



## Stimulation of muscarinic m3 receptor subtype induces tyrosine phosphorylation and MAP kinase activation in TMK -1 gastric cancer cells

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-11-05 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 小平, 誠 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10271/1095">http://hdl.handle.net/10271/1095</a>

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	医博第 242号	学位授与年月日	平成10年 3月26日
氏名	小平 誠		
論文題目	Stimulation of muscarinic m3 receptor subtype induces tyrosine phosphorylation and MAP kinase activation in TMK-1 gastric cancer cells (胃癌培養細胞株 TMK-1 における m3 ムスカリン性アセチルコリン受容体刺激による細胞内蛋白質チロシンリン酸化と MAP キナーゼ活性化)		

(医学) 小平 誠

## 論文題目

Stimulation of muscarinic m3 receptor subtype induces tyrosine phosphorylation and MAP kinase activation in TMK-1 gastric cancer cells

(胃癌培養細胞株 TMK-1における m3ムスカリン性アセチルコリン受容体刺激による細胞内蛋白質チロシンリン酸化とMAPキナーゼ活性化)

## 論文内容の要旨

### 〔背景と目的〕

われわれは、これまでにムスカリン性アセチルコリン受容体（ムスカリン性受容体）の胃における分泌、運動機能を検討してきた。最近これら G蛋白質に共役する受容体刺激による増殖促進作用が報告されるようになった。今回消化管粘膜上皮細胞における m3ムスカリン性受容体刺激による増殖促進効果を検討する目的で、胃癌細胞樹立株を用い、カルバコール（ムスカリン性受容体アゴニスト）刺激による細胞内蛋白質チロシンリン酸化、mitogen-activated protein kinase (MAPキナーゼ)活性を検討した。

### 〔方法〕

- 1) RT-PCR法により m3ムスカリン性受容体の存在の有無を調べた。
- 2) 細胞にカルシウム感受性色素、Fura-2を取り込ませ画像解析装置で10 μMカルバコール刺激による細胞内カルシウム濃度の変化を検討した。
- 3) [<sup>3</sup>H] QNB (quinuclidinyl benzilate: ムスカリン性アンタゴニスト)による結合実験によりムスカリン性受容体の存在を検討した。
- 4) 100 μMカルバコール刺激後の細胞から抽出した蛋白10 μgを SDS-PAGE で分離し、抗リン酸化チロシン抗体で、細胞内チロシンリン酸化を検討した。
- 5) 100 μMカルバコール刺激後の細胞抽出液を用い、特異的にリン酸化される合成ペプチドを基質としてMAPキナーゼ活性を検討した。

### 〔結果〕

- 1) 8種の胃癌細胞株 (MKN-1, 7, 28, 45, 74, KATO-III, TMK-1, NUGC-3)のうち5種 (MKN-1, 7, 28, 74, TMK-1)に m3ムスカリン性受容体の mRNA の発現が確認された。
- 2) 8種の細胞のうち、6種 (mRNAをもつ5種と KATO-III)でカルバコール刺激により細胞内カルシウム濃度が上昇した。細胞株により反応する細胞の割合が異なり、MKN-1: 32%、MKN-7: 4%、MKN-28: 11%、MKN-74: 2%、TMK-1: 90%、KATO-III: 10%であった。  
以下TMK-1細胞を実験に用いた。
- 3) [<sup>3</sup>H] QNBによる結合実験により、Kd値  $0.13 \pm 0.03$  (mean  $\pm$  SE) nM, 1細胞あたり  $16,800 \pm 1,200$  のムスカリン性受容体の存在が示された。
- 4) カルバコール刺激5分後、15分後とも同様に分子量約100kDaの蛋白のチロシンリン酸化の増強が認められた。
- 5) カルバコール5分間の刺激により容量依存的にMAPキナーゼの活性が亢進した。無刺激時  $1.7 \pm 2.0$  (mean  $\pm$  SE) pmol/min. mg protein から  $25.4 \pm 4.1$  pmol/min. mg protein に活性化された。TGF

$\alpha$  刺激 ( $101.0 \pm 17.6$  pmol/min. mg protein) と比較し、活性は低く、15分以降はすみやかに活性の減少を認めた。この反応は特異的プロテインキナーゼC阻害薬のカルフォスチンCでは阻害されず、またプロテインキナーゼC刺激薬PMA(ホルボールエステル)による反応とは異なる時間経過を示した。

#### [考察]

胃癌細胞樹立株においてカルバコール刺激により、細胞内カルシウムの上昇、細胞内蛋白のチロシンリン酸化、およびMAPキナーゼ活性化をきたした。細胞内カルシウムの上昇については、反応しない細胞が存在し、細胞株の多クローン性などが考えられた。MAPキナーゼの活性化は容量、時間依存的で、プロテインキナーゼCに非依存적と考えられた。今回MAPキナーゼ活性化に関わらず、細胞増殖へは至らなかった(結果未提示)。その理由として内因性レセプターの密度が少なく、シグナルが弱い可能性、他の増殖因子刺激によるシグナルと協調作用をもつ可能性などが考えられた。

#### [結論]

胃癌細胞樹立株において比較的普遍的にm3ムスカリン性受容体の発現が示され、その刺激は細胞内蛋白のチロシンリン酸化、およびMAPキナーゼの活性化を引き起こした。

### 論文審査の結果の要旨

近年G蛋白質に共役する受容体刺激による細胞増殖促進作用が報告されるようになった。消化管上皮細胞においては、ガストリンによる細胞増殖促進効果が報告されている。本研究は消化管粘膜上皮細胞におけるm3ムスカリン性アセチルコリン受容体(m3受容体)刺激による増殖促進効果を検討する目的で行われた。

実験は以下の方法により行われた。1) 8種の胃癌培養細胞樹立株を用い、RT-PCR法によりm3受容体のmRNAの発現を検討した。2) カルシウム感受性色素Fura- IIを用い、カルバコール(ムスカリン性受容体アゴニスト)刺激による、細胞内カルシウム濃度( $[Ca^{2+}]_i$ )の上昇を検討した。以下の実験ではTMK-1細胞を用いた。3)  $[^3H]$ QNB(非特異的ムスカリン性受容体アンタゴニスト)による結合実験を行った。4) カルバコール刺激による細胞内蛋白のチロシンリン酸化をWestern blottingで検討した。5) カルバコール刺激によるmitogen-activated protein kinase(MAPキナーゼ)の活性化を検討した。6) 増殖刺激効果をチミジンの取り込み、およびMTTアッセイで検討した。

本研究により以下の3点が明らかになった。①胃癌培養細胞樹立株においてm3受容体が発現しており、その刺激により $[Ca^{2+}]_i$ の上昇を認めた。②TMK-1細胞においてm3受容体刺激で、約100kDaの未知の蛋白のチロシンリン酸化を認めた。③TMK-1細胞においてm3受容体刺激で、MAPキナーゼが活性化された。その活性は一過性であり、増殖効果は認めなかった。これらの結果から胃粘膜細胞においてm3受容体からの刺激は $[Ca^{2+}]_i$ 上昇やMAPキナーゼの活性化をきたすが、明らかな細胞増殖刺激効果は示さないことが認められた。m3受容体は粘膜の恒常性を保つための何らかの機能を果たしていることが考えられる。

本研究により、胃癌培養細胞は胃粘膜細胞のm3受容体の機能を解明するためのモデルとなりうる事が示唆された。今後100kDaの蛋白質を同定し、正常胃粘膜における発現と機能を検討したり、TMK-1

細胞および正常胃粘膜において、m3受容体刺激のアポトーシスへの関与等を検討することにより、胃粘膜細胞におけるm3受容体の機能が追求できると考えられる。

申請者の発表に対し、次のような質疑が行われた。

- 1) 細胞の分化度とm3受容体の発現の関係
- 2) m3受容体以外のムスカリン性受容体の発現はあるのか
- 3)  $[Ca^{2+}]_i$ 測定に蛍光物質としてFura- IIを選んだ理由は
- 4)  $[Ca^{2+}]_i$ のoscillationが起きている可能性は
- 5) TMK-1細胞でのムスカリン性受容体の量は生体の胃壁細胞の受容体量と比べてどうか
- 6) positive controlとしてTGF $\alpha$ の代わりにEGFを使用した方が良いのではないか
- 7) 無刺激時に認められる170kDaのバンドの意味は
- 8) チロシンキナーゼ活性を5分後で測定した理由、活性の最高値は5分より早いのではないか
- 9) カルバコールが持続的にMAPキナーゼを活性化しないのはなぜか
- 10) カルバコールのMAPキナーゼ活性化に対するホルポールエステルとカルフォスチンCの効果の違いはどのように説明するのか
- 11) TMK-1細胞でガストリンのMAPキナーゼ、チミジンの取り込みに対する作用は調べてあるのか
- 12) 増殖細胞でG蛋白系とチロシンキナーゼ系がクロストークしていることを示す論文があるか
- 13) この研究は今後どのように展開するのか

これらの質問に対し申請者の解答は概ね適切であり、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 教授 橋本久邦

副査 教授 馬場正三 副査 助教授 内藤恭久