

コレシストキニン／ガストリン受容体を 介するヒト癌細胞増殖の分子機構の解明

神戸大学医学部講師

松 井 利 充

コレシストキニン/ガストリン受容体を介するヒト癌細胞増殖の分子機構の解明

1 研究の背景と目的

臨床的に高ガストリン血症が胃粘膜の肥厚を、また悪性貧血やZollinger-Ellison症候群においてはカルチノイドや胃癌を好発することが古くから知られている。また、種々のヒト癌細胞株がコレシストキニン(CCK)やガストリンなど脳腸管ペプチドホルモン受容体を発現し、癌細胞増殖がこれらのホルモンに依存し促進されることが示唆されてきた。しかし、CCK-B/ガストリン受容体が細胞のトランスフォーメーションを誘導しうるのか、またヒト癌細胞の増殖や進展に直接的に関与しているのか、その実体は不明である。最近、消化性潰瘍の治療薬として頻用されているプロトンポンプ阻害薬が高ガストリン血症とともにカルチノイド腫瘍を誘発することがラットで証明され臨床的にも使用制限の一因となっている。しかし、これまでのCCKおよびガストリン受容体研究は、薬理学的または生理学的手法によるもので、CCK受容体とガストリン受容体分子種の異同についてすら不明であった。私たちは、種々の動物種のCCK-Bおよびガストリン受容体遺伝子の単離により両受容体が単一の遺伝子産物であることを見出した。CCK-B/ガストリン受容体は中枢神経、胃壁およびECL細胞などに特異的に発現している。従って、生理的な受容体発現細胞の単離が極めて困難で、これまで特異的受容体のみを高発現する細胞を用いた実験はほとんど不可能であり、本受容体の細胞生物学的機能および細胞内情報伝達経路の解析はあまり進んでいない。さらに、私たちも報告しているように、CCK-B/ガストリン受容体は動物種によりそのリガンドおよびアンタゴニスト結合親和性が異なる。その違いは膜貫通領域のアミノ酸1つの変異に由来することが最近証明され、ヒト受容体特異的拮抗薬の開発にたずさわっている多くの研究者が私たちが世界で初めて樹立したヒトCCK-B/ガストリン受容体高発現細胞の重要性を指摘している。また、CCKやガストリンは代表的な脳腸管ホルモンであるが、胃においてすらその生理的発現細胞に関する一致した見解がなく、中枢神経系における生理意義についてはほとんど解明されていない。当該受容体のようなG蛋白共役型受容体によるチロシンキナーゼ系の細胞内信号伝達分子の活性化やチロシンキナーゼ型細胞膜受容体よりの細胞内シグナル伝達のクロストークについては、発癌機構との係わりも含めその生物学的意義について今日たいへん注目されている領域の一つである。本研究では、ヒトCCK-B/ガストリン受容体を介する細胞内信号伝達と細胞増殖の分子機構を明らかにするとともに、ヒト癌細胞におけるCCK-B/ガストリン受容体の生物学的意義を解明する。さらに増殖抑制作用を持つヒトCCK-B/ガストリン受容体特異的拮抗薬の検索を行うことを目的とする。

2 研究方法・研究内容

(A) ヒトCCK-B/ガストリン受容体の細胞生物学的機能の解析

- (1) ヒトCCK-B/ガストリン受容体cDNA発現細胞を用い本受容体の生物学的機能(形質転換、細胞増殖、細胞遊走、細胞接着、細胞骨格再構成)につき、代表的な成長因子(PDGFなど)のそれと比較検討したところ、CCKやガストリンが細胞増殖促進能のみならず、アクチンストレスファイバーの形成能をもつことを見いだした。
- (2) CCK-B/ガストリン受容体の細胞内情報伝達におけるチロシンキナーゼ系とのクロストークを、抗リン酸化チロシン抗体や既知の細胞内シグナル伝達分子の抗体を用い免疫沈降法およびイムノブロット法で検討した結果、Ras-MAPキナーゼ経路の活性化のほか、低分子量G蛋白Rho、SrcやFAKの活性化を誘導することを見いだした。
- (3) CCKやガストリンがPDGF同様に、初期応答遺伝子(fos, myc, jun)を誘導することも見出し報告しているが、このような遺伝子転写活性に至る細胞内情報伝達を、PDGFを対照として比較検討したところ、様々の情報伝達系におけるクロストークが明らかとなった。
- (4) 全長20 kb以上におよぶヒトCCK-B/ガストリン受容体ゲノム遺伝子の解析より、第4イントロンに2ヵ所のスプライスドナー部位が存在するが、動物種特異的なスプライシング機構が存在すると考えられた
- (5) 第4イントロンのalternativeスプライシングにより2種類の転写産物がヒト組織に存在する。同部はエフェクター分子との共役に重要と考えられる細胞質内第3ループの一部をコードしている。各受容体アイソフォームに特異的な生物学的機能が存在するかどうか検討したが、これまでに私たちが明らかにしてきた細胞生物学的機構においては相違は見つかっていない。

(B) CCK-B/ガストリン受容体遺伝子ノックアウトマウスによる受容体発現と生理的機能の解析

マウスCCK-B/ガストリン受容体ゲノム遺伝子のクローニングにより、翻訳開始点を含む5'領域をneo-TKに、コード領域のほぼ全長をlacZ-neoに置き換えた2種類のターゲッティングベクターをES細胞に導入し、各々の相同組み換え細胞を数クローンずつ得、当該遺伝子ノックアウトマウスの作製に成功した。その表現型を解析したところ、発生学的な異常は認められず、ホモマウスもまた生殖障害をきたさないが、肉眼的にも明らかな胃粘膜細胞の増殖障害に基づく胃の萎縮が見つかった。

(C) ヒト腫瘍細胞におけるCCK-B/ガストリン受容体の異所性発現および変異受容体の検索

ヒトCCK-B/ガストリン受容体cDNAをプローベとして染色体マッピングを行った結果、受容体遺伝子は第11番染色体短腕15.5-15.4の種々のヒト腫瘍細胞において変異が報告されている増殖関連遺伝子領域にマップされた。消化器癌のみならず種々のヒト癌での発現をノーザンブロット法およびRT-PCR法で検索した結果、ヒト肺小細胞癌や白血病細胞における異所性発現や大腸癌

における過剰発現が見いだされた。

- (D) ヒトCCK-B/ガストリン受容体特異的アンタゴニストのスクリーニング CCK/ガストリン受容体高発現細胞株を用い、¹²⁵I標識CCKおよび¹²⁵I標識ガストリンを用いたりガンド結合能、これらリガンドにより誘導される細胞内情報伝達系を指標としてヒトCCK-B/ガストリン受容体特異的アンタゴニストの評価を行なったところ、ラットで見いだされた受容体拮抗薬がヒト受容体に結合しないことが見いだされた。また、無血清培地におけるCCK/ガストリンのDNA合成および細胞増殖を指標として受容体特異的アンタゴニストの細胞増殖抑制作用を検討したところ、新規の受容体拮抗薬のなかに、細胞増殖阻害作用の強いものが見いだされた。これを用いて、種々のヒト癌細胞増殖におよぼす影響を検討したところ、癌細胞増殖におけるCCK-B/ガストリン受容体を介するオートクリン機構の存在が見いだされた。

3 研究結果

癌遺伝子および癌抑制遺伝子産物の多くはチロシンキナーゼ型増殖因子受容体に始まる一連の細胞内情報伝達分子であり、私共はこれまでにa型血小板由来成長因子(PDGF)受容体遺伝子を見いだすとともに、種々のヒト腫瘍細胞におけるPDGFオートクリンループの活性化などチロシンキナーゼ型受容体を介する細胞癌化の分子機構を明らかにしてきた。チロシンキナーゼ以外の膜受容体をコードする癌遺伝子としてG蛋白共役型受容体と考えられるmasが報告されているがその生理的機能は不明である。G蛋白共役型のセロトニンやアドレナリン受容体によるリガンド依存性の細胞トランスフォーメーションの報告はあるが、これら受容体のヒト癌細胞における活性化の報告はない。1992年私共は、世界で初めてカルチノイド腫瘍よりガストリン受容体を、さらにヒト大脳および胃粘膜よりCCK-Bおよびガストリン受容体をクローン化し、CCK-B受容体とガストリン受容体が単一の遺伝子産物であることを明らかにした。また、本受容体も7回膜貫通型のG蛋白共役型受容体で、CCKやガストリンが無血清培地において受容体発現細胞のDNA合成を刺激し、細胞増殖を促進することを明らかにした。さらに本研究において、G蛋白共役型CCK-B/ガストリン受容体オートクリン機構のヒト癌細胞増殖における役割を明らかにするとともに、チロシンキナーゼ型増殖因子の細胞内情報伝達経路とのクロストークを見いだした。CCK-B/ガストリン受容体は、胃癌や膵癌などの消化器癌のみならず、正常対照組織において受容体mRNAが検出されない肺小細胞癌や白血病細胞にも発現していることも明らかにし、CCK-B/ガストリン受容体が今後新しい癌診断および癌治療の標的分子として利用できる可能性を見いだした。

この様な膜受容体を研究対象とする理由は、特異的な治療法開発が最も容易であると考えられるためである。各種疾病の内科的治療の最も重要なものとして薬剤による治療がある。遺伝子工学的手法の導入以来、矢継早に内在活性物

質がクローニングされ疾病の原因や病態の解析のみならず治療への応用が可能になってきている。なかでも種々の液性因子の受容体のクローニングの結果その受容体に親和性、特異性の高いアゴニスト、アンタゴニストの開発が可能となった。これまでのCCKおよびガストリン受容体の研究は、薬理学的または生理学的手法によるもので、CCK受容体とガストリン受容体の分子種の異同についてすら不明であった。私共は、種々の動物種の受容体遺伝子の単離により両受容体が単一の遺伝子産物であるが、種々のペプチドリガンドの親和性が動物種により著しく異なることを見い出した。すなわち、CCK-B/ガストリン受容体は、動物種によって非ペプチド性アンタゴニストに対する親和性が著しく異なる

(逆転することもある)。従って、動物実験にてCCK-B/ガストリン受容体遮断作用を示した化合物でも、ヒト受容体に対して拮抗作用を示すとは限らない。すなわち、私共が樹立したヒトCCK-B/ガストリン受容体発現細胞株を用いて各種化合物の生物学的機能を評価することが、ヒトにおける臨床効果を予測する上でたいへん有用である。親株CHOおよびNIH3T3細胞にはCCKやガストリン I の結合は全く見られないが、今回樹立したヒトCCK-B/ガストリン受容体cDNA発現CHOおよびNIH3T3細胞株は、正常の壁細胞や脳細胞に比し少なくとも10倍以上の受容体数を発現している。すなわち、これらの細胞株は受容体アゴニストおよびアンタゴニストのスクリーニングにおいて高感度かつ特異性の高い最良のシステムであることが本研究にて証明された。現在世界中で、私共だけがこの細胞株の樹立に成功しており、豊富に安定して実験に供することができる。またこれらの細胞に発現させたCCK-B/ガストリン受容体はCCKやガストリンにより誘導される生化学的機能のみならず生物学的機能が再構築されており、単なる受容体結合能のみならず機能的アゴニストおよびアンタゴニストの評価に使用できることも証明された。

4 研究がもたらす効果および波及効果

これまで薬理学的にしか同定できなかった本受容体の分子種を特異的DNAプローブを用い検出し、ヒト癌細胞における異所性発現や高発現の有無を確認できるようになった。本研究においても、CCK-B/ガストリン受容体が肺小細胞癌や白血病細胞の特異的腫瘍マーカーであることを見い出しており、今後の受容体遺伝子の変異の有無の解析は本受容体のヒト細胞の癌化における本受容体の活性化のかかわりを明らかにする上でも重要である。また、種々のヒト腫瘍細胞が発現するCCK-B/ガストリン受容体遺伝子産物の機能、その細胞内情報伝達系の解析および遺伝子発現調節機構の解明は癌研究の進歩に大いに貢献すると考える。

ガストリンは胃酸分泌の主たる調節因子の1つであり、CCK-B/ガストリン受容体遮断薬は胃酸分泌抑制作用を示す。プロトンポンプインヒビターやヒスタミンH₂受容体ブロッカーによる消化性潰瘍治療において、胃粘膜肥厚が問題とな

っている。この胃粘膜肥厚にCCK-B/ガストリン受容体が直接的に関与していることが今回の受容体遺伝子欠損マウスの作成により証明され、CCK-B/ガストリン受容体遮断薬が上記2種の消化性潰瘍治療薬による粘膜肥厚も抑制する可能性が強く示唆された。従って、本研究により明らかにされた、細胞増殖抑制能をもつCCK-B/ガストリン受容体遮断薬は既存の酸分泌抑制抗潰瘍薬より優れた潰瘍治療薬になる可能性は高い。

さらに、CCKはヒト中枢神経系において種々の重要な生理作用をもち、各種精神疾患、神経疾患、神経内分泌疾患との関連が指摘されている。しかし、その生理的意義の詳細は明らかでない。私どもが、作成に成功した当該受容体遺伝子相同組み換えマウスは、今後CCKやガストリンの中枢神経系における生理的意義を個体レベルで解明することにも貢献できると確信している。すなわち、CCK-B/ガストリン受容体拮抗薬の開発は、向精神薬および神経疾患や神経内分泌疾患の治療薬になる可能性も高く、本研究成果は各種疾患の克服に向けて大きな貢献が期待される。