Pancreatic Polypeptide-Like Immunoreactivity の脳内分布

神戸大学医学部第2内科

乾 明 夫, 水 野 信 彦, 小 川 正
藤 井 繁 樹, 石 田 正 矩, 馬 場 茂 明

Regional Distribution of Pancreatic Polypeptide-like
Immunoreactivity in the Canine Brain

**Akio INUI, Nobuhiko MIZUNO, Tadashi OGAWA
Shigeki FUJII, Masanori ISHIDA and Shigeaki BABA**

Second Department of Internal Medicine
Kobe University School of Medicine
Kobe, Japan

Recently many gut hormones have been found in the brain, and there is some evidence to suggest that pancreatic polypeptide-like immunoreactivity (PP-LI) is also present in the brain. Although in mammals, confirmative evidence is not yet shown. In the present paper we report the distribution and tissue localization of PP-LI in the canine brain by radio-immunoassay (RIA) and immunohistochemistry.

Normal, fasted mongrel dogs were used. Brain tissue was extracted by boiling water. High concentrations of PP-LI were found in the pituitary gland (3.67 ± 1.10 ng/g wet wt), substantia nigra (1.58 ± 0.36 ng/g wet wt), hypothalamus (0.74 ± 0.28 ng/g wet wt) and olfactory lobe (0.58 ± 0.21 ng/g wet wt). PP-LI was not detectable in the frontal lobe, parietal lobe, striatum, thalamus, hippocampus, pons, cerebellum and medulla oblongata. The amounts of PP-LI in the brain were more less than the amounts of PP present in the pancreas (duodenal lobe, 29.3 ± 1.1 μ g/g wet wt).

The dilution curve of the brain tissue extracts showed parallelism with the standard curve of human and porcine PP on the RIA system. On Bio-Gel P-30 column chromatography, PP-LI from the pituitary gland and olfactory lobe eluted as a single peak coincided with highly purified bovine PP. In immunohistochemical study, PP-LI was found in the intermediate lobe and the stalk of the pituitary gland by means of anti-bovine PP antiserum.

These findings of the specific regional localization suggest that PP or PP-LI may have a physiological role in the central nervous system.

諸 言

近年における消化管ホルモン研究の発展はめざましいものがある。特に精製化学の進歩により、生理学的役割が解明される前に、新しいペプチドホルモンが次々と発見され、また一方、その多くが脳にも存在することが明らかにされてきた¹⁾。

従来 circulating gut hormones¹⁾とされていた gastrin²⁾, secretin¹⁸⁾, cholecystokinin(CCK)^{3) 6) 22)}, motilin²⁷⁾, enteroglucagon(GLI)^{2) 24)} が脳内に見出され、また insulin⁷⁾, glucagon^{2) 24)} の存在も確認され、すべての gut peptides が脳内に存在する可能性すら生じてきた。

しかし、膵ホルモンの一つである pancreatic polypeptide (PP) に関しては、PP の種属特異性もあって、僅かに avian PP (aPP) に対する抗体を用いた immunohistochemistry により、哺乳類の脳内の存在を示唆する報告が散見される程度で^{8) 9) 12) 13) 20)}, PP の脳内の存在および分布についての報告は極めて少ない。

そこで今回我々は、犬の脳内における PP-like immunoreactivity (PP-LI) の分布、ならびに免疫化学的性状を明らかにする目的で、以下の検討を行なった。

実験材料と方法

1) 脳ならびに膵組織摘出操作

雑種成犬(平均体重12kg) 8匹を16時間絶食、絶水の後、sodium thiamylal (isozol[®] 吉富製薬)で麻酔後開胸し、心室内穿刺にて aprotinin 加生食液 (trasylo[®] Bayel 社, 25000KIU/l) を灌流。同時に下大静脈を切開し、十分に脱血を行なった後開頭し、脳を摘出、また開腹にて膵を摘出した。これらをすみやかにドライアイス上にて凍結し、抽出まで -20°C にて保存した。

一部解凍した脳から肉眼的に、前頭葉、頭頂葉、嗅脳、線条体、視床、視床下部、松果体、海馬、黒質、橋、小脳、延髄を分割採取し、各々の小片を秤量した。一方膵は、duodenal lobeより採取した。

Fig. 1. Extraction procedures of PP-LI.

2) 抽出操作

膵はFig. 1に示す如く3種類の抽出方法で行ない、また脳は、回収率(Tab. 1)の最も良好な boiling water にて抽出を行なった。

3) PP-LI の測定

組織抽出物中のPP-LIは、凍結乾燥した検体を、湿重量0.1gあたり0.5～1 mlの割合で、0.05 M PH7.5 phosphate buffered saline(0.1% human serum albumin, 0.05% NaN₃, 400 KIU/ml aprotinin を含む、以下 PBS) に溶解し、我々の確立した二抗体法による radioimmunoassay (RIA)⁶⁾にて測定した。最少検出量30pg/ml以下を not detectable (N.D.) と判定した。

4) 脳抽出物中の PP-LIゲル濾過像

一部の脳凍結乾燥物を、Bio-Gel P-30 (1.5×100cm) column chromatographyにて検討した。溶出液として 3 N 酢酸を用い、流出速度は43ml/hr、各fractionは 2 ml づつ分画採取した。凍結乾燥後0.4mlのPBSに溶解し、うち0.2mlをPP-LIの測定に供した。

5) Immunohistochemistry

脳を摘出し、Bouin液を用いて固定した後、抗bovine PP (bPP) 血清による酵素抗体法間接法にて、PP-LIを検出した。

結 果

Fig. 2に示す如く、我々の用いた human PP (hPP) の RIA 系は良好な容量反応曲線を描き、標準抗原として、canine PP (cPP) と同一アミノ酸配列をもつ porcine PP (pPP)を用いた場合の標準曲線とも、よく一致した。また膵および脳の抽出物の稀釈曲線は、標準曲線と平行する容量反応曲線を示した。本測定系では、PP以外の他のペプチドホルモンとの間には、交差反応を認めなかった¹⁰⁾。

膵組織破砕細片を3等分し、Fig. 1に示す如く3種類の方法にて抽出し、PP-LIを測定すると、1) boiling water: $29.3 \pm 1.1 \mu\text{g/g wet wt}$, 2) acetic acid: $20.4 \pm 1.0 \mu\text{g/g wet wt}$, 3) acid ethanol:

Fig. 2. Standard curves of hPP and pPP, and dilution curves of canine plasma and extracts of canine pancreas and brain.

21.5 ± 2.1 μg/g wet wt と boiling water による抽出操作で最も高い値を示した。また, 既知の濃度の精製 bPP を用いて抽出を行なった際の回収率は, Tab. 1 に示す如く, boiling water の場合が 85.6 ± 6.2% で最も高い値を示した。

脳内の PP-LI は, Tab. 2 に示す如く, 嗅脳, 視床下部, 松果体, 黒質, 下垂体に認められたが, 他の部位における存在は明らかでなかった。

酵素抗体法間接法にては, Fig. 3 に示す如く, 下垂体の中間葉細胞, 及び下垂体茎の神経線維に PP-LI を認めた。

嗅脳と下垂体の抽出物のゲル濾過では, Fig. 4 に示す如く, 共に精製 bPP の溶出部位とほぼ同一の 46~58 分画に, PP-LI の溶出が認められた。

Tab. 1. Recovery rate of bPP by means of various extraction procedures.

Extraction Procedure	Recovery of bPP (% ± S.E.)
Boiling Water	85.6 ± 6.2
Acetic Acid	42.5 ± 2.2
Acid Ethanol	48.0 ± 0.3

Tab. 2. PP-like immunoreactivity in canine brain.

n = 8	
	ng/g wet wt ± S.E.
Telencephalon :	
Frontal Lobe	N. D.
Parietal Lobe	N. D.
Olfactory Lobe	0.58 ± 0.21
Striatum	N. D.
Diencephalon :	
Thalamus	N. D.
Hypothalamus	0.74 ± 0.28
Pineal Body	8.61 ± 2.32
Hippocampus	N. D.
Mesencephalon :	
Substantia Nigra	1.58 ± 0.36
Metencephalon :	
Pons	N. D.
Cerebellum	N. D.
Myelencephalon :	
Medulla Oblongata	N. D.
Pituitary Gland	3.67 ± 1.10
Pancreas	29.3 ± 1.1 μg/g wet wt

N. D. = not detectable

Fig. 3A. PP-like immunoreactivity in the intermediate lobe of the pituitary gland by immunohistochemistry with an antiserum raised against bPP.

Fig. 3B. Control (after absorption by bPP).

Fig. 4. Biogel P-30 elution profiles of PP-LI extracted from canine olfactory lobe and pituitary gland.

考 按

PPの中樞神経系における存在を示唆する報告は、今までのところすべてimmunohistochemistryにもとづいている。Lorénら¹²⁾は抗aPP血清により、chicken, mouse, rat, catの脳内にimmunoreactive neuronの存在を認めたが、抗bPP血清や抗hPP血清にては認められなかったと述べている。Lundbergら¹³⁾はratならびにcatで、Huntら⁹⁾とHökfeltら⁸⁾はratで、すべて抗aPP血清を用いてimmunoreactive neuronの存在を指摘している。またOlschowkaら²⁰⁾は抗bPP血清を用い、ratの脳内にimmunoreactive neuronの存在を示しているが、これらの報告はいずれも、検討に用いられた抗PP血清の種属差が問題であり、必ずしも哺乳類の脳内におけるPPの存在を確定するには到っていない。

今回我々は、イヌの脳内各部分(嗅脳、視床下部、松果体、黒質、下垂体)の抽出にてPP-LIの存在を認めた。さらにゲル濾過法による検討から、これらPP-LIの分子量は、精製bPPとほぼ同一であることを確認した。また、抗bPP血清を用いたimmunohistochemistryにても、下垂体の中間葉細胞、及び下垂体茎の神経線維にPP-LIを認めた⁴⁾。以上の事実は、哺乳類(イヌ)の脳内にもPPそのもの、ないしは極めて近縁物質が存在することを示唆するものである。

現在、哺乳類の脳内には、25種類ものペプチドが存在するといわれ²³⁾、体温調節や摂食、飲水、鎮痛あるいは血糖の中枢性調節への関与などが想定¹⁰⁾されている。しかし、その詳細は不明であり、脳内PP-LIの生理的意義も明らかではない。

我々はすでにイヌを用いて、外因性に投与したほぼ生理量のPPが、迷走神経あるいはその上位中枢を介してinsulin分泌を抑制する事実を報告¹⁹⁾し、PPが生理作用として、脳内中枢に作用する可能性を指摘した。やせ、肥満におけるPP分泌異常も報告され^{11) 19) 25)}、またob/ob mouseの過食、肥満がbPPの腹腔内投与により抑制される事実¹⁰⁾や、NZO mouseの高insulin血症、高血糖、肥満がaPPやbPPの腹腔内投与により是正される事実⁵⁾も、PPの中樞作用を示唆するものである。

しかし、今までのところ、脳内に認められたPP-LIと、臍ないしは末梢血中PPとの関連も明らかではなく、脳内PP-LIの生理的役割の解明は、今後の課題であると思われる。ただ、前述の如く、PPが摂食行動のpeptidergic regulation¹⁷⁾の一翼をになう可能性も考えられ、また、抗aPP血清を用いcatecholamine, methionine enkephalinとのneuron内での併存を認めた成績^{9) 13)}からは、脳内PP-LIがneurotransmitterないしはneuromodulatorとして作用する可能性も想定される。

最近Tatemotoら²⁶⁾により、ブタ脳から、PPと分子構造が極めて類似したアミノ酸36個からなるペプチド(NPY)が単離された。NPYはsecretinの臍外分泌抑制作用をもち、脳内に大量に存在するといわれている。従って、分子構造上きわめて類似性をもっているため、PPあるいは脳内PP-LIとの関連性も含め、今後その生理作用の解明が期待される。

結 語

PP-LIは、イヌの脳内各部分(嗅脳、視床下部、松果体、黒質、下垂体)の抽出から、および下垂体中間葉、下垂体茎におけるimmunohistochemistryによっても、特異的に存在することを明らかにした。また、精製bPPとのゲル濾過パターンの比較から、脳内PP-LIは分子量もほぼbPPに等しいものと考えられた。

以上の事実は、PP-LIがその他のbrain gut peptidesと同じく脳内に証明されうること、さらに脳内局在性のあることは、PPあるいはPP-LIが何らかの生理的役割をもつ可能性を示唆する。

謝辞 稿を終るにあたり、脳局所標本の作製ならびに種々御指導いただいた神戸大学医学部第一生理学教室、岡田安弘教授に深謝いたします。

文 献

- 1) Bloom, S.R. and Polak, J.M.: Gut hormone overview, 3–18. Ed. by Bloom, S.R., Gut Hormones, Churchill Livingstone, Edinburgh, 1978.
- 2) Conlon, J.M., Samson, W.K., Dobbs, R.E., Orci, L. and Unger, R.H.: Glucagon-like polypeptides in canine brain. *Diabetes*, 28: 700–702, 1979.
- 3) Dockray, G.J.: Immunochemical evidence of cholecystokinin-like peptides in brain. *Nature*, 264: 568–570, 1976.
- 4) Fujii, S., Baba, S. and Fujita, T.: Pancreatic polypeptide – immunoreactive cells and nerves in the canine pituitary. *Biomedical Res.*, 3: 525–533, 1982.
- 5) Gates, R.J. and Lazarus, N.R.: The ability of pancreatic polypeptide (APP and BPP) to return to normal the hyperglycaemia, hyperinsulinaemia, and weight gain of New Zealand obese mice. *Hormone Res.*, 8: 189–202, 1977.
- 6) Geola, F.L., Hershman, J.M., Warwick, R., Reeve, J.R., Walsh, J.H. and Tourtellotte, W.W.: Regional distribution of cholecystokinin-like immunoreactivity in the human brain. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 53: 270–275, 1981.
- 7) Havrankova, J., Schmechel, D., Roth, J. and Brownstein, M.: Identification of insulin in rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)*, 75: 5737–5741, 1978.
- 8) Hökfelt, T., Lundberg, J.M., Terenius, L., Jancsó, G. and Kimmel, J.: Avian pancreatic polypeptide (APP) immunoreactive neurons in the spinal cord and spinal trigeminal nucleus. *Peptides*, 2: 81–87, 1981.
- 9) Hunt, S.P., Emson, P.C., Gilbert, R., Goldstein, M. and Kimmel, J.R.: Presence of avian pancreatic polypeptide-like immunoreactivity in catecholamine and methionine-enkephalin-containing neurons within the central nervous system. *Neurosci. Lett.*, 21: 125–130, 1981.
- 10) 伊藤真次: 神経ペプチド, 理工学社, 東京, 1980.
- 11) Lassmann, V., Vague, P., Vialettes, B. and Simon, M.C.: Low plasma levels of pancreatic polypeptide in obesity. *Diabetes*, 29: 428–430, 1980.
- 12) Lorén, I., Alumets, J., Håkanson, R. and Sundler, F.: Immunoreactive pancreatic polypeptide (PP) occurs in the central and peripheral nervous system: Preliminary immunocytochemical observations. *Cell Tissue Res.*, 200: 179–186, 1979.
- 13) Lundberg, J.M., Hökfelt, T., Änggård, A., Kimmel, J., Goldstein, M. and Markey, K.: Coexistence of an avian pancreatic polypeptide (APP) immunoreactive substance and catecholamines in some peripheral and central neurons. *Acta Physiol. Scand.*, 110: 107–109, 1980.
- 14) Malaisse-Lagae, F., Carpentier, J.L., Patel, Y.C., Malaisse, W.J. and Orci, L.: Pancreatic polypeptide: A possible role in the regulation of food intake in the mouse. *Experimentia*, 33: 915–917, 1977.
- 15) Marco, J., Zulueta, M.A., Correas, I. and Villanueva, M.L.: Reduced pancreatic polypeptide secretion in obese subjects. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 50: 744–747, 1980.
- 16) 水野信彦, 石田正矩, 岡田 究, 馬場茂明: Human pancreatic polypeptide(hpp)のradioimmunoassay,ならびに正常比, 糖尿病患者血漿hppの基礎値に関する研究, 糖尿病, 22: 895–905, 1979.
- 17) Morley, J.E.: The neuroendocrine control of appetite: The role of the endogenous opiates, cholecystokinin, TRH, gamma-amino-butyric-acid

- and the diazepam receptor. *Life Sci.*, 27: 355–368, 1980.
- 18) Mutt, V., Carlquist, M. and Tatemoto, K.: Secretin-like bioactivity in extracts of porcine brain. *Life Sci.*, 25: 1703–1707, 1979.
- 19) 小川 正, 乾 明夫, 石原一秀, 石田正矩, 水野信彦, 馬場茂明: Pancreatic polypeptide のインスリン分泌調節機構への関与, *Peptide Hormones In Pancreas*, 2: 91–97, 1982.
- 20) Olschowka, J.A., O'donohue, T.L. and Jacobowitz, D.M.: The distribution of bovine pancreatic polypeptide-like immunoreactive neurons in rat brain. *Peptides*, 2: 309–331, 1981.
- 21) Rehfeld, J.F.: Localization of gastrins to neuro- and adenohypophysis. *Nature*, 273: 771–773, 1978.
- 22) Rehfeld, J.F.: Immunochemical studies on cholecystokinin. *J. Biol. Chem.*, 253: 4022–4030, 1978.
- 23) Roberts, G.W., Crow, T.J. and Polak, J.M.: Neuropeptides in the brain, 457–463. Ed. by Bloom, S.R. and Polak, J.M., *Gut Hormones*, second edition, Churchill Livingstone, Edinburgh, 1981.
- 24) 佐々木英夫, 富永真琴, 丸橋成次郎, 片桐 忠, 白井日出雄, 山谷 恵一, 八幡芳和, 原 正雄: 脳内グルカゴン様物質, *医学のあゆみ*, 120: 275–281, 1982.
- 25) 田港朝彦, 森幸三郎, 藤田拓男, 津田謹輔, 桜井英雄: やせ(神経性食思不振症)における膵, 消化管ホルモン分泌動態, *ホと臨床*, 27: 83–86, 1979.
- 26) Tatemoto, K., Carlquist, M. and Mutt, V.: Neuropeptide Y—a novel brain peptide with structural similarities to peptide YY and pancreatic polypeptide. *Nature*, 296: 659–660, 1982.
- 27) Yanaihara, C., Sato, H., Yanaihara, N., Naruse, S., Forsman, W.G., Helmstader, V., Fujita, T., Yamaguchi, K. and Abe, K.: Motilin-, substance P- and somatostatin-like immunoreactivities in extracts from dog, Tupaia and monkey brain and GI tract. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 106: 269–283, 1977.

(受付日: 57. 9. 8)