



# Functional Characterization of a Human Brain Cholecystokinin-B Receptor: A Trophic Effect of Cholecystokinin and Gastrin

伊藤, 光宏

---

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1994-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲1304

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1001304>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏名・(本籍)	伊 藤 光 宏 (愛知県)
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	博い第912号
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位授与の日付	平成6年3月31日
学位論文題目	Functional Characterization of a Human Brain Cholecystokinin-B Receptor: A Trophic Effect of Cholecystokinin and Gastrin (ヒト・コレシストキニン-B/ガストリン受容体を介する細胞増殖作用の解析)
審査委員	主査 教授 千 原 和 夫 教授 千 葉 勉 教授 前 田 盛

## 論 文 内 容 の 要 旨

### 諸 言

種々の膜受容体型チロシンキナーゼを介する細胞増殖作用はよく知られており、その癌遺伝子産物の多くはその細胞内シグナル伝達分子として同定されている。一方、近年G蛋白共役体を介する弱い細胞増殖促進作用がセロトニン受容体等に報告されているが、癌遺伝子としてはG蛋白共役体と相同性をもつ*mas*癌遺伝子が同定されているのみである。ガストリンは消化管に対して増殖促進作用があり、ラット胃においては高ガストリン血症によりECL細胞腫瘍が発生する。更に、肺小細胞癌、T細胞性白血病細胞株等、一部のヒト腫瘍細胞株で薬理学的方法によりコレシストキニン(CCK)-B/ガストリン受容体の発現が示されている。そこで、私達は、G蛋白共役型受容体と考えられるCCK-B/ガストリン受容体を介する細胞増殖促進の分子機構を解明するため、同受容体cDNAをヒト脳より単離し、CHO細胞に導入・発現させて以下の検討を行った。

### 方 法

ヒト脳および胃粘膜mRNAより $\lambda$ gt10をベクターに用いてcDNAライブラリーを作成し、先に私達がクローニングした*Mastomys*ガストリン受容体cDNA(Biochem.Biophys.Res.Comm.,1992,vol.187,pp.1151-1157)をプローブにスクリーニングし、ヒトCCK-B/ガストリン受容体cDNAクローンの塩基配列を決定した。

次に全コーディング領域を含むヒトcDNAクローンhCCKB4および*Mastomys*ガストリン受容体cDNAクローンmGR10を真核細胞発現ベクターpH $\beta$ APr1neoを用い、G418存在下でCHO細胞株に導入し、定常的に高発現する細胞株を選択し、以下の実験に供した。

第1に、24穴プレートに培養した上記発現細胞と $^{125}$ I-標識および非標識CCK-8およびガストリンIを用いて競合的結合阻害曲線を作成した。さらに種々のCCK様ペプチドに対する競合的阻害(IC<sub>50</sub>)をも測定した。

第2に、*myo*-[ $^3$ H]イノシトールでラベルした発現細胞を種々の濃度のCCK-8およびガス

トリン I で刺激した後、 $LiCl$  10mM 存在下に産生される水溶性分画中の放射性物質を測定することにより総イノシトールリン酸の産生増加を検討した。

第 3 に、fura-2 AM を負荷した発現細胞を種々の濃度の CCK-8 およびガストリン I で刺激し、細胞内 fura-2 蛍光の変化を測定することにより細胞内  $Ca^{2+}$  濃度を検討した。さらに 3 mM EGTA 存在下で同様の実験を行い、細胞外  $Ca^{2+}$  の影響を検討した。

第 4 に、発現細胞を 96 穴プレートに培養し、種々の濃度の CCK-8 およびガストリン I を処理後、 $[^3H]$  チミジンの取り込みを測定して DNA 合成を検討した。さらに  $1 \mu M$  の CCK-8 およびガストリン I 存在下の細胞増殖曲線を検討した。

次に、hCCKB4 cDNA プロブを用いて、種々のヒト組織での発現、さらに胃と脳の発現の局在を RNA プロット法にて解析した。

## 結 果

ヒト脳 CCK-B および胃ガストリン受容体は 447 個のアミノ酸から成り、7 回膜貫通構造をもつ同一の G 蛋白共役型受容体である。その一次構造は *Mastomys* およびイヌガストリン受容体と約 90 % と高い相同性を示したが、細胞質内第 3 ループは約 70 % とやや低い相同性であった。

ヒト CCK-B / ガストリン受容体発現 CHO 細胞 (CHO-hCCKB4) は CCK-8 とガストリン I いずれをも高親和性に結合した。CCK-8 に対する親和性の方が若干高かったが、同様に CHO 細胞に発現させた *Mastomys* ガストリン受容体 (CHO-mGR10) では両者がほぼ同等の親和性であった。CHO-hCCKB4 の種々の CCK 様ペプチドによる競合的結合阻害 ( $IC_{50}$ ) 活性は、CCK-8、CCK-33、ガストリン I、非硫酸化 CCK-8、CCK-4 の順に高かった。

CCK-8 およびガストリン I は、CHO-hCCKB4 に於て、用量依存性にイノシトールリン酸の水解を惹起した。受容体結合親和性と同様に CCK-8 の方がガストリン I より 1 桁活性が強かった。

また CCK-8 およびガストリン I は、CHO-hCCKB4 に於て、用量依存性にイノシトールリン酸の水解依存性と考えられるスパイク相と細胞外  $Ca^{2+}$  依存性のプラトー相から構成される二相性の細胞内  $Ca^{2+}$  上昇を惹起した。同様に CCK-8 がガストリン I より 1 桁活性が強かった。

さらに CCK-8 およびガストリン I は無血清培地にて用量依存性に受容体 cDNA 導入・発現細胞の DNA 合成および細胞増殖を促進した。

DNA 合成能は、CCK-8 の方がガストリン I より 1 桁活性が強かった。

hCCKB4 cDNA をプロブに用いたノーザンプロット解析にて、ヒト同受容体 mRNA は全長 2.3 kb で、脳、胃、脾に強い発現を認めた。脳では大脳に特に著明で、様々の領域に発現していた。胃では胃底腺領域の粘膜に強い発現を認めたが、胃前底部における発現は弱かった。

## 考 察

私達はヒト脳 CCK-B 受容体および胃ガストリン受容体をクローニングし、両者が同一であることを示し、さらに同受容体を CHO 細胞に発現させてその機能を調べ、同受容体を介する細胞増殖促進作用を初めて明らかにした。

ヒトおよび *Mastomys* 受容体の細胞質内第 3 ループにみられるアミノ酸配列の低い相同性や、CCK-8 およびガストリン I の結合親和性がヒトおよび *Mastomys* で若干異なった点は、種差と

考えられた。受容体 cDNA 導入 CHO 細胞と種々の CCK 様ペプチドの結合親和性は、ヒトやラット脳の細胞膜分画を用いたときの結合親和性と一致していた。

また、受容体 cDNA 導入 CHO 細胞の細胞内  $Ca^{2+}$  上昇やイノシトールリン酸水解上昇を CCK-8 およびガストリン I が惹起することから、同受容体 cDNA は細胞内シグナル伝達分子と共役している機能的受容体をコードしていると考えられる。

ガストリンには以前から胃腸管に対する増殖促進効果が示唆されてきた。高ガストリン血症の患者で胃粘膜の肥厚や、壁細胞や ECL 細胞の増加が知られ、ラット胃では  $H_2$  ブロッカーやプロトンポンプ阻害剤の長期投与による高ガストリン血症で ECL 細胞腫瘍の発生が報告されている。また、薬理的に、肺小細胞癌、膀胱癌、胃癌、結腸癌、T 細胞性白血病など種々のヒト腫瘍細胞株で CCK-B / ガストリン受容体の異所性発現が報告されている。さらに、ガストリン投与は、*in vivo* で結腸癌や胃癌の増殖を促進させるとの報告もある。これらは CCK-B / ガストリン受容体が腫瘍細胞の増殖に関与する可能性を示唆する。今回私達は、正常ヒト CCK-B / ガストリン受容体を介する CCK やガストリンの細胞増殖促進作用をヒト CCK-B / ガストリン受容体 cDNA 導入・発現 CHO 細胞を用いて明らかにした。

*mas* 癌遺伝子は G 蛋白共役型受容体と考えられているが、最近、セロトニン 1c 受容体、ムスカリン受容体、 $\alpha_{1B}$ -アドレナリン受容体がアゴニスト依存性に NIH-3T3 細胞を形質転換させること、セロトニンやノルアドレナリンが弱い DNA 合成能をもつことが報告された。

G 蛋白共役型受容体を介する細胞内情報伝達機構およびその細胞増殖機構はチロシンキナーゼ型受容体に比べてその解明があまり進んでおらず、ヒト CCK-B / ガストリン受容体のヒト癌細胞における生物学的機能の解明はこの方面の解明に役立つことが期待される。また同受容体の分子細胞生物学的解析は、ヒト中枢神経系や消化器における本受容体の包括的役割の解明に寄与することが期待される。

## 論文審査の結果の要旨

膜受容体型チロシンキナーゼを介する細胞増殖作用はよく知られているが、G 蛋白共役体を介する細胞増殖促進作用についての知見は少ない。ガストリンは消化管に対して増殖促進作用があり、また肺小細胞癌、T 細胞性白血病細胞株などヒト腫瘍細胞株でコレシストキニン (CCK) -B / ガストリン受容体の発現が示されている。申請者は、G 蛋白共役型受容体と考えられる CCK-B / ガストリン受容体を介する細胞増殖促進の分子機構を解明するため、まず同受容体 cDNA をヒト脳より単離した。ヒト脳および胃粘膜 mRNA より  $\lambda$ gt10 をベクターに用いて cDNA ライブラリーを作成し、*Mastomys* ガストリン受容体 cDNA をプローブにしてヒト CCK-B / ガストリン受容体 cDNA クローンを同定しその塩基配列を決定した。塩基配列から推定されたヒト CCK-B / ガストリン受容体は 447 個のアミノ酸より成り、7 回膜貫通構造をもつ G 蛋白共役型受容体であった。次に単離した同受容体 cDNA クローンを真核細胞発現ベクター pHBAPr1neo を用い、G418 存在下で CHO 細胞株に導入し、定常的に高発現する細胞株を選択した。受容体発現 CHO 細胞 (CHO-hCCKB4) は CCK-8 とガストリン I のいずれをも高親和性に結合したが CCK-8 に対する親和性の方がやや高かった。その他の CCK 関連ペプチドの競合的結合阻害 ( $IC_{50}$ ) 活性は CCK-8, CCK-33, ガストリン I, 非硫酸化 CCK-8, CCK-4 の順に高かった。CCK-8 とガストリン I は CHO-hCCKB4 に於て用量依存性にイノシトールリン酸の水解を

惹起し、それに呼応する細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  のスパイク上昇がみられ、また細胞外  $\text{Ca}^{2+}$  依存性のプラトー相も加わり 2 相性の細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  上昇を惹起した。さらに CCK-8 およびガストリン I は無血清培地において用量依存性に CHO-hCCKB4 の DNA 合成および細胞増殖を促進した。イノシトールリン酸水解能、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  上昇作用、DNA 合成能はすべて受容体結合親和性と同様 CCK-8 がガストリン I より 1 桁活性が強かった。hCCK-B4 cDNA をプローブに用いたノーザンブロット解析では、脳、胃、脾に mRNA の強い発現を認めた。脳では大脳に特に著明であり、また胃では胃底腺領域の粘膜に強い発現を認めた。今回クローニングされた受容体 cDNA を導入した CHO 細胞の細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  上昇やイノシトールリン酸水解上昇を CCK-8 およびガストリン I が惹起することより同受容体 cDNA は細胞内シグナル伝達分子と共役しうる機能的受容体をコードしていると考えられる。ガストリンには以前より胃腸管に対する増殖促進効果が示唆されており、また肺小細胞癌をはじめ各種ヒト腫瘍細胞株で CCK-B/ガストリン受容体の異所性発現が報告されているが、今回申請者達によってはじめてヒト CCK-B/ガストリン受容体を介する CCK やガストリンの細胞増殖促進作用が明確に証明された。以上、本研究は、ヒト脳および胃の CCK-B/ガストリン受容体をクローニングし、その分子細胞生物学的解析を行い、同受容体を介する細胞内情報伝達機構および細胞増殖機構をはじめて明らかにした価値ある研究であると考えられる。よって本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。