

ラット眼球および三叉神経節におけるブラジキニンB2型受容体の発現と局在の検討

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/9468

ラット眼球および三叉神経節における ブラジキニンB₂型受容体の 発現と局在の検討

金沢大学医学部医学科眼科学講座 (主任: 河崎一夫教授)

武 田 久

ブラジキニンB₂型受容体 (B₂型受容体) の発現と分布を, ラットの眼球および三叉神経節において mRNA レベルで検索した. ラットの組織から得られたポリ (A)⁺RNA を使った RNA プロットハイブリダイゼーションの結果, 6000 および 4000ヌクレオチドの長さの転写産物が検出され, 脳, 肺, 腎臓, 子宮における報告に一致した. ジゴキシゲニン標識の非放射性プローブを使った組織内ハイブリダイゼーションによる解析では, 網膜神経節細胞, 三叉神経節の神経細胞および強角膜移行部の細胞群に強いシグナルが認められた. これらの結果から, B₂型受容体は網膜および三叉神経における神経伝達と強角膜移行部における細胞の機能調節に関与することが示唆された.

Key words bradykinin, B₂ bradykinin receptor, *in situ* hybridization, rat eye, trigeminal ganglion

ブラジキニン (bradykinin, BK) は9個のアミノ酸からなる生理活性ペプチドで, 血漿中の高分子量キノーゲンあるいは組織内の低分子量キノーゲンが, キノーゲナーゼ (カリクレイン) により限定分解されて生成される. 炎症の急性期にある組織では, プロスタグランジンやサブスタンスPなどのオタコイドと呼ばれる局所ホルモンが生成され, その中の一つにBKも含まれる¹⁾²⁾. BKは発痛, 血管拡張, 血管透過性亢進, 平滑筋収縮, ナトリウム利尿排泄, 神経伝達物質放出, 膠原線維合成, 細胞増殖など多様な生体機能に関与している¹⁾³⁾.

これらのBKの作用は, 細胞膜の受容体を介して行われる¹⁾⁴⁾. BK受容体は, その薬理学的性質からB₁型とB₂型のサブタイプに分類される¹⁾⁵⁾. 分子構造上, B₁型, B₂型受容体はともに7つの推定膜貫通領域を持ち, グアノシン5'-三リン酸 (guanosine 5'-triphosphate) 結合蛋白質共役型受容体に共通する特徴を備えており, G-蛋白を介するシグナル伝達を経て, 種々の細胞応答を惹起する⁵⁾⁶⁾. 一般にB₁型受容体の発現は, 炎症および外傷により誘導される¹⁾⁷⁾. 一方, B₂型受容体は, 子宮, 小腸, 大動脈, 腎臓, 心臓, 脊髄などの正常組織および培養線維芽細胞や神経系培養細胞で恒常的に発現している¹⁾⁸⁾⁹⁾¹⁰⁾.

上記の生理作用に加え, BKは眼機能に影響を及ぼすことが知られている¹²⁾. BKの眼球内投与により, 瞳孔括約筋の収縮¹³⁾¹⁴⁾, 眼圧変化¹³⁾¹⁵⁾, 前房水流出量増加¹⁵⁾¹⁶⁾を認める. また, 眼球への持続的なBK受容体作動薬の動脈内投与によって血液-眼関門の透過性が亢進する¹⁷⁾. さらに, BK分解酵素であるアンギオテンシン変換酵素 (angiotensin-converting enzyme, ACE) 阻害薬の腹腔内投与により網膜電図においてb波の振幅が変化

することから, BKが網膜の信号伝達機能に関与することも示唆されている¹⁸⁾. しかしながら, 従来のBKあるいは阻害剤の投与による現象の観察のみでは, その反応がBKの直接作用なのか間接作用なのかということを区別できなかった. 従って, 眼球内におけるBKの直接の作用点となる細胞の種類と分布に関しても, 十分知見が得られていない.

本研究では, ラットの眼球および三叉神経節におけるB₂型受容体の発現細胞とその細胞の局在を明らかにするために, RNAプロットハイブリダイゼーションおよび組織内ハイブリダイゼーションによる解析を行った.

対象および方法

I. 実験動物

金沢大学動物実験施設内の空調飼育室にて1週間以上飼育した体重約400gのウイスター系成熟ラットを使用した.

II. ラットB₂型受容体 cDNAの単離

1. 総RNAの抽出および精製
成熟ラットの脳組織を懸濁・溶解して酸性フェノール法¹⁹⁾にて総RNAを抽出し, オリゴdT-セルロースカラムによってポリ (A)⁺RNAを精製した.

2. 逆転写PCR反応 (reverse transcription-PCR, RT-PCR)

1 μgの脳ポリ (A)⁺RNA, 50mM トリス緩衝液 (Tris-HCl, pH 8.3), 75mM KCl, 3mM MgCl₂, 10mM ジチオスレイトール (dithiothreitol), 各1mMのdATP, dCTP, dGTP, dTTP, 5mMのランダムヘキサマー, ヒト胎盤由来RNA分解酵素阻害剤 (3575U/ml, 宝酒造, 東京), およびMoloney murine成人白血

平成11年12月1日受付, 平成12年2月1日受理

Abbreviations: ACE, angiotensin-converting enzyme; BK, bradykinin; FITC, fluorescein isothiocyanate; PB, phosphate-buffer; RT-PCR, reverse transcription-PCR

病ウイルス逆転写酵素 (Gibco BRL, Rockville, USA) 100単位からなる 10 μ l の反応液中で、42°C 30分間 cDNA 合成を行った。次に、この逆転写反応により得られた cDNA を用いて 10mM Tris-HCl (pH 8.3), 50mM KCl, 1.5mM MgCl₂, 0.001% (w/v) ゼラチン、各 0.2mM の dATP, dCTP, dGTP, dTTP、各 1mM のセンスプライマーおよびアンチセンスプライマー、50U/ml Taq I DNA ポリメラーゼ (Perkin Elmer Cetus, Norwalk, USA) からなる反応液内で PCR を行った。PCR の反応条件は、95°C で 5 分間熱変性の後、92°C 1 分間の熱変性、60°C 2 分間のアニーリング、72°C 3 分間の DNA 伸長反応を 1 サイクルとし、30 サイクル行った。センスプライマーおよびアンチセンスプライマーは、既に報告されているラット B₂ 型受容体 cDNA⁹ の塩基番号 323-342, 1561-1581 (GenBank データベースの番号) に相当する部位を、それぞれ合成して使用した。増幅された DNA 断片は pCRベクター (Invitrogen, San Diego, USA) に組み込み、このプラスミドを pCRB2R と命名した。挿入された cDNA の塩基配列はダイデオキシ法によって確認した。

Ⅲ. RNA プロットハイブリダイゼーション

1. RNA の抽出

成熟ラットの眼球および三叉神経節を摘出し、液体窒素にて急速凍結した。前記と同様に、酸性フェノール法¹⁰にて総 RNA を抽出して、オリゴdT-セルロースカラムによってポリ (A)⁺ RNA を精製した。

2. 電気泳動およびナイロンメンブランへの転写

ポリ (A)⁺ RNA (眼球 10 μ g, 三叉神経節 3.7 μ g) を、定電圧 60V で 1.1% アガロース-2.2M ホルムアルデヒドゲルにて電気泳動し、20 倍濃度 SSC (0.3M NaCl, 0.03M クエン酸三ナトリウム) を用いて Zetaprobe ナイロンメンブラン (Bio-Rad, Hercules, USA) に転写した。ナイロンメンブランを 80°C で 1 時間乾燥し、紫外線クロスリンカー (Stratagene, La Jolla, USA) にて処理した後、使用直前まで -30°C に保存した。

3. プロープの作成

pCRB2R を制限酵素 *EcoRI* で切断して得られた約 1200 塩基対の cDNA 断片 (図 1) を以下の反応液中で³²P で標識して、ハイブリダイゼーションのプロープとした。cDNA 断片 25ng を含む水溶液 15 μ l を 100°C で 5 分間処理した後、氷上で冷却し、5 μ l のランダムヘキサマーを含む反応混合液 (アマシヤム・ジャパン, 東京), 0.5 μ l の Klenow 酵素 (DNA ポリメラーゼ I の Klenow 断片; 東洋紡績, 大阪), 2.5 μ l の [α -³²P] dCTP (>3000Ci/mmol) (アマシヤム・ジャパン) を加えて 37°C で 30 分間、さらに室温で 1 時間反応させた。未反応のヌクレオシドは、ゲル濾過用カラム (NAP-5 Sephadex G-25 column, Pharmacia, Uppsala, Sweden) を用いて除去した。プロープの比活性は 1.6 \times 10⁶cpm/ μ g であった。

4. ハイブリダイゼーションと検出

ナイロンメンブランを 50%ホルムアミド、5 倍濃度 SSC、5 倍濃度 Denhardt 液 (0.25% ポリビニールピロリドン, 0.25% ウシ血清アルブミン, 0.25% フィコール), 0.5% SDS, 0.05M 磷酸ナトリウム緩衝液 (pH7.0), 250 μ g/ml の変性サケ精子 DNA からなるプレハイブリダイゼーション液と 42°C で 2 時間反応させた。引き続きハイブリダイゼーション反応を、50%ホルムアミド、5 倍濃度 SSC、5 倍濃度 Denhardt 液, 0.5% SDS, 0.05M 磷酸ナトリウム緩衝液 (pH7.0), 250 μ g/ml の変性サケ精子 DNA に、前記のプロープを混合したハイブリダイゼーション液中で、

42°C で 15 時間行った。ハイブリダイゼーション後のナイロンメンブランは最終的に、0.1% SDS を含む 0.1 倍濃度 SSC 中にて 50°C で 30 分間洗浄した。オートラジオグラフィには増感スクリーンを使用し、露出は -30°C で 3 週間行った。

Ⅳ. 組織内ハイブリダイゼーション

1. プロープの作成

試験管内転写反応によって、ジゴキシゲニン標識 RNA プロープを合成した。まず、転写反応の鋳型として用いるプラスミドを以下のように構築した。pCRB2R を制限酵素 *EcoRI* と *BglII* で切断して得られた 270 塩基対の断片 (図 1) をアンチセンス 1 のプロープとして利用するために Klenow 酵素で末端を平滑化し、pGEMEX1 (Promega, Madison, USA) の *HincII* 切断部位に組み込み pB2RBE とした。次に、pCRB2R を *NcoI* と *EcoRI* で切断して得られた 190 塩基対の断片 (図 1) を同様な末端平滑化の後、センスおよびアンチセンス 2 のプロープとして利用するために pGEMEX1 へ両方向に組み込み、それぞれ pB2REN, pB2RNE と命名した。続いて、pB2RBE は *XhoI* で、pB2REN と pB2RNE は *HindIII* で切断した。直線化したこれらのプラスミド DNA を鋳型として、DIG RNA ラベリングキット (Boehringer Mannheim Biochemica, Mannheim, Germany) を用いて転写を行い、ジゴキシゲニンで標識された RNA プロープを合成した。未反応のヌクレオシドは、ゲル濾過用カラム (NAP-5 Sephadex G-25 column, Pharmacia) にて除去した。プロープの濃度は、前述 III-2 と同様な方法で、ナイロンメンブランに転写した既知濃度の RNA 標品と比較することにより検定した。

2. 組織切片作成

組織切片は、Black らの報告¹¹に従って作成した。まずラットをジエチルエーテル吸入と塩酸キシラジン (セラクター, 日本バイエル, 東京) 20mg/kg の腹腔内注射による麻酔下で開胸した。右心房を切開し、左心室より PBS を灌流しながら脱血させ、続いて 4% パラホルムアルデヒドを含む 0.1M リン酸緩衝液 (phosphate-buffer, PB) で灌流固定した。灌流後直ちに眼球および三叉神経節を摘出し、4% パラホルムアルデヒドを含む PB 中で、2 時間 4°C で浸漬固定した。固定液の浸透を促すため、眼球赤道部の部分切開、赤道部の全周性切開、水晶体の除去、前眼部 (角膜, 虹彩, 毛様体) と後極部 (網膜) の分割を段階的に行い、さらに 30% ショ糖 (w/v) を含む固定液で 4°C で一晩

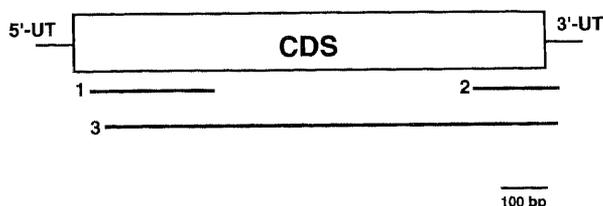


Fig.1. cDNA fragments for B₂BKR used for probe synthesis. The fragments 1-3 were used to generate the following probes: 1, digoxigenin-labeled antisense 1 RNA probe for *in situ* hybridization (ISH); 2, digoxigenin-labeled antisense 2 and sense RNA probes for ISH; 3, randomly-primed, ³²P-labeled probe for RNA blot hybridization. CDS, protein-coding sequence; 5'-UT, 5'-untranslated region; 3'-UT, 3'-untranslated region.

浸漬固定した。固定終了後、組織をO.C.T.コンパウンド(Miles, Elkhart, USA)中で凍結し、厚さ10 μ mの切片を作成した。切片は3アミノプロピルトリエトキシシランで被覆したスライドガラスに貼布し、乾燥後-30 $^{\circ}$ Cの暗所に使用前まで保存した。

3. ハイブリダイゼーションと検出

組織切片を4%パラホルムアルデヒドを含むPBを用いて、室温で10分間後固定した。PBSによる洗浄後、眼球切片では2 μ g/mlのプロテイナーゼKにて室温で10分間、三叉神経節切片では10 μ g/mlのプロテイナーゼKで室温で30分間処理した。その後、切片を0.25%無水酢酸、0.1Mトリエタノールアミン(pH8.0)からなる溶液中で10分間アセチル化した。続いて2倍濃度のSSCで洗浄し、50%ホルムアミド、5倍濃度SSC、5倍濃度Denhardt液、100 μ g/mlの変性サケ精子DNAからなるプレハイブリダイゼーション液中で室温で2時間反応させた。ハイブリダイゼーションには、50%ホルムアミド、5倍濃度SSC、1倍濃度Denhardt液、10% (w/v) 硫酸デキストラン、100 μ g/mlの変性サケ精子DNAおよび500ng/mlのプロープからなる溶液を、切片1枚につき7 μ l使用して42 $^{\circ}$ Cで15時間反応させた。ハイブリダイゼーション終了後、切片を2倍濃度SSCで2回洗浄し、10 μ g/mlのリボヌクレアーゼAを含む溶液[10mM Tris-HCl, 500mM NaCl, 1mM EDTA (pH 7.5)]中で、室温で30分間処理した。さらに、2倍濃度SSCで再度洗浄後に、最終的に0.2倍濃度SSC中で52 $^{\circ}$ Cで20分間2回洗浄した。

プロープの検出は以下の通り行った。まず1.5%のブロッキング剤(Boehringer Mannheim Biochemica)を含む100mM Tris-HCl, 150mM NaCl (pH 7.5)からなる溶液で、室温30分間ブロッキングした。その後、ブロッキング液で500倍に希釈した抗ジゴキシゲニン抗体(Boehringer Mannheim Biochemica)を、4 $^{\circ}$ Cで一晩反応させた。反応後に100mM Tris-HCl, 150mM NaCl (pH 7.5)にて室温で5分間3回、100mM Tris-HCl, 100mM NaCl, 50mM MgCl₂ (pH 9.0)にて室温で5分間2回、それぞれ震盪させながら洗浄した。洗浄後に100mM Tris-HCl, 100mM NaCl, 50mM MgCl₂ (pH 9.0)にニトロブルーテトラゾリウム(nitroblue tetrazolium salt) (385 μ g/ml)と燐酸プロモクロロインドリル(5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate) (188 μ g/ml)を加えたアルカリフォスファターゼ基質溶液を加え、暗所にて4 $^{\circ}$ Cで一晩反応させた。発色の程度を観察しながら、10mM Tris-HCl, 1mM EDTA (pH 8.0)を加えて反応を停止し、水溶性封入剤(Aqua Poly Mount, 大同産業, 東京)を用いて封入した。標本を光学顕微鏡で観察した後に、写真撮影した。前眼部に関しては、比較対照のためにHE染色を施行した。

4. 陰性対照実験

以下に挙げる3つを陰性対照実験とした。

プロープを含まないハイブリダイゼーション液を使用したもの、切片を10 μ g/mlのリボヌクレアーゼAを含む10mM Tris-HCl, 500mM NaCl, 1mM EDTA (pH 7.5)からなる溶液で室温で30分間前処理したもの、およびセンスプロープを用いてハイブリダイゼーションを施行したもの。

5. 免疫組織化学染色との併用

一部の実験で組織内ハイブリダイゼーションに先立って免疫組織化学染色を施行した。前記と同様に作成した組織切片をPBSで3回洗浄の後に、マウス抗Thy-1.1単クローン抗体(MRC OX-7; Serotec, Oxford, UK)²¹⁻²⁰をPBSで100倍希釈し、1切片

当たり150 μ lを用いて4 $^{\circ}$ Cで一晩反応させた。PBSによる洗浄後、二次抗体としてフルオレセインイソチオシアネート(fluorescein isothiocyanate, FITC)で標識されたヤギ抗マウスIgG抗体(Serotec)を500倍希釈し、1切片あたり150 μ lを用いて暗所にて室温で1時間反応させた。その後、0.1% TritonX-100を含むPBSで洗浄し、グリセロール・PBS混合溶液(混合比1:1)にて封入し、FITCの発色を共焦点レーザー顕微鏡(LSM400; Carl Zeiss, Thornwood, USA)下で観察した。写真撮影の後、PBS中でカバーガラスを外して封入剤を洗浄し、引き続き前記IV-3と同様に組織内ハイブリダイゼーションを施行した。免疫組織化学染色終了時に撮影した写真と、組織内ハイブリダイゼーション終了時に撮影した写真とを比較して、Thy-1.1陽性細胞とラットB₂型受容体のmRNA発現細胞の分布を調べた。

成 績

I. RNAプロットハイブリダイゼーションによる解析

成熟ラットの眼球および三叉神経節において、B₂型受容体のcDNAとハイブリッドを形成するRNAが検出された(図2)。mRNAの長さは、いずれの組織においても6000および4000ヌクレオチドと計測された。

II. 組織内ハイブリダイゼーションによる解析

1. 後極部(網膜、脈絡膜、後部強膜)

成熟ラットの眼球後極部において、B₂型受容体のmRNAの局在を調べた。本実験では、実験結果の特異性を確認する目的でB₂型受容体cDNAの異なる部位に対応するプロープを作成して得られた結果を比較した。B₂型受容体のアンチセンスプロープとハイブリッドを形成してシグナル陽性となった細胞は網膜神経節細胞層に限局し、他の細胞層および血管には認められなかった(図3A, 3B)。網膜神経節細胞層内のシグナル陽性細胞は、

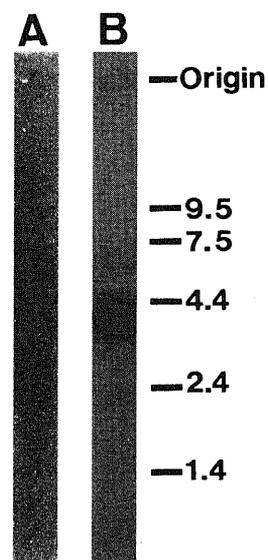


Fig. 2. Autoradiogram of blot hybridization analysis of poly (A)⁺ RNA from rat eyes (A) and trigeminal ganglion (B). The probe used was ³²P-labeled rat B₂BKR cDNA fragment as indicated in Fig.1. Size standards are indicated in kilobases on the right.

長径が12 μmを越える大型の細胞が大部分であった。網膜のシグナル陽性細胞はその大きさから網膜神経節細胞であると推定された。アンチセンス1とアンチセンス2の間で、シグナル陽性細胞の局在に差異は認められなかった(図3A, 3B)。一方、アンチセンス2の相補鎖であるセンスプローブを用いた対照実験では、特異的なシグナルを認めなかった(図3C)。陰性対照実験として、プローブを含まないハイブリダイゼーション液を使用したもの(図4A)、切片をリボヌクレアーゼAで前処理したもの(図4B)、およびセンスプローブを用いてハイブリダイゼーションを施行したもの(図4C)のいずれにおいても、特異的なシグナルは認められなかった。

さらに、網膜のシグナル陽性細胞を確認する目的で、組織内ハイブリダイゼーションに先立ち免疫組織化学染色を同一切片において行った。免疫組織化学染色には一次抗体としてラットの網膜神経節細胞に高発現しているThy-1.1抗原に対する抗体²⁰⁻²⁴⁾を用いた。その結果、Thy-1.1陽性細胞(図5A)の大部分に組織内ハイブリダイゼーションによるシグナル陽性の細胞

(図5B)を認めた。

以上、網膜神経節細胞層においてシグナル陽性細胞の細胞体の大きさと免疫組織化学染色の結果から、B₂型受容体のmRNAを発現する細胞は網膜神経節細胞であることが判明した。

2. 前眼部(角膜, 虹彩, 毛様体, 強角膜移行部)

成熟ラットの前眼部において、B₂型受容体のmRNAの局在を調べた。通常の前眼部組織像と比較するため、HE染色標本(図6D)と比較したところ、シグナル陽性細胞は角膜直下から強膜実質に散在し、かつ強角膜移行部周辺に限局していた。強角膜移行部周辺におけるシグナル陽性細胞は、やや小型で紡錘形もしくは円形であった。強角膜移行部において、シグナル陽性細胞の局在には、アンチセンス1とアンチセンス2の間で差異はなかった(図6A, 6B)。センスプローブを用いた陰性対照実験では、特異的なシグナルは認められなかった(図6C)。網膜後極部と同様に、他の陰性対照実験のいずれにおいても特異的にシグナル陽性と判定される細胞および構造は認められなかった。

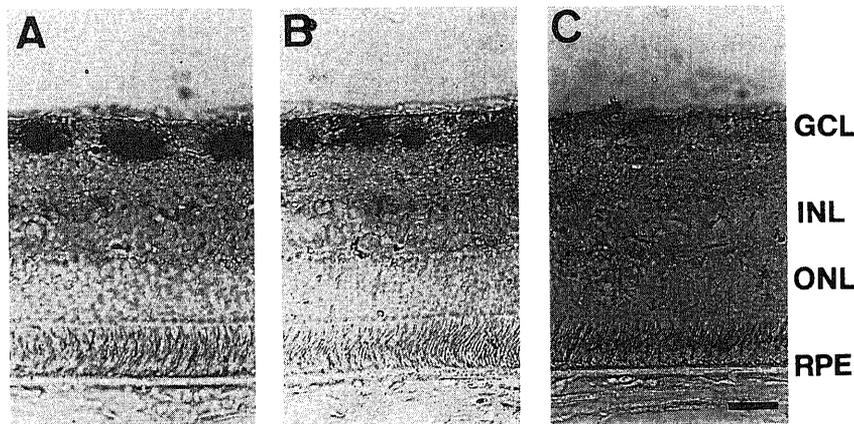


Fig. 3. Cellular localization of B₂BKR mRNA in the rat retina. Sections were hybridized with the antisense 1 (A), antisense 2 (B) and sense (C) digoxigenin-labeled B₂BKR riboprobes. GCL, ganglion cell layer; INL, inner nuclear layer; ONL, outer nuclear layer; RPE, retinal pigment epithelium. Scale bar, 20 μm.

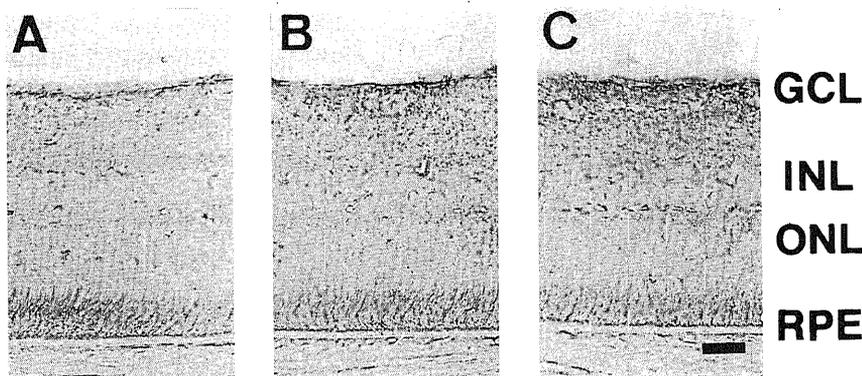


Fig. 4. Negative control for *in situ* hybridization analysis in the rat retina. Hybridization without the antisense digoxigenin-labeled B₂BKR riboprobes (A), hybridization with antisense probe after pretreatment with RNaseA (10 μg/ml) (B) and hybridization with sense riboprobes (C). GCL, ganglion cell layer; INL, inner nuclear layer; ONL, outer nuclear layer; RPE, retinal pigment epithelium. Scale bar,

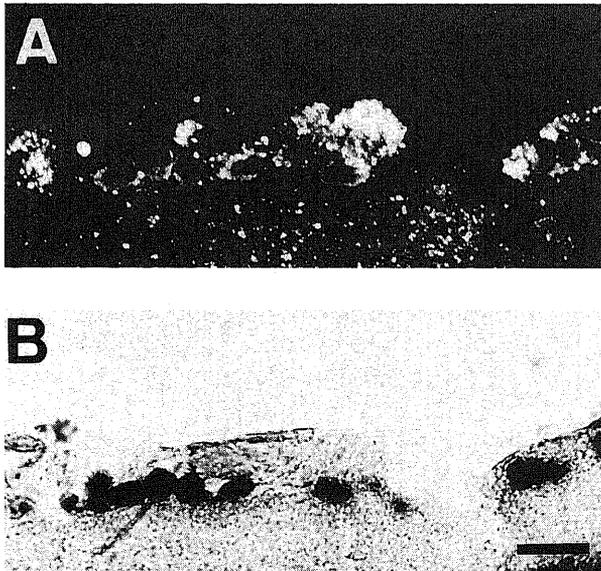


Fig. 5. Expression of B_2 BKR mRNA in Thy-1.1-immunoreactive cells in the retinal ganglion cell layer. Confocal microscopic image of rat retina stained for Thy-1.1 antigen (A). The same section hybridized with the antisense 2 riboprobe for B_2 BKR mRNA (B). Scale bar, 20 μ m.

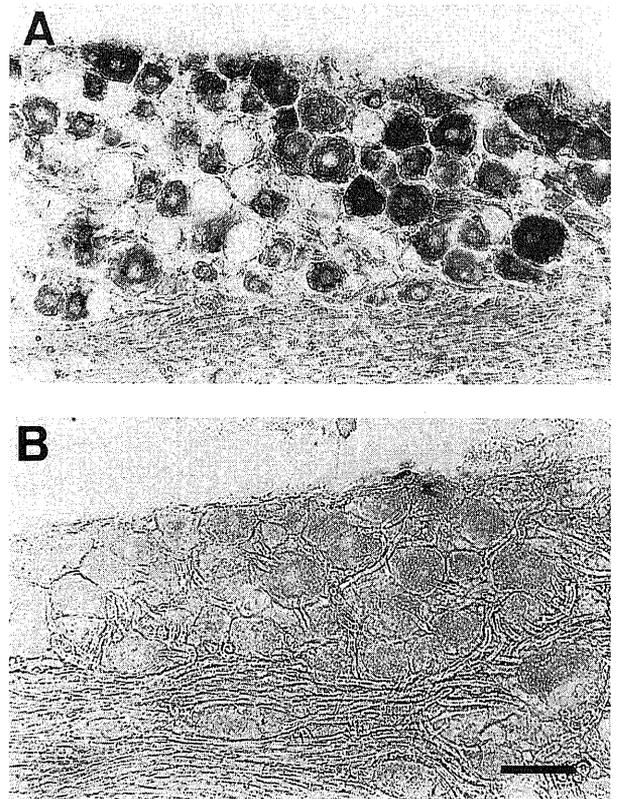


Fig. 7. Cellular localization of B_2 BKR mRNA in the rat trigeminal ganglion. Sections were hybridized with the antisense 2 (A) and sense (B) digoxigenin-labeled B_2 BKR riboprobes. Scale bar, 50 μ m.

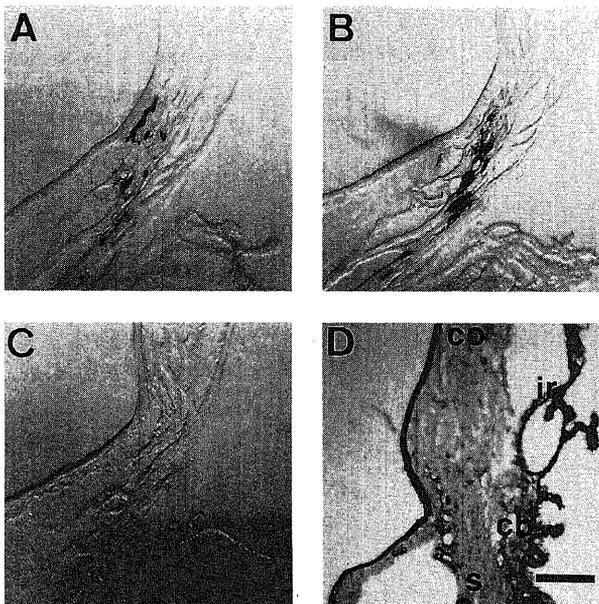


Fig. 6. Cellular localization of B_2 BKR mRNA in the rat sclerocornea. Sections were hybridized with the antisense 1 (A), antisense 2 (B) and sense (C) digoxigenin-labeled B_2 BKR riboprobes. Hematoxylin-eosin staining of a similarly prepared section (D). co, cornea; s, sclera; cb, ciliary body; ir, iris. Scale bar, 100 μ m.

3. 三叉神経節

成熟ラットの三叉神経節において、 B_2 型受容体の mRNA の局在を調べた。シグナル陽性細胞には長径が 10 μ m と小さなものに加えて、35 μ m 以上の大型のものも含まれていた。(図 7A)。神経線維には特異的なシグナルを認めなかった。センスプローブを用いた実験 (図 7B)、および他の陰性対照実験のいずれにおいても特異的なシグナルは認められなかった。

考 察

正常ラットの眼球および三叉神経節において、RNA プロットハイブリダイゼーションで、 B_2 型受容体 cDNA とハイブリッドを形成する 6000 および 4000 ヌクレオチドの 2 本の転写産物が検出された。この 2 つのバンドは脳、肺、腎臓、子宮、神経系培養細胞 NG108-15 で報告されている結果²⁹⁾と一致し、眼球および三叉神経節には他の組織と同様に B_2 型受容体が発現していると推測された。

組織内ハイブリダイゼーションによって、網膜では網膜神経節細胞層に特異的に B_2 型受容体の mRNA の発現が示された。さらに免疫組織化学染色との組み合わせでこの細胞が網膜神経節細胞であることが証明された。これまでに網膜神経節細胞と BK の関連を指摘した報告はない。BK と網脈絡膜に関して挙げてみると、眼杯の灌流実験での BK の添加による灌流液中の脈絡膜由来の組織プラスミノゲン活性化物質の増加²⁹⁾、網膜色

素上皮細胞の培養液へのBK添加による細胞内イノシトール燐脂質の生成増加²⁹、および細胞内カルシウム濃度の上昇²⁷が従来の報告である。最近の組織学的実験で、Maら²⁸がヒトの眼球における組織カリクレイン、低分子量キニノーゲン、B₁型およびB₂型受容体のmRNAの発現と分布を調べている。彼らのRT-PCR法による解析結果では、mRNA発現量は、網膜、脈絡膜、毛様体で高く、視神経では低い。また組織内ハイブリダイゼーションでは、その発現は内顆粒層、外顆粒層および網膜神経節細胞層の広範囲におよんだ。この結果は、B₂型受容体のmRNAの分布が網膜神経節細胞層のみである本研究結果とは異なる。この理由として、ヒトとラットの種差が考えられる。あるいは、ラットのB₂型受容体のmRNAの発現が網膜全層にあるにも関わらず、本実験で使用した非放射性プローブが放射性プローブに比べて感度が低いために検出できなかった可能性も考えられる。

過去の電気生理学的な実験報告では、Jacobiら¹⁸はネコでBKの分解酵素であるACE阻害薬およびB₂型受容体の特異的阻害薬であるヘキスト140 (HOE140)の腹腔内投与前後で網膜電図を比較した。その結果、ACE阻害薬の投与により網膜の光感受性が投与前に比べて増加し、杆体系のb波の振幅が50%増加した。HOE140投与の場合、b波の振幅は変化せずその潜時が延長した¹⁸。この結果から、BKの効果がアンジオテンシンII活性の変化と無関係であること、内層網膜の信号伝達にBKが関与すること、さらにレニン-アンジオテンシン系が網膜内神経伝達に関与することが示唆されている。また、他の神経系細胞を用いた実験では、BKが脊髄後根神経節ニューロンにおいてナトリウムイオンの細胞膜透過性を変化させ、膜興奮性を制御することを示した報告²⁹、神経系培養細胞NG108-15においてBKの添加により細胞内イノシトール燐脂質代謝を変化させ、細胞内Ca貯蔵からの放出や細胞膜のイオン透過性の変化が生じることがわかっている¹⁰。本研究結果と上記の諸報告から、BKがB₂型受容体を介し網膜神経節細胞の細胞膜の興奮性を変化させることも推測されるが、実際に網膜神経節細胞が網膜電図の発生源であるという証拠はない³⁰。一つの可能性として、BKは網膜神経節細胞に変化を与え、網膜神経節細胞と網膜内でシナプスを形成する細胞、例えば網膜電図の発生源の細胞の一つとされる双極細胞に間接的に作用し、内層網膜の神経細胞の興奮性ひいては網膜内信号伝達を変化させるのかも知れない。

前眼部におけるB₂型受容体のmRNAの発現は強角膜移行部に限局していた。この部位の組織構築および細胞構成はヒトでは詳細に解明されているが、ラットでは不明な点が多い。ヒトやモルモットでの知見に基づいて推測すると、静脈叢の血管内皮細胞、線維柱帯細胞、線維芽細胞、ランゲルハンス細胞がB₂型受容体のmRNAの発現細胞の候補として挙げられる。

強角膜移行部には房水流出経路末梢にあたる静脈叢の血管内皮細胞が存在する。BKは血管拡張作用、血管透過性亢進作用を有しており¹¹、血管内皮細胞にBKが作用することで房水流出抵抗が減弱し眼圧が降下することが予測される。実際、BKをウサギ摘出眼球の前房内に注入すると、房水流出が増加し眼圧が有意に低下した¹⁹。しかし一方では、低濃度のBKをウサギの前房内に注入することにより縮瞳と眼圧上昇を来したとの報告^{19,10}もあり、BKが眼圧に与える影響に関して統一された見解はない。

線維柱帯細胞も、ヒトでは隅角における房水流出の調節という重要な働きを担っている。ヒト線維柱帯細胞をSV40で不活化した培養細胞では、BKにより細胞内のイノシトール燐脂質代謝が亢進し、この作用はB₂型受容体の特異的阻害薬によって抑制される¹⁰。また、Llobetら³¹はヒトおよびウシの前眼部を用いてBKの灌流実験とウシの培養線維柱帯細胞の細胞内カルシウムの変化および細胞面積と細胞の長軸の変化に注目して調べ、いずれにおいてもB₂型受容体の関与を示した。以上の諸報告からも、実際の生体内の線維柱帯細胞でもB₂型受容体が発現しており、房水流出抵抗の調節に関与していることが推測される。

線維芽細胞は強角膜移行部にも存在し、膠原線維の産生を含めた創傷治癒の際に中心的な役割を担う。線維芽細胞系の培養細胞にもB₂型受容体の発現が知られており、BKの添加により分裂増殖速度が有意に増大することが確認されている³²。このことから、炎症や損傷などが眼局所に生じた際にBKが産生され、その部位に存在する線維芽細胞に作用することで創傷治癒過程に何らかの影響をおよぼすことも推測される。

BKは炎症に際して産生され、特に急性期に血管を拡張し血管透過性を亢進するとともに、インターロイキン-1や腫瘍壊死因子などのサイトカインやプロスタグランジンやロイコトリエンなどの脂質代謝物の産生を促進する³³。同時に補体系の賦活化を介してマクロファージや好中球などの細胞を遊走する活性を持つ³⁴。抗原提示能を持つランゲルハンス細胞が角膜輪部付近に存在している^{35,36}。この細胞は正常状態では角膜実質には存在せず、角膜上皮欠損などの病的状態に際して角膜輪部から移動してくる³⁷。これまでにランゲルハンス細胞とキニン-カリクレイン系の関係を研究した例はないが、ランゲルハンス細胞の病変部への移動にBKが関与する可能性がある。

今回の実験では前眼部におけるシグナル陽性細胞が上記のいずれの細胞であるか特定できなかった。しかしながら、いずれの可能性においても、強角膜移行部の病態、例えば前眼部炎症、創傷治癒、緑内障などを考える上で、このB₂型受容体mRNA陽性細胞は重要であると推測される。今後この部位の組織構築および細胞構成が解明されてくれば、シグナル陽性細胞の正確な同定が可能になるであろう。また、ヒトでの検討を進めていけば前記の病態の解明の一助となりうると考えられる。

三叉神経節におけるB₂型受容体のmRNAの発現は、小型の神経細胞体に加えて大型の神経細胞体においても認められた。Sterankaら³⁸はモルモットの三叉神経節と脊髄後根におけるトリチウム標識したBKを用いたリガンドオートラジオグラフィを行い、小型の神経細胞体にBKが結合することを見出している。さらに彼らはBK投与による痛覚過敏を評価し、脊髄後根神経節および三叉神経節では、小型の細胞体をもつ神経が痛覚に関与すると考えた。本研究結果は、大きな細胞体もシグナル陽性になった点でこの報告と一致しなかった。今回の実験結果からラット三叉神経ニューロンではB₂型受容体が痛覚に加えて、他の感覚の伝達にも関与していることも推察される。

角膜の炎症にはヒスタミン、プロスタグランジンとともにBKが関与するとされる³⁹。さらに眼球表面および角膜上皮培養細胞でのBKおよびB₂型受容体に関する以下の報告が存在する。Hallら⁴⁰は、モルモットの結膜にBKを点眼したときに、三叉神経の末端から放出されるタキキニンを介して血漿が漏出し、その程度がB₂型受容体拮抗物質WIN64338の前投与で減少

することを述べている。また、ネコの角膜表面にBKを作用させると、三叉神経節のニューロン興奮性が増大する⁴⁰⁾という報告もある。Sharifら⁴⁰⁾は、ヒトの角膜上皮細胞の初代培養細胞およびSV40で不死化した細胞株を用いて、BKとB₂型受容体拮抗物質であるHOE140を培養液に添加し、BKによる細胞内のイノシトール磷脂質の生成の増加がHOE140により抑制されることから、これらの細胞でのB₂型受容体の発現を示し、角膜の病態解明に利用できる⁴¹⁾と論じた。今回の実験では、三叉神経節においてB₂型受容体のmRNAの発現が認められた。一方、前眼部の組織内ハイブリダイゼーションでは角膜内部にシグナル発現を認めなかった。この結果から、生成されたB₂型受容体が軸索流に従って移動し、角膜の知覚神経終末に分布していると考えられるが、今後特異的抗体などを用いた蛋白レベルでの証明が必要であろう。

以上のラット眼球および三叉神経節の実験結果から、B₂型受容体を介するBKの作用が、網膜内層の神経伝達、前眼部における房水流出抵抗の調節、角膜輪部の炎症、免疫反応、および角膜の知覚伝達を含む多様な眼機能に影響を及ぼす可能性が示唆された。

結 論

成熟ラットの眼球および三叉神経節におけるB₂型受容体のmRNAの発現およびその分布について、RNAプロットハイブリダイゼーションおよび組織内ハイブリダイゼーションによる解析を行い以下の成績を得た。

1. RNAプロットハイブリダイゼーションで、ラットの眼球および三叉神経節においてB₂型受容体のmRNAの発現が確認された。
2. 網膜の組織内ハイブリダイゼーションでは、網膜神経細胞層に特異的にB₂型受容体のmRNAの発現が示され、抗Thy-1.1抗体を用いた免疫組織化学染色による結果から発現細胞が網膜神経節細胞であることが判明した。
3. 前眼部の組織内ハイブリダイゼーションで、強角膜移行部に特異的なB₂型受容体のmRNAの発現が検出された。
4. 三叉神経節の組織内ハイブリダイゼーションで、三叉神経節の細胞に特異的にB₂型受容体のmRNAの発現が示された。

以上の結果は、眼球におけるキニン-カリクレイン系の役割を理解するための分子の基礎になるとと思われる。また、これまでに眼球で報告されている種々のBK反応のうち少なくとも一部は、今回mRNAレベルで示された眼内のB₂型受容体への直接作用の結果であると推論された。

謝 辞

稿を終えるに臨み、御指導と御校閲を賜りました恩師金沢大学眼科学講座河崎一夫教授に深甚の謝意を表します。また、直接の御指導を賜りました金沢大学大学院医学研究科細胞遺伝子学講座東田陽博教授、横山茂助教授に深謝致します。本論文の要旨は第63回日本中部眼科学学会(1997, 松江)、第27回北米神経科学学会年会(1997, New Orleans)および国際キニンカンファレンス(1998, 奈良)において発表した。

文 献

- 1) Bhoola KD, Figueroa CD, Worthy K. Bioregulation of kinins. *Pharmacol Rev* 44: 1-80, 1992
- 2) Dray A, Perkins M. Bradykinin and inflammatory pain. *Trends Neurosci* 16: 99-104, 1993

- 3) Regoli D, Barabe J. Kinin receptors. *Methods Enzymol* 163: 210-230, 1988
- 4) Walker K, Perkins M, Dray A. Kinin and kinin receptors in the nervous system. *Neurochem Int* 26: 1-16, 1995
- 5) Majima M, Katori M. Approaches to the development of novel antihypertensive drugs: crucial role of the renal kallikrein-kinin system. *Trends Pharmacol Sci* 16: 239-246, 1994
- 6) Menke JG, Borkowski JA, Bierilo KK, MacNeil T, Derrick AW, Schneck KA, Ransom RW, Strader CD, Linemeyer DL, Hess JF. Expression cloning of a human B₁ bradykinin receptor. *J Biol Chem* 269: 21583-21586, 1994
- 7) Hess JF, Borkowski JA, Young GS, Strader CD, Ransom RW. Cloning and pharmacological characterization of a human bradykinin (BK-2) receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 184: 260-268, 1992
- 8) Yokoyama S, Kimura Y, Taketo M, Black JA, Ransom BR, Higashida H. B₂ bradykinin receptors in NG108-15 cells: cDNA cloning and functional expression. *Biochem Biophys Res Commun* 200: 634-641, 1994
- 9) McEachern AE, Shelton ER, Bhakta S, Obernolte R, Bach C, Zuppan P, Fujisaki J, Aldrich RW, Jarnagin K. Expression cloning of a rat B₂ bradykinin receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 7724-7728, 1991
- 10) Higashida H, Hashii M, Yokoyama S, Taketo M, Hoshi N, Noda M, Zhong ZG, Shahidullah M, Minabe Y, Nakashima S, Nozawa Y. Bradykinin B₂ receptors and signal transduction analyzed in NG108-15 neuroblastoma x glioma hybrid cells, B₂ receptor-transformed CHO cells and ras-transformed NIH/3T3 fibroblasts. *In* Kumazawa T, Kruger L, Mizumura K (eds), *The Polymodal Receptor-A Gateway to Pathological Pain*, *Prog Brain Res*, vol 113, p215-230, Elsevier, Amsterdam, 1996
- 11) Mombouli JV, Vanhoutte PM. Kinins and endothelial control of vascular smooth muscle. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 35: 679-705, 1995
- 12) Igit R. Kallikrein and kininases in ocular tissues. *Exp Eye Res* 41: 117-120, 1985.
- 13) Cole DF, Unger WG. Action of bradykinin on intraocular pressure and pupillary diameter. *Ophthalmic Res* 6: 308-314, 1974
- 14) Bynke G, Hankanson R, Horig J, Leander S. Bradykinin contracts the pupillary sphincter and evokes ocular inflammation through release of neuronal substance P. *Eur J Pharmacol* 91: 469-475, 1983
- 15) Zeller EA, Shoch D, Crezner TB, Hsu MY, Knepper PA. Enzymology of the refractory media of the eye: X. effects of topically administered bradykinin, amine releasers, and pargyline on aqueous humor dynamics. *Invest Ophthalmol* 10: 274-281, 1971
- 16) Sharif NA, Xu SX. Pharmacological characterization of bradykinin receptors coupled to phosphoinositide turnover in SV40-immortalized human trabecular meshwork cells. *Exp Eye Res* 63: 631-637, 1996
- 17) Elliot PJ, Mackic JB, Graney WF, Bartus RT, Zlocovic BV. RMP-7, a bradykinin agonist, increases permeability of blood-

- ocular barriers in the guinea pig. *Invest Ophthalmol Visual Sci* 36: 2542-2547, 1995
- 18) Jacobi PC, Osswald H, Zrenner E. Bradykinin receptor inhibition affects the rod b-wave in the cat electroretinogram. *Vision Res* 36: 3843-3849, 1996
- 19) Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162: 156-159, 1987
- 20) Black JA, Yokoyama S, Higashida H, Ransom BR, Waxman SG. Sodium channel mRNAs I, II and III in the CNS: cell-specific expression. *Mol Brain Res* 22: 275-289, 1994
- 21) Barnstable CJ, Drager UC. Thy-1 antigen: a ganglion cell specific marker in rodent retina. *Neuroscience* 11: 847-855, 1984
- 22) Taschenberger H, Grantyn R. Several types of Ca²⁺ channels mediate glutamatergic synaptic responses to activation of single Thy-1-immunolabeled rat retinal ganglion neurons. *J Neurosci* 15: 2240-2254, 1995
- 23) Liu CJ-I, Chaturvedi N, Barnstable CJ, Dreyer EB. Retinal Thy-1 expression during development. *Invest Ophthalmol Visual Sci* 37: 1469-1473, 1996
- 24) Guenther E, Schumid S, Grantyn R, Zrenner E. In vitro identification of retinal ganglion cells in culture without the need of dye labeling. *J Neurosci Methods* 51: 177-181, 1994
- 25) Wang Y, Gillies C, Cone RE, O'Rourke J. Extravascular secretion of t-PA by the intact superfused choroid. *Invest Ophthalmol Visual Sci* 36: 1625-1632, 1995
- 26) Crook RB, Song M-K, Tong LP, Yabu JM, Polansky JR, Lui GM. Stimulation of inositol phosphate formation in cultured human retinal pigment epithelium. *Brain Res* 583: 23-30, 1992
- 27) Feldman EL, Randolph AE. Peptides stimulate phosphoinositide hydrolysis in human retinal pigment epithelium. *Invest Ophthalmol Visual Sci* 34: 431-437, 1993
- 28) Ma J-x, Song Q, Hatcher HC, Crouch RK, Chao L, Chao J. Expression and cellular localization of the kallikrein-kinin system in human ocular tissues. *Exp Eye Res* 63: 19-26, 1996
- 29) Burgess GM, Mullaney I, Mcneill M, Dunn PM, Rang HP. Second messengers involved in sensory neurons in culture. *J Neurosci* 9: 3314-3325, 1989
- 30) Brown KT. The electroretinogram. Its components and their origins. *Vision Res* 8: 633-677, 1968
- 31) Llobet A, Gual A, Pales J, Barraquer R, Tobias E, Nicolas JM. Bradykinin decreases outflow facility in perfused anterior segments and induces shape changes in passaged BTM cells in vitro. *Invest Ophthalmol Visual Sci* 40: 113-125, 1999
- 32) Walsh DA, Fan T-PD. 18. Bradykinin as a growth factor. *In* Stephen GF (ed), *The Kinin System*, 1st ed, p301-314, Academic Press, London, 1997
- 33) Robin AP, Robert WC. 10. The kallikrein-kinin system in sepsis syndrome. *In* Stephen GF (ed), *The Kinin System*, 1st ed, p173-186, Academic Press, London, 1997
- 34) Naidoo Y, Bhoola K. 11. The kinin system and neutrophils. *In* Stephen GF (ed), *The Kinin System*, 1st ed, p187-196, Academic Press, London, 1997
- 35) Tagawa Y, Takeuchi T, Saga T, Matsuda H, Silverstein AM. Langerhans' cells: role in ocular surface immunopathology. *In* O'Connor GR, Chandler JW (eds), *Advances in Immunology and Immunopathology of the Eye*, 1st ed, p203-207, Masson, New York, 1985
- 36) Gillette TE, Chandler JW, Greiner JV. Langerhans cells of the ocular surface. *Ophthalmology* 89: 700-711, 1982
- 37) Williamson JS, DiMarco S, Streilein JW. Immunobiology of Langerhans cells on the ocular surface. I. Langerhans cells within the central cornea interfere with induction of anterior chamber associated immune deviation. *Invest Ophthalmol Visual Sci* 28: 1527-1532, 1987
- 38) Steranka LR, Manning DC, DeHaas CJ, Ferkany JW, Borosky SA, Connor JR, Vavrek RJ, Stewart JM, Snyder SH. Bradykinin as a pain mediator: Receptors are localized to sensory neurons, and antagonists have analgesic actions. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 3245-3249, 1988
- 39) Leopold IH, Gaster RN. Ocular inflammation and anti-inflammatory drugs. *In* Kaufman HE, Barron BA, McDonald MB, Waltman SR (eds), *The Cornea*, 1st ed, p67-83, Churchill Livingstone, New York, 1988
- 40) Hall JM, Figini M, Butt SK, Geppetti P. Inhibition of bradykinin-evoked trigeminal nerve stimulation by the non-peptide bradykinin B₂ receptor antagonist WIN64338 in vivo and in vitro. *Br J Pharmacol* 116: 3164-3168, 1995
- 41) Belmonte C, Gallar J. Corneal nociceptors. *In* Belmonte C, Cervero F (eds), *Neurobiology of Nociceptors*, 1st ed, p146-183, Oxford University Press, Oxford, 1996
- 42) Sharif NA, Wiernas TK, Howe WE, Griffin BW, Offord EA, Pfeifer AA. Human corneal epithelial cell functional responses to inflammatory agents and their antagonists. *Invest Ophthalmol Visual Sci* 39: 2562-2571, 1998

Expression and Cellular Localization of B₂ Bradykinin Receptor mRNA in Rat Eyes and the Trigeminal Ganglion
Hisashi Takeda, Department of Ophthalmology, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920-8640 — J. Juzen Med Soc., **108**, 78 — 86 (2000)

Key words bradykinin, B₂ bradykinin receptor, *in situ* hybridization, rat eye, trigeminal ganglion

Abstract

Expression of the B₂ bradykinin receptor (BKR) in rat eyes and the trigeminal ganglion was investigated at the mRNA level. Blot hybridization analysis of poly (A)⁺ RNA from the whole eye and trigeminal ganglion showed RNA species of 6000 and 4000 nucleotides, being consistent with those observed in the brain, lung, kidney and uterus. *In situ* hybridization analysis using digoxigenin-labeled riboprobes revealed intense labeling in the retinal ganglion cells, trigeminal ganglion cells and in a population of cells adjacent to the sclerocorneal junction. These results suggest that B₂BKR is involved in retinal and trigeminal neurotransmission and in unidentified biological processes in the sclerocorneal junction.