

氏名	たなか さおり 田中 早織
学位の種類	博士(薬科学)
学位記番号	論博薬科第73号
学位授与の日付	平成28年6月30日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文題目	胃幽門腺粘液細胞における PPAR α による NOS1/NO/cGMP を介した Ca ²⁺ 調節性開口放出の増強
論文審査委員	(主査) 教授 福永 理己郎 (副査) 教授 松村 人志 (副査) 教授 島本 史夫

論文内容の要旨

胃粘膜表面は粘液に覆われ、酸やペプシンなどによる攻撃から粘膜を防御している。粘液は高分子糖蛋白のムチンが主成分であり、粘液細胞内顆粒に蓄えられ、開口放出により細胞外へと放出される。大量の粘液を分泌している胃幽門腺粘液細胞では、生体ビデオ強調型顕微鏡を用いることで粘液顆粒の開口放出現象を直接観察することが出来る。開口放出は記録画像上で細胞内顆粒の急激な輝度変化として観察され、これを数えることで開口放出を高時間分解で定量的に評価出来る。

胃幽門腺粘液細胞における粘液分泌は、主に Ca²⁺調節性開口放出により維持されているが、アセチルコリン (ACh) 刺激による細胞内 Ca²⁺濃度の上昇により活性化される。胃幽門腺粘液細胞 Ca²⁺調節性開口放出は、急激な一過性の増加を示す初期相と、それに続くゆっくりと減少しながら低頻度の開口放出が持続する遅発相の特徴的な二相から構成される。胃幽門腺粘液細胞 Ca²⁺調節性開口放出は生化学的に独立した3つの反応から構成されている。すなわち、ドッキング、ATP 依存性プライミングおよび Ca²⁺依存性フュージョンである。胃幽門腺粘液細胞 Ca²⁺調節性開口放出において、初期相はプライミング顆粒（開口放出可能な顆粒）が一度に放出される反応（一過性で高頻度）であり、遅発相はプライミング、フュージョンが連続して起こる反応（持続

性で低頻度)である。

本研究では胃幽門腺粘液細胞 Ca^{2+} 調節性開口放出における SV2A タンパク質の役割を明らかにするとともに、NO/cGMP シグナル経路による開口放出の制御機構および PPAR α 刺激薬の細胞内調節機序について検討した。胃幽門腺粘液細胞 Ca^{2+} 調節性開口放出は cGMP を含む様々な物質により修飾されている。cGMP のアナログである 8BrcGMP はプライミング反応を亢進し、初期相を約 200%に増加させる。一方で、顆粒膜表面の Synaptic Vesicle protein 2A (SV2A、ATP 結合性のタンパク)はプライミングに関わる蛋白であり、SV2A に結合するレベチラセタムはプライミングを抑制することが報告されている。本研究ではレベチラセタムが Ca^{2+} 調節性開口放出の初期相を減少させ、同時に 8BrcGMP による初期相増強も抑制した。この結果は、SV2A 阻害によるプライミング反応抑制が初期相を減少させることを示している。さらに、PKG 阻害薬による cGMP シグナル抑制も初期相を減少させ、8BrcGMP による初期相増強を消失させた。しかし、遅発相において一過性の開口放出増加を引き起こした。この PKG 阻害による遅発相の一過性開口放出増加は、cGMP 依存性 phosphodiesterase 2 (PDE2) 抑制による cAMP 蓄積により引き起こされていた。

一方で胃幽門腺粘液細胞において、peroxisome proliferation activation receptor α (PPAR α) アゴニストは Ca^{2+} 調節性開口放出を増強した。血管内皮細胞あるいは心筋細胞では PPARs が一酸化窒素 (NO) 産生を活性化することが報告されている。これらの報告は、胃幽門腺粘液細胞においても PPAR α が NO 産生を刺激する可能性を示唆している。本研究では胃幽門腺粘液細胞において、PPAR α 刺激薬 GW7647 が NOS1 を介した NO 産生と cGMP 蓄積を引き起こした。また、GW7647 による Ca^{2+} 調節性開口放出増強は NOS1 阻害薬、PKG 阻害薬により消失したが、同時に遅発相に一過性の開口放出増加を引き起こした。これら結果から、PPAR α 刺激は NOS1/NO/cGMP 経路を介して Ca^{2+} 調節性開口放出を増強していることが明らかとなった。さらに、GW7647 が NO 産生を活性化する過程で NOS1 のリン酸化を引き起こしていた。この NOS1 のリン酸化は PI3K/Akt のリン酸化を介していた。これらの結果は、胃幽門腺粘液細胞では PPAR α /PI3K/Akt/NOS1 経路により NO 産生が活性化されることを示している。

本研究では、PPAR α による Ca^{2+} 調節性開口放出の増強機構を明らかにした。最初に、SV2A 阻害薬と PKG 阻害薬が、8BrcGMP による胃幽門腺粘液細胞 Ca^{2+} 調節性開口放出初期相の増強を抑制することを示した。さらに PKG 阻害薬は PDE2 を抑制し、cAMP

蓄積による遅発相に一過性の開口放出増加を起こすことも示した。これらの結果を用いて、PPAR α 刺激による NOS1/NO/cGMP シグナル活性化機構と NOS1 のリン酸化機構 (PI3K/Akt/NOS1) の詳細を明らかにした。以上の結果から、胃幽門腺粘液細胞の Ca²⁺調節性開口放出維持に PPAR α /NOS1/NO/cGMP 経路が必須であることが明らかとなった。本研究は胃幽門腺粘液細胞における粘液分泌に関与する細胞内調節機序を細胞生理学的に解明し、胃粘膜病変に対する新たな予防法・治療薬開発を提案できるための基礎研究である。

論文審査の結果の要旨

胃粘膜表面は粘液に覆われ、酸やペプシンなどによる攻撃から粘膜を防御している。粘液は高分子糖蛋白のムチンが主成分であり、粘液細胞内顆粒に蓄えられ、開口放出により細胞外へと放出される。大量の粘液を分泌している胃幽門腺粘液細胞では、生体ビデオ強調型顕微鏡を用いることで粘液顆粒の開口放出現象を直接観察することが可能となった。すなわち、開口放出は記録画像上で細胞内顆粒の急激な輝度変化として観察され、これを数えることで開口放出を高時間分解で定量的に評価することができる。

胃幽門腺粘液細胞における粘液分泌は、主に Ca^{2+} 調節性開口放出により維持されており、アセチルコリン (ACh) 刺激による細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇により活性化される。胃幽門腺粘液細胞 Ca^{2+} 調節性開口放出は、急激な一過性の増加を示す初期相と、それに続くゆっくりと減少しながら低頻度の開口放出が持続する遅発相の特徴的な二相から構成される。胃幽門腺粘液細胞 Ca^{2+} 調節性開口放出は、ドッキング、ATP 依存性プライミング、 Ca^{2+} 依存性フュージョンの生化学的に独立した 3 つの反応から構成されていると考えられており、開口放出の初期相はプライミング顆粒（開口放出可能な顆粒）が一度に放出される反応（一過性で高頻度）であり、遅発相はプライミングとフュージョンが連続して起こる反応（持続性で低頻度）であると考えられている。

以上の背景のもと、田中早織君は、胃幽門腺粘液細胞 Ca^{2+} 調節性開口放出における SV2A タンパク質の役割を解析するとともに、NO/cGMP シグナル経路による開口放出の制御機構および PPAR α アゴニストの作用機序について検討した。胃幽門腺粘液細胞 Ca^{2+} 調節性開口放出は様々な物質により修飾されており、cGMP アナログである 8BrcGMP 処理はプライミング反応を亢進し、初期相を約 200% に増加させる。一方で、顆粒膜表面の Synaptic Vesicle protein 2A (SV2A、ATP 結合性のタンパク) はプライミングに関わるタンパク質であり、SV2A に結合するレベチラセタムはプライミングを抑制することが報告されている。本研究では、レベチラセタムが Ca^{2+} 調節性開口放出の初期相を減少させ、同時に cGMP による初期相増強も抑制することを見出した。この結果は、SV2A 阻害によるプライミング反応抑制が初期相を減少させることを示している。さらに、PKG 阻害薬による cGMP シグナル抑制も初期相を減少させ、8BrcGMP による初期相増強を消失させた。しかし、遅発相において一過性の開口放出増加を引き起こした。この PKG 阻害による遅発相の一過性開口放出増加は、cGMP 依存性

phosphodiesterase 2 (PDE2) 抑制による cAMP 蓄積により引き起こされていることが示唆された。

一方で胃幽門腺粘液細胞において、peroxisome proliferation activation receptor α (PPAR α) アゴニストは Ca²⁺調節性開口放出を増強した。血管内皮細胞あるいは心筋細胞では PPARs が一酸化窒素 (NO) 産生を活性化することが報告されている。これらの報告は、胃幽門腺粘液細胞においても PPAR α が NO 産生を刺激する可能性を示唆している。本研究では、胃幽門腺粘液細胞において、PPAR α 刺激薬 GW7647 が NOS1 を介した NO 産生と cGMP 蓄積を引き起こすことを示した。また、GW7647 による Ca²⁺調節性開口放出増強は NOS1 阻害薬、PKG 阻害薬により消失したが、同時に遅発相に一過性の開口放出増加を引き起こした。これら結果から、PPAR α 刺激は、NOS1/NO/cGMP 経路を介して Ca²⁺調節性開口放出を増強していることが示唆された。さらに、GW7647 が NO 産生を活性化する過程で NOS1 のリン酸化を引き起こすこと、この NOS1 リン酸化は PI3K/Akt のリン酸化を介することが示唆された。田中君は以上の結果から、胃幽門腺粘液細胞では PPAR α /PI3K/Akt/NOS1 経路により NO 産生が活性化されると結論づけた。

以上、田中早織君は、本研究において PPAR α 刺激薬による Ca²⁺調節性開口放出の増強機構について解析した。まず最初に、SV2A 阻害薬 (レベチラセタム) と PKG 阻害薬が、8BrcGMP による胃幽門腺粘液細胞 Ca²⁺調節性開口放出初期相の増強を抑制することを示した。次いで、PKG 阻害薬が PDE2 の抑制を介した cAMP の蓄積によって、遅発相に一過性の開口放出増加を起こすことを示唆する結果を得た。さらにこれらの知見に基づき、PPAR α 刺激による NOS1/NO/cGMP シグナル活性化機構と NOS1 のリン酸化機構 (PI3K/Akt/NOS1) の詳細を明らかにした。これらの結果により、胃幽門腺粘液細胞の Ca²⁺調節性開口放出維持に PPAR α /NOS1/NO/cGMP 経路が関与することが明らかとなった。本研究の成果は、胃幽門腺粘液細胞による粘液分泌の制御機構に関する新規かつ重要な知見であり、胃粘膜病変に対する新たな予防法・治療法開発の基盤を提供するものである。

以上により、上記の論文は、博士(薬科学)論文として適当と判断する。