

ヒツジのインスリン分泌における アペリンとアルギニンバソプレッシン受容体遮断薬投与の影響

佐藤勝祥^{* 1,2}, 大川夏貴², 萩野顕彦², 盧 尚建², 加藤和雄²

¹ 秋田県立大学 生物資源科学部 アグリビジネス学科, 秋田県南秋田郡大湯村字南 2-2 〒 010-0444

² 東北大学大学院農学研究科 動物生理科学分野, 宮城県仙台市青葉区荒巻字青葉 468-1 〒 980-0845

キーワード: アペリン, アルギニンバソプレッシン (AVP), インスリン, 反芻動物, ヒツジ

Apelin administration to sheep promotes insulin secretion through increased AVP secretion

Katsuyoshi Sato^{1,2}, Natsuki Okawa², Akihiko Hagino², Sang-gun Roh² and Kazuo Katoh²

¹Faculty of Bioresource Sciences, Akita Prefectural University,
Minamiakita-gun, Akita 010-0444, Japan

²Laboratory of animal Physiology, Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University,
468-1 Aramaki Aza Aoba, Aobaku, Sendai, 980-0845, Japan

Corresponding: Katsuyoshi Sato, (Tel & Fax: +81-185-45-3901, E-mail: katsuyoshi-sato@akita-pu.ac.jp)

Key Words: apelin, arginine-vasopressin (AVP), insulin, ruminant, sheep

2018 年 2 月 5 日受付, 2018 年 5 月 30 日受理

緒 言

1998 年, 当時オーファン受容体であった APJ 受容体の内因性リガンドとして, アペリン (Apelin; APJ endogenous ligand) が同定された (Tatemoto ら, 1998)。アペリンは 77 アミノ酸残基の前駆体タンパク質からなる生理活性ペプチドで, C 末端側に生理活性部位が存在することが知られおり, これらのアミノ酸配列は多くの

種でよく保存されている。また, 複数のプロセッシング部位を持つため, C 末端側の 36 のアミノ酸から構成される Apelin-36 や, 17 のアミノ酸からなる Apelin-17, -15, -13, -12 など様々なアイソフォームが確認されているが, 多くは Apelin-36 と Apelin-17, Apelin-13 の形で存在している。アペリンはその受容体の構造がアンジオテンシン受容体と類似している (40 ~ 50% 程度の相同性を持つ) ことから, 水の代謝との関連が注目されてきた。これまでにラットでの研究がいくつか報告されており, 多くはアペリンが飲水量を増加させる (Lee ら, 2000; Taheri ら, 2002) という報告であるが, アペリン投与によって飲水量が減少するといった報告 (Clarke ら, 2009) や, 飲水量は変化しないという報告 (Mitra

* 連絡者: 佐藤 勝祥 (さとう かつよし)
(秋田県立大学 生物資源科学部)
〒 010-0444 秋田県南秋田郡大湯村字南 2-2
Tel : 0185-45-3901
E-mail : katsuyoshi-sato@akita-pu.ac.jp

ら, 2006), あるいは絶水刺激によって血中のアペリン濃度が低下するという報告 (De Mota ら, 2004) など, 様々な研究結果が報告されており明確な結論には至っていない。また, 反芻動物を対象とした研究では, ヤギにおける絶水下での採食によって血漿中アペリン濃度が上昇することや (Sato ら, 2012), ヒツジへの頸静脈内アペリン投与によってアルギニンバソプレッシン (AVP; 抗利尿ホルモン) や副腎皮質刺激ホルモン (ACTH), コルチゾールといったストレス応答に関連するホルモンの分泌が促進されることが報告されており (Charles ら, 2006), 反芻動物においてもアペリンが水分代謝やストレス応答において重要な役割を担っている可能性が示唆されている。

筆者らはこれまでの研究からヒツジへの頸静脈内アペリン投与によって成長ホルモン (GH) やインスリンの分泌が促進されることを明らかにしており (Sato ら, 2012), アペリンによる内分泌ホルモン分泌調節作用に着目して研究を行ってきた。これらの内分泌ホルモンのうち, ヤギへの頸静脈内 AVP 投与によって ACTH や GH 分泌が促進されることや (Katoh ら, 2005), ヒツジへの AVP 投与によってインスリン分泌が促進されることが報告されている (Mineo ら, 1997)。これらのことから, 反芻動物における内分泌ホルモン調節において AVP が重要な因子として働くことが明らかになっており, アペリンによるインスリン分泌促進作用は, AVP 分泌が増加することによって誘導される可能性が考えられる。

AVP の受容体には V1a, V1b および V2 受容体の存在が確認されている。V1a 受容体は血管平滑筋や肝臓, 副腎, 腎臓などに, V1b 受容体は下垂体前葉や睪臓などに発現し, V2 受容体は主に腎臓に発現していることから, 内分泌調節には V1a および V1b 受容体の関与が考えられる。そこで本研究では, アペリンによるインスリン分泌促進作用が AVP 分泌の増加に起因した反応である可能性を検討するため, ヒツジへのアペリン投与試験および AVP 受容体 (V1a および V1b) 遮断薬の事前投与試験を行なった。

材料および方法

本研究における動物実験は, 東北大学動物実験委員会の承認を得て実施した。

1. 供試動物

供試動物として雑種ヒツジ (去勢雄, 7 ヶ月齢, 28.3 ± 2.7kg) を 6 頭用いた。木製スタンションを取り付けた

ケージで飼育し, 飼料は維持要求量のヘイキューブを 1 日 1 回 (16:00) 給餌, 水と鉱塩は自由摂取とした。

2. 試験区の設定と血液サンプリング

本試験では, ①生理的食塩水 (生食) + 生食投与区, ②生食 + アペリン投与区, ③ AVP 受容体遮断薬 + 生食投与区, ④ AVP 受容体遮断薬 + アペリン投与区の 4 つの試験区を設けた。投与試薬は, アペリン ([Pyr1]-apelin-13, ペプチド研究所, 大阪, 日本) と AVP 受容体遮断薬 (V1a 受容体遮断薬: (d(CH₂)⁵¹, Tyr (Me)², Arg⁸) -Vasopressin, V1b 受容体遮断薬: (Deamino-Pen¹, Tyr (Me)², Arg⁸) -Vasopressin, とともに Bachem, スイス) を用いた。アペリンの投与量は Charles ら (2006) および Sato ら (2012) の報告に従い 1 頭あたり 500 μg とし, AVP 受容体遮断薬は V1a と V1b の受容体遮断薬をそれぞれ体重 1kg あたり 10 μg ずつ混合した。試験前日に頸静脈カテーテルを留置し, 試験当日の 10:00 から 13:15 までの 195 分間, 15 分間隔で合計 14 回の血液サンプリングを行った。この時, 11:00 (サンプリング開始から 60 分後) の採血直後に生食または AVP 受容体遮断薬を投与し, 11:15 (サンプリング開始から 75 分後) の採血直後に生食またはアペリンを投与した。採取した血液はヘパリン (10unit/ml 血液) の入ったチューブに移し, 遠心分離 (10,000 × g, 4°C, 15 分間) して血漿を採取した。血漿サンプルは測定まで -20°C で保存した。試験計画は 6 頭のヒツジを 3 頭ずつの 2 グループに分け, 2 群 × 4 期のクロスオーバー試験法を用い, 1 週間以上のウォッシュアウト期間を設けてサンプリングを行った。全てのサンプリング終了後, 血漿中の AVP, インスリンおよびグルコース濃度を測定した。AVP およびインスリン濃度はラジオイムノアッセイ法 (Sato ら, 2012) を用いて測定し, グルコース濃度の測定には, グルコース C II - テストワコー (和光純薬工業, 大阪, 日本) を用いた。

3. データ解析

全ての測定値は平均値 ± 標準誤差で示した。統計処理は重複測定二元配置分散分析法を用いて, 試験区と投与後時間の間の交互作用の有無を解析した。試験区間の有意差検定には Tukey の多重比較検定を用いた。危険率 0.05 未満を有意差有りとし, 危険率 0.1 未満を傾向有りとした。統計解析は Mac 統計解析 Ver.2.0 (株式会社 エスミ, 東京, 日本) を用いて行なった。

結果

1. AVP 濃度の変動

生食+生食投与区の AVP 濃度において、投与前後で有意な変動は見られなかった（基礎値（サンプリング開始 60 分後の値）： 4.29 ± 1.79 pg/ml, 投与 15 分後： 1.63 ± 0.44 pg/ml, $P=0.179$ ）。生食+アペリン投与区の AVP 濃度は、アペリン投与 15 分後の値 (28.85 ± 12.81 pg/ml) が基礎値 (2.63 ± 1.01 pg/ml) に対して上昇する傾向が見られた ($P=0.091$)。なお、AVP 濃度測定に用いた抗体が AVP 受容体遮断薬と反応してしまい、AVP 受容体遮断薬投与区の AVP 濃度は測定できなかった。

2. インスリン濃度の変動

図 1 に血漿中インスリン濃度の変動 (a) とアペリンまたは生食投与後 60 分間の分泌増加量 (Incremental area) (b) を示す。

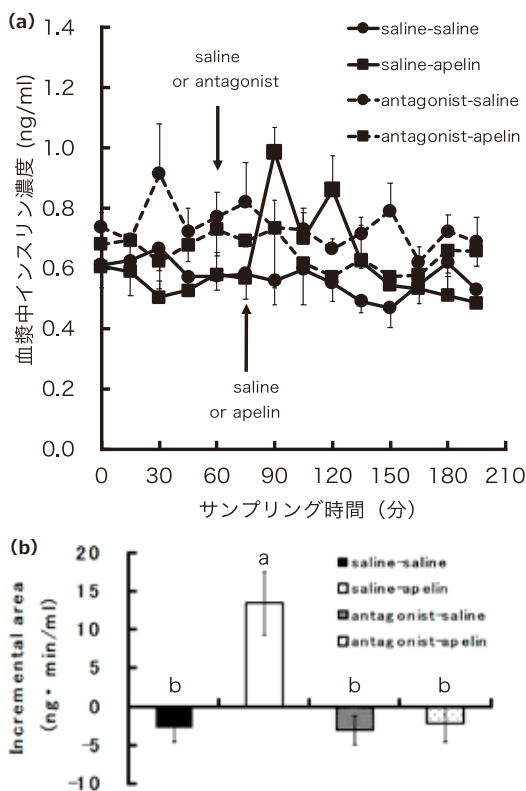


図 1 AVP 受容体遮断薬 (antagonist) およびアペリン投与による血漿中インスリン濃度変動 (a) とアペリンまたは生理的食塩水投与後 60 分間の分泌増加量 (Incremental area) (b) サンプリング開始 60 分後に生食あるいは AVP 受容体遮断薬 (antagonist) を投与し、その 15 分後に生食あるいはアペリンを投与した。全ての値は平均値 ± 標準誤差を示している。異なるアルファベット (a, b) は試験区間に有意差があることを示す (Tukey の多重比較検定)。

area) (b) を示す。インスリン濃度の変動では、重複測定二元配置分散分析の結果、試験区 × 時間の間に交互作用は認められず、試験区間に有意差が認められた (試験区: $P<0.001$, 時間: $P=0.247$, 試験区 × 時間: $P=0.189$)。分泌増加量では、生食+アペリン投与区の値が他の試験区の値と比べて有意に高い値となった ($P<0.001$)。

3. グルコース濃度の変動

図 2 に血漿中グルコース濃度の変動 (a) とアペリンまたは生食投与後 60 分間の分泌増加量 (Incremental area) (b) を示す。グルコース濃度の変動では、重複測定二元配置分散分析の結果、試験区 × 投与後時間の間に交互作用は認められず、投与後時間に有意差が認められた (試験区: $P=0.438$, 時間: $P=0.002$, 試験区 × 時間: $P=0.999$)。また、分泌増加量には試験区間に有意な差は見られなかった ($P=0.556$)。

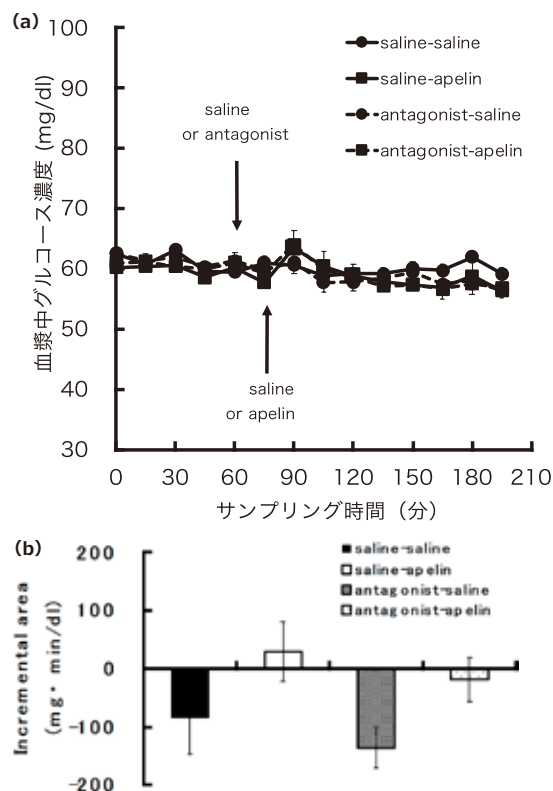


図 2 AVP 受容体遮断薬 (antagonist) およびアペリン投与による血漿中グルコース濃度変動 (a) とアペリンまたは生理的食塩水投与後 60 分間の分泌増加量 (Incremental area) (b) サンプリング開始 60 分後に生食あるいは AVP 受容体遮断薬 (antagonist) を投与し、その 15 分後に生食あるいはアペリンを投与した。全ての値は平均値 ± 標準誤差を示している。

考 察

アペリンとインスリンに関する研究では、2型糖尿病患者やインスリン抵抗性を示す動物において血中アペリン濃度が高いことや (Li ら, 2006)、マウスにおいてアペリンの静脈内投与がインスリン分泌を阻害する作用が明らかになっている (Maria ら, 2005)。これらの報告に対して、ヒツジでは頸静脈内アペリン投与によってインスリン分泌が促進されることが明らかになっており (Sato ら, 2012)、アペリンによるインスリン分泌調節作用には種差がある可能性が考えられる。本研究においても、生食+アペリン投与区のインスリン分泌増加量 (Incremental area) が他の試験区に比べて有意に高い値を示した (図 1 (b)) ことから、ヒツジへのアペリン投与がインスリン分泌を促進する可能性が改めて示唆された。

また、マウスにおけるアペリンによる血糖値への影響について、Dray ら (2008) は静脈内投与によって、また Duparc ら (2011) は低濃度の中枢投与によって、血糖値が減少することを報告している。これらに対し、Sato ら (2012) が行った研究では、ヒツジへの頸静脈内アペリン投与によって血中のグルコース濃度がわずかに上昇する傾向が報告されているが、これは投与から 45 分後の値であり、直接的な作用ではないと考えられている。本研究では、アペリンの投与によって血中グルコース濃度に有意な変動は見られなかった (図 2 (a) および (b))。この結果は、マウスにおけるこれまでの報告とは異なり、アペリンによるグルコース調節作用には種差があることが示唆された。また、本試験ではアペリン投与によってインスリン分泌が促進される結果が得られているが、グルコース濃度を低下させるほどの上昇ではなかった可能性が考えられる。Suzuki ら (2012) が行ったヒツジへの頸静脈内ケメリン投与試験では、高濃度のケメリン投与によって血漿中インスリン濃度が 3.24 ng/ml 程度まで上昇し、血漿中のグルコース濃度が有意に減少することが報告されている。一方で、低濃度のケメリン投与では血漿中インスリン濃度が 2.69 ng/ml 程度まで上昇したが、グルコース濃度に有意な減少は見られていない (Suzuki ら, 2012)。本試験において、アペリンの投与によって上昇したインスリン濃度の最高値は 1.25 ng/ml であり、グルコース濃度を減少させるほどの上昇ではなかった可能性が考えられる。

インスリン分泌は様々なホルモンによって調節されているが、下垂体後葉から分泌される AVP による調節作用が明らかになっている。AVP は抗利尿ホルモンとし

て体内の水分代謝を調節する作用が知られているが、反芻動物では GH 分泌を促進する作用が報告されているなど (Katoh ら, 2005)、内分泌ホルモンの調節作用も明らかになっている。マウスにおける研究では AVP によるインスリン分泌促進作用が確認されており、この作用が特にランゲルハンス島に発現する V1b 受容体を介する作用であることが明らかになっている (Oshikawa ら, 2004)。また、反芻動物における AVP によるインスリン分泌調節作用についても、いくつかの研究結果が報告されている。Wallin ら (1989) が行った研究では、胎児ヒツジでは AVP はインスリン分泌に影響を与えないが、新生児ヒツジでは微量ながらインスリン分泌を増加させる効果が確認されている。また、Mineo ら (1997) は、1~2 歳のヒツジでは頸静脈内 AVP 投与によってインスリン分泌が顕著に促進される効果を明らかにしている。一方で、Roh ら (2014) の報告ではヤギへの頸静脈内 AVP 投与はインスリン分泌を刺激しないことが明らかになっており、反芻動物の中でも種や月齢の違いによって反応が異なる可能性が考えられる。

反芻動物におけるアペリンによる内分泌ホルモン調節作用として、ヒツジへのアペリン投与による、ACTH および GH 分泌促進作用は、AVP 受容体遮断薬の事前投与によってアペリンによる分泌促進作用が抑制される効果が報告されているが (佐藤ら, 2011)、下垂体の組織培養あるいは下垂体前葉細胞を用いた研究では、アペリンが直接下垂体に作用してこれらのホルモン分泌を促進することが明らかになっており (佐藤ら, 2011)、AVP の分泌増加を介した作用と下垂体への直接作用の 2 つの作用機構の可能性が示唆されている。

本研究結果では、ヒツジへの頸静脈内アペリン投与によって AVP とインスリンの分泌が促進されることが確認され、AVP 受容体受容体遮断薬の事前投与によってアペリンによるインスリン分泌促進作用が抑制されることが明らかになった。これまでの報告と本研究結果から、ヒツジにおけるアペリンのインスリン分泌促進作用は AVP 分泌が促進されることを介した反応である可能性が示唆された。今後は本研究結果をもとに、反芻家畜のストレス管理と生産性の新たな指標としてアペリンを活用した飼養管理方法の検討を進める。

引用文献

Charles CJ, Rademaker MT, Richards AM. Apelin-13 induces a biphasic haemodynamic response and hormonal activation in normal conscious sheep. *J Endocrinol.* 189:701-710. 2006.

- Clarke, K. J., K. W. Whitaker and T. M. Reyes. Diminished metabolic responses to centrally-administered apelin-13 in diet-induced obese rats fed a high-fat diet. *J Neuroendocrinol.* 21: 83-89. 2009.
- De Mota N, Reaux-Le Goazigo A, El Messari S, Chartrel N, Roesch D, Dujardin C, Kordon C, Vaudry H, Moos F, Llorens-Cortes C. Apelin, a potent diuretic neuropeptide counteracting vasopressin actions through inhibition of vasopressin neuron activity and vasopressin release. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 101: 10464-10469. 2004.
- Dray C, Knauf C, Daviaud D, Waget A, Boucher J, Buleon M, Cani PD, Attaane C, Guigne C, Carpenne C, Burcelin R, Castan-Laurell I, Valet P. Apelin stimulates glucose utilization in normal and obese insulin-resistant mice. *Cell Metab.* 8 :437-45. 2008.
- Duparc T, Colom A, Cani PD, Massaly N, Rastrelli S, Drougard A, Le Gonidec S, Mouledous L, Frances B, Leclercq I, Llorens-Cortes C, Pospisilik JA, Delzenne NM, Valet P, Castan-Laurell I, Knauf C. Central apelin controls glucose homeostasis via a nitric oxide-dependent pathway in mice. *Antioxid Redox Signal.* 15 :1477-96. 2011.
- Katoh K. Yoshida M. Kobayashi Y. Onodera M. Kogusa K. Obara Y. Responses induced by arginine-vasopressin injection in the plasma concentrations of adrenocorticotrophic hormone, cortisol, growth hormone and metabolites around weaning time in goats. *J Endocrinol.* 187:249-256. 2005.
- Lee DK, Cheng R, Nguyen T, Fan T, Kariyawasam AP, Liu Y, Osmond DH, George SR, O'Down BF. Characterization of apelin, the ligand for the APJ receptor. *J Neurochem.* 74:34-41. 200.
- Li L. Yang G. Li Q. Tang Y. Yang H. Li K. Changes and relations of circulating visfatin, apelin, and resistin levels in normal, impaired glucose tolerance, and type 2 diabetic subjects. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 114:544-548. 2006.
- Maria S, Caroline M Bo A. The apj receptor is expressed in pancreatic islets and its ligand, apelin, inhibits insulin secretion in mice. *Regul Pept.* 131:12-17. 2005.
- Mineo H. Ito M. Muto H. Kamita H. Hyun HS. Onaga T. Effects of oxytocin, arginine-vasopressin and lysine-vasopressin on insulin and glucagon secretion in sheep. *Res Vet Sci.* 62:105-110. 1997.
- Mitra A, Katovich MJ, Mecca A, Rowland NE. Effects of central and peripheral injections of apelin on fluid intake and cardiovascular parameters in rats. *Physiol. Behav.*, 89: 221-225. 2006.
- Oshikawa S. Tanoue A. Koshimizu T. Kitagawa Y. Tsujimoto G. Vasopressin stimulates insulin release from islet cells through V1b receptors: a combined pharmacological/knockout approach. *Mol Pharmacol.* 65:623-629. 2004.
- Ringstrom C. Nitert MD. Bennet H. Fex M. Valet P. Rehfeld JF. Friis-Hansen L. Wierup N. Apelin is a novel islet peptide. *Regul Pept.* 162:44-51. 2010.
- Roh SG, Koiwa K, Sato K, Ohtani Y, Takahashi T, Katoh K. Actions of intravenous injections of AVP and oxytocin on plasma ACTH, GH, insulin, and glucagon concentrations in goats. *Animal Science Journal.* 85:286-92. 2014.
- Sato K, Takahashi T, Kobayashi K, Hagino A, Roh SG, Katoh K. Apelin is involved in postprandial responses and stimulates secretion of arginine-vasopressin, adrenocorticotrophic hormone and growth hormone in the ruminant. *Domestic Animal Endocrinology.* 42:165-72. 2012.
- 佐藤勝祥, 大川夏貴, 萩野顕彦, 盧尚建, 加藤和雄. 反芻動物における血漿中 Apelin 濃度の変動と内分泌調節. *栄養生理研究会報.* 55:17-24. 2011.
- Suzuki Y, Song SH, Sato K, So KH, Ardiyanti A, Kitayama S, Hong YH, Lee SD, Choi KC, Hagino A, Katoh K, Roh SH. Chemerin analog regulates energy metabolism in sheep. *Animal Science Journal.* 83:263-267. 2012.
- Taheri S, Murphy K, Cohen M, Sujkovic E, Kennedy A, Dhillo W, Dakin C, Sajedi A, Ghatei M, Bloom S. The effects of centrally administered apelin-13 on food intake, water intake and pituitary hormone release in rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 291: 1208-1212. 2002.
- Tatemoto K, Hosoya M, Habata Y, Fujii R, Kakegawa T, Zou MX, Kawamata Y, Fukusumi S, Hinuma S, Kitada C. Isolation and characterization of a novel endogenous peptide ligand for the human APJ receptor. In *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 251: 471-476. 1998.
- Wallin LA. Fawcett CP. Rosenfeld CR. Oxytocin stimulates glucagon and insulin secretion in fetal and neonatal sheep. *Endocrinology.* 125:2289-2296. 1989.