

氏 名	木 村 利 幸
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	論 医 博 第 1670 号
学位授与の日付	平 成 10 年 11 月 24 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
学 位 論 文 題 目	High Concentrations of Cholecystokinin Octapeptide Suppress Protein Kinase Activity in Guinea Pig Pancreatic Acini (モルモット膵腺房細胞における高濃度の CCK-8 によるプロテインキナーゼ C 活性の抑制に関する研究) (主査) 論 文 調 査 委 員 教 授 千 葉 勉 教 授 今 村 正 之 教 授 小 西 淳 二

論 文 内 容 の 要 旨

(目的) 膵腺房細胞において, cholecystokinin (CCK), carbachol, bombesinは, 細胞内カルシウムとダイアシルグリセロールを増加させることが証明されており, これらによりProtein kinase C (PKC) が活性化されるとされている。しかしこれらのホルモンによる PKCの活性化をintactの膵腺房細胞において直接測定した報告はない。本研究では, トリチウム標識したホルボールエステル (3 H-PDBu) を用いて各種ホルモンによるPKCの活性化を初めて直接測定した。そしてそれらホルモンの膵外分泌刺激能と, PKCの活性化能を比較検討した。

(方法) 動物はモルモットを用い, 遊離膵腺房細胞はコラゲナーゼ処理にて得た。10nMの 3 H-PDBuの遊離膵腺房細胞への結合を各種ホルモンの存在下・非存在下で測定した。反応は25℃でおこなった。反応の停止はフィルター濾過でおこない, フィルター上の遊離膵腺房細胞の放射能を液体シンチレーションカウンターで測定した。

(結果) 標識PDBuの膵腺房細胞への結合は25℃において, 5分で頂値に達し30分後まで一定であった。この標識PDBuの結合は, 10 μ Mの非標識PDBuの添加によって30%まで抑制された。膵腺房細胞へのPDBuの結合部位は1種類であった ($K_d=70$ nM)。細胞内カルシウムを増加させるCCK-8, carbacholは膵腺房細胞へのPDBuの結合を増加させたが, その増加はそれぞれのantagonistの添加によって抑制された。一方細胞内cAMPを増加させるVIPや低濃度のsecretinでは膵腺房細胞へのPDBuの結合は変化しなかった。すなわち細胞内カルシウムを増加させるホルモンは, 膵腺房細胞へのPDBuの結合を特異的に増加させ, それは結合親和力の増大によるものであった。細胞内カルシウムを増加させるホルモンによる標識PDBuの膵腺房細胞への結合の増加は, それらホルモンによる膵腺房細胞からのアミラーゼ分泌と密接な相関が認められた。すなわち25℃において, CCK-8の濃度の増加とともに膵腺房細胞からのアミラーゼ分泌は増加し, 1 nMの濃度でアミラーゼ分泌は最高となり1 nM以上の濃度でアミラーゼ分泌は低下した。このアミラーゼ分泌の二相性と同様に, PDBuの膵腺房細胞への結合もCCK-8の濃度の増加とともに増加し, 1 nMの濃度で最高となり1 nM以上の濃度で低下した。一方carbachol, bombesinではそれら濃度の増加とともにモルモット膵腺房細胞からのアミラーゼ分泌は増加し, PDBuの結合も増加したが, 高濃度域でのアミラーゼ分泌, PDBuの結合の抑制はみられなかった。

高濃度CCK-8による膵腺房細胞からのアミラーゼ分泌の抑制と標識PDBuの膵腺房細胞への結合の抑制は, 高濃度のCCK-8が膵腺房細胞においてPKCの活性化を抑制する可能性を示唆したので, つぎにその抑制に関わる細胞内メカニズムについて検討した。アミラーゼ分泌において高濃度域のCCK-8によって活性化される細胞内メカニズムには, 細胞内のcAMPとcGMPとカルシウムイオンの増加およびカルモジュリンの活性化が知られている。8 Br-cAMPによる細胞内cAMPの増加, 8 Br-cGMPによる細胞内cGMPの増加及びA23187による細胞内カルシウムイオンの増加は, とともにCCK-8によるPKC活性化を抑制しなかった。またカルモジュリンインヒビターであるW-7によるカルモジュリンの抑制は, 高濃度CCK-8によるPKC活性化の抑制に影響を与えなかった。

(結論) 1) 細胞内カルシウムを増加させるホルモンは、膵腺房細胞において、PKCのPDBuに対する結合親和力を特異的に増加させ、その増加と各々のホルモンによるアミラーゼ分泌刺激能とはよく相関した。2) 高濃度のCCK-8によるPKC活性化の抑制とそのアミラーゼ分泌能の抑制とは深い関連があったが、その機構には細胞内cAMPやcGMPやカルシウムイオンの増加及びカルモジュリンの活性化は関与せずその他の未知の機序の関与が示唆された。

論文審査の結果の要旨

cholecystokinin (CCK), carbachol, bombesinによるprotein kinase C (PKC) の活性化をintactの膵腺房細胞において直接測定し、膵外分泌刺激能との関連を検討した。 $[^3\text{H}]$ phorbol-12, 13-dibutyrate (PDBu) のモルモット遊離膵腺房細胞への結合を測定することにより、PKCの活性化を測定した。

モルモット膵腺房細胞へのPDBuの結合部位は1種類であった ($K_d=70\text{nM}$)。細胞内カルシウムを増加させるホルモンは、膵腺房細胞において、PKCのPDBuに対する結合親和力を特異的に増加させ、その増加と各々のホルモンによるアミラーゼ分泌刺激能とはよく相関した。

高濃度CCK-8では膵腺房細胞からのアミラーゼ分泌は抑制され、PDBuの膵腺房細胞への結合も抑制された。これは高濃度のCCK-8が膵腺房細胞においてPKCの活性化を抑制する可能性を示唆した。その機構には細胞内cAMPやcGMPやカルシウムイオンの増加及びカルモジュリンの活性化は関与しなかった。

以上の研究は、膵腺房細胞におけるCCKの作用機序の解明に貢献し、消化器外分泌機構の解明に寄与するところが多い。従って、本論文は博士(医学)の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成10年11月4日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。