

学位論文の要旨

学位の種類	博士	氏名	堀川 良高
-------	----	----	-------

学位論文題目

Activation of Mitogen-activated Protein Kinase by Cholinergic Agonists and EGF in Human Compared to Rat Cultured Conjunctival Goblet Cells
(コリン作動性物質およびEGFによるマップキナーゼ活性化の
ヒト由来とラット由来結膜培養杯細胞での比較)

共著者名

Marie A. Shatos
Robin R. Hodges
Driss Zoukhri
Jose D. Rios
Eli L. Chang
Carlo R. Bernardino
Peter A. D. Rubin
Darlene A. Dartt

掲載医学雑誌名 未公表

研究目的

涙液は角膜の表面に層状に存在し、表面から油層、水層、ムチン層の3層から構成されている。ムチン層はさらに表層からゲル形成分泌型ムチン、細胞膜貫通型ムチンから構成されている。結膜上皮の結膜杯細胞は涙液のムチン層を構成しているゲル形成分泌型ムチンを合成、貯蔵、分泌する。このゲル形成分泌型ムチンは、角結膜上皮面を親水性に保ち涙液層を安定化させることが知られている。ラット結膜杯細胞における主要なムチン分泌刺激は副交感神経から分泌されるコリン作動性物質であるアセチルコリンであることが明らかとなっている¹⁾。ラット結膜組織を用いた実験において、コリン作動性物質であるアセチルコリンはムスカリン受容体を刺激することが明らかとなった¹⁾。さらに、ムスカリン受容体はmitogen-activated protein kinase (MAPK) を活性化することが我々の研究から明らかになった¹⁾。そのメカニズムとして、上皮成長因子(EGF)受容体を介してMAPKを活性化する

経路が重要であること、MAPKの活性化がラット結膜杯細胞のムチン分泌を刺激することを明らかにした¹⁾。

今日まで、結膜杯細胞におけるシグナル伝達の検討には、実験動物の結膜組織を用いて行われていた。しかしながら、結膜組織は結膜杯細胞の他、重層扁平上皮や線維芽細胞などを多く含むため、結膜杯細胞そのものを用いた研究は今日までなく、さらにヒト結膜杯細胞を用いた実験はさらに困難であったため、実験動物を用いた実験モデルでのムチン分泌のメカニズムが検討されてきた。本研究では最近、作成に成功したヒト由来結膜培養杯細胞²⁾ならびにラット由来結膜培養杯細胞³⁾を用いて、結膜杯細胞におけるシグナル伝達を検討した。まずアセチルコリンおよびEGF刺激によるMAPKの活性化をヒトとラットの結膜杯細胞で比較し、ムスカリン受容体阻害剤およびEGF受容体阻害剤による影響を比較検討することにより、ヒト結膜杯細胞におけるシグナル伝達を検討した。

対 象 と 方 法

対 象

1) ヒト結膜培養杯細胞

ヒトの正常結膜として、マサチューセッツ眼科耳鼻科病院で眼瞼下垂などの手術時に採取した結膜を患者（37-88歳）の同意のもとに用いた。

2) ラット結膜培養杯細胞

ラットの結膜として、雄Sprague-Dawleyラット(250g-300g)の円蓋部結膜を用いた。

以上1)および2)の組織を1-mm³の大きさに刻み、RPMI-1640培養液を用いて結膜培養杯細胞を作製した。

方 法

結膜培養杯細胞の刺激にはコリン作動性物質のカルバコールおよびEGFを用いた。刺激後ただちに、結膜培養杯細胞はRIPAバッファー中で超音波破碎し、遠心上清を取り出しサンプルバッファーを加え検体を作成した。各検体はSDS-PAGEにより電気泳動を行った後、ニトロセルロース膜に蛋白質を転写し、間接法による抗体インキュベート後に化学発光により目的とする蛋白質を可視化し、NIHイメージソフトウェアを用いて解析した（ウェスタンブロット）。なお、蛋白質の活性化は、各検体の蛋白質総量をもとに標準化して対コントロール比をパーセントで表示した。

1)カルバコール刺激によるMAPK活性化（濃度および時間による変化）

カルバコール： 10^{-5} , 10^{-4} , 10^{-3} Mの各濃度で10分間刺激後のMAPK活性化を測定した。

10^{-4} Mカルバコールで5, 10, 30分間刺激後のMAPK活性化を測定した。

2)EGF刺激によるMAPK活性化（濃度および時間による変化）

EGF： 10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} Mの各濃度で5分間（ヒト）あるいは10分間（ラット）刺激後のMAPK活性化を測定した。 10^{-8} M EGFで5, 10, 30分間刺激後のMAPK活性化を測定した。

3)ムスカリンM1/ M3受容体阻害剤による影響

ムスカリンM1/ M3受容体阻害剤、4DAMP(10^{-5} M)で10分間、結膜培養杯細胞をインキュベート後に、 10^{-4} Mカルバコールで10分間刺激後のMAPK活性化を測定した。

4)EGF受容体阻害剤による影響

EGF受容体（内因性チロシンキナーゼ）阻害剤、AG 1478(10^{-7} M)で10分間、結膜培養杯細胞をインキュベート後に、 10^{-8} MEGFで5分間あるいは 10^{-4} Mカルバコールで10分間刺激後のMAPK活性化を測定した。

測定結果は平均値±標準誤差で表し、least squares regression またはStudent's t-testを用いて統計処理し、危険率5%未満を有意とした。

成 績

1. カルバコール刺激によるMAPK活性化（濃度および時間による変化）

MAPKはヒト由来ならびにラット由来結膜培養杯細胞の両者において 10^{-4} Mのカルバコールで最も強く活性化され、コントロールに比べヒトでは $160 \pm 10\%$ 、ラットでは $164 \pm 11\%$ で有意な活性化を示した ($p < 0.05$)。

MAPKはヒト由来ならびにラット由来結膜培養杯細胞の両者において 10^{-4} Mカルバコールで10分間刺激で最も強く活性化され、コントロールに比べヒトでは $165 \pm 5\%$ 、ラットでは $157 \pm 9\%$ で有意な活性化を示した ($p < 0.05$)。

2. EGF刺激によるMAPK活性化（濃度および時間による変化）

MAPKはヒト由来ならびにラット由来結膜培養杯細胞の両者において 10^{-8} MのEGFで最も強く活性化され、コントロールに比べヒトでは5分間刺激で $226 \pm 19\%$ 、ラットでは10分間刺激で $178 \pm 17\%$ で有意な活性化を示した ($p < 0.05$)。

MAPKはヒト由来ならびにラット由来結膜培養杯細胞の両者において 10^{-8} M EGFで5分間刺激で最も強く活性化され、コントロールに比べヒトでは $239 \pm 24\%$ 、ラットでは $177 \pm 17\%$ で有意な活性化を示した ($p < 0.05$)。EGF刺激によるMAPK活性はカルバコール刺激によるMAPK活性に比べ長時間続いた。

3.ムスカリンM1/ M3受容体阻害剤による影響

4DAMPはカルバコールによるMAPK活性化をヒト由来ならびにラット由来結膜培養杯細胞の両者において、それぞれ顕著に抑制した ($p<0.05$)。

4.EGF受容体阻害剤による影響

AG 1478はEGFによるMAPK活性化をヒト由来ならびにラット由来結膜培養杯細胞の両者において、それぞれ顕著に抑制した ($p<0.05$)。AG 1478はカルバコールによるMAPK活性化をヒト由来ならびにラット由来結膜培養杯細胞の両者において、それぞれ顕著に抑制した ($p<0.05$)。

考 按

これまで、結膜杯細胞の細胞内シグナル伝達の研究は、ラットやマウス結膜組織などの実験動物モデルを用いたものが多く報告されてきた。さらに、結膜組織は結膜杯細胞の他、重層扁平上皮や線維芽細胞などを多く含む組織のため、結膜杯細胞そのものを用いた研究は困難であった。そこで本研究では、最近作製に成功したヒト由来結膜培養杯細胞ならびにラット由来結膜培養杯細胞を用いることにより、これまでラット結膜組織においてムチン分泌を刺激すると報告されていたMAPKの活性化の測定を試みた。

MAPKは、一般的に、さまざまな外界刺激を伝達する重要なシグナル分子の1つであり、種々の細胞において、細胞増殖、細胞分化、分泌を刺激することが知られている。MAPKはヒト由来ならびにラット由来結膜培養杯細胞の両者においてカルバコール刺激によりムスカリン受容体を介して、またEGF刺激によりEGF受容体を介して活性を示した。EGF刺激によるMAPK活性はカルバコール刺激によるMAPK活性に比べ長時間続いた。最近の我々の研究では、EGF刺激によりヒト由来²⁾ならびにラット由来結膜培養杯細胞が増殖を示したが、カルバコール刺激では細胞増殖を示さなかった。このことから、長時間のMAPK活性化は結膜杯細胞の増殖を刺激することが示唆された。これまで、カルバコールならびにEGFによりムチン分泌が刺激されることが明かとなっている。このことから、短時間のMAPK活性化で結膜杯細胞からのムチン分泌が刺激されることが示唆された。今日まで、種々の細胞において、MAPKの長時間活性時の反応と短時間活性時の反応に関する研究報告が多数あるが、今回の我々の研究からヒトおよびラット結膜杯細胞におけるMAPKの長時間活性時の反応は細胞増殖であり、短時間活性時の反応はムチン分泌であることがはじめて推測された。なお、この結果は他の細胞における報告と合致するものであった。

AG 1478は、カルバコールによるMAPK活性化をヒト由来ならびにラット由来結膜培養杯細胞の両者において、それぞれ顕著に抑制したことから、カルバコールによるムスカリン受容体刺激はEGF受容体をトランスアクティベートすることが示唆された。以上の成績より、ヒトとラットの結膜杯細胞におけるシグナル伝達が同じであることが示唆された。

結 論

ヒト結膜杯細胞におけるシグナル伝達を検討するため、

ヒト由来結膜培養杯細胞とラット由来結膜培養杯細胞を比較し、以下の結果を得た。

1. カルバコールはムスカリン受容体を介して、またEGFはEGF受容体を介してそれぞれ同様なMAPK活性化を示した。EGF刺激によるMAPK活性はカルバコール刺激によるMAPK活性に比べ長時間続いた。
2. カルバコールによるムスカリン受容体刺激はEGF受容体をトランスアクティベートしMAPKを活性化することが示唆された。
3. 以上の結果より、ヒト結膜杯細胞においてラット結膜杯細胞と同様のシグナル伝達を認めた。このことから今後、ヒト結膜杯細胞におけるシグナル伝達解明のため、ラット由来結膜培養杯細胞を用いた実験モデルの有用性が明らかとなった。



引用文献

1. Kanno H, Horikawa Y, Hodges RR, Zoukhri D, Shatos MA, Rios JD, Dartt DA: Cholinergic agonists transactivate the EGFR and stimulate MAPK to induce goblet cell secretion. American Journal of Physiology in press
2. Shatos MA, Kanno H, Rubin PAD, Garza G, Dartt DA, eds :Isolation and characterization of human goblet cells in vitro: Regulation of proliferation and activation of mitogen-activated protein kinase by EGF and carbachol. Adv Exp Med Biol, ed. D.A.Sullivan. Vol. in press. 2002, Kluwer Academic/Plenum Press: Boston
3. Shatos MA, Rios JD, Tepavcevic V, Kano H, Hodges RR, Dartt DA :Isolation, characterization, and propagation of rat conjunctival goblet cells in vitro. Investigative Ophthalmology & Visual Science 42:1455-1464. 2001

参考論文

1. Ishiko S, Akiba J, Horikawa Y, Yoshida A: Detection of drusen in the fellow eye of Japanese patients with age-related macular degeneration using scanning laser ophthalmoscopy. Ophthalmology 109: 2165-2169. 2002
2. Hikichi T, Mori F, Sasaki M, Takamiya A, Nakamura M, Shishido N, Takeda M, Horikawa Y, Matsuoka H, Yoshida A: Inhibitory effect of bucillamine on laser-induced choroidal neovascularization in rats. Curr Eye Res 24:1-5. 2002
3. Hikichi T, Mori F, Takamiya A, Sasaki M, Horikawa Y, Takeda M, Yoshida A: Inhibitory effect of losartan on laser-induced choroidal neovascularization in rats. Am J Ophthalmol 132:587-589. 2001
4. 堀川良高 引地泰一 森文彦 五十嵐翔 花田一臣 吉田晃敏: Erbium:YAGレーザー硝子体手術装置を用いた摘出豚眼硝子体切除. あたらしい眼科 17:1291-1294. 2000
5. 堀川良高 引地泰一 柳谷典彦 門正則 広川博之 吉田晃敏: 糖尿病網膜症手術後に術眼視力が非術眼よりも良好となる割合—過去と現在の比較—. 日本眼科紀要 49:1006-1009. 1998

学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第 号		
学位の種類	博士 (医学)	氏 名	堀川 良高
審査委員長 吉田 晃敏 印			
審査委員 高井 章 			
審査委員 谷口 隆信 			
<h3 style="margin: 0;">学位論文題目</h3> <p style="margin: 0;">Activation of Mitogen-activated Protein Kinase by Cholinergic Agonists and EGF in Human Compared to Rat Cultured Conjunctival Goblet Cells (コリン作動性物質およびEGFによるマップキナーゼ活性化の ヒト由来とラット由来結膜培養杯細胞での比較)</p>			
<p>眼瞼および眼球結膜の杯細胞から分泌されるムチンは眼球の角結膜上皮において、物理的バリアの一部として機能し、眼球の感染防御および光学的安定性に寄与し良好な視力の保持に必要な不可欠な存在である。結膜杯細胞からのムチンの分泌は副交感神経を介した神経刺激によって亢進することが知られている。著者らは既にラット結膜においてカルバコールによりムスカリン受容体が活性化されることにより、MAPKがリン酸化され、このMAPKの活性化がムチンの分泌を亢進する事を報告している。</p> <p>著者が所属した研究室において世界に先駆けてラットおよびヒト結膜から杯細胞を単離し初代培養細胞を得る手法が確立されており、著者らはこの培養結膜杯細胞を用いて、MAPKのリン酸化の変化を指標にムスカリン受容体を介したムチンの分泌反応における結膜杯細胞の情報伝達系の検討を行った。更に著者はMAPKの活性化をラットとヒトで比較することにより、ラットでの実験結果をヒトに外挿できる可能性についても検討した。</p> <p>本研究で著者は、カルバコールおよびEGFの至適刺激濃度と刺激時間、さらにムスカリン受容体阻害剤である4DAMPおよびEGF受容体阻害剤であるAG1478のMAPKリン酸化への影響を比較検討した。</p> <p>本研究により次ぎのような結果を得た。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) ヒトおよびラット由来結膜培養杯細胞においてカルバコール刺激によるMAPK活性化の至適濃度、至適時間は一致していた。 2) ヒトおよびラット由来結膜培養杯細胞においてEGF刺激によるMAPK活性化の至適濃度、至適時間は一致していた。 3) ヒトおよびラット由来結膜培養杯細胞においてカルバコールによるMAPK活性化は4DAMPにより抑制された。 4) ヒトおよびラット由来結膜培養杯細胞においてカルバコールおよびEGFによるMAPK活性化はAG1478により抑制された。 			

以上の結果から、ヒト結膜杯細胞においてラット結膜杯細胞と同様のシグナル伝達経路が存在することが示唆された。更にムスカリン受容体からMAPKの活性化にいたる経路においてEGF受容体の関与が示唆された。

これらの新しい知見は、今後、ヒト結膜杯細胞におけるシグナル伝達経路を解明する上で、ラット結膜培養杯細胞を用いた実験モデルが有用であることを示唆するものである。

以上この論文で述べられている実験結果並びに考察は、結膜杯細胞におけるムチン分泌の副交感神経性調節に対し一定の理解をあたえるものである。

なお、各審査委員による本論文の内容および関連領域について諮問した結果、適切な応答が得られた。以上の理由により、審査委員会は本論文が博士（医学）の学位に値するものと判断した。