>



培養ラット脳内毛細血管内皮細胞のc-GMP産生に及ぼす 心房性ナトリウム利尿ペプチドおよび C-タイプナトリウム利尿ペプチドの効果

神戸大学医学部脳神経外科（指導教官：玉木紀彦教授）

中 村 秀 美

（平成10年1月20日）

<要 約>

ラットの脳内毛細血管内皮細胞の分離培養系を確立して、in vitroにおける心房性ナトリウム利尿ペプチド（ANP）およびC-タイプナトリウム利尿ペプチド（CNP）の脳内毛細血管内皮細胞内cyclic guanosine 3', 5'-monophosphate（c-GMP）産生に及ぼす効果を検討した。

方法：Sprague-Dawleyラットの大脳皮質の毛細血管内皮細胞を2段階酵素法により分離・培養した。第Ⅷ因子関連抗原の免疫組織染色により内皮細胞を同定し、プロスタグランジン I_2 （PGI $_2$ ）産生能とガンマグルトミルトランスベプチダーゼ（ γ -GTP）を測定することによって細胞機能を確認した。第3から第8継代の培養脳内毛細血管内皮細胞にANP（8-33）およびCNP-53を反応させ、産生される細胞内c-GMP濃度を測定しANP（8-33）とCNP-53の培養脳内毛細血管内皮細胞に対する作用を検討した。

結果：（1）血管内皮細胞に特徴的な生理機能であるPGI $_2$ 産生能を有する脳内毛細血管内皮細胞の分離・培養系が確立された。（2） γ -GTP産生能は、培養早期に消失した。（3）ANP（8-33）を反応させるとc-GMP産生量は反応時間5分で最大値に達した。（4）ANP（8-33）の濃度が 10^{-7} M以上で細胞内c-GMP濃度は有意に増加した。（5）CNP-53を反応させても細胞内c-GMP濃度の有意な変化は認められなかった。

結論：生理機能を保持した脳内毛細血管内皮細胞培養系を作成した。ANPによる細胞内c-GMP濃度の上昇は培養条件によらず安定していた。CNPは継代培養した脳内毛細血管内皮細胞に対しては作用しなかった。

<緒 言>

脳内毛細血管内皮細胞は、脳循環と代謝の境界に存在して両者の制御に重要な役割を担っており、脳神経外科領域においても虚血性疾患、脳浮腫などの病態理解のためにその機能の解明は重要である。生理機能を有する正常脳内毛細血管内皮細胞の分離、継代培養を安定して行うことには技術的な困難を伴うが、近年、その分離・培養が可能となりその生理機能の解明が進みつつある。

心房性ナトリウム利尿ペプチド（Atrial natriuretic peptide, ANP）は腎臓、血管、副腎などに存在する特異的受容体を介して、ナトリウム利尿、降圧、血管弛張作用などを示すペプチドであり、水分、電解質、血圧の調節に関与している^(1,2)。中枢神経系においてもANPの受容体が視床下部や脳室周囲組織のほか、脈絡叢や脳内毛細血管などにも存在することが明らかになり、ANPが血液-髄液、脳-血液関門の機能に関与していることが示唆されている⁽³⁾。従ってその研究は脳浮腫の治療や水頭症の治療に関係して行われている。

また中枢神経系に特異的なナトリウム利尿ペプチドとしてC-タイプナトリウム利尿ペプチド（CNP）の存在が明らかにされた⁽⁴⁾が、現在では腎臓、消化管、肺などにも存在することが確認されている⁽⁵⁾。CNPもANPと同様またはそれ以上に脳の容積調節への関与が推測されているものの^(4,6)、脳内毛細血管における生理作用については十分に知られていないのが現状である。

ラットの脳内毛細血管内皮細胞を生理機能を保持して分離培養する実験系を確立し、それらを用いてANP（8-33）とCNP-53の作用についてナトリウム

Key words：脳内毛細血管内皮細胞，心房性ナトリウム利尿ペプチド，C-タイプナトリウム利尿ペプチド，水頭症，脳浮腫

利尿ペプチドのセカンドメッセンジャーであるcyclic 3', 5'-monophosphate (c-GMP)⁽⁷⁾の細胞内濃度を測定することにより検討した。

＜方 法＞

(1) ラット脳内毛細血管内皮細胞の分離・培養・同定:

200～300gの雄Sprague-Dawleyラット10匹の大脳皮質から毛細血管内皮細胞を2段階酵素法により分離し、継代培養した⁽⁸⁾。大脳皮質の髄膜と血管を除去し、円刃刀で約1㎡の大きさに細切した。20mlのDalbecco's minimum essential medium (D-MEM, Nissui, Tokyo, Japan) と0.5%ディスパーゼ (Boehringer Mannheim, Germany) 中で37℃で3時間処理した。次にD-MEMを含む13% dextran (分子量70,000, Sigma Chemical, St. Louis, MO) 80mlに浮遊させた。5,800gで10分間遠心分離し、毛細血管を脳組織から分離した。そして300μmのナイロンメッシュに通して1mg/mlコラゲナーゼ/ディスパーゼ (Boehringer Mannheim, Germany) 5 ml中で6時間処理した。その後、50%パーコール (Pharmacia, Uppsala, Sweden) を加えたD-MEMに入れ26,000gで50分間遠心分離すると試験管の上3分の1の部分に毛細血管内皮細胞が得られ、直径60mmのコラーゲンコーティングしたシャーレ (Falcon, Lincoln Park, NJ) に播種した。2週間後に内皮細胞は均一な敷石状の様相を呈した。0.25%トリプシン, 0.01% ethylenediamine tetra acetic acid (EDTA) で処理後1:2の割合で継代培養した。培養液は20%牛胎児血清, 2 mMグルタミン, 100U/mlペニシリンG, 100mg/ml硫酸ストレプトマイシン0.08%ヘパリンを含むD-MEMを用い2日毎に入れ替えた。

初代から10代の継代細胞をコラーゲンコーティングしたカバーガラス上に培養し、第Ⅷ因子関連抗原の免疫組織染色を行うことにより内皮細胞を同定し⁽⁹⁾、第Ⅷ因子関連抗原陽性で内皮細胞と確認された細胞⁽¹⁰⁾を実験に供した。

(2) プロスタグランジン I₂ (Prostaglandin I₂; PGI₂) 産生能測定による生理機能の検証

内皮細胞が産生し抗血栓作用や血管拡張作用を有するPGI₂⁽¹¹⁾の産生能を、培養細胞上清中に産生・放出されるPGI₂の安定した代謝産物である6-keto-PGI_{1α}をエンザイムイムノアッセイキット (Amersham, Arlington Heights, IL) を用いて測定することにより検証した。直径30mmのコラーゲンコーティングしたプラスチックシャーレに内皮細胞を均一、敷石状になるまで培養し、培養液をリン酸緩衝生理食塩水に変

更して3時間CO₂インキュベーターに戻した後に上清中に産生・放出された6-Keto-PGI_{1α}量と、アラキドン酸を加えた場合の6-keto-PGI_{1α}の産生量をmg蛋白あたりに換算して測定した。

(3) ガンマグルタミルトランスペプチダーゼ (γ-glutamyl transpeptidase; γ-GTP) を指標とした脳血液関門の検証

脳血液関門の酵素的な指標と考えられているγ-GTP⁽¹²⁾を測定した。Mischekらの方法⁽¹³⁾により、1mg蛋白あたり1分間に産生されるlnmolの3-carboxyl-4-nitroanilineを1 unitの酵素活性として測定した。

(4) ANPとCNP刺激による内皮細胞内のc-GMP産生能の測定

コラーゲンコーティングした直径30mmのシャーレ上で均一、敷石状になった、第3から第8代継代の培養脳内毛細血管内皮細胞を37℃で、cyclic nucleotide phosphodiesterase inhibitorであるisobutylmethylxanthineを加えて10分間処理した後、10^{-10M}から10^{-5M}のANP (8-33) (Penninsula Laboratorise, Belmont, CA), CNP-53 (ペプチド研究所, 大阪) を反応させた。トリクロロ酢酸で反応を停止させ、産生された細胞内c-GMP濃度をエンザイムイムノアッセイ法 (Biotrak, Amersham International, Buckinghamshire, England) により測定し、10⁶細胞当たりの産生量で表示した。また、反応時間とc-GMPの産生量との関係についても検討した。c-GMPの測定は各測定点で5検体ずつとした。検定はt検定を用い、P<0.01を有意とした。

＜結 果＞

(1) 脳内毛細血管内皮細胞の分離・培養・同定

パーコールを用いて分離すると多数の毛細血管の塊が得られた。これを直径30mmのコラーゲンコートしたシャーレ8個に播種すると毛細血管塊から島状に均一な内皮細胞が分裂し、2から3週間で特徴的な敷石状の様相を呈した (Fig.1-A)。細胞は多角形であり、大きな丸い核が認められた。継代回数が増えるに従って細胞は多角形の敷石状を呈する構造から一部が細長い紡錘状の形状に変化する事が観察された (Fig.1-B)。初代から第10代継代のほとんど全ての細胞が第Ⅷ因子関連抗原により染色され、血管内皮細胞であることが確認された (Fig.2-A, 2-B)。染色の特徴としては細胞質、特に核の周辺が強く染色されていた。細胞の形態の変化にもかかわらず、第Ⅷ因子関連抗原の陽性は保持された。

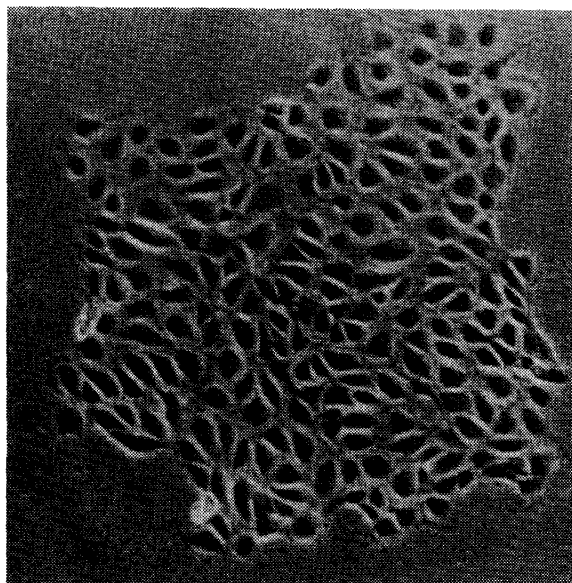
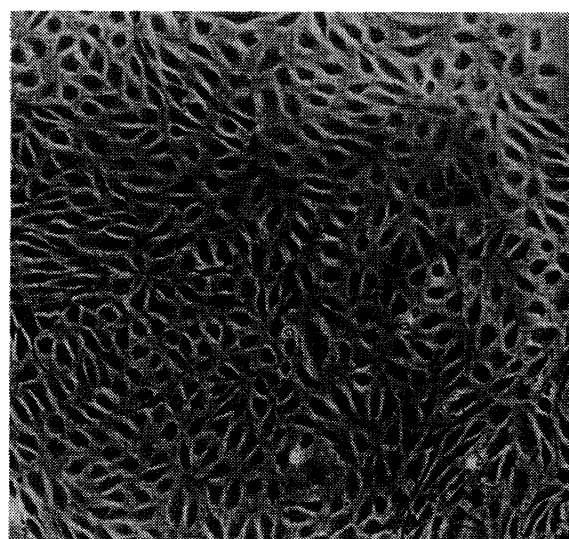


Figure 1. Cultured rat brain capillary endothelial cells viewed by phase-contrast microscopy. ($\times 100$)

(Figure 1 - A) Primary culture of endothelial cells 5 days after seeding. They had the typical appearance: polygonal cells with a large round nucleus and very little overlapping of adjacent cells.



(Figure 1 - B) Passage 6. There are some spindle-shaped endothelial cells.

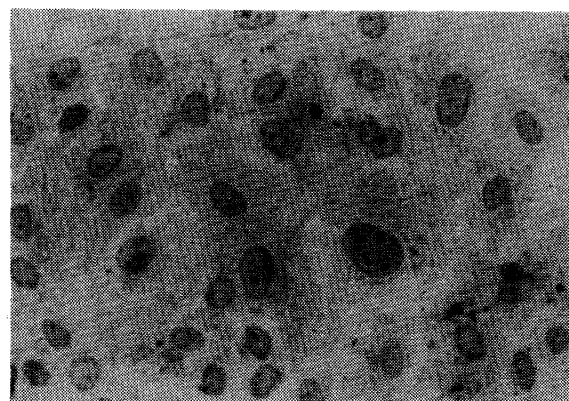
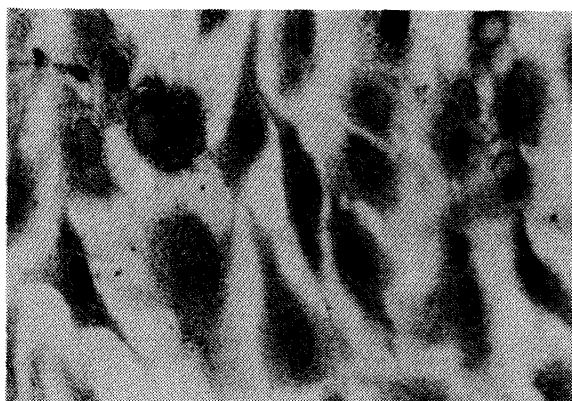


Figure 2. Immunoperoxidase staining for Factor VIII-related antigen in cultured rat brain capillary endothelial cells (Passage 10) (Figure 2-A) and control (Figure 2-B) ($\times 400$).

(2) 6-keto-PGF_{1α}の測定によるPGI₂産生能の検証
初代から少なくとも第10代継代までの細胞では6-keto-PGF_{1α}の産生がほぼ変化なく認められた。初代, 第3代, 第10代継代細胞でそれぞれ 3.6 ± 0.4 , 3.8 ± 0.4 , $3.5 \pm 0.3 \text{ ng} / 10^6 \text{ cells} / 2 \text{ hrs}$ の6-keto-PGF_{1α}が産生されていた。このことは今回培養した脳内毛細血管内皮細胞がPGI₂産生能を保持していることを示した。またPGI₂の前駆体であるアラキドン酸 $100 \mu\text{g}$ を添加することにより6-keto-PGF_{1α}の産生量が増加し, 初代, 第3代, 第10代継代細胞でそれぞれ 12.5 ± 1.4 , 13.5 ± 1.4 , $14.0 \pm 1.8 \text{ ng} / 10^6 \text{ cells} / 2 \text{ hrs}$ の6-keto-PGF_{1α}の産生を認めた (Fig. 3)。継代回数

の増加に伴う細胞形態の変化にPGI₂産生能は影響されなかった。

(3) γ -GTPを指標とした脳血液関門の検証

培養開始後14日目の初代細胞の γ -GTP含有量は $4 \text{ units} / \text{mg}$ 蛋白であった。しかし第2代継代以降の細胞では検出感度以下であり, γ -GTPの産生能が培養の極めて早い時期に消失することを示した。

(4) ANPとCNP刺激による内皮細胞内のc-GMP産生能の測定

培養脳内毛細血管内皮細胞に対して 10^{-7} M のANP (8-33)を反応させ反応時間と細胞内c-GMP濃度との関係を検討した。反応時間が1分から5分までは細胞

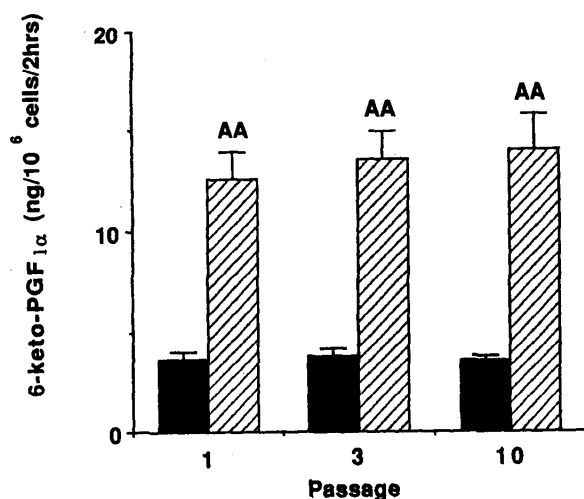


Figure 3. Production of 6-keto-PGF_{1α} by cultured rat brain capillary endothelial cells. AA, Arachidonic acid 100 μg.

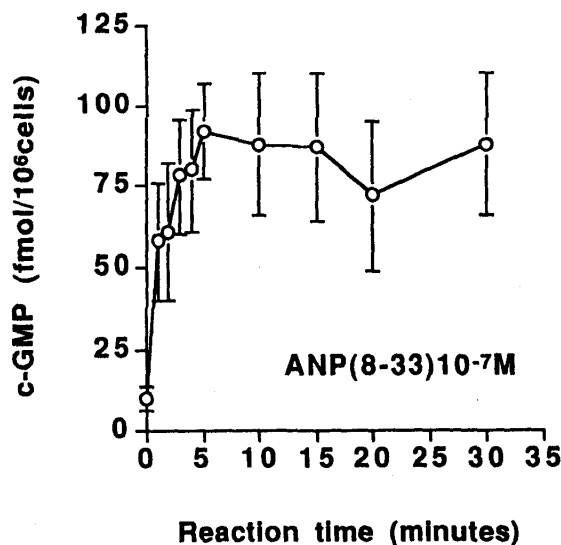


Figure 4. Graph showing the relationship between the time after the application of ANP (8-33) and the production of c-GMP. Application of ANP (8-33) at the dose of 10^{-7} M demonstrated the maximum production of c-GMP within 5 minutes. Values are presented as the mean $\pm$ standard error of the mean.

内c-GMPの濃度は次第に増加した。1分、2分、3分、4分で細胞内c-GMP濃度は 58 ± 18 , 61 ± 21 , 78 ± 18 , 80 ± 19 fmol/ 10^6 cellsとなり、5分で最大値の 92 ± 15 fmol/ 10^6 cellsに達してそれ以後はプラトーを示した (Fig.4)。この結果から以下の実験はナトリウム利尿ペプチドの培養脳内毛細血管内皮細胞に対する反応時間を5分としておこなった。

ANP (8-33) を培養脳内毛細血管内皮細胞に反応させ細胞内c-GMP濃度を測定するとANP (8-33) の濃度が 10^{-10} M, 10^{-9} M, 10^{-8} Mまでは 9.5 ± 8.2 , $9.8 \pm$

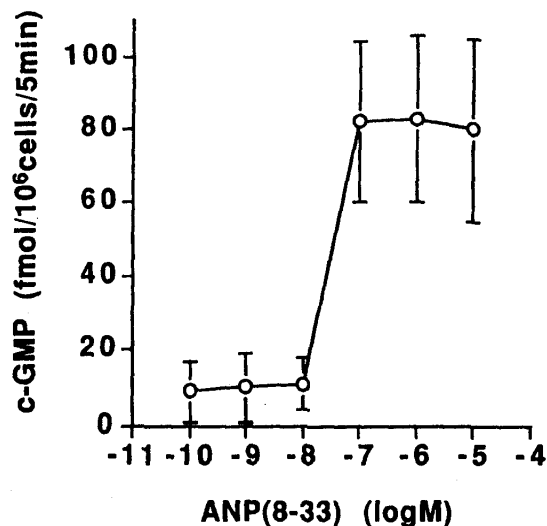


Figure 5. Graph showing the relationship between ANP (8-33) concentration and c-GMP production. Significant response was observed at the dose higher than 10^{-7} M ($P < 0.01$). Values are presented as the mean $\pm$ standard error of the mean.

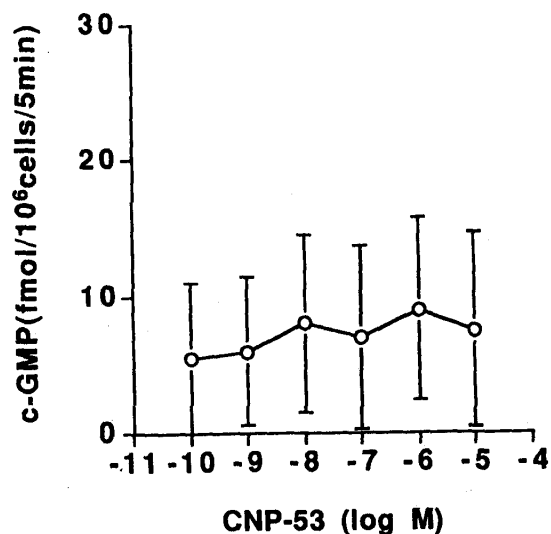


Figure 6. Graph showing the relationship between CNP-53 concentration and c-GMP production. There was no response observed by CNP at the dose between 10^{-10} M and 10^{-5} M. Values are presented as the mean $\pm$ standard error of the mean.

8.9 , 10.8 ± 7.9 fmol/ 10^6 cell/5 minであったが、ANP (8-33) の濃度が 10^{-7} M以上となると細胞内c-GMP濃度は著明に増加し 10^{-7} M, 10^{-6} M, 10^{-5} Mでそれぞれ 82.5 ± 22.6 , 83.3 ± 23.2 , 80.7 ± 25.4 fmol/ 10^6 cells/5minとなり、 10^{-7} Mから 10^{-5} MのANP (8-33) を反応させた時は 10^{-10} Mから 10^{-8} MのANP (8-33) を反応させた時より有意に細胞内c-GMP濃度は増加した。 ($P < 0.01$) (Fig.5)。ANP (8-33) の濃度が 10^{-8} Mから 10^{-7} Mの間に生理的作用濃度が存

在するものと思われた。

CNP-53を 10^{-10} Mから 10^{-5} Mの濃度で培養脳内毛細血管内皮細胞に作用させても細胞内c-GMP濃度は 6.3 ± 5.6 から 9.2 ± 6.9 fmol/ 10^6 cells/5minの変動にとどまり、CNP-53の濃度が変化してもc-GMPの産生量には有意な差は認められなかった (Fig.6)。

<考 察>

(1) 脳内毛細血管内皮細胞の分離培養系について：

脳血液関門を有する特別な内皮細胞である脳内毛細血管内皮細胞は脳代謝と循環系との境界に存在して水分、電解質、栄養の輸送を制御しており、その破綻は脳浮腫をはじめとするさまざまな病態を惹起し、致命的となることも稀ではない。循環と代謝を結ぶ鍵を握る脳内毛細血管内皮細胞の制御機構の解明は脳血管障害、頭部外傷、脳腫瘍の病態解明に欠くことが出来ないことから注目されつつある。

脳内毛細血管内皮細胞を生理的機能を保持して分離し長期に培養する事は技術的に困難であるが、近年、分離培養技術の向上と共にウシ、ブタ、ウザギ、ラット、砂ネズミ、ヒトの脳を用いて可能となってきた^(8,14,15,16,17,18,19,20,21)。このような機能細胞の培養系は脳内毛細血管における物質の透過性や代謝機構の解明のために重要な研究手段となりつつある。入手の容易さと一回に大量に分離培養できることからウシ、ブタ脳を用いた実験系が一般的であるが、今回の実験系のようにラット脳を用いることは1回に入手出来る細胞量が少ないという欠点はあるものの、in vivoの研究と同一種の動物を用いて一貫した実験ができるという利点がある。Goldsteinらは20ヶ月のラット脳からメッシュとビーズを用いて内皮細胞を分離する方法を報告しているが⁽¹⁴⁾、本研究での方法はBowmanらがウシ脳に用いている2段階酵素法⁽¹⁵⁾にメッシュを組み合わせることで機能細胞の収率を向上させている点に特色がある。分離培養した細胞が正常機能を保持することは実験を行う上で重要であるが、分離培養とともに星状神経膠細胞との接触が絶たれ、血流による物理的な刺激も失われるためにin vivoにおける機能を失い変化することが考えられる。内皮細胞により一般的に認められる重要な産生物であるPGI₂産生能は安定に保持されるものの、今回の実験系では脳内毛細血管の大きな機能である脳血液関門の指標と考えられる γ -GTPの産生能が培養早期に失われた。この結果はMeyerら⁽¹⁶⁾がブタ脳内毛細血管内皮細胞培養系において経時的に観察した γ -GTP産生能の結果と合致しており、分離培養により星状神経膠細胞などの毛細血管周囲細

胞の作用を失った内皮細胞が急速に脳血液関門の指標である γ -GTPの産生能を失うことを示していることから、脳血管に特異的な機能を培養系で検討する場合に注意を要する。

(2) 脳内毛細血管内皮細胞に対するANPの作用について：

ANPは心房の心筋顆粒内で合成され、血漿中へと分泌される蛋白であり、腎臓に対するナトリウム利尿作用、副腎に対するアルドステロン分泌抑制作用、血管内皮細胞や血管平滑筋に対する血管拡張作用などを有するとされている^(1,2)。ANPの生物学的作用は、まず特異的受容体に結合し、ついでc-GMPを産生するという過程を経て現れている。そのため、c-GMPがAMPのセカンドメッセンジャーであると考えられている⁽⁷⁾。Steardoウサギの脈絡叢上皮細胞にANPの受容体を認め、ANPの脳室内投与は髄液産生を抑制すると報告した⁽²²⁾。またDocziは頭蓋内圧亢進患者において、髄液中のANP濃度が高いことを指摘した⁽²³⁾。Ibaragiらは脈絡叢におけるANPの髄液産生の抑制には脳内毛細血管におけるようなアミロライド感受性ナトリウムの輸送が関与している可能性があるとしている⁽²⁴⁾。またカオリンによる後天性水頭症ラットの脈絡叢ではANP受容体が増加しており、先天性水頭症ラットでは減少しているという報告もある⁽²⁵⁾。これらの報告はANPが脳浮腫の発生、消退の機序や髄液産生、吸収動態に関与していることを強く示唆している。

脳浮腫や髄液産生動態におけるナトリウム利尿ペプチドの役割を調べる第一歩として、培養脳内毛細血管内皮細胞に対するナトリウム利尿ペプチドの作用、すなわちそのセカンドメッセンジャーであるc-GMPの測定を行った。今回の実験で、ANPの作用によりc-GMPの濃度が増加することが明らかになり、培養脳内毛細血管内皮細胞にANPの受容体が存在することが示された。Kobayashiらは脳内毛細血管内皮細胞の初代培養系においてANPによりc-GMPが用量依存性に増加することを示したが⁽²⁶⁾、その作用強度は今回の実験結果の10倍以上であった。一方、Vigneらはクローニングした脳内毛細血管内皮細胞系においてANPの作用を解析したが⁽²⁷⁾、その強度は今回の実験結果と同様であった。実験条件によってその作用強度は異なるものの、ANP受容体は培養条件や継代数に関わらず比較的安定して発現することから、ANPの作用である血管拡張作用、水分調節などが中枢神経系でも脳内毛細血管を介して働いていると考えられる。クモ膜下出血、脳浮腫、水頭症時の血液中や髄液中のANP濃度の上昇は必ずしも認められていないが^(23,28)、

脳浮腫時における脳内水分調整や水頭症における髄液産生吸収動態に対してANPが受容体の調整を介して影響を及ぼしていることは十分に考えられる。

(3) 脳内毛細血管内皮細胞に対するCNPの作用について：

CNPはナトリウム利尿ペプチドの中でANP, brain natriuretic peptide (BNP) に次いで、最も新しく単離された第3のナトリウム利尿ペプチドであり⁽⁴⁾、ヒトやラットの脳内では視床下部、視床、小脳などに豊富に存在するとされている⁽⁵⁾。CNPは利尿活性、降圧活性を示すものの、その強度はANPのそれぞれの100分の1、30分の1と極めて弱い⁽²⁹⁾。しかし、ヒヨコ直腸弛緩活性においては、CNPはANPの3から4倍の活性を示す。このようにCNPはナトリウム利尿ペプチドとしての薬理活性を有するものの、その活性スペクトルや強度はANPとは大きく異なっている^(4,6)。CNPはANPと似た構造を有するが、ANPとは異なる受容体と結合して作用を発現する⁽³⁰⁾。そして様々な実験結果からCNPは脳神経系を中心に作動する神経ペプチドの可能性もあると考えられている⁽³¹⁾。Stingoらは血管内皮細胞でCNPが生成されているとし、CNPがオートクリン作用を有している可能性を示している⁽³²⁾。またCNP-22は循環型であり、CNP-53は細胞内貯蔵型であるとしている⁽³²⁾。Uedaらは新鮮組織内ではCNP-22よりCNP-53のほうがかなり多く存在し、ブタ脳内ではCNP-53を中心として機能している可能性が高いと報告している⁽³³⁾。

脳内毛細血管内皮細胞培養系におけるANP, CNPの相対的な作用強度については異なった報告がなされている。Vigneらはクローニングした脳内毛細血管内皮細胞系ではCNPが強力な作用を有しており、ANPの100倍の作用強度を示すと報告している⁽²⁷⁾。一方、Kobayashiらはラットの脳内毛細血管内皮細胞の初代培養細胞にCNPを作用させたところ、c-GMPがCNPの濃度依存性に産生されたと報告しているが、その作用強度はANPの10分の1にしかすぎないとしておりVigneらの報告との間に一致を見ていない⁽²⁶⁾。今回の実験で継代した脳内毛細血管内皮細胞ではCNPに対する反応性が得られなかったが、これらの結果はCNP受容体の発現は培養条件、継代数によって大きく影響されることを示唆している。脳内毛細血管内皮細胞のCNP受容体は γ -GTPと同じように星状神経膠細胞などの毛細血管周囲細胞の制御を受けている可能性が示唆された。

(4) まとめ：

ラット脳内毛細血管内皮細胞の分離培養系を確立し、第Ⅷ因子関連抗原陽性でPGI₂産生能を維持して10代

継代培養し得た。ANPの脳内毛細血管内皮細胞に対する作用は比較的安定しており、内皮細胞に直接作用することによって脳の容積調節に関わっていると考えられた。一方CNPは継代とともにその作用が失われることから、脳内毛細血管内皮細胞におけるCNP受容体の発現は星状神経膠細胞などのin vivoの環境による影響を受けている可能性が示唆された。脳内毛細血管内皮細胞培養系は、ナトリウム利尿ペプチドをはじめとする血管作動性物質の解析に適用することにより、今後脳浮腫や水頭症などの病態解明、治療開発の研究への応用が可能であると考えた。

<謝 辞>

稿を終えるにあたり、ご指導とご校閲を賜りました神戸大学医学部脳神経外科学教室玉木紀彦教授に心から感謝申し上げます。また神戸大学脳神経外科学教室での本研究において直接ご指導頂きました長嶋達也先生に深く感謝いたします。

本研究は財団法人日本二分脊椎、水頭症研究振興財団の平成7年度研究助成金により行われた。

<参考文献>

1. Tulassay, T., Khoor, A., Bald, M., Szabo, A., Rascher, W.: Cerebrospinal fluid concentrations of atrial natriuretic peptide in children. *Acta. Pediatr. Hung.* 30: 201-207, 1990
2. Yeung, V.T.F., Lai, C.K., Cockram, C.S., Teoh, R.: Atrial natriuretic peptide in the central nervous system. *Neuroendocrinology* 53(suppl 1): 18-24, 1991
3. Quirion, R., Dalpe, M., Dam, T.V.: Characterization and distribution of receptors for the atrial natriuretic peptides in mammalian brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83: 174-178, 1986
4. Arimura, J.J., Minamino, N., Kangawa, K., Matsuo, H.: Isolation and identification of C-type natriuretic peptide in chicken brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 174: 142-148, 1991
5. Komatsu, Y., Nakao, K., Suga, S., Ogawa, Y., Mukoyama, M., Arai, H., Shirakami, G., Hosoda, K., Nakagawa, O., Hama, N.: C-type natriuretic peptide in rats and

- humans, *Endocrinology* 129: 1104-1106, 1991
6. Komatsu, Y., Nakao, K., Suga, S., Ogawa, Y., Mukoyama, M., Arai, H., Shirakami, G., Hosoda, K., Kishimoto, I., Nakagawa, O., Hama, N., Imura, H.: C-type natriuretic peptide-tissue distribution and molecular form in rats (Abstract). *Circulation* 84: 1730, 1991
7. Hamet, P., Tremblay, J., Pang, S. C., Skuherska, R., Schiffrin E. L., Garcia, R., Cantin, M. j., Genest, J., Palmour, R., Ervin, F. R., Martin, S., Goldwater, R.: Cyclic GMP as mediator and biological marker of atrial natriuretic factor. *J Hypertension* 4 (suppl 2): S49-S56, 1986
8. Minakawa, T.: Long-term culture of microvascular endothelial cells derived from Mongolian gerbil brain. *Stroke* 20: 947-951, 1989
9. Sternberger, L. A.: The unlabeled antibody Peroxidase-antiperoxid (PAP) method, in Sternberger LA (ed) *Immunocytochemistry*, ed. 2. John Wiley & Sons, Inc., pp104-169, 1979
10. Jaffe, E.A., Hoyer, L.W., Nachman, R.L.: Synthesis of antihemophilic factor antigen by cultured human endothelial cells. *J. Clin. Invest.* 52: 2757-2764, 1973
11. Zetter, B.R.: The endothelial cells of large and small blood vessels. *Diabetes* 30(suppl 2): 24-28, 1981
12. Orłowski, M., Sessa, G., Green, J.P.: γ -Glutamyl transpeptidase in brain capillaries: possible site of a bloodbrain barrier for amino acids. *Science*, 184: 66-68, 1974
13. Mischeck, U., Meyer, J., Galla, H. J.: Characterization of γ -glutamyl transpeptidase activity of cultured endothelial cells from porcine brain capillaries. *Cell and Tissue Res.* 256: 224-226, 1989
14. Goldstein, G.W., Wolinsky, J. S., Cseitey, J., Diamond, J.: Isolation of metabolically active capillaries from rat brain. *J. Neurochem.* 25: 715-717, 1975
15. Bowman, P. D., Betz, A.L., Ar, D.: Primary culture of capillary endothelium from rat brain. *In Vitro* 17: 353-362, 1981
16. Meyer, J., Mischeck, U., Veyhl, M., Henzel, K., Galla, H. J.: Blood-brain barrier characteristic enzymatic properties in cultured brain capillary endothelial cells. *Brain Res* 514: 305-309, 1990
17. Mrsulja, B.B., Mrsulja, B.J., Fujimoto, T., Klatzo, I., Spatz, M.: Isolation of brain capillaries: a simplified technique. *Brain Res.* 110: 361-365, 1976
18. Haudenschild, C.C., Zahniser, D., Folkman, J., Klagsbrun, M.: Human vascular endothelial cells in culture; Lack of response to serum growth factors: *Exptl. Cell. Res.* 98: 175-183, 1976
19. Folkman, J., Haudenschild, C.C., Zetter, B.R.: Long-term culture of capillary endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 5217-5221, 1979
20. Goetz, I. E., Warren, J., Estrada, C., Roberts, E., Krause, D. N.: Long-term serial cultivation of arterial and capillary endothelium from adult bovine brain. *In Vitro Cellular & Developmental Biology* 21: 172-180, 1985
21. Vinters, H. V., Reave, S., Costello, P., Girvin, J. P., Moore, S. A.: Isolation and culture of cells derived from human cerebral microvessels. *Cell Tissue Res.* 249: 657-667, 1987
22. Steardo, L., Nathanson, J. A.: Brain barrier tissues: End organs for atriopeptins, *Science* 235: 470-473, 1987
23. Doczi, Y., Joo, F., Szerdahelyi, P., Bodosi, M.: Regulation of brain water and electrolyte contents: The possible involvement of central atrial natriuretic factor, *Neurosurgery* 21: 454-458, 1987
24. Ibaragi, M., Niwa, M., Ozaki, M.: Atrial natriuretic peptide modulates amiloride-sensitive Na-transport across the blood brain barrier. *J. Neurochem.* 53: 1802-1806, 1989
25. Mori, K., Tsutsumi, K., Kurihara, M., Kawaguchi, T., Niwa, M.: Alteration of atrial natriuretic peptide receptors in the choroid plexus of rats with induced or congenital hydrocephalus. *Child's Nerv.*

- Syst. 6:190-193, 1990
26. Kobayashi, H., Ueno, S., Tsusui, M., Okazaki, M., Uezono, Y., Yanagihara, N., Yuhi, T., Izumi, F.: C-type natriuretic peptide increases cyclic GMP in rat cerebral microvessels in primary culture Brain Res. 648:324-326, 1994
 27. Vigne, P., Frelin, C.: C-type natriuretic peptide is a potent activator of guanylate cyclase in endothelial cells from brain microvessels. Biochem. Biophys. Res. Commun. 183:640-644 1992
 28. Diringer, M. N., Kirsch, J. R., Ladenson, P. W., Borel, C., Haley, D. F.: Cerebrospinal fluid atrial natriuretic factor in intracranial disease. Stroke 21:1550-1554, 1990
 29. 宮本薫, 松尾壽之: ナトリウム利尿ペプチドの情報伝達機構代謝: 28, 397-402, 1991
 30. Koller, K. J., Lowe, D. G., Lewis, M., Minamino, N., Kangawa, K., Matsuo, H., Goeddel, D. V.: Selective activation of the B natriuretic peptide receptor by C-type natriuretic peptide (CNP). Science 252:120-123, 1991
 31. Suga, S., Nakao, K., Itoh, H., Komatsu, Y., Ogawa, Y., Hama, N., Imura, H.: Endothelial production of C-type natriuretic peptide and its marked augmentation by transforming growth factor- β : Possible existence of "Vascular natriuretic peptide system" J. Clin. Invest. 90:1145-1149, 1992
 32. Stingo, A. J., Clavell, A. L., Heublein, D. M., Wei, C. M., Pittelkow, M. R., Burnett, J. C.: Presence of C-type natriuretic peptide in cultured human endothelial cells and plasma. Am. J. Physiol. 263:H1318-H1321, 1992
 33. Ueda, S., Minamino, N., Aburaya, M., Kangawa, K., Matsukura, S., Matsuo, H.: Distribution and characterization of immunoreactive porcine C-type natriuretic peptide. Biochem. Biophys. Res. Commun. 175:759-767, 1991

The effect of atrial natriuretic peptide and C-type natriuretic peptide on c-GMP production in rat brain capillary endothelial cells cultured in vitro

Hidemi Nakamura

Department of Neurosurgery, Kobe University School of Medicine

ABSTRACT

The brain capillary endothelial cells are responsible for the permeability properties of the blood-brain barrier. Natriuretic peptides are considered to play an important role in the volume regulation of the brain by affecting the function of capillary endothelial cells. The rat brain capillary endothelial cells were isolated and cultured and the effects of natriuretic peptides on them were studied.

The brain capillary endothelial cells were isolated from Sprague-Dawley rat brain cortex by the method of two step enzymatic treatment and cultured in the collagen-coated dishes. The effects of atrial natriuretic peptide (ANP) and C-type natriuretic peptide (CNP) on cultured brain capillary endothelial cells were studied by the cyclic guanosine 3', 5'-monophosphate (c-GMP) production method.

The cultured brain capillary endothelial cells showed cobble stone appearance and retained an endothelial specific marker, Factor VIII-related antigen. The cells constantly produced PGI₂ after 10 passages. The cells rapidly lost γ -GTP activity by passages. In the cultured endothelial cells, ANP stimulated c-GMP production at the dose higher than 10^{-7} M. On the other hand, CNP at the dose between 10^{-10} M and 10^{-5} M showed no response.

Brain capillary endothelial cells of rats were isolated and cultured with maintaining their physiological activities. Response to ANP which is considered to play an important role in the volume regulation of the brain was preserved after passages. Response to CNP of which role in the volume regulation of the brain is controversial was negative after passages.