

胃幽門腺粘液細胞における PPAR α による
NOS1/NO/cGMP を介した Ca²⁺調節性開口放出の増強

2016

田中 早織

目次

緒言	1
第 1 章 Ca^{2+} 調節性開口放出の cGMP 修飾	
第 1 節 cGMP による Ca^{2+} 調節性開口放出の増強に対する SV2A の役割： レベチラセタムによる SV2A の阻害	5
第 2 節 Ca^{2+} 調節性開口放出に対する cGMP の役割： PKG 阻害による PDE2 を介した cAMP の蓄積	17
第 2 章 PPAR α を介した Ca^{2+} 調節性開口放出の増強機構：NO/cGMP 経路の活性化	
第 1 節 PPAR α オートクリン機構による Ca^{2+} 調節性開口放出の増強： NOS1/NO/cGMP の蓄積	32
第 2 節 PPAR α による NOS1 の活性化	50
総括	61
論文目録	65
謝辞	66
引用文献	67

緒言

胃粘膜表面は粘液細胞から分泌された粘液が形成する層状のゲル層に覆われ、酸やペプシンなどによる攻撃から粘膜を防御している。胃幽門部粘膜は胃の他の部位に比べ、重炭酸イオンと共に大量の粘液を分泌している。胃体部と幽門部の境界部位が胃潰瘍の好発部位であることも、幽門部からの粘液分泌が胃粘膜防御機構として重要な役割を担っていることを示している。粘液は高分子糖蛋白のムチンが主成分であり、粘液細胞内で合成、細胞内顆粒に蓄えられ、主に副交感神経刺激に反応して細胞外へと放出される¹⁾。この放出過程は細胞内顆粒膜が細胞質膜と癒合し、顆粒の口が開くように内容物が細胞外へと放出されることから開口放出と呼ばれている。胃幽門腺粘液細胞における細胞内粘液顆粒の開口放出現象は生体ビデオ強調型顕微鏡システムを用いることで細胞が活着している状態で直接観察できる。開口放出（顆粒内容消失）は記録画像上で顆粒に一致した部位の急激な輝度変化として観察され、この現象を数えることで開口放出を高時間分解で定量的に表現できる。

外分泌腺細胞（例えば唾液腺、膵臓腺細胞、胃幽門腺粘液細胞）やシナプスにおける開口放出は細胞内の Ca^{2+} や cAMP などのシグナル調節を受けていることから、調節性開口放出と呼ばれている^{2,3)}。胃幽門腺粘液細胞における粘液開口放出は主に Ca^{2+} 調節性開口放出により維持されている（cAMP 調節性開口放出頻度は Ca^{2+} 調節性開口放出頻度の約 10%）⁴⁻⁹⁾。胃幽門腺粘液細胞における Ca^{2+} 調節性開口放出はアセチルコリン（ACh）刺激による細胞内 Ca^{2+} 濃度（ $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ）の上昇により活性化され^{6,7,9)}、特徴的なパターンを示す。すなわち、ACh 刺激による急激な開口放出頻度の上昇と引き続き急激に低下する一過性の高頻度開口放出を示す初期相と、それに続くゆっくりと減少しながら低頻度の開口放出が持続する遅発相の二相から構成される^{6,7,9)}（Fig. 1）。

Ca^{2+} 調節性開口放出反応は様々な蛋白の連続した反応（ドッキング、プライミングおよびフュージョン）として引き起こされることが知られている²⁾。ドッキングは細胞内で形成された顆粒が最終的に腺腔側膜直下まで輸送され、顆粒膜と腺腔側膜が融合する直前の状態になる過程、プライミングは顆粒膜と腺腔側膜に存在している開口放出の一連の蛋白（exocytotic machinery）が結合する過程、最後のフュージョンは顆粒膜と腺腔側膜が融合する過程であり、三つの過程を経て、顆粒内容が細胞外へと放出される²⁾（Fig. 2）。ドッキング後のプライミングとフュージョンは独立した過程であり、それぞれ ATP と Ca^{2+} により活性化される（ATP 依存性プライミング、 Ca^{2+} 依存性フュージョン）。ATP 依存性プライミングの活性化はプライミング顆粒（開口放出可能な顆粒）の数を増加させる。一方で Ca^{2+} 依存性フュージョンの活性化はプライミング顆粒を直ちに放出させる。胃幽門腺粘液細胞

Ca²⁺調節性開口放出においては、初期相はプライミングされた顆粒が一度に放出される一過性の高頻度の開口放出反応であり、プライミングの促進は初期相の増加を引き起こす⁷⁾。遅発相はプライミング、フュージョンが新たに連続して起こる低頻度の開口放出反応である。

胃幽門腺粘液細胞の Ca²⁺調節性開口放出における ATP 依存性プライミング、Ca²⁺依存性フュージョンは cAMP、cGMP、プロスタグランジン (PG)、一酸化窒素 (NO)、Cl⁻、レベチラセタム (SV2A 阻害薬)、アラキドン酸など種々の物質により修飾される⁶⁻¹⁶⁾。これらの物質の中で cAMP はプライミングとフュージョンの両ステップを促進し、Ca²⁺調節性開口放出を増強しているが⁷⁾、それ以外の物質はプライミングのみを修飾する。

プライミングには Synaptic Vesicle protein 2A (SV2A、ATP 結合性のタンパク) が重要な役割を果たしている¹⁷⁻¹⁹⁾。シナプスでは SV2A がプライミング顆粒数を調節していることも報告されている^{18,19)}。この事実から、SV2A 阻害薬 (レベチラセタム) が胃幽門腺粘液細胞においてもプライミング顆粒を減少させることが考えられた。実際にレベチラセタムは胃幽門腺粘液細胞 Ca²⁺調節性開口放出において初期相の減少を引き起こした。

一方で、胃幽門腺粘液細胞 Ca²⁺調節性開口放出のプライミングを促進する代表的な物質として cGMP がある¹³⁾。cGMP で処理すると胃幽門腺粘液細胞 Ca²⁺調節性開口放出の初期相を 100%増加させた¹³⁾。cGMP による初期相の増加はレベチラセタムにより抑制される。さらに、PKG を阻害することによってもプライミング顆粒を減少させることができる。実際に PKG 阻害薬はレベチラセタムと同様に、胃幽門腺粘液細胞 Ca²⁺調節性開口放出において初期相の減少を引き起こした。しかし、同時に遅発相において一過性の開口放出増加を引き起こした。この遅発相における一過性の開口放出の増加は PKA 依存性であることから、PKG 阻害薬が phosphodiesterase 2 (cGMP-dependent PDE2) 活性を抑え cAMP 分解を抑制するため、cAMP の蓄積の可能性が考えられた。cGMP を蓄積する物質として細胞間、細胞内の伝達物質である NO が知られている²⁰⁻²²⁾。今回の研究でも、胃幽門腺粘液細胞において NO が cGMP 蓄積を起こすことを明らかにした。しかし、胃幽門腺粘液細胞において NO/cGMP シグナルを活性化する経路は明らかではない。

胃幽門腺粘液細胞において、アラキドン酸と peroxisome proliferation activation receptor α (PPAR α) アゴニストは Ca²⁺調節性開口放出を増強する¹⁴⁾。血管内皮細胞あるいは心筋細胞では PPARs 活性化により NO が産生されること²³⁻²⁷⁾、またアラキドン酸が血管平滑筋細胞において NO を産生することも報告されている²⁸⁾。これらの報告は胃幽門腺粘液細胞においてもアラキドン酸と PPAR α 活性化が NO を産生している可能性を示している。

本研究では PPAR α /NO/cGMP 経路を介した Ca²⁺調節性開口放出の修飾機構について研究を行なった。第 1 章において cGMP により修飾された胃幽門腺粘液細胞 Ca²⁺調節性開口放

出のプライミングに及ぼす SV2A 抑制（レベチラセタムによる抑制）と PKG 阻害薬の効果を示し、さらに PKG 阻害薬による PDE2 抑制が cAMP 蓄積による一過性の開口放出（遅発相）を起こすことを示した。第 2 章では第 1 章の結果を用いて、PPAR α 活性化による NO/cGMP シグナル活性化と NOS1 のリン酸化機構の詳細を明らかにした。これら一連の結果から胃幽門腺粘液細胞 Ca²⁺調節性開口放出の維持に、PPAR α /NOS1/NO/cGMP 経路が重要な役割を果たしていることを示した。

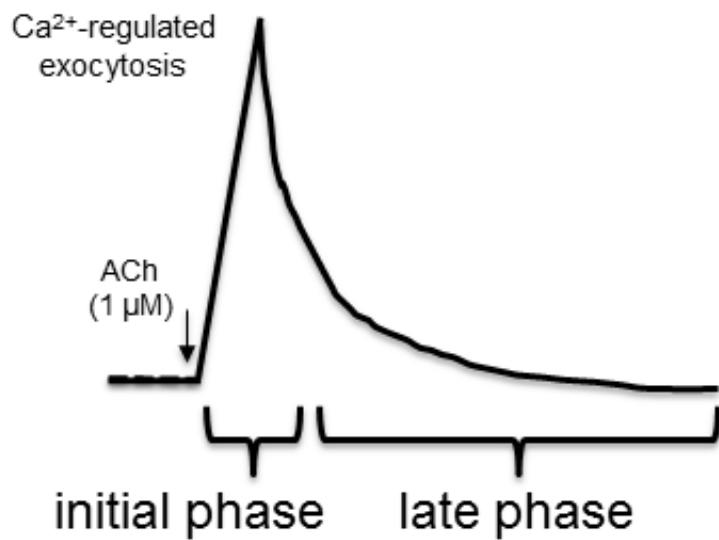


Fig. 1 A characteristic two phase in frequency of Ca^{2+} -regulated exocytosis. ACh increased the frequency of exocytotic events in antral mucous cells: an initial peak that declines rapidly (initial phase) followed by a second slower decline (late phase).

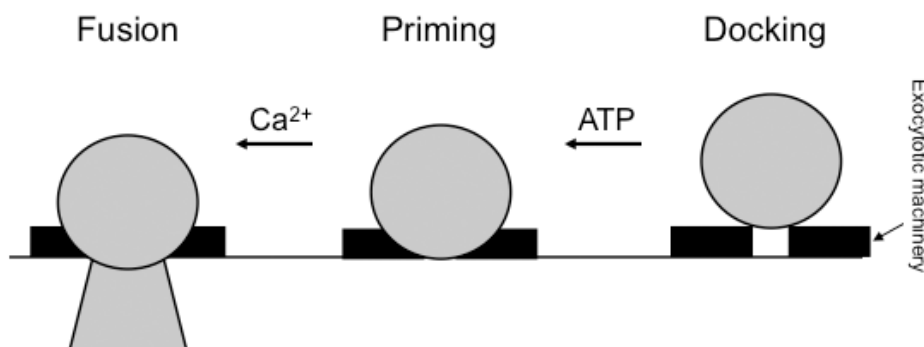


Fig. 2 The final three biochemical steps of the Ca^{2+} -regulated exocytosis in antral mucous cells: docking, priming, and fusion. The priming step requires ATP, and primes granules with exocytotic machinery. The fusion step requires Ca^{2+} , and triggers fusion of the granules to the apical membrane.

第 1 章 Ca^{2+} 調節性開口放出の cGMP 修飾

第1節 cGMP による Ca^{2+} 調節性開口放出の増強に対する SV2A の役割：

レベチラセタムによる SV2A の阻害

1. 緒言

胃幽門腺粘液細胞 Ca^{2+} 調節性開口放出における ATP 依存性プライミングは様々な物質により修飾を受けている^{6,8,9-16}。プライミングには Synaptic Vesicle protein 2A (SV2A) が重要な役割を果たしており、シナプスでは SV2A がプライミング顆粒数を調節していることも報告されている¹⁷⁻¹⁹。さらに SV2A のリガンドであるレベチラセタムは Ca^{2+} 調節性開口放出においてプライミング顆粒を減少させることでシナプスにおける神経伝達物質の放出を減少する^{15,16,29-31}。このように SV2A はシナプスおよび神経内分泌細胞において Ca^{2+} 調節性開口放出を維持するのに重要な蛋白質である。しかし、胃幽門腺粘液細胞 Ca^{2+} 調節性開口放出における ATP 依存性プライミングに及ぼす SV2A の役割については明らかではない。

本節ではレベチラセタムによる SV2A の抑制が cGMP により修飾された胃幽門腺粘液細胞 Ca^{2+} 調節性開口放出のプライミングに及ぼす効果について検討した。

2. 材料および方法

2-1 使用溶液および薬物

溶液 I の組成は、121 mM NaCl、4.5 mM KCl、25 mM NaHCO_3 、1 mM MgCl_2 、1.5 mM CaCl_2 、5 mM Na-HEPES、5 mM H-HEPES、5 mM Glucose であり、pH7.4 に調節して、混合ガス (95% O_2 、5% CO_2) で飽和し、37°C で実験を行った。アセチルコリン (ACh, Daiichi Pharmaceuticals)、コラゲナーゼ (細胞分散用、180-220 U/mg、Wako Pure Chemical Industries)、BSA (Wako Pure Chemical Industries)、dinitrophenol (DNP, Sigma)、8-bromo-cGMP (8BrcGMP, Sigma) およびレベチラセタム (Sigma) を用いた。ACh は超純水で溶解した。ACh 以外の薬物は dimethyl sulfoxide (DMSO) で溶解し、DMSO の最終濃度が 0.1% を超えないように希釈した。

2-2 胃幽門腺粘液細胞の調製

実験動物はハートレイ系雄性モルモット (8-9 週齢、日本 SLC) を用いた。動物は一定の照明サイクル (明期 12 時間)、恒温 ($24 \pm 1^\circ\text{C}$)、恒湿 ($55 \pm 10\%$) の飼育室で、水道水および標準固形飼料 (日本農産工業株式会社) を自由に摂取させ、1 週間以上予備飼育をした後、実験に供した。全ての実験は大阪医科大学の動物実験規程に従って行った。

ペントバルビタール (70 mg/kg) 麻酔下、頸椎脱臼により奢殺後、胃を摘出した。直ち

に胃幽門粘膜を鈍的に剥離し、0.1%コラゲナーゼ処理により遊離腺細胞を得た。コラゲナーゼ処理した組織はナイロンメッシュ（径 300 μm ）で濾過、遠心（300 rpm、1 分）した後、4% BSA を含む灌流溶液中に浮遊させた。遠心・洗浄を 3 度繰り返した後、4% BSA を含む灌流溶液中（4°C）で保存した。遊離腺細胞は 3 時間以内に使用した。

2-3 開口放出の観察

Cell Tak（Becton Dickinson Labware）で前処理したカバースリップ上に遊離腺細胞を接着後、顕微鏡ステージ上の灌流チャンバーに装着して観察した。灌流チャンバーの容積は約 20 μl 、灌流速度 200 $\mu\text{l}/\text{min}$ であった。正立型微分干渉顕微鏡（BX50WI、オリンパス）にビデオ強調型コントラスト装置（ARGUS、浜松ホトニクス）を接続し微分干渉像をビデオ画像として記録した。開口放出は粘液顆粒に一致した部位の光強度の急激な変化として観察された。ビデオ画像中の粘液細胞（3~4 個）について 30 秒間を単位時間とした開口放出数を細胞数で割り、1 細胞あたりの開口放出頻度とした。それぞれの実験は 4~13 枚のカバースリップについて行い、平均値 \pm 標準誤差としての開口放出頻度を表現した。ACh 刺激開始 1 分後を初期相頻度とし、ACh 刺激開始 3 分後を遅発相頻度とした。

2-4 ウェスタンブロット法

胃幽門粘膜および脳を RIPA buffer でホモジナイズし、遠心分離（10,000 g、10 分）を行なった。その上清をタンパク量として 10 μg のサンプルを用いた。7.5%のポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動させ、polyvinylidene difluoride（PVDF）メンブレンに転写させた。メンブレンを 0.3%スキムミルクを含むリンス緩衝液でブロッキング処理（室温、1 時間）を行なった。その後、1 次抗体として SV2A 抗体（Synaptic system）を 1:1,000 に希釈した後、室温において 1 時間反応させた。2 次抗体として Anti-rabbit IgG-HRP（Santa Cruz Biotechnology）を 1:2,000 に希釈した後、室温において 1 時間反応させた。Chemi-Lumi One L（ナカライテスク）を用いて発光させ、LAS-3000（富士フイルム）で解析を行った。

2-5 組織化学染色法

ホルマリン固定した胃幽門粘膜をパラフィン包埋し、各切片を作製した。各切片は hematoxylin and eosin（H&E）、ウェスタンブロット法で使った SV2A 抗体を用いて染色し、光学顕微鏡で観察を行った。

2-6 細胞内 Ca^{2+} 濃度（ $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ）の測定

遊離腺粘液細胞に fura 2 AM（2.5 μM ; Dojindo）を 30 分間室温で負荷した。細胞を遠心

(300 rpm、1 分)、洗浄した後、4%BSA を含む灌流溶液中に浮遊させ 4°C で保存した。Cell Tak で前処理したカバースリップ上に遊離腺粘液細胞を接着させ、画像分析装置 (AQUA COSMOS、浜松ホトニクス) を接続した倒立型顕微鏡 (TE2000、オリンパス) ステージ上の灌流チャンバーに装着し、 $[Ca^{2+}]_i$ の測定を行った。蛍光測定 (Ex: 340/380 nm, Em: 510 nm) により蛍光強度比 (F340/F380) を測定し、 $[Ca^{2+}]_i$ を求めた。

2-7 統計学的処理

実験結果は平均値 \pm 標準誤差で示した。各実験群の初期相頻度の大きさを比較するときの有意差検討は、Student's *t* 検定を用いた。以上の検定において $P < 0.05$ のとき、有意差ありと判定した。

3. 結果

3-1 胃幽門腺粘液細胞 Ca^{2+} 調節性開口放出におけるレベチラセタムの効果

胃幽門腺粘液細胞において、非刺激時では開口放出が観察されなかった。ACh (1 μ M) 単独刺激開始直後より開口放出頻度は速やかに上昇し、ACh 刺激開始 1 分後における初期相頻度は 11.0 ± 0.4 events/cell/30s となった。その後、開口放出頻度はゆるやかに減少し、ACh 刺激開始 3 分後における遅発相頻度は 2.7 ± 0.2 events/cell/30s であった (opened circle in Fig. 3)。

次いで、 Ca^{2+} 調節性開口放出におけるレベチラセタム (50 μ M) の効果について検討した。レベチラセタムで 5 分間刺激した後に ACh 刺激を行ったところ、レベチラセタムは Ca^{2+} 調節性開口放出の初期相を 30% 減少させた (7.4 ± 0.4 events/cell/30s, closed circle in Fig. 3)。

3-2 プライミングステップを阻害した時あるいは促進した時における Ca^{2+} 調節性開口放出の初期相に対するレベチラセタムの効果

胃幽門腺粘液細胞 Ca^{2+} 調節性開口放出におけるプライミングステップは ATP 依存性である^{7,11,13}。まず始めに ATP を枯渇させるために dinitrophenol (DNP, 100 μ M) を用いた。DNP で 5 分間処理し、さらに ACh 刺激を行なうと高頻度の初期相が抑制され、低頻度の遅発相開口放出のみが観察された (3.5 ± 0.6 events/cell/30s, ACh 刺激開始 1.5 分後、Fig. 4A)。次いで、ATP を枯渇させた細胞において Ca^{2+} 調節性開口放出に対するレベチラセタムの効果について検討した。DNP で 5 分間処理し、次にレベチラセタムと DNP で 5 分間処理した後、ACh 刺激を行なったところ、レベチラセタムは Ca^{2+} 調節性開口放出の初期相を相加的には減少させなかった (3.9 ± 0.5 events/cell/30s, ACh 刺激開始 1.5 分後、Fig. 4B)。

胃幽門腺粘液細胞において 8-Bromo-cGMP (8Br-cGMP、細胞膜透過性の cGMP アナログ)

はプライミングを促進させることで Ca^{2+} 調節性開口放出の初期相を増強させることが報告されている¹³⁾。8BrcGMP (100 μM) で増強した Ca^{2+} 調節性開口放出におけるレベチラセタムの効果について検討した。以前の報告と同様に、8BrcGMP は Ca^{2+} 調節性開口放出の初期相を増強させた (19.3 ± 1.1 events/cell/30s、Fig. 5A)。レベチラセタムで 5 分間処理し、次にレベチラセタムと 8BrcGMP で 3 分間処理した後、ACh 刺激を行なったところ、レベチラセタムは 8BrcGMP によって増強した Ca^{2+} 調節性開口放出の初期相を 30% 減少させた (13.4 ± 0.8 events/cell/30s、Fig. 5B)。次に、8BrcGMP で 3 分間処理後、8BrcGMP とレベチラセタムで 5 分間処理し、ACh 刺激を行なったが、レベチラセタムは Ca^{2+} 調節性開口放出の初期相を抑制しなかった (18.9 ± 0.5 events/cell/30s、Fig. 5C)。これらの結果より、レベチラセタムはプライミングステップに働き、プライミング顆粒数を減少させるが、すでにプライミングされた顆粒には影響を与えないことが示された。

3-3 ACh 刺激後の短期間回復後 2 回目の ACh 刺激性開口放出の初期相に対するレベチラセタムの効果

ACh 刺激を 1 分間行い、その後 5 分間の回復期間後に 2 回目の ACh 刺激を行なった (Fig. 6A)。最初の 1 分間の ACh 刺激は遅発相を引き起こさず、初期相のみ引き起こした (10.2 ± 0.4 events/cell/30s)。次に 5 分間の回復期間後 2 回目の ACh 刺激は開口放出を徐々に増加させた後、徐々に減少させた。すなわち、2 回目の ACh 刺激は初期相を著しく減少させた (2.8 ± 0.2 events/cell/30s、2 回目の ACh 刺激 1 分後、Fig. 6A)。次いで 5 分間の回復期間中にレベチラセタムにより処理した後にさらに 2 回目の ACh 刺激を行なった (Fig. 6B)。2 回目の ACh 刺激は開口放出を徐々に増加させ、2 回目の ACh 刺激開始 1 分後の開口放出頻度は 1.9 ± 0.2 events/cell/30s であった。レベチラセタムは 2 回目の ACh 刺激性開口放出をレベチラセタムが存在しない時に比べて 68% に減少させた。さらに、プライミングを促進するために、回復期間中に 8BrcGMP で 3 分間処理し、次いで、8BrcGMP 存在下で 2 回目の ACh 刺激を行なった (Fig. 6C)。8BrcGMP 存在下における 2 回目の ACh 刺激は、初期相と遅発相を引き起こした。初期相頻度は 6.6 ± 0.3 events/cell/30s であり、遅発相頻度は 1.7 ± 0.2 events/cell/30s であった。最後に、回復期間中にレベチラセタムで 2 分間処理し、レベチラセタムと 8BrcGMP で 3 分間刺激後、さらに 2 回目の ACh 刺激を行なった (Fig. 6D)。2 回目の ACh 刺激は初期相に引き続き遅発相を引き起こした。初期相頻度は 3.6 ± 0.1 events/cell/30s、遅発相頻度は 1.8 ± 0.2 events/cell/30s であり、レベチラセタムは 8BrcGMP によって増強される ACh 刺激性開口放出の初期相を 55% に減少させた。

3-4 胃幽門粘膜における SV2A の発現と局在

ウェスタンブロット法における胃幽門粘膜および脳での SV2A のバンドを示す (Fig. 7A-B)。SV2A のバンドが胃幽門粘膜 (Fig. 7A) と脳 (Fig. 7B) で約 93 kDa に検出された。次いで免疫組織化学法を用いて SV2A の局在を検討した。H&E 染色により粘液細胞は胃幽門粘膜層の管腔側から約 1/3 から 1/2 に位置した (Fig. 7C、カラー附図)。SV2A は胃幽門腺粘液細胞の細胞質に局在することが確認された (Fig. 7D、カラー附図)。

3-5 ACh 刺激による $[Ca^{2+}]_i$ 変化に及ぼすレベチラセタムの効果

ACh (10 μ M) 刺激後にレベチラセタム処理をおこなった場合 (Fig. 8A) と ACh (10 μ M) 刺激前にレベチラセタム処理をおこなった場合 (Fig. 8B) では、 $[Ca^{2+}]_i$ に相違は認められなかった。このことからレベチラセタムは ACh 刺激に関係なく $[Ca^{2+}]_i$ に影響を与えないことが示唆された。

4. 考察

胃幽門腺粘液細胞 Ca^{2+} 調節性開口放出の初期相はプライミング顆粒数に依存している^{7,11,13)}。今回の結果から SV2A の特異的なリガンドであるレベチラセタムは Ca^{2+} 調節性開口放出の初期相を減少させ、8BrGMP によりプライミングが促進している条件下においても Ca^{2+} 調節性開口放出の初期相の減少は顕著であった。このことよりレベチラセタムがプライミング顆粒数を減少させることが示された。また、レベチラセタム処理前に 8BrGMP で処理した細胞では、レベチラセタムは Ca^{2+} 調節性開口放出の初期相に影響を及ぼさなかった。この結果はレベチラセタムがすでにプライミングされた顆粒数を減少させないことを示した。レベチラセタムの代わりに ATP 依存性のプライミングを阻害する DNP で処理した細胞でも同じ効果であることが報告されている¹³⁾。これらのことより、レベチラセタムはプライミングステップに影響を与えることが示された。

SV2A は ATP 結合性蛋白質であり、プライミングステップを調節する¹⁷⁻¹⁹⁾。さらに SV2A はすでにプライミングされた条件下にある顆粒には影響を与えないことが示されている¹⁸⁻¹⁹⁾。本研究において、SV2A は胃幽門腺粘液細胞に存在することを確認した。レベチラセタムは DNP 存在下において ACh 刺激性開口放出の遅発相を減少させなかった。次に ACh 刺激を 2 回行なった結果より、2 回目の ACh 刺激も初期相なしに遅発相のみ引き起こした。しかし、レベチラセタムを 2 回目の ACh 刺激前に処理することでさらに遅発相は減少した。この条件下では ATP は酸化的リン酸化から供給されていると考えられるため、これらの結果はレベチラセタムの作用が ATP 依存性であることを示唆している。さらに 2 回目の ACh 刺激前に 8BrGMP で処理した細胞においてもレベチラセタムは初期相を減少させた。レベチラセタムは SV2A を阻害することでシナプスにおいてプライミング顆粒の数を減少さ

せることが報告されている²⁹⁾。このことより、胃幽門腺粘液細胞においてもレベチラセタムは **SV2A** の阻害を介してプライミング顆粒数を減少させることで Ca^{2+} 調節性開口放出の初期相を減少させ、かつ、**8BrcGMP** による Ca^{2+} 調節性開口放出の初期相の増強も抑制すると推察された。

5. 結語

胃幽門腺粘液細胞において、レベチラセタムは **SV2A** の阻害を介してプライミング顆粒数を減少させることで **cGMP** により修飾された Ca^{2+} 調節性開口放出の初期相を減少させることが示された。

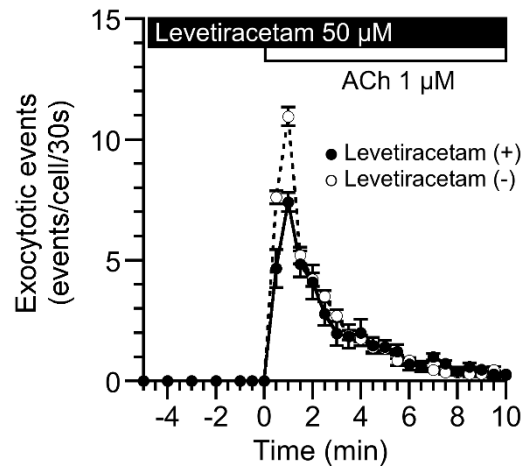


Fig. 3 Effects of levetiracetam (Lev) on the frequency of ACh-stimulated exocytotic events. ACh (1 μ M) increased the frequency of exocytotic events in antral mucous cells: an initial phase followed by a late phase. The addition of Lev decreased the frequency of the initial phase by 30%, but had little effect on the frequency of the late phase.

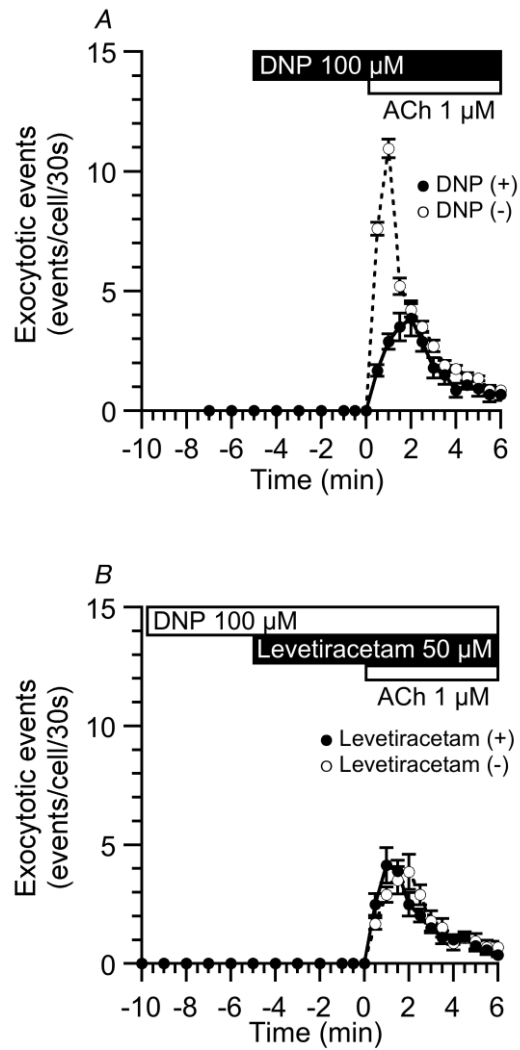


Fig. 4 Effects of levetiracetam (Lev) on the frequency of Ca^{2+} -regulated exocytotic events in the presence of DNP. A: DNP (100 μM) abolished the initial phase of Ca^{2+} -regulated exocytotic events in antral mucous cells stimulated with 1 μM ACh. B: In the presence of DNP, Lev did not induce a further decrease in the frequency of the exocytotic events in antral mucous cells stimulated with 1 μM ACh.

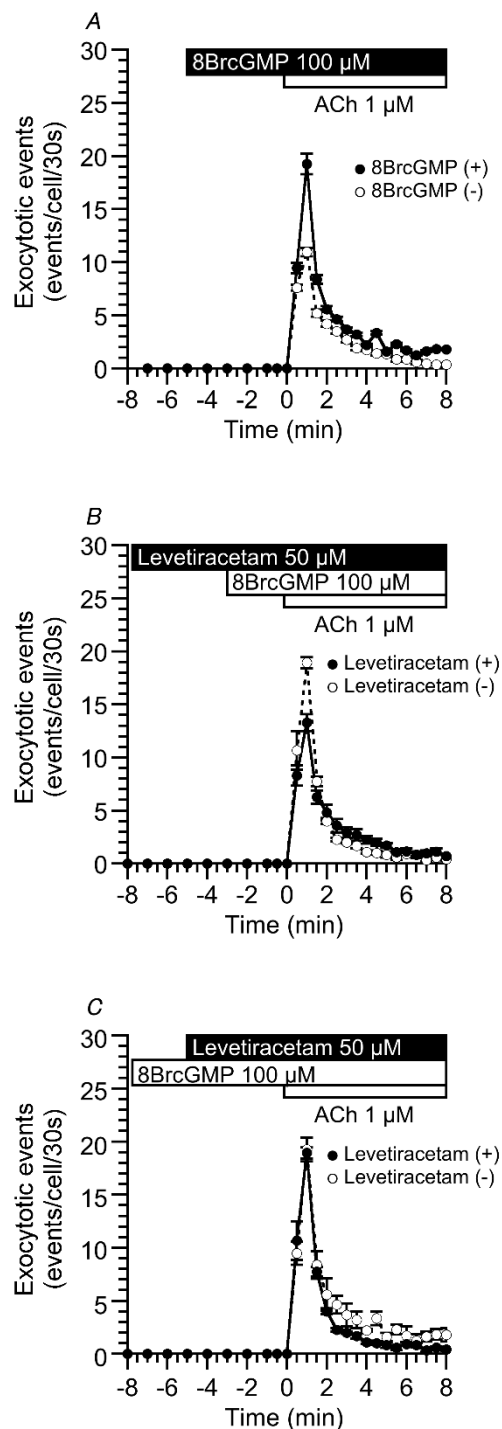


Fig. 5 Effects of levetiracetam (Lev) on the initial phase of Ca^{2+} -regulated exocytotic events activated by 1 μM ACh. A: The addition of 100 μM 8BrcGMP enhanced the frequency of the initial phase by 75% in antral mucous cells stimulated with 1 μM ACh. B: Lev added prior to the 8BrcGMP addition decreased the frequency of the 8BrcGMP-enhanced initial phase by 30%. C: Lev did not decrease the frequency of the 8BrcGMP-enhanced initial phase, when it was added after the 8BrcGMP addition.

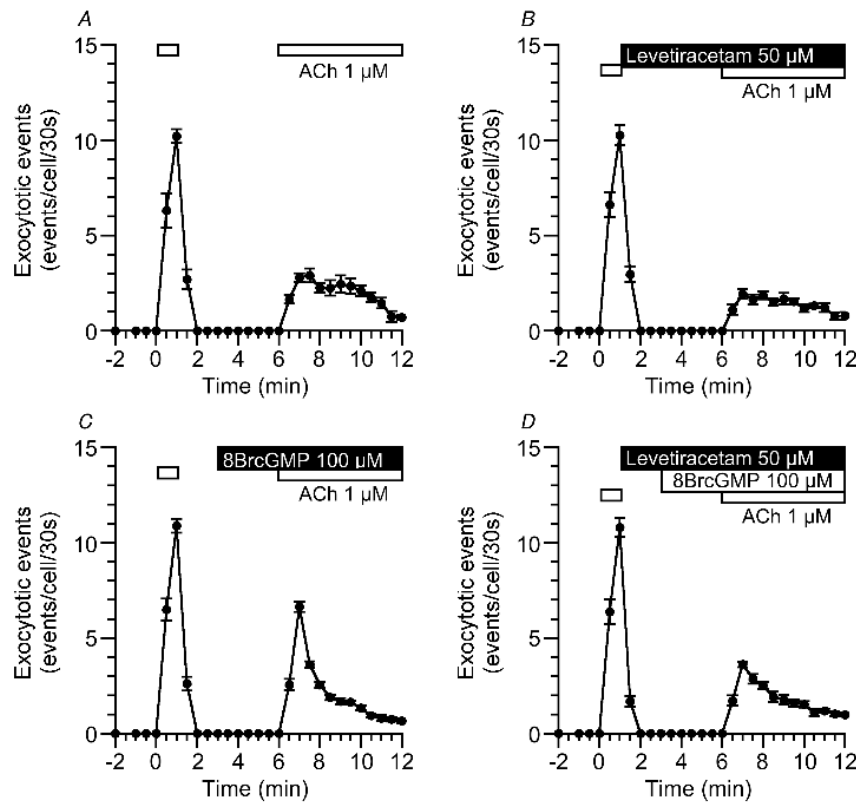


Fig. 6 Effects of levetiracetam (Lev) on the frequency of Ca^{2+} -regulated exocytotic events activated by the second stimulation of ACh. Cells were restimulated with ACh (1 μ M) after a brief recovery (5 min) from a brief ACh stimulation (1 min). The first ACh stimulation induced an initial phase. **A:** Control. After a brief recovery following the first ACh stimulation, the second ACh stimulation induced a gradual increase in the exocytotic events frequency with no initial phase. **B:** Lev added during a brief recovery following the first ACh stimulation. Upon adding Lev during a brief recovery, the second ACh stimulation induced a gradual increase in the exocytotic events frequency with no initial phase. The addition of Lev decreased the frequency of the late phase by 32% during the second ACh-stimulation in antral mucous cells. **C:** 8BrcGMP added during a brief recovery following the first ACh stimulation. Upon adding 8BrcGMP during a brief recovery, the second ACh stimulation induced an initial phase followed by a late phase. **D:** Lev and 8BrcGMP added during a brief recovery following the first ACh stimulation. Upon adding Lev and then Lev plus 8BrcGMP during a brief recovery, the second ACh stimulation induced a small initial phase followed by a late phase. The addition of Lev decreased the frequency of the 8BrcGMP-enhanced initial phase by 45%.

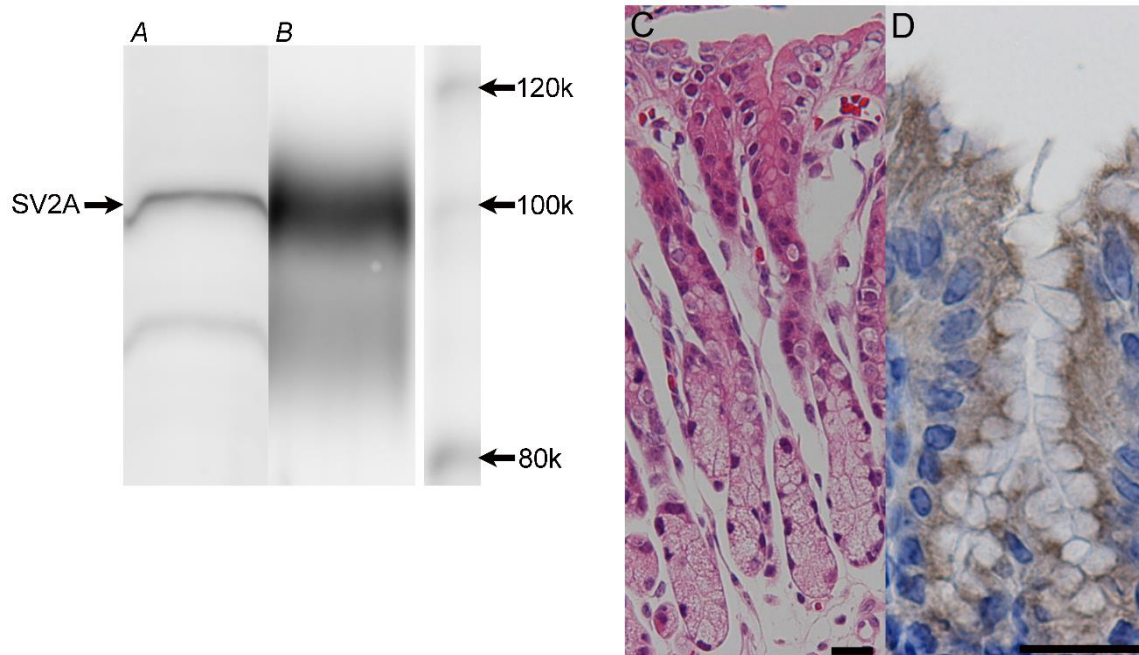


Fig. 7 Expression and localization of SV2A in the antral mucosae. A&B: Western blot analysis for SV2A. The SV2A band was detected in the antral mucosa at a molecular mass of approximately 93 kDa. (A) Antral mucosa. (B) Brain. C: H&E staining. D: Immunohistochemistry for SV2A. The antral mucous cells was immunopositively stained for SV2A. Scale bars represent 50 μ m (C&D).

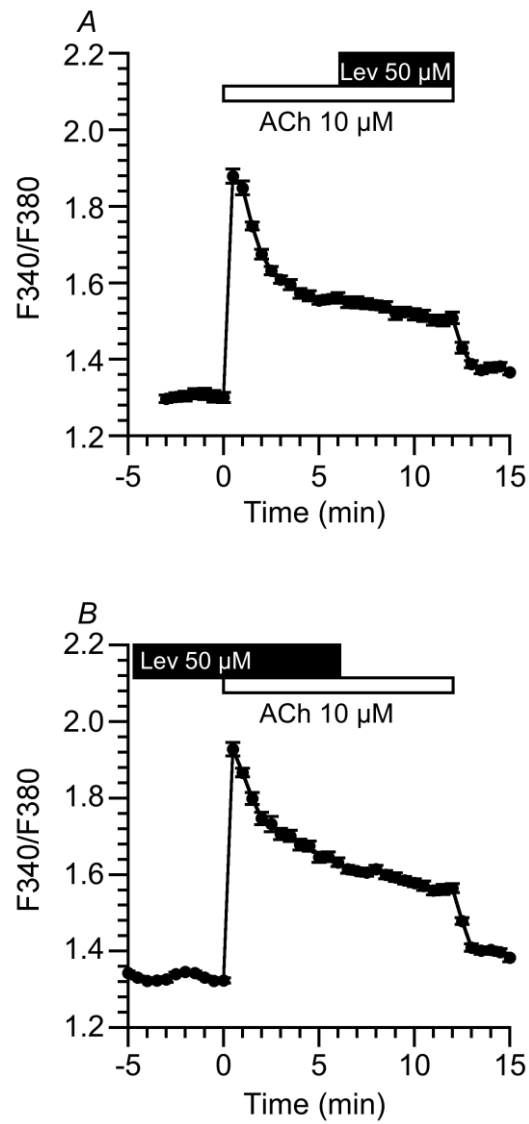


Fig. 8 Effects of levetiracetam (Lev) on ACh-stimulated increases in intracellular Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$). A: ACh increased the $[\text{Ca}^{2+}]_i$, and the further addition of Lev (50 μM) did not affect the ACh-stimulated $[\text{Ca}^{2+}]_i$ increase. B: The addition of Lev had no effects on the basal $[\text{Ca}^{2+}]_i$ and did not affect the ACh-stimulated $[\text{Ca}^{2+}]_i$ increase. The ACh concentration used was 10 μM .

第 1 章 Ca^{2+} 調節性開口放出の cGMP 修飾

第 2 節 Ca^{2+} 調節性開口放出に対する cGMP の役割：

PKG 阻害による PDE2 を介した cAMP の蓄積

1. 緒言

胃幽門腺粘液細胞において cGMP は Ca^{2+} 調節性開口放出の ATP 依存性プライミングを促進させることで初期相を増強する¹³⁾。第 1 節においても cGMP による Ca^{2+} 調節性開口放出の初期相の増強はプライミング顆粒数を減少させるレベチラセタムにより抑制されることを示した。次いで Ca^{2+} 調節性開口放出の初期相の増強に対する cGMP の役割を PKG 阻害薬である Rp8BrPETcGMPS を用いて検討した。Rp8BrPETcGMPS は 8-Bromo-cGMP (BrcGMP、細胞膜透過性のアナログ) によって引き起こされた Ca^{2+} 調節性開口放出の初期相の増強を消失させたが、遅発相において一過性の開口放出増加を引き起こした。すなわち、Rp8BrPETcGMPS により Ca^{2+} 調節性開口放出の初期相と遅発相において異なった開口放出頻度の結果が見られた。Rp8BrPETcGMPS による初期相の消失は Rp8BrPETcGMPS が PKG の阻害を介してプライミング顆粒数を減少させることで引き起こされた。

本節では胃幽門腺粘液細胞において Rp8BrPETcGMPS による PKG の阻害が cGMP により修飾された Ca^{2+} 調節性開口放出のプライミングに及ぼす効果について検討した。

2. 材料および方法

2-1 使用溶液および薬物

第 1 章第 1 節と同じ組成の溶液 I を使用した。また外液中の Ca^{2+} 濃度を下げる目的で Ca^{2+} -free 溶液を使用した。 Ca^{2+} -free 溶液の調製は溶液 I から CaCl_2 を取り除き 1 mM EGTA を加え Ca^{2+} を完全にキレートした。ACh (Daiichi Pharmaceuticals)、コラゲナーゼ (細胞分散用、180-220 U/mg、Wako Pure Chemical Industries)、BSA (Wako Pure Chemical Industries)、8-bromo-cGMP (8BrcGMP, Sigma) および guanosine 3', 5'-cyclic monophosphorothioate, β -phenyl-1, N²-etheno-8-bromo-, Rp-isomer, sodium salt (Rp8BrPETcGMPS, Sigma)、BAY-60-7550 (Biomol) および PKI-amide (Biomol) を用いた。ACh は超純水で溶解した。ACh 以外の薬物は DMSO で溶解し、DMSO の最終濃度が 0.1% を超えないように希釈した。

2-2 胃幽門腺粘液細胞の調製

第 1 章第 1 節と同じ調製法で行った。全ての実験は大阪医科大学動物実験規程に従って行った。

2-3 開口放出の観察

第 1 章第 1 節と同じ方法で行なった。ACh 刺激開始 1 分後を初期相頻度とし、ACh 刺激開始 4 分後を遅発相頻度とした。Rp8BrPETcGMPS および BAY-60-7550 を使用した実験では ACh 刺激開始 3～6 分の間で最も高い頻度を遅発相頻度とした。

2-4 ウェスタンブロット法

胃幽門粘膜および脳を RIPA buffer でホモジナイズし、遠心分離 (10,000 g、10 分) を行なった。その上清をタンパク量として 10 μ g のサンプルを用いた。7.5%のポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動させ、PVDF メンブレンに転写させた。メンブレンを 0.3%スキムミルクを含むリンス緩衝液でブロッキング処理 (室温、1 時間) を行なった。その後、1 次抗体として PDE2A 抗体 (OriGene Technologies) を 1:500 に希釈した後、室温において 1 時間反応させた。2 次抗体として Anti-mouse IgG-HRP (Santa Cruz Biotechnology) を 1:1,000 に希釈した後、室温において 1 時間反応させ、Chemi-Lumi One L (ナカライテスク、京都) を用いて発光させ、LAS-3000 (富士フイルム、東京) で解析を行った。

2-5 cGMP および cAMP の測定

コラゲナーゼ処理していない剥離胃幽門粘膜を混合ガス (95% O₂、5% CO₂) で飽和した溶液 I に入れ、薬剤を添加する前に 37°C、10 分間インキュベートした (コントロールインキュベーション)。cGMP の測定には、コントロールインキュベーション後、剥離胃幽門粘膜に DMSO (媒体コントロール)、ACh (1 μ M) を添加して、10 分間刺激した後、直ちに液体窒素中で凍結した後、-80°C で 24 時間凍結乾燥を行い、その後秤量した。cAMP の測定には、コントロールインキュベーション後、剥離胃幽門粘膜に DMSO、ACh (1 μ M)、Rp8BrPETcGMPS (500 nM) + ACh および BAY-60-7550 (100 nM) + ACh を添加して、1、5、10 分間刺激した後 (DMSO および BAY-60-7550 + ACh は 10 分間刺激のみ)、直ちに液体窒素中で凍結した後、-80°C で 24 時間凍結乾燥を行い、その後秤量した。試料は cGMP EIA kit (Amersham International, Little Chalfont) および cAMP EIA kit (Cayman Chemical, Michigan) を用い、定量した。cGMP は pmoles/g-dry tissue weight、cAMP は pmoles/mg-dry tissue weight で表した。

2-6 組織化学染色法

ホルマリン固定した胃幽門粘膜をパラフィン包埋し、切片を作製した。切片はウェスタンブロット法で使用した PDE2A 抗体を用いて染色し、光学顕微鏡で観察を行った。

2-7 細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) の測定

第 1 章第 1 節と同じ方法で行なった。

2-8 統計学的処理

実験結果は平均値 \pm 標準誤差で示した。各実験群の初期相頻度の大きさを比較するときの有意差検討は Student's t 検定を用いた。遅発相における一過性の開口放出増加を比較するときの有意差検討では、ACh 刺激開始 2.5 あるいは 3 分後の遅発相頻度（一過性の開口放出増加開始直前）と ACh 刺激開始 3~7 分後に見られる一過性の遅発相頻度の増加について ANOVA 検定を用いて比較した。その他の有意差検討は、必要に応じて Student's t 検定、unpaired t 検定あるいは ANOVA 検定を用いた。以上の検定において $P < 0.05$ のとき有意差ありと判定した。

3. 結果

3-1 ACh 刺激による胃幽門粘膜中の cGMP 含量

DMSO と ACh ($1 \mu\text{M}$) 刺激による剥離胃幽門粘膜中の cGMP 含量を示す (Fig. 9)。DMSO 刺激による剥離胃幽門粘膜中の cGMP 含量は $6.7 \pm 0.1 \text{ pmol/g-dry tissue weight}$ であった。ACh 刺激による剥離胃幽門粘膜中の cGMP 含量は $12.2 \pm 2.4 \text{ pmol/g-dry tissue weight}$ であり、DMSO 刺激よりも約 2 倍と有意に増加した。このことから、胃幽門粘膜において ACh 刺激は cGMP を蓄積することが示された。

3-2 Ca^{2+} 調節性開口放出における cGMP の効果

胃幽門腺粘液細胞において、非刺激時では開口放出が観察されなかった。ACh ($1 \mu\text{M}$) 単独刺激開始直後より開口放出頻度は速やかに上昇し、ACh 刺激開始 1 分後における初期相頻度は $10.0 \pm 0.9 \text{ events/cell/30s}$ となり、その後開口放出頻度はゆるやかに減少し、ACh 刺激開始 4 分後における遅発相頻度は $1.7 \pm 0.2 \text{ events/cell/30s}$ であった (opened circle in Fig. 10A)。

まず Ca^{2+} 調節性開口放出における 8-Bromo-cGMP (8BrcGMP、細胞膜透過性の cGMP アナログ、 $100 \mu\text{M}$) の効果について検討した。8BrcGMP で 3 分間刺激した後、ACh 刺激を行った (closed circle in Fig. 10A)。8BrcGMP は Ca^{2+} 調節性開口放出の初期相を有意に増強 ($18.1 \pm 0.7 \text{ events/cell/30s}$) させ、その後ゆるやかに減少 (遅発相頻度: $1.8 \pm 0.1 \text{ events/cell/30s}$) させた。次いで、8BrcGMP によって増強した Ca^{2+} 調節性開口放出における PKG 阻害薬 (Rp8BrPETcGMPS、 500 nM) の効果について検討した。Rp8BrPETcGMPS で 5 分間処理し、次に Rp8BrPETcGMPS と 8BrcGMP で 3 分間処理した後、ACh 刺激を行

った (Fig. 10B)。Rp8BrPETcGMPS 存在下、8BrcGMP は Ca^{2+} 調節性開口放出の初期相を増強せず、ACh 単独刺激によって上昇した初期相よりもさらに 66% に減少 (6.6 ± 0.3 events/cell/30s) させた。この結果は Fig. 9 において示された結果、すなわち ACh 刺激が cGMP を蓄積させることから、この cGMP の蓄積が Ca^{2+} 調節性開口放出の初期相を増強したと考えられた。一方、Rp8BrPETcGMPS は遅発相で一過性の開口放出増加 (2.9 ± 0.3 events/cell/30s、ACh 刺激開始 4.5 分後) を引き起こした。

3-3 Ca^{2+} 調節性開口放出における Rp8BrPETcGMPS (PKG 阻害薬) の効果

Figure 11A は ACh 刺激前に Rp8BrPETcGMPS (500 nM) で 5 分間処理した時の開口放出反応を示す。Rp8BrPETcGMPS は Ca^{2+} 調節性開口放出の初期相を 30% 減少 (6.9 ± 0.2 events/cell/30s) させたが、遅発相において一過性の開口放出増加 (3.1 ± 0.6 events/cell/30s) を引き起こした。ここで、Rp8BrPETcGMPS は ACh 刺激前に処理されたにもかかわらず、Rp8BrPETcGMPS によって引き起こされる一過性の開口放出増加は初期相ではなく遅発相において確認された。cAMP はプライミングとフュージョンを促進し、遅発相維持に働いていることが示されている⁷⁻⁸⁾ことから、一過性の開口放出増加は Rp8BrPETcGMPS の非常に早い効果ではなくて、Rp8BrPETcGMPS による cAMP の蓄積効果が原因であると考えられた。次に Rp8BrPETcGMPS による cAMP の蓄積効果を検討するために、ACh 刺激開始 4 分後に Rp8BrPETcGMPS で処理した (Fig. 11B)。Rp8BrPETcGMPS を加えると、直ぐさま開口放出が増加し、Rp8BrPETcGMPS 処理 1 分後の遅発相の頻度は 3.2 ± 0.4 events/cell/30s であった。すなわち、一過性の開口放出増加は Rp8BrPETcGMPS による cAMP の蓄積効果が原因ではないことが示された。

一方、 Ca^{2+} -free 溶液中で ACh 単独刺激性開口放出における Rp8BrPETcGMPS の効果について検討した。ACh 刺激は遅発相をもたず、初期相においてわずかな一過性の開口放出増加を引き起こした (3.8 ± 0.4 events/cell/30s; opened circle in Fig. 11C)。Rp8BrPETcGMPS で前処理すると遅発相をもたず、初期相においてわずかに一過性の開口放出増加を減少させた (2.9 ± 0.6 events/cell/30s; closed circle in Fig. 11C)。これらの結果より、遅発相における Rp8BrPETcGMPS の効果 (一過性の開口放出の増加) には $[\text{Ca}^{2+}]_i$ が必要であることが示された。

3-4 Ca^{2+} 調節性開口放出における PKI-amide (PKA 阻害薬) の効果

Rp8BrPETcGMPS (PKG 阻害薬) が cAMP を介して作用するの可否を確認するために、Rp8BrPETcGMPS で処理した Ca^{2+} 調節性開口放出における PKA 阻害薬 (PKI-amide, 1 μM) の効果について検討した。ACh 刺激前に PKI-amide で 5 分間処理し、その後 Rp8BrPETcGMPS

を加えてさらに 5 分間処理した (Fig. 12A)。PKI-amide は遅発相において Rp8BrPETcGMPS により引き起こされた一過性の開口放出増加を消失 (0.8 ± 0.2 events/cell/30s) させた。次いで、PKI-amide 存在下で ACh 刺激開始 4 分後に Rp8BrPETcGMPS を加えた (Fig. 12B)。PKI-amide は Rp8BrPETcGMPS により引き起こされた遅発相での一過性の開口放出増加を消失 (1.7 ± 0.3 events/cell/30s) させた。このことから、Rp8BrPETcGMPS は cAMP を蓄積することによって、遅発相で一過性の開口放出増加を引き起こすことが示唆された。

3-5 Ca^{2+} 調節性開口放出における BAY-60-7550 (PDE2 阻害薬) の効果

多くの細胞において cGMP および cAMP の蓄積は phosphodiesterases (PDEs) により調節されている^{32,33)}。その中でも PDE2 (cGMP-dependent PDE2) は cAMP を分解する酵素である³⁴⁻³⁶⁾。そこで、Rp8BrPETcGMPS (PKG 阻害薬) が PDE2 による cAMP の分解を阻害するか否かを確認するために、 Ca^{2+} 調節性開口放出における PDE2 阻害薬 (BAY-60-7550、100 nM) の効果について検討した。ACh 刺激前に BAY-60-7550 で 5 分間処理したところ、BAY-60-7550 は遅発相において一過性の開口放出増加 (4.2 ± 0.5 events/cell/30s) を引き起こした (Fig. 13A)。次いで、ACh 刺激開始 4 分後に BAY-60-7550 を加えた (Fig. 13B)。BAY-60-7550 を加えると、開口放出の頻度を増加 (3.8 ± 0.4 events/cell/30s、BAY-60-7550 処理 1.5 分後) させた。すなわち BAY-60-7550 による開口放出の効果 (遅発相の一過性の増加) は Rp8BrPETcGMPS による開口放出の効果と同様であった。

3-6 胃幽門粘膜中の cAMP 含量

Figure 14 は剥離胃幽門粘膜中の cAMP 含量の変化を示す。ACh 単独刺激では剥離胃幽門粘膜中の cAMP 含量はほとんど変化しなかった。ACh 刺激前の cAMP 含量は 9.9 ± 0.8 pmol/mg-dry tissue weight であり、ACh 刺激開始 1、5 および 10 分後の cAMP 含量はそれぞれ 11.6 ± 1.3 、 11.1 ± 1.6 および 9.3 ± 0.3 pmol/mg-dry tissue weight であった。しかしながら、Rp8BrPETcGMPS (PKG 阻害薬) + ACh による刺激は剥離胃幽門粘膜中の cAMP 含量を徐々に増加し、1 分後では有意に増加しなかったが、5 分以内に定常相に達し、5 および 10 分後では有意に増加した。刺激前の cAMP 含量は 9.7 ± 1.9 pmol/mg-dry tissue weight であり、刺激開始 1、5 および 10 分後の cAMP 含量はそれぞれ 12.7 ± 0.9 、 17.7 ± 1.6 および 17.1 ± 1.5 pmol/mg-dry tissue weight であった。さらに BAY-60-7550 (PDE2 阻害薬) + ACh による刺激でも剥離胃幽門粘膜中の cAMP 含量を 17.3 ± 2.3 pmol/mg-dry tissue weight まで有意に増加した (刺激 10 分後)。

3-7 胃幽門粘膜における PDE2A の発現と局在

ウエスタンブロット法における胃幽門粘膜および脳での PDE2A のバンドを示す (Fig. 15A-B)。PDE2A のバンドが胃幽門粘膜 (Fig. 15A) と脳 (Fig. 15B) で約 105 kDa に検出された。次いで PDE2A の局在を免疫組織化学法により検討した。PDE2A は胃幽門腺粘液細胞の細胞質に局在することが確認された (Fig. 15C、カラー附図)。

3-8 ACh 刺激による $[Ca^{2+}]_i$ 変化に及ぼす Rp8BrPETcGMPS の効果

ACh 刺激後に Rp8BrPETcGMPS 処理をおこなった場合 (Fig. 16A) と ACh 刺激前に Rp8BrPETcGMPS 処理をおこなった場合 (Fig. 16B) では、 $[Ca^{2+}]_i$ に相違は認められなかった。このことから Rp8BrPETcGMPS は ACh 刺激に関係なく $[Ca^{2+}]_i$ に影響を与えないことが示された。

4. 考察

ACh (1 μ M) による刺激は cGMP を蓄積し、さらに PKG 阻害薬である Rp8BrPETcGMPS は 8BrcGMP による Ca^{2+} 調節性開口放出の初期相の増強を消失させた。この Rp8BrPETcGMPS により消失した初期相は ACh 単独刺激による開口放出の初期相より小さかった。この結果より、ACh 刺激による cGMP の蓄積は胃幽門腺粘液細胞 Ca^{2+} 調節性開口放出の初期相を維持するために重要な役割を果たしていると考えられた。

次に PKG を阻害した時の Ca^{2+} 調節性開口放出に対する効果について検討するために PKG 阻害薬 (Rp8BrPETcGMPS) を用いた。Rp8BrPETcGMPS は Ca^{2+} 調節性開口放出の遅発相において一過性の開口放出増加を引き起こした。cGMP はプライミングされた顆粒数を増加させることによって Ca^{2+} 調節性開口放出の初期相を増強する¹³⁾。このことは Rp8BrPETcGMPS がプライミングされた顆粒数を減少させることを示している。一方で、PKA 阻害薬である PKI-amide は Rp8BrPETcGMPS によって引き起こされた遅発相における一過性の開口放出増加を消失させた。このことは胃幽門腺粘液細胞において Rp8BrPETcGMPS が cAMP を蓄積させることが考えられる。胃幽門腺粘液細胞において cAMP の蓄積はプライミングとフュージョンの両ステップを促進させる⁷⁾ことから cAMP の蓄積は遅発相において一過性の開口放出増加を引き起こすことが示唆された。

ウエスタンブロット法および免疫組織化学法より PDE2A が胃幽門腺粘液細胞に局在することを示した。PDE2 阻害薬である BAY-60-7550 は Rp8BrPETcGMPS と同様に遅発相において一過性の開口放出増加を引き起こした。さらに BAY-60-7550 は Rp8BrPETcGMPS と同様に ACh 刺激による胃幽門粘膜において cAMP の分解を阻害することで cAMP の蓄積を増加した。このことより胃幽門腺粘液細胞において Rp8BrPETcGMPS は PKG を阻害することで PDE2 の活性を抑え、cAMP 分解を抑制するため cAMP を蓄積すると推測した。この

cAMP の蓄積が遅発相において一過性の開口放出増加を引き起こすと考えられる。耳下腺細胞においても同様に PDE2 が cAMP の蓄積を調節することが報告されている³⁵⁾。

5. 結語

本研究結果より、胃幽門腺粘液細胞において Rp8BrPETcGMPS (PKG 阻害薬) はプライミングされた顆粒数を減少させることで初期相を抑制した。一方で PKG の阻害は PDE2 の阻害を介し cAMP の蓄積を引き起こした。この cAMP の蓄積が Ca^{2+} 調節性開口放出の遅発相で一過性の開口放出増加を引き起こした。このように PKG を抑制することは胃幽門腺粘液細胞 Ca^{2+} 調節性開口放出の初期相と遅発相において二つの特徴的な反応を引き起こすことを示した。

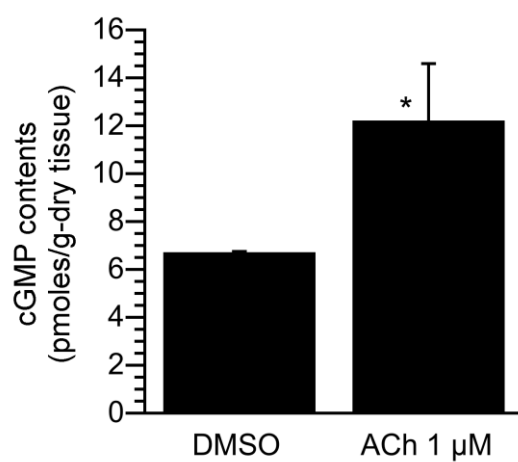


Fig. 9 cGMP contents in the antral mucosae. The antral mucosae were incubated in the *solution I* (10 ml). Next, they were incubated with dimethyl sulfoxide (DMSO, vehicle control) or stimulated with acetylcholine (ACh, 1 µM) for 10 min. Stimulation with ACh increased cGMP content roughly double in the antral mucosae. * $P < 0.05$: Significantly different from the vehicle control values.

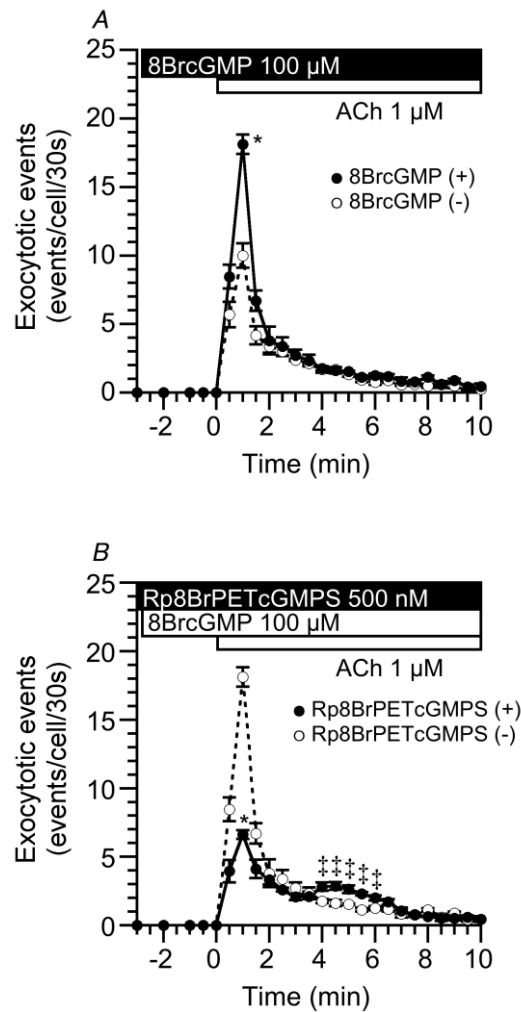


Fig. 10 Effects of cGMP on the frequency of ACh-stimulated exocytotic events. ACh (1 μ M) increased the frequency of exocytotic events in antral mucous cells: an initial phase followed by a late phase. A: The addition of 8BrcGMP (100 μ M) increased the frequency of the initial phase by 80% in ACh-stimulated antral mucous cells. B: In the presence of Rp8BrPETcGMPS (PKG inhibitor, 500 nM), 8BrcGMP did not enhance the initial phase. The frequency of the initial phase decreased by 66%. The frequency of the initial phase was lower in the presence of Rp8BrPETcGMPS than that in the absence of Rp8BrPETcGMPS. However, the addition of Rp8BrPETcGMPS induced the delayed, but transient, increase in the late phase in the exocytotic events stimulation by 8BrcGMP plus ACh. * $P < 0.05$: Significantly different from the corresponding values. ‡ $P < 0.05$: Significantly different from the value at 3.5 min from the start of ACh stimulation.

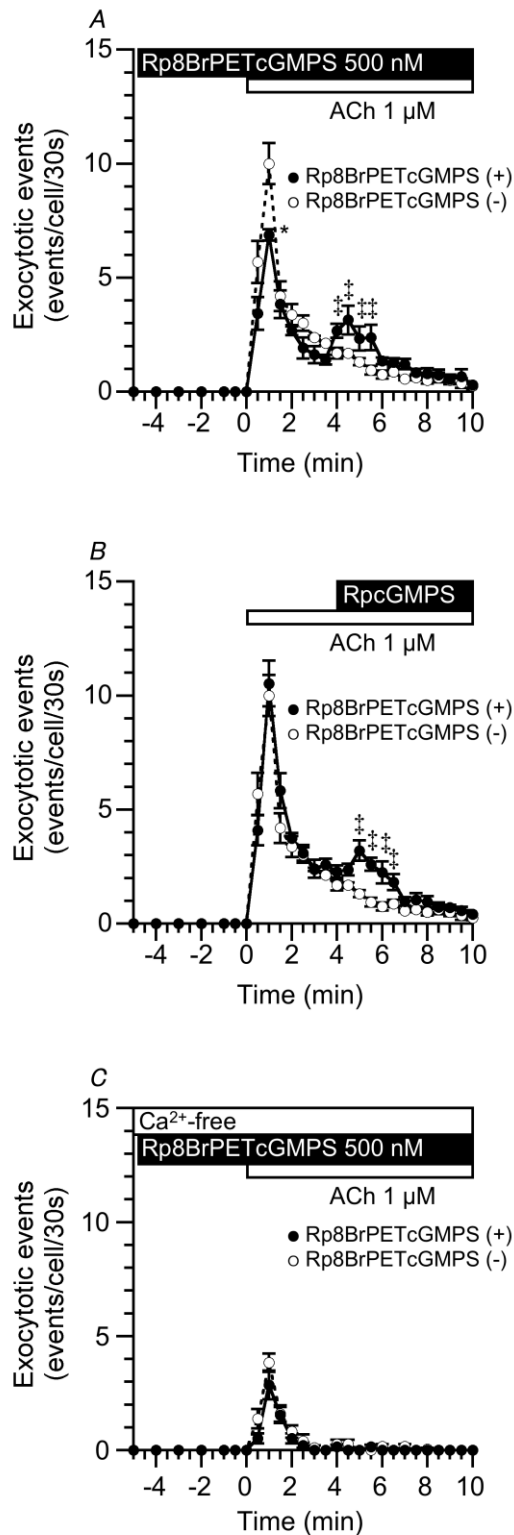


Fig. 11 Effects of a PKG inhibitor (Rp8BrPETcGMPS) on the frequency of ACh-stimulated exocytotic events. A: Rp8BrPETcGMPS (500 nM) decreased the frequency of the initial phase by 30%, but induced the delayed, but transient, increase in the late phase in the exocytotic events stimulated by ACh alone. B: The addition of Rp8BrPETcGMPS in the late phase immediately increased the frequency of the exocytotic events. C: In a Ca²⁺-free solution, stimulation with ACh induced a small transient increase in the frequency of the initial phase without any late phase. The pretreatment of Rp8BrPETcGMPS slightly decreased the frequency of the initial phase, but did not induce any delayed transient increase in the frequency of the late phase. * $P < 0.05$: Significantly different from the corresponding values. ‡ $P < 0.05$: Significantly different from the value at 3.5 min (Fig. 3A) or 4.5 min (Fig. 3B) from the start of ACh stimulation. In B, Rp8BrPETcGMPS is shown as “RpcGMPS.”

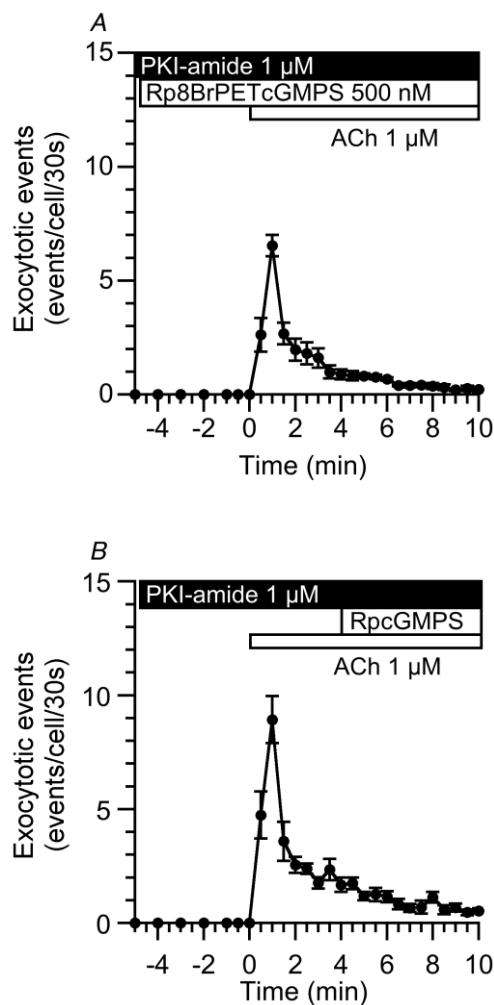


Fig. 12 Effects of a PKA inhibitor (PKI-amide) on the frequency of ACh-stimulated exocytotic events. A: In the presence of PKI-amide (1 μ M), stimulation with Rp8BrPETcGMPS plus ACh induced a biphasic increase in the frequency of exocytotic events. PKI-amide had little effect on the frequency of the initial phase decreased by Rp8BrPETcGMPS, but abolished the delayed, but transient, increase of the late phase. B: In the presence of PKI-amide, the addition of Rp8BrPETcGMPS in the late phase did not increase the frequency of ACh-stimulated exocytotic events. In B, Rp8BrPETcGMPS is shown as “RpcGMPS.”

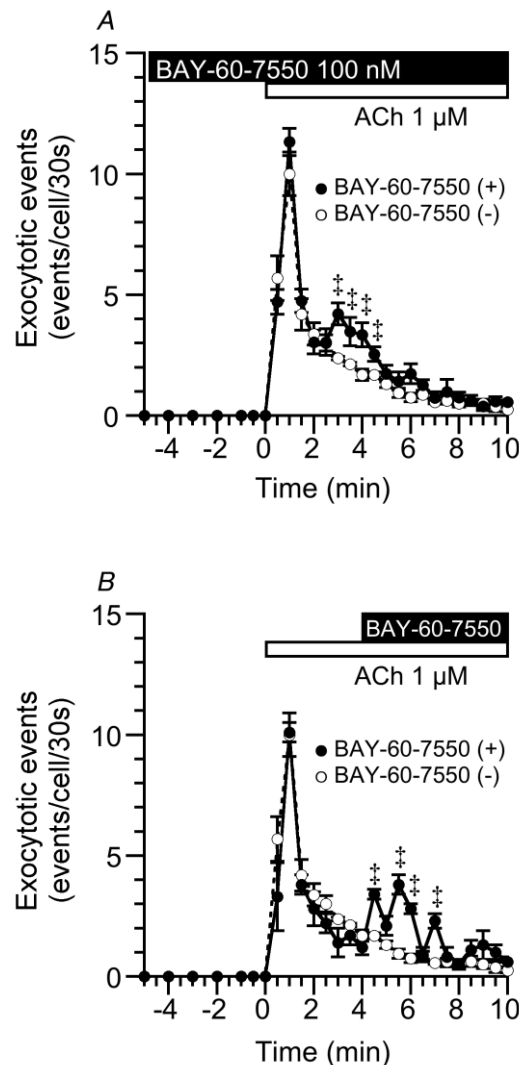


Fig. 13 Effects of a phosphodiesterase (PDE) 2 inhibitor (BAY-60-7550) on the frequency of ACh-stimulated exocytotic events. A: In the presence of BAY-60-7550 (100 nM), ACh increased the frequency of the initial phase, but induced the delayed, but transient, increase in the frequency of the late phase. B: BAY-60-7550 added in the late phase increased the frequency of exocytotic events immediately. The delayed, but transient, increase in the frequency of the late phase induced by BAY-60-7550 is similar to that induced by Rp8BrPETcGMPS. * $P < 0.05$: Significantly different from the corresponding values. ‡ $P < 0.05$: Significantly different from the value at 2.5 min (Fig. 13A) or 4 min (Fig. 13B) from the start of ACh stimulation, respectively.

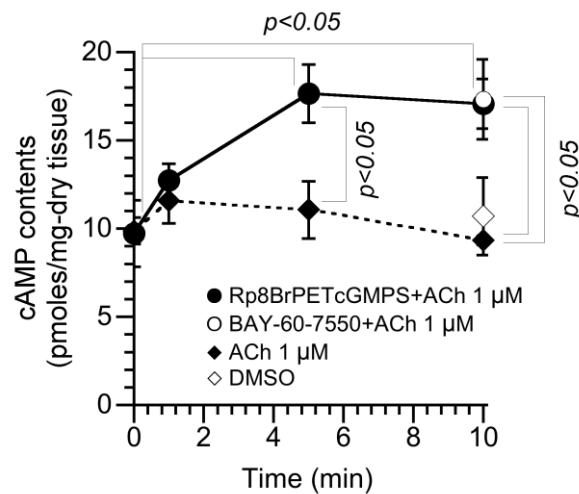


Fig. 14 Change in cAMP content in the antral mucosae. Stimulation with ACh (1 μ M) alone induced little changes in the cAMP contents of the stripped antral mucosae. The addition of Rp8BrPETcGMPS (500 nM) plus ACh gradually increased the cAMP contents of the stripped antral mucosae and plateaued within 5 min. Rp8BrPETcGMPS plus ACh increased by 73% at 5 min, although it did not at 1 min. The addition of BAY-60-7550 (100 nM) plus ACh, instead of Rp8BrPETcGMPS plus ACh, also increased the cAMP contents of the stripped antral mucosae. The addition of dimethyl sulfoxide (DMSO, vehicle control) did not increase cAMP contents of the stripped antral mucosae. $P < 0.05$: Significantly different from the corresponding values.

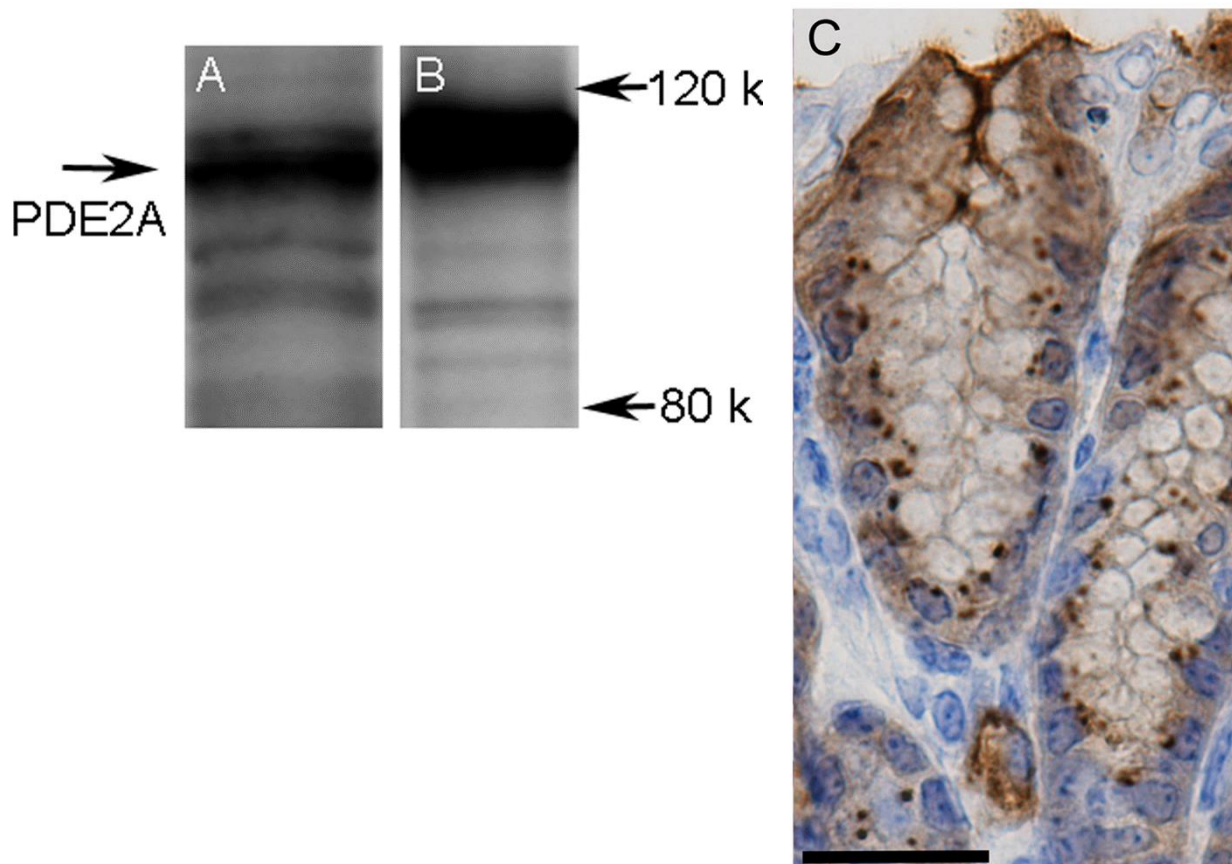


Fig. 15 Expression and localization of PDE2A in the antral mucosae. A&B: Western blot analysis for PDE2A. The PDE2A band was detected in the antral mucosa at a molecular mass of approximately 105 kDa. (A) Antral mucosa. (B) Brain. C: Immunohistochemistry for PDE2A. The cytoplasm of antral mucous cells was immunopositively stained for PDE2A. Scale bars represent 50 µm (C).

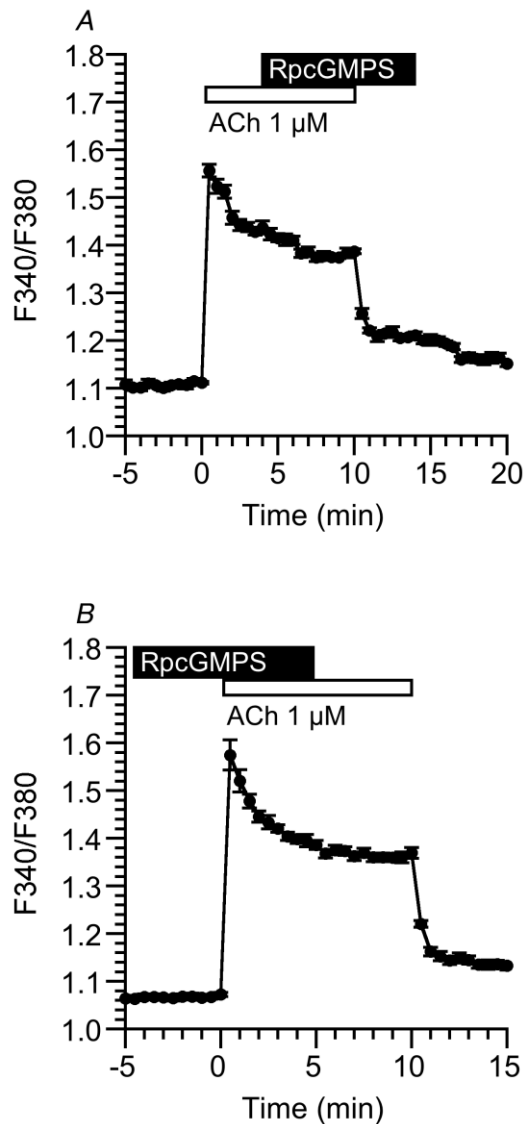


Fig. 16 Effects of a PKG inhibitor (Rp8BrPETcGMPS) on ACh-stimulated increases in intracellular Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$). A: ACh (1 μ M) immediately increased $[\text{Ca}^{2+}]_i$ and then decreased to a plateau within 3 min. The further addition of Rp8BrPETcGMPS (500 nM) did not affect ACh-stimulated increases in $[\text{Ca}^{2+}]_i$. The cessation of ACh stimulation immediately decreased $[\text{Ca}^{2+}]_i$. B: The addition of Rp8BrPETcGMPS did not increase $[\text{Ca}^{2+}]_i$ and then stimulation with ACh immediately increased $[\text{Ca}^{2+}]_i$ and then decreased to a plateau within 3 min after addition of ACh. Increases in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ stimulated by Rp8BrPETcGMPS plus ACh were similar to those stimulated by ACh alone. In A and B, Rp8BrPETcGMPS is shown as “Rp8BrPETcGMPS.”

第 2 章 PPAR α を介した Ca²⁺調節性開口放出の増強機構：NO/cGMP 経路の活性化

第 1 節 PPAR α オートクリン機構による Ca²⁺調節性開口放出の増強：

NOS1/NO/cGMP の蓄積

1. 緒言

第 1 章では SV2A 抑制がプライミング顆粒数を減少させることで cGMP 修飾による Ca²⁺調節性開口放出の初期相の増強を抑制した。このことは cGMP が胃幽門腺粘液細胞 Ca²⁺調節性開口放出における ATP 依存性プライミングをターゲットにしていると推察された。また、PKG を阻害することは Ca²⁺調節性開口放出の初期相の抑制と遅発相における一過性の開口放出増加という二つの特徴的な反応を引き起こすことを明らかにした。

一方で、cGMP を蓄積する物質として NO が知られているが²⁰⁻²²⁾、胃幽門腺粘液細胞において NO/cGMP シグナルを活性化する経路は明らかではない。

胃幽門腺粘液細胞において、アラキドン酸と PPAR α の活性化は Ca²⁺調節性開口放出の初期相を増強させることが明らかにされている¹⁴⁾。血管内皮細胞あるいは心筋細胞では PPARs が NO 産生を活性化させること²³⁻²⁷⁾、またアラキドン酸が血管平滑筋細胞において NO 産生を活性化させることも報告されている²⁸⁾。これらの報告より、胃幽門腺粘液細胞においても PPAR α が NO を産生している可能性が考えられる。

本節では、胃幽門腺粘液細胞において、PPAR α オートクリン機構により Ca²⁺調節性開口放出が増強される機構について検討した。

2. 材料および方法

2-1 使用溶液および薬物

第 1 章第 1 節と同じ組成の溶液 I を使用した。ACh (Daiichi Pharmaceuticals)、コラゲナーゼ (細胞分散用、180-220 U/mg、Wako Pure Chemical Industries)、BSA (Wako Pure Chemical Industries)、アラキドン酸 (Wako Pure Chemical Industries)、arachidonyl trifluoromethyl ketone (AACOCF₃, Wako Pure Chemical Industries)、L-アルギニン (Wako Pure Chemical Industries)、N-((2S)-2-(((1Z)-1-Methyl-3-oxo-3-(4-(trifluoromethyl)phenyl)prop-1-enyl)amino)-3-(4-(2-(5-methyl-2-phenyl-1,3-oxazol-4-yl)ethoxy)phenyl)propyl)propanamide (GW6471, Tocris)、2-[[4-[2-[[[(Cyclohexylamino)-carbonyl](4-cyclohexylbutyl)amino]ethyl]phenyl]thio]-2-methylpropanoic acid (GW7647, Tocris)、NG-nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride (L-NAME, Wako Pure Chemical Industries)、N⁵-[Imino(propylamino)methyl]-L-ornithine hydrochloride (N-PLA, Tocris)、N-(3-aminomethyl)benzyl acetamidine, 2HCl (1400W, Wako Pure Chemical Industries)、N⁵-(1-iminoethyl)-L-ornithine dihydrochloride (LN5-OD, Tocris)、

1-Hydroxy-2-oxo-3-(*N*-ethyl-2-aminoethyl)-3-ethyl-1-triazene (NOC12, Dojindo)、8-bromo-cGMP (8BrcGMP, Sigma) および guanosine 3', 5'-cyclic monophosphorothioate, β -phenyl-1, N^2 -etheno-8-bromo-, Rp-isomer, sodium salt (Rp8BrPETcGMPS, Sigma) を用いた。ACh は超純水で溶解した。ACh 以外の薬物は DMSO で溶解し、DMSO の最終濃度が 0.1% を超えないように希釈した。

2-2 胃幽門腺粘液細胞の調製

第 1 章第 1 節と同じ調製法で行った。全ての実験は大阪医科大学動物実験規程に従って行った。

2-3 開口放出の観察

第 1 章第 1 節と同じ方法で行なった。ACh 刺激開始 1 分後を初期相頻度とし、ACh 刺激開始 4 分後を遅発相頻度とした。GW6471、Rp8BrPETcGMPS、L-NAME および N-PLA を使用した実験では ACh 刺激開始 4~5 分の間で最も高い頻度を遅発相頻度とした。

2-4 ウェスタンブロット法

胃幽門粘膜を RIPA buffer でホモジナイズし、遠心分離 (10,000 g、10 分) を行なった。その上清をタンパク量として 10 μ g のサンプルを用いた。NOS 抗体を使用した時は 7.5% のポリアクリルアミドゲル、PPAR α 抗体を使用した時は 10% のポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動させ、PVDF メンブレンに転写させた。メンブレンを Blocking One でブロッキング処理 (室温、30 分) を行なった。その後、1 次抗体として NOS1 抗体 (LifeSpan BioSciences)、NOS2 抗体 (Millipore)、NOS3 抗体 (Millipore) および PPAR α 抗体 (LifeSpan BioSciences) をそれぞれ 1:500、1:1,000、1:1,000 および 1:500 に希釈した後、4°C 下で一晩反応させた。翌日、2 次抗体として Anti-rabbit IgG-HRP (Santa Cruz Biotechnology) を 1:1,000 (NOS1)、1:5,000 (NOS2)、1:5,000 (NOS3) および 1:1,000 (PPAR α) に希釈した後、室温において 1 時間反応させ、EzWest Lumi plus (ATTO) を用いて発光させ、LAS-3000 (富士フイルム) で解析を行った。

2-5 NO および cGMP の測定

コラゲナーゼ処理していない剥離胃幽門粘膜を秤量した後、混合ガス (95% O₂、5% CO₂) で飽和した溶液 I (5 mL) に入れ、薬剤を加える前に 37°C、10 分間インキュベートした。NO の測定において、コントロール群では、剥離胃幽門粘膜に DMSO (媒体コントロール) を添加して、2 および 10 分間インキュベートした。刺激薬を添加した群では、剥離胃幽門

粘膜に ACh (1 μ M)、GW7647 (50 nM)、GW7647 + ACh、AACOCF₃ (1 μ M) あるいは AACOCF₃ + ACh を添加し、2 および 10 分間刺激した後、NO 測定用に培養上清を直ちに氷上で保管した後、-30°C で保管した。阻害薬 (GW6471 および N-PLA) を添加した群では、阻害薬で 10 分間インキュベートした後、DMSO、ACh (1 μ M)、GW7647 (50 nM)、GW7647 + ACh、AACOCF₃ (1 μ M) あるいは AACOCF₃ + ACh を添加して、10 分間刺激した後、NO 測定用に培養上清を直ちに氷上で保管した後、-30°C で保管した。cGMP の測定において、コントロール群では、剥離胃幽門粘膜に DMSO (媒体コントロール) を添加して、10 分間インキュベートした。刺激薬を添加した群では、剥離胃幽門粘膜に ACh (1 μ M)、GW7647 (50 nM)、GW7647 + ACh、AACOCF₃ (1 μ M)、AACOCF₃ + ACh あるいは NOC12 (500 μ M) を添加し、10 分間刺激した後、直ちに液体窒素中で凍結した後、-80°C で 24 時間凍結乾燥を行い、その後秤量した。阻害薬 (GW6471 および N-PLA) を添加した群では、阻害薬で 10 分間インキュベーションした後、DMSO、ACh (1 μ M)、GW7647 (50 nM)、GW7647 + ACh、AACOCF₃ (1 μ M) あるいは AACOCF₃ + ACh を添加して、10 分間刺激した後、直ちに液体窒素中で凍結した後、-80°C で 24 時間凍結乾燥を行い、その後秤量した。試料は nitrate/nitrite fluorometric assay kit (Cayman Chemical Company) および cGMP EIA kit (Cayman Chemical Company) を用い、定量した。NO は nmoles/g-wet tissue weight、cGMP は pmoles/g-dry tissue weight で表した。

2-6 組織化学染色法

ホルマリン固定した胃幽門粘膜をパラフィン包埋し、各切片を作製した。各切片は periodic acid-Schiff (PAS) あるいは 4'-6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) で染色した。他の切片は PPAR α 抗体 (LifeSpan BioSciences) を用いて 1 時間、NOS1 抗体 (LifeSpan BioSciences) を用いて 1 時間反応させた。その後、Goat anti-Mouse IgG (H+L) Secondary Antibody (Alexa Fluor 488 conjugate, Invitrogen) および Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Secondary Antibody (Alexa Fluor 546 conjugate, Invitrogen) を用いて反応させ、DAPI で染色し、共焦点レーザー顕微鏡 (Leica) で観察を行った。

2-7 細胞内 Ca²⁺濃度 ([Ca²⁺]_i) の測定

第 1 章第 1 節と同じ方法で行なった。

2-8 統計学的処理

実験結果は平均値 \pm 標準誤差で示した。各実験群の初期相頻度の大きさを比較するときの有意差検討は Student's *t* 検定を用いた。遅発相における一過性の開口放出増加を比較す

るときの有意差検討では、ACh 刺激開始 3.5 分後の遅発相頻度（一過性の開口放出増加開始直前）と ACh 刺激開始 4～6 分後に見られる一過性の遅発相頻度の増加について ANOVA 検定を用いて比較した。その他の有意差検討は、必要に応じて Student's *t* 検定、unpaired *t* 検定あるいは ANOVA 検定を用いた。以上の検定において $P < 0.05$ のとき有意差ありと判定した。

3 結果

3-1 Ca^{2+} 調節性開口放出における PPAR α 刺激薬および PPAR α 阻害薬の効果

胃幽門腺粘液細胞において、非刺激時では開口放出が観察されなかった。ACh 単独刺激開始直後より開口放出反応は速やかに上昇し、1 分で初期相頻度が 11.2 ± 0.4 events/cell/30s となり、その後開口放出頻度はゆるやかに減少し、刺激 4 分後で遅発相頻度が 1.8 ± 0.3 events/cell/30s となった（opened circle in Fig. 17A）。

Ca^{2+} 調節性開口放出における PPAR α 刺激薬 (GW7647) の効果について検討した。GW7647 (50 nM) で 3 分間刺激した後、ACh 刺激を行った（closed circle in Fig. 17A）。GW7647 は Ca^{2+} 調節性開口放出の初期相を有意に増強 (18.4 ± 0.9 events/cell/30s) させ、その後ゆるやかに減少（遅発相頻度： 1.7 ± 0.3 events/cell/30s）させた。次いで、GW7647 による Ca^{2+} 調節性開口放出の増強に対する PPAR α 阻害薬 (GW6471、5 μM) の効果について検討した。GW6471 で 3 分間処理し、次に GW6471 と GW7647 で 3 分間処理した後、ACh 刺激を行った (Fig. 17B)。GW6471 は GW7647 による Ca^{2+} 調節性開口放出の初期相の増強を消失させ、ACh 単独刺激時初期相の 71% に減少 (7.9 ± 0.4 events/cell/30s) させた。しかし GW6471 は遅発相において一過性の開口放出増加 (2.9 ± 0.2 events/cell/30s) を引き起こした。第 1 章第 2 節で PKG 阻害薬である Rp8BrPETcGMPS が PDE2 (cGMP-dependent PDE2) 阻害により cAMP を蓄積することで遅発相における一過性の開口放出増加を引き起こすことを示唆した。そこで GW7647 および ACh により刺激された開口放出において GW6471 により引き起こされた遅発相における一過性の開口放出増加に及ぼす PKA 阻害薬である PKI-amide (1 μM) の効果について検討した (Fig. 17C)。PKI-amide は GW7647 および ACh により刺激された開口放出において GW6471 により引き起こされた一過性の開口放出増加を消失 (1.0 ± 0.1 events/cell/30s) させたが、初期相 (7.9 ± 0.4 events/cell/30s) には影響を及ぼさなかった。このことより、GW6471 により引き起こされた遅発相の一過性の開口放出増加は PKI-amide により阻害されたため、GW6471 が cAMP を蓄積することが示唆された。

さらに ACh 単独刺激性開口放出における GW6471 の効果について検討した (Fig. 17D)。GW6471 は ACh 刺激性開口放出の初期相を 76% に減少 (8.5 ± 0.1 events/cell/30s) し、遅発

相において一過性の開口放出増加 (3.0 ± 0.1 events/cell/30s) を引き起こした。Fig. 17B の結果も合わせて ACh 単独刺激時でも PPAR α を活性化することが示された。

3-2 GW7647 (PPAR α 刺激薬) による Ca²⁺調節性開口放出の増強に対する Rp8BrPETcGMPS (PKG 阻害薬) の効果

第 1 章第 2 節で 8-Bromo-cGMP (8BrcGMP、細胞膜透過性のアナログ) および ACh 刺激時において Rp8BrPETcGMPS は初期相の増強を消失させ、遅発相で一過性の開口放出増加を引き起こすことを示した。そこで、GW7647 による Ca²⁺調節性開口放出の増強に対する PKG 阻害薬 (Rp8BrPETcGMPS、500 nM) の効果について検討した。Rp8BrPETcGMPS で 3 分間処理し、次に Rp8BrPETcGMPS と GW7647 で 3 分間処理した後、ACh 刺激を行った (Fig. 18A)。Rp8BrPETcGMPS は GW7647 による Ca²⁺調節性開口放出の初期相の増強を消失 (8.3 ± 0.3 events/cell/30s) させ、遅発相で一過性の開口放出増加 (2.9 ± 0.2 events/cell/30s) を引き起こした。

次いで、GW6471 (PPAR α 阻害薬) 存在下における Ca²⁺調節性開口放出において GW7647 (Fig. 17B) の代わりに 8BrcGMP の効果について検討した (Fig. 18B)。GW6471 存在下においても 8BrcGMP (100 μ M) は Ca²⁺調節性開口放出の初期相を増強 (17.7 ± 0.9 events/cell/30s) させ、遅発相において引き起こされた一過性の開口放出増加を消失 (1.6 ± 0.2 events/cell/30s) させた。これらの結果より PPAR α を介したシグナル経路は cGMP を蓄積すると考えられる。

3-3 GW7647 (PPAR α 刺激薬) による Ca²⁺調節性開口放出の増強に対する NOS 阻害薬の効果

多くの細胞、組織において PPARs 活性化は NO 合成を刺激し^{23,37)}、NO は cGMP を蓄積する^{20,21, 37)}。そこで GW7647 による Ca²⁺調節性開口放出の増強に対する NOS 阻害薬 (L-NAME、100 μ M) の効果について検討した。L-NAME で 3 分間処理し、次に L-NAME と GW7647 で 3 分間処理した後、ACh 刺激を行った (Fig. 19A)。L-NAME は GW7647 による Ca²⁺調節性開口放出の初期相の増強を消失 (7.6 ± 0.4 events/cell/30s) させ、遅発相において一過性の開口放出増加 (3.0 ± 0.3 events/cell/30s) を引き起こした。

次いで、胃幽門腺粘液細胞の NO の産生に関与する NOS アイソフォームを決定するために選択的 NOS1 阻害薬である N-PLA (1 μ M)、選択的 NOS2 阻害薬である 1400W (50 nM)、選択的 NOS3 阻害薬である LN5-OD (2 μ M) の効果について検討した。N-PLA は GW7647 による Ca²⁺調節性開口放出の初期相の増強を消失 (7.7 ± 0.3 events/cell/30s) させ、遅発相において一過性の開口放出増加 (3.2 ± 0.2 events/cell/30s) を引き起こした (Fig. 19B)。1400W

(Fig. 19C) および LN5-OD (Fig. 19D) は GW7647 による Ca^{2+} 調節性開口放出の増強に影響を及ぼさなかった。

3-4 N-PLA (選択的 NOS1 阻害薬) 存在下で Ca^{2+} 調節性開口放出における NO、L-アルギニンおよび cGMP の効果

N-PLA 存在下において GW7647 ($\text{PPAR}\alpha$ 刺激薬) と ACh により刺激した際の NO ドナー (NOC12, 500 μM) の効果について検討した。N-PLA で 4 分間処理し、次に N-PLA と GW7647 で 3 分間処理した後、さらに NOC12 を加えて 3 分間刺激し、ACh 刺激を行った (Fig. 20A)。N-PLA 存在下において NOC12 は GW7647 と ACh 刺激における開口放出の初期相を増強 (19.2 ± 0.4 events/cell/30s) させ、遅発相において引き起こされた一過性の開口放出増加を消失 (0.4 ± 0.2 events/cell/30s) させた。次いで、NOC12 の代わりに L-アルギニン (5 mM) あるいは 8BrcGMP (100 μM) を使用した。N-PLA 存在下において L-アルギニン (Fig. 20B) あるいは 8BrcGMP (Fig. 20C) は NOC12 と同様に GW7647 と ACh 刺激における開口放出の初期相を増強させ、遅発相において引き起こされた一過性の開口放出増加を消失させた。これらより、胃幽門腺粘液細胞において $\text{PPAR}\alpha$ を介したシグナル経路は NOS1 を介して NO を産生することが示唆された。

3-5 アラキドン酸による Ca^{2+} 調節性開口放出の増強に対する $\text{PPAR}\alpha$ 阻害薬 (GW6471) の効果

アラキドン酸 (1 μM) は $\text{PPAR}\alpha$ の天然のリガンドであり²⁸⁾、胃幽門腺粘液細胞において Ca^{2+} 調節性開口放出の初期相を増強 (opened circle in Fig. 21A) させ、GW7647 ($\text{PPAR}\alpha$ 刺激薬) による初期相の増強と同じ程度の開口放出頻度を示した (Fig. 17A)。初期相頻度および遅発相頻度はそれぞれ 18.4 ± 0.5 および 1.2 ± 0.4 events/cell/30s であった。次いで、アラキドン酸による Ca^{2+} 調節性開口放出の増強に対する $\text{PPAR}\alpha$ 阻害薬 (GW6471, 5 μM) の効果について検討した (closed circle in Fig. 21A)。GW6471 はアラキドン酸による Ca^{2+} 調節性開口放出の初期相の増強を消失 (8.1 ± 0.6 events/cell/30s) させ、遅発相において一過性の開口放出増加 (2.8 ± 0.2 events/cell/30s) を引き起こした。さらにアラキドン酸の代わりに非代謝性のアラキドン酸 (AACOCF_3) を使用してもアラキドン酸による開口放出の効果が再現された (Fig. 21B)。

3-6 胃幽門粘膜からの NO 放出量および cGMP 含量

DMSO 刺激による 2 および 10 分値における剥離胃幽門粘膜からの NO 放出量は、それぞれ 0.02 ± 0.27 および 0.31 ± 0.16 nmol/g-tissue であった (closed column at DMSO in Fig. 22A)。

また、これらの刺激による剥離胃幽門粘膜からの 10 分値における NO 放出量は GW6471 (PPAR α 阻害薬)あるいは N-PLA(選択的 NOS1 阻害薬)によってわずかに減少した(opened column at DMSO in Fig. 22A)。刺激薬を添加した群において ACh、GW7647 (PPAR α 刺激薬) および GW7647 + ACh 刺激による剥離胃幽門粘膜からの NO 放出量はそれぞれ 2.2 ± 0.3 (2 分値) と 3.8 ± 0.6 nmol/g-tissue (10 分値)、 3.8 ± 0.8 (2 分値) と 4.9 ± 0.4 nmol/g-tissue (10 分値) および 4.5 ± 0.2 (2 分値) と 5.6 ± 0.4 nmol/g-tissue (10 分値) であった。これらの刺激による剥離胃幽門粘膜からの 10 分値における NO 放出量の増加は GW6471 あるいは N-PLA によって有意に減少した。さらに AACOCF₃ および AACOCF₃ + ACh による刺激も剥離胃幽門粘膜からの NO 放出量を有意に増加した (2 および 10 分値)。これらの刺激による剥離胃幽門粘膜からの 10 分値における NO 放出量の増加は GW6471 あるいは N-PLA によって有意に減少した。

次いで DMSO 刺激において、剥離胃幽門粘膜の cGMP 含量は、 25.6 ± 2.3 pmol/g-tissue であった (closed column at DMSO in Fig. 22B)。また、これらの刺激による剥離胃幽門粘膜の cGMP 含量は GW6471 あるいは N-PLA によって変化がなかった(opened column at DMSO in Fig. 22B)。刺激薬を添加した群において ACh、GW7647 および GW7647 + ACh 刺激による剥離胃幽門粘膜の cGMP 含量はそれぞれ 40.8 ± 6.8 、 34.8 ± 1.3 および 50.5 ± 7.7 pmol/g-tissue であった。これらの刺激による剥離胃幽門粘膜の cGMP 含量の増加は GW6471 あるいは N-PLA によって有意に減少した。さらに、AACOCF₃ および AACOCF₃ + ACh 刺激も剥離胃幽門粘膜の cGMP 含量を有意に増加させた。これらの刺激による剥離胃幽門粘膜の cGMP 含量の増加は GW6471 あるいは N-PLA によって有意に減少した。これらの結果より PPAR α 刺激薬である GW7647 および AACOCF₃ は NO を産生および cGMP を蓄積することが示された。

さらに、剥離胃幽門粘膜において NO 濃度の増加が cGMP の蓄積に与える影響について検討した。NO ドナーである NOC12 を用いて剥離胃幽門粘膜に NO を付加することにより、剥離胃幽門粘膜の cGMP 含量は有意に増加した (Table 1)。

3-7 胃幽門粘膜における NOS1 および PPAR α の発現と局在

ウェスタンブロット法における胃幽門粘膜での NOS1 および PPAR α のバンドを示す (Figs. 23A および 23B)。NOS1 のバンドが約 160 kDa、PPAR α のバンドが約 52 kDa に検出された。次いで NOS1 および PPAR α の局在を免疫組織化学法により検討した。PAS 染色により粘液細胞は胃幽門粘膜層の管腔側から約 1/3 から 1/2 に存在していた (Fig. 23C)。NOS1 は胃幽門腺粘液細胞の細胞質に存在し (Fig. 23D)、PPAR α は胃幽門腺粘液細胞の細胞質と核に存在していた (Fig. 23E)。DAPI 染色により核は胃幽門腺粘液細胞の基底膜側

に存在していた (Fig. 23F)。Figures 23D-F を重ね合わせた Figure 23G は NOS1 と PPAR α が胃幽門腺粘液細胞の細胞質に共在することを示した (Fig. 23C-G、カラー附図)。

さらに、ウェスタンブロット法および免疫組織化学法を用いて NOS2 および NOS3 の発現と局在を検討した。NOS3 は約 135 kDa にバンドが検出され、血管内皮細胞に局在していた。NOS2 は胃幽門腺粘液細胞に検出されなかった。

3-8 ACh 刺激による $[Ca^{2+}]_i$ 変化に及ぼす GW7647 の効果

ACh 刺激後に PPAR α 刺激薬 (GW7647) 処理をおこなった場合 (Fig. 24A) と ACh 刺激前に GW7647 処理をおこなった場合 (Fig. 24B) では、 $[Ca^{2+}]_i$ に相違は認められなかった。このことから GW7647 は ACh 刺激に関係なく $[Ca^{2+}]_i$ に影響を与えないことが示唆された。

4. 考察

胃幽門粘膜において PPAR α 刺激薬である GW7647 および AACOCF₃ (非代謝性のアラキドン酸) は cGMP の蓄積を有意に増加した。さらに Ca^{2+} 調節性開口放出において PPAR α 阻害薬である GW6471 は GW7647、アラキドン酸および AACOCF₃ による Ca^{2+} 調節性開口放出の増強を阻害した (初期相の減少と遅発相における一過性の開口放出増加)。さらに遅発相における一過性の開口放出増加は PKA 阻害薬である PKI-amide により消失した。この GW6471 により得られた結果は第 1 章第 2 節で明らかにした PKG 阻害薬である Rp8BrPETcGMPS による結果と同様であった。また GW6471 による阻害効果は 8BrcGMP により回復した (減少した初期相の増強と遅発相における一過性の開口放出増加の消失)。これらより胃幽門腺粘液細胞において PPAR α 刺激薬は cGMP を蓄積することが示唆された。

多くの細胞、組織で NO は cGMP を蓄積する^{20,21,37)}。胃幽門腺粘液細胞においても cGMP の蓄積は NO を介していることが示された。さらに NOS1 と PPAR α の共在が胃幽門腺粘液細胞において確認できた。また NOS1 選択的阻害薬である N-PLA は PPAR α 刺激薬による NO の産生増加および cGMP の蓄積の増加を有意に抑制し、PPAR α 刺激薬による Ca^{2+} 調節性開口放出の増強効果を阻害した。このことから PPAR α 刺激薬は NOS1 を介して NO を産生することが示された。これらの結果から、胃幽門腺粘液細胞において PPAR α 活性化は NOS1 を介して NO を産生し cGMP を蓄積し、この cGMP の蓄積が Ca^{2+} 調節性開口放出の初期相を増強させることが示唆された。

一方で、アラキドン酸は PPAR α の生理的なアゴニストであるが³⁸⁻⁴²⁾、PGs、ロイコトリエンおよびリポキシン等、アラキドン酸カスケードの鍵となる基質でもある。これらアラキドン酸から産生された物質による Ca^{2+} 調節性開口放出の増強効果である可能性が考えられるが、非代謝性のアラキドン酸 (AACOCF₃) は、以前報告¹⁴⁾したように PPAR α を介し

た Ca^{2+} 調節性開口放出の初期相を増強させ、NO 産生と cGMP 蓄積を増加した。このことより、PGs 等のアラキドン酸カスケードの代謝産物の関与は除外できると考えられた。以上より、生理的条件下において、アラキドン酸カスケードではなくてアラキドン酸そのものが PPAR α を刺激することが示唆された。

ACh の単独刺激は PPAR α を活性化し、GW6471 は ACh 単独刺激性開口放出の初期相を減少し、遅発相において一過性の開口放出増加を引き起こした。また ACh の単独刺激は NOS1 を介して NO を産生し、cGMP を蓄積した。これらより ACh 刺激は PPAR α /NOS1/NO/cGMP オートクリン機構を介して Ca^{2+} 調節性開口放出を維持するのに重要な役割を果たしていると考えられる。

5. 結語

本研究結果より、胃幽門腺粘液細胞において PPAR α の活性化は、NOS1 を介して NO を産生、さらに cGMP を蓄積した。最終的に cGMP が Ca^{2+} 調節性開口放出の初期相を増強することが示唆された。

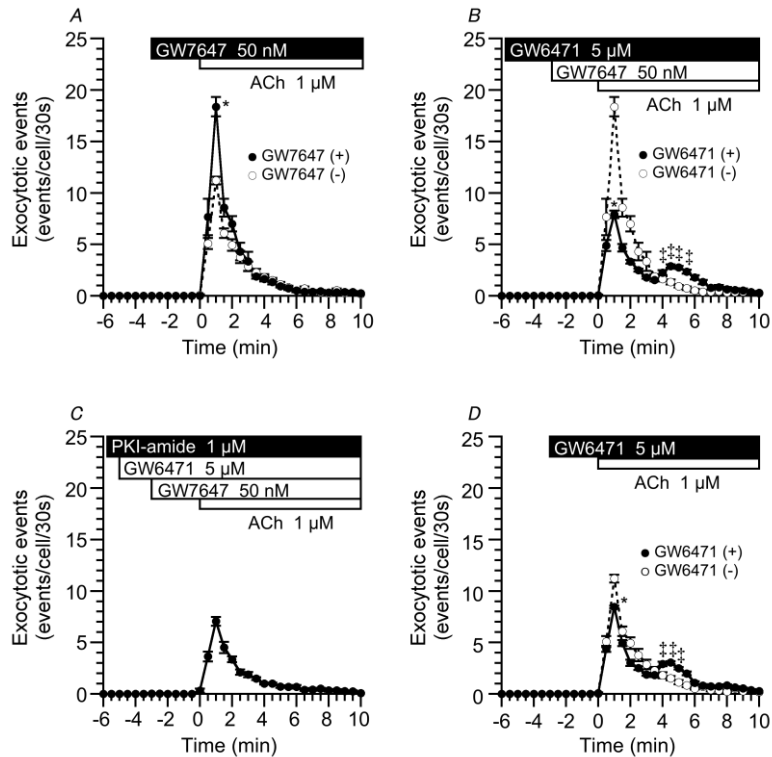


Fig. 17 Effects of peroxisome proliferation activation receptor α (PPAR α) agonist (GW7647) and antagonist (GW6471) on the frequency of ACh-stimulated exocytotic events. ACh (1 μ M) increased the frequency of exocytotic events in antral mucous cells: an initial phase followed by a late phase. A: GW7647 (50 nM) enhanced the ACh-stimulated initial phase by 64% in antral mucous cells. B: GW6471 (5 μ M) abolished the enhancement of initial phase of exocytotic events and decreased the frequency to 43% of that enhanced by GW7647 plus ACh; rather, the frequency was reduced to 71% of that increased by ACh alone. However, the addition of GW6471 produced the delayed, but transient, increase in the late phase in the exocytotic events stimulated by GW7647 plus ACh. C: PKI-amide (1 μ M) abolished the GW6471-induced delayed, but transient, increase in the exocytotic events stimulated by GW7647 plus ACh. D: GW6471 decreased the frequency of the ACh-stimulated initial phase to 76% of that increased by ACh alone and produced the delayed, but transient, increase in the late phase in the exocytotic events stimulated by ACh alone. * $P < 0.05$: Significantly different from the corresponding values. ‡ $P < 0.05$: Significantly different from the value at 3.5 min from the start of ACh stimulation.

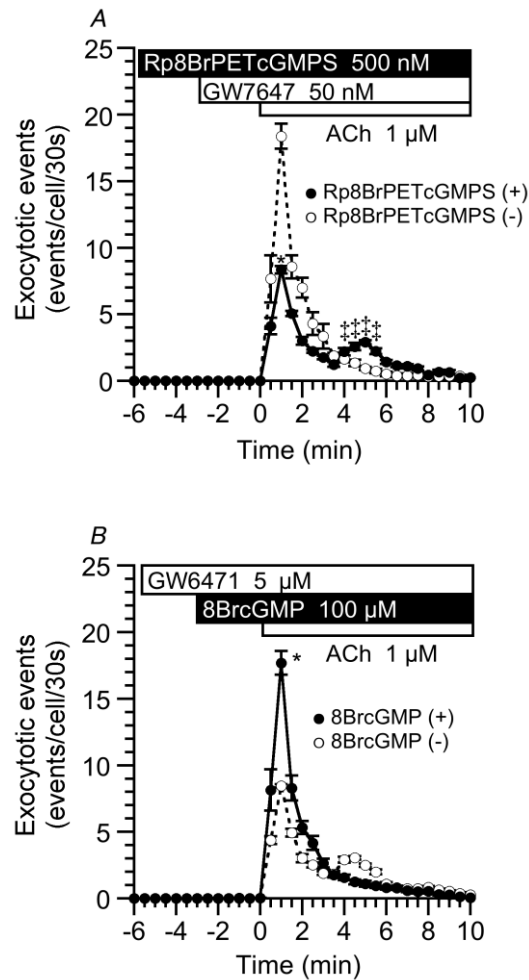


Fig. 18 Effects of a PKG inhibitor (Rp8BrPETcGMPS) on the frequency of ACh-stimulated exocytotic events enhanced by GW7647. A: Rp8BrPETcGMPS (500 nM) abolished the enhancement of initial phase of exocytotic events (the frequency to 45% of that enhanced by GW7647 plus ACh) and produced the delayed, but transient, increase in the late phase in the exocytotic events stimulated by GW7647 plus ACh. B: 8BrcGMP (100 μM) enhanced the initial phase and abolished the delayed, but transient, increase in the late phase in the ACh-stimulated exocytotic events of GW6471-treated cells. * $P < 0.05$: Significantly different from the corresponding values. ‡ $P < 0.05$: Significantly different from the values at 3.5 min from the start of ACh stimulation.

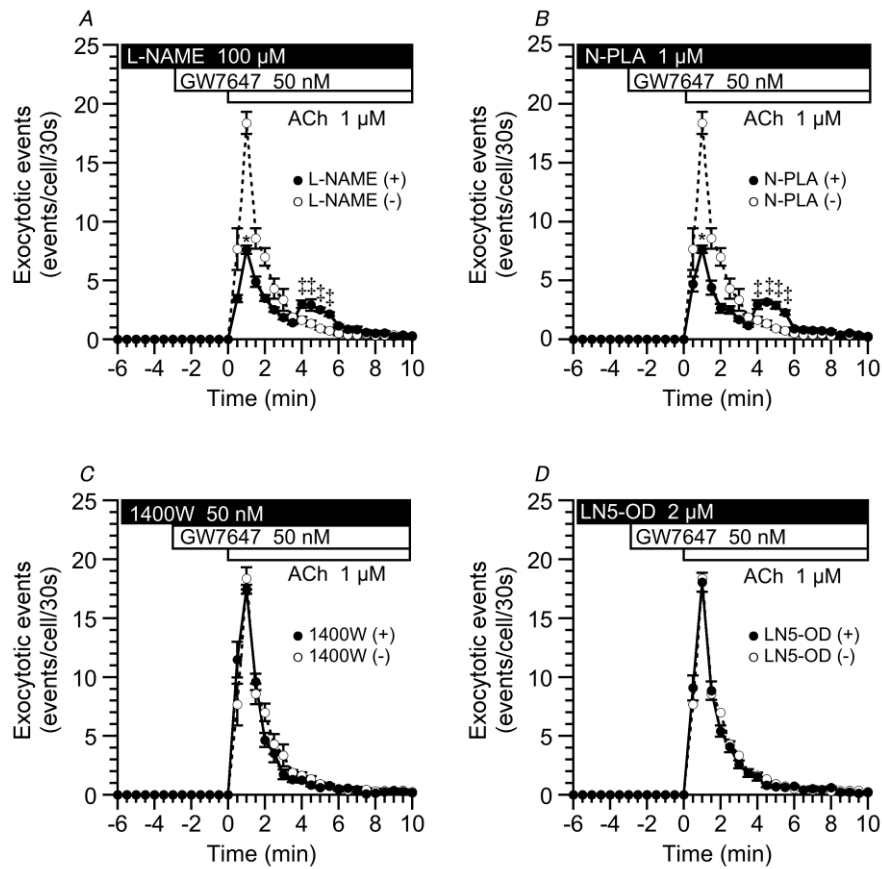


Fig. 19 Effects of nitric oxide synthase (NOS) inhibitors on the frequency of ACh-stimulated exocytotic events enhanced by GW7647. A: L-NAME (100 μM) abolished the enhancement of initial phase and produced the delayed, but transient, increase in the late phase in the exocytotic events stimulated by GW7647 plus ACh. B: N-PLA (a selective inhibitor of NOS1, 1 μM) abolished the enhancement of initial phase and produced the delayed, but transient, increase in the late phase in the exocytotic events stimulated by GW7647 plus ACh. C: 1400W (a selective inhibitor of NOS2, 50 nM) did not affect the exocytotic events stimulated by GW7647 plus ACh. D: LN5-OD (a selective inhibitor of NOS3, 2 μM) did not affect the exocytotic events stimulated by GW7647 plus ACh. * $P < 0.05$: Significantly different from the corresponding values. ‡ $P < 0.05$: Significantly different from the value at 3.5 min from the start of ACh stimulation.

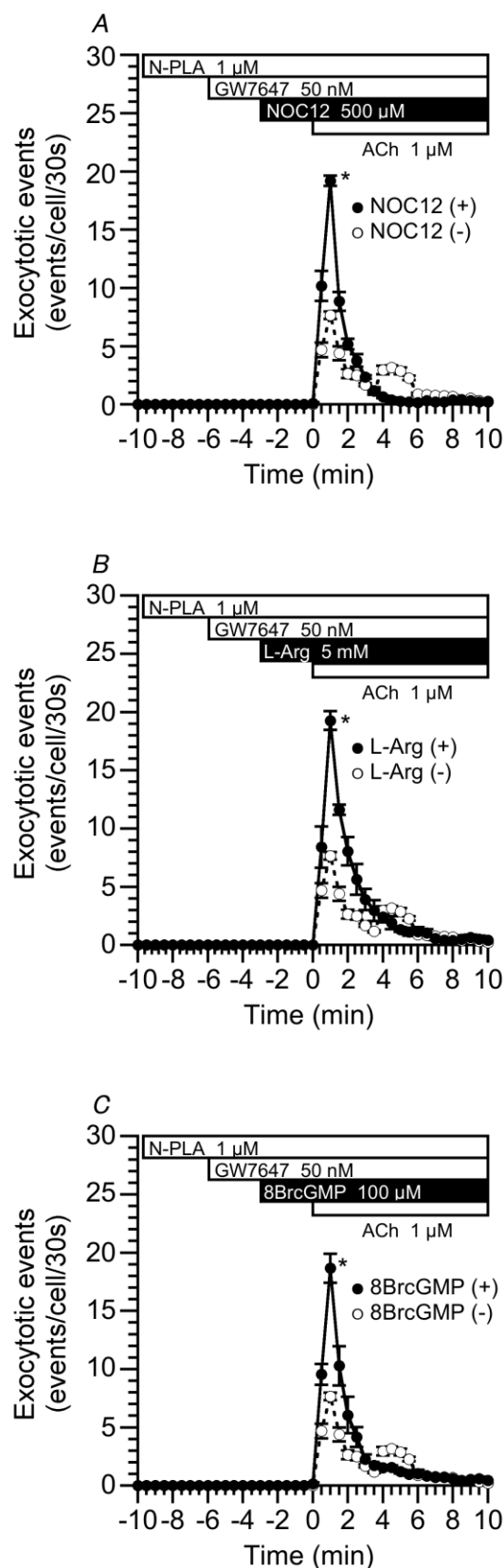


Fig. 20 Effects of NO and cGMP in the presence of a NOS1 inhibitor, N-PLA, on the ACh-stimulated exocytotic events enhanced by GW7647. N-PLA abolished the enhancement of initial phase and produced the delayed, but transient, increase in the late phase in the exocytotic events stimulated by GW7647 plus ACh. In the presence of N-PLA, NOC12, L-arginine (L-Arg), and 8BrcGMP enhanced the initial phase and abolished the delayed, but transient, increase in the late phase in the exocytotic events stimulated by GW7647 plus ACh. A: NOC12 (an NO donor, 500 μ M). B: L-Arg (5 mM). C: 8BrcGMP. * $P < 0.05$: Significantly different from the corresponding values.

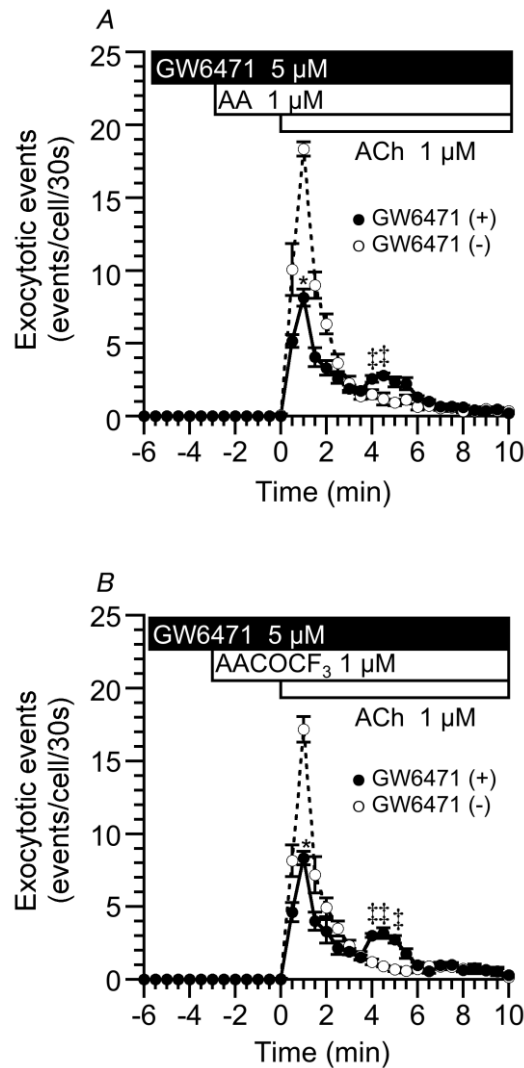


Fig. 21 Effects of arachidonic acid (AA) and arachidonyl trifluoromethyl ketone (AACOCF₃) on the ACh-stimulated exocytotic events. A: AA (1 μ M) enhanced the ACh-stimulated initial phase, similarly to GW7647. GW6471 abolished the enhancement of initial phase and produced the delayed, but transient, increase in the late phase in the exocytotic events stimulated by AA plus ACh. B: AACOCF₃ (1 μ M) enhanced the ACh-stimulated initial phase, similarly to GW7647 and AA. GW6471 abolished the enhancement of initial phase and produced the delayed, but transient, increase in the late phase in the exocytotic events stimulated by AACOCF₃ plus ACh. * $P < 0.05$: Significantly different from the corresponding values. ‡ $P < 0.05$: Significantly different from the value at 3.5 min from the start of ACh stimulation.

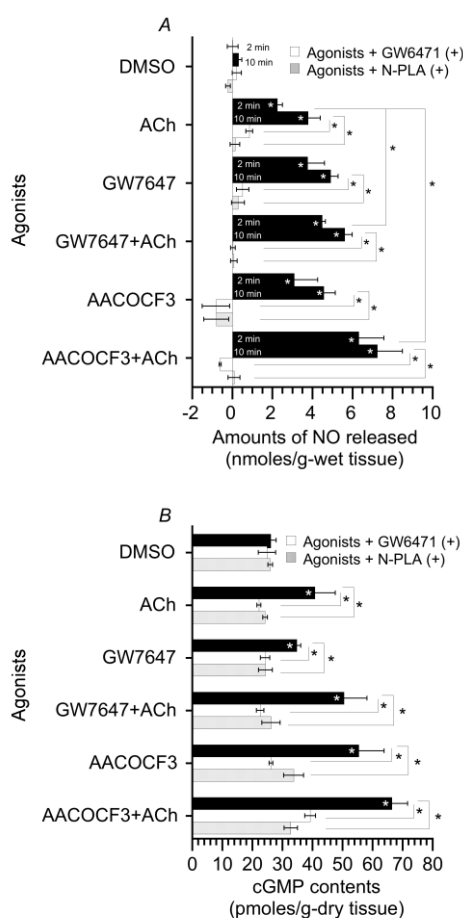


Fig. 22 Amounts of NO released from and cGMP content of the antral mucosae. A: The amounts of NO released from the antral mucosa. In both samples (2 and 10 min), ACh (1 μ M), GW7647 (50 nM), and GW7647 plus ACh increased the amounts of NO released from stripped antral mucosa. GW6471 (5 μ M) or N-PLA (1 μ M) inhibited these increases in the amounts of NO released during 10-min incubation with ACh, GW7647, and GW7647 plus ACh. AACOCF₃ (1 μ M) or AACOCF₃ plus ACh increased the amounts of NO released from stripped antral mucosa in both samples (2 and 10 min). GW6471 or N-PLA inhibited these increases in the amounts of NO released during 10-min incubation with AACOCF₃ or AACOCF₃ plus ACh. B: The cGMP contents of the antral mucosa. The antral mucosae were incubated with ACh (1 μ M), GW7647 (50 nM), and GW7647 plus ACh for 10 min. ACh increased the cGMP contents of stripped antral mucosa. GW7647 or GW7647 plus ACh also increased the cGMP contents of stripped antral mucosa. These increases were inhibited by GW6471 (5 μ M) or N-PLA (1 μ M). AACOCF₃ (1 μ M) or AACOCF₃ plus ACh increased the cGMP contents of stripped antral mucosa. These increases were inhibited by GW6471 or N-PLA. * $P < 0.05$: Significantly different from the corresponding values.

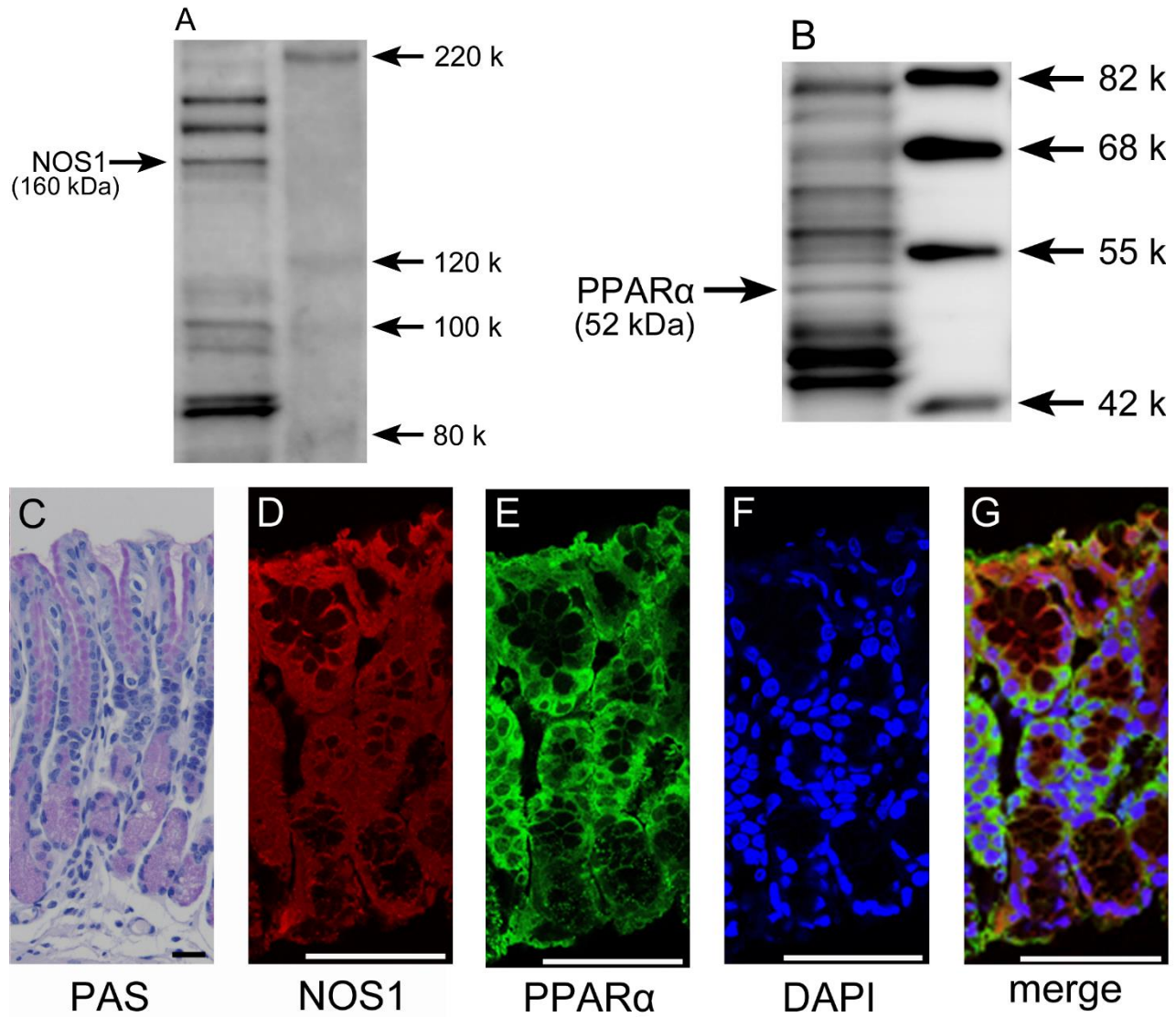


Fig. 23 Expression and localization of NOS1 or PPARα in antral mucous cells. A&B: Western blot analysis for NOS1 (A) and PPARα (B). The NOS1 band (160 kDa) and PPARα band (52 kDa) were detected in the antral mucosa. C: PAS staining. D: Immunofluorescence for NOS1. The cytoplasm of the antral mucous cell was positively stained for NOS1. E: Immunofluorescence for PPARα. The cytoplasm and the nucleus of the antral mucous cell were positively stained for PPARα. F: DAPI staining. G: Merged Figs. 23D–F. NOS1 and PPARα were colocalized in the cytoplasm of the antral mucous cell. Scale bars represent 50 μM (C) and 75 μM (D–G).

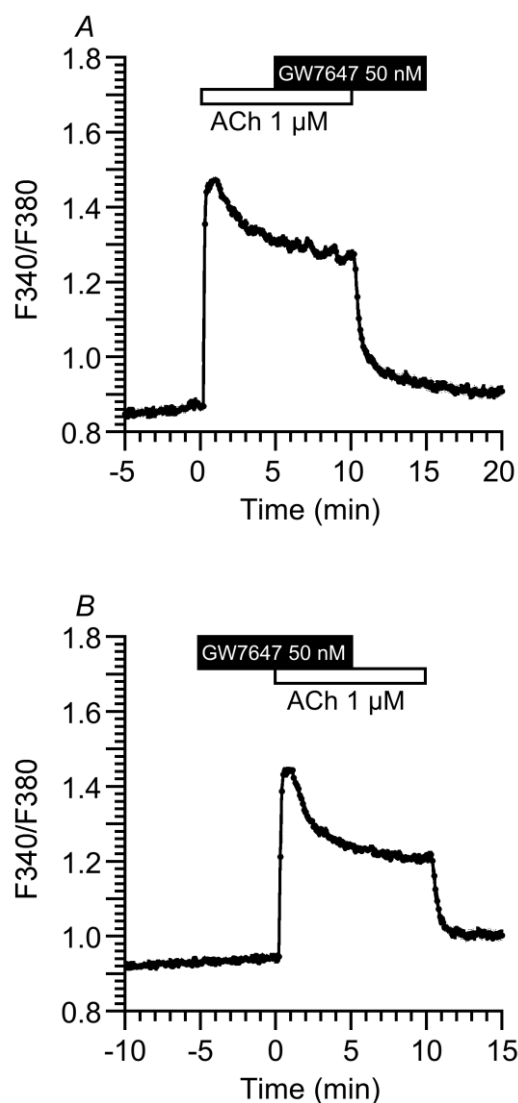


Fig. 24 Effects of GW7647 on ACh-stimulated increases in intracellular Ca^{2+} concentration ($[Ca^{2+}]_i$). A: ACh ($1\ \mu M$) immediately increased $[Ca^{2+}]_i$ and then decreased to a plateau within 3 min. The further addition of GW7647 ($50\ nM$) did not affect ACh-stimulated increases in $[Ca^{2+}]_i$. The cessation of ACh stimulation immediately decreased $[Ca^{2+}]_i$. B: The addition of GW7647 did not increase $[Ca^{2+}]_i$ and then stimulation with ACh immediately increased $[Ca^{2+}]_i$ and then decreased to a plateau within 3 min after addition of ACh. Increases in $[Ca^{2+}]_i$ stimulated by GW7647 plus ACh were similar to those stimulated by ACh alone.

Table 1. The NO concentration and the cGMP content

Experiment	Final [NO], μM	($\Delta[\text{NO}]$), μM	cGMP contents, pmol/g tissue	n
DMSO	3.17 ± 0.66	(0.17 ± 0.15)	27.27 ± 3.86	3
NOC12 500 μM	44.74 ± 1.07 *	(40.86 ± 2.49 *)	$76.27 \pm 9.23^*$	3

An increase in [NO] of the incubation solution by NOC12 cause cGMP to accumulate in the antral mucosa. Values are expressed as means \pm SE; *n*, no. of experiments.

**P* < 0.05 vs. DMSO.

第2章 PPAR α を介した Ca²⁺調節性開口放出の増強機構：NO/cGMP 経路の活性化

第2節 PPAR α による NOS1 の活性化

1. 緒言

第2章第1節では、胃幽門腺粘液細胞において PPAR α が NOS1 を介して NO/cGMP を蓄積し、Ca²⁺調節性開口放出を増強することを示した。しかし PPAR α による NOS1 の活性化機構は明らかでない。心筋細胞および血管内皮細胞において PPAR γ が phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/serine-threonine kinase (Akt) シグナルを介して NO 合成を刺激すること²⁴⁾、また PPAR α アゴニストが PI3K/Akt を介して NOS3 のリン酸化を刺激することが報告されている⁴³⁻⁴⁵⁾。胃幽門腺粘液細胞においても PPAR α のアゴニストが PI3K/Akt シグナルを介して NOS1 を活性化する可能性が考えられる。

本節では胃幽門腺粘液細胞において PPAR α による NOS1 活性化機構について検討した。

2. 材料および方法

2-1 使用溶液および薬物

第1章第1節と同じ組成の溶液 I を使用した。ACh (Daichi Pharmaceuticals)、コラゲナーゼ (細胞分散用、180-220 U/mg、Wako Pure Chemical Industries)、BSA (Wako Pure Chemical Industries)、arachidonyl trifluoromethyl ketone (AACOCF₃, Wako Pure Chemical Industries)、N-((2S)-2-(((1Z)-1-Methyl-3-oxo-3-(4-(trifluoromethyl)phenyl)prop-1-enyl)amino)-3-(4-(2-(5-methyl-2-phenyl-1,3-oxazol-4-yl)ethoxy)phenyl)propyl)propanamide (GW6471, Tocris)、2-[[4-[2-[[[(Cyclohexylamino)-carbonyl](4-cyclohexylbutyl)amino]ethyl]phenyl]thio]-2-methylpropanoic acid (GW7647, Tocris)、wortmannin (Wako Pure Chemical Industries) および AKT 1/2 Kinase Inhibitor (AKT-inh, Wako Pure Chemical Industries) を用いた。ACh は超純水で溶解した。ACh 以外の薬物は DMSO で溶解し、DMSO の最終濃度が 0.1% を超えないように希釈した。

2-2 胃幽門腺粘液細胞の調製

第1章第1節と同じ調製法で行った。全ての実験は京都府立医科大学および大阪薬科大学動物実験規程に従って行った。

2-3 開口放出の観察

第1章第1節と同じ方法で行なった。ACh 刺激開始 1 分後を初期相頻度とし、ACh 刺激開始 4 分後を遅発相頻度とした。Wortmannin および AKT-inh を使用した実験では ACh 刺激開始 4～5 分の間で最も高い頻度を遅発相頻度とした。

2-4 ウェスタンブロットおよび NO 測定のための剥離胃幽門粘膜の処理

コラゲナーゼ処理していない剥離胃幽門粘膜を秤量した後、混合ガス (95% O₂, 5% CO₂) で飽和した溶液 I (5 mL) に入れ、薬剤を添加する前に 37°C、10 分間インキュベートした。コントロール群では剥離胃幽門粘膜に DMSO (媒体コントロール) を添加して、10 分間インキュベートした。刺激薬を添加した群では剥離胃幽門粘膜を ACh (1 μM)、GW7647 (50 nM)、GW7647 + ACh、AACOCF₃ (1 μM) および AACOCF₃ + ACh を添加して、10 分間刺激した後、NO 測定用に培養上清を直ちに氷上で保管した後、液体窒素中で凍結後、-30°C で保管した。阻害薬 (GW6471 (ウェスタンブロットのみ)、wortmannin および AKT-inh) を添加した群では、阻害薬を添加し 10 分間インキュベートした後、DMSO、ACh (1 μM)、GW7647 (50 nM)、GW7647 + ACh、AACOCF₃ (1 μM) および AACOCF₃ + ACh (1 μM) を添加し、10 分間刺激した後、NO 測定用に培養上清を直ちに氷上で保管した後、液体窒素中で凍結後、-30°C で保管した。試料は nitrate/nitrite fluorometric assay kit (Cayman Chemical Company) を用い、定量した。NO は nmols/g-wet tissue weight で表した。実験終了後の剥離胃幽門粘膜はウェスタンブロットに使用した。

2-5 ウェスタンブロット法

胃幽門粘膜を RIPA buffer でホモジナイズし、遠心分離 (10,000 g、10 分) を行なった。その上清をタンパク量として 20 μg のサンプルを用いた。4-12% のポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動させ、PVDF メンブレンに転写させた。メンブレンを Blocking One-P でブロッキング処理 (室温、30 分) を行った。その後、1 次抗体としてリン酸化 PI3K (Tyr467) 抗体 (Gene Tex)、リン酸化 Akt (Ser473) 抗体 (Cell Signaling Technology) およびリン酸化 NOS1 (Ser1417) 抗体 (Enzo Life Sciences) をそれぞれ 1:1,000、1:1,000 および 1:500 に希釈した後、4°C 下で一晩反応させた。翌日、2 次抗体として Anti-rabbit IgG-HRP (Santa Cruz Biotechnology) をそれぞれ 1:1,000 に希釈した後、室温において 1 時間反応させ、EzWest Lumi plus (ATTO) を用いて発光させ、LAS-3000 (富士フイルム) で解析を行った。各々のリン酸化タンパク質含量は内部標準である β-actin で補正し、PI3K (Tyr467)、Akt (Ser473) あるいは NOS1 (Ser1417) のリン酸化レベルとして表した。

2-6 組織化学染色法

胃幽門腺粘液細胞（遊離腺管）をカバーガラス上に乾燥固定し、PI3K 抗体（Cell Signaling Technology）および PPAR α 抗体（LifeSpan BioSciences）あるいは Akt 抗体（Cell Signaling Technology）および PPAR α 抗体（LifeSpan BioSciences）を用いて 4°C、一晚反応させた。翌日、Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Secondary Antibody (Alexa Fluor 488 conjugate, Invitrogen) および Goat anti-Mouse IgG (H+L) Secondary Antibody (Alexa Fluor 546 conjugate, Invitrogen) を室温で 2 時間反応させ、核染色剤（DAPI）含有のスライド封入剤を用いて封入した。共焦点レーザー顕微鏡（Carl Zeiss）で観察を行った。

2-7 細胞内 Ca²⁺濃度（[Ca²⁺]_i）の測定

第 1 章第 1 節と同じ方法で行なった。

2-8 統計学的処理

実験結果は平均値 \pm 標準誤差で示した。各実験群の初期相頻度の大きさを比較するときの有意差検討は Student's *t* 検定を用いた。遅発相における一過性の開口放出増加を比較するときの有意差検討では、ACh 刺激開始 3 分後の遅発相頻度（一過性の開口放出増加開始直前）と ACh 刺激開始 3.5~7 分後に見られる一過性の遅発相頻度の増加について ANOVA 検定を用いて比較した。その他の有意差検討は、必要に応じて Student's *t* 検定、unpaired *t* 検定あるいは ANOVA 検定を用いた。以上の検定において $P < 0.05$ のとき有意差ありと判定した。

3. 結果

3-1 GW7647（PPAR α 刺激薬）による Ca²⁺調節性開口放出の増強に対する PI3K/Akt 阻害薬の効果

胃幽門腺粘液細胞において、非刺激時では開口放出が観察されなかった。ACh 単独刺激開始直後より開口放出反応は速やかに上昇し、1 分で初期相頻度が 11.3 ± 1.1 events/cell/30s となり、その後開口放出頻度はゆるやかに減少し、刺激 4 分後で遅発相頻度が 2.2 ± 0.5 events/cell/30s となった（opened circle in Fig. 25A）。

PPARs の活性化によって、PI3K/Akt を介して NO が産生されることが報告されている⁴³⁻⁴⁵。PPAR α 刺激薬（GW7647）による Ca²⁺調節性開口放出の増強に対する PI3K 阻害薬（wortmannin、50 nM）および Akt 阻害薬（AKT-inh、100 nM）の効果について検討した。第 2 章第 1 節と同様に GW7647 は Ca²⁺調節性開口放出の初期相を増強させた（ 18.9 ± 0.9 events/cell/30s; closed circle in Fig. 25A）。Wortmannin で 3 分間処理し、次に wortmannin と GW7647 で 3 分間処理した後、ACh 刺激を行なった（Fig. 25B）。Wortmannin は GW7647

による Ca^{2+} 調節性開口放出の初期相の増強を消失 (8.2 ± 0.4 events/cell/30s) させ、遅発相において一過性の開口放出増加 (4.5 ± 0.3 events/cell/30s) を引き起こした。

次いで、wortmannin の代わりに AKT-inh を用いて GW7647 による Ca^{2+} 調節性開口放出の増強に対する効果について検討した (Fig. 25C)。AKT-inh は wortmannin の効果と同様に GW7647 による Ca^{2+} 調節性開口放出の初期相の増強を消失 (8.0 ± 0.3 events/cell/30s) させ、遅発相において一過性の開口放出増加 (4.4 ± 0.3 events/cell/30s) を引き起こした。これら GW7647 によって引き起こされた Ca^{2+} 調節性開口放出における wortmannin と AKT-inh の効果は第 2 章第 1 節で示した GW6471 (PPAR α 阻害薬)、Rp8BrPETcGMPS (PKG 阻害薬) および N-PLA (選択的 NOS1 阻害薬) による開口放出の効果と同様であった。

3-2 胃幽門粘膜における PPAR α 活性化による PI3K、Akt および NOS1 のリン酸化

P-NOS1 (Ser1417)、P-PI3K (Tyr467) および P-Akt (Ser473) のバンドにおける各刺激薬 (ACh、GW7647 (PPAR α 刺激薬)、GW7647 + ACh、AACOCF₃ および AACOCF₃ + ACh) の効果について検討した。各刺激薬は NOS1 の Ser1417 リン酸化を DMSO 刺激時と比較して有意に増加した (Fig. 26A)。PI3K の Tyr467 リン酸化および Akt の Ser473 リン酸化も各刺激薬により有意に増加した。Figures 26C-E (■) は PI3K の Tyr467 リン酸化、Akt の Ser473 リン酸化および NOS1 の Ser1417 リン酸化を β -actin により補正した図である。次いで GW6471 (PPAR α 阻害薬) 存在下における各刺激薬の効果について検討した (Fig. 26B: GW6471 実験群)。GW6471 存在下、DMSO 刺激により PI3K の Tyr467 リン酸化、Akt の Ser473 リン酸化および NOS1 の Ser1417 リン酸化が検出されたが、各刺激薬により PI3K の Tyr467 リン酸化、Akt の Ser473 リン酸化および NOS1 の Ser1417 リン酸化バンドは増加しなかった (Fig. 26B)。Figures 26C-E (□) は PI3K の Tyr467 リン酸化、Akt の Ser473 リン酸化および NOS1 の Ser1417 リン酸化を β -actin により補正した図である。GW6471 は刺激薬による PI3K、Akt (Ser473) および NOS1 のリン酸化の増加を阻害することが示唆された。

さらに、GW6471 の代わりに wortmannin (PI3K 阻害薬) を使用した (Fig. 27A: Wortmannin 実験群)。Wortmannin 存在下において、Akt の Ser473 リン酸化および NOS1 の Ser1417 リン酸化は DMSO 刺激時に検出されたが、各刺激薬により増加しなかった (Fig. 27A)。Figures 27B-C は Akt の Ser473 リン酸化および NOS1 の Ser1417 リン酸化を β -actin により補正した図である。Wortmannin は刺激薬による Akt (Ser473) および NOS1 のリン酸化の増加を阻害することが示唆された。

最後に、wortmannin の代わりに AKT-inh (Akt 阻害薬) を使用した (Fig. 27D: AKT-inh 実験群)。AKT-inh 存在下において、各刺激薬は PI3K の Tyr467 リン酸化を DMSO 刺激時と比較して有意に増加したが、NOS1 の Ser1417 リン酸化は増加しなかった (Fig. 27D)。

Figures 27E-F は PI3K の Tyr467 リン酸化および NOS1 の Ser1417 リン酸化を β -actin により補正した図である。AKT-inh 存在下において、PPAR α 刺激薬は PI3K のリン酸化を増加したが、NOS1 のリン酸化は引き起こさなかった。

これらより、GW7647 は PI3K のリン酸化、続いて Akt (Ser473) のリン酸化を刺激し、さらに NOS1 のリン酸化を引き起こすことが示唆された。ACh 単独時および AACOCF₃ 刺激により得られた結果も同様であった。

3-3 胃幽門粘膜からの NO 放出量

DMSO 刺激時において、剥離胃幽門粘膜からの NO 放出量は 0.31 ± 0.04 nmol/g-tissue であった (closed column at DMSO in Fig. 28)。刺激薬を添加した群において、ACh、GW7647 (PPAR α 刺激薬)、GW7647 + ACh、AACOCF₃ および AACOCF₃ + ACh による各刺激は剥離胃幽門粘膜からの NO 放出量をそれぞれ 4.88 ± 0.17 、 5.45 ± 0.86 、 9.33 ± 2.71 、 8.10 ± 0.83 および 11.68 ± 2.34 nmol/g-tissue に増加した (Fig. 28)。また、これらの刺激による剥離胃幽門粘膜からの NO 放出量増加は wortmannin (PI3K 阻害薬) および AKT-inh (Akt 阻害薬) により完全に消失した。これらの結果は第 2 章第 1 節で示した NO 放出量に対する GW6471 (PPAR α 阻害薬) および N-PLA (選択的 NOS1 阻害薬) の効果と wortmannin および AKT-inh の効果が同様であることを示唆した。

3-4 胃幽門腺粘液細胞における PI3K、Akt および PPAR α の局在

胃幽門腺粘液細胞における PI3K/PPAR α (Figs. 29B-E) および Akt/PPAR α (Figs. 29F-I) の局在を検討した。Figure 29A は胃幽門腺粘液細胞の微分干渉顕微鏡像を示す。粘液顆粒が細胞質に存在していた。PI3K (Fig. 29B) および Akt (Fig. 29F) は胃幽門腺粘液細胞の細胞質に存在していた。PPAR α (Figs. 29C および 29G) も胃幽門腺粘液細胞の細胞質に存在していた。DAPI 染色により核の存在を確認した (Figs. 29D および 29H)。Figures 29B-D を重ね合わせた Figure 29E は PI3K と PPAR α が胃幽門腺粘液細胞の細胞質に共在することを示した。さらに Figures 29F-H を重ね合わせた Figure 29I は Akt と PPAR α が胃幽門腺粘液細胞の細胞質に共在することを示した (Fig. 29B-I、カラー附図)。

4. 考察

PI3K 阻害薬である wortmannin および Akt 阻害薬である AKT-inh は PPAR α 刺激薬により活性化された NO の産生と NOS1 のリン酸化の増加を抑制した。さらに PPAR α 刺激薬は PI3K のリン酸化と Akt (Ser473) のリン酸化を増加し、これらの増加は GW6471 (PPAR α 阻害薬) によって阻害された。Wortmannin は Akt (Ser473) のリン酸化の増加を阻害したが、

AKT-inh は PI3K のリン酸化の増加を阻害しなかった。このことより胃幽門腺粘液細胞の PPAR α 経路において Akt は PI3K の下流シグナルであることが示唆された。免疫蛍光染色法により PPAR α は胃幽門腺粘液細胞の細胞質に PI3K および Akt と共在しており、PPAR α と NOS1 は胃幽門腺粘液細胞の細胞質に局在することを第 2 章第 1 節において示した。血管内皮細胞において PPAR α のリガンドが作用すると PI3K/Akt のリン酸化を亢進することが報告されている^{44,45)}。これらより、胃幽門腺粘液細胞においても PPAR α の活性化は PI3K/Akt のリン酸化を介して NOS1 をリン酸化し NO を産生していることが示唆された。

本結果より、PPAR α 活性化により産生された NO が胃幽門腺粘液細胞 Ca²⁺調節性開口放出の維持に重要な役割を果たしていることが明らかになった。第 2 章第 1 節において NO による Ca²⁺調節性開口放出の増加は cGMP の蓄積を介していることを示し、第 1 章第 2 節において胃幽門腺粘液細胞には cAMP を分解する PDE2 (cGMP-dependent PDE2) が存在していることを示した。さらに、NO 合成を阻害することで cGMP の蓄積を抑制し、PDE2 阻害により cAMP を蓄積し、その結果として Ca²⁺調節性開口放出において特徴的な二つの反応（初期相の抑制と遅発相の一過性の開口放出の増加）を引き起こすことも示した。Wortmannin による PI3K の阻害、AKT-inh による Akt の阻害も Ca²⁺調節性開口放出において同様の二つの特徴的な反応を引き起こした。このことは胃幽門腺粘液細胞において PPAR α の活性化が NOS1 を介した NO を産生するのに重要な因子であることを示唆している。

本章で使用した AACOCF₃ はアラキドン酸の非代謝性のアナログであり、PLA₂ の阻害薬でもある。AACOCF₃ は内因性のアラキドン酸産生を阻害することより、PGs、トロンボキサンおよびロイコトリエンのようなアラキドン酸カスケードの産生物が NO の産生に関与しないことが考えられる。AACOCF₃ は胃幽門腺粘液細胞において PI3K/Akt を介して NOS1 をリン酸化し NO を産生した。PPAR α 活性化による NO 合成が心筋⁴³⁾および内皮細胞^{44,45)}において報告され、PPAR γ の活性化も内皮細胞において NO 合成に関与している²⁴⁾。これらより、アラキドン酸は胃幽門腺粘液細胞において NO を産生するのに重要な鍵となる因子であることを示唆した。

5. 結語

胃幽門腺粘液細胞において PPAR α 活性化は PI3K/Akt を介して NOS1 をリン酸化し、さらに NO を産生し cGMP を蓄積した。胃幽門腺粘液細胞において PPAR α /PI3K/Akt/NOS1 シグナル経路による NO 産生が Ca²⁺調節性開口放出維持に重要であることが示唆された。

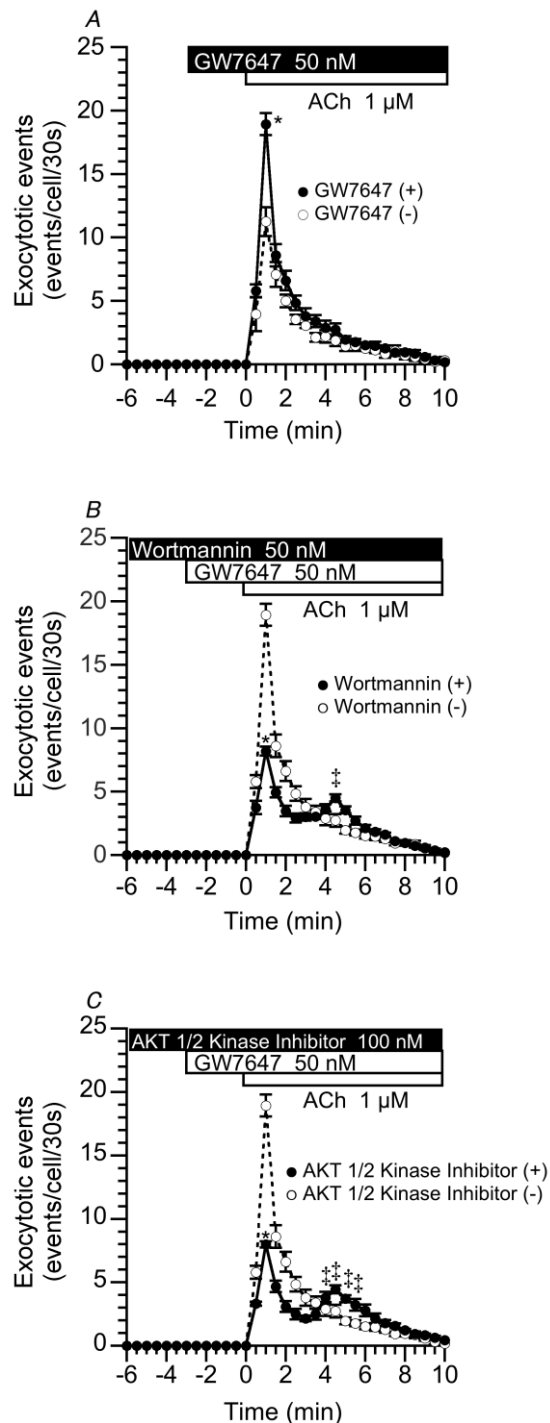


Fig. 25 Effects of PPAR α on the Ca²⁺-regulated exocytotic events stimulated by ACh. ACh (1 μ M) increased the frequency of exocytotic events in antral mucous cells: an initial phase followed by a late phase. A: GW7647 (50 nM) enhanced the ACh-stimulated initial phase. GW6471 (5 μ M) abolished the enhancement of initial phase and produced the delayed, but transient, increase in the late phase stimulated by GW7647 plus ACh. B: Wortmannin (50 nM) abolished the enhancement of initial phase and produced the delayed, but transient, increase in the late phase stimulated by GW7647 plus ACh. C: AKT-inh (100 nM) abolished the enhancement of initial phase and produced the delayed, but transient, increase in the late phase stimulated by GW7647 plus ACh. *Significantly different from the corresponding values and ‡significantly different from the value at 3 min (Fig. 25A), 3.5 min (Fig. 25B) or 3 min (Fig. 25C) from the start of ACh stimulation, respectively ($P < 0.05$).

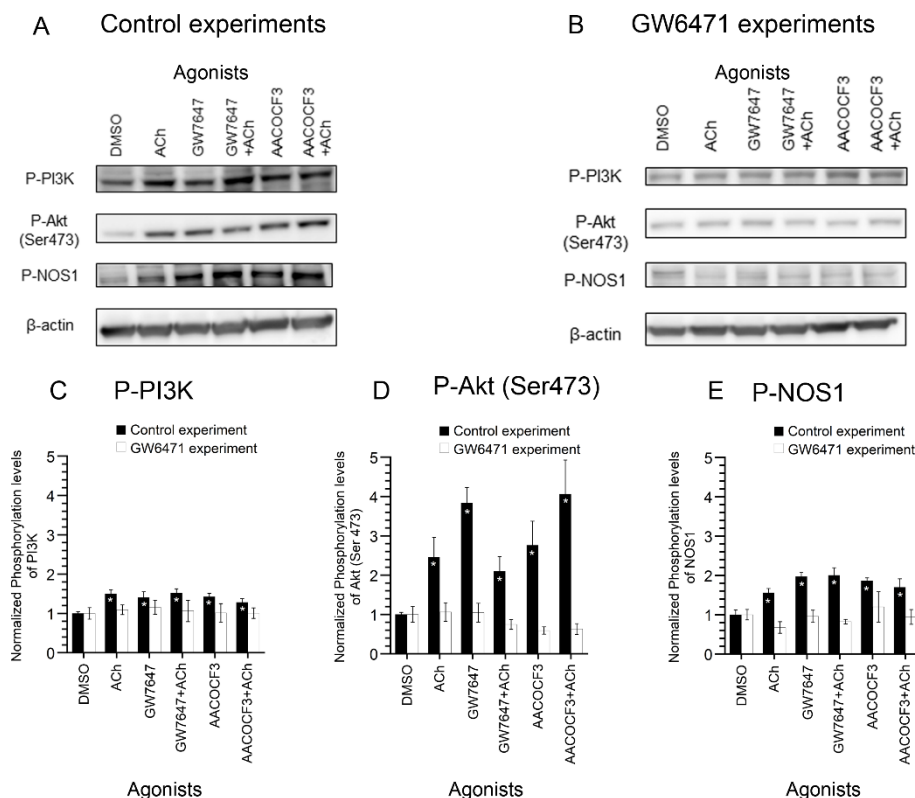


Fig. 26 P-PI3K, P-Akt (Ser473), and P-NOS1 of antral mucosa stimulated by agonists. Agonists used were ACh (1 μ M), GW7647 (50 nM), GW7647 plus ACh, AACOCF3 (1 μ M), and AACOCF3 plus ACh. We used DMSO as the vehicle control. Panels A & B shows representative Western blotting for P-PI3K, P-Akt (Ser473), P-NOS1, and β -actin in antral mucosae. A: Control experiments. The addition of each agonist enhanced the bands of P-PI3K, P-Akt (Ser473), and P-NOS1. B: GW6471 (5 μ M) experiments. The agonists did not enhance three bands in the presence of GW6471. C, D, E: The relative changes in the band densities of P-PI3K (C) (n = 5; Control experiment, n = 3; GW6471 experiment), P-Akt (Ser473) (D) (n = 4; Control experiment, n = 3; GW6471 experiment), and P-NOS1 (E) (n = 4; Control experiment, n = 3; GW6471 experiment) normalized by the corresponding β -actin bands. The stimulation with agonists significantly enhanced the band densities of P-PI3K, P-Akt (Ser473), and P-NOS1 (marked as ■). The enhancement was abolished by the prior treatment of GW6471 (marked as □). *Significantly different from the corresponding values (P < 0.05).

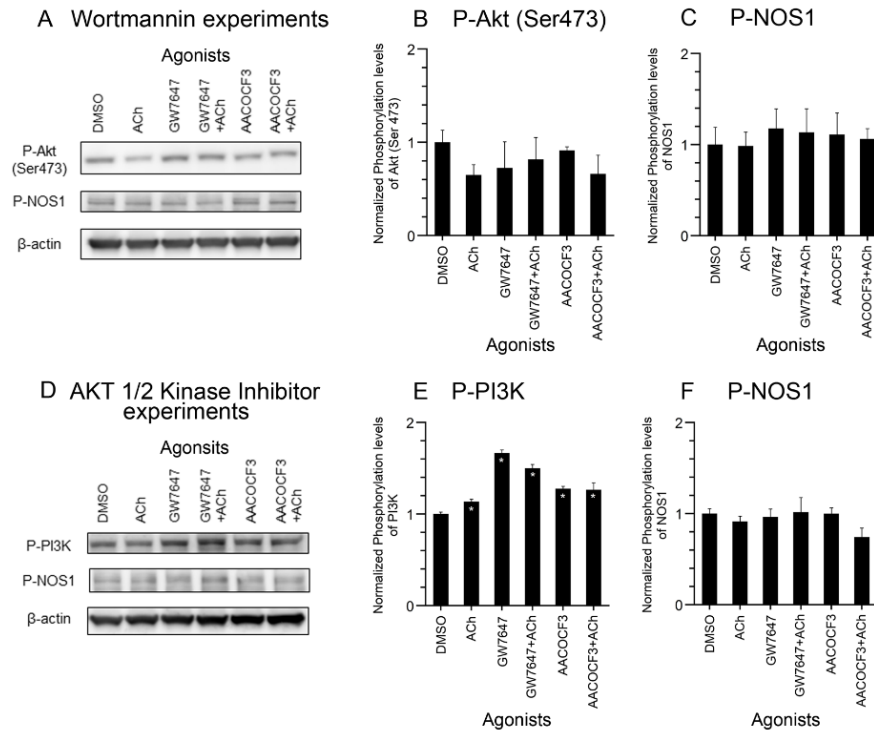


Fig. 27 Effects of wortmannin and AKT-inh on P-PI3K, P-Akt (Ser473), and P-NOS1. A, B, C: Wortmannin (50 nM) experiments. (A) Representative Western blotting for P-Akt (Ser473) and P-NOS1. The stimulation with agonists did not enhance the band of P-Akt (Ser473) and P-NOS1. (B) The relative changes in the band densities of Akt (Ser473) ($n = 3$) normalized by the corresponding β -actin bands. (C) The relative changes in the band densities of NOS1 ($n = 3$) normalized by the corresponding β -actin bands. The agonists induced no significant changes in the band densities of P-Akt (Ser473) and P-NOS1 in the presence of wortmannin. D, E, F: AKT-inh (100 nM) experiments. (D) Representative Western blotting for P-PI3K and P-NOS1. The stimulation with agonists enhanced the band of P-PI3K, but not those of P-NOS1. (E) The relative changes in the band densities of P-PI3K ($n = 3$) normalized by the corresponding β -actin bands. The agonists significantly increased the band densities of P-PI3K. (F) The relative changes in the band densities of P-NOS1 ($n = 3$) normalized by the corresponding β -actin bands. The agonists did not change the band densities of P-NOS1. Thus, AKT-inh inhibited the increases in the P-NOS1 density, but did not those in P-PI3K. *Significantly different from the corresponding values ($P < 0.05$).

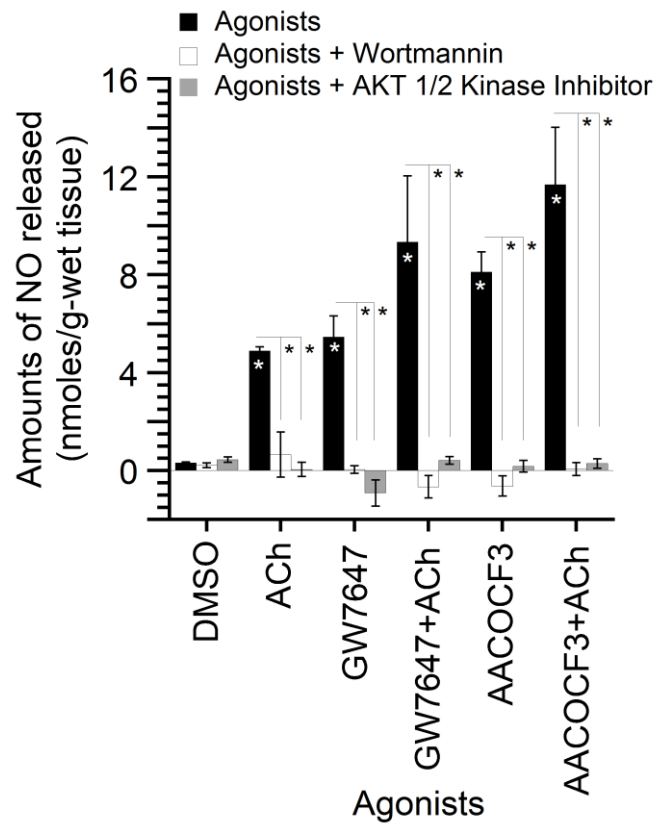


Fig. 28 The amounts of NO released from the antral mucosae. Stimulation with the agonists (ACh (1 μ M), GW7647 (50 nM), GW7647 plus ACh, AACOCF3 (1 μ M), and AACOCF3 plus ACh) increased the amounts of NO released in the stripped antral mucosa. Wortmannin (50 nM) and AKT-inh (100 nM) inhibited these increases in the amounts of NO released stimulated with the agonists. *Significantly different from the corresponding values ($P < 0.05$).

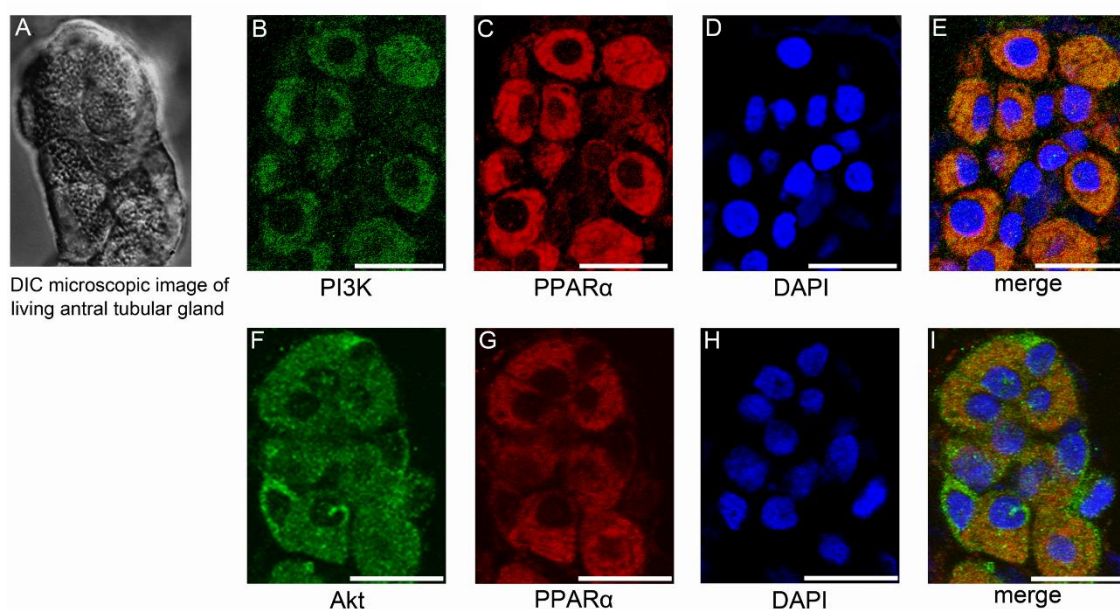


Fig. 29 Immunofluorescence examinations of PI3K, Akt, and PPAR α in antral mucous cells.

A: The differential interference contrast light-microscopic images of living antral tubular gland. B: Immunofluorescence image for PI3K. The cytoplasm of the antral mucous cell was positively stained for PI3K. C: Immunofluorescence image for PPAR α . The cytoplasm of the antral mucous cell was positively stained for PPAR α . D: DAPI staining. E: Merged Figs. 29B-D. PI3K and PPAR α were co-localized in the cytoplasm of the antral mucous cell. F: Immunofluorescence image for Akt. The cytoplasm of the antral mucous cell was positively stained for Akt. G: Immunofluorescence image for PPAR α . The cytoplasm of the antral mucous cell was positively stained for PPAR α . H: DAPI staining. I: Merged Figs. 29F-H. Akt and PPAR α were co-localized in the cytoplasm of the antral mucous cell. Scale bars represent 20 μ m.

総括

本研究では、胃幽門腺粘液細胞における Ca^{2+} 調節性開口放出の $\text{PPAR}\alpha$ による修飾機構を明らかにした。胃幽門腺粘液細胞における Ca^{2+} 調節性開口放出は様々な物質により修飾を受けている⁶⁻¹⁶⁾。 $\text{PPAR}\alpha$ もその一つであるが、最終的な修飾物質は NO/cGMP であることを本研究で明らかにした。また、 Ca^{2+} 調節性開口放出における cGMP のターゲットは ATP 依存性プライミングであり、 ATP 依存性プライミングの促進効果はすでに明らかにされている¹³⁾。第1章第1節では、 cGMP の ATP 依存性プライミングの促進を確かめる目的で、プライミングに関わる顆粒膜蛋白 SV2A に結合するレベチラセタムの Ca^{2+} 調節性開口放出に対する効果について検討した。レベチラセタムはプライミング顆粒を減少させることで Ca^{2+} 調節性開口放出の初期相を抑制し、かつ、8-Bromo- cGMP (8BrcGMP、細胞膜透過性の cGMP アナログ) による Ca^{2+} 調節性開口放出の初期相の増強も抑制した。この結果は cGMP が胃幽門腺粘液細胞 Ca^{2+} 調節性開口放出における ATP 依存性プライミングをターゲットにしていることを示している。第1章第2節では PKG を阻害することで Ca^{2+} 調節性開口放出に対する効果について検討した。 PKG を阻害するために Rp8BrPETcGMPS (PKG 阻害薬) を用いた。 PKG 阻害薬は Ca^{2+} 調節性開口放出の初期相を 30%程度抑制させ、かつ、8BrcGMP による Ca^{2+} 調節性開口放出の初期相の増強を消失させた。しかし同時に PKG 阻害薬は遅発相において一過性の開口放出の増加を引き起こした。この遅発相の一過性の開口放出の増加は PDE2 (cGMP -dependent PDE2) 阻害による cAMP の蓄積により引き起こされていることを明らかにした。この結果は重要で、胃幽門腺粘液細胞において、 cGMP の蓄積を起こすシグナルの抑制は、 Ca^{2+} 調節性開口放出において初期相の抑制と遅発相の一過性の開口放出の増加という二つの特徴的な反応を引き起こすことを示している (Fig. 30)。この結果を用いて、 $\text{PPAR}\alpha$ によるシグナル経路を第2章で明らかにした。

胃幽門腺粘液細胞における Ca^{2+} 調節性開口放出の修飾経路の一つに、 $\text{PPAR}\alpha$ を介した経路がある¹⁴⁾。この経路は Ca^{2+} 調節性開口放出の維持に重要な役割を果たしている。第2章第1節では $\text{PPAR}\alpha$ による胃幽門腺粘液細胞 Ca^{2+} 調節性開口放出の増強機構を明らかにした。 $\text{PPAR}\alpha$ 活性化は NOS1 を介して NO を産生し、さらに NO は cGMP 蓄積を介し、 Ca^{2+} 調節性開口放出の初期相を増強していた。しかも $\text{PPAR}\alpha$ 活性化による胃幽門腺粘液細胞 Ca^{2+} 調節性開口放出の初期相の増強は ACh 単独刺激時にも起こっていることから、胃幽門腺粘液細胞において、オートクリン機構として Ca^{2+} 調節性開口放出を維持していることが明らかとなった。さらに、 $\text{PPAR}\alpha$ の生理的なアゴニストであるアラキドン酸も NOS1/NO/cGMP を介して胃幽門腺粘液細胞 Ca^{2+} 調節性開口放出の初期相を増強する。このことは、アラキドン酸が生理的条件下において、このオートクリン機構を活性化していることを示してい

るが、現在のところ、胃幽門腺粘液細胞において ACh によるアラキドン酸の増加は証明出来ていない。現在、この部分を解明する実験を進めている。第 2 章第 2 節では NOS1 の活性化機構について検討した。PPAR α アゴニストは NOS1 のリン酸化を引き起こすことで NO 産生を活性化していた。さらに PPAR α による NOS1 のリン酸化は PI3K のリン酸化、Akt のリン酸化を介していた。PI3K、Akt の抑制は PPAR α による NO 産生を抑制し、Ca²⁺調節性開口放出における特徴的な二つの反応（初期相の抑制と遅発相の一過性の開口放出の増加）を引き起こした。このように、PPAR α /PI3K/Akt/NOS1 のシグナル経路による NO 産生が Ca²⁺調節性開口放出の維持に重要であることが示された（Fig. 31）。

今回の一連の研究で、PPAR α による Ca²⁺調節性開口放出の修飾機構を解明することができた。しかし、PPAR α を活性化するためのシグナル物質として、アラキドン酸を考えているが、未だ明らかにされていない。今後の研究課題であり、現在取り組んでいる。

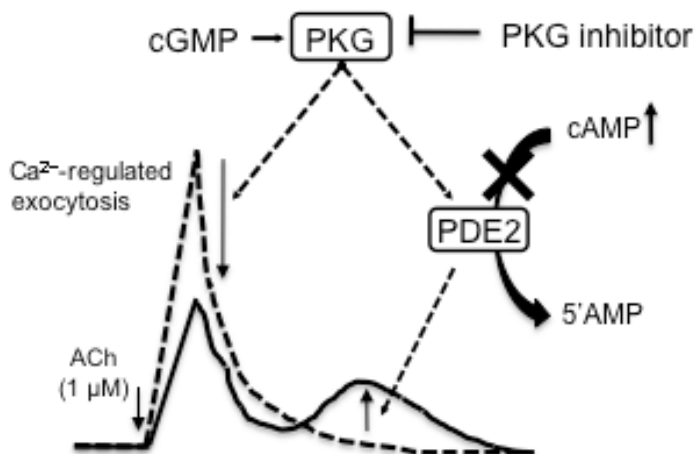


Fig. 30 Schematic diagram of the inhibition of cGMP signal in antral mucous cells. Inhibition of PKG evoked two characteristic responses in the Ca^{2+} -regulated exocytotic events of antral mucous cells; abolishing the enhancement of initial phase and producing the delayed, but transient, increase in the late phase. The delayed, but transient, increase in the late phase was evoked by cAMP accumulation, which was induced by the inhibition of cGMP-dependent PDE2.

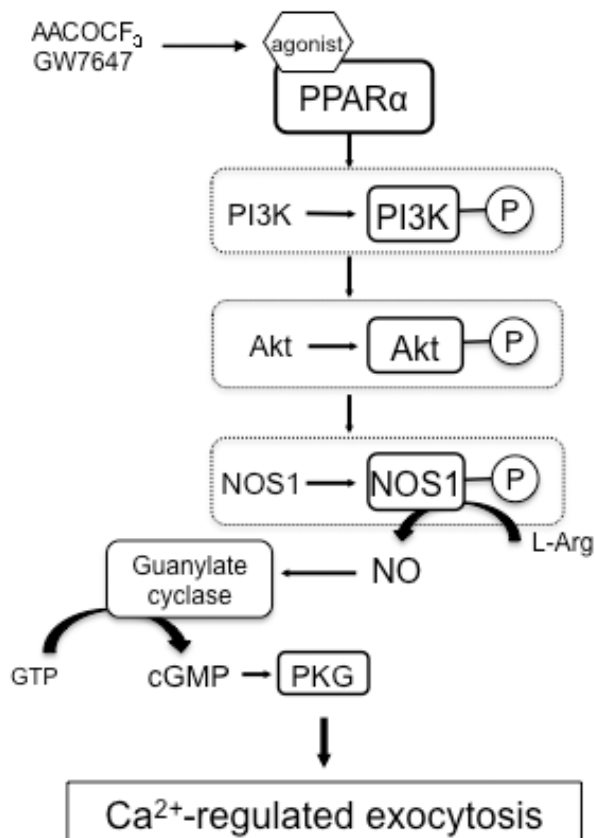


Fig. 31 The enhancement of Ca^{2+} -regulated exocytosis mediated via PI3K/Akt/NOS1 signal stimulated by PPAR α in antral mucous cells. AACOCF₃ and GW7647 stimulate PPAR α leading to NOS1 phosphorylation via PI3K/Akt phosphorylation. The phosphorylated NOS1 produces NO, which accumulates cGMP. cGMP enhances the Ca^{2+} -regulated exocytosis in antral mucous cells.

組織化学染色法（カラー附図）

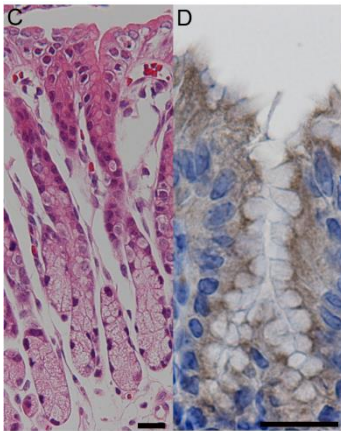


Fig. 7C, D

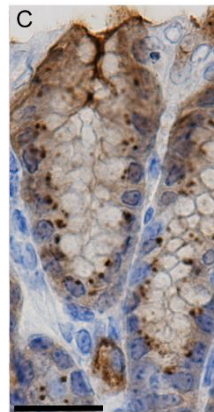


Fig. 15C

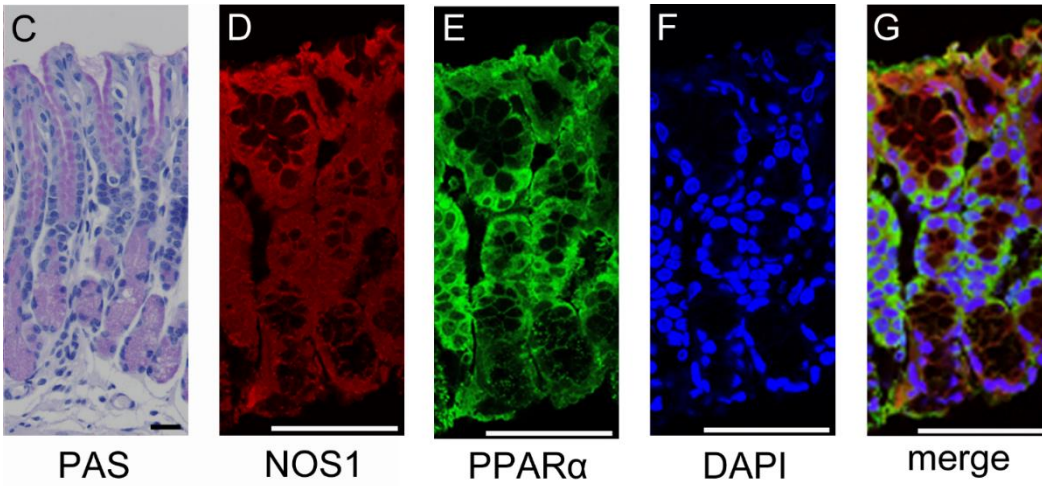


Fig. 23 C-G

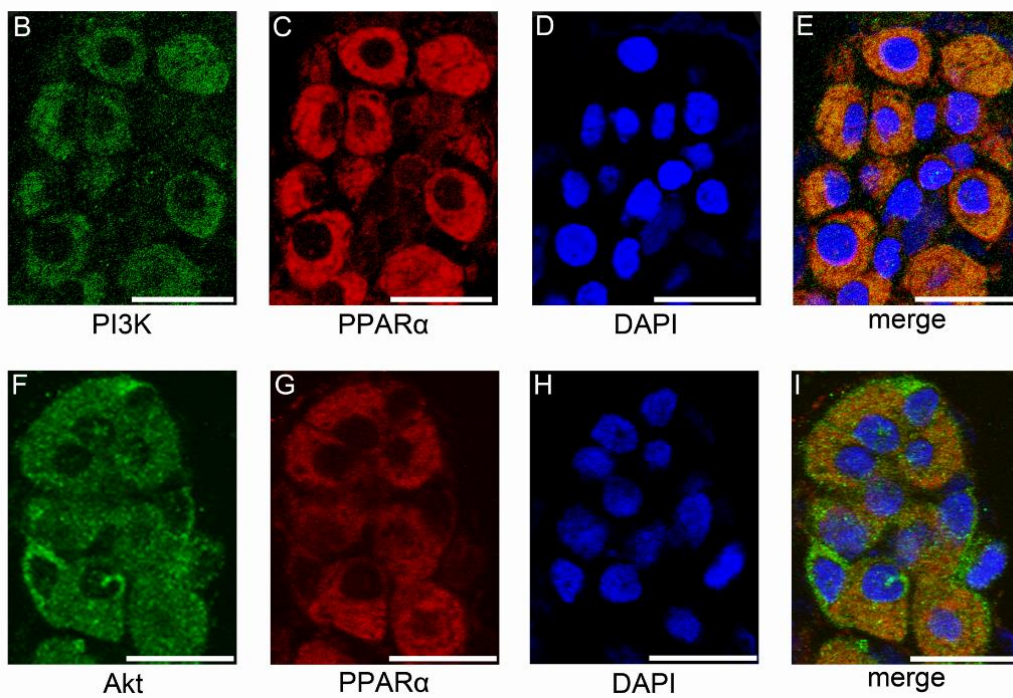


Fig. 29 B-I

論文目録

- 1) Harada S, Tanaka S, Takahashi Y, Matsumura H, Shimamoto C, Nakano T, Kuwabara H, Sawabe Y, Nakahari T. Inhibition of Ca^{2+} -regulated exocytosis by levetiracetam, a ligand for SV2A, in antral mucous cells of guinea pigs.
Eur J Pharmacol. 721: 185-192 (2013).
- 2) Tanaka S, Tanaka R, Harada S, Kohda Y, Matsumura H, Shimamoto C, Sawabe Y, Marunaka Y, Kuwabara H, Takahashi Y, Ito S, Nakahari T. A PKG inhibitor increases Ca^{2+} -regulated exocytosis in guinea pig antral mucous cells: cAMP accumulation via PDE2A inhibition.
Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 304: G773-G780 (2013).
- 3) Tanaka S, Sugiyama N, Takahashi Y, Mantoku D, Sawabe Y, Kuwabara H, Nakano T, Shimamoto C, Matsumura H, Marunaka Y, Nakahari T. PPAR α autocrine regulation of Ca^{2+} -regulated exocytosis in guinea pig antral mucous cells: NO and cGMP accumulation.
Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 307: G1169-G1179 (2014).
- 4) Tanaka S, Hosogi S, Sawabe Y, Shimamoto C, Matsumura H, Inui T, Marunaka Y, Nakahari T. PPAR α induced NOS1 phosphorylation via PI3K/Akt in guinea pig antral mucous cells: NO-enhancement in Ca^{2+} -regulated exocytosis
Biomedical Research, Vol. 37, No. 3, June 2016, in press.

謝 辞

本研究を遂行するとともに本稿をまとめるにあたり、終始懇切なる御指導御鞭撻を賜りました、松村 人志 教授（大阪薬科大学 薬物治療学研究室）に深甚なる謝意と敬意を表します。

本研究の遂行に際し、直接御指導を賜りました、中張 隆司 特任教授（京都府立医科大学大学院 細胞生理学）および島本 史夫 教授（大阪薬科大学 薬物治療学Ⅱ研究室）に深く感謝致します。

また、本研究を進めるにあたって、種々のお力添えおよび有益なご助言を頂戴しました、幸田 祐佳 准教授（大阪薬科大学 薬物治療学研究室）、伊東 重徳 准教授（大阪医科大学 化学 生体分子学教室）、桑原 宏子 講師（大阪医科大学 病理学教室）、細木 誠之 講師（京都府立医科大学大学院 細胞生理学）に心より感謝の意を表します。

最後に、本研究に多大なる御協力を頂戴しました、大阪薬科大学 薬物治療学研究室員および薬物治療学Ⅱ研究室員の皆様に深く感謝致します。

なお、本研究の実施にあたって、大阪薬科大学研究振興基金（平成 25 年度研究助成）より一部研究支援頂きました。併せて、厚く御礼申し上げます。

引用文献

- 1) Forstner JF, Forstner GG : Gastrointestinal mucous. In: Physiology of the Gastrointestinal Tract, vol. 2 (3rd ed.), edited by Johnson LR, Alpers DH, Christensen J, Jacobson ED, and Walsh JH, Raven Press, New York, pp. 1255-1283 (1994).
- 2) Südhof T.C. The synaptic vesicle cycle :a cascade of protein–protein interactions. *Nature* 375:645-653 (1995).
- 3) Nakahari T, Yoshida H, Imai Y, Fujiwara S, Ohnishi A, Shimamoto C, Katsu Ki. Inhibition of Ca^{2+} entry caused by depolarization in acetylcholine-stimulated antral mucous cells of guinea pig: G protein regulation of Ca^{2+} permeable channels. *Jpn J Physiol.* 49:545-50 (1999).
- 4) Nakahari T, Fujiwara S, Shimamoto C. $[\text{Na}^+]_i$, $[\text{K}^+]_i$ and $[\text{Cl}^-]_i$ regulation of exocytosis in guinea-pig antral mucous cells. *J Korean Med Sci.* 15 Suppl:S36-S37 (2000).
- 5) Segawa A, Terakawa S, Yamashina S, Hopkins CR. Exocytosis in living salivary glands: direct visualization by video-enhanced microscopy and confocal laser microscopy. *Eur J Cell Biol.* 54:322-330 (1991).
- 6) Fujiwara S, Shimamoto C, Katsu K, Imai Y and Nakahari T Isosmotic modulation of Ca^{2+} -regulated exocytosis in guinea-pig antral mucous cells: role of cell volume. *J Physiol.* 516:85-100 (1999).
- 7) Nakahari T, Fujiwara S, Shimamoto C, Kojima K, Katsu K and Imai Y. cAMP modulation of Ca^{2+} -regulated exocytosis in ACh-stimulated antral mucous cells of guinea pig. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 282:G844-G856 (2002).
- 8) Ohnishi A, Shimamoto C, Katsu K, Ito S, Imai Y and Nakahari T. EP1 and EP4 receptors mediate exocytosis evoked by prostaglandin E2 in guinea-pig antral mucous cells. *Exp Physiol.* 86:451-460 (2001).
- 9) Shimamoto C, Fujiwara S, Kato M, Ito S, Katsu K, Mori H and Nakahari T. Inhibition of ACh-stimulated exocytosis by NSAIDs in guinea pig antral mucous cells: autocrine regulation of mucin secretion by PGE2. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 288:G39-G47 (2005).
- 10) Shimamoto C, Nakanishi Y, Katsu K, Nakano T, Kubota T, Mori H and Nakahari T. Prostaglandin E2 release in gastric antral mucosa of guinea-pigs: basal PGE2 release by cyclo-oxygenase 2 and ACh-stimulated PGE2 release by cyclo-oxygenase 1. *Exp Physiol.* 91:1015-1024 (2006).
- 11) Shimamoto C, Umegaki E, Katsu K, Kato M, Fujiwara S, Kubota T and Nakahari T. $[\text{Cl}^-]_i$ modulation of Ca^{2+} -regulated exocytosis in ACh-stimulated antral mucous cells of guinea pig.

Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 293:G824-G837 (2007).

- 12) Fujiwara S, Shimamoto C, Nakanishi Y, Katsu K, Kato M and Nakahari T. Enhancement of Ca^{2+} -regulated exocytosis by indomethacin in guinea-pig antral mucous cells: arachidonic acid accumulation. *Exp Physiol*. 91:249-259 (2006).
- 13) Saad AH, Shimamoto C, Nakahari T, Fujiwara S, Katsu K and Marunaka Y. cGMP modulation of ACh-stimulated exocytosis in guinea pig antral mucous cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 290:G1138-G1148 (2006).
- 14) Sawabe Y, Shimamoto C, Sakai A, Kuwabara H, Saad AH, Nakano T, Takitani K, Tamai H, Mori H, Marunaka Y and Nakahari T. Peroxisome proliferation activation receptor alpha modulation of Ca^{2+} -regulated exocytosis via arachidonic acid in guinea-pig antral mucous cells. *Exp Physiol*. 95:858-868 (2010).
- 15) Lynch B.A., Lambeng N, Nocka K, Kensel-Hammes P, Bajjalieh S.M. Matagne A, Fuks B. The synaptic vesicle protein SV2A is the binding site for the antiepileptic drug levetiracetam. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 101:9861-9866 (2004).
- 16) Xu T, Bajjalieh S.M. SV2 modulates the size of the readily releasable pool of secretory vesicles. *Nature Cell Biology*. 3:691-698 (2001).
- 17) Yao J, Bajjalieh SM. Synaptic vesicle protein 2 binds adenine nucleotides. *J Biol Chem*. 283:20628-20634 (2008).
- 18) Chang WP, Südhof TC. SV2 renders primed synaptic vesicles competent for Ca^{2+} -induced exocytosis. *J Neurosci*. 29:883-897 (2009).
- 19) Custer KL, Austin NS, Sullivan JM, Bajjalieh SM. Synaptic vesicle protein 2 enhances release probability at quiescent synapses. *J Neurosci*. 26:1303-1313 (2006).
- 20) Brecht DS. Nitric oxide signaling in brain: potentiating the gain with YC-1. *Mol Pharmacol*. 63:1206-1208 (2003).
- 21) Li B, Fu Y, Jiang D, Xie J, Cheng J, Li G, Hamid MI, Yi X. Cyclic GMP as a second messenger in the nitric oxide-mediated conidiation of the mycoparasite *Coniothyrium minitans*. *Appl Environ Microbiol*. 76:2830-2836 (2010).
- 22) Yu D, Eldred WD. Glycine and GABA interact to regulate the nitric oxide/cGMP signaling pathway in the turtle retina. *Vis Neurosci*. 22:825-838 (2005).
- 23) LaPointe MC, Sitkins JR. Phospholipase A2 metabolites regulate inducible nitric oxide synthase in myocytes. *Hypertension*. 31:218-224 (1998).
- 24) Polikandriotis JA, Mazzella LJ, Rupnow HL, Hart CM. Peroxisome proliferator-activated

- receptor gamma ligands stimulate endothelial nitric oxide production through distinct peroxisome proliferator-activated receptor gamma-dependent mechanisms. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 25:1810-1816 (2005).
- 25) Snider RM, McKinney M, Forray C, Richelson E. Neurotransmitter receptors mediate cyclic GMP formation by involvement of arachidonic acid and lipoxygenase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 81:3905-3909 (1984).
 - 26) Watson EL, Jacobson KL, Singh JC, DiJulio DH. Arachidonic acid regulates two Ca^{2+} entry pathways via nitric oxide. *Cell Signal.* 16:157-165 (2004).
 - 27) Wicher D, Messutat S, Lavialle C, Lapied B. A new regulation of non-capacitative calcium entry in insect pacemaker neurosecretory neurons. Involvement of arachidonic acid, no-guanylyl cyclase/cGMP, and cAMP. *J Biol Chem.* 279:50410-50419 (2004).
 - 28) Moraes LA, Piqueras L, Bishop-Bailey D. Peroxisome proliferator-activated receptors and inflammation. *Pharmacol Ther.* 110:371-85 (2006).
 - 29) Meehan AL, Yang X, McAdams BD, Yuan L, Rothman SM. A new mechanism for antiepileptic drug action: vesicular entry may mediate the effects of levetiracetam. *J Neurophysiol.* 106:1227-1239 (2011)
 - 30) Nowack A, Malarkey E.B, Yao J, Bleckert A, Hill J, Bajjalieh S.M. Levetiracetam reverses synaptic deficits produced by over expression of SV2A. *Plos One* 6 (12), e29560, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0029560>. (2011).
 - 31) Nowack A, Yao J, Custer KL, Bajjalieh SM. SV2 regulates neurotransmitter release via multiple mechanisms. *Am J Physiol Cell Physiol.* 299:C960-C967 (2010).
 - 32) Lugnier C. Cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE) superfamily: a new target for the development of specific therapeutic agents. *Pharmacol Ther.* 109:366-398 (2006).
 - 33) Bender AT, Beavo JA. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular regulation to clinical use. *Pharmacol Rev.* 58:488-520 (2006).
 - 34) Komine N, Shimomura H. Characterization of cGMP-related phosphodiesterase isoenzymes in rat salivary glands. *Odontology.* 90:7-12 (2002).
 - 35) Imai A, Nashida T, Shimomura H. Characterization of cyclic AMP phosphodiesterase isozymes in rat parotid gland. *Arch Oral Biol* 40:165-168 (1995).
 - 36) Eckly AE, Lugnier C. Role of phosphodiesterases III and IV in the modulation of vascular cyclic AMP content by the NO/cyclic GMP pathway. *Br J Pharmacol.* 113:445-50 (1994).
 - 37) Moneer Z, Dyer JL, Taylor CW. Nitric oxide co-ordinates the activities of the capacitative and non-capacitative Ca^{2+} -entry pathways regulated by vasopressin. *Biochem J.* 370:439-448

(2003).

- 38) Forman BM, Chen J, Evans RM. Hypolipidemic drugs, polyunsaturated fatty acids, and eicosanoids are ligands for peroxisome proliferator-activated receptors alpha and delta. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 94:4312-4317 (1997).
- 39) Keller H, Dreyer C, Medin J, Mahfoudi A, Ozato K, Wahli W. Fatty acids and retinoids control lipid metabolism through activation of peroxisome proliferator-activated receptor-retinoid X receptor heterodimers. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 90:2160-2164 (1993).
- 40) Kliewer SA, Sundseth SS, Jones SA, Brown PJ, Wisely GB, Koble CS, Devchand P, Wahli W, Willson TM, Lenhard JM, Lehmann JM. Fatty acids and eicosanoids regulate gene expression through direct interactions with peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 94:4318-4323 (1997).
- 41) Pégrier JP, Le May C, Girard J. Control of gene expression by fatty acids. *J Nutr*. 134:2444S-2449S (2004).
- 42) Peraza MA, Burdick AD, Marin HE, Gonzalez FJ, Peters JM. The toxicology of ligands for peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR). *Toxicol Sci*. 90:269-295 (2006).
- 43) Bulhak AA, Jung C, Ostenson CG, Lundberg JO, Sjöquist PO and Pernow J PPAR-alpha activation protects the type 2 diabetic myocardium against ischemia-reperfusion injury: involvement of the PI3-Kinase/Akt and NO pathway. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 296:H719-H727 (2009).
- 44) Okayasu T, Tomizawa A, Suzuki K, Manaka K and Hattori Y PPAR α activators upregulate eNOS activity and inhibit cytokine-induced NF- κ B activation through AMP-activated protein kinase activation. *Life Sci* 82:884-891 (2008).
- 45) Wang Y, Yang Q, Yan JT, Zhao C, Cianflone K and Wang DW Effects of bezafibrate on the expression of endothelial nitric oxide synthase gene and its mechanisms in cultured bovine endothelial cells. *Atherosclerosis* 187:265-273 (2006).