

## 論文の内容の要旨

論文題目：アドレノメデュリンの調節性膵外分泌抑制作用の分子機構の解析

指導教官：藤田 敏郎

東京大学大学院医学系研究科

平成9年4月入学

医学博士課程

内科学専攻

土田 知宏

アドレノメデュリン (adrenomedullin : AM) はヒト褐色細胞腫から単離された新しい降圧活性ペプチドである。AMの主な産生部位は血管壁細胞であると考えられているが、血管系以外にも、呼吸器系、内分泌系、消化器系など広範にAMの発現が認められており、これに伴い、AMの生理作用も多岐にわたって報告されている。最近、免疫組織学的に膵ラ氏島のポリペプチド産生 (PP) 細胞にもAMが確認された。膵臓には膵外分泌を担う膵腺房と膵内分泌を担う膵ラ氏島とが混在している。これらの間には「ラ氏島一腺房連間 (islet-acinar axis)」が存在している。すなわち、膵ラ氏島を灌漑した血流は、そのホルモンを受け取って、ほぼ全量が膵腺房へと流入する一種の門脈系が存在し、このため様々な膵ラ氏島ホルモンが膵腺房における分泌を制御していることが知られている。したがって、PP細胞より分泌されているAMは膵腺房外分泌に対し何らかの作用を有しているのではないかと仮説をたて、アドレノメデュリンの調節性膵外分泌に対する作用およびその作用機序について検討した。

AMの膵外分泌に対する作用を検討するに当たり、初めに膵腺房細胞にAMの受容体が存在しているか否かを、 $[^{125}\text{I}]\text{AM}$ を用いて受容体結合実験を行って検討した。非標識AM濃度の上昇に伴い標識AMの受容体への結合率は低下していた。AMはある細胞においてはCGRPと受容体を共有するという報告があるが、CGRPはAMの受容体への結合を阻害しなかった。これより膵腺房細胞にはCGRPと競合しないAMの特異的受容体が存在することが確認できた。

次に、AMの膵腺房の調節性膵外分泌における作用を検討する目的で、ラ

ットの遊離膵腺房を用いて、CCK 刺激したアミラーゼ分泌に対する AM の効果を検討した。AM は CCK 刺激によるアミラーゼ分泌を容量依存的に抑制した。その抑制効果は最大 52% であった。一方、基礎分泌に対しては抑制効果及び促進効果も示さなかった。これらの結果より、AM は刺激したアミラーゼ分泌を特異的に抑制することが明らかになった。

CCK に刺激されたアミラーゼ分泌に対する AM の抑制機構の作用部位を明らかにする目的で、まず CCK とその受容体との結合に対する AM の作用を [<sup>125</sup>I]CCK を用いて検討した。当然のごとく非標識 CCK 濃度を上昇させると標識された CCK の受容体への結合率は低下するが、非標識 AM 濃度を上昇させても標識された CCK の CCK 受容体への結合率は低下しなかった。つまり、AM は CCK の受容体への結合を阻害せずに分泌を抑制していることが確認され、その分泌抑制作用は CCK の受容体-リガンドシステムより遠位に働いていると考えられた。

CCK は、膵腺房において細胞内カルシウム濃度を上昇させて、膵外分泌を刺激している。そこで AM の細胞内での作用機序を明らかにしていく上で、細胞内カルシウム濃度に対する AM の作用を検討した。CCK は細胞内カルシウム濃度を上昇させるが、AM は、CCK による細胞内カルシウム上昇を抑制しなかった。したがって、AM は、細胞内カルシウム濃度を減少させることなく膵外分泌を抑制していることが明らかとなり、AM は受容体を介した細胞内カルシウム上昇機構より遠位に働いていることが示唆された。

カルシウムイオノファ A23187 は、受容体を介したカルシウム上昇機構をバイパスして細胞内カルシウム濃度を上昇させるため、カルシウムイオノファ A23187 で刺激したアミラーゼ分泌に対する AM の効果を検討することによって、受容体を介したカルシウム上昇機構より遠位における AM の作用を直接的に検証した。AM は容量依存的に A23187 で刺激されたアミラーゼ分泌を抑制した。この結果より、AM はカルシウム上昇機構よりも遠位の部位に働き分泌を抑制していることが明らかとなった。

AM が膵外分泌機構のカルシウム感受性を低下させることによる抑制効果を有していないかを見るために、ストレプトライジン-O にて透過性にした遊離膵腺房を用いて様々な細胞内カルシウム濃度におけるアミラーゼ分泌を比較した。アミラーゼ分泌はカルシウム容量依存性に促進されるが、AM はカルシウム依存性アミラーゼ分泌をいずれのカルシウム濃度においても抑制し、膵外分泌のカルシウム感受性曲線を右方移動させていることがわかり、AM は膵外分泌機構のカルシウム感受性を低下させることにより分泌抑制していることが明らかとなった。

他の組織では、AM は細胞内 cAMP 濃度を調節してその活性を発現していると言われている。また、cAMP は膵外分泌機構のカルシウム感受性を増強して膵外分泌を増大することが知られている。そこで、カルシウム感受性を制御する機構に対する AM の作用を検討する目的で、膵腺房細胞内 cAMP 濃度に対する AM の効果を検討した。AM は CCK の有無に関わらず細胞内 cAMP 濃度を変えなかった。またセクレチンによって上昇した cAMP 濃度への影響も認められなかった。この結果、AM のカルシウム感受性抑制作用は、細胞内 cAMP 濃度調節とは別の機構が考えられた。

カルシウム感受性調節因子として cAMP の他に GTP があり、AM が細胞

内 cAMP 濃度へ関与していないことより、GTP 依存性の情報伝達経路に注目した。GTP 結合蛋白質である Rab3D 蛋白質は膵酵素顆粒上に存在し、細胞内カルシウム濃度調節機構より遠位においてカルシウム刺激性調節性膵外分泌に促進的に働いている。そこで、AM がこの Rab3D 蛋白質の活性を抑制することによりカルシウム感受性を低下させ、その結果膵外分泌を抑制しているのではないかと仮説をたてた。この仮説を検討するために、ヘマグルチニン (HA) を付加した Rab3D (HA-Rab3D) 蛋白質を膵腺房に特異的に過剰発現させたトランスジェニックマウスを用いて Rab3D 蛋白質に対する AM の作用を検討した。Rab3D 蛋白質は GDP/GTP サイクルによって活性化される低分子量 GTP 結合蛋白質であることより、トランスジェニックマウスの HA-Rab3D 蛋白質への GTP 結合率を測定し、AM の Rab3D 蛋白質への作用を検討した。CCK は HA-Rab3D 蛋白質への GTP 結合率を最大約 200% まで増強するのに対し、AM は CCK によって増強した GTP 結合率を顕著に抑制していた。この結果より、AM が Rab3D 蛋白質の活性を低下させることによりアミラーゼ分泌を抑制していることが明らかとなり、また、AM は HA-Rab3D 蛋白質の GDP/GTP サイクルを抑制していることが示唆された。

さらに、AM が HA-Rab3D 蛋白質の GDP/GTP サイクルを抑制する分子機構の解明を試みた。今日、GDP 解離抑制蛋白質 (GDI)、GTPase 活性化蛋白質 (GAP)、GDP/GTP 変換蛋白質 (GEP) の 3 つの Rab 蛋白質の GDP/GTP サイクル制御因子が知られており、この中で GDI 蛋白質は Rab 蛋白質と直接結合し作用し最も重要な因子と考えられている。そこで、AM の抑制作用の情報伝達経路にこの GDI 蛋白質が関与しているか否かを検討する目的で、まず初めに、トランスジェニックマウスを用いて膵腺房細胞における HA-Rab3D 蛋白質と GDI 蛋白質の相互作用を共役免疫沈降法にて検討した。GDI 蛋白質のアイソフォームである GDI-1 蛋白質は、トランスジェニックマウスの膵腺房から抗 HA 抗体にて HA-Rab3D 蛋白質と共沈された。一方、GDI-2 蛋白質は HA-Rab3D 蛋白質とは共沈されなかった。この結果より、膵腺房細胞においては GDI-1 蛋白質が Rab3D 蛋白質に結合し Rab3D 蛋白質の GDP/GTP サイクルを制御していることが示された。さらに、GDI 蛋白質のチロシンリン酸化が GDI 蛋白質と Rab 蛋白質の相互作用を増強していることが報告されており、GDI-1 蛋白質と Rab3D 蛋白質間の相互作用の制御の情報伝達系を解明するために、マウス膵腺房での GDI-1 蛋白質のチロシンリン酸化に対する AM および CCK の作用を抗フォスフォチロシン抗体を用いて検討した。CCK は GDI-1 蛋白質のチロシンリン酸化を増強し、一方 AM は CCK によって増強された GDI-1 蛋白質のチロシンリン酸化を抑制した。この結果より、AM および CCK が GDI-1 蛋白質のリン酸化を介して Rab3D 蛋白質の GDP/GTP サイクルを制御していることが示唆された。

最後に、HA-Rab3D 蛋白質と GDI-1 蛋白質の相互作用に対する、AM および CCK の作用を検討した。CCK は HA-Rab3D 蛋白質に結合する GDI-1 蛋白質量を増加させた。一方、AM は CCK によって増加した HA-Rab3D 蛋白質の GDI-1 蛋白質結合量を減少させた。この結果より、AM および CCK は、Rab3D 蛋白質と GDI-1 蛋白質の相互作用を調節することによって Rab3D 蛋白質の GDP/GTP サイクルを制御し、その結果膵外分泌を調節していると考えられた。

本研究において、AM は膵腺房細胞の特異的受容体を介し、カルシウム感受性を低下させることにより調節性膵外分泌を抑制していることが明らかと

なった。さらにこのカルシウム感受性を制御する分子機構として、CCK は GDI-1 蛋白のチロシンリン酸化を促進させ Rab3D 蛋白と GDI-1 蛋白の結合を増大させることにより、Rab3D 蛋白活性を亢進させ、その結果調節性膜外分泌を増強していると考えられた。一方、AM は CCK 刺激による GDI-1 蛋白のリン酸化を抑制することにより Rab3D 蛋白の活性を低下させ、調節性膜外分泌を抑制していると考えられた。