

Thesis

ラットの胃酸分泌に及ぼすアシルグレリンと
デスアシルグレリンの作用の比較

埼玉医科大学 臨床医学研究系 内科学

櫻田 智也

背景: 成長ホルモン放出ペプチドであるグレリンには、活性型グレリン(アシルグレリン)と不活性型グレリン(デスアシルグレリン)の、2つの主要な分子形態が存在する。最近の研究では、これらの2形態が異なる役割を果たしていることが示唆されている。本研究では、デスアシルグレリンとアシルグレリンのラットの胃における酸分泌とヒスタミン産生への作用について比較した。

方法: 我々は、胃内腔灌流ラットを用いてin-vivo実験を行った。2つの形態のグレリンが、ガストリン(ガストリン-17)刺激による酸分泌に及ぼす作用についても検討した。さらに、グレリンがヒスタミン産生に及ぼす作用を検討するため、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応法(RT-PCR)により、胃体部粘膜におけるヒスチジンデカルボキシラーゼ・メッセンジャーリボ核酸(HDC mRNA)を測定した。

結果: アシルグレリンを20 µg/kgの用量で静脈内投与すると、胃酸分泌が4.8倍に増大した。しかしながら、デスアシルグレリンの場合には、200 µg/kgの用量で静脈内投与しても酸分泌に対する作用が認められなかった。アシルグレリンはガストリン刺激による酸分泌を増強したが、デスアシルグレリンは増強しなかった。迷走神経を切断すると、ガストリン刺激下酸分泌に対するアシルグレリンの増強する作用が著しく抑制された。アシルグレリンを投与すると、1時間後には、HDC mRNA濃度が2.3倍に上昇し、投与2時間後には2.7倍に上昇した。デスアシルグレリンには、同様の作用は認められなかった。HDC mRNAの濃度に関しては、アシルグレリンとガストリンの間に相乗作用が認められた。

結論: 本研究の結果は、アシルグレリンがヒスタミン分泌・合成の促進によって胃酸分泌を刺激し、デスアシルグレリンには胃酸分泌に対する作用がないことを明らかにし、さらに、ヒスタミン分泌・合成の促進による胃酸分泌に対して、ガストリンとアシルグレリンは相乗的に作用することを示唆している。

諸語

成長ホルモン放出ペプチドであるグレリンは、元来、ラットとヒトの胃から分離され¹⁾、胃および視床下部の内分泌細胞に局在していることが証明されている^{1,2)}。グレリンを末梢または中枢部に投与すると、成長ホルモン(GH)の分泌、食物摂取、体重増加が促進される^{1,3-9)}。また、グレリンは胃酸分泌に影響を及ぼし、胃運動性を促進させる¹⁰⁻¹²⁾。しかしながら、グレリンには活性型グレリン(アシルグレリン)と不活性型グレリン(デスアシルグレリン)の2つの主要な分子形態が存在する¹³⁾。アシルグレリンは3番目のセリンがアシル化されており、このようなグレリンのn-オクタノイル化修飾がGH放出作用には不可欠であるものと思われる¹⁾。アシルグレリンは、タイプ1a GH分泌促進受容体(GHS-R1a)との結合を介して下垂体からの

GH分泌を刺激し、3番目のセリンのアシル化はこの結合に不可欠である¹⁴⁾。デスアシルグレリンはGHS-R1aと結合することが不可能であるため、GH放出を惹起することはない¹⁵⁾。したがって、アシルグレリンはペプチドの活性型、デスアシルグレリンはペプチドの不活性型であると考えられている。デスアシルグレリンは、循環血漿中のグレリン全体の90%以上を占めているが^{13,16)}、生理学的役割についてはほとんど知られていない。しかしながら、最近の研究では、ラットH9c2心筋細胞¹⁷⁾、モルモット心臓乳頭筋¹⁸⁾、ヒトの各種癌細胞株¹⁹⁾において、デスアシルグレリンがアシルグレリンと同一の生物学的作用を発揮することが確立されている。Asakawa et al.も、アシルグレリンとは対照的に、デスアシルグレリンを投与すると、視床下部室傍核および視床下部の弓状核に対する作用を介して、食物摂取や胃内容物排出速度が減少することを証明した²⁰⁾。これらの研究から、デスアシルグレリンに

生物学的活性が存在している可能性が示唆される。既報において、我々は、アシルグレリンが、ヒスタミン産生の促進によって胃における酸分泌を刺激することを発表した¹²⁾。同研究において、我々は、アシルグレリンが、胃粘膜においてヒスチジンデカルボキシラーゼ・メッセンジャーリボ核酸(HDC mRNA)の合成を刺激し、H₂受容体拮抗薬のファモチジンを投与すると、この刺激作用が完全に抑制されることを証明した¹²⁾。

胃酸分泌におけるグレリンの生理学的役割を解明するためには、グレリンの生物学的作用についてさらに多くの知識を得る必要がある。とくに、グレリンと他の消化管ホルモンの間には相互作用あるいは相乗作用が存在している可能性がある。Fukumoto et al.は、胃酸分泌に対するグレリンとガストリンの相乗作用を示している²¹⁾。

これまでに、デスアシルグレリンが胃酸分泌に及ぼす作用は解明されていない。デスアシルグレリンが循環血漿中のグレリン全体の大部分を占めているため、胃酸分泌機序におけるグレリンの生理学的作用を解明するためには、デスアシルグレリンの作用を解明することが重要である。本研究において、我々は、デスアシルグレリンとアシルグレリンが、ラットの胃における酸分泌ならびにHDC mRNA合成に及ぼす作用を比較した。また、胃酸分泌において、2つの形態のグレリンとガストリン間に相乗作用が存在しているか否かについても検討した。

材料と方法

胃内腔灌流ラットを作製するための外科実験的処置

既報²²⁾で述べた方法により、一晚絶食させた雄のWistarラット(体重180~220g;三協ラボサービス株式会社;東京,日本)に、ウレタン溶液(37wt/vol)を0.34 ml/100g b.w.の用量で腹腔内注入して麻酔を施し、胃酸分泌試験のための処置を行った。まず、気管を切開してカニューレを挿入し、体外に露出させた。白線から開腹して胃を露出し、灌流用ポリエチレンチューブを食道に挿入した。チューブの先端は、胃の管腔部に設置した。その後、幽門十二指腸接合部を露出し、もう1本のポリエチレンチューブを十二指腸の切開部から胃に挿入し、幽門周囲で結紮して確実に固定した。胃の管腔部は、排出液が透明になるまで生理食塩水でよく洗浄し、蠕動ポンプ(速度1±0.1 ml/min;マイクロチューブポンプMP-3A,東京理科器械株式会社,東京,日本)を用いて37℃の生理食塩水で灌流した。排出液を15分間隔で採取し、フェノールフタレイン溶液を指標として使用し、0.01 M NaOHを用いて滴定し酸分泌量を測定した。

酸分泌量の測定

酸分泌量は、15分または60分あたりのH⁺μEqとして表わした。酸分泌量は、アシルグレリンまたはデス

アシルグレリンの投与後に測定した。これらの投与法は以下の通りとした:アシルグレリン(ラット・アシルグレリン:ペプチド研究所,大阪,日本);胃内腔灌流開始から1時間後に20 μg/kgの用量をワンショットで静脈内投与,デスアシルグレリン(ラット・デスアシルグレリン:ペプチド研究所,大阪,日本);胃内腔灌流開始から1時間後に20 μg/kgまたは200 μg/kgの用量をワンショットで静脈内投与。

アシルグレリンが酸分泌に及ぼす作用において、迷走神経が果たす役割を検討するため、アシルグレリンの投与5分前にムスカリン受容体拮抗薬である硫酸アトロピンを投与し、酸分泌量を測定した。

ガストリン(ガストリン-17,ヒトG-17,Sigma Chemical Co.,St Louis,MO,USA)の静脈内連続投与中にアシルグレリンまたはデスアシルグレリンを追加し、アシルグレリンまたはデスアシルグレリンがガストリン刺激による酸分泌に及ぼす作用についても検討した。

リアルタイム逆転写ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)によるラットの胃におけるラットHDC mRNAの定量的検出

グレリンの2つの形態が胃粘膜におけるヒスタミン合成に及ぼす作用を検討するため、LightCyclerシステムを使用してRT-PCRによるHDC mRNAのアッセイを行った²³⁾。アシルグレリンまたはデスアシルグレリン(20 μg/kg)の静脈内投与2時間後にラットを屠殺し、胃体部粘膜を剥離した。FastPrepシステムを使用し、全てのRNAを粘膜から分離した。FastPrepシステムの構成は以下の通りとした: BIO 101 FP120 FastPrep インストルメント, FastRNA Pro Greenキット(BIO 101 Inc., Carlsbad, CA, USA)。各波長(260 nm, 280 nm)の吸光度を測定し、これによってHDC mRNA濃度を測定した。RT-PCR用の1st Strand cDNA Synthesis キット(Roche Diagnostics Corp., Indianapolis, IN, USA)を使用し、相補的DNA(cDNA)にRNAを逆転写した。逆転写産物のアリコート(2 μl)を用いて定量的RT-PCRを実施した。定量的RT-PCRには、Fast Start DNA Master SYBR Green Iキット(Roche Diagnostics Corp.)とLightCycler Quick System 330 (16)(Roche Diagnostics Corp.)を使用した。プライマーセットは以下の通りとした:ラットHDCについては5'-CCCAGTG AATACCATGAATAC-3'(センス)および5'-ATGTCCCC AAAGATGCTAT-3'(アンチセンス)(GenBankアクセス番号M29591からデザインした),18S rRNA測定については5'-CGAACGTCTGC CCTATCA-3'(センス)および5'-GCTGCCTTCCTTGGATGT-3'(アンチセンス)(アクセス番号V01270からデザインした)。このようにして、各複製配列は182 bp, 130 bpとなった。増幅条件は以下の通りとした:最初に95℃で10分間の熱変性後,95℃で10秒間の熱変性を40サイクル,62℃で10秒間のアニーリング,72℃で7秒間のエクステンション

を行った。温度遷移速度は20°C/secとした。さらに、PCRの後で融解曲線解析を行い、PCR反応の特異度を確認した。PCR産物については、ゲル電気泳動(2%アガロースゲル)およびエチジウムブロマイド染色によって目視観察を行い、GFX PCR DNAとGel Band精製キット(Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Sweden)で精製して配列を決定した。波長260 nmにおける吸光度を測定し、これによって濃度を測定した。サンプルは1/10濃度に連続希釈し、標準として使用した。PCR後の測定用サンプルは、検量曲線により、LightCycler Software Ver. 3.5を用いて定量した。標準化するため、HDC単位複製配列の量は、対応するサンプルの18S rRNA複製配列の量で除した。

コントロールラットと迷走神経切断ラットにおけるガストリン刺激下酸分泌およびHDC mRNA合成に対するグレリンの作用

2つの形態のグレリンが、ガストリン刺激下酸分泌に及ぼす作用を検討するため、胃内腔灌流ラットを製作し、ガストリン刺激下にアシルグレリンまたはデスアシルグレリンを投与した。アシルグレリンまたはデスアシルグレリン(20 µg/kg)は、以下の方法でラットに投与した:ガストリンの注入を開始して1時間経過してからガストリンの連続投与(ヒトガストリン17, 10⁹ mol/kg/hr)下にワンショットでアシルグレリンまたはデスアシルグレリンを注入した。胃内腔灌流によって排出される液体を15分間隔で採取し、フェノールフタレイン溶液を指標として使用し、0.01 M NaOHにて滴定し、酸分泌量を測定した。

2つの形態のグレリンが、ガストリン刺激下胃酸分泌と胃粘膜におけるヒスタミン合成に及ぼす作用について、迷走神経が関与しているかどうかを検討するため、胃内腔灌流実験の7日前に、ラットの横隔膜下の胃に向けて走行する迷走神経の一部を切断した。同じタイミングで、コントロールラットにも疑似手術を実施した。迷走神経切断ラットとコントロールラットには、胃内腔灌流を開始してから1時間後にガストリン(20 µg/kg/hr, IV)を投与開始した。ガストリンの注入を開始してから1時間後に、アシルグレリンまたはデスアシルグレリンをワンショットで注入した。胃内腔から排出される液体を15分間隔で採取し、0.01 M NaOHにて滴定を行い酸分泌量を測定した。さらに、迷走神経切断術を実施していないラットに対して、ガストリンの連続投与下において、アシルグレリンを注入する15分前に、ムスカリン受容体拮抗薬である硫酸アトロピン(0.1 mg/kg)を投与し、ガストリン刺激下酸分泌に及ぼすアシルグレリンの促進作用に迷走神経が関与しているかどうかを検討した。

2つの形態のグレリンがガストリン刺激によるHDC mRNA合成に及ぼす作用を検討するため、アシルグレリンまたはデスアシルグレリン(20 µg/kg)とガストリン

(20 µg/kg)を同時に静脈内投与してから2時間後にラットを屠殺した。胃体部粘膜を剥離し、RNAを抽出した。HDC mRNAについては、上述した通り、LightCyclerを用いてRT-PCRによるアッセイを行った。

さらに、アシルグレリンがガストリン刺激によるHDC mRNA合成に及ぼす作用に迷走神経が関与しているかどうかを検討するため、実験の7日前にラットの迷走神経を切断した。コントロールラットと迷走神経切断ラットには、アシルグレリン(20 µg/kg/hr, IV)とガストリン(20 µg/kg/hr, IV)を同時にワンショットで投与した。投与2時間後にラットを屠殺し、胃体部粘膜を剥離し、RNAを抽出した。HDC mRNAについては、上述した通り、LightCyclerを用いてRT-PCRによるアッセイを行った。

統計解析

群間差については、一元ANOVAで解析した。平均値の多重比較にはScheffe検定を使用した。Windows (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA)用のSPSS (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA)を使用し、全ての統計検定を実施した。P値が0.05未満(P<0.05)の場合に統計的有意とみなした。

結果

アシルグレリンまたはデスアシルグレリンの投与に伴う胃酸分泌、迷走神経とヒスタミンのグレリン刺激による酸分泌への関与

我々は、各用量(0.04, 0.8, 4, 20 µg/kg)でアシルグレリンを静脈内投与すると、用量依存性で胃酸分泌が促進されることを既報で発表した。これらの用量において、20 µg/kgでアシルグレリンを静脈内投与すると胃酸分泌の最大反応が惹起されることも報告した¹²⁾。したがって、今回の酸分泌実験では、20 µg/kgの用量でアシルグレリンを投与した。アシルグレリンを20 µg/kgの用量で静脈内投与すると、胃酸分泌量がコントロールレベルの4.8倍まで増大することが確認された(Fig1)。しかしながら、デスアシルグレリンを20 µg/kgまたは200 µg/kgの用量で単回投与しても酸分泌に対する影響は認められなかった(Fig2)。

我々は、既報にて¹²⁾、迷走神経を切断すると、グレリンが酸分泌に及ぼす作用が完全に抑制されることを証明した。このことは、グレリンが酸分泌に及ぼす作用に迷走神経が関与していることを示している。本研究では、この所見を確認するため、アシルグレリンを注入する15分前に、ムスカリン受容体拮抗薬である硫酸アトロピンを投与した。Fig3は、アシルグレリンの繰り返し投与が胃酸分泌量に及ぼす作用を示している。アシルグレリンの第2回目の注入では、第1回目の注入による酸分泌量の増加とほぼ等しいレベルの増加が認められた(54.8±7.4 µEq/hr; 58.5±4.8 µEq/hr)。しかしながら、硫酸アトロピンの投与により、アシル

グレリンの第2回目の投与が酸分泌量に及ぼす作用は著しく抑制された(Fig4).

グレリン投与後におけるラット胃粘膜のHDC mRNA濃度

グレリンが胃粘膜におけるヒスタミン合成に及ぼす作用を検討するため、HDC mRNAについて、RT-PCRによるアッセイを行った。アシルグレリンを20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の用量で静脈内投与すると、1時間後には、胃粘膜内のHDC mRNA濃度が基礎レベルの2.3倍に上昇し、2時間後には2.7倍に上昇した(Fig5A)。しかしながら、デスアシルグレリンを20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の用量で投与した場合

には、1時間後あるいは2時間後にHDC mRNA濃度に対する作用は認められなかった(Fig5B)。

グレリンのガストリン刺激下酸分泌に及ぼす作用

ガストリンとグレリンの間に相乗作用が存在しているか否かを解明するため、グレリンのガストリン刺激下酸分泌に及ぼす作用を検討した。ガストリンの連続注入(10^{-9} mol/kg/hr)による刺激下のラットに対して、アシルグレリン(20 $\mu\text{g}/\text{kg}$)をワンショットで静脈内投与した。Fig6に示したように、アシルグレリンは、ガストリン刺激による酸分泌を著明に増加させた。ガストリンの注入開始1時間後の酸分泌量は、

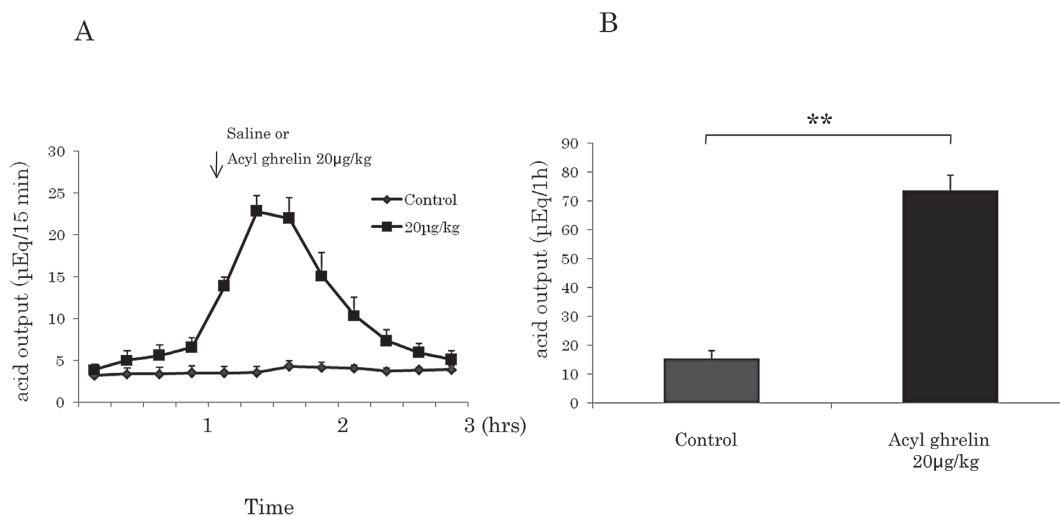


Fig. 1. Effect of acyl ghrelin on acid output in gastric lumen-perfused rats. Time course of acid output in response to intravenous administration of ghrelin (20 $\mu\text{g}/\text{kg}$) in gastric lumen perfused rats. Saline was administered in control rats. Gastric acid output was measured for an hour after the administration of acyl ghrelin or saline. (A); each value represents the mean \pm SE of acid output at 15-min intervals. (B); acid output for 1 hr calculated based on the data in A. Each column represents the mean \pm SE of acid output for an hour after acyl ghrelin or saline administration. ** $p < 0.01$, $N = 5, 7$.

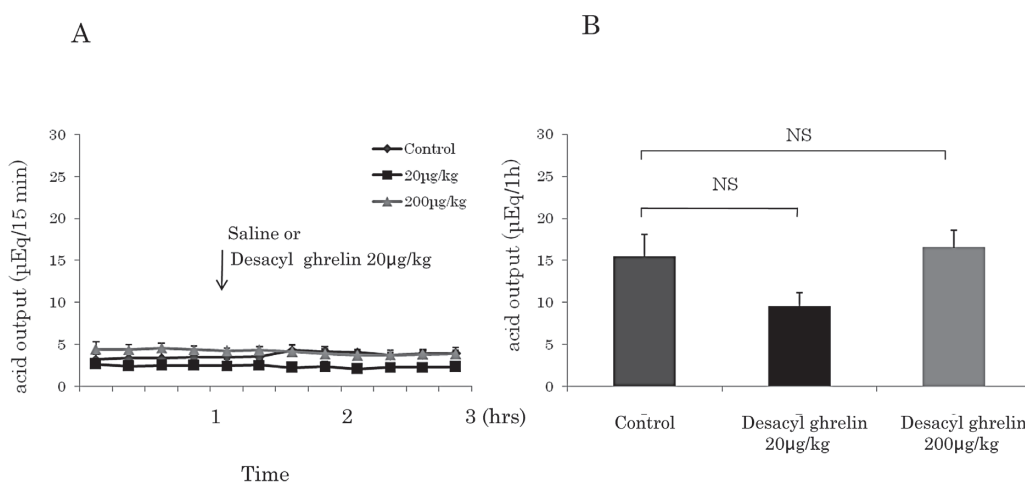


Fig. 2. Effect of desacyl ghrelin on acid output in gastric lumen-perfused rats. Time course of acid output in response to intravenous administration of desacyl ghrelin (20, 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$) in gastric lumen-perfused rats. Saline was administered in control rats. Gastric acid output was measured for an hour after the administration of desacyl ghrelin or saline. (A); each value represents the mean \pm SE of acid output at 15 min intervals. (B); acid output for 1 hr calculated based on the data in (A). Each column represents the mean \pm SE of acid output for 1 hr after desacyl ghrelin or saline administration. NS not significant, $N = 5, 6, 4$.

アシルグレリンを追加投与することによって1.84倍に増加していた。しかしながら、デスアシルグレリン(20 $\mu\text{g}/\text{kg}$)を投与しても、ガストリン刺激による酸分泌に変化が生じることはなかった(Fig7)。

アシルグレリンがガストリン刺激による酸分泌に及ぼす作用において、迷走神経が果たしている役割を解明するため、酸分泌実験を行う7日前に迷走神経を切断した。迷走神経切断ラットでは、アシルグレリンを投与しても、ガストリン刺激による酸分泌量に変化は認められなかった[72.3 \pm 12 $\mu\text{Eq}/\text{hr}$ (アシルグレリンを投与した場合) vs. 65.0 \pm 4.1 $\mu\text{Eq}/\text{hr}$ (アシルグ

レリンを投与しなかった場合)]. したがって、迷走神経切断ラットにおいては、アシルグレリンが、ガストリン刺激による酸分泌に及ぼす促進作用は認められなかった(Fig8)。これは、迷走神経の関与を示唆する所見であった。迷走神経の役割を確認するため、硫酸アトロピンが、アシルグレリンの促進作用に及ぼす影響についても検討した。Fig9に示したように、硫酸アトロピンは、ガストリン刺激下酸分泌をアシルグレリンが増強するのを著明に抑制した。硫酸アトロピンで前処理すると、ガストリン刺激による酸分泌量に関しては、アシルグレリンの投与による変化は認められな

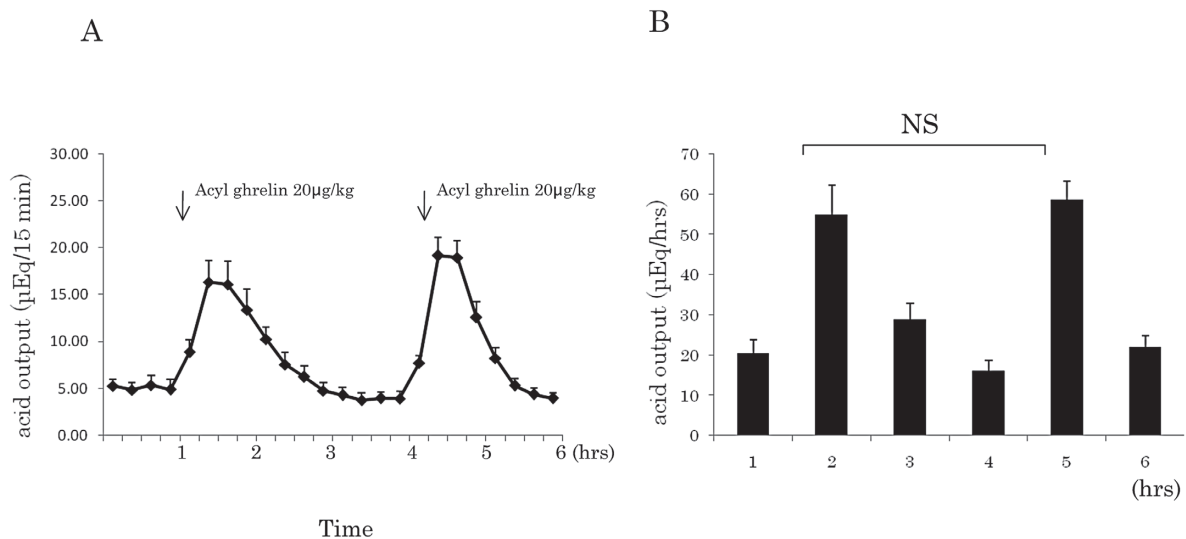


Fig. 3. Effects of successive administrations of acyl ghrelin on acid output in gastric lumen-perfused rats. Time course of acid output in response to successive intravenous administration of acyl ghrelin (20 $\mu\text{g}/\text{kg}$) in gastric lumen-perfused rats. (A); each value represents the mean \pm SE of acid output at 15 min intervals. (B); acid output for 1 hr calculated based on the data in A. Each column represents the mean \pm SE of acid output at 1-hr intervals. NS not significant, N=12.

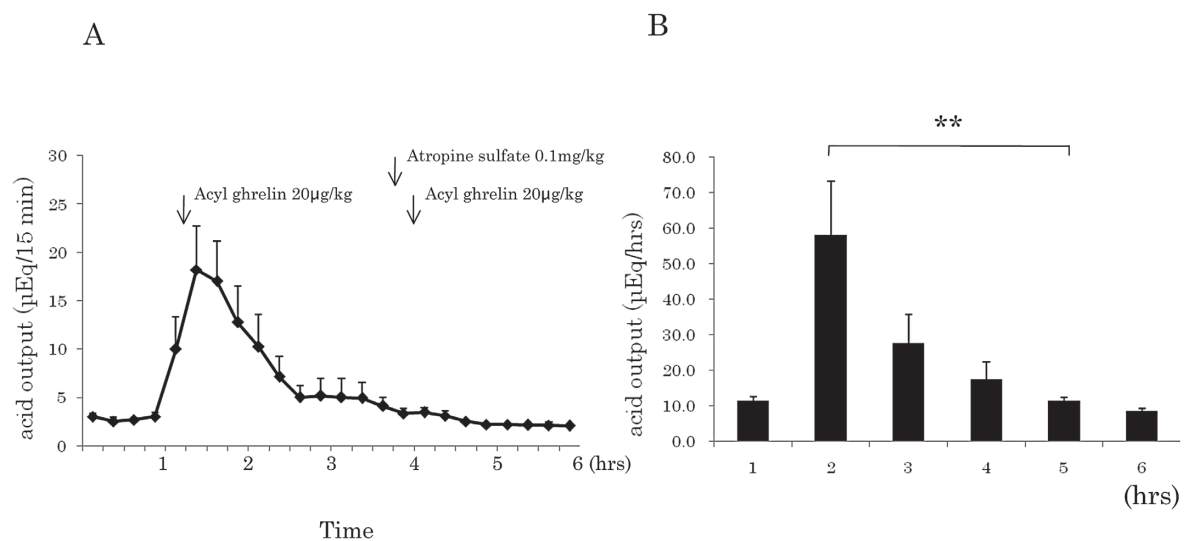


Fig. 4. Effect of a muscarinic receptor antagonist on ghrelin-stimulated acid output in gastric lumen-perfused rats. Time course of acid output in response to intravenous administration of ghrelin (20 $\mu\text{g}/\text{kg}$) and atropine sulfate in gastric lumen perfused rats. (A); each value represents the mean \pm SE of acid output at 15-min intervals. (B); acid output for 1 hr calculated based on the data in (A). Each column represents the mean \pm SE of acid output at 1-hr intervals. ** $p < 0.01$, N=5.

かった[53.6 ± 6.7 $\mu\text{Eq/hr}$ (アシルグレリンを投与した場合) vs. 48 ± 6.0 $\mu\text{Eq/hr}$ (アシルグレリンを投与しなかった場合)].

ガストリン刺激下 HDC mRNA 合成に対するアシルグレリンの促進作用における迷走神経の関与

ガストリン刺激による酸分泌をアシルグレリンが增強する際にヒスタミン分泌・合成が関与しているか否か, またこの作用に迷走神経が関与しているか否かを判定するため, 胃粘膜の HDC mRNA 含有量につい

てアッセイを行った. コントロールラットと迷走神経切断ラットには, アシルグレリン($20 \mu\text{g/kg}$)とガストリン($20 \mu\text{g/kg}$)を同時にワンショットで静脈内投与した. 2時間後にラットを屠殺し, 胃粘膜の HDC mRNA 含有量を測定した. HDC mRNA 濃度は, アシルグレリン ($20 \mu\text{g/kg}$) とガストリン($20 \mu\text{g/kg}$)を同時に投与した場合に著しく上昇し, ガストリン刺激だけの場合の1.94倍に到達した(Fig10). 迷走神経切断ラットを用いた実験では, ガストリンによって HDC

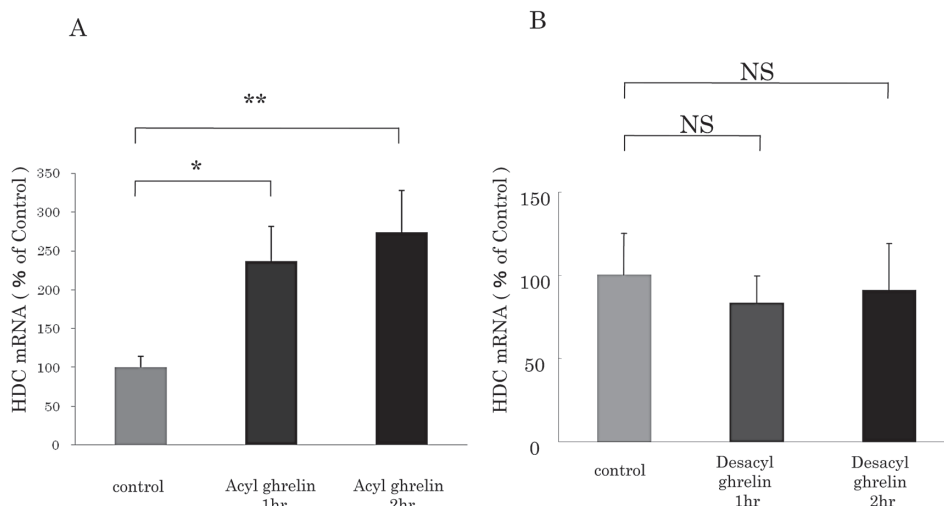


Fig. 5. Effects of acyl and desacyl ghrelin on the concentration of HDC mRNA in rat gastric mucosa. Acyl or desacyl ghrelin ($20 \mu\text{g/kg}$) was administered intravenously. The concentration of HDC mRNA was measured by real time RT-PCR using LightCycler. (A): the effect of acyl ghrelin on the concentration of HDC mRNA. (B): the effect of desacyl ghrelin on the concentration of HDC mRNA. Control: the concentration of HDC mRNA in gastric mucosa of rats administered saline. Acyl ghrelin 1 hr or desacyl ghrelin 1 hr; concentration of HDC mRNA in gastric mucosa 1 hr after acyl ghrelin or desacyl ghrelin administration (the stomachs were excised 1 hr after the administration). Acyl ghrelin 2 hr or desacyl ghrelin 2 hr; concentration of HDC mRNA in gastric mucosa 2 hr after acyl ghrelin or desacyl ghrelin administration (the stomachs were excised 2 hr after administration). Each value represents the mean \pm SE of HDC mRNA expressed as % of control. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, NS not significant, $N = 24, 17, 17, 9, 9, 9$.

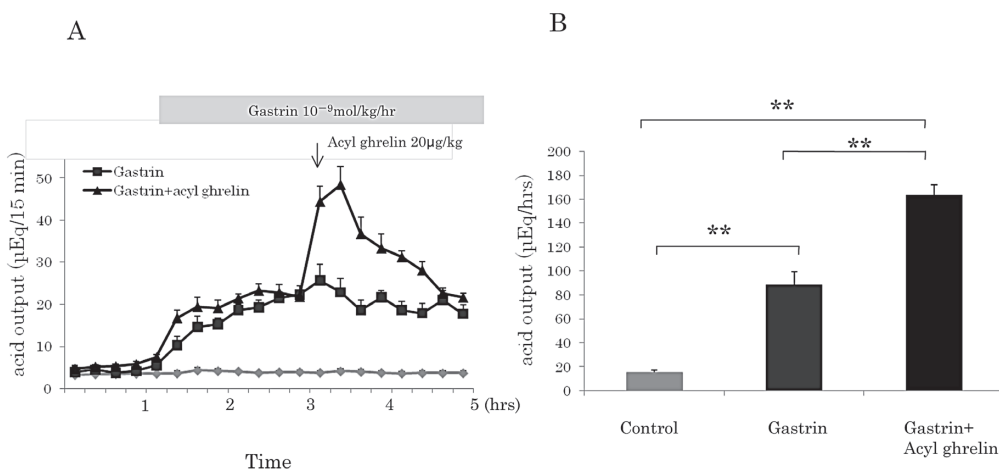


Fig. 6. The effects of acyl ghrelin on gastrin (gastrin-17)-stimulated acid secretion. (A): time course of acid output in response to the intravenous administration of acyl ghrelin ($20 \mu\text{g/kg}$) on gastrin-stimulated acid secretion in gastric lumen-perfused rats. Acyl ghrelin was administered intravenously 2 hrs after the beginning of continuous gastrin administration (human gastrin $17, 10^9$ mol/kg/hr). Each value represents the mean \pm SE of acid output at 15-min intervals. (B): acid output for 1 hr calculated based on the data in (a). Each column represents the mean \pm SE of acid output for 1 hr at the 4th hour. ** $p < 0.01$, $N = 5, 5, 6$.

mRNA 含有量が有意に増加し、コントロールラットとほぼ等しいレベルの増加が認められた。しかしながら、迷走神経を切断すると、ガストリン刺激による HDC mRNA濃度の上昇がアシルグレリンによって増幅されることはなかった(Fig10)。

考察

最近の10年間において、グレリンがGH分泌、食物摂取、体重増加を促進することが報告されている^{1,3,9)}。

また、グレリンが、胃酸分泌や胃運動を刺激することも報告されている^{10,11)}。グレリンが酸分泌および胃運動に及ぼす作用については、その機序に関する研究も行われ、迷走神経が関与することが判明している^{10,11)}。過去において、我々は、グレリン(アシルグレリン)が、ヒスタミン産生を促進することによって胃酸分泌を刺激することを報告した¹²⁾。我々は、この研究において、グレリンが胃粘膜における HDC mRNA合成を促進することを証明し、グレリンの酸分泌刺激作用が、

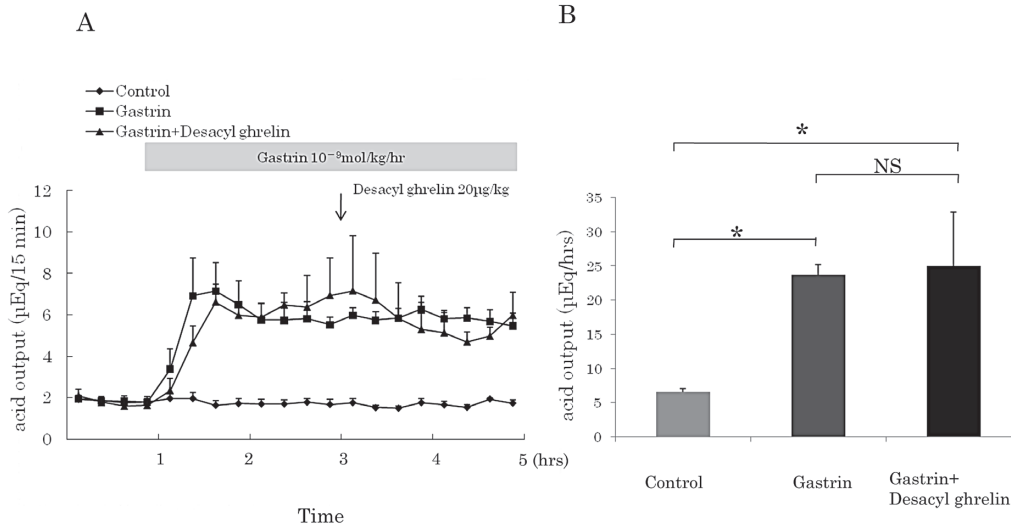


Fig. 7. Effects of desacyl ghrelin on gastrin (gastrin-17)-stimulated acid secretion. (A): time course of acid output in response to intravenous administration of desacyl ghrelin (20 µg/kg) on gastrin-stimulated acid secretion in gastric lumen-perfused rats. Desacyl ghrelin was administered intravenously 2 hrs after the beginning of continuous gastrin administration (human gastrin 17, 10⁻⁹ mol/kg/hr). Each value represents the mean ± SE of acid output at 15-min intervals. (B): acid output for 1 hr calculated based on the data in A. Each column represents the mean ± SE of acid output for 1 hr at the 4th hour. *p<0.05, NS not significant, N=5, 8, 5.

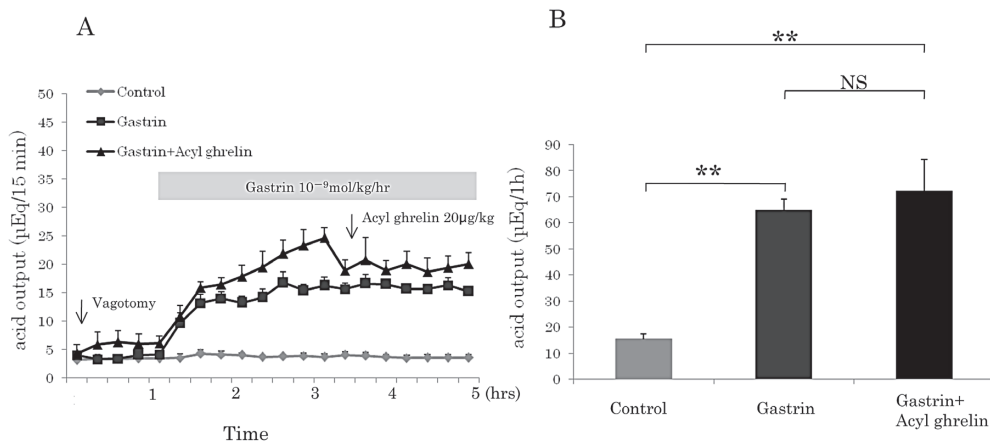


Fig. 8. Effect of vagotomy on the enhancement of gastrin-stimulated acid secretion by acyl ghrelin. Subdiaphragmatic and gastric branch vagotomy was performed in rats 7 days before the experiments. Sham operation for control rats was performed on the same day. (A): time course of acid output in response to intravenous administration of acyl ghrelin (20 µg/kg) on gastrin-stimulated acid secretion in gastric lumen-perfused rats. Acyl ghrelin was administered intravenously 2 hrs after the beginning of continuous gastrin administration (human gastrin 17, 10⁻⁹ mol/kg/hr). Each value represents the mean ± SE of acid output at 15-min intervals. (B): acid output for 1 hr calculated based on the data in (a). Each column represents the mean ± SE of acid output for 1 hr at the 4th hour. **p<0.01, NS not significant, N=5, 9, 5.

H₂受容体拮抗薬のファモチジンの投与によって完全に抑制されることを明らかにした。迷走神経を切断すると、グレリン刺激による酸分泌とHDC mRNA合成が完全に抑制されたことから、グレリンのこれらの作用は、迷走神経が仲介しているものと考えられる。しかしながら、上記の研究において、我々はアシルグレリンの作用について検討したが、循環中の主要形態で

あるデスアシルグレリンの作用については検討していなかった。グレリンの胃酸分泌機序における役割を解明するためには、デスアシルグレリンの胃酸分泌に及ぼす生物学的作用を解明する必要がある。

デスアシルグレリンは、生物学的作用が欠如しているものと考えられていた。なぜならば、デスアシルグレリンはGHS-R1aと結合することができないため

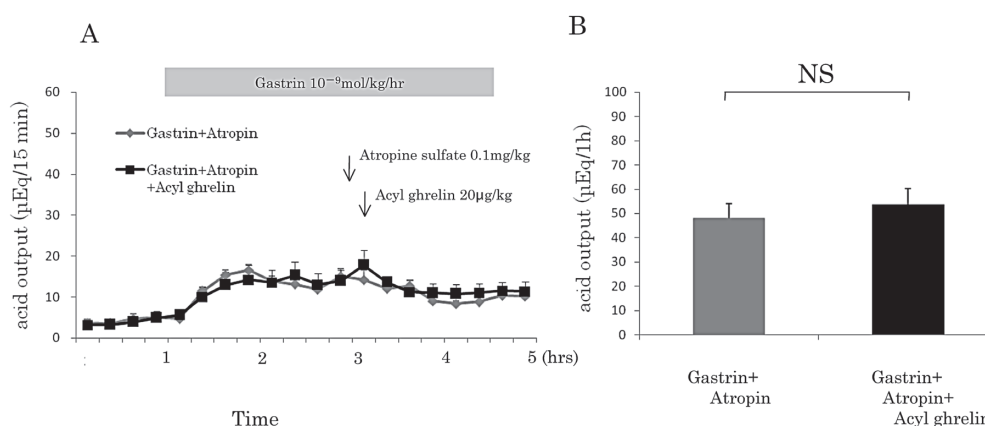


Fig. 9. Effect of atropine sulfate on the enhancement of gastrin-stimulated acid secretion by acyl ghrelin. A: time course of acid output by IV administration of acyl ghrelin (20 $\mu\text{g}/\text{kg}$) on gastrin-stimulated acid secretion in gastric lumen-perfused rats. Acyl ghrelin was administered intravenously 2 hrs after the beginning of continuous gastrin administration (human gastrin 17, 10^{-9} mol/kg/hr). Atropine sulfate (0.1 mg/kg) was administered to rats 5 min before acyl ghrelin administration. Each value represents the mean \pm SE of acid output at 15-min intervals. (B): acid output for 1 hr calculated based on the data in (A). Each column represents the mean \pm SE of acid output for 1 hr at the 4th hour. NS not significant, N = 4, 4.

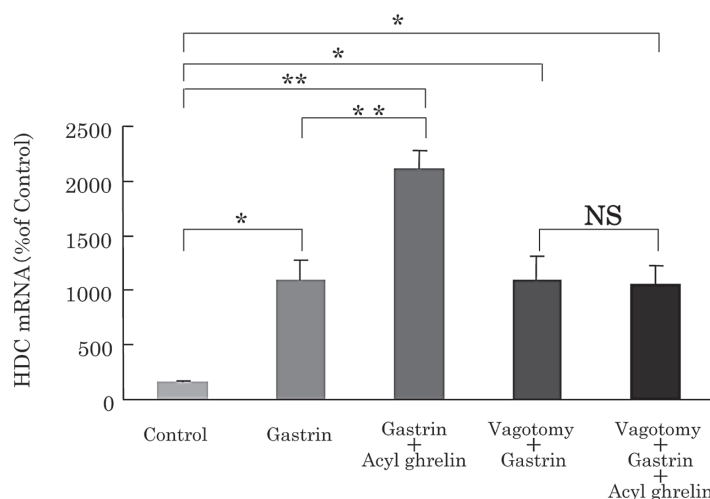


Fig. 10. Effect of vagotomy on the enhancement of gastrin-stimulated HDC mRNA synthesis in the gastric mucosa by acyl ghrelin. Subdiaphragmatic and gastric branch vagotomy was performed in rats 7 days before the experiments. Sham operation for control rats was performed on the same day. Gastrin (20 $\mu\text{g}/\text{kg}$) alone or in combination with ghrelin (20 $\mu\text{g}/\text{kg}$) was administered intravenously. The concentration of HDC mRNA was measured by real time RT-PCR using Light Cycler. Control: the concentration of HDC mRNA in gastric mucosa of rats with saline administration. Gastrin; the concentration of HDC mRNA in gastric mucosa of rats with gastrin (20 $\mu\text{g}/\text{kg}$) administration, Gastrin+Acyl ghrelin; the concentration of HDC mRNA in the gastric mucosa of rats with gastrin (20 $\mu\text{g}/\text{kg}$) + acyl ghrelin (20 $\mu\text{g}/\text{kg}$) administration Vagotomy+Gastrin; the concentration of HDC mRNA in the gastric mucosa of vagotomized rats with gastrin (20 $\mu\text{g}/\text{kg}$) administration, Vagotomy+Gastrin+Acyl ghrelin; the concentration of HDC mRNA in the gastric mucosa of vagotomized rats with gastrin (20 $\mu\text{g}/\text{kg}$) + ghrelin (20 $\mu\text{g}/\text{kg}$) administration. Each column represents the mean \pm SE of HDC mRNA expressed as % of control. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, NS not significant, N = 4, 5, 5, 5, 5.

にGH放出活性が欠如していることが示されているからである¹⁵⁾。しかしながら、最近の研究では、ラットH9c2心筋細胞¹⁷⁾、モルモット心臓乳頭筋¹⁸⁾、ヒトの各種癌細胞株¹⁹⁾において、デスアシルグレリンがアシルグレリンと同一の生物学的活性を発揮することが示されている。Asakawa et al.も、デスアシルグレリンを投与すると、視床下部室傍核および視床下部の弓状核に対する作用を介して、食物摂取や胃内容物排出速度が減少することを証明している²⁰⁾。したがって、デスアシルグレリンには何らかの生物学的活性が存在するものと思われる。我々は、本研究において、アシルグレリンとデスアシルグレリンが胃酸分泌およびHDC mRNAに及ぼす作用について検討した。今回の研究では、アシルグレリンが胃酸分泌量と胃粘膜のHDC mRNA濃度を増加させたが、デスアシルグレリンについては、200 µg/kgの用量で投与してもこのような作用は認められなかった。これらの結果は、2つの異なる形態のうちアシルグレリンだけが胃酸分泌に作用していることを示している。このことは、グレリンの2つの形態の受容体における相違によって説明付けることが可能である。Date et al.の過去の報告によれば、GHS-Rは下神経節の迷走神経求心性ニューロンで合成され、胃の求心性末端に輸送される²⁴⁾。アシルグレリンは受容体と結合してこれを活性化することが可能である。GHS-Rが活性化されると、シグナルが迷走神経求心性ニューロンを介して中枢神経系に伝達されて最終的に胃に戻る。胃では、ヒスタミン合成が促進される結果、胃酸分泌が増幅される。しかしながら、デスアシルグレリンは、GHS-Rと結合することができず、迷走神経活性に作用しない。その結果、デスアシルグレリンが胃酸分泌を増幅することはできない。我々は、本研究において、胃酸分泌の観点から、グレリンとガストリンの相乗作用についても検討した。Fukumoto et al.²¹⁾は、ガストリンとグレリンを同時投与すると、胃酸分泌量が付加的に増加するというよりも相乗的に増加することを示して上記の現象を示した。Fukumoto et al.は、この相乗作用の機序に関して、ガストリンの投与がグレリン分泌量の増加を増幅したものと考えている。しかしながら、本研究では、ガストリンをラットに連続投与した状態にアシルグレリンのワンショットでの静脈内注入を追加した。ガストリン刺激下胃酸分泌が、アシルグレリンの投与によって著しく増強された。すなわちアシルグレリンがガストリンの作用を相乗的に増幅させることを示している。さらに、ガストリンとアシルグレリンの相乗作用がHDC mRNA合成の際に観察されたことから、これらのホルモンの相互作用には、ガストリンが胃からのグレリン分泌を促進する作用よりも、ガストリンのヒスタミン合成に及ぼす作用の増強が含まれるものと思われる。今回の所見は、ガストリンの作用がグレ

リンではなくヒスタミンによって仲介されていることを示唆している。ガストリンの酸分泌作用およびHDC mRNA増加作用が迷走神経切断にて影響されないことからガストリンの作用がグレリンを仲介するものではないことが明らかである。我々は、ガストリンとグレリンが、腸クロム親和性細胞様細胞に相乗的に作用し、ヒスタミン合成を促進しているものと推測している。さらに、相乗作用が迷走神経の切断によって抑制されたことは、迷走神経が仲介していることも示している。

ガストリンとグレリンの相乗作用の生理学的結果については解明されていない。しかし、これらのホルモンレベルの変化が逆相関することはよく知られている：空腹時には、グレリンレベルが上昇し²⁵⁾、食物摂取時にはガストリンレベルが上昇する²⁶⁾。生理学的には、これらのホルモンの最高濃度を同時に観察することはできない。ガストリンは、食後の酸分泌量の増加に関与している²⁶⁾。他方、グレリンは、空腹時における基礎酸分泌量に関与しているものと思われる。なぜならば、血漿グレリンレベルが空腹時に高く、食物を摂取すると急速に低下するからである。しかしながら、*Helicobacter pylori*(HP;ヘリコバクター・ピロリ)感染者の場合、空腹時において、ガストリンレベルとグレリンレベルの同時上昇が発生する可能性がある。その理由として、循環ガストリンレベルが、HPに感染していない集団と比べて、HPに感染している集団において高いことが考えられる²⁷⁾。これらの状況では、ガストリンとアシルグレリンが、胃酸分泌に対して相乗的に作用する可能性がある。デスアシルグレリンは酸分泌を刺激しないため、ガストリンとデスアシルグレリンの相乗作用が発生することはない。

要約すると、本研究では、アシルグレリンが、ヒスタミン合成の促進によって胃酸分泌を刺激することが示された。また、デスアシルグレリンが胃酸分泌に対して作用しないことが示された。さらに、アシルグレリンは、迷走神経刺激を介するヒスタミン合成の促進を介してガストリン刺激による酸分泌を増強した。このような結果から、HP感染症の空腹期の状態などグレリンとガストリンのレベルが十分に高い場合、胃酸分泌に関して、両ホルモンの間に相乗作用が存在する可能性が示唆される。

謝辞

稿を終えるにあたり、御指導を賜りました埼玉医科大学総合医療センター消化器・肝臓内科学教室屋嘉比康治教授に心より感謝いたします。また、動物実験に協力して頂いた工藤光子様に謝意を表します。

この論文(Thesis)は、Journal of Gastroenterologyに掲載された原著論文「Comparison of the actions of

acylated and desacylated ghrelin on acid secretion in the rat stomach」より内容を抜粋したものである。Sakurada T, Ro S, Onouchi T, Kato S, Takayama K, Yakabi K, et al. Comparison of the actions of acylated and desacylated ghrelin on acid secretion in the rat stomach. *Journal of Gastroenterology*. [Epub ahead of print]

References

- 1) Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K. Ghrelin is a novel growth hormone releasing acylated peptide from stomach. *Nature*. 1999;402:656-60.
- 2) Date Y, Kojima Y, Hosoda H, Sawaguchi A, Mondal MS, Suganuma T, et al. Ghrelin a novel growth hormone-releasing acylated peptide, is synthesized in a distinct endocrine cell type in the gastrointestinal tracts of rats and humans. *Endocrinology*. 2000;141:4255-61.
- 3) Tscop M, Smiley DL, Heiman M. Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature* 2000;407:908-13.
- 4) Wren AM, Small CJ, Ward HL, Murphy KG, Dakin CL, Taheri S, et al. The novel hypothalamic peptide ghrelin stimulates food intake and growth hormone secretion. *Endocrinology*. 2000;141:4325-8.
- 5) Kamegai J, Tamura H, Shimizu T, Ishii S, Sugihara H, Wakabayashi I. Central effect of ghrelin, an endogenous growth hormone secretagogue, on hypothalamic peptide gene expression. *Endocrinology*. 2000;141:4797-800.
- 6) Nakazato M, Murakami N, Date Y, Kojima M, Matsuo H, Kangawa K, et al. A role for ghrelin in the central regulation of feeding. *Nature*. 2001;409:194-8.
- 7) Asakawa A, Inui A, Kaga T, Yuzuriha H, Nagata T, Ueno N, et al. Ghrelin is an appetite-stimulatory signal from stomach with structural resemblance to motilin. *Gastroenterology*. 2001;120:337-45.
- 8) Shintani M, Ogawa Y, Ebihara K, Aizawa-Abe M, Miyanaga F, Takaya K, et al. Ghrelin, an endogenous growth hormone secretagogue, is a novel orexigenic peptide that antagonizes leptin action through the activation of hypothalamic neuropeptide Y/Y1 receptor pathway. *Diabetes*. 2001;50:227-32.
- 9) Wren AM, Seal LA, Cohen MA, Brynes AE, Frost GS, Murphy KG, et al. Ghrelin enhances appetite and increases food intake in humans. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001;86:5992-5.
- 10) Masuda Y, Tanaka T, Inomata M, Ohnuma N, Tanaka S, Itoh Z, et al. Ghrelin stimulates gastric acid secretion and motility in rats. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000;276:905-8.
- 11) Date Y, Nakazato M, Murakami N, Kojima M, Kangawa K, Matsukura S. Ghrelin acts in the central nervous system to stimulate gastric acid secretion. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001;280:904-7.
- 12) Yakabi K, Shoki R, Onouchi T, Tanaka T, Ohno S, Miura S, et al. Histamine mediates the stimulatory action of ghrelin on acid secretion in rat stomach. *Dig Dis Sci*. 2006;56:1313-21.
- 13) Hosoda H, Kojima M, Matsuo H, Kangawa K. Ghrelin and desacyl ghrelin: two major forms of rat ghrelin peptide in gastrointestinal tissue. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000;279:909-13.
- 14) Kojima M, Hosoda H, Matsuo H, Kangawa K. Ghrelin: discovery of the natural endogenous ligand for the growth hormone secretagogue receptor. *Trends Endocrinol Metab*. 2001;12:118-22.
- 15) Broglio F, Benso A, Gottero C, Prodam F, Gauna C, Filtri L, et al. Non-acylated ghrelin does not possess the pituitary and pancreatic endocrine activity of acylated ghrelin in humans. *J Endocrinol Invest*. 2003;26:192-6.
- 16) Yoshimoto A, Mori K, Sugawara A, Mukoyama M, Yahata K, Suganami T, et al. Plasma ghrelin and desacyl ghrelin concentrations in renal failure. *J Am Soc Nephrol*. 2002;13:2748-52.
- 17) Baldanzi G, Filigheddu N, Cutrupi S, Catapano F, Bonisconi FS, Fubini F, et al. Ghrelin and des-acyl ghrelin inhibit cell death in cardiomyocytes and endothelial cells through ERK1/2 and PI 3-kinase/AKT. *J Cell Biol*. 2002;159:1029-37.
- 18) Bedendi I, Alloatti G, Marcantoni A, Malan D, Catapano F, Ghè C, et al. Cardiac effects of ghrelin and its endogenous derivatives des-octanoyl ghrelin and des-Gln14-ghrelin. *Eur J Pharmacol*. 2003;476:87-95.
- 19) Cassoni P, Pappoti M, Ghè C, Catapano F, Sapino A, Craziani A, et al. Identification, characterization, and biological activity of specific receptors for natural (ghrelin) and synthetic growth hormone secretagogues and analogs in human breast carcinomas and cell lines. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001;86:1738-45.
- 20) Asakawa A, Inui A, Fujimiya M, Sakamaki R, Shinfuku N, Ueta Y, et al. Stomach regulates energy balance via acylated ghrelin and desacyl ghrelin. *Gut*. 2005;54:18-24.
- 21) Fukumoto K, Nakahara K, Katayama T, Miyazatao M, Kangawa K, Murakami N. Synergistic action of ghrelin on gastric acid secretion in rats. *Biochem*

- Biophys Res Commun 2008;374:60-3.
- 22) Yakabi K, Mimura H, Iwabuchi H, Ro S, Nakamura T. Interleukin-8 enhances tetra-gastrin-stimulated acid secretion in vivo. *Dig Dis Sci.* 1998;43:2317-21.
- 23) Kreuzer KA, Lass U, Bohn A, Landt O, Schmit CA. LightCycler technology for the quantitation of bcr/abl fusion transcripts. *Cancer Research.* 1999;59:317-74.
- 24) Date Y, Murakami N, Toshinai K, Matsukura S, Nijima A, Matsuo H, et al. The role of the afferent vagal nerve in ghrelin-induced feeding and growth hormone secretion in rats. *Gastroenterology.* 2002;123:1120-8.
- 25) Cummings DE, Purnell JQ, Frayo RS, Schmidova K, Wisse BE, Weigle DS. A preprandial rise in plasma ghrelin levels suggests a role in meal initiation in humans. *Diabetes.* 2001;50:1714-9.
- 26) Richardson CT, Walsh JH, Hicks MI, Fordtran JS. Studies on the mechanisms of food-stimulated acid secretion in normal human subjects. *J Clin Invest.* 1976;58:623-31.
- 27) Levi S, Beardshall K, Swift I, Foulkes W, Playford R, Ghosh P, et al. Antral *Helicobacter pylori*, hypergastrinaemia and duodenal ulcer: effect of eradicating the organism. *BMJ.* 1989;299:1904-5.