

Title	Identification and Characterization of Receptors Specific for Human Pancreatic Secretory Trypsin Inhibitor
Author(s)	新居延, 高宏
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	http://hdl.handle.net/11094/37504
DOI	
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/repo/ouka/all/>

氏名・(本籍)	に 新	い 居	のぶ 延	たか 高	ひろ 宏
学位の種類	医	学	博	士	
学位記番号	第	9	4	9	3号
学位授与の日付	平	成	3	年	2月4日
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当				
学位論文題目	Identification and Characterization of Receptors Specific for Human Pancreatic Secretory Trypsin Inhibitor (膵分泌性トリプシン・インヒビター (PSTI) 受容体の構造および機能の解析)				
論文審査委員	(主査) 教授	森	武貞	(副査) 教授	垂井清一郎 教授 和田 博

論文内容の要旨

【目的】

膵分泌性トリプシン・インヒビター (PSTI) は、1948年 Kazal らによってウシの膵臓から分離されたトリプシンの阻害物質である。従来、PSTIの生理的役割は膵臓内で万一トリプシノーゲンが活性化された場合、それと結合してトリプシンの活性を阻害し膵臓の自己消化を防ぐことにあるとされてきた。しかし教室ではPSTIが膵臓以外の臓器にも存在すること、悪性腫瘍組織中に高率に発現していること、PSTI cDNAの塩基配列はEGF cDNAと高い相同性を有すること、さらにPSTIはヒト線維芽細胞のDNA合成を促進することを明らかにし、PSTIには従来知られていない重要な生理活性がある可能性を指摘してきた。しかしPSTIの生理活性の情報伝達に関しては、受容体の存在を含めて何ら報告はない。PSTIの受容体の性状はどのようなもので、どの細胞株に分布しているのかなどを明らかにするために、本研究を行った。

【方法】

- ① 細胞：PSTIの結合測定は3T3 Swiss albino細胞を用いた。
- ② 放射線標識PSTIの調整：ラクトベルオキシダーゼ法を用いてヒト recombinant PSTI を¹²⁵Iで標識し、Sephadex G-25にて溶出した。¹²⁵I-PSTIの比活性は100 μCi/μgであった。
- ③ ¹²⁵I-PSTIの細胞に対する結合の測定：細胞を24-well dishに静止状態になるまで培養したものを用いた。1 × 10⁵個の細胞に¹²⁵I-PSTI (2.0 × 10⁻⁹ M) を加え、200倍過剰量非標識PSTI存在下、あるいは非存在下で全量1mlとし4℃、120分間反応させた。未反応の上清を除去し、Tris-bufferにて2回洗浄した後、0.5N NaOHで細胞を可溶化しその放射活性を測定した。

- ④ PSTI受容体の分子量解析：架橋試薬であるDSSを用いて ^{125}I -PSTIと細胞表面のPSTI受容体を共有結合させ、SDS-PAGEで分離後、オートラジオグラフィーによりPSTI受容体の分子量を解析した。
- ⑤ ^{125}I -PSTIの細胞への陥入と崩壊： ^{125}I -PSTIと細胞を4℃、120分間反応後、未反応のPSTIを除去し37℃保温の培養液に変え、一定時間ごとに上清を集め、TCA不溶性の放射活性を測定した。細胞は0.05M glycine-HCl bufferで処理して、表面に結合している ^{125}I -PSTIと陥入した ^{125}I -PSTIを各々測定した。
- ⑥ PSTIのDNA合成促進作用：細胞を24-well dishに播き、静止状態になるまで培養をした。そして各濃度のPSTIを加えた後、24時間刺激し [^3H]チミジンの取り込みを液体シンチレーションで測定した。

【成績】

- ① 9種類の細胞株に対し、PSTIの結合測定をしたところ、3T3 Swiss albino(マウス線維芽細胞)、H4-II-E-C3(ラット肝癌細胞)において ^{125}I -PSTIの高い結合を認めた。
- ② PSTIの3T3細胞に対する結合は4℃、120分で平衡状態に達した。 ^{125}I -PSTIを非標識PSTIと共に細胞と反応させると、非標識PSTIは、用量依存的に ^{125}I -PSTIの結合を阻害した。他の成長因子であるEGF、b-FGF、IGF-I、TGF α 、PDGF、TNFを添加しても ^{125}I -PSTIの結合は阻害されなかった。
- ③ Scatchard解析をしたところ、解離定数(kd)は 5.3×10^{-10} Mで、一細胞当たり5,400のPSTIの結合部位が3T3細胞に存在することがわかった。
- ④ Cross-linking法にて、140kdのbandが検出された。このbandは大過剰の非標識PSTIの添加により濃度依存的に消失した。またEGF、b-FGF、IGF-Iを添加してもbandの消失は認めなかった。
- ⑤ 細胞に結合したPSTIは37℃、30分ですみやかに細胞内に取り込まれ、時間経過と共に取り込まれた ^{125}I -PSTIは崩壊し細胞外へ排除された。
- ⑥ 各種プロテアーゼ・インヒビターで37℃、10分間前処理した細胞に対し、 ^{125}I -PSTIの結合をみたところ、その結合には影響を認めなかった。
- ⑦ PSTIは濃度依存的に3T3細胞のDNA合成促進をさせた。その作用は24時間で最高に達しEGFと相乗作用を有していた。

【総括】

^{125}I -PSTIを用いてPSTIに特異的な受容体の存在を示した。その受容体は種々の細胞株で発現しており3T3細胞では解離定数は 5.3×10^{-10} Mで、一細胞あたり5,400個存在した。Cross-linking法より、分子量は約134 kdであった。PSTIのDNA合成のシグナルはこの受容体を介して伝達されることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

PSTIは従来よりトリプシンの阻害活性物質として知られてきたが、最近それ以外に、生体に侵襲が加わるとPSTIが急性相反応物質として血中で増えること、ヒト線維芽細胞のDNA合成促進作用をもつことなど重要な生理活性があることがわかってきた。しかし、PSTIの細胞に対する情報伝達は、受容体の存在を含めて明らかにされていない。

本論文は、PSTIのラジオレセプターアッセイを確立し、細胞表面においてPSTIに特異的な受容体が存在すること、受容体の分子量は134 kdで既知の成長因子の受容体とは異なること、ヒト、マウス線維芽細胞、ヒト血管内皮細胞においてPSTI受容体が存在することを明らかにした。

以上のことは、PSTIが成長因子として受容体を介して作用することを明らかにしたもので、PSTIの新しい生理活性を解明するにおいて意義深く今後の研究に多大な貢献をもたらすものと考えられる。故に本論文は学位に値すると判断した。