

原 著

胃粘膜上皮細胞の trefoil factor family 発現に及ぼす
indomethacin の影響

獨協医科大学 内科学 (消化器)

小板橋綾子 島田 忠人

要 旨 Trefoil factor family (TFF) に属するペプチド (TFF 1, TFF 2, TFF 3) は, 消化管粘膜の健全性維持, 傷害修復過程に重要な役割を果たしているが, その発現調節については不明の部分が多い. 本研究では, 胃癌由来細胞株である MKN45 細胞を用いて, 胃粘膜傷害の起因因子である NSAIDs の TFF 発現に対する影響をリアルタイム定量的 RT-PCR 法で解析した. MKN 45 細胞では, TFF 1 の発現レベルが最も高く, 次いで TFF 2 であり, TFF 3 の発現レベルは非常に低かった. Indomethacin は TFF 1, TFF 3 の発現に対しては有意な影響を与えず, TFF 2 の発現は濃度依存性に上昇させた. Indomethacin による TFF 2 発現誘導は他の胃癌由来細胞株 (AGS, JR) でも認められ, また, 他の NSAIDs (aspirin, NS-398) も MKN 45 細胞において TFF 2 発現を上昇させた. この indomethacin の効果は外来性の PGE 2 の投与では拮抗されなかった. 以上の結果から, NSAIDs はその COX 抑制作用とは別の機構を介して胃粘膜上皮細胞の TFF 2 発現を誘導していることが示唆された. NSAIDs の投与による TFF 2 発現レベルの上昇は, NSAIDs 起因性胃粘膜傷害の発生をある程度防御している可能性が考えられる.

Key Words: 非ステロイド性抗炎症薬 (NSAIDs), trefoil factor family, 胃粘膜傷害

緒 言

Trefoil factor family (TFF) は, 分子内に特徴的な三つ葉のクローバー様構造 (TFF domain) を有する一群のペプチドである¹⁾. TFF は消化管粘膜をはじめとして各種の粘液産生上皮に発現し, ムチンとともに粘膜の恒常性維持に重要な役割を果たしている²⁾. ヒトにおいてはこれまでに pS2, SP (spasmolytic polypeptide), ITF (intestinal trefoil factor) の3種の TFF ペプチドが報告されているが, 最近名称の統一が行われ, pS2, SP, ITF は, それぞれ, TFF 1, TFF 2, TFF 3 と呼称されることになった³⁾. 消化管粘膜においては, TFF 1, TFF 2 は主に胃粘膜に発現しており, TFF 3 は下部消化管での発現レベルが高い^{4,5)}.

TFF は粘液ゲル層でムチンと共同し粘液ゲルの安定性と強度を高めることで消化管粘膜傷害を防御している^{6,7)}. さらに TFF には上皮細胞の遊走促進作用 (motogenic effect) があり消化管上皮傷害の修復を促進してい

ることが報告されている^{8,9)}. TFF 1 は当初乳癌由来細胞株でエストロゲン誘導遺伝子として発見されたものであるが, 胃粘膜上皮細胞では TFF 1 遺伝子の発現はエストロゲンに影響されず¹⁰⁾, その発現調節機構は十分に解明されていない. TFF 2, TFF 3 の発現調節機構については, 更に不明の部分が多い.

一方, これまでの胃粘膜防御機構の研究において中心的であったのは prostaglandin (PG) および PG 産生系 (アラキドン酸カスケード) の触媒酵素である cyclooxygenase (COX) である^{11,12)}. COX には, ほとんどの細胞種で恒常的に発現している COX-1 と, 炎症性サイトカインや増殖因子により誘導される COX-2 の2種類のアイソフォームがあり, 胃粘膜での PG 産生に主に関与しているのは COX-1 である. PG は胃粘膜において, 粘液分泌促進, 胃粘膜血流増加などの機序を介して粘膜防御に重要な役割を果たしている^{13~15)}. 非ステロイド性抗炎症薬 (NSAIDs) は, 胃粘膜内の COX を抑制し, PG の合成を抑制することにより胃粘膜傷害を誘発する. しかし PG, COX 系と TFF との相互作用については解明されておらず, また, 胃粘膜での TFF が NSAIDs 投与で受ける影響についても不明である. そこで本研究において我々は, 胃粘膜上皮細胞の TFF 発現に及ぼす NSAIDs

平成 14 年 10 月 31 日受付, 平成 14 年 12 月 3 日受理

別刷請求先: 小板橋綾子

〒321-0293 栃木県下都賀郡壬生町北小林 880

獨協医科大学 内科学 (消化器)

(indomethacin) の影響について検討を行い, NSAIDs 起因性胃粘膜傷害の病態における TFF の意義について考察を行った。

方 法

1. 試 薬

Indomethacin は Sigma Aldrich (St. Louis, Missouri, USA), aspirin, nordihydroguaiaretic acid (NDGA) は和光純薬 (大阪), NS-398, prostaglandin E₂ (PGE₂) は Cayman Chemical (Ann Arbor, Michigan, USA) より購入した。Indomethacin, aspirin および NS-398 は dimethylsulfoxide (DMSO) (和光純薬) に溶解してストック溶液を作製し, 実験時は最終的に DMSO 濃度が 0.1% 以下になるように調整した。この濃度の範囲で DMSO 自体は実験の結果に有意な影響を与えなかった。

2. 細胞培養

ヒト胃癌由来細胞株である MKN45 細胞を用いた。一部の実験には同様にヒト胃癌由来細胞株である AGS 細胞および JR 細胞も使用した。これらの細胞は 10% fetal bovine serum (Invitrogen, California, USA) を添加した Ham's F-12 culture medium (Invitrogen) で培養した。

3. リアルタイム定量的 RT-PCR (reverse-transcription polymerase chain reaction)

TRIZOL 試薬 (Invitrogen) を用いて培養細胞より total RNA を抽出した。You-Prime First Strand Beads (Amersham Bioscience, Buckinghamshire, UK), oligo (dT) primer (Invitrogen) を用いて転写反応を行い cDNA を作製した。PCR 用のプライマーはそれぞれ既報の遺伝子塩基配列情報に基づいて設計した。本研究で使用したプライマーの塩基配列は表 1 に示す通りである。

リアルタイム定量的 RT-PCR は, SYBR Green PCR reagents (Applied Biosystems, California, USA) を用いて ABI PRISM 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems) にて行った¹⁶⁾。PCR は 95°C 10 分間の後, 95°C 15 秒及び 56°C 1 分間のサイクルを 40 回繰り返す条件で行った (two step PCR)。また定量的 PCR のスタンダードは, 通常の RT-PCR にて採取した PCR 産物を Qiaquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden, Germany) にて抽出し, 抽出物を段階的に希釈することで作製した。スタンダードカーブの例を図 1 に示すが, 広範囲に渡り直線的なスタンダードカーブを得ることが可能であった。各実験ごとにスタンダードカーブを作製

表 1 PCR プライマー配列

human TFF 1 (Gen Bank No. NM_003225)	Sence 5'-CAATGGCCACCATGGAGAAC-3'	Antisence 5'-AACGGTGTCTCGAAACAGC-3'	PCR 産物 188 bp
human TFF 2 (Gen Bank No. NM_005423)	Sence 5'-CCAAAGCAAGACTCGGATCAG-3'	Antisence 5'-CAGTCTTCCACAGACTTCGGG-3'	PCR 産物 161 bp
human TFF 3 (Gen Bank No. NM_003226)	Sence 5'-TGTCTGCAAACCAGTGTGCC-3'	Antisence 5'-GCATTCTGTCTTCTAGTCAGGG-3'	PCR 産物 158 bp
human β -actin (Gen Bank No. NM_001101)	Sence 5'-TTCCTGGCATGGAGTCCCT-3'	Antisence 5'-AGGAGGAGCAATGATCTTGATC-3'	PCR 産物 204 bp
rat TFF 1 (Gen Bank No. D 83231)	Sence 5'-GTGACCTGTGTGCGCCAT-3'	Antisence 5'-TTTTTCCTTGACTGCTGGG-3'	PCR 産物 140 bp
rat TFF 2 (Gen Bank No. M 97255)	Sence 5'-TGACGCCCTCCAACAGAAAG-3'	Antisence 5'-ACACATTGTTCCGACGCTTG-3'	PCR 産物 145 bp
rat TFF 3 (Gen Bank No. M 80826)	Sence 5'-TGTTGGCCTATCTCCAAGCC-3'	Antisence 5'-TGCAGAGGTTTGAAGACCA-3'	PCR 産物 150 bp
rat GAPDH (Gen Bank No. AF 106860)	Sence 5'-TGCACCACCAACTGCTTAG-3'	Antisence 5'-GGATGCAGGGATGATGTTC-3'	PCR 産物 177 bp

し, 試料中に含まれる対象遺伝子のコピー数を算出するとともに, 同一試料中の β -actin の発現についてもそれぞれの試料で検討し, 結果の標準化を行った。

4. レポーター遺伝子アッセイ

PCR により増幅したヒト TFF 2 遺伝子のプロモーター領域 (-936 から +15bp) をルシフェラーゼレポータープラスミド pGL3 (Promega, California, USA) に組み込み (pGL3-TFF2), レポーター遺伝子アッセイを行った。pGL3 に組み込まれた DNA 配列はシーケンシングにより確認した。MKN45 細胞を 24 穴プレートに培養し, Lipofectamine 2000 (Invitrogen) を用いて pGL3-TFF2 と pSV- β -galactosidase control vector (Promega)

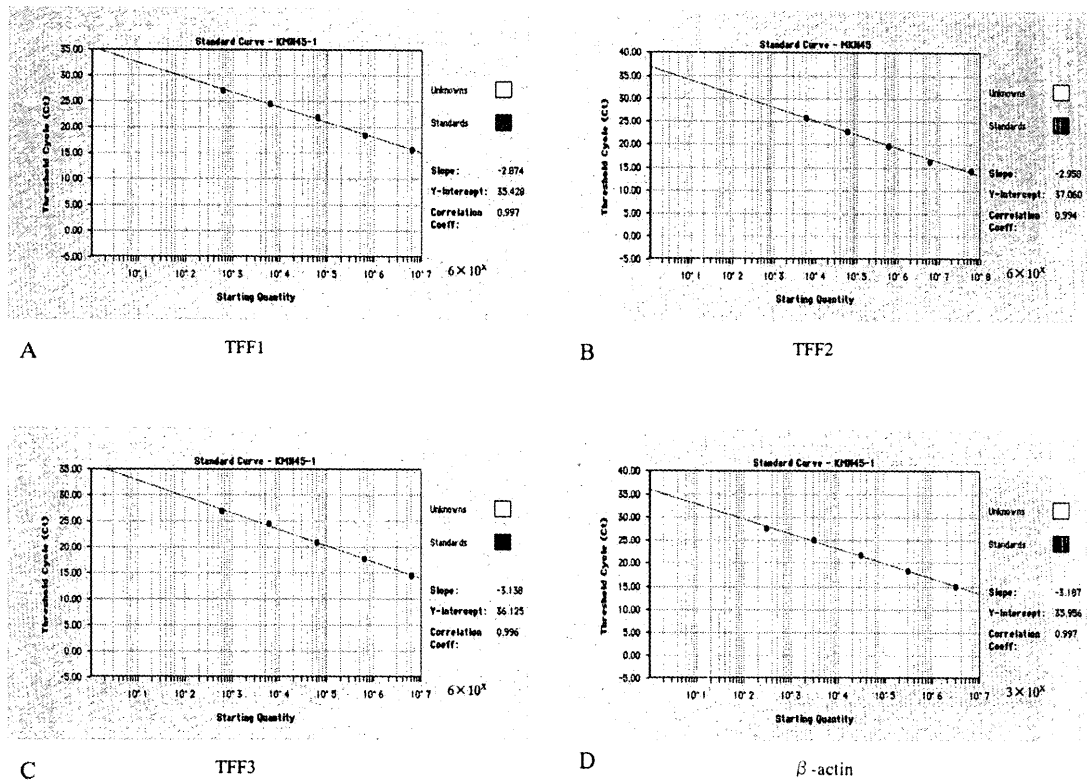


図1 リアルタイム定量的RT-PCRスタンダードカーブの製作例，横軸：遺伝子コピー数（対数表示），縦軸：Threshold cycle (Ct) (蛍光強度が測定光度以上になったPCRサイクル数) human TFF 1 (A), human TFF 2 (B), human TFF 3 (C), human β -actin (D)

を同時にトランスフェクションし，indomethacin投与24時間後に細胞を回収した．細胞溶解液中のルシフェラーゼ活性を測定するとともに，ガラクトシダーゼ活性も測定し，トランスフェクション効率の標準化を行った．

5. 統計処理方法

データは平均値 \pm 標準偏差で示した．3群以上のグループ間の比較には分散分析 (ANOVA) を行い，有意差が認められた場合はScheffe's testにより各群間の比較を行い有意差 ($P < 0.05$) を判定した．

結 果

1. MKN45細胞におけるTFF発現

表2に示すようにMKN45細胞ではTFF1の発現レベルが最も高く，次いでTFF2，TFF3の順であった．これら3種のTFFの相対的な発現比を表2の平均値から計算するとTFF1:TFF2:TFF3 = 617:12:1となった．

2. TFF発現に対するindomethacinの影響

MKN45細胞を異なる濃度のindomethacinの存在下で24時間インキュベートし，無処置群と比較したTFF

表2 MKN45細胞におけるTFF1，TFF2，TFF3の発現レベル

TFF1/ β -actin	117 \pm 12 (%)
TFF2/ β -actin	2.24 \pm 0.48 (%)
TFF3/ β -actin	0.19 \pm 0.07 (%)

n = 8

発現の変化をリアルタイム定量的RT-PCRにより検討した．図2Aに示すように，TFF1の発現は僅かな増加傾向を示すものの有意差は認められなかった．TFF2はindomethacin 10 μ M以上の濃度で有意に発現の増加を認め，60 μ Mにて約5.5倍であった (図2B)．TFF3では発現レベルに有意な変化は認められなかった (図2C)．

3. IndomethacinによるTFF2発現誘導の経時的観察

図3は，MKN45細胞をindomethacin (125 μ M) で0-24時間インキュベートした時のTFF2発現レベルの変化をみたものである．6時間後よりTFF2の有意な発現増加を認め，このシリーズの実験では24時間後に約2.6倍となった．

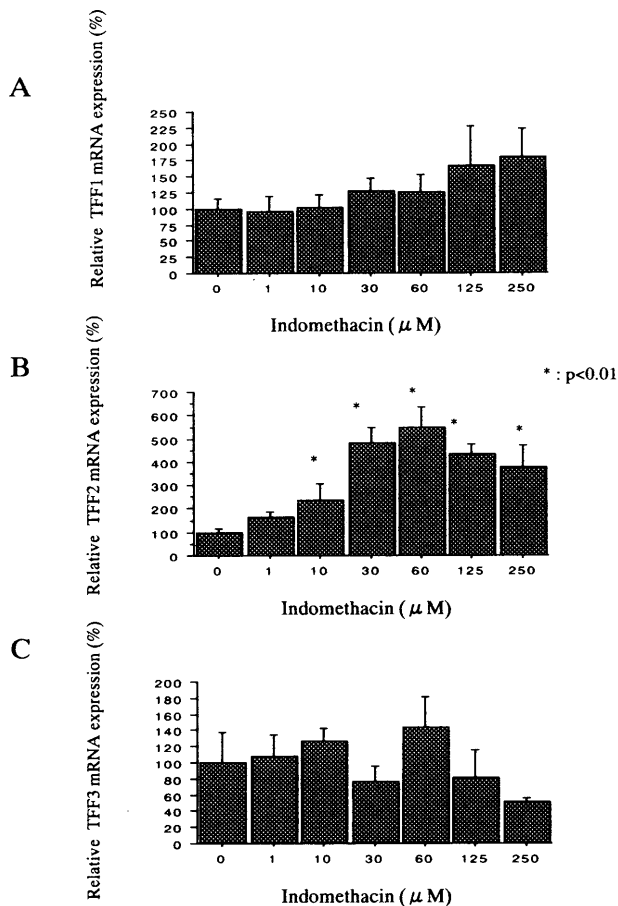


図2 MKN 45のTFF 1 (A), TFF 2 (B), TFF 3 (C), 発現に対するIndomethacinの影響 (24時間インキュベーション) $n = 4 \sim 6$ * $p < 0.01$ vs control

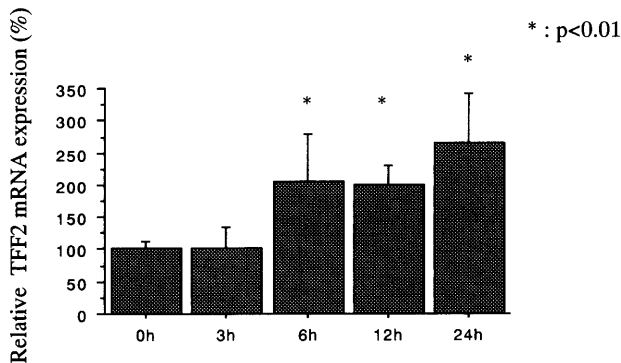


図3 Indomethacin (125 μM) 投与に対するTFF 2発現の経時の変化 $n = 4 \sim 5$ * $p < 0.01$ vs control

4. レポーター遺伝子アッセイ

TFF 2プロモーター配列を組み込んだプラスミドによるレポーター遺伝子アッセイでは、図4に示すようにindomethacinの濃度依存性にルシフェラーゼ活性の上昇を認め、indomethacinがTFF 2遺伝子の発現を増大させていることが確認された。

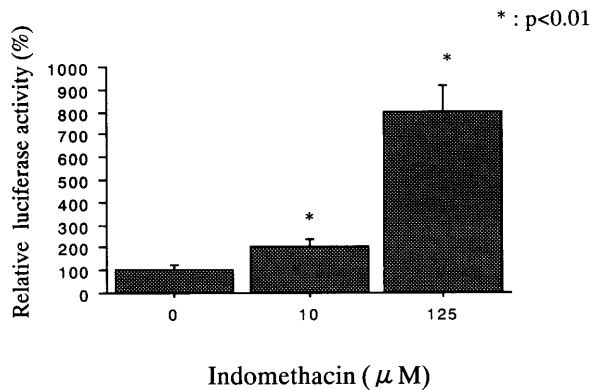


図4 レポーター遺伝子アッセイでみたTFF 2発現に対するIndomethacinの効果 $n = 4 \sim 5$ * $p < 0.01$ vs control

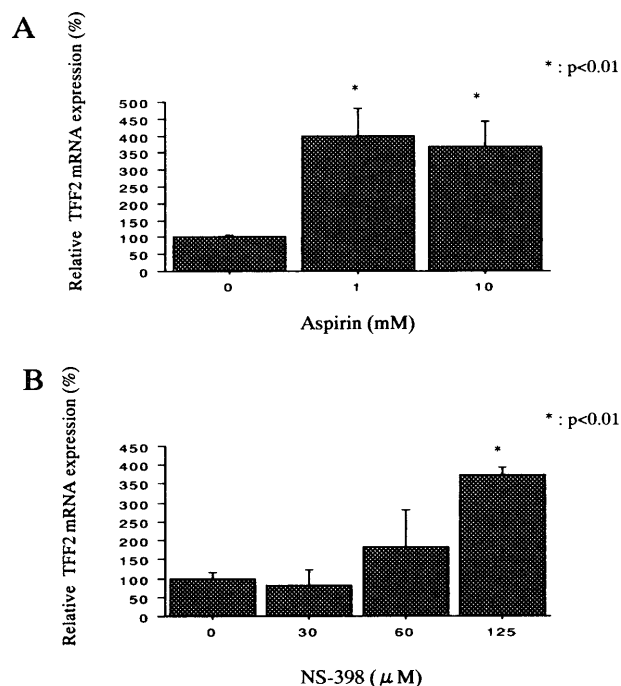


図5 TFF 2発現に対するAspirin, NS-398の影響 (24時間インキュベーション) $n = 4 \sim 6$ * $p < 0.01$ vs control

5. TFF 2発現に対するaspirin, NS-398の影響

次にindomethacin以外のNSAIDsとしてaspirin (非選択的COX阻害剤), NS-398 (COX-2選択的阻害剤)のTFF 2発現に対する影響を検討した. MKN 45細胞をaspirin 0, 1, 10 mM存在下で24時間インキュベートし, リアルタイム定量的RT-PCRにより測定した. 図5 Aに示すように, 1, 10 mM両方でTFF 2の発現増加を認めた. またNS-398では図5 Bに示すように, 125 μMで有意にTFF 2発現の増加を認めた.

6. TFF 2発現に対するPGE₂, NDGAの影響

IndomethacinによるTFF 2発現誘導の機序を探るため, 胃粘膜上皮細胞で産生される主要なPGである

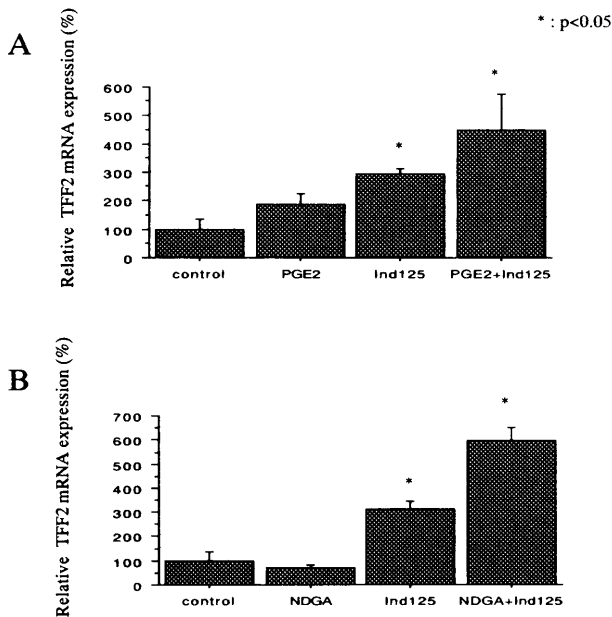


図6 Indomethacin (125 μ M) による TFF 2 発現上昇に対する PGE₂ (10 μ M) (A), NDGA (10 μ M) (B) の効果 (24 時間インキュベーション) n = 4~6 * p < 0.05 vs control

PGE₂ (20 μ M), およびアラキドン酸カスケードのもう一つの経路である lipoygenase (LOX) の阻害薬である NDGA の効果を検討した. 図6に示すように, 単独で投与した場合 PGE₂ は TFF 2 発現を上昇させる傾向であったが, NDGA には有意な影響は認められなかった. Indomethacin (125 μ M) による TFF 2 発現の上昇はこれらにより拮抗されることはなく, 逆にさらに TFF 2 の発現が上昇した.

7. AGS, JR 細胞の TFF 発現に対する indomethacin の影響

他の胃癌由来細胞株の TFF 発現を検討するため, AGS, JR 細胞を indomethacin 125 μ M で 24 時間インキュベート後リアルタイム定量的 RT-PCR にて測定した. 図7 B に示すように両細胞において indomethacin 存在下で TFF 2 発現は有意に上昇した.

考 察

本研究ではヒト胃粘膜上皮細胞のセルラインが確立していないため MKN 45 細胞細胞を胃粘膜上皮細胞のモデルとして使用し, TFF 発現に及ぼす indomethacin の効果について検討した. MKN 45 細胞では TFF 1 の発現レベルが最も高く, TFF 2 発現レベルは TFF 1 の 1/50 程度, TFF 3 の発現は微量であった (表2). Indomethacin (1 - 250 μ M) の投与は TFF 1, TFF 3 mRNA の発現に対しては有意な影響を与えなかったが, TFF 2 mRNA の

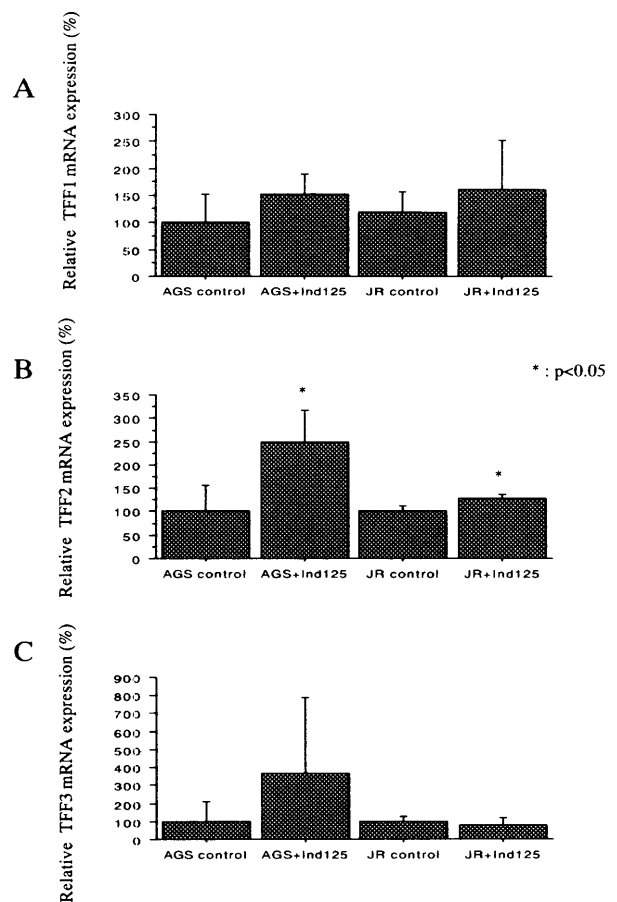


図7 AGS, JR 細胞の TFF 1 (A), TFF 2 (B), TFF 3 (C), 発現に対する Indomethacin (125 μ M) の影響 (24 時間インキュベーション) n = 4~6 * p < 0.05 vs control

発現を濃度依存性に上昇させた (図2). TFF 2 遺伝子のレポーター遺伝子アッセイにおいても同様に indomethacin による TFF 2 発現の増加が確認された (図4). MKN45 細胞での TFF 2 発現増大は他の NSAIDs (aspirin, NS-398) 投与時も認められ (図5), また, 他の胃癌由来細胞株 (AGS, JR) においても indomethacin による TFF 2 の発現誘導が認められた (図7).

TFF は消化管粘膜防御に関連する主要な因子の1つであり^{17,18)}, TFF 1, TFF 2, TFF 3 のうち胃粘膜においては TFF 1, TFF 2 が重要な役割を持つとされる^{19,20)}. これら3種の TFF 遺伝子は第21番染色体上に並んで存在しているが²¹⁾, その発現調節については不明の部分が多い. 本研究より, 胃粘膜傷害の重要な危険因子である NSAIDs が, 胃粘膜上皮細胞の TFF 2 発現を上昇させることが示された. この indomethacin の作用機序について検討するため胃粘膜で産生される代表的な PG である PGE₂ の影響をみたが, 外因性に投与した PGE₂ は indomethacin による TFF 発現の上昇に拮抗しなかった (図6 A). 従って, TFF 2 の発現が, indomethacin によ

り COX 活性が抑制されることにより起こる PG 産生の低下により誘導されるのではないと考えられた。また、アラキドン酸カスケードのもう一つの経路である LOX の阻害薬である NDGA も、indomethacin による TFF 2 発現誘導を抑制しなかった (図 6 B)。この結果は、indomethacin により COX 活性が抑制され相対的に LOX 経路の作用が増強することが、TFF 2 の発現上昇に影響したのではないことを示唆する。以上より、本研究で認められた indomethacin の効果は、COX 抑制作用とは異なった機構を介している可能性がある。図 2 に示すように、indomethacin による TFF 2 発現誘導は、COX 抑制に必要な濃度より高濃度で上昇が著しいこともこの可能性を示唆しているかもしれない。NSAIDs には COX 阻害作用の他に多くの作用が認められ²²⁾、*in vivo*、*in vitro* で観察される NSAIDs の作用には NF- κ B、AP-1、PPAR γ などの転写因子への影響を介したものと、細胞内の各種のキナーゼ活性への影響を介したものなども少なくないと考えられている²²⁾。Azarschab ら²³⁾ も、aspirin が胃癌由来細胞株の TFF 2 発現を上昇させると報告しているが、COX の抑制がアラキドン酸の濃度を上昇させプロテインキナーゼ C を活性化する事が、TFF 2 発現誘導に関連していると推論している。いずれにしても TFF 2 発現に対する indomethacin の作用機序に関しては更なる検討が必要と思われる。

また、本研究では非特異的 COX 阻害薬 (indomethacin, aspirin) のみでなく COX-2 選択的阻害薬 (NS-398) も TFF 2 発現を上昇させることが示された。これは、MKN45 細胞では通常誘導性の酵素である COX-2 が非刺激時にも発現しているという報告²⁴⁾ と関連しているかもしれないが、NS-398 による TFF 2 発現誘導も外因性の PGE₂ で拮抗されないことより (data not shown)、indomethacin の場合と同様に、その COX 阻害作用とは別の機構を介した作用であると思われる。更に我々は、TFF 発現に対する indomethacin の効果を初代培養ラット胃粘膜上皮細胞で検討したが、indomethacin は TFF 2 に対して有意な影響は与えず、TFF 1 の発現レベルを上昇させた (data not shown)。ラット TFF 遺伝子のプロモーター領域はヒト TFF 遺伝子のもものと異なっているため、indomethacin の効果に差があることは不思議ではないが、この問題についても更なる検討が必要と思われる。

各種の実験系で、TFF 2 の経口投与が胃粘膜傷害の治癒を促進するという報告がある^{25, 26)}。本研究で認めた NSAIDs による胃粘膜上皮細胞での TFF 2 発現レベルの上昇が、*in vivo* でも起こっているならば、増加した TFF 2 が NSAIDs による胃粘膜傷害の発生をある程度緩和し

ている可能性がある。逆に NSAIDs 投与時に TFF 2 の発現誘導が起こらない場合は、NSAIDs による胃粘膜傷害が惹起されやすい可能性が考えられる。最近 Farrell ら²⁷⁾ は TFF 2 ノックアウトマウスでは indomethacin による胃粘膜傷害がより重篤になると報告しているが、これは NSAIDs 起因性胃粘膜傷害に対する TFF 2 の役割を示唆するものであり、本研究の結果と整合的な結果であると考えられる。

結 論

胃粘膜上皮細胞における trefoil factor family (TFF) 発現に対する indomethacin の影響を MKN45 細胞を用いて検討した。

1) MKN45 細胞での TFF 発現レベルは、TFF 1, TFF 2, TFF 3 の順であった。

2) Indomethacin は TFF 1, TFF 3 mRNA の発現に対しては有意な影響を与えなかったが、TFF 2 mRNA の発現は濃度依存性に上昇させた。レポーター遺伝子アッセイでも同様に Indomethacin による TFF 2 発現誘導を認めた。

3) Indomethacin による TFF 2 発現の増大は、他の胃癌由来細胞株 (AGS, JR) でも認められ、また他の NSAIDs (aspirin, NS-398) も MKN45 細胞の TFF 2 発現を上昇させた。

4) Indomethacin による TFF 2 発現の上昇は PGE₂, NDGA の投与では拮抗されなかった。

以上により、NSAIDs による TFF 2 発現誘導作用は、NSAIDs の COX 阻害作用とは別の機構により媒介されており、またその作用は、NSAIDs による胃粘膜傷害を防御している可能性が示唆された。

謝 辞 稿を終えるにあたり、御助力を賜りました保坂久美さん (獨協医科大学消化器研究室)、田部井恭子さん (獨協医科大学医学総合研究所) に厚くお礼申し上げます。

参考文献

- 1) Thim L.: Trefoil peptides: from structure to function. *Cell Mol Life Sci*, **53**: 888-903, 1997.
- 2) Hoffmann W, Jagla W.: Cell type specific expression of secretory TFF peptides: Colocalization with mutins and synthesis in the brain. *Int Rev Cytol*, **213**: 147-181, 2002.
- 3) Wright NA, Hoffmann W, Otto WR, et al.: Rolling in the clover: trefoil factor family (TFF)-domain peptides, cell migration and cancer. *FEBS Lett*, **408**: 121-123,

- 1997.
- 4) Hanby AM, Poulson R, Singh S, et al : Spasmolytic polypeptide is a major antral peptide : distribution of the trefoil peptides human apasmolytic polypeptide and pS2 in the stomach. *Gastroenterology*, **105** : 1110 - 1116, 1993.
 - 5) Podolsky DK, Lynch -Devaney K, Stow JL, et al : Identification of human intestinal trefoil factor. Goblet cell - specific expression of a peptide targeted for apical secretion. *J Biol Chem*, **268** : 12230, 1993.
 - 6) Sands S, Podolsky DK. : The trefoil peptide family. *Annu Rev Physiol*, **58** : 253 - 273, 1996.
 - 7) Tomasetto C, Masson R, Linares JL, et al : pS2/TFF 1 interacts directly with the VWFC cystein - rich domains of mucins. *Gastroenterology*, **118** : 70 - 80, 2000.
 - 8) Hoffmann W, Jagla W, Wiede A. : Molecular medicine of TFF - peptides : from gut to brain. *Histol Histopathol*, **16** : 319 - 334, 2001.
 - 9) Alison MR, Chinery R, Poulson R, et al : Experimental ulceration leads to sequential expression of spasmolytic polypeptide, intestinal trefoil factor, epidermal growth factor and transforming growth factor alpha mRNAs in rat stomach. *J Pathol*, **175** : 405 - 414, 1995.
 - 10) Masiakowski P, Breathnach R, Bloch J, et al : Cloning of cDNA sequences of hormone - regulated genes from the MCF - 7 human breast cancer cell line. *Nucleic Acids Res*, **10** : 7895 - 7903, 1982.
 - 11) Pausawasdi N, Ramamoorthy S, Crofford LJ, et al : Regulation and function of COX - 2 gene expression in isolated gastric parietal cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, **282** : 1069 - 1078, 2002.
 - 12) Hirose M, Miwa H, Kobayashi O, et al : Inhibition of proliferation of gastric epithelial cells by a cyclooxygenase 2 inhibitor, JTE 522, is also mediated by a PGE 2 - independent pathway. *Aliment Pharmacol Ther*, **16** : 83 - 9, 2002.
 - 13) Johansson C, Bergstrom S. : Prostaglandin and protection of the gastroduodenal mucosa. *Scand J Gastroenterol*, **77** : 21 - 46, 1982.
 - 14) Cheung LY. : Topical effects of 16, 16 - dimethyl prostaglandin E₂ on gastric blood flow in dogs. *Am J Physiol*, **238** : 514 - 519, 1980.
 - 15) Robert A, et al : Cytoprotection by prostaglandins in rats. Prevention of gastric necrosis produced by alcohol, HCl, NaOH, hypertonic NaCl, and thermal injury. *Gastroenterology*, **77** : 433 - 443, 1979.
 - 16) Shimada T, Kojima K, Yoshiura K, et al : Characteristics of the peroxisome proliferator activated receptor γ (PPAR γ) ligand induced apoptosis in colon cancer cells. *Gut*, **50** : 658 - 664, 2002.
 - 17) Kinoshita K, Taupin DR, Itoh H, et al : Distinct pathways of cell migration and antiapoptotic response to epithelial injury : structure - function analysis of human intestinal trefoil factor. *Mol Cell Biol*, **20** : 4680 - 4690, 2000.
 - 18) Efstathiou JA, Liu D, Wheeler JM, et al : Mutated epithelial cadherin is associated with increased tumorigenicity and loss of adhesion and of responsiveness to the motogenic trefoil factor 2 in colon carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, **96** : 2316 - 2321, 1999.
 - 19) Lefebvre O, Chenard MP, Masson R, et al : Gastric mucosa abnormalities and tumorigenesis in mice lacking the pS2 trefoil protein. *Science*, **274** : 259 - 262, 1996.
 - 20) McKenzie C, Marchbank T, Playford RJ, et al : Pancreatic spasmolytic polypeptide protects the gastric mucosa but dose not inhibit acid secretion or motility. *Am J Physiol*, **273** : 112 - 117, 1997.
 - 21) Kayadmir T, dos Santos Silva E, Pusch C, et al : A novel 25 bp tandem repeat within the human trefoil peptide gene TFF 2 in 21q22.3 : polymorphism and mammalian evolution. *Eur J Hum Genet*, **6** : 121 - 128, 1998.
 - 22) Tegeder I, Pfeilschifter J, Geisslinger G. : Cyclooxygenase - independent actions of cyclooxygenase inhibitors. *FASEB J*, **15** : 2057 - 2072, 2001.
 - 23) Azarschab P, Al - Azzeh E, Kornberger W, et al : Aspirin promotes TFF 2 gene activation in human gastric cancer cell lines. *FEBS Lett*, **488** : 206 - 210, 2001.
 - 24) Sawaoka H, Kawano S, Tsuji M, et al : Effects of NSAIDs on proliferation of gastric cancer cells *in vitro* : possible implication of cyclooxygenase - 2 in cancer development. *J Clin Gastroenterol*, **27** : 47 - 52, 1998.
 - 25) Babyatsky MW, deBeaumont M, Thim L, et al : Oral trefoil peptides protect against ethanol - and indomethacin - induced gastric injury in rats. *Gastroenterology*, **110** (2) : 489 - 497, 1996.
 - 26) Cook GA, Thim L, Yeomans AD, et al : Oral human spasmolytic polypeptide protects against aspirin - induced gastric injury in rats. *J Gastent Hepatol*, **13** : 363 - 370, 1998.
 - 27) Farrell JJ, Taupin D, Koh TJ, et al : TFF 2/SP - deficient mice show decreased gastric proliferation, increased acid secretion, and increased susceptibility to NSAID injury. *J Clin Invest*, **109** (2) : 193 - 204, 2002.

Effect of Indomethacin on TFF Expression in Gastric Epithelial Cells

Ayako Koitabashi and Tadahito Shimada

Department of Gastroenterology, Dokkyo University School of Medicine, Mibu, Tochigi, 321 - 0293 Japan

Although trefoil factor family (TFF) peptides (TFF 1, TFF 2, and TFF 3) are assumed to play important roles in the protection of gastrointestinal mucosa, regulatory mechanisms of TFF expression are poorly understood at present. In the present study, we examined the effect of indomethacin, a non-selective inhibitor of cyclooxygenase (COX), on the expression of TFF mRNA expression in MKN 45 gastric cells by real-time quantitative RT-PCR method. In MKN 45 cells, relative expression level of TFF 1, TFF 2, and TFF 3 mRNA was 617 : 12 : 1 in the control condition. Indomethacin up-regulated the expression level of TFF 2 in a dose-dependent manner, whereas TFF 1 and TFF 3 expression levels were not sig-

nificantly affected. Luciferase reporter gene assay confirmed this stimulatory effect of indomethacin on TFF 2 expression. Other COX inhibitors, such as aspirin and NS-398, also up-regulated TFF 2 expression and indomethacin-induced up-regulation of TFF 2 expression was also observed in other gastric cell lines, such as AGS and JR. Externally applied PGE₂ did not antagonize the effect of indomethacin on TFF 2 expression. Since TFF peptides play a critical role in gastric mucosal protection, indomethacin-induced TFF 2 may reduce the degree of gastric mucosal damage induced by indomethacin. The present results also suggest that the effect of indomethacin on TFF 2 expression is COX-independent.