

氏名(本籍)	あくざわ 阿久沢	しのぶ 忍	(千葉県)
学位の種類	博士(医学)		
学位記番号	博甲第1,733号		
学位授与年月日	平成9年3月24日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
審査研究科	医学研究科		
学位論文題目	消化管におけるセロトニン(5-HT)受容体に関する研究 —5-HT ₃ および5-HT ₄ 受容体の構造および機能について—		
主査	筑波大学教授	薬学博士	後藤 勝年
副査	筑波大学教授	医学博士	深尾 立
副査	筑波大学教授	医学博士	三輪 正直
副査	筑波大学教授	医学博士	武藤 弘
副査	筑波大学助教授	医学博士	山口 巖

論文の内容の要旨

(目的)

5-HT₃受容体の消化管機能との関わりについては、モルモットやラット、マウス、イヌ等の実験動物に於いて多くの研究が行われてきた。回腸や結腸の5-HT₃受容体を刺激すると収縮が惹起され、胃排出能も亢進することなどが認められている。ヒトに於いても、5-HT₃アンタゴニストが大腸輸送を遅延させることが知られている。最近では、制癌剤による嘔吐に対し、5-HT₃受容体アンタゴニストが良く奏効することが判明し、注目を集めている。このように、消化管機能の調節に5-HT₃受容体が重要な役割を果たしていることがうかがわれる。

本研究では、ヒトの消化管に於ける5-HT₃受容体の役割を解明し、将来的には新しい治療法(薬)を開発することを目指し、未だ明らかにされていないヒト5-HT₃受容体遺伝子をクローニングしてその一次構造を明らかにし、その体内分布や生化学的性質(リガンドとの結合能)などの基本的性質を探ることを目的とする。又、既知のラット5-HT₃受容体との質的差異なども調べ、将来の応用研究への資料に供する。5-HT₄受容体についても若干の検討を加える。

(実験方法)

1. 受容体結合実験

飽和結合実験において、ラットの脳や消化管、ヒト5-HT₃受容体を発現させたCOS-1細胞などの膜標品(蛋白量0.1mg)と³H]YM060(0.01から0.2nM)を全量0.5mlで、25℃、30分間反応させた。特異的結合阻害実験においては、³H]YM060(0.3nM)と4から6段階の濃度のアゴニストおよびアンタゴニストを反応させた。非特異的結合は1μMトロピセトロン存在下で測定した。全結合量と非特異的結合量をグラフにプロットし、前者より後者を差し引くことにより、特異的結合量を求めた。又、特異的結合をスキッチャード解析することにより、親和性(解離定数:Kd値)や最大結合量(Bmax)を求めた。

2. ヒト5-HT₃受容体遺伝子のクローニング

まず、ヒト脳由来のpoly(A)+RNA(Clontech社)を用い、ラットやマウスの5-HT₃受容体間で保存されている塩基配列をもとにプライマーを設計して、RT-PCR法によりヒト5-HT₃受容体cDNAの部分断片を単離した。続いて、ヒト海馬由来Poly(A)+RNAを用いてRACE法を実施し、5'末端側及び3'末端側の塩基配列を明らかにした。

3. サザンブロッティング

ヒトゲノム DNA を BamH I, Bgl II, EcoR I, Hind III 及び NcoI/Spe I によって制限酵素処理して0.7%アガロースゲルで電気泳動を行い、先述のプライマーの RT-PCR 産物をプローブとして、ブロッティングを行った。

4. ノーザンブロッティング

クローニングしたヒト 5-HT₃受容体 cDNA の全長をプローブとして、サザンブロッティングと同じハイブリダイゼーションの条件下に行った。いずれも、poly(A)+RNA から合成した cDNA を、20サイクルの RT-PCR を行った後、ノーザンブロッティングに供した。

(結果)

1. 5-HT₃受容体に選択的な化合物である YM 060のラジオリガンド [³H] YM 060の性質を、ラット大脳皮質膜標品を用いて検討したところ、 [³H] YM 060は5-HT₃受容体に高親和性で選択的なラジオリガンドであることが確認された。

2. ヒトおよびラット5-HT₃受容体遺伝子をクローニングし、一次構造を明らかにした。塩基配列およびアミノ酸配列を調べたところ、ヒト5-HT₃受容体アミノ酸配列におけるマウス及びラットとの相同性は、80%以上であった。またノーザンブロットあるいは RT-PCR 法により、5-HT₃受容体がヒトの脳、腸管、脾臓、胸腺および前立腺に分布していることが確認された。更に、マウス5-HT₃受容体の分布においてヒトおよびラットとの種差が確認された。

3. 5-HT₃受容体選択的なラジオリガンドである [³H] YM 060を用いた、ラット大脳皮質、回腸および結腸での5-HT₃受容体アゴニストおよびアンタゴニストの親和性を検討したところ、脳と腸管では違いがなく同じサブタイプであることが示唆された。又、クローニングされたラット5-HT₃受容体は上記組織における5-HT₃受容体と同じ性質の受容体であることが示唆された。

4. クローニングしたヒトおよびラット5-HT₃受容体と [³H] YM 060を用いた受容体結合実験を行ったところ、ヒトとラットの5-HT₃受容体では親和性に種差が存在することが示唆された。

(考察)

[³H] YM 060は5-HT₃受容体に選択的で高親和性なラジオリガンドであり、受容体結合実験を行う上で有用であることが示された。また、ヒトおよびラットの5-HT₃受容体遺伝子がクローニングされ、 [³H] YM 060を用いた受容体結合実験により受容体の基本的性質が明らかとなった。ラットにおいては5-HT₃受容体サブタイプは確認されず、5-HT₃受容体は単一のものと考えられる。また、ヒトおよびラット5-HT₃受容体が異なる性質を有していたことから、ヒトと種差のない動物種を用いた実験を行うことも必要と思われる。以上まとめると、ヒト5-HT₃受容体の基本的性質が明らかとなり、疾患との関わりを調べ、治療法(薬)の開発を行う上で有用な情報が得られた。

審査の結果の要旨

消化管の運動や制癌剤による嘔吐に5-HT₃受容体が深く関わっていることが明らかとなり、注目を集めている。本研究では、まず5-HT₃受容体に極めて特異性の高いリガンド ([³H] YM 060) を見出し受容体結合実験の基礎を確立している。そして、ヒトの5-HT₃受容体を初めてクローニングしてその一次構造を明らかにし、上記結合実験等によりその性質を明らかにすると同時に、生体内分布や動物との種差の有無などを詳しく検討している。本研究の成果は、ヒトの消化管に於けるセロトニンの生理・病態生理への関わりを解明するのに役立つばかりでなく、将来的には一部の消化管疾患の新しい治療法(治療薬)の開発につながることも期待され、高く評価されるものである。

よって、著者は博士(医学)の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。