

原 著

胃粘膜上皮細胞の *TFF1* 発現に対する cAMP/Protein kinase A 経路の影響

獨協医科大学 内科学 (消化器)

小池 健郎 島田 忠人

要 旨 Trefoil factor family (TFF) は消化管粘膜防御において重要なペプチドであるが、胃粘膜で高レベルに発現している *TFF1* (pS2) の作用機構については不明の部分が多い。本研究では胃粘膜上皮細胞の *TFF1* 発現に対する cAMP/PKA 経路の影響を、ヒト胃癌由来細胞株 MKN45 及びラット正常胃粘膜上皮由来の RGM-1 を用いて検討した。定量的 RT-PCR により内因性 *TFF1* mRNA の発現を測定し、ヒト *TFF1* 遺伝子のプロモーター領域 (-953 から +34) を pGL3-basic ベクターに組み込みんだ *TFF1* レポーター遺伝子を用いて *TFF1* プロモーター活性を評価した。Forskolin, DbcAMP 刺激により MKN45 細胞において内因性 *TFF1* mRNA 発現及び *TFF1* プロモーター活性は増強した。さらに段階的に *TFF1* プロモーター領域を欠失させたレポーターを作製し検討すると *TFF1* 遺伝子プロモーター上で cAMP/PKA 経路の活性化に対する応答領域は -456 から -327 にマップされた。MKN45 細胞において、消化管防御機能を有する PGE₂ の受容体である EP2 と EP4 の発現が認められ、さらに PGE₂ により *TFF1* の発現レベルが上昇することも確認された。Forskolin, PGE₂ による *TFF1* 発現の増強は RGM-1 細胞でも認められた。これらの結果より、cAMP/PKA 経路は胃粘膜上皮細胞において *TFF1* の発現調節に関与し、PGE₂ は cAMP/PKA 経路を介して *TFF1* 発現を増強していると考えられた。

Key Words : Trefoil factor, *TFF1*, PGE₂, cAMP, protein kinase A

緒 言

Trefoil factor family (TFF) ペプチドは、6個のシステイン残基による特徴的な三つ葉のクローバー様構造 (trefoil domain) を分子内にもつ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全身の粘液産生上皮に発現し、ムチンとともに粘膜の恒常性の維持に重要な働きを果たしている²⁾。ヒトにおいては、これまでに pS2, spasmolytic polypeptide (SP), intestinal trefoil factor (ITF) の3種の TFF ペプチドが報告されているが²⁾、最近名称の統一が行われ、それぞれ *TFF1*, *TFF2*, *TFF3* と呼称されることとなった³⁾。胃粘膜において発現が認められるのは *TFF1* と *TFF2* であるが、*TFF1* が胃粘膜表層の粘液産生被蓋上皮細胞に発現して

いるのに対し、*TFF2* の発現は粘液頸細胞、幽門腺細胞に限局している²⁾。*TFF3* は下部消化管の杯細胞に高発現しており、正常な胃粘膜での発現レベルは低いが、胃粘膜に発生した腸上皮化生では強発現する²⁾。*TFF* の作用機構については不明の部分も少なくないが、*TFF* は粘液ゲル層でムチンコア蛋白と相互作用し、ムチン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と考えられている^{2,4,5)}。さらに *TFF* には上皮細胞の遊走促進作用があり、粘膜傷害部での修復過程を促進していることも報告されている^{2,5)}。また *TFF1* は胃粘膜において腫瘍抑制遺伝子として機能していることが示唆されている⁷⁾。

本研究で対象としている *TFF1* は、当初、乳癌細胞株 MCF-7 でエストロゲン誘導遺伝子として発見されたものであり⁸⁾、確かに、ヒト *TFF1* 遺伝子のプロモーター領域にはエストロゲン応答エレメントが存在しているが、胃粘膜上皮細胞においては *TFF1* 発現はエストロゲンの調節を受けていない⁹⁾。胃粘膜特異的な *TFF1* 遺伝子の発現機序については不明の部分が多いが、Gottら¹⁰⁾ および Beckら¹¹⁾ は、他の *TFF* 遺伝子プロモーター領域

平成18年11月1日受付, 平成18年11月29日受理

別刷請求先: 小池健郎

〒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)

との比較から、4ヶ所の領域 (Motif I - IV) が、組織特異的な TFF1 の発現に関連している可能性を示唆している。また GATA6 も、胃粘膜上皮細胞における TFF1 の発現を上昇させることが報告されている¹²⁾。その他にも数々の因子が、胃粘膜における TFF1 の発現に影響を与えているが⁹⁾、TFF1 発現の詳細な調節機構については、まだ、多くの不明の部分が残されている。

cAMP/protein kinase A (PKA) 経路は、広範な細胞機能に影響を与えているシグナリング経路であり¹³⁾、胃粘膜においても、ヒスタミン H₂ 受容体を介する壁細胞からの酸分泌の調節などをはじめとして重要な機能を担っている。しかしながらこれまでのところ、胃粘膜上皮細胞において、cAMP/PKA 経路が TFF1 発現に与える影響については検討されていない。そこで本研究において、TFF1 を発現している胃癌由来細胞株 MKN45 を用い、PKA の活性化が TFF1 の発現に与える影響を解析した。

方 法

1. 試 薬

Forskolin 及び dibutyryl cyclic AMP (DbcAMP) は Wako (大阪) より、prostaglandin E₂ (PGE₂) は Biomol (Plymouth Meeting, PA) より購入した。Forskolin は DMSO、PGE₂ はエタノールに溶かし、ストック溶液とした。実験時の溶媒の最終濃度は 0.1% 以下であり、この濃度の溶媒自体は実験の結果に影響を与えなかった。

2. 細胞培養

実験には、ヒト胃癌由来細胞株である MKN45 細胞とラット正常胃粘膜上皮由来の細胞株である RGM-1 を使用した。MKN45 細胞は 10% fetal bovine serum (FBS) (Invitrogen, Carlsbad, CA) を添加した Ham's F-12 culture medium (Invitrogen) で、37°C、5% CO₂ 存在下で培養した。RGM-1 細胞は 10% FBS を添加した Dulbecco's Modification of Eagle's Medium (DMEM) (MP Biomedicals, Solon, OH) で培養した。実験開始 24 時間前より 0.1% FBS 添加の培養液に置き換え、0.1% FBS 存在下で実験を行なった。

3. Reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)

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 (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK), oligo (dT) primer (Invitrogen) を用いて、逆転写反応により cDNA を作製した。PCR 用のプライマーは表 1 に示すとおりであ

表 1 使用した PCR プライマー

Human TFF1 (GenBank No. NM_003225)
Sense 5'-CAATGGCCACCATGGAGAAC-3'
Antisense 5'-AACGGTGTGTCGAAACAGC-3'
PCR 産物 188 bp
Human GAPDH (GenBank No. 1310)
Sense 5'-TGATGACATCAAGAAGGTGGTGAAG-3'
Antisense 5'-TCCTTGAGGCCATGTGGGCCAT-3'
PCR 産物 240 bp
Human EP1 (GenBank No. NM_001458)
Sense 5'-CCTTGGGTGTACATCCTACTGC-3'
Antisense 5'-GCCTCTGGTTGTGCTTAGAAGT-3'
PCR 産物 182 bp
Human EP2 (GenBank No. NM_002395)
Sense 5'-GAAGATCCAGCTGCCTATTGAT-3'
Antisense 5'-TTGGTTGCTTCCACATATTGAC-3'
PCR 産物 199 bp
Human EP3 (GenBank No. NM_002082)
Sense 5'-TTGGTTCTTGATTTGTCCTTT-3'
Antisense 5'-AGATGAGGAATTTTGGGAAAT-3'
PCR 産物 194 bp
Human EP4 (GenBank No. NM_003432)
Sense 5'-ATCCTCCTGAGAAAGACAGTGC-3'
Antisense 5'-GCAGTACATCTCAGACCCTCCT-3'
PCR 産物 200 bp
Rat TFF1 (GenBank No. 0466)
Sense 5'-GTGACCTGTGTCCTCGCCAT-3'
Antisense 5'-TTTTCTTGCCTGCTGGG-3'
PCR 産物 140 bp
Rat GAPDH (GenBank No. 1186)
Sense 5'-TGCACCACCAACTGCTTAG-3'
Antisense 5'-GGATGCAGGGATGATGTTC-3'
PCR 産物 177 bp

る。通常の PCR 反応は HotStar Taq DNA polymerase (Quiagen, Hilden, Germany) を用いて行なった。PCR 産物は 2% アガロースゲル電気泳動を行い、エチジウムブロマイド染色で確認した。

リアルタイム定量的 RT-PCR は、Absolute QPCR SYBR Green Mix (Abgene, Epsom, UK) を用いて、Opticon2 リアルタイム PCR 解析システム (BIO-RAD, Hercules, CA) に行なった。定量的 PCR のスタンダードは、通常の RT-PCR にて増幅した PCR 産物を Qiaquick PCR Purification Kit (Qiagen) にて抽出し、抽出物を段階的に希釈して作製した ($6 \times 10^7 \sim 6 \times 10^3$ copy)。実験ごとに標準曲線を作成し、試料中に含まれる TFF1 mRNA のコピー数を算出するとともに、同一

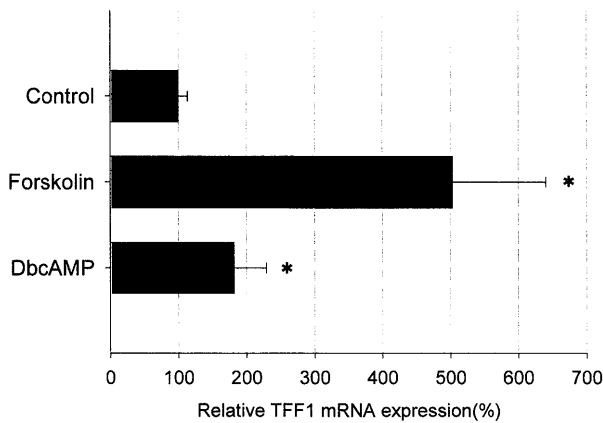


図1 Forskolin (10 μ M, 24時間インキュベーション) 及び DbcAMP (1 mM, 24時間インキュベーション) が MKN45細胞の内因性 *TFF1* mRNA発現に与える影響. Mean \pm S.D (n = 3) * p < 0.01 vs. control.

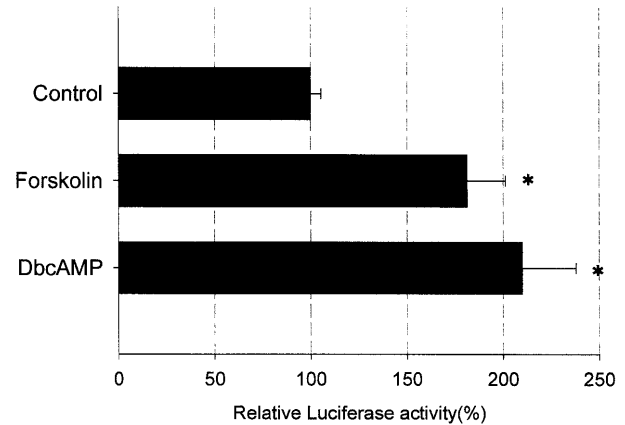


図2 Forskolin (10 μ M, 24時間インキュベーション) 及び DbcAMP (1 mM, 24時間インキュベーション) が TFF1レポーター遺伝子 (TFF1-Luc) 発現に与える影響. Mean \pm S.D (n = 3) * p < 0.01 vs. control.

試料中のGAPDH mRNA発現についても検討し、結果の標準化を行なった。

4. レポーター遺伝子アッセイ

PCRにより増幅したヒト *TFF1* 遺伝子のプロモーター領域 (-953から+34) を pGL3-basicベクター (Promega, Madison, WI) の SmaI 部位に組み込み (TFF1-Luc) レポーター遺伝子アッセイを行なった。配列はシーケンシングにより確認した。更に GeneEditor in vitro site-directed mutagenesis system (Promega) によりプロモーター領域を段階的に欠失させたレポーターを作製し検討を行なった。培養細胞を24穴プレートに培養し、Lipofectamine 2000 (Invitrogen) を用いて TFF1-Luc と phRL-TK vector (Promega) を同時にトランスフェクトし、刺激物質投与24時間後に細胞を回収し、Dual-Luciferase Reporter Assay (Promega) を行った。ルミノメーターはドイツ・ベルトールド研究所社製 LB96V を使用した。

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 (p < 0.05), Sheffe'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) 内因性 *TFF1* mRNA 発現における forskolin 及び DbcAMP の影響

内因性 *TFF1* mRNA の発現に対する PKA 活性化の影響を検討するため、MKN45細胞を forskolin (10 μ M)

あるいは DbcAMP (1 mM) で24時間刺激し、リアルタイム RT-PCR により *TFF1* mRNA の発現レベルの変化を解析した。図1に示すように、コントロールの MKN45細胞と比較して、*TFF1* mRNA の発現は、forskolin 処理群では約5倍、DbcAMP 処理群では約1.8倍に増加することが認められた。

(2) TFF1-Luc 発現に対する forskolin 及び DbcAMP の影響

Forskolin 及び DbcAMP の作用をさらに詳細に解析するため、TFF1レポーター遺伝子 (TFF1-Luc) を作製し、レポーター遺伝子アッセイを行った。図2に示すように、レポーター遺伝子アッセイにおいても、forskolin (10 μ M, 24時間インキュベート)、あるいは DbcAMP (1 mM, 24時間インキュベート) の投与により、TFF1-Luc の発現レベルは有意に増強した。

(3) *TFF1* 遺伝子プロモーター上の応答領域についての解析

Forskolin 及び DbcAMP 刺激時の TFF1-Luc 発現レベルの上昇に関係する *cis*-element を特定するため、wild-type TFF1-Luc より段階的に5'側を欠失させたレポーター遺伝子 (A-F) を作製した (図3)。図4には、forskolin (10 μ M, 24時間インキュベーション) を作用させた場合のこれらのレポーター遺伝子の発現変化、図5には DbcAMP (1 mM, 24時間インキュベーション) を作用させた場合の各レポーターの遺伝子の発現変化を示す。いずれの場合もレポーター C において反応性が低下しており、forskolin 及び DbcAMP に対する応答部位、

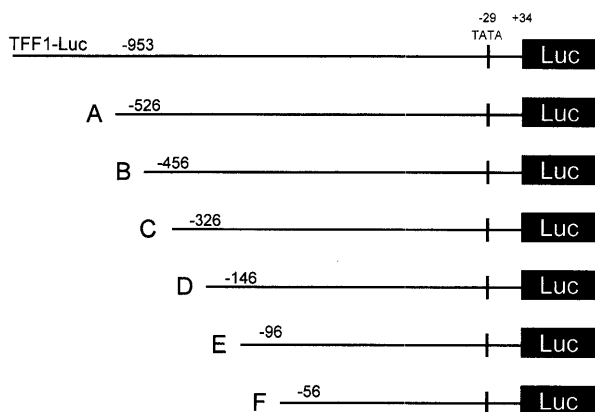


図3 Wt-TFF1-Lucの構造と段階的に5'側配列を欠失させたレポーター遺伝子の構造
リアルタイム定量的RT-PCR法による Forskolin (10 μ Mol), DbcAMP (1 mM) の発現比の検討. Mean \pm S.D (n = 3)

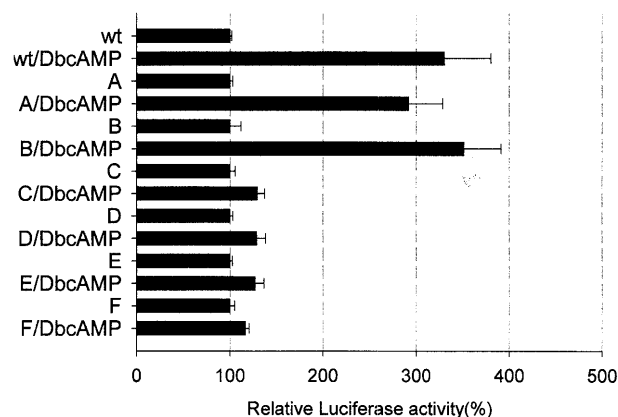


図5 各レポーター遺伝子の発現に対する DbcAMP (1 mM, 24時間インキュベーション) の影響 (それぞれのレポーターのコントロール時の発現レベルを100%とした場合の相対的变化). Mean \pm S.D (n = 3)

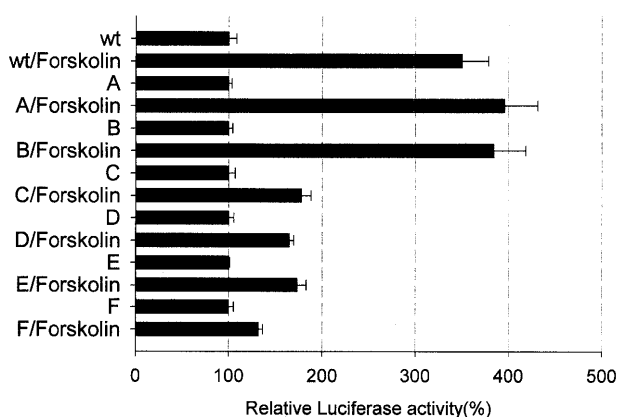


図4 各レポーター遺伝子の発現に対する forskolin (10 μ M, 24時間インキュベーション) の影響 (それぞれのレポーターのコントロール時の発現レベルを100%とした場合の相対的变化). Mean \pm S.D (n = 3)

すなわちPKAの活性化によるTFF1遺伝子の発現増強に主として関与しているのは、-456から-327の領域であることが示唆された。

(4) PGE₂によるTFF1発現の増強

生理的に胃粘膜において上皮細胞のPKAシグナリングを活性化させる因子としてはPGE₂が考えられる¹⁴⁾。そこでまず、MKN45細胞におけるEP受容体(EP1-4)の発現を通常のRT-PCR法で確認した。図6に示すように、MKN45細胞ではEP1, EP2, EP4受容体の発現が認められた。このうちEP2とEP4はGsにリンクして細胞内cAMPを上昇させる受容体なので¹⁵⁾、実際にPGE₂の効果を検討したところ、内因性TFF1 mRNA発現も(図7)、TFF1-Lucの発現も濃度依存性に有意に増強す

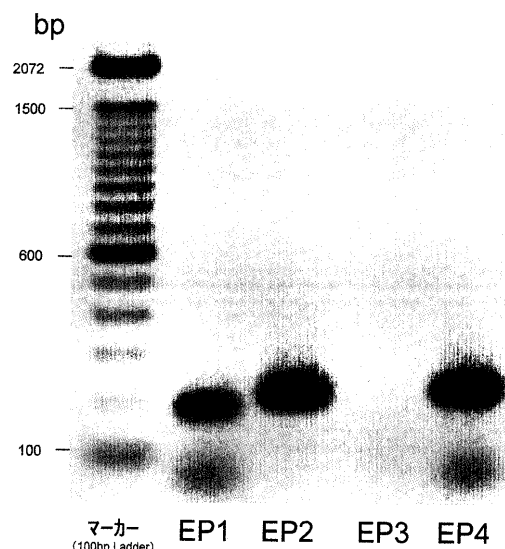


図6 MKN45細胞におけるEP1, EP2, EP3, EP4受容体の発現 (RT-PCR法)

ることが認められた。

(5) RGM-1細胞における検討

比較のために、ラット正常胃粘膜細胞由来の細胞株であるRGM-1細胞を用いた検討をおこなった。RGM-1細胞のTFF1 mRNA発現に対するforskolin (10 μ M, 24時間インキュベーション)の効果を検討したところ、図9に示すように、有意に増強することが認められた。また、PGE₂ (10 μ M, 24時間インキュベーション)も有意にTFF1 mRNAの発現を増大させた(図9)。

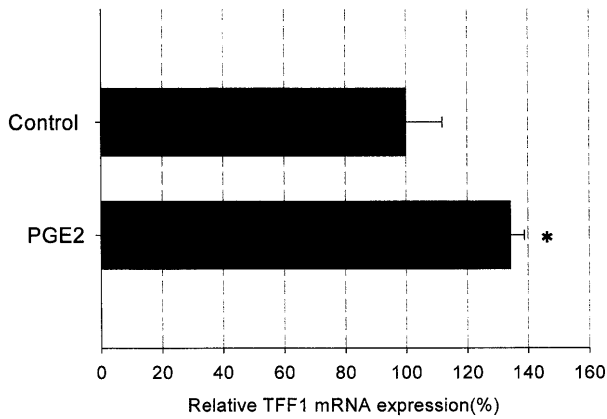


図7 PGE₂ (10 μM, 24時間インキュベーション) がMKN45細胞の内因性TFF1 mRNA発現に与える影響。**p* < 0.01 vs. control.

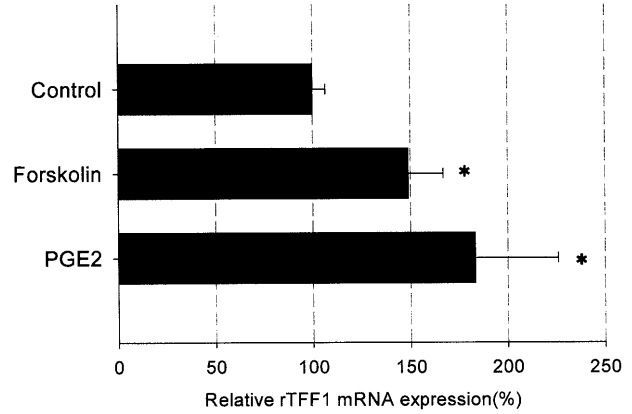


図9 Forskolin (10 μM, 24時間インキュベーション) 及びPGE₂ (10 μM, 24時間インキュベーション) がRGM-1細胞の内因性rat TFF1 (rTFF1) mRNAに与える影響。Mean ± S.D (n = 3) **p* < 0.01 vs. control.

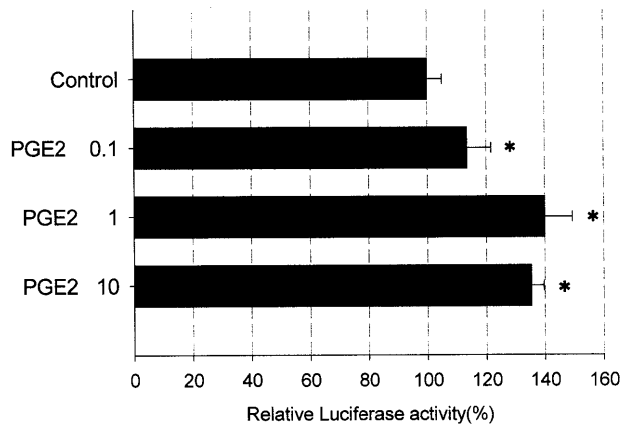


図8 PGE₂ (0.1 - 10 μM, 24時間インキュベーション) がTFF1-Lucの発現に与える影響。Mean ± S.D (n = 3) **p* < 0.01 vs. control.

考 察

TFF1はムチンコア蛋白とともに胃粘膜表層の粘液ゲル層の重要なコンポーネントであり、胃粘膜防御において不可欠の因子である²⁾。しかしながら、胃粘膜上皮細胞におけるTFF1の発現調節機構については不明の部分が多く残っている。

本研究において我々は、胃粘膜上皮細胞におけるTFF1発現がcAMP/PKA経路により影響を受けるか否かについて、ヒト胃癌由来細胞株MKN45を用いて検討を行った。その結果、forskolinあるいはDbcAMPで細胞内cAMPを増加させる処理により、MKN45細胞における内因性のTFF1 mRNA発現は増強することを見出した。また、TFF1レポーター遺伝子を用いたアッセイでも同様の結果を得た。さらに、ラット胃粘膜上皮由来

の細胞株であるRGM-1を用いた検討でも、forskolin処理により内因性TFF1 mRNA発現が上昇することを認め、このようなcAMP/PKA経路によるTFF1発現の誘導機構が、ヒトのみでなく他の動物種にも共通して存在している可能性が示唆された。

胃粘膜上皮細胞における組織特異的なTFF1の発現の機構については、緒言で述べたようにTFF1プロモーター内に認められる4箇所モチーフの存在が重要であると示唆されているが⁹⁻¹¹⁾、その詳細な解析はまだ十分に行われていない。また、TFF1の誘導性発現は、乳癌細胞株MCF-7などで示されているようにphorbol esterで著明に起こるが、これは胃粘膜上皮細胞でも同様であり、TFF1遺伝子プロモーターの-338に存在するAP-1サイトが中心的な役割を果たしている¹⁶⁾。Inadera¹⁷⁾はMCF-7細胞にcholera toxin及び3-isobutyl-1-methylxanthine (CT/IBMX)を作用させたときにTFF1発現が増大することを報告し、cAMP/PKA経路のシグナリングがTFF1発現の誘導を行う可能性を示唆しているが、胃粘膜上皮細胞においてcAMP/PKA経路の活性化が同様の効果を発揮するか否かについては明らかではなかった。cAMPは普遍的にいずれの細胞にも存在しているセカンドメッセンジャーであり、細胞外からの各種の刺激によってアデニルシクラーゼが賦活されることにより細胞内でのcAMP濃度が上昇し、主としてPKAを活性化して各種の細胞機能に影響を与えている¹⁸⁾。ただし、cAMPにより直接活性化されるチャンネルなども存在している¹⁹⁾、cAMPを介する生理的な作用が必ずしもすべてPKAによっているわけではないことは留意しておく必要がある。

PKAの活性化により遺伝子発現が影響を受ける場合、PKAによりリン酸化を受けたcAMP response element-binding protein (CREB)が転写コアクチベーターのCREB binding protein (CBP)に結合し、ターゲット遺伝子プロモーター上のcAMP response element (CRE)に結合して転写を活性化すると考えられている²⁰⁾。しかしながら、PKAによるリン酸化は各種の蛋白に生じると考えられるので、間接的な経路による転写調節機構の存在も考えられる。我々は、今回の研究において段階的に5'側を欠失させたTFF1レポーター遺伝子を用いてcAMP/PKA経路の活性化に対するTFF1プロモーター上の応答領域に関する検討を行い、-456から-327の領域が重要であることを見出した。CREの典型的な配列はTGACGTCAであるが、この領域内にはこれに一致する配列はないので、このTFF1発現の上昇には何らかの間接的な機構が存在している可能性も考えられる。現在、このレポーターBとレポーターCの間の領域をさらに区分して詳細な検討を行っている。図9のように、cAMP/PKA経路の活性化によるTFF1発現の上昇はRGM-1細胞でも認められているので、ラットTFF遺伝子のプロモーター解析も比較検討する必要があると思われる。

生理的にアデニルシクラーゼを活性化してcAMP/PKA経路を活性化するのはGsにリンクした受容体系である。PGE₂は胃粘膜防御機構において重要な役割を果たしているが、4種類同定されているPGE₂受容体(EP1-4)²¹⁾のうち、Gsにリンクした受容体はEP2とEP4であり¹⁵⁾、胃粘膜上皮細胞からの粘液分泌促進はEP4受容体を介していると報告されている^{22~24)}。本研究において、図6に示すようにMKN45細胞はEP1、EP2、EP4受容体を発現しており、実際にPGE₂を作用させると図7-8に示すようにTFF1発現は有意に増大することが認めれた。したがってこれらの実験の範囲では、関与しているのがEP2かEP4かは断定できないが、RGM-1細胞ではEP4の発現のみが報告されているので²²⁾、EP4が中心的な役割を果たしているのかもしれない。本研究の結果から、胃粘膜上皮細胞においてPGE₂がcAMP/PKA経路を介してTFF1の発現を調節している可能性が考えられ、これはPGとTFFの相互作用という観点からも興味ある知見と思われる。

結 論

ヒト胃癌細胞株MKN45を用いて、胃粘膜上皮細胞におけるTFF1発現に対するcAMP/PKA経路の影響を検討した。ForskolinあるいはDbcAMP処理により内因性TFF1 mRNA、TFF1レポーター遺伝子の発現は有意に

増強し、cAMP/PKA経路によるTFF1遺伝子調節機構の存在が示唆された。また、TFF1遺伝子プロモーター上でcAMP/PKA経路の活性化に対する応答領域は-456から-327にマップされた。ラット正常胃粘膜由来のRGM-1細胞でも、同様にcAMP/PKA経路活性化によるTFF1発現の増強が認められた。また、MKN45細胞にはGsにリンクするEP2、EP4受容体が発現しており、PGE₂の投与によりTFF1発現レベルが上昇することが認められたのでPGE₂はcAMP/PKA経路を介してTFF1遺伝子発現調節に関与している可能性が考えられた。

謝 辞 稿を終えるにあたり、ご協力を賜りました田部井恭子さん、生田目貴さん(獨協医科大学医学総合研究所)に厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) Tim L. Trefoil peptides : from structure to function. *Cell Mol Life Sci*, **53** : 883-903, 1997.
- 2) Hoffmann W, Jagla W. : Cell type specific expression of secretory TFF peptides : colocalization with mucins 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) Sands S, Podolovsky DK. : The trefoil peptide family. *Annu Rev Physiol*, **58** : 253-273, 1996.
- 5) Tomasetto C, Masson R, Linares JL, et al : pS2/TFF1 interacts directly with the VWFC cysteine-rich domains of mucins. *Gastroenterology*, **118** : 70-80, 2000.
- 6) Hoffmann W, Jagla W, Wiede A. : Molecular medicine of TFF-peptides : from gut to brain. *Histol Histo-pathol*, **16** : 319-334, 2001.
- 7) Lefebvre O. et al : Gastric mucosa abnormalities and tumorigenesis in mice lacking the pS2 trefoil protein. *Science*, **274** : 259-262, 1996.
- 8) 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** : 895-903, 1982.
- 9) Fujii Y, Shimada T. : Regulation of TFF1 (pS2) expression in gastric epithelial cells. *Aliment Pharmacol Ther*, **2** : 285-291, 2006.
- 10) Gott P, Beck S, Machado JC, et al : Human trefoil pep-

- tides : genomic structure in 21q22.3 and coordinated expression. *Eur J Hum Genet.*, **4** : 308-315, 1996.
- 11) Beck S, Sommer P, Bil N et al. 5'-flanking motifs control cell-specific expression of trefoil factor genes (TFF). *Int J Mol Med*, **2** : 353-361, 1998.
 - 12) Al-azzeah ED, Fegert P, Blin N, et al : Transcription factor GATA-6 activates expression of gastroprotective trefoil genes TFF1 and TFF2. *Biochim Biophys Acta*, **29** : 324-332, 2000.
 - 13) Beavo JA, Brunton LL. : Cyclic nucleotide research -- still expanding after half a century. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **3** : 710-718, 2002.
 - 14) Konturek SJ, Mikos E, Pawrik W et al. Direct inhibition of gastric secretion and mucosal blood flow by arachidonic acid. *J Physiol*, **86** : 15-28, 1979.
 - 15) Coleman RA, Grix SP, Head SA, et al : A novel inhibitory receptor in piglet saphenous vein. *Prostaglandins*, **47** : 151-168, 1994.
 - 16) 藤井陽一朗, 島田忠人 : 胃粘膜上皮細胞における trefoil factor family (TFF1) 発現に影響を与える因子に関する検討. *獨協医学会雑誌*, **32** : 29-37, 2005.
 - 17) Inadera H. : Estrogen-induced genes, WISP-2 and pS2 respond divergently to protein kinase pathway. *Biochem Biophys Res Commun*, **309** : 272-278, 2003.
 - 18) Beavo JA, Brunton LL. : Cyclic nucleotide research -- still expanding after half a century. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **3** : 710-718, 2002.
 - 19) Matulef K, Zagotta WN. : Cyclic nucleotide-gated ion channels. *Annu Rev Cell Biol*, **19** : 23-44, 2003.
 - 20) Chrivia JC, Kwock RP, Lamb N, et al : Phosphorylated CREB binds specifically to the nuclear protein CBP. *Nature*, **365** (6449) : 855-859, 1993.
 - 21) Coleman RA, Smith W, Narumiya S. : International Union of Pharmacology classification of prostanoid receptors : properties, distribution, and structure of the receptors and their subtypes. *Pharmacol Rev.*, **46** : 205-229, 1994.
 - 22) Araki H, Yagi K, Suzuki K, et al : The roles of prostaglandin E receptor subtypes in the cytoprotective action of prostaglandin E2 in rat stomach. *Aliment Pharmacol Ther*, **14**(Suppl 1) : 116-124, 2000.
 - 23) Hassan S, Kinoshita Y, Min D, et al : Presence of prostaglandin EP4 receptor gene expression in a rat gastric mucosal cell line. *Digestion*, **57** : 196-200, 1996.
 - 24) Takahashi S, Takeuchi K, Okabe S. : EP4 receptor mediation of prostaglandin E2-stimulated mucus secretion by rabbit gastric epithelial cells. *Biochem Pharmacol*, **58** : 1997-2002, 1999.

Regulation of Gastric *TFF1* Expression by cAMP/Protein Kinase A (PKA) Pathway

Takero Koike and Tadahito Shimada

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

Trefoil factor family (TFF) is a group of small peptides that play important roles in the defense of the gastrointestinal mucosa. Among TFF subtypes, TFF1 is expressed at high levels in gastric epithelial cells. However, the regulatory mechanisms of gastric TFF1 expression are not fully understood. In this study, we examined whether cAMP/PKA pathway modulates the expression of TFF1 in gastric epithelial cells. MKN45 gastric cells were used. RGM-1, a cell line derived from normal rat gastric mucosa, was also used in some experiments. Endogenous EP1-EP4 receptor expression was examined by conventional RT-PCR. Endogenous TFF1 mRNA expression was analyzed by real-time quantitative RT-PCR. The promoter sequence of the human TFF1 gene (-956 to +36) was cloned into pGL3-basic vector to make a TFF1 reporter gene (TFF1-Luc) and various mutant reporters were also made. In each reporter gene assay, phRL-TK vector was co-transfected for

standardization. Forskolin or DbcAMP significantly up-regulated the expression of endogenous TFF1 mRNA and TFF1 reporter genes in MKN45 cells. cAMP/PKA responsive element was mapped between -456 and -327 of the TFF1 gene promoter. EP2 and EP4 receptors, which link to Gs, were expressed in MKN45 cells, and PGE₂ was found to up-regulate TFF1 expression. In RGM-1 cells, forskolin, and PGE₂ also increased the expression of endogenous TFF1 mRNA. These results suggest that cAMP/PKA pathway is involved in the regulation of TFF1 expression in gastric epithelial cells, and that PGE₂, a gastroprotective prostaglandin, up-regulates TFF1 expression through cAMP/PKA pathway.

Key words : TFF1, protein kinase A, prostaglandin E₂, gastric epithelial cells