



Alteration of intracellular histamine H2 receptor cycling precedes antagonist-induced upregulation

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2013-08-27 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 大澤, 恵 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/318

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博論第 4 1 7 号	学位授与年月日	平成 1 8 年 2 月 1 5 日
氏 名	大 澤 恵		
論文題目	<p>Alteration of intracellular histamine H₂ receptor cycling precedes antagonist-induced upregulation (ヒスタミン H₂ 受容体の細胞内循環の変化が、拮抗剤による受容体のアップレギュレーションに先行する)</p>		

博士(医学) 大 澤 恵

論文題目

Alteration of intracellular histamine H₂ receptor cycling precedes antagonist-induced upregulation

(ヒスタミンH₂受容体の細胞内循環の変化が、拮抗剤による受容体のアップレギュレーションに先行する)

論文の内容の要旨

〔はじめに〕

ヒスタミンH₂受容体は胃の壁細胞に発現し酸分泌に関与しており、H₂受容体拮抗剤は消化性潰瘍や逆流性食道炎の治療に世界中で使用されている。しかし長期投与により耐性獲得や中止後のリバウンド現象が起こることが知られている。この現象に関連してH₂受容体拮抗剤の投与により壁細胞のH₂受容体のアップレギュレーションが起こることを我々は以前報告したが、その機序の詳細は知られていない。いくつかのG蛋白共役型受容体ではアゴニストの暴露により受容体エンドサイトーシスと、その後のダウンレギュレーションが起こることが知られている。今回、H₂受容体拮抗剤によるH₂受容体の調節機構が細胞内輸送に関連しているという仮説のもと、green fluorescence protein (GFP) で標識し可視化したH₂受容体を培養細胞に発現させて細胞内局在の変化を観察しH₂受容体のアップレギュレーションの機序を検討した。

〔材料ならびに方法〕

ヒトヒスタミンH₂受容体のC末端側にGFPを付加したヒトヒスタミンH₂受容体GFP融合蛋白(H₂受容体・GFP)発現ベクターを作製し、HEK293細胞にリポフェクション法を用いて一過性に発現させた。H₂受容体の定量は、H₂受容体拮抗剤の放射性リガンドである[3H]tiotidineを用いたbinding assayで行なった。H₂受容体・GFPの画像解析は、共焦点顕微鏡とエバネッセンス顕微鏡を用いて生細胞で経時的に行った。H₂受容体の細胞内局在は細胞内オルガネラ・マーカーを用いて共局在の有無で評価した。H₂受容体のアップレギュレーションが蛋白合成増大に依存するかを、mRNAレベルおよび蛋白合成阻害剤の影響についても検討した。

〔結果〕

HEK293細胞に発現させたH₂受容体・GFPは、野生型H₂受容体と比較し、発現レベル(Bmax)および親和性(Kd)には差を認めなかった。H₂受容体・GFPは、野生型H₂受容体と同程度のconstitutive activityを有し、3種類のH₂受容体拮抗剤(ファモチジン、シメチジン、ラニチジン)投与24時間後のアップレギュレーションはいずれも約2倍前後で認められた。H₂受容体・GFPの可視化から、アゴニストである100μMヒスタミン刺激により受容体はエンドサイトーシスを起こし、30分後には早期エンドソームに、60分でリサイクリングエンドソームに局在した。H₂受容体拮抗剤である100μMファモチジン投与は2時間以内の経過で受容体のエンドソームからのリサイクリングを引き起こした。さらに3時間以上の長時間の拮抗剤投与は、細胞膜のGFPの蛍光強度増大とともにbinding assayによるH₂受容体の増加を引き起こした。H₂受容体拮抗剤投与はH₂受容体のmRNAレベルには影響せず、アップレギュレーション後のcycloheximideによる蛋白合成阻害は、受容体数減少をもたらさず、アップレギュレーションは蛋白合成の増大には依存しな

いことが示された。一方で、アゴニストの長時間刺激は細胞内での後期エンドソームやリソゾームへの輸送を引き起こし、 H_2 受容体調節機構においてエンドサイトーシス後の蛋白分解経路が存在することも確認された。

〔考察〕

我々は本研究で、GFPをレポーターとして用いることではじめて H_2 受容体を生細胞で可視化して観察することに成功した。これまで我々がウサギの胃の壁細胞で確認した H_2 受容体拮抗剤による H_2 受容体のアップレギュレーションがHEK293細胞に発現させた H_2 受容体においても同様に再現された。 H_2 受容体拮抗剤投与は、3時間後より H_2 受容体を取りわけ細胞膜で増加させたが、これに先行して2時間以内にエンドソーム内の H_2 受容体が細胞膜へリサイクリングを起こすことが新たに見出された。このアップレギュレーションは H_2 受容体のmRNAの増加や蛋白合成阻害剤の投与による抑制効果が見られなかったことから、蛋白合成の増大でなく、蛋白分解の抑制によることが推測される。G蛋白共役型受容体のアゴニスト刺激によるダウンレギュレーションについては、先行して起こるエンドサイトーシスにより、受容体がエンドソームからリソゾームへ移行し蛋白分解が起こることが知られている。近年、細胞膜の受容体数制御は、リガンドの非存在下においてもエンドサイトーシスとリサイクリングの平衡が存在し、合成とリソゾームでの分解の平衡が同様に存在すると言われている。このことを考慮すると、 H_2 受容体拮抗剤によりリサイクリングがエンドサイトーシスより優位となり結果として、エンドソーム内の受容体が減少し、リソゾームでの分解が減少する結果として受容体のアップレギュレーションが起こると考えられた。

〔結論〕

H_2 受容体拮抗剤投与は、 H_2 受容体のアップレギュレーションに先行して、エンドサイトーシスとリサイクリングの平衡状態をリサイクリング優位に変化させる。

論文審査の結果の要旨

G蛋白共役型受容体ファミリーに属するヒスタミン H_2 受容体は胃の壁細胞に発現し酸分泌に関与している。その H_2 受容体のアンタゴニストは消化性潰瘍や逆流性食道炎の治療に広く使用されている。一方で H_2 アンタゴニスト長期投与により耐性獲得や中止後のリバウンド現象が起こることが知られている。以前に申請者のグループは、 H_2 受容体アンタゴニストの投与により壁細胞の H_2 受容体の増加が起こることを報告した。これまで他のいくつかのG蛋白共役型受容体ではアゴニストの暴露により受容体のエンドサイトーシスと、その後のダウンレギュレーションが起こることが知られているが、 H_2 アンタゴニストによる H_2 受容体増加のメカニズムは明らかでなかった。今回申請者は、 H_2 アンタゴニストによる H_2 受容体の調節機構が細胞内輸送に関連しているという仮説を立て、 H_2 受容体を可視化し、リアルタイム分子イメージングの技術を駆使して細胞内動態を解析した。実際にはgreen fluorescence protein (GFP)で標識した H_2 受容体を培養細胞に発現させて細胞内局在の変化をタイムラプス共焦点蛍光顕微鏡やエバネッセンズ顕微鏡で観察し、 H_2 受容体のアップレギュレーションの機序を解析した。

〔材料ならびに方法〕

(1) ヒトヒスタミン H_2 受容体のC末端側にGFPを付加したヒトヒスタミン H_2 受容体GFP融合蛋白(H_2 受容

体・GFP)発現ベクターを作製し、HEK293細胞にリポフェクション法を用いて一過性に発現させた。

- (2) H₂受容体・GFPの画像解析は、タイムラプス共焦点顕微鏡とエバネッセンス顕微鏡を用いて生細胞で経時的に行った。H₂受容体の細胞内局在は細胞内各種オルガネラ・マーカーを用いて共局在の有無で評価した。
- (3) H₂受容体の定量は、H₂受容体アンタゴニストの放射性リガンドである [³H]tiotidineを用いたbinding assayで行なった。
- (4) H₂受容体アンタゴニスト投与によりH₂受容体mRNAレベルが変動するか、蛋白合成阻害剤(サイクロヘキシミド)でH₂受容体レベルが変動するかを検討し、H₂受容体のアップレギュレーションのメカニズムについて解析した。

〔結果〕

- (1) HEK293細胞に発現させたH₂受容体・GFPは、野生型H₂受容体と比較し、発現レベル(*Bmax*)および親和性(*Kd*)には差を認めなかった。
 - (2) 3種類のH₂受容体アンタゴニスト(ファモチジン、シメチジン、ラニチジン)投与24時間後、H₂受容体は約2倍前後アップレギュレーションした。
 - (3) ヒスタミン刺激によりH₂受容体はエンドサイトーシスを起こし、30分後には早期エンドソームに、60分でリサイクリングエンドソームに局在した。
 - (4) ファモチジン投与により2時間以内の経過で受容体のエンドソームからのリサイクリングを引き起こした。さらに3時間以上の長時間のアンタゴニスト投与は、細胞膜のGFPの蛍光強度増大とともにbinding assayによるH₂受容体の増加を引き起こした。
 - (5) H₂受容体アンタゴニスト投与はH₂受容体のmRNAレベルには影響せず、アップレギュレーションは蛋白分解の抑制に起因することが示唆された。
 - (6) アゴニストの長時間刺激は細胞内での後期エンドソームやリソゾームへの輸送を引き起こし、H₂受容体調節機構においてエンドサイトーシス後の蛋白分解経路が存在することも確認された。以上より、申請者は本研究でH₂受容体を生細胞で可視化して観察することに初めて成功した。さらにこのシステムによって、H₂受容体アンタゴニスト投与は、H₂受容体のアップレギュレーションに先行して、エンドサイトーシスとリサイクリングの平衡状態をリサイクリング優位に変化させることを見出した。
- 審査委員会では、H₂受容体細胞内動態に関し高度なイメージング技術を用いて解析することに成功した点を高く評価した。

以上の研究に対し審査委員会では以下の質疑を行った。

- 1) GFPをH₂受容体のC末端に配置した理由について
- 2) GFP結合型H₂受容体のヒスタミン刺激時のcAMP増加について
- 3) 実験で用いた薬物濃度と臨床用量の比較について
- 4) 胃由来細胞でなくHEK293細胞を用いたことについて
- 5) 時間経過に伴うエンドソームの細胞内局在について
- 6) H₂受容体のconstitutive activityについて
- 7) H₂アンタゴニストの長期投与による受容体リサイクリングについて
- 8) G-protein coupled receptor kinaseの関与はあるのか
- 9) リバウンド現象の回復期間について(実験と臨床の比較)

10) H₂受容体を分解しているのはプロテアソーム系かリソゾーム系か

これらの質問に対し申請者の解答は適切であり、問題点も十分理解しており、博士(医学)の学位論文にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者	主査	北	川	雅	敏	
	副査	今	野	弘	之	副査 近 藤 一 直