

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 18 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590316

研究課題名(和文) 拘束水浸ストレスによる胃粘膜ヒスタミンの代謝変動

研究課題名(英文) Effects of restrained water immersion stress on the metabolism of histamine in the gastric mucosa.

研究代表者

竹村 基彦 (Takemura, Motohiko)

兵庫医科大学・医学部・教授

研究者番号：70207009

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：30分間の拘束水浸ストレス(WRS)マウスとラットの胃粘膜に軽度の潰瘍を起こしていた。ヒスタミンはマウスで1.6倍程度、ラットで1.3倍増加した。抗ヒスタミンNメチル基転移酵素(HMT)抗体は、ラット腎臓で発現を検出したが、胃粘膜は検出できなかった。定量PCRで胃粘膜でHMT mRNAを検出できたが、WRSによる発現の変化は検出されなかった。抗ヒスチジン脱炭酸酵素抗体はラット胃粘膜で単一分子量のバンドを検出したが、WRSによる発現の変化はなかった。抗ジアミン酸化酵素抗体は発現が検出できなかった。リン酸化ERK1/2, SAPK/JNK, p38抗体ではWRSによるリン酸化の変化はなかった。

研究成果の概要(英文)：Restrained water immersion stress of 30 min (WRS) in mice and rats caused mild ulcer in the gastric mucosa. Histamine content in the gastric mucosa increased 1.6 and 1.3 times, respectively. Anti-histamine N-methyltransferase (HMT) antibody detected a band in rat kidney, but not in gastric mucosa. Quantitative PCR detected HMT mRNA in gastric mucosa, but the expression level did not change by WRS. Anti-histidine decarboxylase antibody detected a single band in the rat gastric mucosa but the content did not change by WRS. Anti-diamine oxidase antibody failed to detect expression in the gastric mucosa. The phosphorylation level of MAP kinases (ERK1/2, SAPK/JNK, p38) did not change by WRS.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・薬理学一般

キーワード：ヒスタミン 拘束水浸ストレス 代謝酵素

1. 研究開始当初の背景

ヒスタミンはヒスチジンからヒスチジン脱炭酸酵素 (L-histidine decarboxylase, HDC) により合成される。マスト細胞では HDC の翻訳産物は 74-kDa であり、翻訳後に C-末端側が切断されて 53-kDa になり、活性が高まるとともに分泌顆粒内に移動する (Tanaka, S., et al., J. Biol. Chem., 273, 8177-8182, 1998)。マスト細胞表面の IgE のクロスリンクなどでヒスタミン放出を誘発すると HDC 活性が増加するが、この時、74-kDa から 53-kDa への変換も亢進することが示されている (Furuta, K., J. Biol. Chem., 282, 13438-13446, 2007)。

一方、マスト細胞 / 好塩基球の成熟に伴う HDC の発現量の増加は、HDC 遺伝子上流領域の脱メチル化によるとの報告もある (Kuramasu, A., et al., J. Biol. Chem., 273, 31607-31614, 1998; Suzuki-Ishigaki, S., et al., Nucl. Acid. Res., 28, 2627-2633, 2000) ことから、少なくともマスト細胞では HDC 酵素活性は転写レベルと翻訳後の両方のステップで調節されていると考えられる。

ヒスタミンは視床下部結節乳頭核の神経細胞、胃粘膜 ECL 細胞、結合組織マスト細胞、血液好塩基球で合成、放出され、情報伝達に関わっている。マスト細胞 / 好塩基球と神経細胞 / ECL 細胞ではヒスタミンの貯蔵、分泌様式が大きく異なっている。マスト細胞ではヒスタミンは多糖類に結合して巨大な分泌顆粒中に貯蔵され、その半減期は分泌刺激がなければ 20 日程度である。分泌は Fc 受容体のクラスティングによって起こり、トラニラストなどの「ヒスタミン遊離防止薬」によって阻害され、compound48/80 で増強される。一方、神経細胞 / ECL 細胞ではヒスタミンを貯蔵している分泌顆粒は他の情報伝達分子を含む神経細胞や内分泌細胞と形態が類似しており、ヒスタミンの半減期は数時間で、「ヒスタミン遊離予防薬」や compound48/80 の影響を受けない。

神経細胞ではヒスタミンの放出が増加すると HDC 活性が増加すると言われているが、詳細は不明である。拘束水浸などのストレスをマウスに負荷すると胃粘膜に出血性病変が生じるが、この時に胃粘膜のヒスタミン量の増加と HDC 活性の増加が起こる。IL-18 KO マウスでは 2 時間の拘束水浸ストレス負荷でも胃粘膜の HDC 活性、ヒスタミン量は増加せず、出血性病変も生じないことから、ストレスによる HDC 活性増加は IL-18 を介するとの報告もある (Seino, H., et al., Am. J. Physiol., 292, G262-267, 2007)。IL-18 の細胞内シグナル伝達は MAPK 経路とされるが、MAPK による HDC の活性調節は全く報告がない。又、HDC 遺伝子座は単一であり、オルタナティブスプライシングの報告はな

いことから、ECL 細胞や神経細胞でもマスト細胞と同一の mRNA が転写されると推定されるが、非マスト細胞での HDC 翻訳産物の分子量や翻訳後修飾については報告がない。神経細胞で HDC 様免疫活性は分泌顆粒ではなく細胞質全体に認められている (Hayashi, H., et al., J. Comp. Neurol., 229, 233-241, 1984)。

哺乳動物におけるヒスタミンの不活性化はジアミン酸化酵素 (diamine oxidase, DAO) またはヒスタミン N-メチル基転移酵素 (histamine N-methyltransferase, HMT) のいずれかによって行なわれる。ラット、マウスの胃粘膜には DAO 活性はほとんど認められず (Kitanaka, J. et al., Eur. J. Pharmacol., 437, 179-185, 2002)、ヒスタミンの不活性化は HMT によって行なわれ、主要代謝産物は N-メチルヒスタミンであると考えられている (Loenroth, H., et al., Scand. J. Clin. Lab. Invest., 49, 23-31, 1989)。ヒトでは食事摂取と同調して N-メチルヒスタミンとイミダゾール酢酸抱合体の両方が増加するとの報告があること (Imamura, I., et al., J. Biochem., 96, 1931-1937, 1984)、マウスでは肝臓に DAO 活性が高いことから、胃粘膜で遊離したヒスタミンの一部は門脈を経て肝臓で DAO により代謝されている可能性はあるが、ECL から放出されるヒスタミンの主要な代謝経路はメチル化であると思われる。

私たちはこれまで、HMT を中心にヒスタミン代謝について研究してきた。過去にラット、ヒト、マウス HMT cDNA、HMT 遺伝子の構造解析を行ない、in situ hybridization 法による HMT mRNA の分布についてもマウス及びラットで解析した。又、覚醒アミンによる行動感作の形成過程、異常行動の発現に対するヒスタミン神経系の関わりについて研究中である。今回は、脳、マスト細胞とならんで古くからヒスタミンによる情報伝達が主要な生理 / 病理的意義を持つ胃粘膜に着目した。

2. 研究の目的

今回は、非マスト細胞 / 好塩基球で HDC 活性上昇の条件がはっきり判っている胃粘膜 ECL での HDC の活性上昇メカニズムについての検討を企画した。拘束水浸ストレス負荷を加え、胃粘膜でのヒスタミン、HDC、HMT 活性、タンパク量、mRNA 量を定量し、ストレス負荷がこれらに与える影響を観察する。タンパク定量にはウェスタンブロッティングを用いて、HDC の分子量を算出し、胃粘膜での HDC の翻訳後プロセッシングがマスト細胞と異なるか否かを検討する。これにより、HDC の活性変動に対する mRNA 量の増加 (誘導現象) とプロセッシングのいずれの影響が大きいのかも見積もることができる。

拘束水浸ストレスによる胃潰瘍の発現には IL-18 が大きな役割を担うとの報告がある。一方、IL-18 受容体の下流に分裂促進因子活性化タンパク質リン酸化酵素(MAPK)が位置するとされている。そこで、IL-18 受容体活性化から HDC 酵素活性増加へのシグナル伝達経路を調べる第1歩として拘束水浸ストレス負荷後の胃粘膜での MAPK のリン酸化状態を観察する。

拘束水浸ストレス負荷により胃粘膜でヒスタミンが増加し、HDC 活性が上昇することは報告されているが、ヒスタミン不活性化酵素が変動するか否かについては報告がない。上述のように、胃粘膜でのヒスタミンの不活性化は主に HMT によって行なわれているとされている。そこで、HMT, DAO 酵素活性、N^ε-メチルヒスタミン量をヒスタミン量と同時に測定し、ストレスによる胃病変におけるヒスタミン不活性化経路の関与を明らかにしたいと考えた。モルモット脳で HMT 酵素活性に日内変動があるとの報告 (Tuomisto, L. and Tuomisto, J., *Med. Biol.*, 60, 204-209, 1982) はあるが、これ以外に HMT 酵素活性や発現量が変化したとの報告はなく、一般的にはこの酵素は特定の臓器、細胞に構成的に発現されていると考えられている。

3. 研究の方法

(1)終夜絶食したマウスおよびラットに30分間の拘束水浸ストレス(WRS)を加えて、胃粘膜の変化を肉眼的に観察するとともに、ヒスタミン量を定量した。対照群はWRSなしの動物を用意した。

(2)終夜絶食したラットに30分のWRSを加えた後、食道、胃底部、胃体部、幽門部、腎臓を採取し、抗HMT抗体、抗HDC抗体、抗DAO抗体を用いてウェスタンブロットを行った。HMT抗体はHMTのrat/mouseに共通なC末端の部分ペプチド(18アミノ酸)、NH₂-GKVLFNNSLFIWVEANV-COOHを合成し、ウサギ2羽を免疫して血清を得た後、このペプチドのアフィニティーカラムで精製することで作成した。この自作抗体以外に市販の抗ヒトHMT抗体2種(Cusabio社製及びAbnova社製。Cusabio社製はヒト、マウス、ラットHMTと反応するとされている)を用いた。HDC抗体はMonosan社製抗ヒトHDCウサギ抗体(ヒト、マウス、ラット、イヌ及びモルモットHDCに反応するとされている)を用いた。DAO抗体はNovus Biologicals社製のDAOのC末端50アミノ酸残基からなる合成ペプチドに対するウサギ抗体を用いた。ヒト、マウス、ラット、ウシ、ブタ、ウサギなどのDAOに反応するとされている。

(3)マウスをWRS処理30分間有りまたは無しで処理して胃底部、胃体部、幽門部からRNA

を抽出し、HMT遺伝子の発現変化を定量PCRにより調べた。マウスHMT cDNAの推定翻訳開始点からの21塩基(5'-ATGGCATCTTGCATGAGGAGC-3')及び翻訳終了点の上流の相補配列21塩基(5'-TTATACATTTGCCTCAACCAC-3')をプライマーに用い、GAPDH mRNAに対するプライマー(5'-CCATCTTCCAGGAGCGAGATC-3'及び5'-TTGCTGTAGCCAAATTCGTTGTC-3')の増幅産物と比較する事でHMT mRNAを定量した。

(4)30分間WRSを加えたラットの食道、胃底部、胃体部、幽門部、腎臓を採取し、抗リン酸化MAPキナーゼ抗体を用いたウェスタンブロットングによりMAPKのリン酸化の程度に変化があるかを検討した。抗体はBD transduction Laboratories社の"MAP kinase Activation Sampler Kit"を用いた。ERK1,phosho-ERK1/2 (pT202/pY204), JNK/SAPK1, phosho-JNK (pT183/pY185), p38,phosho-p38に対する抗体が含まれる。

4. 研究成果

(1)30分間のWRSを加えたマウスおよびラットの胃粘膜を肉眼的に観察すると、軽度の潰瘍が生じていた。採取した胃粘膜でヒスタミンを定量すると、マウスの胃粘膜ではWRS処理によって1.6倍程度、ラット胃粘膜ではWRSによって1.3倍程度の増加が観察された。Seino, H.らの報告(*Am. J. Physiol.*, 292, G262-G267, 2007)によればマウスでは2時間のWRSにより顕著な出血を生じ、ヒスタミン含量は1.7倍程度に増加する。我々の結果は、ヒスタミン含量の増加は顕著な出血に先行し、2時間後とほぼ同等の増加が30分で既に生じている事を示している。

(2)抗HMT抗体は、いずれの抗体も、WRS処理有り無しいずれのラットにおいても腎臓のみで発現を検出できたが、食道、胃、十二指腸では発現を検出できなかった。胃粘膜は、胃底部、胃体部、幽門部に分けて行ったが、発現を検出できなかった。Loenroth, H.ら(*Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 49, 23-31, 1989)はヒト胃粘膜生検標品でHMT活性を検出し、部位による変化は見られなかったとの事である。ノザンブロットによるmRNAの組織分布でも、別の抗体を用いたウェスタンブロットでも、ラット、マウスの胃粘膜でのHMT発現量はモルモット胃粘膜と比較すると少なく(Kitanaka, N.ら, *Jpn. J. Pharmacol.*, 88, 85-92, 2002, Takemura, M.ら, *Life Sci.*, 54, 1059-1071, 1994)、マウスではDAO活性が認められたこと(Kitanaka, J.ら, *Eur. J. Pharmacol.*, 437, 179-185)、ヒト、モルモットとマウス、ラットではヒスタミンの血漿中濃度が大きく異なることから、胃粘膜ECL細胞から放出されるヒスタミンの不活性化のメカニズムは種によって異なっているのかも知れない。あるいは、本研究でのウェス

タンブロットの検出感度が不足している可能性もあるので、今後も引き続き検討の予定である。抗 HDC 抗体は、WRS 処理有り無しいずれのラットにおいても胃体部および幽門部において単一分子量のバンドが検出されたが、WRS の有無による有意な発現の変化は検出されなかった。Kazumori, H.ら (Am. J. Physiol., 286, G508-G514, 2004)はラット胃粘膜から分離した ECL 細胞でのウェスタンブロットにより 74, 54kDa の 2 本のバンドが抗 HDC 抗体に反応し、74k, 54k の両方が TGF- β により増加することを示している。Seino, H.ら (Am. J. Physiol., 292, G262-267)も 2 時間の WRS によりマウス胃粘膜で HDC 活性が 2.5 倍に増加することを認めている。我々の結果はこれらの報告とは大きく異なっている。既に 30 分でヒスタミン量が増加していることから、HDC 活性も(その前から増加している)と考えられ、また、マスト細胞での HDC の活性調節機構に関する Furuta, K.らの報告 (J. Biol. Chem., 282, 13438-13446, 2007)からも胃粘膜でも HDC は 74, 54kDa の 2 種類の存在形式がある可能性が極めて高いことから、我々のウェスタンブロットでは HDC が検出できていない可能性が高いと考えられ、今後は異なる抗体を用いたり検出系を変更して検討する予定である。抗 DAO 抗体ではいずれのラット組織においても WRS の有無に関わらず発現が検出できなかった。これについては、調べたラット臓器の DAO 含量が少なく、ウェスタンブロットの感度が不足していたと考えられる。今後は比較的活性の高い(J. Kitanaka ら、Eur. J. Pharmacol., 437, 179-185, 2002)空腸を加えて検討を続ける。

(3)いずれの組織においても HMT mRNA を検出する事ができたが、発現は低く、WRS による有意な発現の変化は検出されなかった。

(4)ERK1/2, SAPK/JNK, p38 の 3 種類の MAP キナーゼのリン酸化レベルをウェスタンブロットにより調べた。ラット食道、胃底部、胃体部、幽門部、腎臓でこれらの総タンパク、リン酸化体に相当すると考えられるバンドを検出することが出来たが、いずれの組織においても WRS の有無による有意なリン酸化状態の変化は検出されなかった。WRS による HDC の活性増加はこれらのキナーゼ以外の経路を介しているのかも知れない。一方で IL-18 欠損マウスでは WRS による胃潰瘍の発生、ヒスタミン量の増加、HDC 活性の増加がいずれも完全に消失する (Seino, H.ら Am. J. Physiol., 292, G262-267, 2007)ことから、WRS による HDC 活性上昇には IL-18 の関与が強く疑われる。IL-18 受容体は MyD88, IRAK, TRAF-6 を経て AP-1, NF- κ B を活性化する。一方、単離 ECL 細胞では TGF- β 刺激により HDC が誘導される。一方、IL-1, TNF- α , IL-6, IFN- γ では HDC mRNA に変動はない (Kazumori, H.ら Am. J. Physiol., 286, G508-G514,

2004)。今回の我々の結果からは ERK1/2, SAPK/JNK, p38 の WRS による HDC 活性上昇への関与は証明できなかった。今後は他のシグナル伝達分子の関与の有無を検討したいと考えている。

全体として、当初の予定を達成する事ができなかった。ヒスタミン定量系の設定に時間をとられた事、WRS により HDC タンパク量増加が証明できなかった事から、単離 ECL 細胞の調製や HDC 阻害薬によるヒスタミンの減少による HDC タンパク量への影響も試行したが、明確な結果を得るには至らなかった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等：なし

6. 研究組織

(1)研究代表者
竹村 基彦 (TAKEMURA, Motohiko)
兵庫医科大学・医学部・教授
研究者番号：70207009

(2)研究分担者
()

研究者番号：

(3)連携研究者
木村 信也 (KIMURA, Shinya H)

兵庫医科大学・医学部・講師
研究者番号： 70273703
長野 貴之 (NAGANO, Takayuki)
兵庫医科大学・医学部・助教
研究者番号： 10368516
