

Thesis

アペリン-12の胃酸分泌とヒスタミン分泌増加作用に関する研究 —ラット胃内腔及び血管灌流単離胃を用いた検討—

臨床医学研究系 内科学 消化器・肝臓内科

大野 志乃

背景: アペリンはウシの胃から抽出、分離されたペプチドであり、オーファン受容体APJに対する内因子リガンドとして発見された。アペリンとAPJレセプターは全身に広く分布している。アペリンは心血管系など多数の臓器の調節因子として重要な役割を担っていると推測されるが、アペリンの作用は十分に解明されていない。この研究は胃酸分泌におけるアペリンの作用を明らかにし、その作用のメカニズムの一部を解明した。

方法: 胃内腔灌流ラットを作成し、蠕動ポンプを使用し胃に生理食塩水を灌流させた。アペリン-12、-13または-36の胃酸分泌への作用を検討するためにラットへ静脈投与を行った。さらにヒスタミン及び迷走神経の関与を明らかにするためアペリン投与15分前に前投薬としてファモチジン(0.33 mg/kg)、5分前に硫酸アトロピン(0.1 mg/kg)静脈投与が施行された。またヒスタミン分泌に対するアペリンの作用を検討するために単離血管灌流ラット胃を作成した。灌流液中のヒスタミンはラジオイムノアッセイ(RIA)により測定した。単離胃の胃粘膜中のヒスチジンデカルボキシラーゼ(HDC)mRNAはreal time RT-PCRにより測定した。

結果: アペリン-12(20–100 µg/kg)は用量依存性に胃酸分泌を増加させた。1) アペリン-12(100 µg/kg)は胃酸分泌を203%まで増加させた。2) アペリン-13と-36では酸分泌の増加は認められなかった。3) ファモチジンはアペリンの酸分泌刺激作用を完全に抑制した。4) アペリン-12(100 µg/20 ml/10 min)は単離血管灌流ラット胃で278%のヒスタミン分泌増加を認めた。またアペリン-12は単離血管灌流ラット胃においてHDCmRNAをコントロールと比較して480%まで増加させた。硫酸アトロピンは胃酸分泌においてアペリンの作用を抑制しなかった。アペリン-12はガストリン投与による酸分泌刺激の増加を増幅した。

結論: この結果はアペリン-12が胃酸分泌刺激を増加させその機序にヒスタミン分泌と合成の増加を介していることを示しており、アペリンが胃酸分泌に関与していること、あるいは胃酸分泌の調節因子のひとつであることを示唆しているものと思われる。

緒 言

アペリンはヒトのオーファン(orphan)受容体APJの内因子リガンドとして近年ウシの胃から抽出、分離されたペプチドである¹⁾。APJレセプターは1993年にG蛋白質共役型受容体として最初に発見された²⁾。APJレセプターは血管内皮、心筋、血管平滑筋^{3,4)}、脂肪組織⁴⁾、脳⁵⁾などの組織に広範囲に分布している。アペリンが胃のみならず全身に広く分布していることが1993年に知られるまで、APJレセプターはオーファン受容体として認識されていた。アペリン前駆体mRNAはヒトの中樞神経、副腎、精管、腎臓、心臓、脾臓、肝臓

医学博士 甲第1166号 平成23年3月25日(埼玉医科大学)

といった多くの臓器に分布している^{6,7)}。アペリン-17を免疫し作成された抗アペリン抗体による免疫組織学研究では、アペリン様の免疫反応は腸間膜の微小動脈内皮、大網、心臓、肺、胃、小腸、脾臓、膵臓と腎臓で発見されている⁸⁾。アペリン様の免疫反応は、胃壁でも発見されている。免疫酵素法による分析ではヒトでのアペリンの循環血中濃度は3-4 ng/mlの間と推定される⁹⁾。今日アペリン-APJシステムはそれらの組織における病態生理学的な変化と関連があると推定されている。近年、アペリンは血管拡張など生物学的な作用があることが明らかにされている¹⁰⁾。ラットでの経静脈的投与は平均動脈圧¹¹⁾、全身の血管緊張性¹²⁾を減弱する。またアペリンには投与時に冠動脈の血管拡張作用

と末梢血管の抵抗性低下作用があることが証明されている¹⁰⁾。これらの研究を通じて、アペリンは循環調整に生理学的な役割を持つと推測されている¹³⁾。一方、消化管においてはアペリンが広く分布していることが証明されているが、アペリンの消化管における作用は十分に明らかにされていない。Wangによると、アペリンはマウス腸内分泌細胞STC-1からのCCK分泌を刺激するとされている¹⁴⁾。免疫組織学的研究ではアペリン様の免疫反応は胃壁、特に酸分泌粘膜で示されているが⁸⁾、アペリン陽性細胞は表層粘膜と胃底腺頸部の粘液細胞と酸分泌細胞であることが示されている⁸⁾。これらの結果によりアペリンは胃粘膜機能への作用、とくに胃酸分泌作用をもっていることを推測することができる。本研究では、我々はラット胃粘膜からの胃酸とヒスタミンの分泌におけるアペリンの作用を明らかにし、さらにアペリンの異なる分子型における酸分泌作用の相違を比較することを試みた。

材料と方法

1. 胃内腔灌流ラットの外科的処置と、実験の手順

既報¹⁵⁾で述べた方法により、体重180–220 gの雄のWisterラット（三協ラボサービス株式会社；東京、日本）を一晩絶食させ、ウレタン溶液（37% wt/vol）を0.34 ml/100 gb.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。気管を切開し、カニユーレを挿入し、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、チューブの先端は胃の管腔部に設置した。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。胃の管腔部は灌流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（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）を使用し、速度 1 ± 0.1 ml/min、37℃の生理食塩水で灌流した。灌流液を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。

2. 酸分泌量の測定

酸分泌量は15分または60分あたりの $H^+ \mu Eq$ として表した。アペリンによる酸分泌はアペリン-12、13と36（アペリン-12は群馬大学 生体調節研究所 立元一彦教授より供与、アペリン-13とアペリン-36はPeptide Institute, INC. 大阪 日本より購入）20 $\mu g/kg$ を胃内腔灌流開始から1時間後に静脈内投与、その後の灌流液の酸を測定した。アペリン-12の用量依存作用を調べるために、アペリン-12は4, 20, 100 $\mu g/kg$ を胃内腔灌流開始から1時間後に投与した。アペリン-13、-36も100 $\mu g/kg$ 静脈内投与し、それらの胃酸分泌に対する作用を検討した。

アペリン刺激による胃酸分泌におけるヒスタミンの役割を調べるためにファモチジン（0.33 mg/kg、アステラス製薬 東京 日本）をアペリン投与15分前に胃内腔灌流ラットに静脈内投与した。胃内腔の灌流液は15分ごとに採取し、酸滴定を行った。アペリン刺激による胃酸分泌での迷走神経の関与を評価するために、硫酸アトロピン（0.1 mg/kg, Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA）をアペリン投与5分前に投与した。アペリン投与後、胃内腔の排出液を15分間隔で採取し、酸滴定を行った。また、ガストリンとの相互作用を検討するためにhuman gastrin-17（Peptide Institute）を 10^{-9} mol/kg/hrにて持続投与を行ない、持続投与開始後2時間目にアペリン-12 100 $\mu g/kg$ を投与して酸分泌量を測定した。

3. アペリン-12 のヒスタミン分泌に対する作用についての実験—単離血管灌流ラット胃作成の外科的処置と実験の手順

完全に単離した、単離血管灌流ラット胃は既報¹⁶⁾で述べられた方法に基づき処置された。ラットはフェノバルビタール（40 mg/kg, Abbott Laboratories, North Chicago, IL, USA）の腹腔内投与で麻酔を施した。腹部大動脈は注意深く剥離し、腹腔動脈を除いた全ての分枝は結紮し、脾臓を切除した。動脈は上腸間膜動脈より近位で結紮し、腹腔動脈近位に直接直径1 mmのポリエチレンカテーテルを挿入し、腹腔動脈を固定した。その後、門脈を分離し直径1.8 mmのポリエチレンカテーテルを挿入し、胃を除いた全ての分枝を結紮した。完全に単離した灌流胃はKrebs-Ringer buffer（KRB, pH 7.4）で満たされた容器に移した。血管系は80 mg/dl グルコース（Waco Pure Chemical Co., Osaka, Japan）と4% デキストラン（Amersham Pharmacia Biosciences AB, Uppsala, Sweden）と0.2% ウシ血清アルブミンを含んだKRB（pH 7.4）で動脈カテーテルを通して灌流した。灌流液は95% O_2 と5% CO_2 ガスを含み、胃は2 ml/minで灌流した。胃内腔は100% O_2 ガスを通した1% N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-ethanesulfonic acid（HEPES, Wako Pure Chemical Co.）溶液（pH 7.4）を2 ml/minの速さで灌流した。20分の灌流後、その後の血管灌流液は氷上にのせたチューブの中へ2分間隔で採集され、ピペットで1 mlずつ採取し保存した。検体は分析するまでの間–20℃に保たれた。灌流液中のヒスタミンは市販の測定キット（Immnotech. S.A., Marseille Cedex France）でアセチル化されたのちラジオイムノアッセイで分析された。

4. ヒスタミン分泌に対するアペリン-12 の作用を研究のための実験手順

基礎ヒスタミン分泌に関する研究では単離ラット胃には30分間KRBが血管内に注入された。アペリン-12刺激によるヒスタミン分泌の研究では、KRBの10分間

持続注入後10 $\mu\text{g}/2\text{ ml}/\text{min}$ のアペリン-12が単離血管灌流ラット胃に10分間持続的に注入された。血管灌流液は氷上のチューブに2分間隔で採集された。灌流液中のヒスタミンはラジオイムノアッセイで測定された。

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

アペリン-12の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、Light Cyclerシステム²⁵⁾を使用してreal time RT-PCRによるHDC mRNAのアッセイを行った。10 $\mu\text{g}/2\text{ ml}/\text{min}$ のアペリン-12をラット単離胃に10分間持続投与し、投与2時間後に胃体部粘膜を剥離した。またコントロールとしてアペリン-12の代わりに生理食塩水を投与した。FastPrepシステムを使用し、すべてのRNAを粘膜から抽出した。FastPrepシステムの構成は以下の通りとした：BIO 101 FP FastPrepインスツルメント、FastRNA Pro Greenキッド (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りHDC mRNA濃度を測定した。RT-PCR用の1st Stand cDNA Synthesisキッド (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 μg) 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キッド (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'-CCCAGTGAATACCATG AATAC-3' (センス) および5'-ATGTCCCCAAAGATG CTAT-3' (アンチセンス) (GenBankアクセス番号 M29251) からデザインした。18 S rRNA測定については5'-CGAACGTCTGCCCTATCA-3' (センス) および5'-GCTGCCTTCCTTGATGT-3' (アンチセンス) (アクセス番号 V01270) からデザインした。プライマーの、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℃/secとした。さらにPCRの後で融解曲線解析を行い、PCR反応の特異性を確認した。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精製キッド (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18 S rRNA複製配列の量で除した。

6. 統計解析

結果は $\pm$ SE (標準誤差) で表記した。アペリン投与前後の酸分泌量の比較はStudent's paired t-testで行い、2グループ間の比較はnon-paired t-testで行ない、さらに3群以上のデータは一元ANOVAを用いてデータの統計解析を行った。平均値の多重比較にはScheffe検定を使用した。統計処置にはWindows (Microsoft Corporation, Redmond, Wa, USA) 用のSPSS (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA) を使用し、統計検定を実施した。P値が0.05未満 ($P < 0.05$) の場合には統計的に有意とみなした。

結 果

1. 胃内腔灌流ラットにおける酸分泌に対するアペリン-12の用量依存的な作用

Fig.1AとBでは灌流されたラット胃内腔でのアペリン-12の用量依存的な作用が示されている。(A)；15分毎での胃酸分泌の平均および標準誤差を示した。(B)；1時間の酸分泌量をデータAに基づいて計算した。Fig.1Aではアペリン-12 (20, 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$) の静脈内投与は胃酸分泌を増加させた。Fig.1BではAのデータに基づき1時間の酸分泌量を示した。アペリン-12 4 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ または100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ で投与後1時間の胃酸分泌がアペリン-12投与前と比較してそれぞれ153% ($11.6 \pm 2.0\text{ }\mu\text{mol}/\text{hr}$: $17.8 \pm 2.9\text{ }\mu\text{mol}/\text{hr}$), 192% ($20.3 \pm 3\text{ }\mu\text{mol}/\text{hr}$: $39 \pm 8.7\text{ }\mu\text{mol}/\text{hr}$), 203% ($19.6 \pm 2.2\text{ }\mu\text{mol}/\text{hr}$: $39.8 \pm 3.8\text{ }\mu\text{mol}/\text{hr}$) に増加した。酸分泌増加は約60分間持続した。

2. 胃内腔灌流ラットにおける胃酸分泌におけるアペリン-12, -13, -36の作用の比較

アペリンの他の分子型、アペリン-13, 36の作用も比較した。これらのペプチドの投与はアペリン-12の実験と同じ方法で施行した。Fig.2A, Bは胃内腔灌流ラット胃の胃酸分泌でのアペリン-13 (100 $\mu\text{g}/\text{kg}$) の作用を示した。Aの各値は15分の胃酸分泌量を示し、Bの各値は1時間の酸分泌量をAのデータに基づき表記した。Fig.2AとBはアペリン-13の投与は胃酸分泌には影響しないことを示している ($12.2 \pm 1.9\text{ }\mu\text{mol}/\text{hr}$: $15.4 \pm 2.9\text{ }\mu\text{mol}/\text{hr}$)。Fig.3AとBは胃酸分泌でのアペリン-36 (100 $\mu\text{g}/\text{kg}$) の作用を表記した。Fig.3A, Bはアペリン-36投与は酸分泌に影響しないことを示している ($17.9 \pm 4.8\text{ }\mu\text{mol}/\text{hr}$: $26.8 \pm 8.9\text{ }\mu\text{mol}/\text{hr}$)。

3. アペリン-12 刺激下胃酸分泌に対するヒスタミン H2 ブロッカーアンタゴニスト、ファモチジンの作用

アペリン-12による酸分泌増加におけるメカニズムでのヒスタミンの役割を明らかにするためにアペリン-12作用下でのファモチジン投与の影響を検討した。Fig.4では、アペリン-12投与15分前にファモチジンを

投与すると、アペリン-12刺激で胃酸分泌は増加せず、アペリン-12による刺激がファモチジンにより完全に抑制されたことが示されている。この結果はヒスタミンがアペリン-12の酸分泌作用に関係することを示している。

4. 単離血管灌流ラット胃からヒスタミン分泌に対するアペリン-12の作用

ヒスタミン分泌に対するアペリン-12の作用を明らかにするために、単離血管灌流ラット胃で実験した。アペリン-12 (100 $\mu\text{g}/20\text{ ml}/10\text{ min}$) は単離血管灌流ラットで10分間持続投与された。アペリン-12は投与間のヒスタミン分泌に比較して278% (2827 $\pm$ 289 pmol/10 min : 7863 $\pm$ 1070 pmol/10 min), 次の10分間で165% (4685 $\pm$ 393 pmol/10 min) と著明に増加させた (Fig.5A, B)

5. 単離血管灌流ラット胃粘膜内のHDC mRNA産生におけるアペリン-12の作用

胃におけるヒスタミン産生における、アペリン-12の作用を明らかにするために、胃でのHDC mRNAに対するアペリン-12の投与の影響を単離血管灌流ラット胃を用いて検討した。アペリン-12 (100 $\mu\text{g}/20\text{ ml}/10\text{ min}$) は単離血管灌流ラット胃に持続投与され、胃粘膜は投与2時間後に剥離した。Fig.6ではアペリン-12は単離血管灌流ラット胃でのHDC mRNAを、コントロールと比較して480 $\pm$ 63%と著明に増加させ、アペリン-12が胃粘膜内のヒスタミン産生を刺激したことを示している。

6. アペリン-12 刺激性の胃酸分泌下での抗ムスカリンレセプターアンタゴニストの作用

迷走神経の役割を明らかにするために、アペリン-12

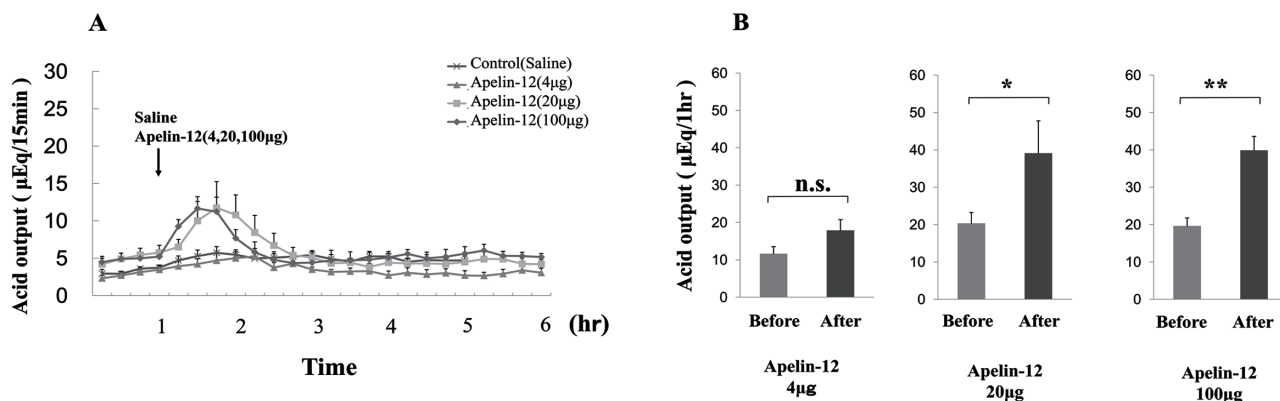


Fig. 1. 胃内腔灌流ラットの酸分泌に対するアペリン-12の用量依存性作用. 胃内腔灌流ラットでのアペリン-12 (4,20,100 $\mu\text{g}/\text{kg}$) 経静脈投与による酸分泌反応の時間経過を表記した. コントロール群には生理食塩水を投与した. 胃酸分泌量はアペリン-12または生理食塩水投与後5時間まで測定した. (A) 各値は15分毎の酸分泌量の平均 $\pm$ SE で表記した. (B) 1時間の酸分泌量を (A) に基づき計算した. 各円柱はアペリン-12 投与前後1時間の酸分泌量を平均 $\pm$ SE で表記. Before: アペリン-12 投与前1時間の酸分泌. After: アペリン-12 投与後1時間の酸分泌. 左: アペリン-12 4 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 中: アペリン-12 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 右: アペリン-12 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$. n.s.; not significant, N = 5, 5, 8, 4. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

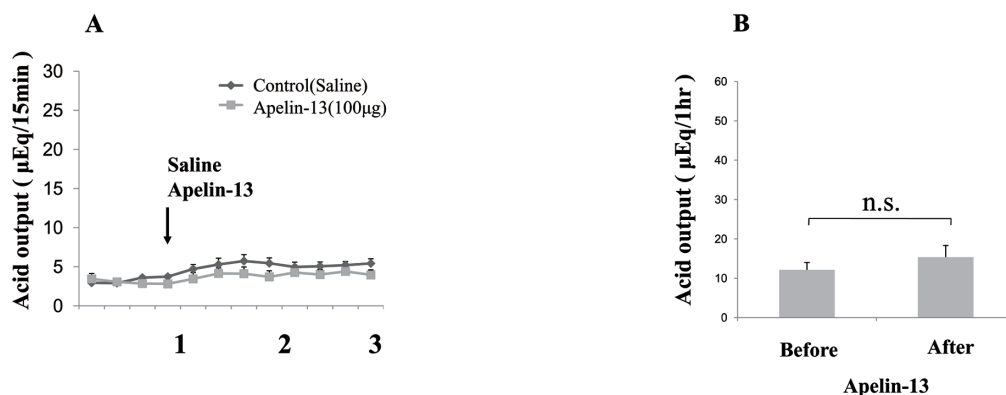


Fig. 2. 胃内腔灌流ラットの酸分泌に対するアペリン-13の作用. 胃内腔灌流ラットにおけるアペリン-13 (100 $\mu\text{g}/\text{kg}$) 経静脈投与の酸分泌反応の時間経過を表記した. アペリン-13の作用をコントロールのラットと比較した. 胃酸分泌量はアペリン-13投与後2時間まで測定した. (A) 各値は15分毎の酸分泌量の平均 $\pm$ SE で表記した. (B) 1時間の酸分泌量を (A) に基づき計算した. 各円柱はアペリン-13 投与前後1時間の酸分泌量を平均 $\pm$ SE で表記. Before: アペリン-13 投与前1時間の酸分泌. After: アペリン-13 投与後1時間の酸分泌. n.s.; not significant, N = 5, 10.

による酸分泌刺激下における抗ムスカリンレセプターアンタゴニストの硫酸アトロピンの作用を胃内腔灌流ラット胃で実験した。Fig.1でアペリン-12は酸分泌を増加させるが、硫酸アトロピンをアペリン-12投与5分前に投与しても、アペリン-12投与で酸分泌は173%と増加しており (Fig.7A, B), アペリン-12による刺激は硫酸アトロピンによって抑制されなかった ($16.2 \pm 4.1 \mu\text{mol/hr}$: $28.0 \pm 4.8 \mu\text{mol/hr}$)。この結果はコリン作動性迷走神経はアペリン-12の酸分泌増加作用に関与していないことを示している。

7. ガストリン刺激酸分泌でのアペリン-12の作用

ガストリンとアペリン間の合成、相互作用があるかどうか検討するため、ガストリン刺激下の酸分泌に対するアペリン-12投与の影響について検討した。アペリン-12の100 $\mu\text{g/kg}$ をガストリン持続静脈注射

($10^{-9} \text{ mol/kg/hr}$)で刺激されたラットに投与したが Fig.8A, Bに示すようにアペリン-12はガストリン刺激下での酸分泌をさらに増加させた。アペリン-12投与後1時間の酸分泌量はアペリン-12投与前の酸分泌量と比較して194% ($56.1 \pm 7.6 \mu\text{mol/hr}$: $77.4 \pm 5.8 \mu\text{mol/hr}$)に増加した。

考 察

最近のペプチド研究では、アペリンとそのレセプターのAPJは心血管系、視床下部一下垂体系、消化管の機能や食欲の調整において生理学的、病態生理学的に重要な役割をもつ、新たなペプチドホルモン調節系の構成要素であることが示唆されている¹⁷⁾。アペリンとAPJシステムは特に心疾患の病態生理に関係していると考えられており、経静脈投与は心房圧や末梢血管

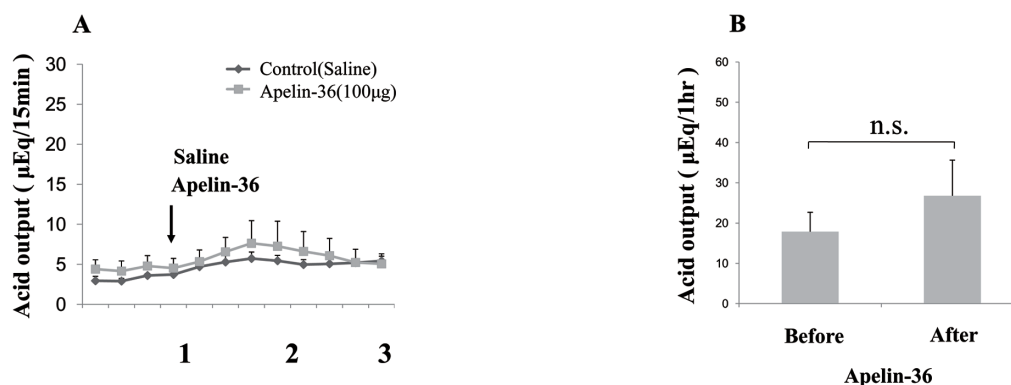


Fig. 3. 胃内腔灌流ラットの酸分泌に対するアペリン-36の作用。胃内腔灌流ラットにおけるアペリン-36 (100 $\mu\text{g/kg}$) 経静脈投与の酸分泌反応の時間経過を表記した。アペリン-36の作用をコントロールのラットと比較した。胃酸分泌量はアペリン-36投与後2時間まで測定した。(A) 各値は15分毎の酸分泌量の平均 $\pm$ SEで表記した。(B) 1時間の酸分泌量を(A)に基づき計算した。各円柱はアペリン-36投与前後1時間の酸分泌量を平均 $\pm$ SEで表記。Before: アペリン-36投与前1時間の酸分泌。After: アペリン-36投与後1時間の酸分泌。n.s.; not significant, N = 5, 7.

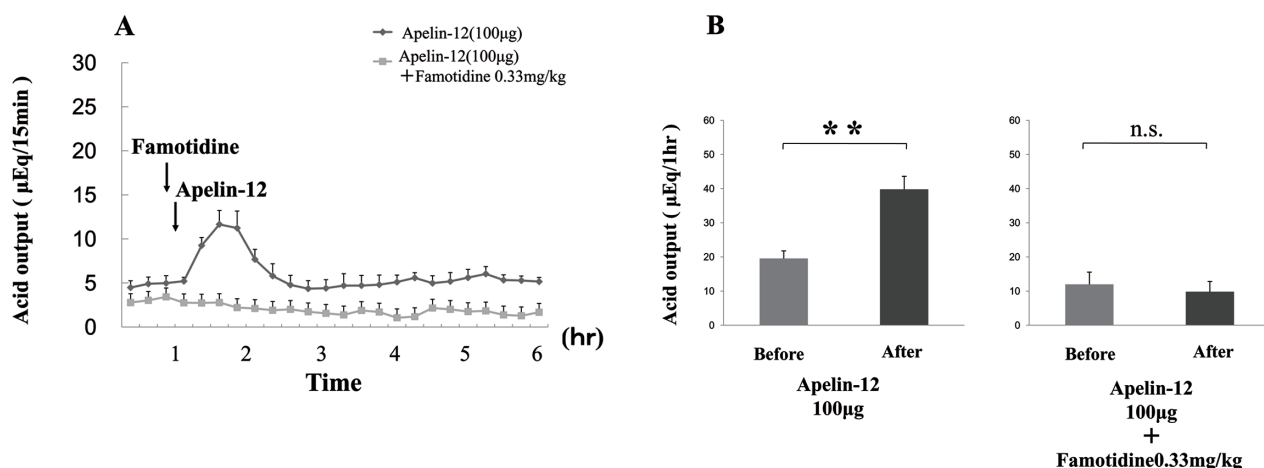


Fig. 4. 胃内腔灌流ラットにおけるアペリン-12刺激下胃酸分泌に対するファモチジン投与の影響。(A) 胃内腔灌流ラットにおけるアペリン-12 (100 $\mu\text{g/kg}$) 単独とアペリン-12 + ファモチジン (0.33 mg/kg) 経静脈投与による酸分泌反応の時間経過を表記した。ファモチジンはアペリン-12投与15分前に投与された。各値は15分毎の酸分泌量の平均 $\pm$ SEで表記した。(B) 1時間の酸分泌量を(A)に基づき計算した。各円柱はアペリン-12, アペリン-12 + ファモチジンの各投与前後1時間の酸分泌量を平均 $\pm$ SEで表記。Before: アペリン-12, アペリン-12 + ファモチジン投与前1時間の酸分泌。After: アペリン-12, アペリン-12 + ファモチジン投与後1時間の酸分泌。左: アペリン-12 100 $\mu\text{g/kg}$, 右: アペリン-12 100 $\mu\text{g/kg}$ + ファモチジン 0.33 mg/kg . n.s.; not significant, **p < 0.01, N = 4, 4.

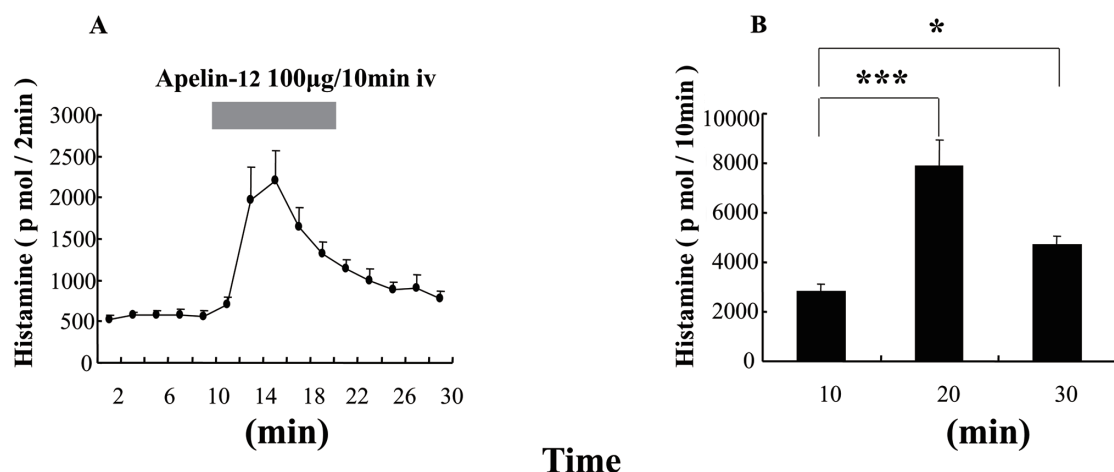


Fig. 5. 単離血管灌流ラット胃からの灌流液内ヒスタミン濃度に対するアペリン-12の作用. アペリン-12は単離血管灌流ラット胃へ持続投与された. 各値は(A)に表示した. 各値は2分毎でのヒスタミン分泌の平均±SEで表記した. (B) 10分間のヒスタミン分泌はAのデータに基づいている. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, $N = 5$.

の抵抗を減弱させ, 心疾患への治療への可能性があることが明らかにされている¹³⁾. さらに心血管系のほかに, アペリンは炎症性サイトカイン産生¹⁸⁾, 飲水行動の抑制¹⁹⁾などの作用を持つと報告されている. またアペリンはHIV感染においてCD4のco-receptorとしての機能が知られている²⁰⁾. しかしアペリンが消化管に存在すると証明されたにも関わらず⁸⁾, 消化管機能への作用は十分に解明されていない. Wangは, アペリンは*in vitro*において胃上皮細胞の増殖を著明に促進するが, 同時にマウス腸内分泌細胞STC-1からのCCK分泌も刺激すると報告した¹⁴⁾. *in vitro*では, アペリンは単離したECL細胞からのヒスタミン分泌を抑制し, 胃酸分泌を抑制することが示唆されている²¹⁾が, 生体における酸分泌への作用は明確にされていない.

本研究ではアペリンの胃酸分泌への作用を検討した. 本研究の結果は, 1) アペリン-12は胃酸分泌を増加させ, アペリン-12 100 µg/kgでは胃酸を203%増加させた. 2) アペリン-13, -36では酸分泌において有意な増加は認められなかった. 3) ファモチジンはアペリンの酸分泌作用を完全に抑制した. 4) アペリン-12 (100 µg/20 ml/10 min) は単離血管灌流ラット胃からのヒスタミン分泌を278%と有意に増加させた. 5) アペリン-12は単離血管灌流ラット胃でHDCmRNAをコントロールと比較し480%増加させた. 6) 硫酸アトロピンはアペリン-12の胃酸分泌作用を抑制しなかった. 7) さらにアペリン-12はガストリン投与による酸分泌増加を増幅させた. これらの結果はアペリンは胃粘膜からのヒスタミン分泌, 合成を介して胃酸分泌を刺激していることを示しており, アペリンが胃酸分泌のメカニズムに関与し, 酸分泌調節因子の一つとして生理学的, 病態生理学的酸分泌反応に関与しているこ

とを示唆している. 硫酸アトロピンはアペリンによる酸分泌刺激に影響を与えず, またアペリンは迷走神経切断した単離胃でのヒスタミン放出を増加させているので迷走神経の関与はないと思われる. 以上の結果よりアペリンの生理作用のメカニズムは胃酸分泌におけるグレリンの作用に見られるような脳-胃相関を介するものではないと思われる.

アペリンがヒスタミン分泌と産生を刺激することを示した今回の結果から, その機序を考慮すると, アペリンはECL細胞に直接作用していると思われる. 単離したECL細胞実験系を使用したLambrechtaらの検討

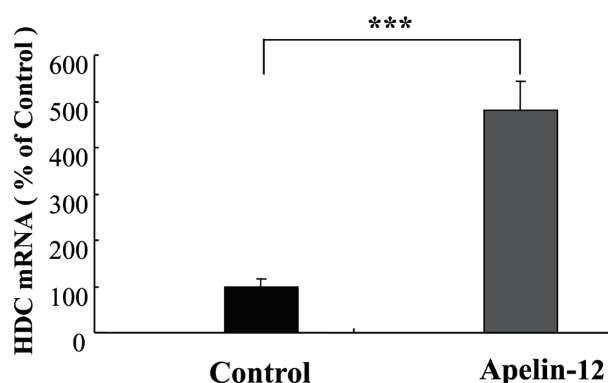


Fig. 6. ラット胃粘膜のHDC mRNAの濃度におけるアペリン-12の作用. アペリン-12を100 µg/20 ml/10 minの濃度で単離血管灌流ラット胃に持続投与して, その2時間後, 胃粘膜を剥離し, mRNAを抽出, HDCmRNAを測定した. HDCmRNAの濃度はLightCyclerを用いreal time PCRで測定された. コントロール: 生理食塩水投与したラットの胃粘膜内のHDCmRNA濃度. アペリン-12: アペリン-12投与後2時間の胃粘膜内のHDCmRNA濃度. 各円柱はHDCmRNAの平均±SEをコントロールの百分率で表記した. *** $p < 0.001$, $N = 8, 16$.

では、アペリンレセプター遺伝子APJはECL細胞中に多く存在することを証明した²¹⁾。彼らの研究はアペリンがECL細胞に直接作用しているというわれわれの仮説を強く後押ししている。しかし酸分泌に対するアペリンの作用においては彼らと著者らの結論の間には相違がある。彼らの単離ECL細胞と単離胃底腺を使用した検討では、アペリンがガストリンで刺激された単離ラットECL細胞の細胞内カルシウムのシグナルと、ガストリンで刺激されたウサギの単離胃底腺の¹⁴Cアミノプリンの取り込みが抑制されている。この結果に基づき、彼らはアペリンはECL細胞からのヒスタミン分泌抑制を介して酸分泌を減少させると結論付けた。

しかしながら、本研究では、アペリン-12は単離血管灌流ラット胃においてヒスタミンの分泌を増加させ、引き続き産生を増加させる。アペリンがヒスタミンの分泌増加を介して酸分泌を増加させていることを示唆している。しかし、これらの結果の相違について、考えられる理由として、1) 実験のシステムの相違があること、すなわち我々はin vivoとex vivoの実験を行ったが、彼らは単離した細胞と胃底腺を用いてin vitroで行っている。単離したECL細胞や胃底腺は単離する過程において蛋白分解酵素のコラゲナーゼなどによって処理されるが、コラゲナーゼなどの働きに細胞が露出され、さらに還元剤のDithiothreitol (DTT) 処理は細胞

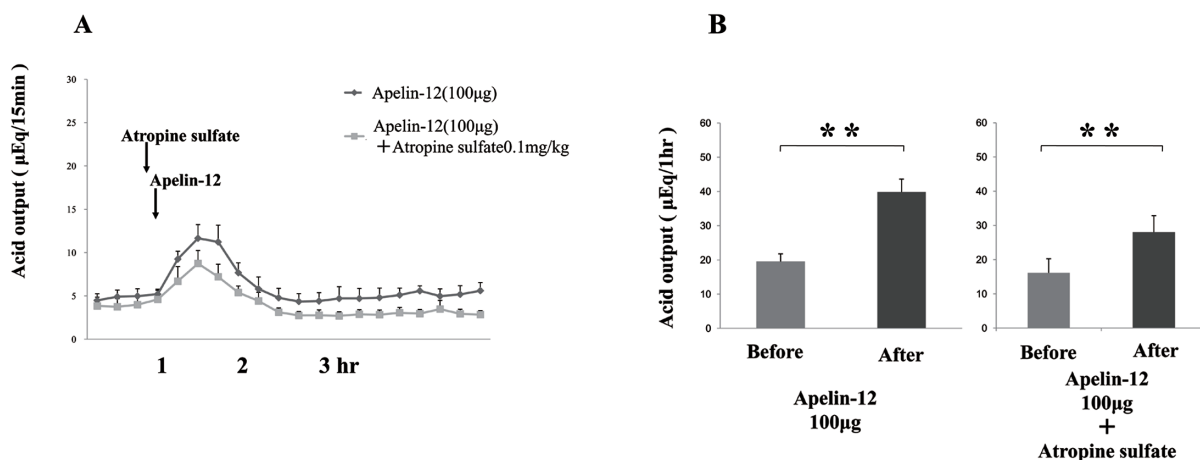


Fig. 7. ラット単離胃のアペリン-12 刺激下の酸分泌量に対するムスカリンレセプターアンタゴニストの作用。(A)：胃内腔灌流ラットでのアペリン-12 (100 μg/kg) 単独投与とアペリン-12 + 硫酸アトロピン (0.1 mg/kg) の経静脈投与の酸分泌反応の時間経過を表記した。各値は15分毎の酸分泌量の平均±SEで表記した。(B)：1時間の酸分泌量を(A)に基づき計算した。各円柱は薬剤投与前後1時間の酸分泌量を平均±SEで表記。Before：アペリン-12, アペリン-12 + 硫酸アトロピン投与前1時間の酸分泌。After：アペリン-12, アペリン-12 + 硫酸アトロピン投与後1時間の酸分泌。左：アペリン-12 100 μg/kg, 右：アペリン-12 100 μg/kg + 硫酸アトロピン0.1 mg/kg. **p < 0.01, N = 4, 8.

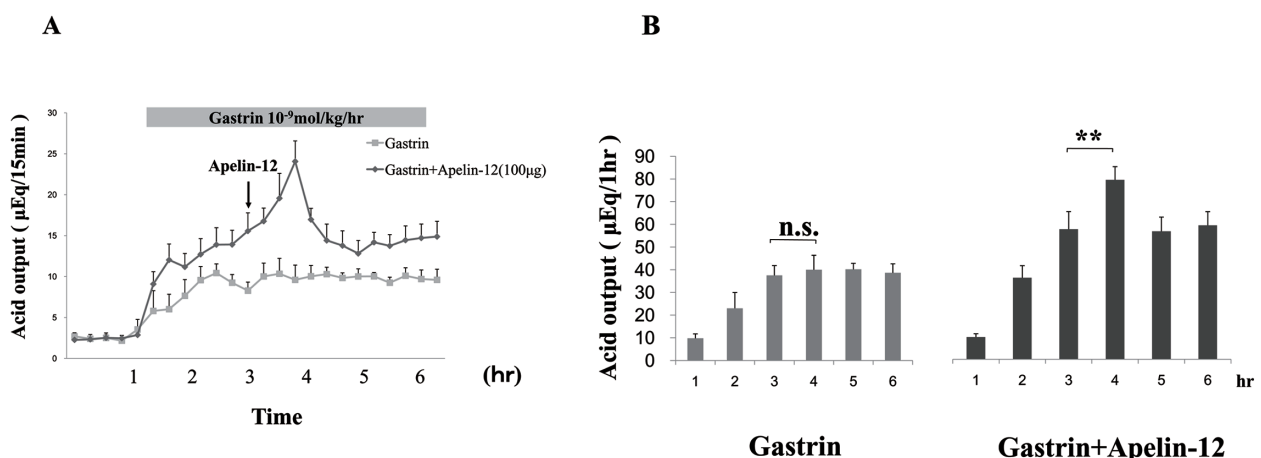


Fig. 8. ガストリン刺激下酸分泌に対するアペリンの作用。(A) 胃内腔灌流ラットにおけるガストリン及びアペリン-12 (100 μg/kg) 経静脈投与の酸分泌反応の時間経過。ガストリン投与はhuman gastrin -17, 10⁻⁹ mol/kg/hrの持続投与を行い、アペリン-12はガストリン持続投与開始後2時間に経静脈的投与を施行した。(A) 各値は15分毎の酸分泌量の平均±SEで表記した。(B) 1時間の酸分泌量を(A)に基づき計算した。各円柱は投与前後1時間の酸分泌量を平均±SEで表記。N.S.: not significant, **p < 0.01, N = 6, 6.

表面を破壊したり、その結果、機能においても様々な不十分な反応を生じることが考えられる。

免疫病理組織研究ではアペリンは胃壁、とくに酸分泌を行う粘膜に存在している⁸⁾。これらの染色された細胞は胃粘膜胃底腺頸部細胞と酸分泌細胞であることが示されている⁸⁾。他の免疫組織化学染色を用いた検討でラットとヒトの胃の腺上皮内に豊富なアペリン蛋白が存在することが示されている¹⁴⁾。さらにアペリン蛋白とHK-ATPaseの共存が免疫組織化学で証明されている²¹⁾。さらにノーザン解析では胃底腺で最も高いアペリンの発現を認めている¹⁴⁾。これらの研究も胃の機能の調節にアペリンが生理学的に重要な役割をしていることが示唆していると思われる^{14, 21)}。さらにECL細胞内のアペリンレセプター遺伝子APJの発現が明らかであり²¹⁾、これらの所見よりアペリンはヒスタミン放出の調整を介して酸分泌を調整する壁細胞とECL細胞間のネットワーク形成に関与していることが推測される。

今回の研究でアペリン-12は酸分泌を増加させるが、アペリンの他の分子異型、例えば-13と-36は有意に酸分泌増加を誘発しなかった。降圧作用についてもアペリン蛋白の作用はその分子量に大きく影響されることが報告されている⁸⁾。アペリン-13は活性型として知られている^{4, 14, 18)}にも関わらず、アペリン-12はアペリン-13の降圧作用よりも、より活性があると報告されている⁸⁾。しかしアペリン-9、-10と-11には動脈圧には影響していない⁸⁾。以上よりアペリン-12がアペリン前駆体から産生されるペプチドの中で最も活性のあるペプチドであると推測されている⁸⁾。

アペリンは77個のアミノ酸から成る前駆体から血中の主たるアペリンである36のアミノ酸ペプチドが生成される¹⁾。しかしより短い、活性型のピログルタミン酸化された13個のアミノ酸からなるアペリン、(Pyr¹)アペリン-13が組織中に同定され、それは最も活性があり^{4, 23)}心臓組織において豊富に含まれている。ラットと牛の初乳にアペリン-36は優位な形として存在しているが、アペリン-13もまたラットの乳腺、肺組織、卵巣に発見、同定されている²⁴⁾。これらの結果はアペリン-13も生体の組織中において生理的役割を果たしていることを示唆していると思われる。しかしアペリン-12は多くの臓器、組織には同定されておらず、生理的役割は不明である。アペリン-12の生成には特異的なプロセッシング酵素によってアペリン前駆体のGlu-Arg側で分割される必要がある⁸⁾。これまでの報告では、アペリン-12はもっとも強い活性をもつホルモンであり⁸⁾、その脳内への投与は強い昇圧作用と頻脈反応を起こすことも知られている²⁵⁾。しかしながら、アペリン-12が生理学的調節ホルモンであると結論づけるにはアペリン前駆体のプロセッシングより産生されることが証明されなければならない。アペリン-12

の生成の過程とその部位を証明する必要がある。

結論として、我々はアペリン-12が酸分泌作用を刺激し、そのメカニズムとして、ヒスタミン分泌の増加が関与しており、その機序は迷走神経に依存しないことを明らかにした。以上の結果よりアペリンは酸分泌調節因子として、酸分泌のメカニズムに関与していることが示唆された。

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 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落合光子様に謝意を表します。

References

- 1) Tatemoto K, Hosoya M, Habata Y, Fujii R, Kakegawa T, Zou MX, Kawamata Y, Fukusumi S, Hinuma S, Kitada C, Kurokawa T, Onda H, Fujino M. Isolation and characterization of a novel endogenous peptide ligand for the human APJ receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;251:471-6.
- 2) O'Dowd BF, Heiber M, Chan A, Heng HH, Tsui LC, Kennedy JL, Shi X, Petronis A, George SR, Nguyen T. A human gene that shows identity with the gene encoding the angiotensin receptor is located on chromosome 11. *Gene* 1993;136:355-60.
- 3) Kleinz M J, Skepper JN, Davenport AP. Immunocytochemical localisation of the apelin receptor, APJ, to human cardiomyocytes, vascular smooth muscle and endothelial cells. *Regul Pept* 2005;126:233-40.
- 4) Hosoya M, Kawamata Y, Fukusumi S, Fujii S, Habata Y, Hinuma S, Kitada C, Honda S, Kurokawa T, Onda H, Nishimura O, Fujino M. Molecular and functional characteristics of APJ. Tissue distribution of mRNA and interaction with the endogenous ligand apelin. *J Biol chem* 2000;275:21061-7.
- 5) Medhurst AD, Jennings CA, Robbins MJ, Davis RP, Ellis C, Winborn KY, Lawrie KW, Hervieu G, Riley G, Bolaky JE, Herrity NC, Murdock P, Darker JG. Pharmacological and immunohistochemical characterization of the APJ receptor and its endogenous ligand apelin. *J Neurochem* 2003;84:1162-72.
- 6) Lee DK, Cheng R, Nguyen T, Fan T, Kariyawasam AP, Osmond DH, George SR, O'Dowd BF. Characterization of apelin, the ligand or the APJ receptor. *J Neurochem* 2000;74:34-41.
- 7) O'Carroll A-M, Selby TL, Parkovits M, Lolait SJ. Distribution of mRNA encoding B78/apj, the rat

- homologue of the human APJ receptor, and its endogenous ligand apelin in brain and peripheral tissues. *Biochem Biophys Acta* 2000;1492:72-80.
- 8) Tatemoto K, Takayama K, Zou MX, Kumaki I, Zhang W, Kumano K, Fujimiya M. The novel peptide apelin lowers blood pressure via a nitric oxide-dependent mechanism. *Regul Pept* 2001;99:87-92.
 - 9) Chen MM, Ashley EA, Deng DX, Tsalenko A, Deng A, Tabibiazar R, Ben-Dor A, Fenster B, Yang E, King JY, Fowler M, Robbins R, Johnson FL, Bruhn L, McDonagh T, Dargie H, Yakhini Z, Tsao PS, Quertermous T. Novel role for the potent endogenous inotrope apelin in human cardiac dysfunction. *Circulation* 2003;108:1432-9.
 - 10) Japp AG, Cruden NL, Barnes G, van Gemeren N, Mathews J, Adamson J, Johnston NR, Denvir MA, Megson IL, Flapan AD, Newby DE. Acute cardiovascular effects of apelin in humans: potential role in patients with chronic heart failure. *Circulation* 2010;121:1818-27.
 - 11) Ishida J, Hashimoto T, Hashimoto Y, Nishiwaki S, Iguchi T, Harada S, Sugaya T, Matsuzaki H, Yamamoto R, Shiota N, Okunishi H, Kihara M, Umemura S, Sugiyama F, Yagami K, Kasuya Y, Mochizuki N, Fukumizu A. Regulatory roles for APJ, a seven-transmembrane receptor related to angiotensin-type1 receptor in blood pressure in vivo. *J Biol Chem* 2004;279:26274-9.
 - 12) Cheng X, Cheng XS, Pang CC. Venous dilator effect of apelin, an endogenous peptide ligand for the orphan APJ receptor, in conscious rats. *Eur J Pharmacol* 2003;470:171-5.
 - 13) Barnes G, Japp AG, Newby DE. Translational promise of the apelin-APJ system. *Heart* 2010;96:1011-6.
 - 14) Wang G, Anini Y, Wei W, Qi X, O'Carroll AM, Mochizuki T, Wang HQ, Hellmich MR, Englander MR, Greeley GH Jr. Apelin, a new enteric peptide: localization in the gastrointestinal tract, ontogeny, and stimulation of gastric cell proliferation and of cholecystokinin secretion. *Endocrinology* 2004;145:1342-8.
 - 15) Yakabi K, Mimura H, Iwabuchi H, Ro S, Nakamura T. Interleukin-8 enhances tetragastrin-stimulated acid secretion in vivo. *Dig Dis Sci* 1998;43:2317-21.
 - 16) Yakabi K, Ro S, 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;51:1313-21.
 - 17) Ladeiras-Lopes R, Ferreira-Martins J, Leite-Moreira AF. The apelineric system: the role played in human physiology and pathology and potential therapeutic applications. *Arq Bras Cardiol* 2008;90:343-9.
 - 18) Habata Y, Fujii R, Hosoya M, Fukusumi S, Kawamata Y, Hinuma S, Kitada C, Nishizawa N, Murosaki S, Kurokawa T, Onda H, Tatemoto K, Fujino M. Apelin, the natural ligand of the orphan receptor APJ, is abundantly secreted in the colostrum. *Biochem Biophys Acta* 1999;1452:25-35.
 - 19) Reaux A, De Mota N, Skultetyova I, Lenkei Z, El Messari S, Gallatz K, Corvol P, Palkovits M, Llorens-Cortès C. Physiological role of a novel neuropeptide, apelin, and its receptor in the rat brain. *J Neurochem* 2001;77:1085-96.
 - 20) Puffer BA, Sharron M, Coughlan CM, Baribaud F, McManus CM, Lee B, David J, Price K, Horuk R, Tsang M, Doms RW. Expression and coreceptor function of APJ for primate immunodeficiency viruses. *Virology* 2000;276:435-44.
 - 21) Lambrecht NW, Yakubov I, Zer C, Sachs G. Transcriptomes of purified gastric ECL and parietal cells: identification of a novel pathway regulating acid secretion. *Physiol Genomics* 2006;25:153-65.
 - 22) Lee DK, Saldivia VR, Nguen T, Cheng R, George SR, O'Dowd BF. Modification of the terminal residue of apelin-13 antagonises its hypotensive action. *Endocrinology* 2005;146:231-6.
 - 23) Kleinz MJ, Davenport AP. Emerging roles of apelin in biology and medicine. *Pharmacol Ther* 2005;107:198-211.
 - 24) Kawamata Y, Habata Y, Fukusumi S, Hosoya M, Fujii R, Hinuma S, Nishizawa N, Kibata C, Onda H, Nishimura O, Fujino M. Molecular properties of apelin: tissue distribution and receptor binding. *Biochem Biophys Acta* 2001;1538:162-71.
 - 25) Takayama K, Kumaki I, Motegi S, Hou XH, Tatemoto K. Cardiovascular responses to apelin-12 injection into the ventral medullary surface in rats. *Ann Gunma Sci* 2001;22:55-60.