



G protein-coupled cholecystokinin-B/gastrin receptors are responsible for physiological cell growth of the stomach mucosa in vivo

長田, 明

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1997-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲1626

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1001626>

※ 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）	なが た あき 長 田 明	（兵庫県）
博士の専攻分野の名称	博士（医学）	
学位記番号	博い第1081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9年3月31日	
学位論文題目	G protein-coupled cholecystokinin-B/gastrin receptors are responsible for physiological cell growth of the stomach mucosa, <i>in vivo</i> . （胃粘膜細胞の増殖におけるG蛋白共役型CCK-B／ガストリン受容体の生理的役割に関する固体レベルでの検討）	
審査委員	主査 教授 千 原 和 夫 教授 片 岡 徹	教授 春 日 雅 人

論文内容の要旨

【緒言】

増殖因子やサイトカイン受容体を介する細胞内シグナル伝達同様に、ペプチドや神経伝達物質などのG蛋白共役型受容体のシグナル伝達に種々のチロシンキナーゼやRAS-MAPキナーゼ経路の活性化が関与していることが明らかにされ注目をあびている。G蛋白共役型受容体に作用するペプチドホルモンおよび神経伝達物質が*in vitro*において細胞増殖作用を示すのみならず、一部のG蛋白共役受容体がりガンド依存性に細胞をトランスフォーム（癌化）することも報告されてきた。しかし*in vivo*におけるG蛋白共役型受容体を介する細胞増殖作用の生理的意義についてはほとんど知られていない。

代表的な脳腸管ペプチドホルモンであるコレシストキニン（CCK）受容体もまた7回膜貫通型のG蛋白共役型受容体であり、膵臓などの末梢組織に多く発現するCCK-A受容体と中枢神経系に多く発現するCCK-B受容体の二種類が存在する。私達は遺伝子クローニングにより胃粘膜ガストリン受容体が大脳CCK-B受容体と単一のG蛋白共役型受容体であり（J. Biol. Chem. 268; p18300-5, 1993）、その細胞内情報伝達系は増殖因子や接着因子受容体よりのシグナルとクロストークすることを報告してきた。（Oncogene 9; p861-7, 1994; Oncogene 12; 1357-60, 1996）。今回、私達はジーンターゲット法によりCCK-B／ガストリン受容体欠損マウスを作成し、個体における同受容体の細胞増殖能の生理的意義を検討した。

【実験材料および方法】

1) CCK-B／ガストリン受容体欠損マウスの作成

ヒトCCK-B／ガストリン受容体cDNAをプローブとしてマウスゲノムライブラリーをスクリーニングし、マウスCCK-B／ガストリン受容体ゲノム遺伝子を単離した。本遺伝子の5つのエクソンのうち、第2から第5エクソンをLacZとプロモーターつきネオマイシン耐性遺伝子によって置換したターゲティングベクターを作成した。ES細胞にこのベクターを電気穿孔法によって導入し、サザンブロット法でスクリーニングした結果、6クローンの相同組み換え体を得た。そのうちの2クローン

からキメラマウスを作成し、交配によって、CCK-B／ガストリン受容体欠損マウスを作成した。

2) ^{125}I -CCK-8結合の競合的阻害能の計測

20週令の各遺伝子型ごとのマウスの脳および脾より蛋白を抽出し、CCK-8およびガストリン I 存在下での、 ^{125}I -CCK-8との結合能を測定した。

3) ノーザンプロット解析

各遺伝子型ごとのマウスの脳、胃、脾、精巣および肺よりトータルRNAを抽出しノーザンプロット用フィルターを作成し、マウスCCK-B／ガストリン受容体、CCK-A受容体、ヒスチジン脱炭酸酵素 (HDC)、 H^+ 、 K^+ -ATPase、クロモグラニンAのcDNAプローブを用いてハイブリダイゼーションを行った。

4) マウス胃粘膜の組織学的解析

18週令の各遺伝子型の雌マウスの胃を大彎側で開き肉眼的観察およびHE染色を施行した。また、各遺伝子型ごとの腺胃の重量、蛋白およびDNA含有量を測定した。さらに麻酔下でザンボーニ固定液による灌流固定後、胃を取り出し凍結切片を作成し、抗ラットクロモグラニンA抗体による免疫組織化学染色を行なった。

5) マウスへのプロトンポンプ阻害剤投与

8週令の各遺伝子型の雌マウスに対して、プロトンポンプ阻害剤（オメプラゾール） 400ng/g 体重・日の連日経口投与を10週間行なった。

6) マウス胃酸基礎分泌量の測定

8週令の各遺伝子型の雄マウスを3時間絶食後に、麻酔下で幽門結さつ術を施行し4時間後の胃液量とpHを測定した。

【結果】

1) CCK-B／ガストリン受容体欠損マウスの外観

ヘテロ変異体同士の交配によって、メンデル比どおりに野生型、ヘテロ変異体、ホモ変異体が誕生し、ホモ変異体は明らかな成長障害や体表奇形もなく、生殖可能であり現在2年まで長期生存可能であった。

2) CCK-B／ガストリン受容体欠損マウスのCCK-A受容体の発現

ノーザンプロット解析では、CCK-B受容体欠損によるCCK-A受容体mRNAの代償的増加は認めなかった。さらに、脳と脾における ^{125}I -CCK-8結合の競合的阻害能を用いた検討にて、CCK-B受容体欠損によってCCK-A受容体蛋白の発現量が影響を受けなかった。

2) 本受容体欠損マウスの無酸症と高ガストリン血症

ホモ変異体の胃酸基礎分泌能は野生型と比べて著しく低下していた。一方、血清ガストリン値はホモ変異体では野生型の約5倍に増加していた。オメプラゾール投与によって野生型の血清ガストリン値は約2倍に増加したが、ホモ変異体では増加しなかった。

3) 本受容体欠損マウスにおける壁細胞とECL細胞数に伴う胃粘膜萎縮

野生型と比べてホモ変異体の胃粘膜は著明に萎縮しているのが肉眼的に観察できた。腺胃部の重量、蛋白量およびDNA量はホモ変異体は野生型と比べて有意に減少していた。ラットにオメプラゾールを投与すると胃粘膜の肥厚をきたすことが報告されているが、オメプラゾールを経口投与した野生型マウスでは腺胃部の重量、蛋白量およびDNA量いずれの値も増加することが確認されたが、ホモ変異体ではこのような変化を認めなかった。胃粘膜のHE染色標本ではホモ変異体の胃粘膜の峽部と頸部

の菲薄化と壁細胞の減少を認めた。野生型ではオメプラゾール投与による胃粘膜肥厚がHE染色標本にて確認できたが、ホモ変異体の胃粘膜萎縮には影響は認められなかった。

次に、本受容体を発現する壁細胞とECL細胞の各マーカー遺伝子の発現量をノーザンブロット法によって検討した。ホモ変異体ではHE染色標本に見られた壁細胞数の減少と一致してそのマーカー遺伝子であるH⁺, K⁺-ATPaseの発現の有意な低下を認めた。同様に、ホモ変異体でのECL細胞のマーカーであるクロモグラニンAとHDCの発現も野生型と比べて著しく減少していた。HDCは脳皮質、基底核、肺および精巣でも発現しているが、これらの部位での発現量に変化はなく、HDC発現の激減は胃粘膜に特異的であった。オメプラゾール投与によって野生型マウスではH⁺, K⁺-ATPaseだけでなくHDCとクロモグラニンA発現の増加を認めたが、ホモ変異体ではそのような変化を認めなかった。

さらに抗クロモグラニンA抗体を用いた胃粘膜の免疫染色により、ホモ変異体でのECL細胞の減少を確認した。オメプラゾール投与によって野生型マウスではECL細胞は増加したが、ホモ変異体ではそのような増加を認めなかった。

【考察】

多くのG蛋白共役型受容体の活性化が、*in vitro*で細胞増殖を促進することが知られているが、これらのリガンド受容体の欠損マウスにおいて、G蛋白共役型受容体が成熟固体の特定細胞の生理的増殖に関与していることが示された例はほとんど無い。本研究においてCCK-B/ガストリン受容体欠損マウスに壁細胞とECL細胞数の減少に伴う胃粘膜萎縮が認められたことから、G蛋白共役型の本受容体が生理的な胃粘膜細胞の発育に中心的役割を果たしており、本受容体を介する細胞増殖制御機構を代償するものがないことがはじめて明らかとなった。

今日では全ての胃粘膜細胞が共通の胃粘膜幹細胞をもち、腺峡部の増殖細胞帯と呼ばれる部位において、この幹細胞が分裂、増殖するとともに、管腔方向と腺底方向に移動しながら分化し、しだいにその増殖能を失うと考えられている。CCK-B/ガストリン受容体欠損マウス胃粘膜に見られた成熟壁細胞の減少は、幹細胞レベルでの異常というよりは、未熟な壁細胞の増殖・分化の異常に起因するものと推測される。最近、壁細胞の欠損がその他の胃粘膜細胞の発育障害を引き起こすことが報告されており、CCK-B/ガストリン受容体欠損マウスにおける成熟壁細胞の減少が、他の胃粘膜細胞の増殖にも影響している可能性も考えられる。一方、成熟ECL細胞は増殖能を保持していることから、ガストリン受容体が、ECL前駆細胞だけでなく成熟ECL細胞の増殖制御にも重要な役割を果たしていると考えられる。

CCK-B/ガストリン受容体の新しい細胞生物学的機能として細胞骨格制御能が見いだされている。アクチンストレスファイバーの形成は細胞の走化性や接着能にも影響を与えられ、受容体欠損マウスに見られた胃粘膜発育障害が細胞増殖障害のみならず、増殖細胞帯よりの細胞の移動の障害にもとづく可能性も考えられる。また、増殖細胞帯での胃粘膜細胞の増殖は内分泌ホルモンのみならずオートクリン・パラクリンされる増殖因子によって制御されていると考えられる。しかし、胃粘膜細胞の増殖・分化にいかなる増殖因子が関与していようとも、G蛋白共役型のCCK-B/ガストリン受容体を介する細胞増殖制御機構を代償するものがないといえることができる。

論文審査の結果の要旨

G 蛋白共役型受容体を介するシグナル伝達機構に各種チロシンキナーゼやRAS-MAPキナーゼなど細胞増殖と関連の深い経路も関与していることが近年指摘されているが、*in vivo*においてG 蛋白共役型受容体を介する細胞増殖機構が作動していることを示す明確な成績はない。申請者達は、7回膜貫通型のG 蛋白共役型受容体の1つであるコレシストキニン (CCK) /ガストリン受容体をクローニングし、その細胞内情報伝達系が増殖因子や接着因子受容体よりのシグナルとクロストークすることを報告してきた。今回、申請者達はジーンターゲティング法によりCCK-B /ガストリン受容体欠損マウスを作成し、個体における同受容体の細胞増殖能の意義を検討した。マウスCCK-B /ガストリン受容体ゲノム遺伝子の第2から第5エクソンをLac Zとプロモーターつきネオマイシン耐性遺伝子に置換したターゲティングベクターを作製し、ES細胞に導入、6クローンの相同組み換え体を得た。そのうちの2クローンよりキメラマウスを作成し交配によってCCK-B /ガストリン受容体欠損マウスを作製した。ホモ変異体には明らかな成長障害や体表奇形は無く、生殖可能であり現在2年まで長期生存可能であった。ノーザンブロット解析で、CCK-B /ガストリン受容体欠損マウスにおいてCCK-A受容体mRNAの代償的増加は認めなかった。さらに¹²⁵I-CCK-8結合の競合的阻害実験でCCK-B /ガストリン受容体欠損マウスにおいてCCK-A受容体蛋白発現量は変化していなかった。ホモ変異体の胃酸基礎分泌能は野生型と比べ著しく低下していた。一方、血清ガストリン値はホモ変異体では野生型の約5倍に増加していた。オメプラゾール投与によって野生型の血清ガストリン値は約2倍に増加したが、ホモ変異体では増加しなかった。野生型と比べてホモ変異体の胃粘膜は著明に萎縮しているのが肉眼的に観察できた。腺胃部の重量、蛋白量およびDNA量はホモ変異体は野生型と比べて有意に減少していた。オメプラゾールを経口投与した野生型マウスでは腺胃部の重量、蛋白量およびDNA量いずれの値も増加することが確認されたが、ホモ変異体ではこのような変化を認めなかった。胃粘膜のHE染色標本ではホモ変異体の胃粘膜の狭部と頸部の菲薄化と壁細胞の減少を認めた。次に、本受容体を発現する壁細胞とECL細胞の各マーカー遺伝子の発現量をノーザンブロット法によって検討した。ホモ変異体ではHE染色標本に見られた壁細胞数の減少と一致してそのマーカー遺伝子であるH⁺, K⁺-ATPaseの発現の有意な低下を認めた。同様に、ホモ変異体でのECL細胞のマーカーであるクロモグラニンAとHDCの発現も野生型と比べて著しく減少していた。オメプラゾール投与によって野生型マウスではH⁺, K⁺-ATPaseだけでなくHDCとクロモグラニンA発現の増加を認めたが、ホモ変異体ではそのような変化を認めなかった。さらに抗クロモグラニンA抗体を用いた胃粘膜の免疫染色により、ホモ変異体でのECL細胞の減少を確認した。オメプラゾール投与によって野生型マウスではECL細胞は増加したが、ホモ変異体ではそのような増加を認めなかった。本研究においてCCK-B /ガストリン受容体欠損マウスに壁細胞とECL細胞数の減少に伴う胃粘膜萎縮が認められたことから、G 蛋白共役型の本受容体が生理的な胃粘膜細胞の発育に中心的役割を果たしており、本受容体を介する細胞増殖制御機構を代償するものがないことがはじめて明らかとなった。本研究は、G 蛋白共役型受容体を介する細胞増殖作用について、CCK-B /ガストリン受容体欠損マウスをジーンターゲティング法で作製し、*in vivo*における変化を形態学および分子生物学的手法で調べたものであるが、従来知られていなかった欠損マウスの特徴について重要な所見を得たものとして価値ある業績であると認める。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。