



Neurokinin Receptor Antagonists Inhibit the Binding of Growth Hormone-Releasing Peptide to EP-1 Human Neuroblastoma Cells

田井, 茂

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1999-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲1970

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1001970>

※ 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）	た い しげる 田 井 茂 （香川県）
博士の専攻分野の名称	博士（医学）
学位記番号	博い第1214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11年3月31日
学位論文題目	Neurokinin Receptor Antagonists Inhibit the Binding of Growth Hormone-Releasing Peptide to EP-1 Human Neuroblastoma Cells （ニューロキニン受容体の拮抗剤は成長ホルモン放出ペプチドと培養ヒト神経芽細胞種 EP-1 細胞との結合を阻害する）
審査委員	主査 教授 千 原 和 夫 教授 中 村 肇 教授 玉 木 紀 彦

論文内容の要旨

緒言

成長ホルモン放出ペプチド（GHRP）は構造エネルギー計算と成長ホルモン分泌活性を指標として合成された人工産物であり、特にヒトにおいて強力な成長ホルモン分泌促進活性を示す。その作用機序には不明な点が多いが、成長ホルモン放出ホルモン（GHRH）とは異なる受容機構を介すると考えられている。GHRP の特異的結合部位は下垂体前葉及び視床下部に存在すると思われるが、その生化学的特性や分子構造は不明である。Bowers らは GHRP と下垂体及び視床下部細胞膜との結合がサブスタンス P の拮抗剤によって阻害され、かつサブスタンス P 自身では阻害されないと報告した。

この論文は第二世代の GHRP である KP-102（D-Ala-D-β-Nal-Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH₂）をリガンドとして、培養ヒト神経芽細胞種 EP-1 細胞を始めとする様々な培養細胞への GHRP の結合特性を検討し、さらにニューロキニン受容体の拮抗剤がそれに及ぼす影響を検討したものである。

方法

細胞培養 EP-1 細胞及び HeLa 細胞を10%胎児ウシ血清含有 Ham's F10培養液内で単層培養した。WI-26VA 4 細胞, HT1376細胞, COS 7 細胞, BS-C-1 細胞, RIN 細胞, NIH 3 T 3 細胞, L 細胞, UMR 細胞, MBT 2 細胞, RenCa 細胞及び CHO 細胞を10%胎児ウシ血清含有 DMEM 内で培養した。GH 3 細胞を15%ウマ血清及び2.5%胎児ウシ血清含有 DMEM 内で培養した。培養は37℃, CO₂ 5 % 及び空気95%の条件下で行った。単一ドナー由来の細胞を0.25%トリプシン/EDTA を用いて収穫し、35mm プラスチックペトリ皿に植えた。

結合実験 細胞を35mm 皿で3～4日間培養した。培養液を吸引除去した後、細胞を氷冷 PBS（pH 7.8）で洗浄した。10μM 非標識 KP-102の存在下あるいは非存在下で Ham's F10培養液 1 ml に各濃度の [³H] KP-102を添加した。細胞を37℃で60分間静置した後、洗浄した。細胞を0.1規定水酸化ナトリウムを用いて可溶化した後、液体シンチレーションカウンターを用いて細胞由来の放射活性を測定した。競合結合実験においては非標識 KP-102の代わりにそれぞれの試験物質を加えた。

化学的架橋結合実験 35mm 皿で培養した EP-1 細胞を過量の非標識 KP-102の存在下あるいは非

存在下で100nM [³H] KP-102と共に20℃で2時間培養した。細胞を氷冷 PBS で洗浄し、1 ml 氷冷 PBS 内に静置した。これにジメチルスルフォキシドで溶解したジサクシニミジルスベレート (DSS) を最終濃度0.5mM になるよう添加した後、4℃で20分間培養した。1 mM の EDTA を含有する50mM トリス緩衝液をこれに添加して反応を停止させた。次に細胞を1%のジゴキシゲニンで可溶化し、SDS-PAGE を行った。ゲルを EN³-HANCE に曝露し、乾燥させた後、自動現像機で解析を行った。

結果

EP-1細胞に対するKP-102の結合 EP-1細胞に対するKP-102の特異的な結合が認められた。Scatchard 分析の結果では高親和性 (K_d 値=210nM) と低親和性 (K_d 値=1.5μM) の2種類の特異的結合部位の存在が確認された。高親和性のコンポーネントの最大結合能は5.47pmol/10⁶細胞 (受容対数は約3200個/細胞) であった。KP-102の架橋結合 [³H] KP-102と可溶化した細胞膜蛋白との架橋結合の結果、分子量約80kDa のバンドが確認された。このバンドは10μM の非標識 KP-102の存在下あるいは非 DSS 処理下では同定されなかった。

KP-102の結合に対する各種物質の影響 GHRP-6, L694, 429, GHRH, メト-エンケファリン, アンギオテンシンII, ボンベシン, TRH, バゾプレッシン, ソマトスタチン-28, ガラニン, PHM, CRF, ニューロペプチド Y, プロスタグランディン E¹, Gpp NHp, 硫酸アトロピン, カルバコールといった, KP-102の結合に影響を与える可能性のある様々なペプチド及び非ペプチドで [³H] KP-102を用いた競合結合実験を行った。検討したいずれの物質も KP-102の EP-1細胞との結合に影響を与えなかった。

KP-102の結合に対するニューロキニン及びニューロキニン受容体拮抗剤の影響 KP-102の EP-1細胞との特異的結合に対するニューロキニン及びその拮抗剤の影響を検討した。サブスタンス P の拮抗ペプチドである [D-Arg¹, D-Phe⁵, D-Trp^{7,9}, Leu¹¹] サブスタンス P 及びサブスタンス P 受容体であるニューロキニン受容体1型 (NK-1R) の非ペプチド性拮抗剤である CP96,345及びSR140,333は全てKP-102の結合を阻害し、それぞれのIC₅₀値は10.0, 2.1及び23.0μM であった。一方、サブスタンス P 自身は阻害能を有しなかった。ニューロキニン受容体2型 (NK-2R) の非ペプチド性拮抗剤である SR48,968及びニューロキニン受容体3型 (NK-3R) の非ペプチド性拮抗剤である SR142,801もまたKP-102の結合を阻害し、それぞれのIC₅₀値は12.0, 及び4.0μM であった。

各種培養細胞に対するKP-102の結合 KP-102の結合の細胞特異性を検討するために様々な培養細胞に対して [³H] KP-102を用いて結合実験を行った。HT1376細胞, WI-26VA4細胞, BS-C-1細胞, COS7細胞, GH3細胞, RIN細胞, MBT2細胞, NIH3T3細胞, RenCa細胞, UMR細胞及びCHO細胞に対して特異的結合が認められた。HT1376細胞, MBT2細胞, NIH3T3細胞, RenCa細胞及びCHO細胞の結合特性はEP-1細胞のそれと類似していた。

考察

本論文で我々は, [³H] KP-102を用いて様々な細胞と, GHRP の結合特性を明らかにした。EP-1細胞において, 2種類のコンポーネントからなる特異的 KP-102結合部位の存在が明らかになった。高親和性のコンポーネントの K_d 値は GHRP とラット下垂体及び視床下部細胞膜との結合親和性とほぼ同等であった。架橋結合実験の結果, 分子量約80kDa のバンドが同定され, これは KP-102とその受容体からなる複合体であると思われる。

競合実験において, [³H] KP-102と EP-1細胞との結合は KP-102自身及び GHRP によって阻害されたが, GHRH を始めとする他の様々な物質では阻害されず, これは KP-102と EP-1細胞との結合が特異的なものであり, また GHRH 受容体を介するものではないことを証明する結果であっ

た。

一方、サブスタンス P 拮抗ペプチドは容量依存性に結合を阻害するにもかかわらず、サブスタンス P 自身及びサブスタンス K は阻害能を有しなかった。この結果はサブスタンス P 拮抗剤が GHRP とラット下垂体細胞膜との結合を阻害するというこれまでの報告と一致するものであった。さらに検討を進めた結果、NK-1 R, NK-2 R 及び NK-3 R, の非ペプチド性拮抗剤が KP-102 と EP-1 細胞との結合を阻害することが明らかになった。Schwartz らはサブスタンス P の受容体である NK-1 R の 2 番目の膜貫通領域における変異がサブスタンス P 自身の結合には影響を与えないにも関わらず、サブスタンス P と非ペプチド性拮抗剤との競合に影響を与えると報告した。彼らはこの現象を説明する推論として、NK-1 R にはいくつかの異なる形態すなわち、サブスタンス P 自身に親和性が高い形態と非ペプチド性拮抗剤に親和性が高い形態とが存在するという説を唱えている。通常はこれらは容易に相互変化するために 2 つのリガンドは互いに拮抗するが、ある種の変異によってこの相互変化が阻害されるために、各リガンド自身の親和性は変化しないにもかかわらず、両者の競合能に変化が生じると彼らは論じている。これと同様の現象はサブスタンス K の受容体である NK-2 R でも認められている。この説と我々の結果とを考え併せると、KP-102 はニューロキニン受容体に類似した分子のある部位に結合し、その分子はサブスタンス P 及び K 自身との結合親和性は低い、非ペプチド性拮抗剤とは高い親和性を示すものであるものが示唆される。

EP-1 細胞以外の各種培養細胞と KP-102 との結合実験を行った結果、様々な培養細胞において EP-1 細胞と同様の結合特性が認められた。この結果は GHRP の作用が臓器特異的かつホルモン特異的であることを考えれば、意外な結果であった。これまでに GHRP はラット成長ホルモン分泌細胞において、細胞内カルシウム濃度を上昇させることが報告されている。そこで我々はこれら培養細胞に対する KP-102 の結合が機能的なものかどうかを検討するために、fura-2 AM を用いて、培養細胞における細胞内カルシウム濃度を測定したが、EP-1 細胞を始めとする培養細胞においては KP-102 の結合において細胞内カルシウム濃度の上昇は認められなかった。この結果から、これら培養細胞に存在する KP-102 結合部位は受容体としての機能を持たない不完全なものであるか、あるいは細胞内シグナル伝達に必須である何らかの分子が培養細胞において欠損していると考えられた。

結語

KP-102 は EP-1 細胞においてニューロキニン受容体類似の構造を有する受容部位と結合することが強く示唆された。また、KP-102 の結合部位は様々な種類の細胞において存在するが、細胞内カルシウム濃度には変化は認められなかった。

論文審査の結果の要旨

成長ホルモン (GH) 分泌は視床下部に存在する成長ホルモン放出ホルモン (GHRH) とソマトスタチンによってそれぞれ促進および抑制の調整を受けることが知られている。米国 Tulane 大学 Bowers らは偶然の機会に Met-enkephaline アナログが下垂体に直接作用して GH 分泌を促進させることを見出した。そこで彼らは Met-enkephaline アナログを原形として構造エネルギー計算と GH 分泌活性を指標に多くのペプチドを人工的に合成し、その中で最も強力な GH 分泌促進活性を示したものを GH 放出ペプチド (GHRP) と名づけた。GHRP は第 1 世代から第 2, 第 3 世代と、より強力な GH 分泌活性を示すものが開発されてきているが、内因性 GHRP 様物質の存在は不明のままであり、またより有効な GHRP を開発する上でも GHRP 受容体をクローニングする事が必須であった。申請者

達は、その前段階として GHRP 受容体の特性を明らかにする目的で、第2世代の GHRP である KP-102 をリガンドとして、培養ヒト神経芽細胞種 EP-1 細胞をはじめ各種培養細胞への GHRP の結合特性を検討した。 [^3H] でラベルした KP-102 と種々の量の非標識 KP102 を培養 EP-1 細胞に加えたところ、EP-1 細胞に対する KP-102 の特異的な結合が認められ、Scatchard 分析の結果、高親和性 ($K_d=210\text{nM}$) と低親和性 ($K_d=1.5\mu\text{M}$) の2種類の特異的結合部位の存在が確認された。高親和性のコンポーネントの K_d 値は、既報のラット下垂体及び視床下部細胞膜と GHRP の結合親和性とほぼ同等であり、EP-1 細胞に存在する GHRP 受容体は下垂体や視床下部に発現しているものと同一であろうと推測された。次に EP-1 細胞に [^3H] KP-102 を結合させた後ジサクシニミジルスベレート (DSS) で化学的架橋を作り、ジゴキシゲニンで可溶化し SDS-PAGE を行ったところ分子量約 80kDa バンドが確認された。また、このバンドは多量の非標識 KP-102 を [^3H] KP-102 と共に添加した場合には検出されなかったことにより、この 80kDa は KP-102 とその受容体からなる複合体と考えられた。競合実験において [^3H] KP-102 と EP-1 細胞との結合は KP-102 自身及び GHRP-6 によって阻害されたが GHRH をはじめとする他の視床下部ペプチドでは阻害されず、KP-102 と EP-1 細胞との結合が特異的なものであり、また KP-102 は GHRH 受容体には結合しないことが明らかとなった。以前 Bowers らは、下垂体及び視床下部細胞膜と GHRP-6 の結合がサブスタンス P の拮抗剤によって阻害され、かつサブスタンス P 自身では阻害されないと報告している。そこで KP-102 の EP-1 細胞との特異的結合に対するサブスタンス P 拮抗ペプチド [D-Arg^1 , D-Phe^5 , $\text{D-Trp}^{7,9}$, Leu^{11}] -サブスタンス P 及び非ペプチド性ニューロキニン受容体 I 型拮抗剤 (CP96,345 と SR140,333), 非ペプチド性ニューロキニン受容体 2 型拮抗剤 (SR48,968), 非ペプチド性ニューロキニン受容体 3 型拮抗剤 (SR142,801) の影響を調べたところ、すべての拮抗薬で KP-102 の結合が阻害された。しかし、サブスタンス P やサブスタンス K ではまったく阻害されなかった。これらの成績より、KP-102 はニューロキニン受容体に類似した分子 (受容体) に結合する可能性が示唆された。以上、本研究 GHRP 受容体について、EP-1 細胞を用いてその特性を研究したものであるが、従来明らかでなかった GHRP 受容体発現細胞をはじめで見出し、GHRP 受容体の化学的性状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。