



## Up-regulation of H2 receptor and adenylate cyclase in rabbit parietal cells during the treatment with H2 receptor antagonists

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-11-05 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 竹内, 健 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10271/1073">http://hdl.handle.net/10271/1073</a>

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博第 220号	学位授与年月日	平成 9年 3月26日
氏名	竹内 健		
論文題目	Up-regulation of H <sub>2</sub> receptor and adenylate cyclase in rabbit parietal cells during the treatment with H <sub>2</sub> receptor antagonists (H <sub>2</sub> 受容体拮抗剤投与による家兔胃壁細胞の H <sub>2</sub> 受容体とアデニレートサイクラーゼの up-regulation について)		

博士(医学) 竹内 健

論文題目

Up-regulation of  $H_2$  receptor and adenylate cyclase in rabbit parietal cells during the treatment with  $H_2$  receptor antagonists

( $H_2$ 受容体拮抗剤投与による家兎胃壁細胞の  $H_2$ 受容体とアデニレートサイクラーゼの up-regulation について)

論文内容の要旨

[はじめに]

胃酸分泌は胃底腺領域を中心に分布する壁細胞により行われる。壁細胞膜上にはヒスタミン  $H_2$ 受容体、ムスカリン性アセチルコリン m3受容体、ガストリン/CCK-B受容体が存在し、それぞれヒスタミン、アセチルコリン、ガストリンが結合し酸分泌刺激を伝達する。ヒスタミン  $H_2$ 受容体拮抗剤はその強力な減酸効果により、消化性潰瘍患者の初期治療及び維持療法において重要な位置を占めている。この  $H_2$ 受容体拮抗剤投与継続中に、 $H_2$ 受容体拮抗剤の減酸効果の低下が潰瘍患者だけではなく健常者でもみられることが報告されており、 $H_2$ 受容体拮抗剤抵抗性潰瘍の原因の一つとして考えられている。しかし、この  $H_2$ 受容体拮抗剤に対する‘薬剤耐性現象’のメカニズムは十分に検討されていない。そこで、このヒスタミン  $H_2$ 受容体拮抗剤の継続投与による胃壁細胞の酸分泌機構の変化とその薬剤耐性現象への関与を検討した。

[材料ならびに方法]

NZW系ラビット(2kg)にヒスタミン  $H_2$ 受容体の特異的拮抗剤であるシメチジン100mg/kg ×2/dayを1週間静脈内投与した群と生理食塩水を1週間投与した群にわけ、それぞれにおいて遊離胃腺を用いてヒスタミン、カルバコール、ガストリン刺激による酸分泌能を $^{14}C$ -アミノピリン蓄積法で測定しAP ratioで表した。次に、NZW系ラビット(2kg)をosmotic pumpを用い、ヒスタミン  $H_2$ 受容体の特異的拮抗剤であるファモチジン10mg/dayを2週間持続投与した群とその溶解液のみを投与した群にわけ、それぞれパーコール密度勾配法により壁細胞を分離し、その粗膜分画において、 $^{125}I$ -アミノポテンチジンによる  $H_2$ 受容体の結合実験を行った。アデニレートサイクラーゼ刺激性のGTP結合蛋白質である  $G_s\alpha$ 、抑制性の  $G_i\alpha$ 、さらにムスカリン性 m3受容体およびガストリン/CCK-B受容体に共役している  $G_q/11\alpha$ を各GTP結合蛋白質に対する特異抗体を用いたイムノプロット法で検出し、各プロットをデンシトメーターで測定した。兎の脳蛋白での発現量を基準として各GTP結合蛋白質の発現量を検討した。更に各群間において、無刺激及びヒスタミン、ヒスタミンとシメチジン、ヒスタミンとGTP、GTP $\gamma$ S、フォルスコリンの各刺激下でのアデニレートサイクラーゼ活性をサイクリックAMP産生量で検討した。

[結果]

(1) 酸分泌能：無刺激の状態では  $H_2$ 受容体拮抗剤投与群と対象群のAP ratioはそれぞれ  $14 \pm 1.5$ と  $7.8 \pm 0.6$ と前者で有意な増加を示し( $p < 0.01$ )、更にシメチジン  $10^{-4}M$ 存在下においても  $H_2$ 受容体拮抗剤投与群は対照群に比し有意なAP ratioの増加を認めた。ヒスタミン及びカルバコール刺激ではともに  $10^{-8}$ – $10^{-6}M$ で濃度依存性の酸分泌刺激効果を示し、また全ての濃度にわたり酸分泌能の

亢進が認められた。ヒスタミン刺激では  $H_2$  受容体拮抗剤投与群と対照群の  $ED_{50}$  値に有意な差は認められなかった ( $7.0 \times 10^{-6}$  vs.  $7.5 \times 10^{-6} M$ )。ガストリン存在下では濃度依存性の酸分泌刺激効果は認められなかったが、全ての濃度にわたり無刺激時と同程度の酸分泌能亢進を認めた。

- (2) 結合実験： $H_2$  受容体拮抗剤投与群と対象群では  $^{125}I$ -アミノポテンチジンの親和性に変化は無かった ( $K_d$  値： $0.15 \pm 0.015$  vs.  $0.12 \pm 0.007 nM$ )。Bmax 値は有意に増加していた ( $226.3 \pm 21.1$  vs.  $146.9 \pm 14.2 fmol/mg-protein, p = 0.014$ )。
- (3) GTP 結合蛋白質： $H_2$  受容体に共役している  $G_s \alpha$  は 45kDa と 52kDa に蛋白の発現を認め、 $H_2$  受容体拮抗剤投与群で有意に蛋白量が増加していた (45+52kDa： $\%rabbit-brain-protein$ ； $134.7 \pm 6.9$  vs.  $113.9 \pm 5.7, Mean \pm SE, p < 0.05$ )。 $G_i \alpha$  及び  $G_q/11 \alpha$  では対照群と比較し有意な差は認められなかった。
- (4) アデニレートサイクラーゼ活性：無刺激の状態とヒスタミン刺激時に  $H_2$  受容体拮抗剤投与群で有意に活性の上昇が認められた (basal： $24.48 \pm 2.69$  vs.  $17.25 \pm 1.31$ ；histamine： $58.35 \pm 6.41$  vs.  $37.79 \pm 4.3 pmol/mg-protein/min$ ；Mean  $\pm SE, p < 0.05$ )。100  $\mu$  MGTP 存在下でのヒスタミン刺激、GTP $\gamma$ S 及びフォルスコリンの各刺激下、更にシメチジン存在下でのヒスタミン刺激では有意な差は認められなかった。

#### 〔結論〕

$H_2$  受容体拮抗剤の持続投与により胃壁細胞の酸分泌能亢進状態がおこることが観察された。この現象は  $H_2$  受容体拮抗剤存在下でも観察されたことから、 $H_2$  受容体拮抗剤の持続投与後に認められた  $H_2$  受容体の up-regulation は関与しないと考えられた。さらに  $H_2$  受容体シグナル伝達機構の下流に位置する GTP 結合蛋白質の発現量の増加とアデニレートサイクラーゼ活性の増加を認めたことから、サイクリック AMP の増加が薬剤耐性現象の一因になっていることが示唆された。

### 論文審査の結果の要旨

胃の壁細胞からの酸分泌はヒスタミン、アセチルコリン及びガストリンによりそれぞれ  $H_2$  受容体、ムスカリン性  $m_3$  受容体、ガストリン /CCK-B 受容体を介して制御されている。 $H_2$  受容体細胞内メッセンジャーは cAMP であり、 $m_3$  受容体とガストリン /CCK-B 受容体は  $Ca^{2+}$  を介する機構でシグナルを伝達する。各シグナル伝達系間に crosstalk があり、たとえば cAMP 動員ホルモンと  $Ca^{2+}$  動員ホルモンの相乗作用が観察されている。

ウサギ壁細胞では胃酸分泌促進の主要機構は cAMP 経路と推定されており、ヒトでも  $H_2$  受容体拮抗薬は協力的な減酸作用を示すので消化性潰瘍の有効な治療薬として使われている。しかし、 $H_2$  受容体拮抗薬の投与を継続すると減酸効果の低下が起こることが知られており、これが  $H_2$  受容体拮抗薬抵抗性潰瘍の原因の一つと考えられる。申請者はこの薬剤耐性現象の分子機構の解明を目的として、ウサギに  $H_2$  受容体拮抗薬を継続投与した時の壁細胞の酸分泌制御系の変化を解析した。具体的には、 $H_2$  受容体の特異的拮抗薬であるシメチジン (100mg/kg  $\times$  2/d, 1 週間) あるいはファモチジン (10mg/d, 2 週間) を投与したウサギ (2 kg) から胃腺あるいは壁細胞の単離し、上記三種の secretagogues に対する酸分泌の応答と cAMP 経路の成分の活性あるいは量を測定して対照ウサギ (薬剤の溶解液のみ同期間投与) と比較した。

酸分泌の指標として測定した  $^{14}C$ -アミノピリンの遊離胃腺への取り込みは、無刺激時にもヒスタミン

やカルバコールの存在下でも、シメチジン投与群の方が対照群より有意に高かった。このシメチジン投与群の方が高値を示す無刺激時の<sup>14</sup>C-アミノピリンの取り込みは $10^{-4}$ M シメチジン（実験的に $10^{-4}$ M ヒスタミンの効果を相殺する）の反応液への添加によりほとんど影響を受けなかったので、H<sub>2</sub>受容体の活性化とは無関係の酸分泌を表すと理解された。

単離壁細胞から調整した膜標品を用いて行った cAMP 経路の成分の解析では、<sup>125</sup>I-アミノポテンチジン（H<sub>2</sub>拮抗剤）結合の Bmax とむ無刺激時のアデニル酸シクラーゼ活性にファモチジン長期投与による増加が認められた。Gs $\alpha$ もわずか（20%以下）ではあるが増加していた。<sup>125</sup>I-アミノポテンチジン結合の Kd 及びフォルスコリン存在下でのアデニル酸シクラーゼ活性には変化が認められなかった。

以上より、H<sub>2</sub>受容体拮抗薬の持続投与による H<sub>2</sub>受容体及び無刺激時のアデニル酸シクラーゼ活性の up-regulation が明かになり、申請者は H<sub>2</sub>受容体拮抗薬に対する耐性には後者が主に関与するのではないかと推測した。

本研究に関して次のような質疑、試問を行った。

- 1) プロトンポンプ阻害剤でも同様の耐性が生じるか
- 2) 胃酸分泌制御における PKA, CaMK-II および PKC の標的蛋白質
- 3) 実験動物としてウサギを選んだ理由
- 4) <sup>14</sup>C-アミノピリンの取り込みが胃酸分泌を反映することの理論的根拠、プロトンポンプによる H<sup>+</sup>放出と H<sup>+</sup>産生との連関
- 5) Gs $\alpha$  の量及びアデニル酸シクラーゼ活性の測定をサンプル量に対する比例関係が成立する条件で行ったか否か
- 6) “inverse agonism” という現象が壁細胞にもあるとすれば、H<sub>2</sub>受容体拮抗薬の継続投与ではまず受容体と拮抗薬の結合が引き金となって受容体が増加し、増加した受容体に起因するがしかしアゴニストには無関係で tonic な酸の分泌が増加するという可能性があるのではないか
- 7) 質問6) と関連して、無刺激時に測定されるアデニル酸シクラーゼ活性は膜標品中に受容体へのリガンド結合とは無関係に存在する GTP-結合や Gs $\alpha$ の量を反映すると考えてもよいか、それともアデニル酸シクラーゼは Gs $\alpha$ やフォルスコリンの作用がなくて多少の活性を示すのか
- 8) (H<sub>2</sub>受容体拮抗薬の継続投与中に痙攣を起こしたウサギがあったという申請者の発表と関連して) 適正な拮抗薬の投与量とその判断基準、痙攣の機構

これらの質問に対する申請者の応答は概ね適切であり、問題点も理解していた。また研究そのものも新しい知見を含むと評価された。以上により、本論文は博士（医学）の学位授与に値する内容を備えていると論文審査委員全員一致で判定した。

論文審査担当者 主査 教授 市 山 新  
副査 教授 中 島 光 好 副査 講師 田 港 朝 彦