

学位論文内容の要旨

論文提出者氏名	論文審査担当者
中西 吉彦	主査 教授 勝 健 一 副査 教授 窪 田 隆 裕 副査 教授 谷 川 允 彦 副査 教授 宮 崎 瑞 夫 副査 教授 芝 山 雄 老
主論文題名 モルモット胃幽門腺粘膜におけるプロスタグランジン E ₂ の放出: COX-1 と COX-2 の役割 (Prostaglandin E ₂ release from antral mucosa of guinea pig: role of COX-1 and COX-2)	
学位論文内容の要旨	
<p>(目的)</p> <p>プロスタグランジン (PGs) はアラキドンサン (AA) を基質としてシクロオキシゲナーゼ (COX) を介して合成される。この PGs のうちプロスタグランジン E₂ (PGE₂) は胃粘膜防御因子の一つであり、胃粘膜保護の維持に重要な役割を果たしている。しかし胃粘膜内の PGE₂ 濃度については報告されているが、PGE₂ 産生の調節機構に関してはいまだ不明な点が多い。経時的に胃幽門粘膜から放出される PGE₂ を測定することにより、モルモット幽門粘膜における PGE₂ 合成の調節機構、さらに COX-1 と COX-2 の役割について検討した。</p> <p>(方法)</p> <p>ハートレイ系雄モルモット (体重約 250 g) より胃を摘出し、幽門部の粘膜を剥離した。遊離腺細胞の実験ではコラゲナーゼ処理により遊離腺に単離した。実験に用いた溶液組成 (mM) は NaCl, 121; KCl, 4.5; MgCl₂, 1.0; CaCl₂, 1.5; NaHCO₃, 25; NaHEPES, 5; HHEPES, 5; glucose 5; pH 7.4 であり、実験は 37°C で行った。また非刺激時と 10 μM アセチルコリン (ACh) による粘液分泌刺激時の PGE₂ 放出について検討した。幽門粘膜あるいは遊離腺細胞を溶液中 (20ml) に浮遊し、経時的に溶液を採取し (500μl)、PGE₂ 濃度を PGE₂ EIA kit (Cayman 514010) を用いて測定した。放出された PGE₂ は μg/g-tissue で表現し、各実験の比較は 15 分間の値を用いた。また遊離腺細胞を用いた実験では、増加した PGE₂ 量は各々の実験における control 値と比較して % で表現した。</p> <p>(結果)</p> <p>非刺激時幽門粘膜においても、PGE₂ 放出 (基礎放出) が認められた。放出された PGE₂ 量は 0.136 ± 0.006 μg/g, (n=3) であった。ACh 刺激を行うと PGE₂ 放出は 0.1 μM ~ 1 μM では濃度依存性に増加し、10 μM 以上では一定となった。その時の放出量は 0.316 ± 0.027 μg/g, (n=3) であった。このように ACh は幽門粘膜において PGE₂ 放出を増強した。ACh の効果は細胞内 Ca²⁺ 濃度 ([Ca²⁺]_i) を介したものであることが知られている。イオノマイシン (IM)、タブシガルジン (TG) を用いて [Ca²⁺]_i を上昇させると、ACh 同様に PGE₂ 放出が増強された。逆に Ca²⁺-free 溶液中では基礎放出は抑制され、ACh の効果も消失した。</p>	

COX 阻害剤であるアスピリン (ASA), インドメサシン (IDM) は基礎 PGE₂ 放出を抑制し、ACh 刺激による PGE₂ 放出の増強は認められなかった。ACA (phospholipase A₂ inhibitor) は基礎放出、ACh 刺激による増強を完全に抑制した。反対に AA を加えると、基礎放出は増加し、ACh はこの PGE₂ 放出をさらに増強した。

COX には 2 つのサブタイプ (COX-1 と COX-2) が知られており、それぞれの選択的阻害剤を用い PGE₂ 放出について検討した。SC560 (選択的 COX-1 阻害剤) は基礎 PGE₂ 放出をわずかに抑制したのみであったが、ACh による PGE₂ 放出の増強は完全に抑制した。しかし、IM 刺激による [Ca²⁺]_i 上昇では SC560 存在下でも PGE₂ 放出は約 200% に増強された (0.254 ± 0.051 μg/g, n=3)。

一方、NS398 (選択的 COX-2 阻害剤) は基礎 PGE₂ 放出を約 50% に減少させた (0.060 ± 0.010 μg/g, n=3) が、ACh 刺激による PGE₂ 放出の増強は抑制しなかった。また、IM 刺激も PGE₂ 放出を増強した。IM はレセプターを介さず直接に [Ca²⁺]_i を上昇させる。このことは、COX-1 阻害剤の存在下では ACh による [Ca²⁺]_i 上昇の効果は認められなかったことを示している。すなわち、ACh 刺激は COX-1 を含む細胞の [Ca²⁺]_i を増加させている (SC560 存在下) が、COX-2 を含む細胞の [Ca²⁺]_i は増加させていない (NS 398 存在下) ことを示している。幽門上皮細胞においては、ACh 刺激は [Ca²⁺]_i 上昇を引き起こし、COX-1 のみが存在していることがすでに報告されている。SC560 と NS398 による差は細胞の種類が異なることによる可能性が示唆された。さらに、遊離腺細胞を用いた PGE₂ 放出の測定結果は SC560 により PGE₂ の基礎放出、ACh による増強は完全に抑制されたが、NS398 はいずれに対しても抑制効果は認められなかった。

(考察)

胃幽門粘膜においては非刺激時には、COX-2 を介し PGE₂ を放出し、ACh 刺激時には幽門上皮細胞を刺激し COX-1 を介し PGE₂ 放出をさらに増強させていた。また本研究の結果は COX-1 の分布する細胞と COX-2 の分布する細胞が異なることも示唆している。すなわち、COX-1 は ACh レセプターを有する細胞に存在していることから、おそらく幽門上皮細胞に存在しており、COX-2 は遊離腺細胞の実験で COX-2 の反応が認められなかったことから ACh レセプターがない非上皮細胞すなわち間質細胞に存在していると考えられる。一般に、COX-1 は生理的条件下で胃粘液層の維持に働き、COX-2 は炎症、感染など、病的条件下で粘膜防御あるいは修復に働いていると考えられてきた。しかし、今回の結果は正常幽門粘膜においては、COX-2 は非刺激時に必要不可欠な役割を果たしていることを示していると同時に、COX-1 は ACh 刺激時 (例えば食事中など) に活性化されていることが明らかとなった。

審査結果の要旨および担当者

報告番号	乙 第 号	氏 名	中西 吉彦
論文審査担当者		主 査 教授 勝 健 一 副 査 教授 窪 田 隆 裕 副 査 教授 谷 川 允 彦 副 査 教授 宮 崎 瑞 夫 副 査 教授 芝 山 雄 老	
主論文題名 モルモット胃幽門腺粘膜におけるプロスタグランジン E ₂ の放出:COX-1 と COX-2 の役割 (Prostaglandin E ₂ release from antral mucosa of guinea pig:role of COX-1 and COX-2)			
論文審査結果の要旨			
<p>申請者はモルモット胃幽門粘膜を用い、経時的に PGE₂ を測定し、COX の役割について検討している。モルモット胃幽門腺粘膜は非刺激時に PGE₂ を産生放出していた(基礎放出)。Acetylcholine (ACh) はこの PGE₂ 放出をさらに約 3 倍に増加させた (ACh 刺激性放出)。ACh 刺激性 PGE₂ 放出は細胞内 Ca²⁺濃度 ([Ca²⁺]_i) により調節されていた。この二つの PGE₂ 放出は arachidonic acid (AA) により増加し、PLA₂ 阻害剤、COX 阻害剤 (aspirin and indomethacin) により抑制された。COX-1 阻害剤 (SC560, 100nM) は基礎 PGE₂ 放出には影響を及ぼさなかったが、ACh 刺激性 PGE₂ 放出は抑制した。反対に COX-2 阻害剤 (NS398, 20 μM) は基礎 PGE₂ 放出は抑制したが、ACh 刺激性 PGE₂ 放出は抑制しなかった。さらに collagenase 処理により得られた単離幽門上皮細胞では COX-1 阻害剤のみが PGE₂ 放出を阻害し、COX-2 阻害剤による抑制は認められなかった。</p> <p>上皮細胞には COX-1 が存在し、ACh 刺激時に PGE₂ 放出を増強しているのに対し、COX-2 は間質細胞に存在し、恒常的に PGE₂ を産生していることが示された。このことは胃幽門粘膜の COX-2 は生理的条件における PGE₂ 産生に不可欠な役割を果たしていることを示しており、COX-2 選択的阻害剤の使用が消化管に障害を引き起こす可能性があることを示している。今回の研究結果は、消化管、特に胃における PGE₂ 産生調節において重要な発見であると同時に、今後の新たな展開が期待できる新しい視点を提供している。</p> <p>以上により本論文は本学学位規程第3条第2項に定めるところの博士(医学)の学位を授与するに値するものと認める。</p> <p><主論文公表誌> 大阪医科大学雑誌 65(1):12-24, 2006</p>			