

助成番号 9953

水・電解質代謝におけるグアニリンファミリーの生理学的意義に関する研究

助成研究者：中里 雅光（宮崎医科大学 第三内科）

uroguanylinは、哺乳類の腸管と尿から単離された腸管-腎臓連関を結びつけるペプチドである。われわれはuroguanylinの構造解析・定量法ならびに免疫組織化学的手技を確立した。今回、血液・腹膜透析患者において血漿uroguanylin濃度を測定し、患者の臨床的状態と比較した。さらに生体内で最も酸性度が高く、Cl⁻分泌に機能している胃でのguanylin peptide familyの病態生理学的意義を解明するために、guanylinとuroguanylinの細胞局在、遺伝子発現ならびにGC-Cの分布について検討した。

透析前のuroguanylin濃度は腹膜透析、PEPA膜血液透析のいずれでも透析前に高く、透析後に減少した。胃でのuroguanylin産生細胞はヒスタミンを産生するenterochromaffin-like細胞であった。Zollinger-Ellison症候群のuroguanylin血漿濃度は、正常者の1.2倍に増加しており、プロトンポンプ阻害剤投与により正常に復した。uroguanylinが胃酸分泌を生理的に調節している可能性が示された。

助成番号 9953

水・電解質代謝におけるグアニリンファミリーの生理学的意義に関する研究

助成研究者：中里 雅光 (宮崎医科大学 第三内科)

①研究目的

グアニレート (GC)結合型受容体にはGC-A, GC-B, GC-Cの3種類があり、前2者には心房性ナトリウム利尿ペプチド(atrial natriuretic polypeptide; ANP)とその同族ペプチドであるB-type natriuretic polypeptide (BNP)とC-type natriuretic polypeptide (CNP)が結合し、水・Naの再吸収抑制と排泄促進ならびに血管トーンや血管内皮増殖の調節に関与している。GC-C受容体は腸管、腎臓、副腎、膵臓、気道、中枢神経系に存在し(1)、その内在性リガンドは共通した2個のS-S結合を持つuroguanylin (ウログアニリン、16アミノ酸残基)とguanylin (グアニリン、15アミノ酸残基)であることが、1993年以降明確にされてきた(2, 3)。uroguanylinとguanylinはGC-C受容体に結合し、細胞内cyclic GMP産生を促進して、腎臓と消化管上皮での水・Na⁺の吸収抑制とCl⁻分泌を齎らす。uroguanylinとguanylinはともに酸性ペプチドで、50%のアミノ酸相同性を示し、その構造や情報伝達機構ならびに生理作用の共通性から1つのペプチドファミリーを形成している。これまでにわれわれは、両ペプチドに関する基礎研究として、ヒトとラットのuroguanylinとguanylinのペプチド構造解析、radioimmunoassayによる定量法、組織含量ならびに体内分布、構造機能相関について報告してきた(4-10)。さらにuroguanylinのcDNAと遺伝子の塩基配列解析を行った(11, 12)。今回、下記の2点について解析をすすめた。

1. uroguanylinは経静脈投与で利尿作用、natriuresis、kaliuresisを引き起こす。また、単離した腎臓で尿中へのNa⁺、K⁺、水の分泌増加が認められている。

筆者らは、高塩食負荷ラットにおいて低塩食と比較してuroguanylinが増加し、 Na^+ 、 K^+ 、 Cl^- 、cGMPと相関することを報告している。

これらの報告は腎においてuroguanylinが水・電解質平衡に関与していることを示唆している。

さまざまなレベルの腎障害患者で、血漿uroguanylinと血清クレアチニンは相関している(13)。慢性腎不全の患者は特に末期腎不全患者では、糸球体濾過率や機能するネフロン数の減少により Na^+ 、 K^+ 、水が蓄積される。しかし透析患者におけるuroguanylinの動態は、充分には解明されていない。今回、血液・腹膜透析患者において血漿uroguanylin濃度を測定し、患者の臨床的状态と比較した。

2. uroguanylinとguanylinの組織分布や細胞局在には差があり、異なる生理的役割を有する可能性がある。特にuroguanylinは酸性条件下において小腸粘膜からの HCO_3^- 分泌をより強く刺激することが明らかにされている。われわれは生体内で最も酸性度が高く、 Cl^- 分泌に機能している胃でのguanylin peptide familyの病態生理学的意義を解明するために、guanylinとuroguanylinの細胞局在、遺伝子発現ならびにGC-Cの分布について検討した。

②研究方式

A. 透析におけるuroguanylinの生理的意義

1. 対象

13人の正常コントロール群（男性7人、女性6人、平均年齢 27.5 ± 1.0 (SEM)歳）、76人の維持血液透析患者群（男性43人、女性33人、平均年齢 57.7 ± 1.6 歳）および腹膜透析患者群（男性のみ10人、平均年齢 40.2 ± 3.8 歳）を解析した。血液透析患者の原疾患は、慢性糸球体腎炎7人、糖尿病21人、腎硬化症6人、多発性嚢胞腎3人、膠原病8人、痛風腎3人、その他の疾患8人、不明2人であった（表 1）。腹膜透析患者の原疾患は慢性糸球体腎炎8人、不明2人であった。透析期間の平均は血液透析患者で 66.0 ± 7.5 月、腹膜透析患者で 27.0 ± 7.8 月であった。血液透析患者のうち38人はダイアライザーとして高透過性の合成膜であるPEPA膜 (FLX, Nikkiso Co.)を、その他38人はPC膜 (AMPC, Asahi Medical Co.)を使用した。

2. 方法

血液透析患者の採血は、透析前の午前9時に行い、正常コントロールは前日夜から絶食して早朝に行った。無作為に選んだPEPA膜で透析している患者7

人、PC膜で透析している患者7人において透析終了時に採血した。心胸比は透析前の胸部X線で測定した。それぞれの患者のDry Weight (DW)は、透析前の体重や血圧や心胸比等で決定し、毎月適正かどうか評価した。透析前増加量は透析前の体重からDWを引いて計算した。血液透析患者27人で β 2-ミクログロブリンを測定した。腹膜透析患者の採血は、透析液交換前の11時から14時の間に行った。

EDTA-2Na (1mg/ml blood)とアプロチニン (500unit/ml blood)を含んだポリプロピレンチューブに血液を入れ、直後に4℃、3000 rpmで15分間遠心した。血漿は0.9%の生理食塩水で2倍に希釈後、生理食塩水で平衡化したSep-pak C-18カートリッジにアプライし、0.1%TFAを含んだ60%アセトニトリル溶液でペプチドを抽出した。抽出液をuroguanylinのラジオイムノアッセイ (RIA)に供した。ヒトuroguanylin抗体は最終希釈濃度1:15,000でuroguanylinのみを特異的に認識した。本法によりuroguanylinは最低0.4 fmol/tubeから測定可能であり、RIA標準曲線のhalf-maximum inhibitionは4 fmol/tubeであった(4)。

表1 患者背景

	血液透析患者 n = 76	腹膜透析患者 n = 10
血漿uroguanylin濃度 (fmol/ml)	212.0 ± 17.4	245 ± 39.5
血液学的検査		
Hematocrit (%)	28.5 ± 0.4	31.7 ± 1.8
Na (mEq/l)	135.0 ± 0.5	139 ± 1.2a
K (mEq/l)	5.7 ± 1.3	3.86 ± 0.2
Cl (mEq/l)	98.7 ± 1.3	97.3 ± 1.1
収縮期血圧 (mmHg)	158.0 ± 2.5	138.0 ± 5.1b
拡張期血圧 (mmHg)	84.4 ± 1.1	80.0 ± 2.8
心胸比 (%)	50.9 ± 0.6	44.7 ± 1.3a
体重増加 (Kg)	2.54 ± 0.1	—

値はmean ± SEMで示す。

a: $p < 0.01$, b: $p < 0.05$

B. 胃上皮細胞におけるuroguanylinとその受容体の存在

ラット胃粘膜をcentrifugation-elutriation法により、細胞のサイズが小さいものから順に7分画 (F1~F7) に分離した。各細胞分画の塗抹標本を作成し、uroguanylin含有細胞を免疫組織化学的に同定した。免疫染色にはuroguanylin, prouroguanylin, histamine, somatostatin, chromogranin A に対する抗体を用いた。rat uroguanylin mRNAのantisenseとsenseに対する45-merのoligonucleotide probeを合成し、各細胞分画の塗抹標本の*in situ* hybridizationを行った。方法の詳細については既報に示している (14)。各細胞分画よりRNAを抽出し、guanylin, uroguanylinおよびGC-Cの遺伝子発現をnorthern blottingとRT-PCRにより検討した。またuroguanylinに関し、RIAで各分画の含量を定量し、uroguanylinの存在を確認した。uroguanylin peptideの同定は、最終的に逆送高速液体クロマトグラフィーの各分画をRIAで測定し、合成uroguanylinとの溶出位置で確認した。また高ガストリン血症とヒスタミンを産生するenterochromaffin-like cell (ECL細胞)の過形成をきたすZollinger-Ellison症候群患者で、治療前後の血漿uroguanylin濃度を定量した。

C. 統計処理

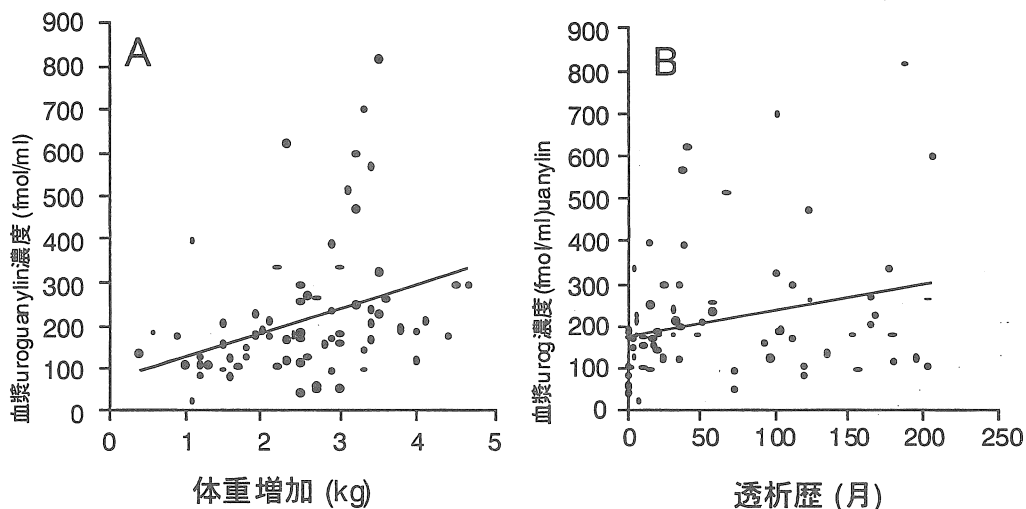
データは平均値 ± SEMで示した。相関はsimple linear regression analysisで決定した。P値は0.05以下を有意とした。paired student's *t*-testを2群間の比較に用いた。

③研究結果

1. 透析前の血漿uroguanylinは 212.0 ± 17.4 fmol/mlで、正常コントロールの 5.0 ± 0.3 fmol/mlと比較し、有意に上昇していた。正常患者で、加齢とともにuroguanylin濃度は減少していた。血漿uroguanylinは体重増加量($r = 0.327$, $P < 0.01$)と透析歴($r = 0.258$, $P < 0.05$)に相関していた (図 1)。腹膜透析患者の平均血漿uroguanylin濃度は 245.3 ± 39.5 fmol/mlで、正常コントロールより有意に高かったが($P < 0.01$)、血液透析患者とは有意差を認めなかった。uroguanylinと血清電解質、収縮期拡張期血圧、心胸比に相関はなかった。

PEPA膜で血液透析を行っている患者の血漿uroguanylin濃度は、血液透析前が 121.7 ± 13.4 fmol/mlで、透析後が 54.8 ± 6.2 fmol/mlであり、透析中に有意に減少した。一方PC膜で行っている群では、前が 168.2 ± 18.4 fmol/ml、後が 211.4 ± 35.1 fmol/mlで有意な変化を認めなかった。透析前の血漿uroguanylin濃度はPEPA膜透析群でPC膜透析群より低かったが、有意差は認

めなかった($P = 0.06$)。血液透析前の $\beta 2$ -ミクログロブリンはPEPA膜透析群がPC膜透析群より有意に低かった($24.7 \pm 1.4 \mu\text{g/L}$ versus $33.7 \pm 2.7 \mu\text{g/L}$, $P < 0.01$)。



(A) $r = 0.327$, $P < 0.01$, (B) $r = 0.260$, $P < 0.05$

図1 76人の血液透析患者における血漿uroguanylin濃度と透析前体重増加量 (A) および透析歴 (B) との関係

2. uroguanylinはヒトとラットの胃組織ならびにelutriationにより得られた単離胃上皮細胞での二重免疫染色により、ヒスタミンと共存し、ソマトスタチンと共存を認めなかった(図2, A-F)。これらより、胃でのuroguanylin含有細胞はヒスタミンを産生するenterochromaffin-like (ECL)細胞であることが明らかになった。また*in situ* hybridizationでもECL細胞にuroguanylinのsignalを認めた(図2, GとH)。uroguanylin遺伝子は胃粘膜小型細胞分画(F1~F3)に強く発現し、壁細胞を主体とする大型細胞分画(F6, F7)には認めなかった。この結果はRIAによる免疫活性の分布とよく一致していた。guanylin免疫活性は免疫染色とRIAでは検出できなかったが、RT-PCRにより胃粘膜細胞F1~F5にguanylin遺伝子発現を認めた。GC-C遺伝子は全細胞分画で発現していた。ガストリン産生腫瘍により過酸をきたすZollinger-Ellison症候群4例のuroguanylin血漿濃度は平均65.3 fmol/mlで、正常者の5.2 fmol/mlに比べ有意に高く($P < 0.001$)、プロトンポンプ阻害剤投与により過酸がコントロールされた状態でのuroguanylin血漿濃度は、8.9 fmol/mlに低下した。

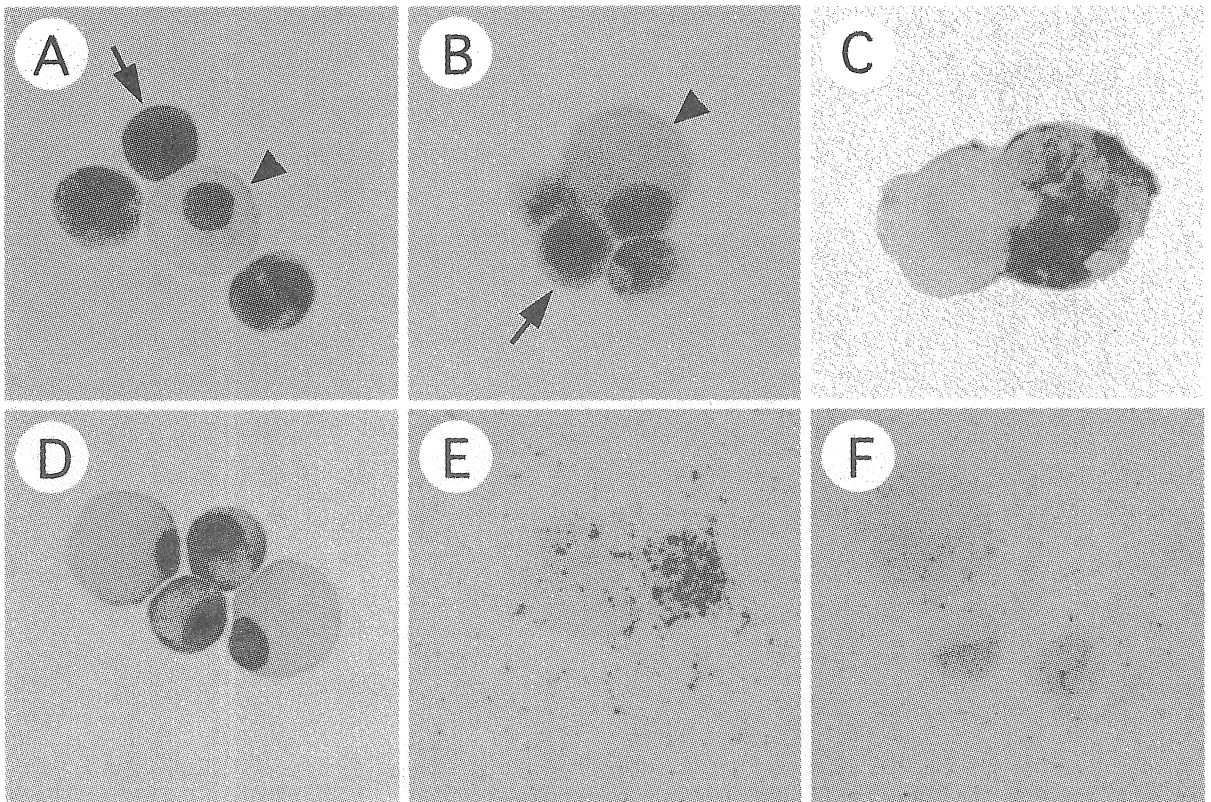


図2 胃粘膜単離細胞の免疫染色と *in situ* hybridization

uroguanylin (A) およびprouroguanylin (B)の免疫活性はelutriationで単離したラット胃粘膜の上皮細胞のうち、矢印で示す内分泌細胞に存在していた。壁細胞(矢頭で示す)には免疫活性を認めなかった。ストレプトアビジンペルオキシダーゼ法とストレプトアビジンアルカリフォスファターゼ法を用いた二重染色で、uroguanylin (茶色)と histamine (赤色)はヒスタミンを産生するECL細胞に共存していた(C)。uroguanylin吸収抗体を用いた対照試験で、uroguanylin免疫活性は消失した(D)。rat uroguanylin antisense cRNA probeを用いた *in situ* hybridization で、hybridization signalをECL細胞に認められた(E)。sense probeを用いた時は、hybridization signalを認めなかった(F)。

④考察

筆者は、uroguanylinおよびそのレセプターが腎臓に存在していることをノーザン解析により確認している(15, 16)。高塩食時には低塩食時より尿中 uroguanylin排泄量が多いこと、尿中uroguanylin排泄量はナトリウム、cGMP 排泄量と有意に相関することより、腎臓におけるナトリウム排泄の調節に関係しているものと考えられた。ネフローゼ症候群において血圧、心胸比とともに血漿uroguanylin濃度は増加していた。また、その増加率はvolume retention と相関していたことよりuroguanylin が腎臓におけるナトリウム代謝と関連し、ネフローゼ症候群のvolume調節に何らかの役割を果たしていると

考えられた。

⑤今後の課題

guanylin familyは、ナトリウム利尿ホルモンとともにGCリガンドファミリーに属し、水・電解質代謝調節維持に作用する生理活性ペプチドである。特にuroguanylinは、腸管-腎臓連関を結びつける内分泌性因子である可能性がある(17)。本研究によりuroguanylinが胃酸分泌を生理的に調節している可能性が示された。胃におけるguanylin, uroguanylinおよびGC-Cの存在は、これらのpeptidesがautocrineもしくはparacrineとして水・電解質代謝調節に関与することを示唆している。今後さらに胃酸分泌機構との関連を解明し、guanylin peptide familyの新たな生理作用について検討する必要がある。

さらに筆者らは、uroguanylinが心不全時には体液負荷を減少させるために心臓から分泌されることも示している。guanylin familyは消化管や腎臓で水・電解質のホメオスタシスに積極的に関与している。今後、さらなる水・電解質代謝異常におけるguanylin familyの病態生理学的意義の解析が期待される。

⑥文献

- 1) S. Schultz, et al: Cloning and expression of guanylin: its existence in various mammalian tissues, *J Biol Chem*, 267: 16019-16021, 1992.
- 2) M.G. Currie, et al: Guanylin: an endogenous activator of intestinal guanylate cyclase, *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 947-951, 1992.
- 3) T. Kita, et al: Characterization of human uroguanylin: a member of the guanylin peptide family, *Am J Physiol* 266: F342-348, 1994.
- 4) M. Nakazato, et al: Identification of 10-kDa proguanylin as a major guanylin molecule in human intestine and plasma and its increase in renal insufficiency, *Biochem Biophys Res Commun*, 205: 1966-1975, 1994.
- 5) Y. Date, et al: Tissue distribution and plasma concentration of human guanylin, *Int.Med* 35: 171-175, 1996.
- 6) H. Yamaguchi, et al: Two novel rat guanylin molecules, guanylin-94 and guanylin-16, do not increase cyclic GMP production in T84 cells, *Biochem Biophys Res Commun* 214:1204-1210, 1995.
- 7) H. Kinoshita, et al: Increased plasma guanylin levels in patients with impaired renal function, *Clin Nephrol* 47: 28-32, 1997.
- 8) M. Nakazato, et al: Identification of biologically active and inactive human uroguanylin in plasma and urine and their increases in renal insufficiency, *Biochem Biophys Res Commun*, 220: 586-593, 1996.
- 9) N. Chino, et al: Generation of two isomers with the same disulfide connectivity during disulfide bond formation of human uroguanylin. *Lett Pept Sci*, 3: 45-52, 1996.
- 10) N Chino, et al: Topological isomers of human uroguanylin: Interconversion between biologically active and inactive isomers, *FEBS Lett*, 421: 27-31, 1998.
- 11) M. Miyazato, et al: Cloning and characterization of a cDNA encoding a precursor for human uroguanylin, *Biochem Biophys Res Commun* 219: 644-648, 1996.
- 12) M. Miyazato, et al: Genomic structure and chromosomal localization of human uroguanylin gene, *Genomics* 43: 359-365, 1997.
- 13) H. Kinoshita H, et al: Plasma and urine levels of uroguanylin, a new natriuretic peptide, in nephrotic syndrome. *Nephron* 81:160-164, 1999.
- 14) Y. Date Y, et al: Enterochromaffin-like cell, a cellular source of

- uroguanylin in rat stomach. *Endocrinology* 140: 2398-2404, 1999.
- 15) M. Nakazato, et al: Tissue distribution, cellular source and structural analysis of rat immunoreactive uroguanylin, *Endocrinology*, 139: 5247-5254, 1998.
- 16) H. Kinoshita, et al: Plasma and urine levels of uroguanylin and its molecular forms in renal diseases, *Kidney Int*, 52: 1028-1034, 1997
- 17) R.N. Greenberg, et al: Comparison of effects of guanylin, uroguanylin, and escherichia coli heat stable enterotoxin STa in mouse intestine and kidney: evidence that uroguanylin is an intestinal natriuretic hormone, *J Invest Med*, 45: 276-283, 1997.

【研究論文の発表】

- ① Date Y, Nakazato M, Yamaguchi H, Kangawa K, Kinoshita Y, Chiba T, Ueta Y, Yamashita H, Matsukura S: Enterochromaffin-like cell, a cellular source of uroguanylin in rat stomach. *Endocrinology* 1999; 140: 2398-2404.
- ② Kinoshita H, Fujimoto S, Fukae H, Yokota N, Hisanaga S, Nakazato M, Eto T: Plasma and urine levels of uroguanylin, a new natriuretic peptide, in nephrotic syndrome. *Nephron* 1999;81:160-164.
- ③ Fujimoto S, Kinoshita H, Hara S, Nakazato M, Hisanaga S, Eto T: Immunohistochemical localization of uroguanylin in the human kidney. *Nephron* 2000;84:88-89.
- ④ Fukae H, Kinoshita H, Fujimoto S, Nakazato M, Eto T.: Plasma concentration of uroguanylin in patients on maintenance dialysis therapy. *Nephron* 2000;84:206-210.
- ⑤ Kinoshita H, Nakazato M, Fujimoto S, Eto T.: Significance of uroguanylin, a new natriuretic peptide, in renal diseases. *Biochemical Res* 2000;1:255-258.
- ⑥ 中里雅光：水・NaCl 代謝調節に作用する新しい消化管ペプチド グアニリンファミリー消化管ホルモン (XVII) 1999;9-14 医学図書出版

Physiological Implication of the Guanylin Peptide Family in the Regulation of Water and Electrolyte Homeostasis

Masamitsu Nakazato, M.D., Ph.D.

Third Department of Internal Medicine

Miyazaki Medical College

Summary

Uroguanylin, originally isolated from human and rat urine, is a new natriuretic peptide. Its plasma level is increased in association with renal impairment and fluid retention in patients with renal diseases. We measured uroguanylin concentrations in patients on hemodialysis (HD, $n = 76$) and those on continuous ambulatory peritoneal dialysis (CAPD, $n = 10$) using a sensitive radioimmunoassay. Plasma concentrations of immunoreactive (ir)-uroguanylin in the patients on HD and CAPD (212.0 ± 17.4 and 245.3 ± 39.5 fmol/ml) were significantly higher than the value for the normal controls (5.0 ± 0.3 fmol/ml). Plasma ir-uroguanylin levels before the start of regular HD were correlated with predialysis excess weight based on their dry weights ($r = 0.33$, $p < 0.01$) and with dialysis duration ($r = 0.26$, $P < 0.05$). The plasma levels in patients with HD, for whom high-flux membranes were used, were decreased at the end of regular HD as compared with the prior levels ($p < 0.05$), but not in those who underwent HD with conventional membranes. These findings suggest that the plasma ir-uroguanylin level is related to the patient's volume status as well as renal impairment. Moreover, we studied uroguanylin in the stomach. Uroguanylin messenger RNA and the peptide are present in rat stomach, but the cellular source has not been identified. We separated gastric mucosal cells by size into seven fractions and enriched endocrine cells using counterflow elutriation. Double-staining showed that uroguanylin and histamine are colocalized in enterochromaffin-like (ECL) cells that release histamine, leading to the stimulation of gastric acid secretion from parietal cells. Uroguanylin is synthesized in ECL cells. These findings should contribute to elucidating the physiological functions of ECL cells and the cyclic GMP-mediated gastric ion transport mechanism.