

ウシ網膜血管のエンドセリン受容体 —ラジオリミノグラフィー法を応用した定量的受容体 オートラジオグラフィー法による解析—

佐藤 隆哉, 雨宮 次生

長崎大学医学部眼科学教室

要 約

ウシ網膜細動静脈, 毛細血管, および非血管組織のエンドセリン受容体を ^{125}I -エンドセリン-1 (^{125}I -ET-1), ET-1, ET-3, BQ 123 (ET_A受容体拮抗薬), sarafotoxin S 6_C (ET_B受容体作働薬)を用いた定量的受容体オートラジオグラフィー法で検討した。定量は, コンピュータラジオリミノグラフィシステムとイメージングプレートを用いた方法で行った。この方法で, ウシ網膜細動静脈, 毛細血管, 非血管組織ともに ET-1 の高親和性の特異的結合部位の存在が明らかになった。網膜細動静脈と毛細血管との間には結合親和性である解離定数 (Kd) に差を認

めなかった。また, 網膜細動静脈と毛細血管は BQ 123 で置換され, 一方, 網膜非血管組織は sarafotoxin S 6_C で置換された。網膜細動静脈と毛細血管には ET_A受容体が, 網膜非血管組織には ET_B受容体が存在すると推測された。(日眼会誌 99: 546—551, 1995)

キーワード: ウシ網膜血管, エンドセリン受容体, 定量的受容体オートラジオグラフィー法, ラジオリミノグラフィー

Endothelin Receptors in Bovine Retinal Vessels —Quantitative Receptor Autographic Analysis with Radioluminography—

Takaya Sato and Tsugio Amemiya

Department of Ophthalmology, Nagasaki University School of Medicine

Abstract

Endothelin (ET) receptors in bovine retinal macrovessels, microvessels, and nonvascular tissues were characterized using a quantitative receptor autoradiographic method with ^{125}I -endothelin-1 (^{125}I -ET-1), ET-1, ET-3, BQ123 (a selective antagonist for the ET_A receptor) and sarafotoxin S6_C (an agonist for the ET_B receptor). A quantitation was made with a computerized radioluminographic system and imaging plates. The method we used revealed that there were specific binding sites for ^{125}I -ET-1 in the bovine retinal macrovessels, microvessels, and nonvascular tissues. There was no difference in the dissociation constant (Kd) showing binding charac-

teristics between the retinal macrovessels and the microvessels. The bindings to the retinal macrovessels and the microvessels were effectively displaced by BQ123, whereas the binding to the retinal nonvascular tissues was displaced by sarafotoxin S6_C. Thus, we obtained evidence that macrovessels and microvessels of the bovine retina have ET_A receptor, and that the nonvascular tissues have ET_B receptors. (J Jpn Ophthalmol Soc 99: 546—551, 1995)

Key words: Bovine retinal vessels, Endothelin receptor, Quantitative receptor autoradiography, Radioluminography

別刷請求先: 852 長崎県長崎市坂本 1-7-1 長崎大学医学部眼科学教室 雨宮 次生
(平成 6 年 10 月 24 日受付, 平成 6 年 12 月 27 日改訂受理)

Reprint requests to: Tsugio Amemiya, M.D. Department of Ophthalmology, Nagasaki University School of Medicine, 1-7-1 Sakamoto, Nagasaki-shi, Nagasaki-ken 852, Japan

(Received October 24, 1994 and accepted in revised form December 27, 1994)

I 緒 言

エンドセリン (ET) はブタの血管内皮細胞培養上清中から同定された 21 アミノ酸残基から成るペプチドで、血管平滑筋細胞内の Ca^{2+} を増加させて強力な血管収縮作用をはじめ、多彩な作用を示すことが知られている¹⁾。眼内にも ET が存在することが明らかにされ^{2)~5)}、また、その受容体を介して様々な作用を示すことがわかってきた⁶⁾⁷⁾。しかし、眼領域における受容体研究を行うにあたって、従来の膜分画受容体結合法では多量の試料を必要とするため、少量の試料しか得にくい眼組織では受容体の存在を明らかにすることは困難であった。

そこで本研究では、コンピュータラジオミノグラフィイメージングプレートシステム⁸⁾を用いたペレット法定量的受容体オートラジオグラフィー法^{9)~12)}を応用することで、ウシ網膜の血管成分、非血管成分における ET 受容体を測定し、その特性を検討した。

II 実験方法

網膜血管の採取は Meezan ら¹³⁾、Dallaire ら¹⁴⁾の毛細血管採取法を参考にし、さらに網膜細動静脈も採取できるように改変した¹⁵⁾。屠殺後すぐに摘出し、冷凍運搬してきたウシ眼球 40 眼を解凍し網膜を取り出した後、氷冷したショ糖緩衝液に浸した。これを剪刀で細切後、polytron homogenizer (PT 10, Kinematica) で 6,500 回転、2 分間、次に teflon-glass homogenizer で 10 往復ホモジナイズを行い、まず 108 μm ナイロンメッシュで濾過した。濾過物質をさらに 55 μm ナイロンメッシュで濾過し、メッシュ上に残った物質を再び polytron homogenizer で 6,500 回転、1 分間ホモジナイズし、55 μm ナイロンメッシュで濾過を行った。この操作をもう一度繰り返して、最後に 55 μm ナイロンメッシュ上に残った毛細血管を得た。回収率を上げるために、はじめの 108 μm ナイロン

メッシュ上に残った物質を集め、polytron homogenizer で毛細血管部を切り取り、それを 108 μm ナイロンメッシュで濾過し、55 μm ナイロンメッシュで集めるという操作を繰り返した。また、最初に 55 μm ナイロンメッシュで濾過された物質を非血管組織として、最後に 108 μm ナイロンメッシュ上に残った物質を細動静脈として得た (図 1)。

得られた網膜血管、非血管組織を 16,500 g で 5 分間遠心し、沈渣に embedding matrix を 0.1 ml 加え、よく攪拌した後、口径 2 mm のチューブに移し、1,300 g で 5 分間遠心した。これを冷凍しチューブから抜き出し、沈渣部を用いてクライオスタットで厚さ 10 μm の連続凍結切片を作成し、ゼラチン塗布スライドガラスに貼付した。これを一晩、4°C で真空乾燥したものを受容体結合実験に用いた。

受容体結合は pH 7.4 の浸漬用緩衝液で前浸漬を 10 分間行った後、¹²⁵I-ET-1 (New England Nuclear, USA) を標識リガンドとして含む浸漬用緩衝液 (100 mM NaCl, 10 mM EDTA-Na, 1 mg/ml bacitracin, 4 μg /ml leupeptin, 2 μg /ml chymostatin, 10 μM phosphoramidon, 0.2% BSA を含有した 50 mM Tris-HCl) 中で置換物質として 1.0~1.0 μM の濃度の ET-1, ET-3, sarafotoxin S_{6c} (ペプチド研究所, 東京), BQ-123 (萬有製薬, 東京) を用いて、4°C, pH 7.4, 48 時間浸漬を行った¹⁶⁾¹⁷⁾。浸漬後、氷冷した緩衝液中で洗浄し、冷風下で一晩乾燥した後、感光用カセット内でイメージングプレート (Type BAS-III, 富士写真フィルム, 東京) に密着感光した。この際、既知のリガンド濃度を含むスタンダードの切片 (¹²⁵I) micro-scales, Amersham, UK) を浸漬した切片と同じカセット内で同時に感光させた。これより得られた標準曲線から検体組織の感光度を dpm に換算した。フジックスバイオイメージングアナライザー BAS 2000 (富士写真フィルム, 東京) を用いて画像解析を

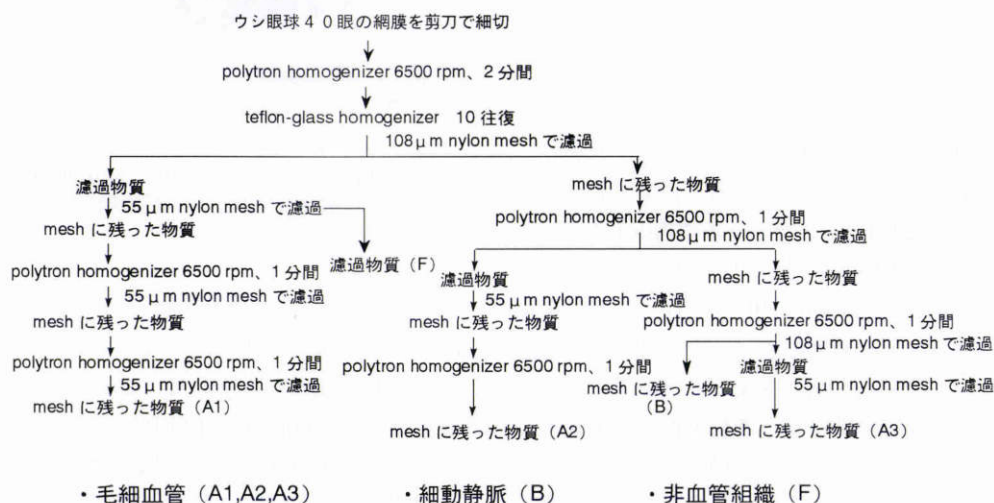


図 1 網膜血管採取法。

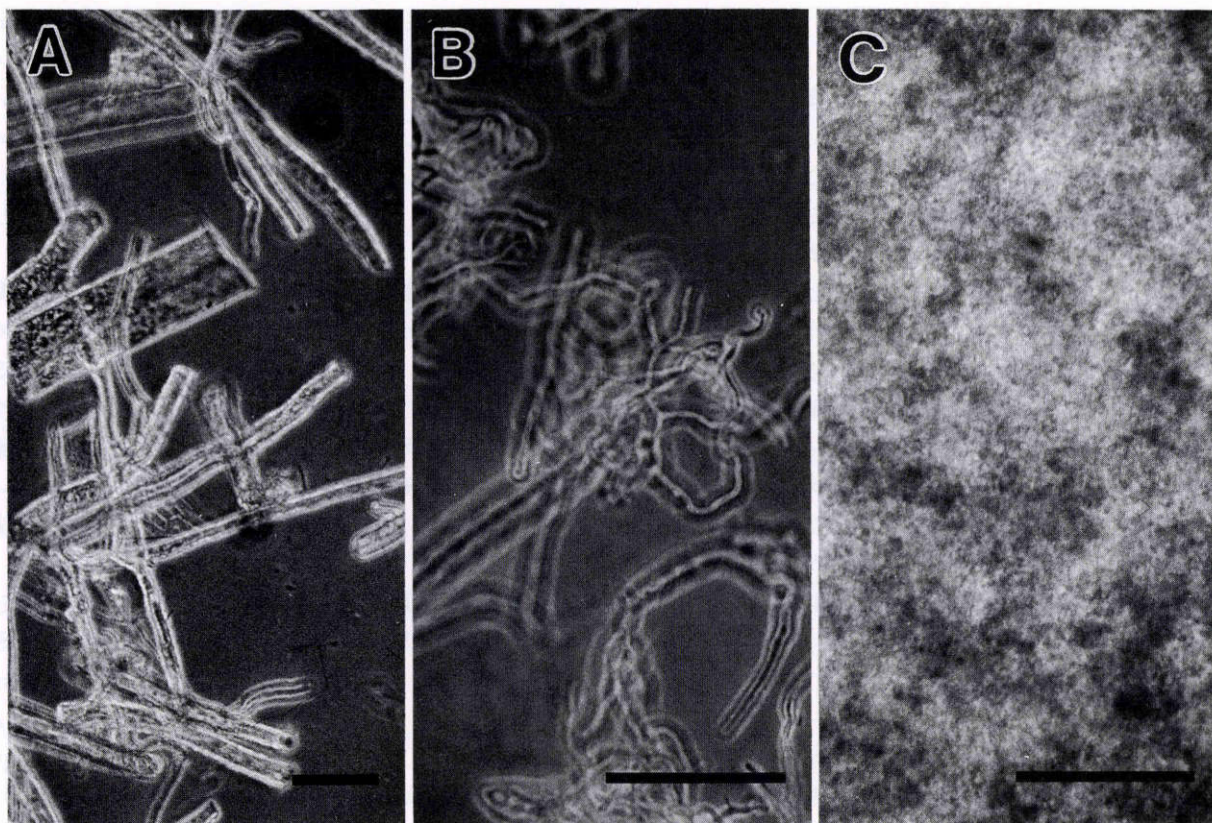


図2 網膜血管と非血管組織の位相差顕微鏡写真.

A: 網膜細動静脈, B: 網膜毛細血管, C: 網膜非血管組織. バーは 50 μm

行った.

各々の試料は Bradford¹⁸⁾の方法で蛋白質量を測定し, さらにスタンダードから得られた標準曲線から感光度を dpm に換算した.

画像解析で得られた値は, さらに LIGAND プログラム¹⁹⁾で受容体解析を行った.

III 結 果

採取された網膜非血管組織, 血管組織を図2に示した. 網膜細動静脈は直径 10~50 μm で, 網膜毛細血管は直径 2~8 μm の血管であった. 我々の血管採取法では, ウシ眼球 40 眼から約 2 mg の網膜毛細血管を採取することができた.

図3に¹²⁵I-ET-1 結合部位のオートラジオグラムの一部として, ¹²⁵I-ET-1 のみを含んだ緩衝液に浸漬した全結合(I), 同濃度の¹²⁵I-ET-1 と 10⁻⁶M の非標識 ET-1 を含んだ緩衝液に浸漬した非特異的結合(II), 既知のリガンド濃度を含むスタンダードの切片(III)を示す. 4 種類の置換物質を用いたすべての濃度のオートラジオグラムを BAS 2000 で感光度を測定した. さらに, スタンダードにより dpm に換算した後, 全結合から非特異的結合の差として得られた特異的結合の値を用いて描いた置換曲線では網膜細動静脈, 網膜毛細血管の¹²⁵I-ET-1 結合は非標識 ET-1, ET-3, BQ-123 で濃度依存的に抑制されたが, sar-

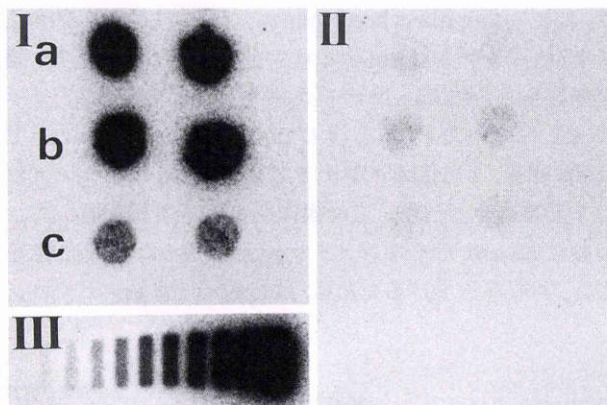


図3 網膜組織のペレットから得られたラジオミノグラム.

I: 全結合, II: 非特異的結合 (10⁻⁶M 非標識 ET-1 存在下で得られた), III: standard scale

A: 網膜毛細血管, B: 網膜細動静脈, C: 網膜非血管組織

afotoxin S 6_cでは置換されなかった. 一方, 網膜非血管組織は非標識 ET-1, ET-3, sarafotoxin S 6_cとともに濃度依存性に抑制され, BQ 123 で置換されなかった (図4). Scatchard 解析での解離定数(Kd)は網膜細動静脈が 0.303 $\pm$ 0.038nM, 網膜毛細血管は 0.337 $\pm$ 0.086nM, 網膜非血管組織は 0.215 $\pm$ 0.039 nM と, 三者に有意差を

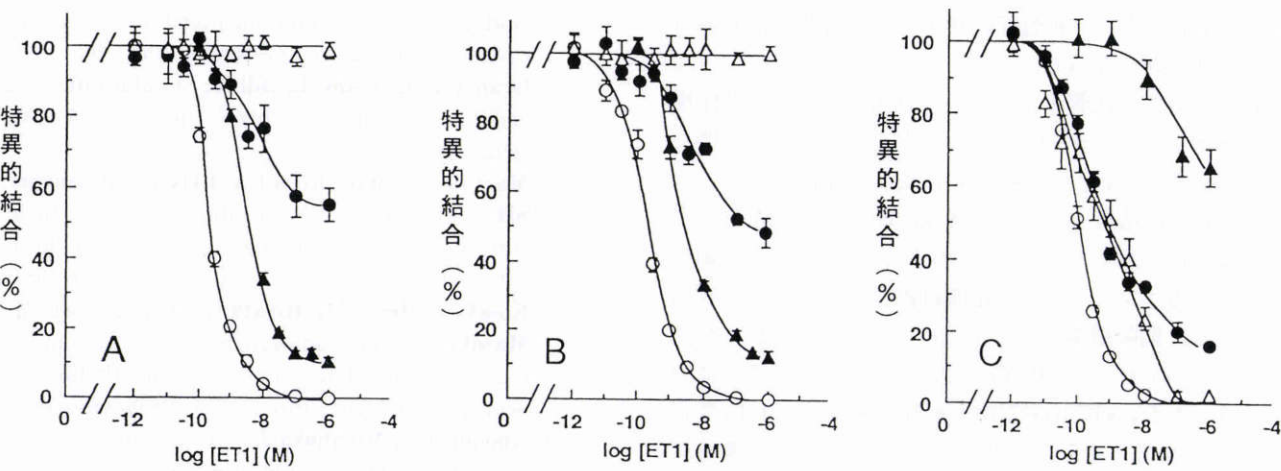


図 4 網膜組織における特異的¹²⁵I-エンドセリン-1 結合の置換曲線。
A：網膜細動静脈，B：網膜毛細血管，C：網膜非血管組織
白丸：エンドセリン-1 (ET-1)，黒丸：ET-3，白三角：sarafotoxin S 6_c，黒三角：BQ-123
網膜細動静脈と網膜毛細血管は BQ-123 で置換され，網膜非血管組織は sarafotoxin S 6_c で置換されている。

表 1 置換実験から得られた¹²⁵I-エンドセリン-1 の網膜組織への結合親和性

Peptide	ET-1 K _i nM	ET-3 K _i nM	Sarafotoxin S 6 c K _i nM	BQ 123 K _i nM
網膜細動静脈	0.303±0.0380	504±41.6 ^a	ND	3.41±0.375
網膜毛細血管	0.337±0.0855	454±54.2 ^b	ND	2.75±0.175
網膜非血管組織	0.215±0.0387	1.36±0.0736 ^c	5.43±0.895	ND

網膜血管と網膜非血管組織は明らかに結合親和性が異なるが，網膜細動静脈と網膜毛細血管との間には有意差を認めなかった。

p<0.01 (a>c, b>c), 平均値±標準誤差, n=4 ND: not detected

認めなかった。各々の抑制濃度 (K_i) は，ET-3 では網膜細動静脈 504±41.6 nM，網膜毛細血管 454±54.2 nM，網膜非血管組織 1.36±0.07 nM，sarafotoxin S 6_c では網膜非血管組織 5.43±0.90 nM，BQ-123 では網膜細動静脈 3.41±0.38 nM，網膜毛細血管 2.75±0.18 nM と，いずれも網膜細動静脈と網膜毛細血管には有意差を認めなかった(表 1)。

IV 考 按

エンドセリンは眼組織にも様々な作用を及ぼすことが知られてきており^{2)~5)}，その受容体の存在も確認されている⁶⁾⁷⁾。しかし，他のペプチド受容体研究と同様に，エンドセリン受容体解析を行うにあたって，従来の膜分画受容体結合法では，特に網膜血管のごく少量の試料しか得られない場合には非常に困難である。そこで，以前から血液中の単核細胞，胸腺細胞，脾臓細胞，リンパ球，血小板などの受容体研究に応用されている方法^{9)~12)}に準じて網膜血管を embedding matrix に包埋し，その切片を試料として用いた。

今回，我々が用いたコンピュータラジオグラフィイメージングプレートシステム⁸⁾は，フィルムの代わりに蛍光体(BaFBr: Eu²⁺)を塗布したイメージングプ

レートを用いるもので，このイメージングプレートに取り込まれた情報をモニター画面上に画像化し，コンピュータ解析することができる。また，得られる画像も従来のフィルムを用いたオートラジオグラフィーに匹敵するものであり，感光時間はフィルムの約 5 分の 1 で済む。前回我々は，これらの方法を組み合わせて網膜血管のアンジオテンシン II 受容体の存在と特性を明らかにすることができた¹¹⁾。

エンドセリン受容体には ET_A 受容体，ET_B 受容体の 2 種類のサブタイプが確認されている。ET_A 受容体は ET-1 のみに強い親和性があり²⁰⁾，これに対して，ET_B 受容体は ET-1，ET-2，ET-3 に対してともに同等の親和性を有している²¹⁾。

今回の実験では，網膜には網膜血管，網膜非血管組織のいずれにもエンドセリン受容体の存在が認められた。網膜細動静脈，網膜毛細血管は，いずれも ET-1 および ET_A 受容体のアンタゴニストである BQ-123 で強く置換され，ET-3 では ET-1 に比し高濃度でしか置換されず，ET_B 受容体のアゴニストである sarafotoxin S 6_c ではほとんど置換されなかった。ところが，網膜非血管組織は ET-1，ET-3，sarafotoxin S 6_c で置換されたが，BQ 123 では置換されなかった。このことから，網膜血管は主に

ET_A受容体を有し、非血管組織はET_B受容体が主であることが明らかになった。

ET_A受容体は血管平滑筋に多く分布し、血管収縮作用を引き起こすことが知られている²⁰⁾。また、平滑筋を持たない毛細血管には、壁細胞にET_A受容体が確認されており²²⁾、我々の結果も網膜細動静脈、網膜毛細血管ともにET_A受容体を認め、これらを支持するものであった。網膜においてもエンドセリンは網膜細動脈、毛細血管に収縮を起こし、網膜循環に深くかかわっていると思われた。今回の方法では、その局在までは明らかにすることはできなかったが、網膜細動静脈と網膜毛細血管のET_A受容体の親和性に有意差が認められなかったことは興味深い。ET_A受容体が壁細胞に存在するとすれば、網膜毛細血管において、壁細胞はその支持機能以外に血管収縮作用の機能もあると考えられる。

一方、ET_B受容体は脳ではグリア細胞に存在し、細胞分化の調節を行っている可能性が示唆されている²³⁾。網膜でもJuanら²⁴⁾がET_B受容体の存在を確認しており、網膜におけるエンドセリンによる神経伝達および調節作用の役割のあることを示唆している。ただ、彼らは網膜血管と網膜非血管組織との分離は行っていない。今回得られた網膜非血管組織は、神経細胞とMüller細胞を含むグリア細胞と考えられる。網膜でも脳と同様にET_B受容体はグリア細胞に存在する可能性が大きいと考えられるが、神経細胞にも存在する可能性を否定できない。いずれにしろ、神経伝達に何らかの形でかかわっていると推測される。

今回、我々が行った血管凍結標本のコンピュータラジオリミノグラフィイメージングプレートシステムを用いた定量的オートラジオグラフィーでは、網膜血管のようにごく少量の試料でも、エンドセリン受容体解析を迅速にかつ簡単に行うことができた。

稿を終えるにあたり、エンドセリンET_A受容体拮抗薬BQ-123を頂いた萬有製薬(株)つくば研究所、矢野光夫博士、ならびに実験の御指導を頂いた長崎大学医学部薬理学第二教室、丹羽正美助教授、谷山紘太郎教授に深謝いたします。

文 献

- 1) Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, et al: A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 332: 411—415, 1988.
- 2) McCumber MW, Jampel HD, Snyder SH: Ocular effects of the endothelins. *Arch Ophthalmol* 109: 705—709, 1991.
- 3) Erickson-Lam K, Kormbacher C, Schuman J, Nathanson JA: Effect of endothelin on outflow facility and accommodation in the monkey eye *in vivo*. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 32: 492—495, 1991.
- 4) Abdel-Latif AA, Zhang Y, Yousufzai SYK: Endothelin-1 stimulates the release of arachidonic

acid and prostaglandins in rabbit iris sphincter smooth muscle. *Curr Eye Res* 10: 259—265, 1991.

- 5) Granstam E, Wang L, Bill A: Ocular effects of endothelin-1 in the cat. *Curr Eye Res* 11: 325—332, 1992.
- 6) MacCumber MW, Ross CA, Glaser BM, Snyder SH: Endothelin: Visualization of mRNAs by *in situ* hybridization provides evidence for local action. *Proc Natl Acad Sci* 86: 7285—7289, 1989.
- 7) Koseki C, Imai M, Hirata Y, Yanagisawa M, Masaki T: Autoradiographic distribution in rat tissues of binding sites for endothelin: A neuropeptide? *Am J Physiol* 256: R858—R866, 1989.
- 8) Amemiya Y, Miyahara J: Imaging plate illuminates many fields. *Nature* 336: 89—90, 1988.
- 9) Kurihara M, Katamine S, Saavedra JM: Atrial natriuretic peptide, ANP(99-126), receptors in rat thymocytes and spleen cells. *Biochem Biophys Res Commun* 145: 789—796, 1987.
- 10) Kurihara M, Castren E, Gutkind JS, Saito K, Saavedra JM: Characterization of β -adrenergic receptors in sections from human blood lymphocyte pellets by quantitative autoradiography. *Biol Psychiatry* 23: 746—749, 1988.
- 11) Gutkind JS, Kurihara M, Castren E, Saavedra JM: Autographic quantitation of vasoactive intestinal peptide binding sites in sections from human blood mononuclear cell pellets. *Neuropsychopharmacology* 1: 251—255, 1988.
- 12) Himeno A, Saavedra JM: Human platelet [¹²⁵I] R-DOI binding sites. Characterization by *in vitro* autoradiography. *Neuropsychopharmacology* 3: 25—32, 1990.
- 13) Meezan E, Brendel K, Carlson EC: Isolation of a purified preparation of metabolically active retinal blood vessels. *Nature* 251: 65—67, 1974.
- 14) Dallaire L, Tremblay L, Beliveau R: Purification and characterization of metabolically active capillaries of the blood-brain barrier. *Biochem J* 276: 745—752, 1991.
- 15) Sato T, Niwa M, Himeno A, Tsutsumi K, Amemiya T: Quantitative receptor autoradiographic analysis for angiotensin II receptors in bovine retinal microvessels: Quantitation with radioluminography. *Cell Mol Neurobiol* 13: 223—245, 1993.
- 16) Yamasaki H, Niwa M, Yamashita K, Kataoka Y, Shigematsu K, Hashiba K, et al: Specific ¹²⁵I-endothelin-1 binding sites in the atrioventricular node of the porcine heart. *Eur J Pharmacol* 168: 247—250, 1989.
- 17) Niwa M, Kawaguchi T, Himeno A, Fujimoto M, Kurihara M, Yamashita K, et al: Specific binding sites for ¹²⁵I-endothelin-1 in the porcine and human spinal cord. *Eur J Pharmacol -Mol Pharmacol Section* 225: 281—289, 1992.
- 18) Bradford M: A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein

- utilising the principle of protein dye binding. *Anal Biochem* 72: 248—253, 1976.
- 19) **McPherson GA**: Analysis of radioligand binding experiments: A collection of computer program for the IBM PC. *J Pharmacol Meth* 14: 213—228, 1985.
- 20) **Arai H, Hori S, Aramori I, Ohkubo H, Nakaniishi S**: Cloning and expression of a cDNA encoding an endothelin receptor. *Nature* 348: 730—732, 1990.
- 21) **Sakurai T, Yanagisawa M, Takuwa Y, Miyazaki H, Kimura S, Goto K, et al**: Cloning of a cDNA encoding a non-isopeptide-selective subtype of the endothelin receptor. *Nature* 348: 732—735, 1990.
- 22) **Takahashi K, Brooks RA, Kanse SM, Ghatge MA, Kohner EM, Bloom SR**: Production of endothelin 1 by cultured bovine retinal endothelial cells and presence of endothelin receptors on associated pericytes. *Diabetes* 38: 1200—1202, 1989.
- 23) **Hama H, Sakurai T, Kasuya Y, Fujiki M, Masaki T, Goto K**: Action of endothelin-1 on rat astrocytes through the ET_B receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 186: 355—362, 1992.
- 24) **Juan JA, Moya FJ, Lacoba MG, Fernandez-Cruz A, Fernandez-Durango A**: Identification and characterization of endothelin receptor subtype B in rat retina. *J Neurochem* 61: 1113—1119, 1993.
-