



Calcitonin gene-related peptide-like immunoreactivity in the central nervous system and peripheral organs of rats

置村, 泰彦

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1987-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲0694

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1000694>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏名・（本籍）	おき 置 村 康 彦 （兵庫県）
学位の種類	医学博士
学位記番号	医博い第555号
学位授与の要件	学位規則第5条第1項該当
学位授与の日付	昭和62年3月31日
学位論文題目	Calcitonin gene-related peptide-like immunoreactivity in the central nervous system and peripheral organs of rats （ラット中枢神経系および末梢臓器中カルシトニン遺伝子関連ペプチド様免疫活性）
審査委員	主査 教授 藤 田 拓 男 教授 山 口 延 男 教授 中 井 久 夫

論文内容の要旨

I はじめに

Calcitonin gene-related peptide (CGRP) の遺伝情報は calcitonin (CT) のそれと同一遺伝子上に存在し、組織特異的な RNA スプライシングにより、甲状腺では主に CT mRNA が、神経系では CGRP mRNA が発現し、それぞれ CT, CGRP の産生に到るとされているが、実際に各種臓器の CGRP 含量についての報告は少ない。そこで、ラット (r) CGRP の RIA 系を確立し、ラット各種臓器の rCGRP 様免疫活性 (rCGRP-LI) を測定するとともにゲル濾過を併用し、rCGRP-LI の分子サイズを種々の臓器で比較した。

II 方 法

rCGRP-RIA

合成 rCGRP を牛サイログロブリンと結合させ、家兎に免疫し、抗 rCGRP 血清を得た。この抗血清はカルシトニンをはじめとする各種ペプチドを認識しないが、rCGRP-C 端フラグメントと 50% 交叉したことから、主に C 端を認識する抗血清と考えられた。〔¹²⁵I〕-rCGRP はクロラミン T 法で作製した。標準物質には合成 rCGRP を用いた。この rCGRP-RIA 系の最小検出量は 40pg / tube であった。

抽 出

ウレタン麻酔下で、雄 Spragne-Dawly ラットの左室にカニューレを刺入し、100 ml の 0.01M リ

ン酸緩衝化生理的食塩水で灌流した後、脳、脊髄、下垂体、甲状腺、胃、十二指腸、脾、肝、腎、副腎および精巣を摘出した。脳はブラウNSTEINらの方法に基づき、大脳、小脳、脳幹、視床下部に区分切断した。これらの組織を沸騰酢酸抽出し、最終的には30000 G 上清を凍結乾燥し、これを rCGRP-RIA で測定した。

回収率の検討

既知量の合成 rCGRP を摘出した胃あるいは脊髄に加え、直ちに抽出し、rCGRP-LI を測定した。回収率は総 rCGRP-LI より内因性 CGRP-LI (合成 rCGRP 無添加胃あるいは脊髄抽出物中 rCGRP-LI) をひき、これを外因性 rCGRP 量で除することによって求めた。

rCGRP-LI の分子サイズの検討

0.7 × 100 cm のセファデックス G-50 カラムを用いて各種抽出物中 rCGRP-LI の分子サイズを検討した。カラムの平衡化、溶出には 1 N 酢酸を用いた。

抽出、ゲル濾過中の rCGRP-LI の分解の検討

脊髄・胃を摘出し、1) 直ちに、2) 室温中 1 時間放置した後、3) 室温で 2 時間放置した後抽出し、各々の標品のゲル濾過パターンを比較した。合成 rCGRP を摘出した脊髄に加えた後、この混合物より抽出し、ゲル濾過パターンを同重量の脊髄からの抽出物のゲル濾過パターンと比較した。

Ⅲ 結 果

rCGRP-LI は脊髄および甲状腺に高濃度存在した。中枢神経系では、脳幹、視床下部に検出したが、大脳、小脳には検出し得なかった。末梢臓器では、胃、十二指腸、脾、腎に存在した。回収率は平均 76.1% であった。脊髄、脳幹、甲状腺、胃、十二指腸あるいは脾抽出物中 rCGRP-LI のゲル濾過パターンはいずれも 3 峰性であり、第 1 のピークは、合成 rCGRP の溶出位置に一致した。しかし、ピークの高さの比は中枢神経と末梢臓器で異なり、中枢神経抽出物中 rCGRP-LI のゲル濾過パターンでは第 1 のピークが最大であるのに対し、末梢臓器抽出物では第 2 のピークが最大であった。抽出操作に到るまでの時間によって、このパターンは変化せず、また、抽出前に合成 rCGRP 添加した脊髄のゲル濾過パターンは、rCGRP 無添加標品のゲル濾過パターンと比べ、第 1 のピークが著増していたが、第 2、第 3 のピークの高さに変化はなかった。

Ⅳ 考 察

rCGRP-LI は中枢神経系では脊髄に大量に存在した。この濃度は、ヒト脊髄後根の CGRP-LI 濃度によく一致した。次いで脳幹、視床下部の順で rCGRP-LI が検出されたが、これもヒトにおける分布と一致した。免疫組織化学的検索では少数の小脳プルキンエ細胞、大脳の一部の細胞も CGRP 陽性であるが、今回の結果では小脳、大脳には検出し得なかった。

今回、甲状腺にも脊髄に匹敵するほどの大量の CGRP-LI が存在することが明らかになった。これはヒト甲状腺では少量の CGRP しか検出されないという報告と異なる。しかし、甲状腺にも CGRP mRNA が CT mRNA に比べて少ないものの検出され、免疫組織化学的にも甲状腺 C 細胞は

CGRP 陽性であることから、CGRP は甲状腺にまちがいに存在し、ヒトとラットの CGRP 濃度の差は、ラット甲状腺ではヒトに比べ C 細胞がはるかに多いということで説明しうると考えられる。

さらに、今回、胃にも明らかに rCGRP-LI を認めた。静脈内に投与した CGRP は胃酸分泌を抑制することが報告されており、胃の CGRP が胃酸分泌に何らかの生理的役割を果している可能性がある。

セファデックス G-50 による rCGRP-LI のゲルパターンは、臓器にかかわらず 3 峰性であった。今回確立した RIA 系は rCGRP の C 端を認識するので、合成 rCGRP の溶出位置より遅れて出現する第 2、第 3 のピークは rCGRP の C 端フラグメントであると考えられた。第 1、第 2 のピークの高さの比が神経系と末梢臓器で異なっていたことは興味深い。抽出に到るまで放置した時間によって、このパターンは変化しないこと、抽出操作前に加えた外因性 CGRP は抽出中、ゲル通過中に明らかな分解を受けないことから、末梢臓器で第 2 のピークが高いという結果は人工産物でなく、組織間で rCGRP のプロセッシングに相異がある可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

カルチトニン はカルシウム調節ホルモンの一つで高カルシウム血症の刺激によって分泌され、破骨細胞の機能を抑制して骨吸収を低下させるのがその主な役割りであるがカルチトン遺伝子関連ペプチド (CGRP) はカルチトニン 合成遺伝子解析の経過において発見されたペプチドでカルチトニンと略同じ大きさの 37 個のアミノ酸をもつペプチドであり、アミノ酸配列の相同性は少ないが、三次構造が比較的似ていることが知られている。同じ遺伝子から出発しながらカルチトニンと組織分布や作用においてかなりことなり、生体の必要に応じて合成経路の選択が行われている可能性が強い。カルチトニンは人及び他の哺乳類では主として甲状腺の C 細胞で合成分泌されるが他の組織にも存在し、一方 CGRP は神経系に多く存在するが、CGRP の生体内分布及びその生理作用については尚不明の点が多い。

そこで本研究者はラット CGRP の抗体を作製してラジオイムノアッセイにより生体内分布を観察するとともにゲル通過分画によって各組織における CGRP 活性の均一性について検討した。1mg の合成ラット CGRP を 2mg の牛サイログロブリンとともに 0.8ml の 0.1M 酢酸アンモニア緩衝液 pH 7.0 に溶解し、100 μ l の 0.02 モルグルタルアルデハイドを加え 6 時間放置した後 48 時間透析した。フロイントアジュバントとともにニュージーランド白色兎に 2 ケ月間隔で注射し抗体を作製した。クロラミン T 法で 190 μ Ci/ μ g の比活性に 125 I で標識したラット CGRP を用い、4000 倍稀釋の抗血清でラジオイムノアッセイを行った。CGRP 様免疫活性は脊髓と甲状腺で高く、夫々 202 ± 22 pg/mg 及び 229 ± 62 pg/ml であり、その他にも脳幹 75・視床下部 11・胃 17・十二指腸 4・脾 2 及び腎 4 pg/ml でも測定可能であった。セファデックス G50 によるゲル通過では CGRP 活性に三つのピークがみとめられ、一つは標準の CGRP と同一のものであったが他の二つは C 末端を含む断片であろうと推定された。神経組織においては標準の CGRP が多く含まれていたが、胃・脾臓・甲

状腺等の他の組織では逆に断片の比率の方が高かった。

この様な差のおてる原因として組織における酵素的分解の可能性は低く、これは組織ホモジネートとともに室温で2時間放置してから抽出し分画してもゲル濾過のプロフィールに変化が見られなかったことによって推定される。即ちCGRPの断片の存在様式が、神経組織と消化管その他の間で、ことになっていることは、むしろプロセッシング上の問題であると考えられる。CGRP陽性のニューロンが脊髄の後角に密なネットワークをつくって存在し、又脳幹部や視床下部にも多数存在するという組織化学的所見からはCGRPの神経系における特殊な作用が考えられるが生合成過程にこれが反映されている可能性が考えられる。甲状腺においては主としてカルチトニンが生合成され、CGRPの合成は少ないのでカルチトニン対CGRPの比は95：1であるとされ、ホルモン活性のあるCGRPの比率は、更に近い可能性がある。

以上本研究者は新しいホルモンであるCGRPの組織分布と分画を高感度のラジオイムノアッセイを用いて研究し、従来殆ど行われなかったCGRPの各組織における断片組成の差と作用との関係について新しい知見を得たものであり、価値ある集積と考えられる。従って本研究者は医学博士の学位を得る資格があると考えられる。