

## 審査の結果の要旨

氏名 野口 貴史

本研究は、ghrelin および IGF I の作用機構の解明の一端として、ヒト GH 産生下垂体腺腫細胞においてこれらが非選択性陽イオン電流を活性化することを明らかにし、その活性化機構および特性を調査して、どのようなチャネルが活性化しているかについて考察したものである。特に IGF I については、以下に示すようにチャネル分子の候補についても検討した。

下記の結果を得ている。

1. 電気生理学的実験により、ghrelin 投与時には非選択性陽イオン電流の活性化が確認された。細胞外液の  $\text{Na}^+$  を不活性 1 価陽イオンである tetramethylammonium ( $\text{TMA}^+$ ) に置換すると電流活性化が有意に抑制されることから、この電流は主に  $\text{Na}^+$  流入による内向き電流であることが確かめられた。また、細胞外の陽イオンを等張の  $\text{Ca}^{2+}$  に置換すると電流活性化が有意に抑制されることから、そのチャネルは  $\text{Ca}^{2+}$  に対し非透過性であることが示された。
2. Fura 2 を用いて細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度 ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) を測定したところ、ghrelin 投与による  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  上昇が確認された。この上昇は nitrendipine によって阻害されることから、L 型電位依存性  $\text{Ca}^{2+}$  チャネルを介した  $\text{Ca}^{2+}$  流入によることが示された。細胞外の  $\text{Na}^+$  を  $\text{TMA}^+$  に置換すると  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  上昇が抑制されることから、前述の  $\text{Na}^+$  流入によって膜が脱分極し、L 型電位依存性  $\text{Ca}^{2+}$  チャネルを開口しているものと考えられた。
3. PKC を薬理的に阻害することで、ghrelin による内向き電流の活性化および  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  上昇は抑制された。PKA の阻害および PI3 kinase の阻害ではこのような抑制はみられず、活性化経路には PKC が関与していることが示された。この結果は、従来ラットやブタで知られている ghrelin での活性化機構とは異なるものであった。
4. 細胞外液中の  $\text{Na}^+$  の  $\text{TMA}^+$  の置換・L 型電位依存性  $\text{Ca}^{2+}$  チャネルのブロック・PKC 阻害はいずれも ghrelin による GH 分泌促進作用を有意に抑制した。一方で、PKA の阻害・PI3 kinase の阻害はいずれも GH 分泌促進作用の抑制はみられなかった。このことから、ghrelin 投与に対する上記の反応は、ghrelin の GH 分泌作用に関与していることが示された。

5. これらの特性は、GHRHによって活性化される非選択性陽イオンチャンネルと共通のものであった。既知のチャンネルでこの特性と合致するものを検索したが、該当するものはみられなかった。
6. 同様に、IGF Iを投与したときにも非選択性陽イオン電流の活性化がみられた。これは主にNa<sup>+</sup>の流入による内向き電流であった。ghrelinで活性化するものとは異なり、Ca<sup>2+</sup>に対しても透過性を有していた。
7. IGF Iの投与によって[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>上昇があることが確認された。これはCa<sup>2+</sup>流入によるものであったが、ghrelinの場合と異なり、L型電位依存性Ca<sup>2+</sup>チャンネルを介してはいなかった。
8. PI3 kinaseの阻害剤によって内向き電流および[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>上昇は抑制されることから、PI3 kinaseを介する伝達経路であることが示された。また、ruthenium redおよびtranelastによっても、内向き電流および[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>上昇が抑制されることが示された。
9. この細胞にはTRPV2が発現していることが、RT-PCRおよび免疫染色で確かめられた。また、TRPV1の活性化物質であるcapsaicinへの反応はみられないが、加温に対して[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>の可逆性の上昇がみられたことから、このTRPV2は機能していることが考えられた。そして、TRPV2に対するアンチセンスを導入して発現を抑制した細胞では、IGF Iでの内向き電流活性化が対照群に比べ有意に抑制されることから、IGF Iに対する反応にはTRPV2が関与していることが示された。

以上、本論文はghrelinはヒトGH産生下垂体腺種細胞において、ラットやブタで報告されているものとは異なる経路を介して作用すること、そこで活性化される非選択性陽イオン電流の特性はGHRHで活性化されるものと共通であり、新規のチャンネルを介している可能性があることを明らかにした。また、IGF Iはこの細胞において、PI3 kinaseを介してTRPV2を活性化させており、これを介するNa<sup>+</sup>およびCa<sup>2+</sup>の流入が非選択性陽イオン電流をなしていることを明らかにした。

これまで、ヒトにおけるghrelinの作用機構は検討されておらず、本研究によってヒト細胞での特異性が初めて明らかとなった。この結果は、未だ主要な生理的役割も明らかでないghrelinの今後の研究において寄与する所が大きいと考えられる。また、本研究でIGF Iの新たなエフェクター蛋白が明らかになったことは、成長因子の持つ細胞成長や増殖の作用機構、あるいは癌や動脈硬化をはじめとする増殖性疾患の病態生理への関与を解明する上で貢献をなすと考えられる。以上より、本研究は学位の授与に値するものと考えられる。