



Inhibitory Action of Sphingosine or Ceramide on Amylase Secretion from Isolated Rat Pancreatic Acini

新海, 政幸

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1998-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲1742

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1001742>

※ 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） 新 海 政 幸 （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1137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10年3月31日

学位論文題目 Inhibitory Action of Sphingosine or Ceramide on
Amylase Secretion from Isolated Rat Pancreatic Acini
（ラット単離膵腺房におけるスフィンゴシン，セラミドの
アミラーゼ分泌に対する抑制作用）

審査委員 主査 教授 黒田 嘉和
教授 尾原 秀史 教授 片岡 徹

論文内容の要旨

【はじめに】

近年、スフィンゴミエリン代謝産物は細胞内情報伝達機構の重要な経路のひとつとして認識されている。セラミド、スフィンゴシン、スフィンゴシン-1-リン酸などこの経路の代謝産物が、いくつかの生理現象あるいは病態生理現象における細胞内情報伝達系に関与することがこれまでに報告されている。

たとえば、vitamin D₃、tumor necrosis factor- α 、interferon- γ 、interleukin-1などの生理活性物質によりスフィンゴミエリナーゼが活性化され、これに引き続いて標的細胞内でセラミドの上昇が見られ、さらにセラミドがセカンドメッセンジャーとして機能し、細胞外刺激に対する生物学的作用を制御することが明らかになっている。また、同様にスフィンゴシンがヒト腫瘍細胞を起源とする培養線維芽細胞の細胞増殖においてセカンドメッセンジャーとして働いていることが報告されている。

ところで、膵外分泌は正常状態においては、コレシストキニン（以下CCK）、アセチルコリンなどの細胞外シグナルにより調節されている典型的な器官である。

これまでに、膵腺房細胞においてスフィンゴシンが細胞質内Ca²⁺濃度を増加させ、Ca²⁺ oscillationを誘発すること、またミクロゾームCa²⁺-ATPase活性を抑制すると共に、Ca²⁺取り込みをも抑制することが報告されている。しかし、これまでに膵酵素分泌反応に対するスフィンゴシン、セラミドの効果についての報告はなかった。

そこで、我々はスフィンゴシン、セラミドのラット単離膵腺房からのアミラーゼ分泌に対する抑制作用を示し、この現象の分子機構を解析し、その意義につき考察を加えた。

【対象と方法】

1) in vitro アミラーゼ分泌測定

単離膵腺房は体重200 - 250 gのWistar系雄性ラットより、コラゲナーゼ処理により採取した。

採取した膵腺房を適量の Hepes 緩衝 Ringer 液により 2-3 mg/ml の蛋白濃度となるよう調整したのち、50 ml の Erlenmeyer flask に移し 37℃、30 分間プレインキュベーションした。プレインキュベーションののち、膵腺房を新しい適量の Ringer 液により約 0.5 mg/ml の蛋白濃度となるよう調整し、2 ml ずつ膵腺房浮遊液を 25 ml の Erlenmeyer flask に移した。これらを C2 セラミド、C2 デヒドロセラミド、スフィンゴシンの存在下あるいは非存在下に 37℃、10 分間インキュベーションし、さらに各種分泌刺激を加え 20 分間インキュベーションした。インキュベーション後、1 ml を採取し、直ちに 10,000 g にて 20 秒間遠心した。放出されたアミラーゼの総量は総アミラーゼ含有量に対するインキュベーションの間に溶液中に放出されたアミラーゼ量の比として表わした。総アミラーゼ含有量は 1 ml の分泌刺激を加えてない膵腺房浮遊液を超音波破碎し、その上清の酵素活性を測定することにより評価した。

【結 果】

1) CCK 8 刺激によるアミラーゼ分泌に対する C2 セラミド、C2 デヒドロセラミドの効果

CCK の octapeptide である CCK 8 刺激によるアミラーゼ分泌は CCK 8 の低濃度領域では濃度依存性に増加し、100 pM 濃度で最大となり、それ以上では分泌抑制がみられた。CCK 8 刺激の前に 100 μ M の C2 セラミドを加えると、濃度依存曲線は下方に移動し、アミラーゼ分泌は C2 セラミドを添加しないコントロールと比べ約 55% に抑制された。ところが、CCK 8 刺激の前に加水分解型で不活性化型である C2 デヒドロセラミドを 100 μ M 加えても濃度依存曲線にほとんど変化はなくアミラーゼ分泌に影響を与えなかった。

2) カルバコール刺激によるアミラーゼ分泌に対する C2 セラミドの効果

膵外分泌に対するコリン性刺激剤である、カルバコール刺激によるアミラーゼ分泌は濃度依存性に増加し、3 nM で最大となる。カルバコール刺激の前に 100 μ M の C2 セラミドを加えると、濃度依存曲線は下方に移動し、アミラーゼ分泌はコントロールと比べ約 75% に抑制された。

3) CCK 8 刺激によるアミラーゼ分泌に対する C2 セラミド、スフィンゴシンの濃度効果

最大刺激濃度である 100 pM CCK 8 刺激下のアミラーゼ分泌は、添加した C2 セラミドの濃度に依存して抑制され、100 μ M の C2 セラミド存在下ではアミラーゼ分泌は約 55% に減少したが、C2 セラミド単独ではアミラーゼ分泌に影響を与えなかった。同様にスフィンゴシンも濃度依存性にアミラーゼ分泌を抑制し、40 μ M のスフィンゴシン存在下ではアミラーゼ分泌は約 55% に減少したが、スフィンゴシン単独ではアミラーゼ分泌に影響を与えなかった。

4) 他の分泌刺激物質によるアミラーゼ分泌に対する C2 セラミドの効果

フッ化ナトリウムはレセプター結合性 G 蛋白質を直接刺激し、アミラーゼ分泌を誘起するが、10 mM 刺激の前に 100 μ M の C2 セラミドを加えるとアミラーゼ分泌はフッ化ナトリウム単独の約 78% に減少した。ホルボールエステルである 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate (以下 TPA) 50 ng/ml 単独刺激によるアミラーゼ分泌には C2 セラミドは影響を与えなかった。しかし、Ca²⁺ イオノフォアである A23187 (2 μ M) 単独刺激や TPA (50 ng/ml) と A23187 (2 μ M) 同時刺激によるアミラーゼ分泌には C2 セラミド加えるとそれぞれ 75.4%, 77.3% に抑制された。

【考 察】

本論文で我々は、スフィンゴシンや C2 セラミドが、CCK 8 やカルバコール刺激によるラット単離膵腺房からの酵素分泌を濃度依存性に抑制することをはじめて示した。スフィンゴシンや C2 セラ

ミドそれ自身はアミラーゼの基礎分泌に影響を与えなかったが、C2セラミドはレセプター結合性 G 蛋白質を活性化するフッ化ナトリウムによるアミラーゼ分泌を抑制し、さらにカルシウム動員を促す A23187 によるアミラーゼ分泌を抑制した。

しかし、protein kinase C を活性化する TPA 刺激によるアミラーゼ分泌には影響を与えなかった。これまでに分泌反応に対するスフィンゴシン、C2セラミドの抑制作用に関しては、スフィンゴシンがヒト肺線維芽細胞においてフィブロネクチンの分泌を抑制すること、C2セラミドがラット白血病細胞において抗原刺激下のセロトニン放出や A23187 刺激下のセロトニン放出を抑制することが報告されている。これらの細胞におけるカルシウム動員以降の分泌過程におけるセラミドの作用は、ラット単離膵腺房におけるものと同様と考えられる。これらの結果から、我々はスフィンゴシンやセラミドがカルシウム動員以降の分泌過程において、膵外分泌を抑制しているものと考えた。

ところで、膵外分泌において酵素分泌の抑制は急性膵炎と関連しているとされ、CCK やそのアナログであるセルレインがラットに最大刺激濃度を超えて投与されると、著しい外分泌の低下とともに浮腫性膵炎を惹き起こすことが知られている。酵素分泌の抑制はチモーゲン顆粒の細胞内での輸送障害に由来し、in vitro において最大刺激濃度以上の CCK 8 刺激を加えることにより再構成されることが示されている。この様な膵腺房細胞レベルでの分泌抑制機序が急性膵炎発症機構と直結していると考えられ、これまでもこの問題が注目されてきた。ラット膵腺房には異なる親和性を持つ 2 種類の CCK 結合部位が存在し、高親和性結合部位はアミラーゼ分泌促進に、低親和性結合部位はアミラーゼ分泌抑制に関与しているとされてきたが、さらに少なくとも 3 種類の異なる親和性を持つ CCK 結合部位が存在することが最近の研究で判明している。しかし、これらの受容体活性化から分泌抑制に至る分子機構についてはいまだ明らかになっていない。

我々はこれまでに、この分泌抑制過程がカルシウム動員と protein kinase C の活性化以降にあることや、この分泌抑制機構に細胞内小胞輸送における微小管障害が関与していることを明らかにしている。最大刺激濃度を超える濃度の CCK 8 刺激により低下した分泌は、スフィンゴシンやセラミドによりさらに抑制されることから、スフィンゴミエリン代謝産物がこの機構に関与している可能性は、少ないものと考えられる。しかしスフィンゴシンやその関連代謝産物が細胞内メッセンジャーとして急性膵炎の発症機構に関与している可能性は否定できず、膵外分泌においてスフィンゴミエリン代謝産物を誘導する生理学的あるいは病態生理学的刺激についてさらなる検討が必要と考えられた。

論文審査の結果の要旨

近年、セラミド、スフィンゴシン、スフィンゴシン-1-リン酸などのスフィンゴミエリン代謝産物が細胞内情報伝達物質としての役目をなし、いくつかの生理現象あるいは病態生理的現象における細胞内情報伝達系に関与することがこれまでに報告されている。

一方、膵外分泌は正常状態においては CCK、アセチルコリンなどの細胞外シグナルにより調節されている典型的な器官である。これまでに、膵腺房細胞においてスフィンゴシンが細胞内 Ca^{2+} 濃度を増加させ、 Ca^{2+} oscillation を誘発すること、またミクロゾーム Ca^{2+} -ATPase を抑制するだけでなく、 Ca^{2+} 取り込みをも抑制することが報告されている。しかし、膵酵素分泌反応に対するスフィンゴシン、セラミドの効果についての報告はなかった。

そこで、スフィンゴシン、セラミドのラット単離膵腺房からのアミラーゼ分泌に対する作用とその分子機構を解析し、意義につき考察を加えている。

実験に用いた単離膵腺房は体重 200 - 250 g の Wistar 系雄性ラットよりコラゲナーゼ処理により採取した。採取した膵腺房をプレインキュベーションのち、C2 セラミド、C2 デハイドロセラミド、スフィンゴシン存在下もしくは非存在下に 37℃にて 10 分間インキュベーションし、さらに各種分泌刺激を加え 37℃にて 20 分間インキュベーションした。放出されたアミラーゼ量は、総アミラーゼ含有量に対するインキュベーションの間に溶液中に放出されたアミラーゼ量の比として表わし、総アミラーゼ含有量は分泌刺激を加えていない膵腺房浮遊液を超音波破碎して酵素活性を測定することにより評価している。

その結果、CCK 8 刺激によるアミラーゼ分泌は CCK 8 の低濃度領域では濃度依存性に増加し、100 pM 濃度で最大となり、それ以上では分泌抑制がみられた。CCK 8 刺激の前に 100 μ M の C2 セラミドを加えると、濃度依存曲線は下方に移動し、アミラーゼ分泌は C2 セラミドを添加しないコントロールと比べ約 55% に抑制された。ところが、加水分解型で不活化型である C2 デハイドロセラミドはアミラーゼ分泌に影響は与えなかった。また、カルバコール刺激によるアミラーゼ分泌も 100 μ M の C2 セラミド添加により約 75% に抑制された。さらに、スフィンゴシンも C2 セラミドと同様に濃度依存性にアミラーゼ分泌を抑制し、40 μ M のスフィンゴシン存在下では CCK によるアミラーゼ分泌は約 55% に減少したが、スフィンゴシン単独ではアミラーゼ分泌に影響を与えなかった。レセプター結合性 G 蛋白質を直接刺激するフッ化ナトリウムによるアミラーゼ分泌も、100 μ M の C2 セラミドにより約 78% に減少した。TPA (50 ng/ml) 刺激によるアミラーゼ分泌には C2 セラミドは影響を与えなかったが、A23187 (2 μ M) 刺激や、TPA (50 ng/ml) と A23187 (2 μ M) 同時刺激によるアミラーゼ分泌は C2 セラミドによりそれぞれ 75.4%、77.3% に抑制された。

本論文では、スフィンゴシンや C2 セラミドが、ラット単離膵腺房からの酵素分泌を濃度依存性に抑制することをはじめて報告し、さらにそれがカルシウム動員以降の分泌過程において作用していることを示唆する結果を示した。

ところで、膵外分泌において酵素分泌の抑制は急性膵炎と関連しているとされ、CCK やそのアナログであるセルレインがラットに生理的濃度を超えて投与されると著しい外分泌の低下とともに浮腫性膵炎が惹起され、膵腺房細胞レベルでの分泌抑制機序が急性膵炎発症機構と直結していると考えられている。本研究者の共同研究者らは、これまでにこの分泌抑制過程がカルシウム動員と protein kinase C の活性化以降にあることや、この分泌抑制機構に細胞内小胞輸送における微小管障害が関与していることを明らかにしている。

最大刺激濃度を超える CCK 8 刺激により低下した分泌が、スフィンゴシンやセラミドによりさらに抑制されることから、スフィンゴミエリン代謝産物が高濃度 CCK による分泌抑制機構に関与している可能性は少ないと考えられるが、スフィンゴシンやその関連代謝産物が細胞内メッセンジャーとして急性膵炎の発症機構に関与している可能性は否定できない。膵外分泌においてスフィンゴミエリン代謝産物を誘導する生理学的あるいは病態生理学的刺激についてさらなる検討が必要と考えられた。

以上、本研究は従来報告のなかったスフィンゴミエリン代謝産物（セラミド、スフィンゴシン）のラット単離膵腺房からの酵素分泌に対する作用を解析し、その分子機構について研究したものであり、スフィンゴミエリン代謝産物（セラミド、スフィンゴシン）の細胞内メッセンジャーとしての急性膵炎の発症機構への関与の可能性について、重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。

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。