



## Presence and release of calcitonin gene-related peptide in rat stomach

乾, 哲也

---

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1990-05-09

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙1432

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2001432>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏名・(本籍) 乾 喬也 (和歌山県)

学位の種類 医学博士

学位記番号 医博ろ第1167号

学位授与の要件 学位規則第5条第2項該当

学位授与の日付 平成2年5月9日

学位論文題目 PRESENCE AND RELEASE OF CALCITONIN GENE-RELATED PEPTIDE IN RAT STOMACH  
(ラット胃の CALCITONIN GENE-RELATED PEPTIDE (CGRP) の存在と分泌)

審査委員 主査教授 藤田拓男  
教授 齊藤洋一 教授 千葉勉

### 論文内容の要旨

#### 緒言

Calcitonin gene-related peptide (CGRP) はカルチトニン遺伝子より組織特異的なRNAスプライシングにより作られる37個のアミノ酸残基によりなるペプチドである。CGRPは中枢および末梢神経系及び消化管に分布している事が免疫組織学的方法およびラジオイムノアッセイ (RIA) により確認されており、この事はCGRPが消化管において重要な役割を果している事を示唆している。実際、胃運動の抑制や胃液の分泌等の作用が報告されており、また我々もCGRPがラットや犬の胃のソマトスタチン分泌を刺激する事を明らかにした。一方、最近の研究は胃を含む消化管のCGRPが主にカプサイシン感受性の求心性神経に局在しているという事を明らかにしている。

従ってこの研究では胃におけるCGRPの役割をさらに詳しく追及する目的で、胃におけるCGRPの局在のみならず単離胃灌流標本からのCGRP分泌を検討した。

#### 実験材料と方法

実験動物： 実験には300～350gのWister系雄ラットを用いた。

組織CGRP含量： 8頭の実験動物を一夜絶食の後断頭し直ちに胃を摘出し噴門部、胃底部、前庭部及び幽門部に分け、各部位を粘膜層と筋層に分離した。組織を0.1規定酢酸で15分間煮沸し polytron mixer で均等化し1800gで30分間遠心分離して上清を凍結乾燥して-20°Cで保存した。保存した検体はアッセイ溶液に溶解しCGRPのRIAに供した。

単離胃灌流実験： 一夜絶食の後、実験動物を抱水クロラール (400mg/kg体重、腹腔内投与) で麻酔し既報の方法で胃を単離した。実験は全て95%酸素と5%二酸化炭素の混合ガスを供給した5.5mM

ブドウ糖、4.6%デキストラン（平均分子量7,000）を含む37°CのKrebs-Ringer 重炭酸緩衝液を左胃動脈から2ml/分の流速で灌流する事により行った。20分の前灌流の後それぞれの刺激物質を15分間注入し胃静脈からの流出液を1または2分毎にアプロチニン（50U/ml）を入れた試験管に採取した。デキストランを除去するために2容の0.35規定酢酸を含むアセトンを加え攪拌、遠心分離した後上槽を凍結乾燥した。またゲル・クロマトグラフィーおよび高速液体クロマトグラフィーにかけるためにSep-pak C-18で流出液を精製し凍結乾燥した。

ゲル・クロマトグラフィーおよび高速液体クロマトグラフィー： 組織と流出液の抽出物は1mlの1規定酢酸で再溶解し10ml/hの流速でSephadex G-50 fine (1 x 100cm) カラムにかけた。逆相高速液体クロマトグラフィーは0.1%三弗化酢酸（TFA）で平衡したμBondapak C-18 カラムに0～50%のアセトニトリル濃度勾配をかけてCGRP様免疫活性を溶出させた。さらに高速液体クロマトグラフィーのCGRP様免疫活性のピークは同一のSephadex G-50 カラムにかけどの位置に溶出されるか調べた。

CGRPのRIA： 実兎を合成CGRPで免疫して得たCGRP特異抗血清により行った。最小感度は15pg/mlでありアッセイ内およびアッセイ間の変動係数は4.8%および8.0%であった。

## 結果

CGRP様免疫活性は胃のどの部分にも検出され、特に幽門部の含量が多く、筋層の含量は粘膜層の含量の9～10倍を示した。筋層および粘膜峡の酸抽出のゲル・クロマトグラフィーでは3つのピークが明らかであり、1つめの最も大きいピークが合成CGRPに相当する位置に溶出された（図1）。高速液体クロマトグラフィーでも同様に3つのピークが溶出された。

単離灌流標本からのCGRPの基礎分泌は21±3pg/mlでありこれは灌流期間を通じて変わらなかつた。ジ・ブチリル・サイクリックAMP (dbcAMP) ( $10^{-2}$ M) とテオフィリン (5mM) は刺激開始後それぞれ14分後と6分後に67±4pg/ml, 78±3pg/mlを頂値として有意にCGRP分泌を増加させた（図2）。これに対してグルカゴン ( $10^{-7}$ M) はCGRP分泌に対して有意の影響をおよぼさなかった（図3）。胃からの流出液の抽出物のゲルクロマトグラフィーおよび高速液体クロマトグラフィーでは組織の抽出液と同様のパターンが認められた（図1, 2）。

高速液体クロマトグラフィーのCGRPの1番目、2番目および3番目のピークをSephadex G-50 カラムにかけるとそれぞれ3番目、2番目および1番目の位置に溶出された。またゲルクロマトグラフィーおよび高速液体クロマトグラフィーのそれぞれのピークは活性炭に吸着され、その希釈曲線はRIAの標準曲線とほぼ平行であった。

## 考察

この研究ではCGRPがラットの胃、特にその筋層に多く存在する事が明らかになった。この所見はCGRP陽性細胞が粘膜下層および筋層に多く存在するという免疫組織化学的な方法による報告と一致する。ゲル・クロマトグラフィーおよび高速液体クロマトグラフィーでともに3つのピークが見

出され、うち1つは合成CGRPと同じ位置に溶出された。他の2つのピークは使用した抗血清がC末端を認識する事からC末端フラグメントである事が予想される。しかし我々が既に報告したようにラット肝細胞のCGRP受容体にC末端フラグメントが結合しない事などからこれらのピークが生物学的活性を有する事については懐疑的である。

この研究において単離胃灌流標本からCGRPが分泌されたという所見は重要である。これは流出液のCGRPが組織と同一の3つの成分から構成されているという事実によって裏付けられている。胃CGRPの分泌はdbcAMPおよびテオフィリンにより刺激された。このことにより adenylate cyclase-cyclic AMP系が胃のCGRP分泌機構に関与している事が示唆された。しかし細胞内cyclic AMPを増加させてホルモン分泌を刺激するとされているグルカゴンは胃のCGRPに何等影響を及ぼさなかった。このグルカゴンに対する不応性胃のCGRP産生細胞にグルカゴン受容体が欠如しているかまたはCGRPを含む細胞体が存在しない事によると思われる。

CGRPは強力な胃酸抑制物質である事が知られており、我々もCGRPがラット胃灌流標本からのソマトスタチン分泌を刺激する事を報告している。また我々は特異受容体がラット肝細胞膜に存在する事も報告した。従って胃から分泌されたCGRPが生理的な条件で胃の酸分泌やソマトスタチン分泌を調節するか否か、また門脈循環を経て肝細胞に作用するか否か、また門脳循環を経て肝細胞に作用するか否かについてさらに検討する必要がある。一方腸管のCGRPはカプサイシン感受性の求心性ニューロンに存在し、その細胞体は脊髄後根の神経節に存在するという最近の報告がある。従って求心性ニューロンの末端から分泌されるペプチドであるという事が胃の機能におけるCGRPの独自の役割を意味している可能性がある。

### 論文審査の結果の要旨

カルチトニン遺伝子関連蛋白はカルチトニン合成に関与するDNAが器官特異的に切断を受け、カルチトニンが主として甲状腺のC細胞で合成されるのとことなり中枢及び末梢神経系の他に、消化管でも多くつくられ、消化管の機能に重要な役割を果していると考えられる。即ちCGRPは強力な胃酸分泌抑制作用をもつとともに、消化管の運動を抑制し、又、胃ソマトスタチン分泌を刺激する。胃においてソマトスタチンはカプサイシンに感受性のある求心線維に存在し、知覚神経との関連が示唆される。この様に胃におけるCGRPの存在場所と機能の関係は重要な問題であるので、本研究者はラットを用いて検討した。

体重300-350グラムの成熟雄ウイスターラットを用い、一夜絶食後断頭し胃を迅速に取り出し、噴門、胃底、前庭、幽門部に分離した。粘膜及び筋層を分離した後、0.1N酢酸存在下で15分煮沸、ホモジナイズした。冷却後、1800×gで30分間2℃で遠心し、上清を蒸発乾固し保存し、再び緩衝液に溶解してラジオイムノアッセイによってCGRPを測定した。胃の灌流は抱水クローラル麻酔下に胃を遊離し、4.6%デキストランで2ml/分の速度で1回だけ灌流し、ジブチリルCAMP、デオフィリン、グルカゴンを加えた。流出液及び胃壁抽出物はゲルクロマトグラフィーとHPLCで分画し各

分画中のCGRPをラジオイムノアッセイで測定した。

CGRP様の免疫活性は、ラット胃の各部分にみとめられたが、筋層の厚い幽門部での含量は、これに高く、筋層における濃度は、粘膜部の9-10倍に達した。分画によるとCGRP活性は三つのピークを示し、その中の最初のものが、合成CGRPと同じ性質を示した。遊離ラット胃からのCGRPの放出は $21 \pm 3$  pg/mlであってこれは灌流期中は変化しなかった。ジブチリルCGRPもテオフィリンもCGRPの分泌を有意に増加させ14分及び6分後、夫々 $67 \pm 4$ ,  $78 \pm 3$  の最高値に達した。これに反しグルカゴンはCGRPの分泌に影響をあたえなかった。灌流液中のCGRPの分画は組織抽出物におけるそれに対応するものであった。今回用いたCGRPのラジオイムノアッセイはC末端に反応する抗体を用いているので、三つのピークの中にはC末端に反応する抗体を用いるので、これらはC末端断片である可能性も考えられる。思から放出されるCGRPが直接胃で胃酸分泌の抑制を起こすか、或いは肝で既に証明されている肝細胞膜CGRP受容体を介して血糖上昇等に関与する可能性も考えられる。

以上本研究者は、従来殆ど行われなかったCGRPの胃分布及び胃からの放出について研究し、新しい知見を得たものであり、価値ある集積と考えられる。よって本研究者は、医学博士の学位を受け資格があると考えられる。