

Thesis

インドメタシン起因性小腸潰瘍形成過程における
アドレノメデュリンの作用機序についての検討

臨床医学研究系 内科学

可児 和仁

【背景】アドレノメデュリンは血流増加作用、抗炎症作用などを有することが報告されている。今回、インドメタシン小腸潰瘍形成過程におけるアドレノメデュリンの発現変化とその受容体の発現につき検討するとともに、アドレノメデュリン・アンタゴニストを用いて小腸潰瘍形成に及ぼす影響について検討した。

【方法】インドメタシンを連日2日間皮下注射して小腸潰瘍を作成し、アドレノメデュリンおよびその受容体である calcitonin receptor-like receptor (CRLR) と receptor activity modifying protein (RAMP) -2 の発現を検討した。同時にアドレノメデュリン、CRLR、RAMP-2 および炎症性サイトカインである CXCL-1 mRNA の発現を real time RT-PCR 法を用いて検討した。また、アドレノメデュリン・アンタゴニスト Adrenomedullin (22-52) peptide の作用についても検討した。

【結果】インドメタシン小腸潰瘍形成は day2 が有意に強かった。炎症性サイトカインである CXCL-1 mRNA の発現も同様に有意に高かった。アドレノメデュリン、CRLR、RAMP-2 の発現は上皮細胞、間質細胞、筋肉に広く発現し、day2 ではアドレノメデュリン mRNA の発現は有意に高かった。CRLR、RAMP-2 mRNA の発現も高い傾向にあった。Adrenomedullin (22-52) peptide は濃度依存性にインドメタシン小腸潰瘍の形成を増悪させた。

【結論】本研究により、インドメタシンによる組織障害発症時には内因性アドレノメデュリンおよびその受容体の発現が増加し、内因性アドレノメデュリンの増加はインドメタシン小腸潰瘍形成に対し抑制的に働くことが示唆された。

緒言

非ステロイド性抗炎症薬 (Non-steroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs) は解熱、鎮痛および消炎を目的として広く一般臨床にて使用されている薬剤である。従来から NSAIDs による胃十二指腸潰瘍の発生は広く知られており、本邦の消化器病学会編集の消化性潰瘍診療ガイドライン¹⁾において、その予防および治療法について、プロトンポンプ阻害薬、プロスタグランジン製剤、高用量のヒスタミン受容体拮抗薬が推奨されている。また、近年、カプセル内視鏡・小腸内視鏡の普及により、胃十二指腸のみならず、NSAIDs は小腸にもびらん・潰瘍を形成することが報告されるようになり、原因不明の消化管出血 OGIB の原因として、NSAID 小腸潰瘍の占める割合が大きいことが判明した²⁾。また、本邦では OTC 医薬

品として NSAIDs が医療機関の受診なく容易に購入できることや、高齢化社会の到来に伴い、整形外科領域では関節リウマチや変形性関節症の患者の増加が見込まれることや、生活習慣病の増加に伴い、循環器科領域でも心筋梗塞などの加療後の再発予防としての抗血小板薬である低用量アスピリンの使用が増えていく現状に伴い、NSAIDs 起因性小腸潰瘍の頻度は増加していくものと考えられ、その治療および予防法の解明は重要な課題である。

NSAIDs 起因性小腸潰瘍の特徴は、高齢者に発症する頻度が高く、臨床症状として消化管出血や原因不明の貧血の原因となることがある。NSAIDs 潰瘍患者の NSAID の使用理由としては心血管系疾患、関節症および関節リウマチでの使用が高かった³⁾。カプセル内視鏡を用いた前向きな検討では、ボランティアによる急性病変の特徴として2週間のジクロフェナック投与による病変は68%に発症し、その病変は粘膜欠損や発赤などの軽微な病変が多いが、3か月以上 NSAIDs を

服用した患者でも同様に68%に病変が発症し、びらんのみならず潰瘍形成や膜様狭窄まで発症し、その中には潰瘍形成が少ないと考えられてきたCOX-2阻害薬の投与でも長期投与ではその50%に従来のNSAIDs同様に病変が発症するということが判明した⁴⁻⁶⁾。また、最近では心疾患治療後の再発防止のために抗血小板薬として低用量アスピリンの投与が推奨されているが低用量アスピリンによっても小腸潰瘍が形成されることが報告されている⁷⁾。現在までにNSAIDs小腸潰瘍の予防薬としてはボランティアに対するNSAIDs潰瘍の予防効果として、プロスタグランジン製剤であるミソプロストール⁸⁾と粘膜保護薬であるレバミピド⁹⁾およびゲラニルゲラニルアセトン¹⁰⁾の報告があるのみで十分な長期にわたる潰瘍予防効果についての報告はないのが現状である。

アドレノメデュリン(adrenomedullin)はヒト褐色細胞腫の細胞より単離された52アミノ残基よりなるペプチドで^{11, 12)}、その生理活性としては、血管・リンパ管の内皮細胞におけるタイトジャンクションの保護作用^{13, 14)}や敗血症時の血流保護作用¹⁵⁾およびマクロファージからの炎症性サイトカイン産生抑制作用¹⁶⁾など様々な機能を有することが報告されている。また、アドレノメデュリンのレセプターはGタンパク共役受容体であり、calcitonin receptor-like receptor (CRLR)とreceptor activity modifying protein (RAMP)-2, 3の複合体よりなる¹⁷⁾。

今回われわれはインドメタシン誘発ラット小腸潰瘍モデルを用い、小腸潰瘍形成過程におけるアドレノメデュリンおよびそのレセプターの発現および内因性アドレノメデュリンの作用機序につき検討した。

方法と材料

動物と試薬

実験動物としては8週齢、雄性、Sprague-Dawley (SD) ラット(日本クレア)を用いた。埼玉医科大学動物実験委員会の承認を得て施行した。インドメタシン(Sigma, JAPAN)は5%炭酸水素ナトリウムNaHCO₃(和光純薬工業株式会社)に溶解した。Adrenomedullin (22-52) peptideはAnaSpec (EGT Corporate Headquarters, CA, USA)より購入した。

インドメタシン小腸潰瘍の作成

健常コントロール群にはPBS溶液を、インドメタシン投与群にはインドメタシン容液10 mg/kgをday0, 1の2日間1日1回皮下投与しインドメタシン小腸潰瘍を作成した。

小腸潰瘍の経時的変化の評価

インドメタシンを投与後、day2, 4, 6にラットの尾静脈に1%エバンスブルー PBS溶液0.5 mLを投与し、

30分後にエーテル麻酔下に屠殺し、小腸を摘出した。小腸潰瘍の面積をNIHイメージ・アナライザーを用いて測定した。また、小腸粘膜の組織を採取するために、カバーガラスを用いて、粘膜を剥離したのち、ホモジナイザーにて組織をホモジナイズしたのち、QIAshredderRNeasy Mini Kit[®] (Qiagen, Inc., CA, USA)を用いてRNAを抽出した。

免疫組織化学的検討

摘出小腸をホルマリンで固定したのち、4 μmのパラフィン切片を作成し、免疫組織化学的検討はABC法を用いて検討した。一次抗体として、抗アドレノメデュリン抗体(polyclonal, rabbit IgG, Phoenix Pharmaceuticals, Inc., CA, USA)、抗RAMP-2抗体(C-21, monoclonal goat IgG, Santa Cruz Biotechnology, Inc., CA, USA)、抗Calcitonin receptor-like receptor, CRLR抗体(V-20, monoclonal goat IgG, Santa Cruz, Inc., CA, USA)、抗Myeloperoxidase (MPO)抗体(polyclonal rabbit IgG, Neo Markers, CA, USA)、抗CD4 (W3/25, monoclonal mouse IgG1, Serotec, Ltd., Oxford, UK)、抗CD8抗体(MRC OX-8, monoclonal mouse IgG1, Serotec, Ltd., Oxford, UK)を用いた。パラフィン切片を脱パラフィン化したのち、室温にて一次抗体と1時間反応させた。つぎにビオチン化goat anti-rabbitもしくはmouse anti-goat IgGと室温にて30分反応させた。発色にはstreptavidin-DABを用い、室温にて30分間反応させた。

Real-time PCR

1.5 μg RNAをsuperscript transcriptase (SuperScript[™] First-Strand Synthesis System for RT-PCR, Invitrogen Corp., CA, USA)を用いてcDNAに逆転写の後、アドレノメデュリン、CXCL-1、RAMP-2、CRLRの発現をTaqman ABI 7900H Sequence Detection System R (Applied Biosystems, Warrington, UK)を用いて測定した。また、内因性コントロールには18S rRNA (Applied Biosystems, Warrington, UK)を用いた。

アドレノメデュリン・アンタゴニストによるインドメタシン小腸潰瘍の変化

インドメタシン潰瘍形成過程における内因性アドレノメデュリンの作用を検討するために、アドレノメデュリン受容体・アンタゴニストのadrenomedullin (22-52) peptideを用いた¹⁸⁾。正常コントロール群(n = 10)、アドレノメデュリン・アンタゴニスト(ADM antagonist)投与群(n = 10)、インドメタシン(indometacin)投与群(n = 10)、インドメタシン+アドレノメデュリン・アンタゴニスト(indometacin + ADM antagonist)投与群(n = 10)の4群に分けて検討を行った。Adrenomedullin (22-52) peptideはPBS

溶液に溶解して使用した。正常コントロール群にはインドメタシン、アドレノメデュリン・アンタゴニストの溶媒であるリン酸緩衝液、PBS溶液をそれぞれ1日1回皮下および1日2回腹腔内投与した。インドメタシンの投与方法は同様にday0, 1に1日1回皮下に10 mg/kgにて投与した。アドレノメデュリン・アンタゴニストはday0, 1に1日2回腹腔内投与した。第2・4・6病日にラットの尾静脈に1%エバンスブルー PBS溶液0.5 mLを投与し、30分後にエーテル麻酔下に屠殺し、小腸を摘出した。小腸潰瘍の面積をNIH イメージ・アナライザーを用いて測定した。また、1%エバンスブルー PBSを尾静脈に注入後のラットではRNAの採取率が悪いため、別に実験を行ってRNAの採取を行った。具体的には小腸粘膜の組織を採取するために、カバーガラスを用いて、粘膜を剥離したのち、ホモジナイザーにて組織をホモジナイズしたのち、QIAshredderRNeasyMini Kit® (Qiagen, Inc., CA, USA)を用いてRNAを抽出した。

統計学的処理

潰瘍面積およびreal time-PCRによるmRNAの発現量の比較検討はノン・パラメトリカルなデータ解析であるため、Kruskal-Wallis test およびScheffe testを用いた。P < 0.05の場合に統計学的に有意とした(平均±標準誤差)。

結 果

インドメタシン小腸潰瘍の特徴

図1Aに示すようにインドメタシンの皮下投与により小腸の腸管膜付着側にエバンスブルー色素の染み出しを伴い青く染まった潰瘍形成が認められた。潰瘍の分布は小腸全体に認められたが、潰瘍の数は口側よりも肛門側の方向に多く認めた。H&E染色の弱拡大像(図1B)では上皮細胞の欠損および腸管全層に及ぶ炎症を伴う潰瘍形成を認めた。特に粘膜から粘膜下層に強く炎症細胞浸潤する像が認められた(図1C)。また、H&E染色の拡大像(図1D)では炎症細胞浸潤は多核白血球を主体とした急性炎症細胞浸潤であることが分かった。

インドメタシン小腸潰瘍の免疫組織学的検討

小腸潰瘍の浸潤細胞の種類を検討するために、抗MPO, CD4, CD8抗体を用いてday2の小腸潰瘍部分の免疫染色を行ったところ、浸潤細胞はHE染色でも確認したようにMPO陽性の浸潤細胞が主体でCD4, CD8陽性のリンパ球の浸潤が少ないことより、この炎症は急性炎症モデルであることが判明した(図2)。

アドレノメデュリンの発現に関して、図3に示すようにコントロールラットの上皮細胞、間質細胞および固有筋層に恒常的にアドレノメデュリンの発現を認めた。上皮細胞における発現は絨毛の基底部より

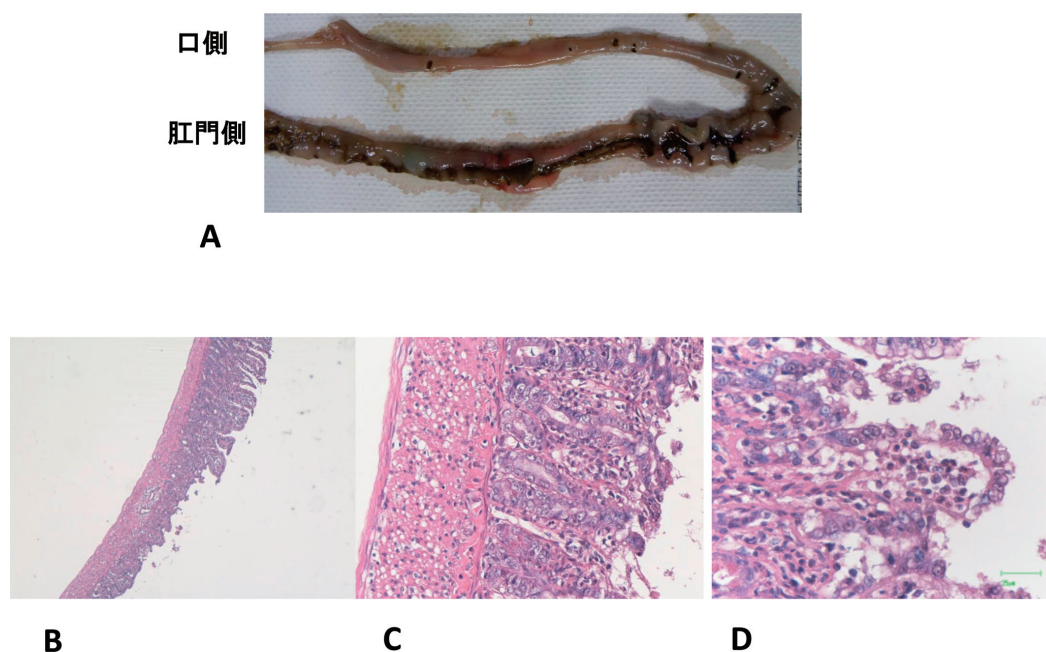


図1. インドメタシン小腸潰瘍 (day 2) の肉眼所見およびHE染色。A: 肉眼所見, B: HE染色像(弱拡大, 4X), C: HE染色像(中等度拡大, 20X), D: HE染色像(強拡大, 40X)

管腔側に向かうにつれてその発現は増加する傾向にあった。また、インドメタシン小腸潰瘍では、上皮細胞および筋層におけるアドレノメデュリンの発現の増加を認めた(図3C)。つぎにアドレノメデュリンのレセプターの発現について、RAMP-2の発現はアドレノメデュリンと同様にコントロールラットの上皮細胞および固有筋層に認められた。上皮細胞におけるRAMP-2の発現はアドレノメデュリンと同様に絨毛の基底部より管腔側に向かうにつれてその発現は増加する傾向にあった(図4B)。また、インドメタシン投与

により、上皮細胞および固有筋層におけるアドレノメデュリンのレセプターであるRAMP-2の発現も増加した(図4C)。また、もう一つのレセプターを構成するCRLRは上皮細胞に強く発現するが固有筋層には発現は少なかった。上皮細胞におけるCRLRの発現はアドレノメデュリン、RAMP-2と同様に絨毛の基底部より管腔側に向かうにつれてその発現は増加する傾向にあった。また、インドメタシン投与により上皮細胞におけるCRLRの発現の増加が認められたが、筋層におけるCRLRの増加は少なかった(図4E)。

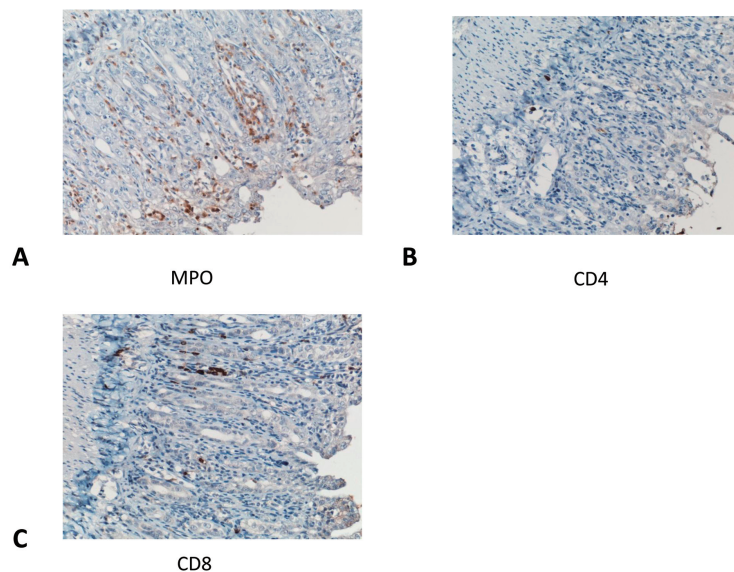


図2. インドメタシン小腸潰瘍(day 2)の浸潤細胞の免疫組織学的検討。A：抗MPO抗体による免疫染色，B：抗CD4抗体による免疫染色，C：抗CD8抗体による免疫染色。

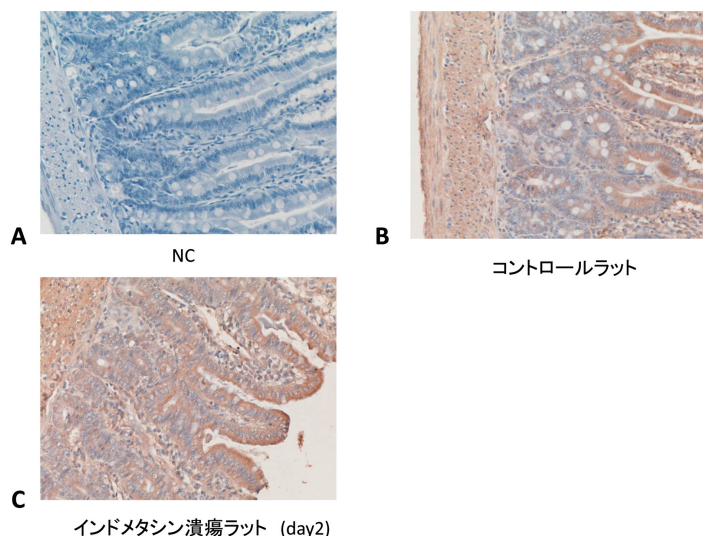


図3. 抗アドレノメデュリン抗体による免疫組織学的検討。A：陰性コントロール(一次抗体無)，B：コントロールラット(20X)，C：インドメタシン小腸潰瘍(day 2)(20x)。

インドメタシン小腸潰瘍の経時的変化

インドメタシン投与後の小腸の潰瘍面積の変化について、図5に示すように、Day2における潰瘍面積 ($151 \pm 27.5 \text{ mm}^2$) はコントロール ($0 \pm 0 \text{ mm}^2$)、day4 ($55.6 \pm 9.5 \text{ mm}^2$)、day6 ($21.7 \pm 5.8 \text{ mm}^2$) における潰瘍面積に比べて優位に高く、小腸潰瘍の形成はday2が最も強いということが分かった ($p < 0.01$)。同様に急性炎症のマーカーであるCXCL1 mRNAの発現もコントロール、day4、6に比べday2が有意にその発現が大きかった(図6)。

インドメタシン小腸潰瘍形成におけるアドレノメデュリンとそのレセプターの発現

つぎに粘膜におけるアドレノメデュリンおよびアドレノメデュリン・レセプターであるRAMP-2, CRLR mRNAの発現についても検討した。CXCL-1 mRNAの発現と同様にアドレノメデュリンの発現は、day2における発現がコントロールおよびday4、6における発現に比べて有意に高かった(図7)。同様にアドレノメデュリン・レセプターであるRAMP-2 mRNA, CRLR mRNAの発現について検討したところ、アドレノメ

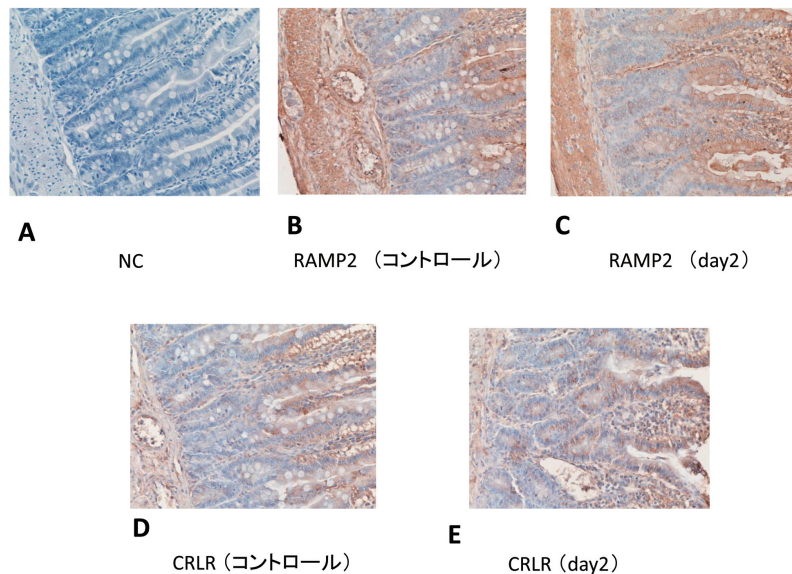


図4. 抗RAMP2, CRLR抗体による免疫組織学的検討。A：陰性コントロール(一次抗体無)，B：コントロールラット(抗RAMP-2抗体，20X)，C：インドメタシン小腸潰瘍(day 2)(抗RAMP-2抗体，20x)，D：コントロールラット(抗CRLR抗体，20X)，E：インドメタシン小腸潰瘍(day 2)(抗CRLR抗体，20x)。

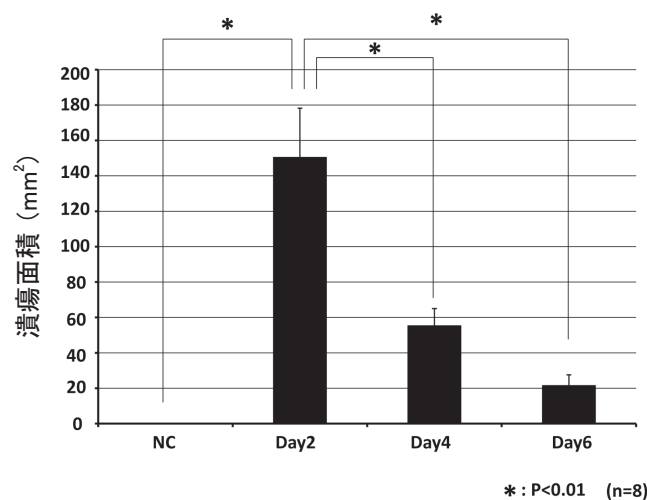


図5. インドメタシン小腸潰瘍の潰瘍面積の経時的変化(平均±標準誤差, $n = 8$, $p < 0.05$)。

デュリンmRNAの発現と同様にday2における発現が大きい傾向にあった(図8)。

アドレノメデュリン・アンタゴニストによるインドメタシン小腸潰瘍の変化

インドメタシン小腸潰瘍形成過程における内因性アドレノメデュリンの作用機序を検討するために、小腸潰瘍面積が有意に大きくなるday2における潰瘍面積にて比較した。図9に示すようにコントロールに対し、アドレノメデュリン・アンタゴニストのみの1回投与量2 mg/kgの2日間腹腔内投与では潰瘍は形成されず、アンタゴニスト自体ではコントロール群に対する障害性が無いことが確認できた。インドメタシン投与群に対し、インドメタシンとアドレノメデュリン・アンタゴニストを三段階

の濃度で投与した結果、インドメタシン単独群、インドメタシン+アドレノメデュリン・アンタゴニスト0.02 mg/kg群、0.2 mg/kg群、2 mg/kg群ではそれぞれ $38.9 \pm 4.42 \text{ mm}^2$, $94.6 \pm 6.03 \text{ mm}^2$, $119 \pm 18.7 \text{ mm}^2$, $125 \pm 34.4 \text{ mm}^2$ とアドレノメデュリン・アンタゴニストは濃度依存的にインドメタシンの潰瘍形成作用を増強させた(インドメタシン単独群vsインドメタシン+アドレノメデュリン・アンタゴニスト2 mg/kg群, $p < 0.05$)。また、急性炎症の評価としてインドメタシン単独群とインドメタシン+アドレノメデュリン・アンタゴニスト2 mg/kg群では有意差をもってインドメタシン+アドレノメデュリン・アンタゴニスト2 mg/kg群の方がCXCL-1 mRNAの発現が強かった(図10)。

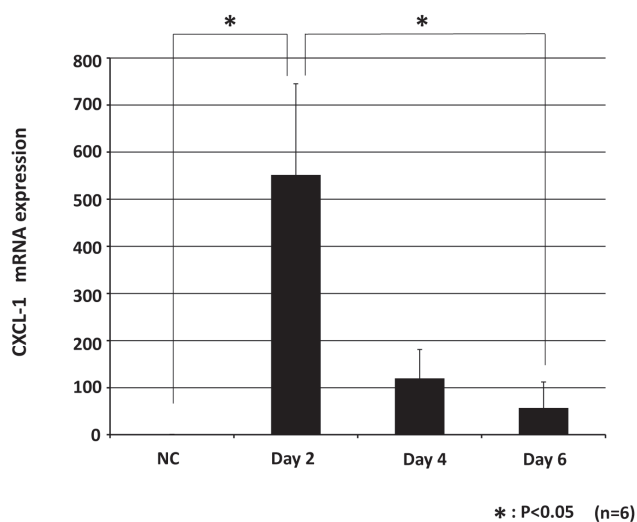


図6. インドメタシン投与小腸粘膜におけるCXCL-1 mRNAの発現の経時的変化(平均±標準誤差, n = 6, * $p < 0.05$).

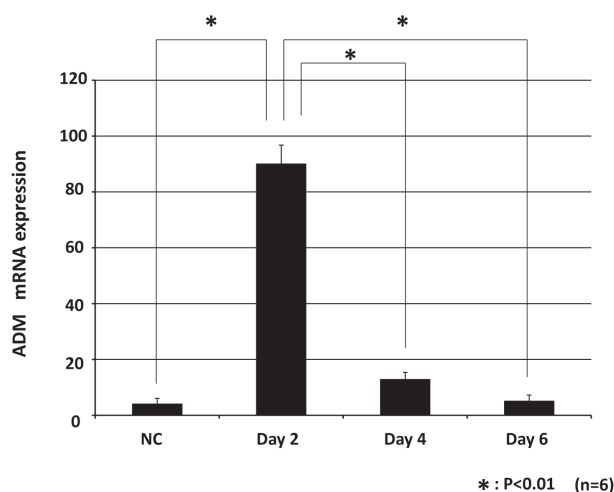


図7. インドメタシン投与小腸粘膜におけるアドレノメデュリン mRNAの発現の経時的変化(平均±標準誤差, n = 6, * $p < 0.05$).

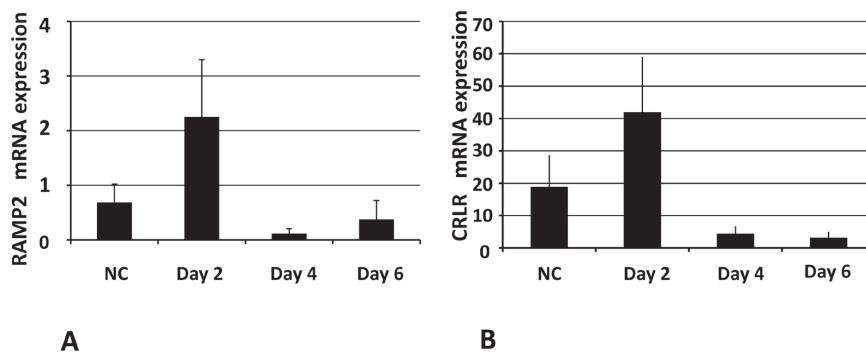


図 8. インドメタシン投与小腸粘膜におけるアドレノメデュリン受容体 mRNA の発現の経時的変化. A : RAMP-2, B : CRLR (平均±標準誤差, n = 6).

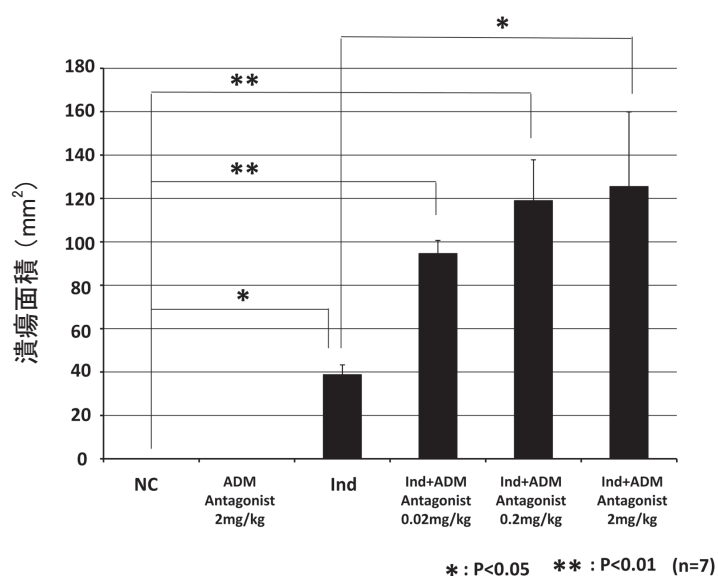


図 9. インドメタシン小腸潰瘍潰瘍面積におよぼすアドレノメデュリン・アンタゴニストの濃度依存的影響についての検討. (平均±標準誤差, n = 7, *p < 0.05, **p < 0.01).

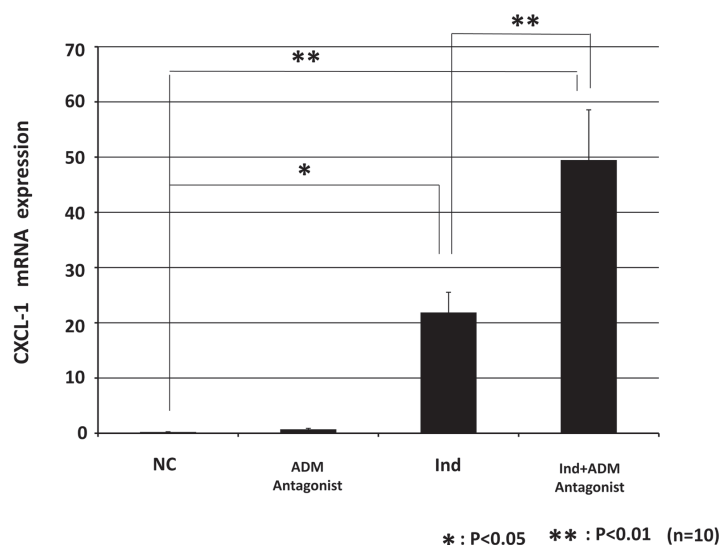


図 10. インドメタシン投与小腸粘膜の CXCL-1 mRNA 発現量におよぼすアドレノメデュリン・アンタゴニストの影響についての検討. (平均±標準誤差, n = 7, *p < 0.05, **p < 0.01).

考 察

本研究の結果、インドメタシン小腸潰瘍形成過程において、内因性アドレノメデュリンの腸管における増加が小腸潰瘍に対し保護的に作用するとともに、腸管粘膜におけるアドレノメデュリン受容体であるRAMP-2, CRLRの発現も同様に増加することが判明した。

インドメタシン小腸潰瘍形成ではインドメタシンの連日2日間の皮下投与にて、day2が最も小腸潰瘍形成面積が有意に大きくなることが判明した。今回、われわれはインドメタシンの投与を2日間連日で1日1回皮下投与にて作成した理由として、インドメタシン小腸潰瘍モデル作成において、1日1回投与では個体間の潰瘍形成のばらつきが大きくなるためより再現性の良い安定したモデルを作成のために行ったものである。ラットインドメタシン小腸の特徴として、潰瘍は小腸全長の正中より口側から肛門側に至るまで形成されており、潰瘍の個数と大きさは肛門側に近づくにつれて増大する傾向であった。実際にヒトのNSAIDs小腸潰瘍の特徴として、カプセル内視鏡やバルーン小腸内視鏡を用いた検討ではさまざまな病変が混在するのが特徴で、発赤、びらん、小潰瘍、膜様狭窄などの所見を呈し、穿孔や消化管出血を生じることがある^{3,4,19)}。ヒトNSAIDs潰瘍の分布としては粘膜欠損などの小病変は近位小腸に多く、びらん小腸全般に生じ、潰瘍は回腸側に多く発生することから、今回の研究で用いたインドメタシン小腸潰瘍モデルはヒトのNSAIDs潰瘍に類似した特徴を示すモデルであることが分かった²⁰⁾。また炎症部位の浸潤細胞の検討からはCD4, CD8陽性リンパ球の浸潤は少なく、MPO陽性細胞の浸潤が主体であり、インドメタシン小腸潰瘍モデルの特徴は急性炎症による潰瘍形成であることがわかった。そこでラットの好中球遊走因子であるCXCL-1 mRNAの発現についても検討したところ、潰瘍形成変化と同様にCXCL-1 mRNAの発現はday2が有意に大きくなることが判明した。

つぎにアドレノメデュリンおよびそのレセプターであるRAMP-2, CRLRの免疫染色による検討において、アドレノメデュリンおよびそのレセプターは上皮細胞、間質の細胞および筋肉にも広く広範囲に恒常的に発現していた。このことから産生されたアドレノメデュリンは、オートクライン・パラクライン的に作用するものと考えられた。また、今回のインドメタシン小腸潰瘍モデルにおいて障害部位は粘膜から粘膜下層までの炎症性変化が主体であることから、筋層の影響をできるだけ除去した評価を行うために、プレパラートをを用いて粘膜より粘膜下層までの組織を剥離回収して実験を施行した。アドレノメデュリンmRNAの発現は潰瘍形成が有意に大きくなるday2において、有意に発現の増加を認めた。RAMP-2, CRLRの発現

も同様にday2で大きくなる傾向を示した。アドレノメデュリンの発現について、血管平滑筋細胞²¹⁾、血管内皮細胞²²⁾、繊維芽細胞²³⁾、気管支上皮、網膜色素上皮、尿管上皮、乳腺上皮細胞、前立腺上皮、腸管上皮細胞などの上皮細胞²⁴⁻²⁹⁾や神経・グリア細胞^{30,31)}などのさまざまな種類の細胞より分泌されることが報告されている。また炎症細胞のうちマクロファージは好中球やリンパ球に比較してアドレノメデュリンを強く発現しており、またLPS刺激によりマクロファージからのアドレノメデュリンの分泌が増加するとの報告もあることから、炎症によりアドレノメデュリンの発現が増加する原因として、炎症細胞からのアドレノメデュリンの供給が一つの理由として考えられる^{32,33)}。血管内皮細胞、繊維芽細胞およびマクロファージに対するアドレノメデュリンの産生促進物質としては炎症部位で発現の増加するIL-1, TNF α などの炎症性サイトカインやLPSが報告されている³⁴⁾。アドレノメデュリン・レセプターであるRAMP-2, CRLRの発現は血管内皮細胞での発現の報告³⁵⁾は認められるが、小腸での発現はmRNAレベルでの報告³⁶⁾のみで、免疫組織学的検討は本研究が初めての報告である。今回の検討ではRAMP-2, CRLRともに上皮細胞、筋肉および間質の細胞に発現を認め、アドレノメデュリンの発現とほぼ同じ分布を示しており、アドレノメデュリンとの密接な関係が示唆された。

アドレノメデュリンでの抗炎症作用に関して、酢酸潰瘍モデルとTNBS大腸炎モデルを用いた検討では、いずれの報告も粘膜障害および炎症性サイトカインであるTNF α , IFN γ , IL-6の発現が抑制されたとの報告である³⁷⁻³⁹⁾。その腸炎抑制メカニズムとしてDSS大腸炎モデルを用いた検討では注腸によるアドレノメデュリン投与により大腸炎が抑制され、そのメカニズムとして腸管上皮細胞におけるSTAT1とSTAT3のリン酸化の抑制と上皮細胞のタイトジャンクションの保護作用を挙げている⁴⁰⁾。インドメタシン小腸潰瘍モデルでのアドレノメデュリンの炎症抑制作用はいままでに報告がなく、われわれの検討が初めての報告である。今回の検討ではインドメタシンによる侵害刺激に対し、増加する内因性のアドレノメデュリンの作用をアドレノメデュリン拮抗薬であるAdrenomedullin (22-52) peptideを用い検討したものであり、内因性のアドレノメデュリンは抗炎症的に作用することが判明した。現在までにアドレノメデュリンのヒトへの投与に関する報告は潰瘍性大腸炎に対する報告がなされているのみであり、アドレノメデュリンの今後の臨床応用が期待される⁴¹⁾。

今後、患者の増加が予測されるNSAIDs小腸潰瘍に対する有効な治療法は確立されておらず、今後の創薬の観点からもアドレノメデュリンはNSAIDs小腸潰瘍治療に重要な因子となるものと考えられた。しかし、

臨床的な観点からは発症したNSAIDs小腸潰瘍はNSAIDs内服中止や禁飲食による加療にて自然治癒が望めるため、創薬の目標としては予防薬の確立が重要になるものと考えられる。この点からも内因性のアドレノメデュリンを増加させる薬剤の予防的投与の開発がNSAIDs小腸潰瘍の予防薬となる可能性が本研究より示唆された。

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加藤真吾准教授・屋嘉比康治教授に心より感謝いたします。

References

- 1) 日本消化器病学会編. 日本消化器病学会ガイドライン消化性潰瘍ガイドライン. 南江堂; 2009.
- 2) Higuchi K, Umegaki E, Watanabe T, Yoda Y, Morita E, Murano M, Tokioka S, Arakawa T. Present status and strategy of NSAID-induced small bowel injury. *J Gastroenterol* 2009;44:879-88.
- 3) Matsumoto T, Kudo T, Esaki M, Yano T, Yamamoto H, Sakamoto C, Goto H, Nakase H, Tanaka S, Matsui T, Sugano K, Iida M. Prevalence of non-steroidal anti-inflammatory drug-induced enteropathy determined by double-balloon enteroscopy: a Japanese multicenter study. *Scand J Gastroenterology* 2008;43:490-6.
- 4) Maiden L. Capsule endoscopic diagnosis of nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced enteropathy. *J Gastroenterology* 2009;44:64-71.
- 5) Maiden L, Thjodleifsson B, Theodors A, Gonzalez J, Bjarnason I. A quantitative analysis of NSAID-induced small bowel pathology by capsule enteroscopy. *Gastroenterology* 2005 May;128(5):1172-8.
- 6) Maiden L, Thjodleifsson B, Seigal A, Bjarnason II, Scott D, Birgisson S, Bjarnason I. Long-term effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs and cyclooxygenase-2 selective agents on the small bowel: a cross-sectional capsule enteroscopy study. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2007;5(9):1040-5.
- 7) Watanabe T, Sugimori S, Kameda N, Machida H, Okazaki H, Tanigawa T, Watanabe K, Tominaga K, Fujiwara Y, Oshitani N, Higuchi K, Arakawa T. Small bowel injury by low-dose enteric-coated aspirin and treatment with misoprostol: a pilot study. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2008;6(11):1279-82.
- 8) Fujimori S, Seo T, Gudis K, Ehara A, Kobayashi T, Mitsui K, Yonezawa M, Tanaka S, Tatsuguchi A, Sakamoto C. Prevention of nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced small-intestinal injury by prostaglandin: a pilot randomized controlled trial evaluated by capsule endoscopy. *Gastrointest Endosc* 2009;69(7):1339-46.
- 9) Niwa Y, Nakamura M, Ohmiya N, Maeda O, Ando T, Itoh A, Hirooka Y, Goto H. Efficacy of rebamipide for diclofenac-induced small-intestinal mucosal injuries in healthy subjects: a prospective, randomized, double-blinded, placebo-controlled, cross-over study. *J Gastroenterol* 2008;43(4):270-6.
- 10) Yanaka A, Zhang S, Sato D, Tauchi M, Suzuki H, Shibahara T, Matsui H, Nakahara A, Hyodo I. Geranylgeranylacetone protects the human gastric mucosa from diclofenac-induced injury via induction of heat shock protein 70. *Digestion* 2007;75(2-3):148-55.
- 11) Kitamura K, Kangawa K, Kawamoto M, Ichiki Y, Nakamura S, Matsuo H, Eto T. Adrenomedullin: a novel hypotensive peptide isolated from human pheochromocytoma. *Biochem Biophys Res Commun* 1993;192:553-60.
- 12) Kitamura K, Sakata J, Kangawa K, Kojima M, Matsuo H, Eto T. Cloning and characterization of cDNA encoding a precursor for human adrenomedullin. *Biochem Biophys Res Commun* 1993;194:720-5.
- 13) Honda M, Nakagawa S, Hayashi K, Kitagawa N, Tsutsumi K, Nagata I, Niwa M. Adrenomedullin improves the blood-brain barrier function through the expression of claudin-5. *Cell Mol Neurobiol* 2006 Mar;26(2):109-18.
- 14) Dunworth WP, Fritz-Six KL, Caron KM. Adrenomedullin stabilizes the lymphatic endothelial barrier in vitro and in vivo. *Peptides* 2008 Dec;29(12):2243-9.
- 15) Brain SD, Grant AD. Vascular actions of calcitonin gene-related peptide and adrenomedullin. *Physiol Rev* 2004 Jul;84(3):903-34.
- 16) Kamoi H, Kanazawa H, Hirata K, Kurihara N, Yano Y, Otani S. Adrenomedullin inhibits the secretion of cytokine-induced neutrophil chemoattractant, a member of the interleukin-8 family, from rat alveolar macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 1995 Jun 26;211(3):1031-5.
- 17) McLatchie LM, Fraser NJ, Main MJ, Wise A, Brown J, Thompson N, Solari R, Lee MG, Foord SM. RAMPs regulate the transport and ligand specificity of the calcitonin-receptor-like receptor. *Nature* 1998 May 28;393(6683):333-9.

- 18) Kono T, Kaneko A, Hira Y, Suzuki T, Chisato N, Ohtake N, Miura N, Watanabe T. Anti-colitis and-adhesion effects of daikenchuto via endogenous adrenomedullin enhancement in Crohn's disease mouse model. *J Crohns Colitis* 2010 Jun;4(2):161-70.
- 19) Fujimori S, Takahashi Y, Seo T, Gudis K, Ehara A, Kobayashi T, Mitsui K, Yonezawa M, Tanaka S, Tatsuguchi A, Sakamoto C. Prevention of traditional NSAID-induced small intestinal injury: recent preliminary studies using capsule endoscopy. *Digestion* 2010;82:167-72.
- 20) Fujimori S, Gudis K, Takahashi Y, Seo T, Yamada Y, Ehara A, Kobayashi T, Mitsui K, Yonezawa M, Tanaka S, Tatsuguchi A, Sakamoto C. Distribution of small intestinal mucosal injuries as a result of NSAID administration. *Eur J Clin Invest* 2010;40(6):504-10.
- 21) Sugo S, Minamino N, Shoji H, Kanagawa K, Kitamura K, Eto T, Mastuo H. Production and secretion of adrenomedullin from vascular smooth muscle cells: augmented production by tumor necrosis factor-alpha. *Biochem Biophys Res Commun* 1994;207:25-32.
- 22) Sugo S, Minamino N, Kanagawa K, Miyamoto K, Kitamura K, Sakata J, Eto T, Matsuo H. Endothelial cells actively synthesize and secrete adrenomedullin. *Biochem Biophys Res Commun* 1994;201:1160-6.
- 23) Isumi Y, Minamino N, Katafuchi T, Yoshioka M, Tsuji T, Kanagawa K, Mastuo H. Adrenomedullin production in fibroblasts: its possible function as a growth regulator of Swiss 3T3 cells. *Endocrinology* 1998;139:2552-63.
- 24) Martinez A, Miller MJ, Unsworth EJ, Siegfried JM, Cuttitta F. Expression of adrenomedullin in normal human lung and in pulmonary tumors. *Endocrinology* 1995;136:4099-105.
- 25) Uono T, Takahashi K, Nakayama M, Murakami O, Durlu YK, Tamai M, Shibahara S. Adrenomedullin in cultured human retinal pigment epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41:1962-70.
- 26) Nishimura J, Seguchi H, Sakihara C, Kureishi Y, Yoshimura H, Kobayashi S, Kanaide H. The relaxant effect of adrenomedullin on particular smooth muscles despite a general expression of its mRNA in smooth muscle, endothelial and epithelial cells. *Br J Pharmacol* 1997;120:193-200.
- 27) Jahnke GD, Miller MJ, Martinez A, Montuenga L, Cuttitta F. Adrenomedullin expression in the mouse mammary gland: evidence for the mature form in milk. *J Mol Endocrinol* 1997;19:279-89.
- 28) Pewitt EB, Haleem R, Wang Z. Adrenomedullin gene is abundant expressed and directly regulated by androgen in the rat ventral prostate. *Endocrinology* 1999;140:2382-6.
- 29) Kishikawa H, Nishida J, Ichikawa H, Kaida S, Morishita T, Miura S, Hibi T. Lipopolysaccharides stimulate adrenomedullin synthesis in intestinal epithelial cells: release kinetics and secretion polarity. *Peptides* 2009;30:906-12.
- 30) Serrano J, Uttenthal LO, Martinez A, Fernandez AP, Martinez de Velasco J, Alonso D, Bentura ML, Santacana M, Gallardo JR, Martinez-Murillo R, Cuttitta F, Rodrigo J. Distribution of adrenomedullin-like immunoreactivity in the rat central nervous system by light and electron microscopy. *Brain Res* 2000;853:245-68.
- 31) Takahashi K, Nakayama M, Totsune K, Murakami O, Sone M, Kitamuro T, Yoshinoya A, Shibahara S. Increased secretion of adrenomedullin from cultured human astrocytes by cytokines. *J Neurochem* 2000;74:99-103.
- 32) Kubo A, Minomino N, Isumi Y, Kanagawa K, Dohi K, Matsuo H. Adrenomedullin production is correlated with differentiation in human leukemia cell lines and peripheral blood monocytes. *FEBS Lett* 1998;426:233-7.
- 33) Nakayama M, Takahashi K, Murakami O, Murakami H, Sasano H, Shirato K, Shibahara S. Adrenomedullin in monocytes and macrophages: possible involvement of macrophage-derived adrenomedullin in atherogenesis. *Clin Sci (Colch)* 1999;97(2):247-51.
- 34) Minamino N, Kikumoto K, Isumi Y. regulation of adrenomedullin expression and release. *Microsc Res Tech* 2002;57:28-39.
- 35) Oliver KR, Wainwright A, Edvinsson L, Pickard JD, Hill RG. Immunohistochemical localization of calcitonin receptor-like receptor and receptor activity-modifying proteins in the human cerebral vasculature. *J Cereb Blood Flow Metab* 2002;22(5):620-9.
- 36) Suzuki N, Sekiguchi T, Satake H, Kato K, Nishiyama Y, Takahashi H, Danks JA, Martin TJ, Hattori A, Nakano M, Kakikawa M, Yamada S, Ogoshi M, Hyodo S, Yamaguchi Y, Chowdhury VS, Hayakawa K, Funahashi H, Sakamoto T, Sasayama Y. Cloning of two members of the calcitonin-family receptors from stingray, *Dasyatis akajei*: possible physiological roles of the calcitonin family in osmoregulation. *Gene* 2012;15:499(2):326-31.

- 37) Ashizuka S, Ichikawa N, Kato J, Yamaga J, Inatsu H, Eto T, Kitamura K. Effect of adrenomedullin administration on acetic acid-induced colitis in rats. *Peptides* 2005;26:2610-5.
- 38) Gonzalez-Rey E, Fernandez-Martin A, Chorny A, Delgado M. Therapeutic effect of urocortin and adrenomedullin in a murine model of Crohn's disease. *Gut* 2006 Jun;55(6):824-32.
- 39) Talero E, Sánchez-Fidalgo S, de la Lastra CA, Illanes M, Calvo JR, Motilva V. Acute and chronic responses associated with adrenomedullin administration in experimental colitis. *Peptides* 2008 Nov;29(11):2001-12.
- 40) Ashizuka S, Inagaki-Ohara K, Kuwasako K, Kato J, Inatsu H, Kitamura K. Adrenomedullin treatment reduces intestinal inflammation and maintains epithelial barrier function in mice administered dextran sulphate sodium. *Microbiol Immunol.* 2009;53(10):573-8.
- 41) Ashizuka S, Kita T, Inatsu H, Kitamura K. Adrenomedullin: A novel therapy for intractable ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2012.