

## 学位論文の要旨

学位の種類	博士	氏名	Md. Tariqul Islam
<p>学位論文題目</p> <p>Muscarinic cholinceptor-mediated activation of JNK negatively regulates intestinal secretion in mice (ムスカリン性アセチルコリン受容体によるJNKの活性化はマウス腸管における分泌を負に制御する)</p> <p>共著者名</p> <p>Md. Rafiqul Islam Khan、矢澤 隆志、林 久由、鈴木 裕一、宇和田 淳介、Abu Syed Md Anisuzzaman、谷口 隆信と共著</p> <p>掲載雑誌</p> <p>Journal of Pharmacological Sciences 127巻(2015年) 150-153頁</p> <p>研究目的</p> <p>腸管上皮は消化吸収において中心的な役割を担うと同時に、強固な物理的バリアを形成することで、腸内の細菌や抗原が腸壁内に侵入してくることを防いでいる。これらの腸管機能の調節においてアセチルコリンは最も重要な分子の一つであり、腸上皮に存在するムスカリン性アセチルコリン受容体 (mAChR) を介していると考えられている<sup>(1)</sup>。</p> <p>炎症性腸疾患 (IBD) は、潰瘍性大腸炎とクローン病の二つを代表的な疾患とする原因不明の難治性疾患であり、腸における炎症調節制御不全が発病に関与する要因の一つとして考えられている。腸における炎症調節には、免疫系によるものの他に、腸の上皮細胞によって形成されるバリアが重要な役割を果たしている。即ち、腸上皮細胞は整然と配列して相互に接着することにより、強固な物理的バリアを形成するのであるが、このバリア機能の低下や破綻はIBDの発症に繋がる原因の一つと考えられている。</p> <p>腸上皮のもう一つの重要な機能は、上皮を介する分泌・吸収によって体液の量や電解質組成のバランスを保ち、ホメオスタシスを維持するというものである。腸上皮を介する分泌は主として、いずれも能動的な、陽イオンの吸収と陰イオンの排出によって担われていると考えられており、陰イオンの中ではCl<sup>-</sup>イオンが中心的な存在とされている。我々はこれまで、腸上皮にmAChRが存在しバリアの維持・補強に働いていることを示す中で、mAChRの下流でMAPキナーゼが機能していることを報告している<sup>(2)</sup>。MAPキナーゼは腸上皮における分泌現象において、負の制御に関わっているとされている<sup>(3, 4)</sup>。MAPキナーゼの主要なメンバーとして、ERK、JNK、p38の3者が知られているが、いずれがどの機能に関わっているのか、未解明の部分が残されている。</p> <p>本研究では、腸上皮でのmAChRを介する分泌現象の解析を通じて、mAChR下流のMAPキナーゼの役割について、MAPキナーゼタンパク質のリン酸化状態をその活性化の指標とし、Cl<sup>-</sup>イオンの排出を分泌現象の指標として、分泌現象におけるMAPキナーゼの関与について検討を行った。</p>			

## 材 料 ・ 方 法

### 1 材料

実験には雄のBALB/cマウス（9-10週令）を用いた。

### 2 実験方法

#### (1) 腸粘膜上皮の採取

マウスから摘出した結腸の粘膜面をカミソリの刃を立てた状態で擦過し、腸上皮細胞の集合体である粘膜断片として採取した。

#### (2) ウェスタンブロットによるタンパク質リン酸化解析

粘膜断片として採取した腸上皮細胞をアセチルコリンで刺激し、Laemli法に従ってタンパク質をSDS電気泳動で分離した。分離したタンパク質をpolyvinylidene fluoride膜に転写し、目的のタンパク質に特異的な抗体を用いてリン酸化状態を観察・評価した。

#### (3) 分泌機能

マウス結腸の粘膜片をUssing chamberに装着し、常法に従い粘膜を介する電流を電気生理学的に解析した。

#### (4) MAPキナーゼ阻害剤

それぞれのMAPキナーゼに対する阻害剤として、ERKに対するU0126、JNKに対するSP600125、p38に対するSB203580を用いた。

### 3 統計学的処理

ウェスタンブロットの定量的解析には、発色させた膜をデンシトメーターで読み取り、Prism (GraphPad software)を用いて検討した。2群間の比較には、Student's t検定を行い、危険率5%未満を有意とした。

## 成 績

### 1 腸上皮細胞におけるムスカリン刺激によるMAP kinaseのリン酸化亢進

マウスの腸上皮細胞をアセチルコリン（100  $\mu$ M、25度、3分間）で刺激すると、3つのMAPキナーゼ、Erk、JNK、p38の全てにおいてリン酸化が亢進し、このリン酸化はムスカリンアンタゴニストであるアトロピン（10  $\mu$ M）の存在下で消失した。これらの結果から、3つのMAPキナーゼは全てmAChRによって活性化されていると考えられた。

### 2 阻害剤のそれぞれのMAPキナーゼに対する特異性の検討

1で行った実験にMAPキナーゼ阻害剤を濃度 1-30  $\mu$ Mの範囲で追加して、その特異性を検討した。いずれの阻害剤も用いた濃度の範囲において標的とするMAPキナーゼのリン酸化を特異的に抑制していた。これらの結果から、3つのMAPキナーゼ阻害剤はこの実験系において、いずれも標的のキナーゼのみを特異的に抑制していると考えられた。

### 3 腸上皮分泌におけるMAPキナーゼの機能

Ussing chamberにおいて、アセチルコリン（100  $\mu$ M、37度）刺激によるマウス腸粘膜を介したCl<sup>-</sup>電流の増加が観察され、この電流はアトロピン（10  $\mu$ M）の存在下では消失し、mAChRを介するCl<sup>-</sup>分泌であると考えられた。ここにMAPキナーゼ阻害剤を濃度 1-30  $\mu$ Mの範囲で追加したところ、SP600125は10  $\mu$ Mの濃度から有意な分泌増強作用を示したが、U0126とSB203580は 30  $\mu$ Mの濃度においても変化を与えなかった。これらの結果から、ムスカリン刺激によって生じるCl<sup>-</sup>分泌は、JNKによって負に制御されており、Erkとp38はこの制御には関わっていないと考えられた。

## 考 案

腸上皮細胞において、mAChRを介する分泌反応が確認され、同時にmAChRはMAPキナーゼ経路における、ERK、JNK、p38の3者全てを活性化させていた。この3者のうち、JNKのみが腸上皮の分泌機能の負の制御に関わっていた。Keelyらは腸上皮分泌機能がMAP kinase経路によって負に制御されていることを報告しており<sup>(4)</sup>、我々の実験結果と矛盾しないが、その主たるものはJNKであることが、本研究結果から明らかになった。

我々はこれまで、mAChRからMAPキナーゼ、focal adhesion kinaseに連なる経路が、腸上皮バリア機能において重要な役割を担っていることを報告している<sup>(2)</sup>。本研究においては、更に、mAChRの下流で活性化されるMAPキナーゼの主要な3つのメンバーのなかで、JNKのみが腸上皮を介する分泌反応の負の制御に関わっていることが示された。腸管機能調節における最も基本的な分子の一つであるアセチルコリンが、腸上皮の分泌機能においても重要な役割を担う中で、mAChRの下流にあるMAPキナーゼの役割分担の一部が明らかになった。




## 結 論

- 1、腸上皮においてmAChRを介してMAPキナーゼの主要なメンバー3者が活性化された。
- 2、腸上皮におけるCl<sup>-</sup>分泌はMAPキナーゼによって負に制御されていたが、この制御に関わるのはJNKのみであり、Erkとp38は関わっていなかった。

## 引 用 文 献

1. C.L. Hirota, D.M. McKay, Cholinergic regulation of epithelial ion transport in the mammalian intestine. *Br. J. Pharmacol.* 149 (2006) 463-479.
2. M.R. Khan, T. Yazawa, A.S.M. Anisuzzaman, S. Semba, Y. Ma, J. Uwada, H. Hayashi, Y. Suzuki, H. Ikeuchi, A. Maemoto, I. Muramatsu, T. Taniguchi, Activation of focal adhesion kinase via M1 muscarinic acetylcholine receptor is required in restitution of intestinal barrier function after epithelial injury. *Biochim. Biophys. Acta. (Mol Basis Dis)* 1842 (2014) 635-645
3. C.L. Hirota, D.M. McKay, Loss of Ca-mediated ion transport during colitis correlates with reduced ion transport responses to a Ca-activated K channel opener. *Br. J. Pharmacol.* 156 (2009) 1085-1097.
4. S.J. Keely, J.M. Uribe, K.E. Barrett, Carbachol Stimulates Transactivation of Epidermal Growth Factor Receptor and Mitogen-activated Protein Kinase in T84 Cells: IMPLICATIONS FOR CARBACHOL-STIMULATED CHLORIDE SECRETION. *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 27111-27117.

## 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	<i>Md. Tarigul Islam</i>
		審査委員長	<i>伊藤 文隆</i> 
		審査委員	<i>奥村 利隆</i> 
		審査委員	<i>若宮 伸隆</i> 
学位論文題目			
<b>Muscarinic cholinceptor-mediated activation of JNK negatively regulates intestinal secretion in mice</b>			
(ムスカリン性アセチルコリン受容体による JNK の活性化はマウス腸管における分泌を負に制御する)			
掲載雑誌： <span style="margin-left: 100px;">Journal of Pharmacological Sciences 127: 150-153, 2015.</span>			
(審査評価・結果のみとし、800字以内で提出すること。)			
<p>従来、ムスカリン刺激で活性化される MAPキナーゼの腸上皮における役割が知られている。腸上皮に対しニコチン受容体阻害条件下でアセチルコリン刺激を行うと、ムスカリン受容体を介した3種類の MAPキナーゼ (ERK、JNK、p38) の活性化が観察される。この時、腸上皮からの Cl<sup>-</sup>分泌が生じるが、これらの MAPキナーゼはこの分泌反応を抑制して分泌現象を最適化していることが報告されている。しかし、これら3種類の MAPキナーゼが、単独あるいは協調してこの抑制作用に係わっているかどうか不明である。</p> <p>申請者らは、マウス大腸上皮を用い、ムスカリン受容体刺激を介する3種類の MAPキナーゼの活性化を、ウエスタンブロッティング法で確認した。また、各々の MAPキナーゼに特異的な阻害剤による活性化の抑制を検討し、各阻害剤が特異性を持って各々のキナーゼの活性化を抑制することを確認した。ついで、大腸粘膜組織を Ussing Chamber に装着して分泌反応の検討を行った。その結果、JNK 特異的阻害剤 SP600125 が、ムスカリン刺激による分泌反応を濃度依存的に増強することを明らかにした。一方、ERK および p38 の特異的阻害剤には、このような増強作用は認められなかった。これらの結果、MAPキナーゼの中で JNK のみが、ムスカリン刺激時の分泌反応を抑制することが示された。</p> <p>本研究は、炎症性腸疾患や感染性腸炎などの病態形成を理解する上で重要な知見を提示するものであり、これらの疾患に伴う体液調節や粘膜防御機構の破綻の予防あるいは治療に道を拓くものである。本論文の論旨は明確である。申請者は、各委員の質問に対し具体的かつ明快な説明をし、当該分野における十分な知識を有していた。以上の結果を総合し、本委員会は本論文を博士論文として相応しいものと判定する。</p>			