

Title	Gastrin activates NF- $\kappa$ B through a protein kinase C-dependent pathway involving NF- $\kappa$ B-inducing kinase, I $\kappa$ B kinase and TRAF6 in MKN-28 cells transfected with gastrin receptor
Author(s)	小笠, 美幸
Citation	大阪大学, 2003, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/45297">https://hdl.handle.net/11094/45297</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> 大阪大学の博士論文について <a href="#">ご参照ください</a> 。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

氏 名 小 笠 美 幸

博士の専攻分野の名称 博士 (医 学)

学 位 記 番 号 第 18003 号

学 位 授 与 年 月 日 平成 15 年 4 月 10 日

学 位 授 与 の 要 件 学位規則第 4 条第 1 項該当

医学系研究科生体制御医学専攻

学 位 論 文 名 Gastrin activates NF- $\kappa$ B through a protein kinase C-dependent pathway involving NF- $\kappa$ B-inducing kinase, I $\kappa$ B kinase and TRAF6 in MKN-28 cells transfected with gastrin receptor.  
(ガストリンは、胃上皮細胞においてプロテインキナーゼ C 依存性に TRAF6/NIK/IKK カスケードを介して NF- $\kappa$ B を活性化する。)

論 文 審 査 委 員 (主査)

教 授 松澤 佑次

(副査)

教 授 濱岡 利之 教 授 門田 守人

## 論 文 内 容 の 要 旨

【背景・目的】 *Helicobacter pylori* に感染した胃上皮細胞においては転写因子 NF- $\kappa$ B が活性化され、IL-8 に代表されるケモカインが誘導されることにより炎症が持続、増悪していると考えられている。我々は胃体部粘膜に著明な炎症細胞浸潤を伴う体部皺襞腫大型胃炎において高ガストリン血症が認められることから、ガストリンが胃体部粘膜の炎症に関与するとの仮説を立てて研究を進めてきた。実際、ガストリンはガストリン受容体を発現している胃上皮細胞株の IL-8 産生を亢進させ、この効果には転写因子 NF- $\kappa$ B の活性化が必須であることを明らかにしてきた。本研究は胃上皮細胞におけるガストリンによる NF- $\kappa$ B 活性化シグナルを明らかにすることを目的とした。

### 【方法】

1. 細胞はヒト胃癌由来細胞株 MKN28 にヒトガストリン受容体 cDNA を遺伝子導入して作製した細胞株 MKGR およびモルモット単離壁細胞を用いた。
2. ガストリンによる NF- $\kappa$ B 活性化は、NF- $\kappa$ B 認識配列を有する二本鎖オリゴヌクレオチドを用いた Gel shift assay およびリポーター遺伝子 (pNF- $\kappa$ B-Luc Vector) を用いた Luciferase assay にて評価した。
3. ガストリン受容体を介して活性化される様々な protein kinase (MEK, p38MAPK, EGF 受容体, protein kinase C (PKC)) の関与を調べるため、これらの protein kinase に対する特異的阻害剤がガストリンによる NF- $\kappa$ B 活性化に与える影響を調べた。
4. 各 PKC isozyme の特異的阻害剤または dominant negative 変異体の導入がガストリンによる NF- $\kappa$ B 活性化に与える影響を調べた。
5. サイトカイン刺激による NF- $\kappa$ B 活性化シグナルに関与することが明らかとされている IKK, NIK, TRAF2 および TRAF6 の dominant negative 変異体を MKGR 細胞に導入して、ガストリン刺激による NF- $\kappa$ B の転写活性に与える影響を評価した。
6. ガストリン刺激による PKC- $\delta$  の活性化はリン酸化 PKC- $\delta$  特異的抗体を用いた Western blot 法にて検討した。
7. 野生型 PKC- $\delta$  cDNA の強制発現による NF- $\kappa$ B 活性化と、この効果に IKK, NIK および TRAF6 の dominant

negative 変異体導入が及ぼす効果を検討した。

#### 【結果】

1. PKC 阻害剤 GF109203x はガストリンによる NF- $\kappa$ B 活性化を強く抑制した。しかし、MEK、p38MAPK および EGF 受容体の阻害剤に抑制効果は認められなかった。
2. Rottlerin (PKC- $\delta$ 、PKC- $\theta$  阻害剤) はガストリンによる NF- $\kappa$ B 活性化を抑制した。しかし、HBDDE (PKC- $\alpha$ 、PKC- $\gamma$  阻害剤) および Go6976 (PKC- $\alpha$ 、PKC- $\beta$  阻害剤) は抑制しなかった。
3. Dominant negative PKC- $\delta$  はガストリンによる NF- $\kappa$ B 活性化を抑制した。しかし、dominant negative PKC- $\theta$  は抑制しなかった。
4. IKK、NIK および TRAF6 の dominant negative 変異体はガストリンによる NF- $\kappa$ B 活性化を抑制したが、dominant negative TRAF2 は抑制しなかった。
5. ガストリン刺激後 5 分以内に PKC- $\delta$  のリン酸化が確認され、60 分後まで持続した。
6. 野生型 PKC- $\delta$  cDNA の強制発現により NF- $\kappa$ B の転写活性は促進された。この効果は IKK、NIK および TRAF6 の dominant negative 変異体を共発現することにより阻害された。

#### 【総括】

ガストリンは胃上皮細胞において PKC- $\delta$  を活性化し、PKC- $\delta$  がガストリンによる NF- $\kappa$ B 活性化に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。また、ガストリンによる NF- $\kappa$ B の活性化には TRAF6、NIK および IKK が関与しており、PKC- $\delta$  は TRAF6/NIK/IKK カスケードの上流に位置することが明らかとなった。以上より、ガストリンは *Helicobacter pylori* 菌体や炎症性サイトカインとともに NF- $\kappa$ B を活性化し、胃炎の増悪、進展に強く関与することが示唆された。

### 論文審査の結果の要旨

本研究はガストリン受容体を恒常的に発現させたヒト胃癌由来細胞株ならびにモルモット単離壁細胞を用いて、ガストリンによる NF- $\kappa$ B 活性化の分子機構を検討したものである。ゲルシフトアッセイおよびルシフェラーゼアッセイにより、ガストリンは IL-1 シグナルと同様に TRAF6、NIK、IKK カスケードを介して I $\kappa$ B を分解し、NF- $\kappa$ B を活性化することが明らかとなった。また、各 PKC アイソザイムに対する阻害剤および dominant negative 変異体を用いた検討により、ガストリンによる NF- $\kappa$ B 活性化には PKC- $\delta$  が強く関与していることが明らかとなった。さらに、胃上皮細胞に PKC- $\delta$  を強制発現させると NF- $\kappa$ B が活性化され、TRAF6、NIK、IKK のそれぞれ dominant negative 変異体を共発現させることによりこの効果は抑制されたことから、TRAF6、NIK、IKK カスケードは PKC- $\delta$  の下流シグナルであることが示唆された。本論文は *H. pylori* 胃炎や自己免疫性胃炎に見られる高ガストリン血症が胃上皮細胞において転写因子 NF- $\kappa$ B を活性化し、炎症に強く関与することを分子レベルで初めて明らかにしたものであり、学位に値すると考える。