



Pharmacological Classification of Muscarinic Receptor Subtypes on Guinea Pig Gastric Chief Cells

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-27 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 菅沼, 登 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/974

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 1 2 1 号	学位授与年月日	平成 4 年 3 月 2 6 日
氏 名	菅 沼 登		
論文題目	Pharmacological Classification of Muscarinic Receptor Subtypes on Guinea Pig Gastric Chief Cells (モルモット胃主細胞上のムスカリン性受容体の薬理学的サブタイプに関する研究)		

医学博士 菅 沼 登
論文題目

Pharmacological Classification of Muscarinic Receptor Subtypes on Guinea Pig Gastric Chief Cells

(モルモット胃主細胞上のムスカリン性受容体の薬理学的サブタイプに関する研究)

論文の 内 容 の 要 旨

目的：ムスカリン性アセチルコリン受容体は、薬理学的に、 M_1 、 M_2 、 M_3 型の3つに分類されており、又5種類の遺伝子の存在が報告されている。ところで、胃の主細胞からのペプシノーゲン分泌には、ムスカリン性受容体による刺激が大きく関与していると考えられている。しかし、胃主細胞上のムスカリン性受容体のサブタイプ分類については、十分には解明されておらず、特に M_3 型選択的アンタゴニストであるパラフルオロヘキサハイドロシラディフェニドール(p-fluoro-hexahydrosiladifenidol: p-F-HHSiD) およびヘキサハイドロシラディフェニドール(hexahydrosiladifenidol: HHSiD)の効果に関しては、まだ報告がなされていない。今回私は、 M_1 型選択性アンタゴニストのピレンゼピン、 M_2 型選択性アンタゴニストの AF-DX 116、および上記の M_3 型選択性アンタゴニストを用いて、モルモット胃主細胞上のムスカリン性受容体の性質を検討した。

方法：ラウフマンおよびソルらの方法に準じて、モルモット胃粘膜より、酵素処理により遊離胃腺を得、さらにキレート剤処理およびパーコール密度勾配遠心法にて、主細胞を分離した。ペプシノーゲン分泌実験においては、主細胞または遊離胃腺にアゴニストを単独、又は、アンタゴニストを共に加えて30分間反応させ、培養液中に放出されたペプシノーゲン量をアンソンマースキー法にて測定した。放射性リガンドを用いた結合実験においては、主細胞にトリチウム化 N メチルスコポラミン ($[^3\text{H}]\text{N-methylscopolamine}$: $[^3\text{H}]\text{NMS}$) を単独、又はアンタゴニストを共に加えて45分間培養し、遠心したのち、細胞に結合した放射活性を測定した。

結果：ムスカリン性アゴニストであるカルバコールは、主細胞または遊離胃腺からのペプシノーゲン分泌を、用量依存性に刺激した。主細胞と遊離胃腺の間には、反応性に有意な差は認められず、最大刺激は、1 mM で得られ、 EC_{50} は、 $16\ \mu\text{M}$ であった。尚、 M_1 型選択性アゴニストである McN-A-343 は、1 mM の濃度でも、有意な分泌反応を起こさなかった。

各々のアンタゴニストは、1 mM のカルバコール刺激による遊離胃腺からのペプシノーゲン分泌反応を、用量依存性に抑制した。アトロピンは、最も potency が高く (IC_{50} , $0.14\ \mu\text{M}$)、以下 potency の順に IC_{50} を共に示すと、HHSiD $0.21\ \mu\text{M}$; p-F-HHSiD $1.1\ \mu\text{M}$; ピレンゼピン $20\ \mu\text{M}$; AF-DX 116 $250\ \mu\text{M}$ であった。又、Shild 解析によって得られた、各アンタゴニストの機能的な親和性の指標である pA_2 値は、下表の様であった。

放射性的ムスカリン性アンタゴニストである $[^3\text{H}]\text{NMS}$ は、主細胞に対し特異的な結合性を示し、その解離定数 K_d は、 0.47nM であった。各アンタゴニストは、 $[^3\text{H}]\text{NMS}$ の主細胞への結合を用量依存性に抑制した。各薬剤の IC_{50} より求められた解離定数 K_d は、それぞれ HHSiD 25nM , p-F-HHSiD 83nM , pirenzepine 340nM , AF-DX 116 5200nM であった。尚、各薬剤の $-\log(K_d)$ 値を下表に示す。

	atropine	HHSiD	p-F-HHSiD	pirenzepine	AF-DX 116
pA_2	8.53	7.90	7.53	6.50	5.49
$-\log(K_d)$	-	7.60	7.08	6.47	5.28

結論：モルモット胃主細胞に対する M_1 、 M_2 、 M_3 型選択性アンタゴニストの親和性が求められた。 M_3 型選択性アンタゴニストである p-F-HHSiD および HHSiD は、 pA_2 値、 $-\log(K_d)$ 値共に7以上の値であり、それらは高親和性を示した。又、 M_1 型選択性アンタゴニストのピレンゼピンは、中等度の、 M_2 型選択性の AF-DX 116 は、低い親和性を示した。以上の結果より、モルモット胃主細胞上のムスカリン性受容体は、薬理学的に M_3 型に分類されることが考えられた。

論文審査の結果の要旨

ムスカリン性受容体のサブタイプは薬理学的には、 M_1 、 M_2 、 M_3 型の3つに分けられる。胃の主細胞は、刺激によりペプシノーゲン分泌を行うが、この分泌に関する受容体が、どの型のサブタイプであるのか、まだ十分明らかにされていない。比較的良く研究されている壁細胞の場合でも、モルモットは M_1 、ラットは M_3 といわれ、犬やヒトでは不明である。また、主細胞では、犬で M_1 であろうと言われているが、その他の動物でははっきりした報告はない。

そこで申請者は、ヒスタミンなどによる酸分泌反応が、比較的ヒトと類似しているモルモットを用いて、以下の実験を行った。

方法としては、次の二通りをもちいた。①遊離胃腺と主細胞からの、アゴニストによるペプシノーゲン分泌反応に対する各種ムスカリン性アンタゴニストの影響より、それぞれのアンタゴニストの効果の pA_2 値を求める。②遊離主細胞にトリチウム化 N メチルスコポラミンを単独、又はアンタゴニストを共に加える実験により、主細胞と夫々のアンタゴニストの結合の K_d 値を求める。 M_1 型選択性アンタゴニストとしてピレンゼピン、 M_2 型選択性アンタゴニストとして AF-DX 116、 M_3 型選択性アンタゴニストとしては、新たに開発されたパラフルオロヘキサハイドロシラディフェニドール(p-F-HHSiD)およびヘキサハイドロシラディフェニドール(HHSiD)を用いた。この M_3 型選択性アンタゴニストを用いて主細胞のサブタイプを調べた研究は、未だなされていない。

その結果、 M_3 型選択性アンタゴニストである p-F-HHSiD の pA_2 値と K_d 値は、それぞれ29nM と83nM、HHSiD では12nM と25 nM でありこれらは全て100nM以下の値であることより、高い親和性を示すと考えられた。又、ピレンゼピンの pA_2 値と K_d 値は、それぞれ320nM と340nM、AF-DX 116では3200 nM と5200nM と、共に低い親和性を示した。

以上の結果より、モルモット胃主細胞のムスカリン性受容体は、 M_3 型である事が明らかにされた。

この論文の審査に際して、以下の様な質問がなされた。

- ①ガストリンの主細胞、壁細胞に対する作用
- ②ソマトスタチン分泌に対する、酸、ペプシノーゲン分泌の影響
- ③ゾーリンガー・エリソン症候群でのガストリン、ペプシノーゲンの血中濃度レベル
- ④血中ペプシノーゲン変動の意義
- ⑤ペプシンと消化管ホルモン分泌との関連
- ⑥受容体のサブタイプが知られているもので、ムスカリン性以外のもの
- ⑦モルモットが、ヒスタミン刺激に対する反応性という点ではヒトに似ているのに、一般にラットが病態モデルとして使われる理由
- ⑧ヒトの主細胞を用いた、同様な実験の可能性

これらに対して申請者は明確に解答した。

以上、この論文は、今まで明らかでなかったモルモットの胃主細胞のムスカリン性受容体のサブタイプが M_3 型である事を明らかにした仕事であり、審査員一同、博士(医学)論文に値すると判断した。

論文審査担当者 主査 教授 中 島 光 好

副査 教授 市 山 新 副査 教授 喜 納 勇

副査 助教授 青 木 克 憲 副査 助教授 太 田 英 彦