

## 学位論文内容の要旨

論文提出者氏名	論文審査担当者
木下ちさ	主査 教授 花房 俊昭 主査 教授 窪田 隆裕 副査 教授 宮崎 瑞夫 副査 教授 南 敏明 副査 教授 勝間田 敬弘
主論文題名  $\beta_2$ -adrenergic regulation of ciliary beat frequency in rat bronchiolar epithelium: potentiation by isosmotic cell shrinkage (ラット細気管支上皮線毛運動周波数の $\beta_2$ 刺激薬による調節:等張性細胞容積減少による増強)	
学位論文内容の要旨	
<p>《研究目的》            気道上皮線毛運動の重要な役割は、気道粘膜表面で捕らえた障害性物質を排泄することにある。この気道上皮線毛運動の周波数 (ciliary beat frequency, CBF) は、<math>\beta_2</math> 刺激薬により増加することが知られている。今回、著者らは単離に成功した細気管支線毛細胞を用いて terbutaline (<math>\beta_2</math> 刺激薬) 刺激を行った。実験の過程で、terbutaline 刺激時に CBF 増加と同時に細胞容積が減少していることを見出した。種々の細胞において細胞容積は細胞機能 (イオンチャンネル、アポトーシス、開口放出等) を修飾することが報告されている。本研究では、単離細気管支線毛細胞において terbutaline 刺激時の CBF 増加と細胞容積の関係について検討した。</p> <p>《材料および方法》            実験には、100% <math>O_2</math> で飽和した HEPES buffered solution (pH 7.4) を用いた (37 °C)。Pentobarbital-Na (60 ~ 70 mg/kg) の腹腔内投与により麻酔した雄性ラット (200 ~ 250 g) から肺を摘出し、エラストーゼ処理により、細気管支線毛細胞を単離した。単離細気管支線毛細胞を接着したカバースリップを灌流チャンバーに装着し、ビデオ顕微鏡を用いて観察した。ビデオフレーム画像 (30 Hz) から CBF (Hz) を測定した。またビデオスクリーン上で細胞の輪郭をトレースして面積 (A) を測定し、静止時に対する面積比を <math>3/2</math> 乗して細胞容積変化 (<math>V_t/V_0=(A_t/A_0)^{3/2}</math>) とした。</p> <p>《結果》            細気管支線毛細胞において terbutaline は、濃度依存性に CBF 増加と細胞容積減少を引き起こした。また terbutaline の効果は、細胞外 <math>Ca^{2+}</math> には依存せず、forskolin (Adenylyl cyclase 刺激剤)、DBcAMP (膜透過型 cAMP)、IBMX (Phosphodiesterase 阻害剤) により再現された。            まず、イオン輸送阻害剤の効果について検討した。Quinidine (500 <math>\mu M</math>, <math>K^+</math> channel 阻害剤) は terbutaline (10 <math>\mu M</math>) による CBF 増加を抑制し、細胞容積を増加させた。また、amiloride (1 <math>\mu M</math>, <math>Na^+</math> channel 阻害剤) と bumetanide (20 <math>\mu M</math>, <math>Na^+/K^+/2Cl^-</math> 共輸送体阻害剤) を同時に加えると terbutaline (0.5 <math>\mu M</math>) による CBF 増加は増強され、同時に細胞容積減少も増強された。NPPB、glybenclamide (<math>Cl^-</math> channel 阻害剤) は、terbutaline (0.5 <math>\mu M</math>) による CBF 増加、細胞容積減少</p>	

には影響しなかった。一連のイオン輸送阻害剤の実験の結果は、細胞容積減少は *terbutaline* による CBF 増加を増強し、反対に細胞容積増加は抑制することを示唆していた。

次に細胞容積減少を増強する条件 (*amiloride* (1  $\mu$ M) と *bumetanide* (20  $\mu$ M) で前処理) で *terbutaline* 刺激を行った。この条件では *terbutaline* による CBF 増加は増強され、また CBF に対する *terbutaline* の濃度依存性曲線は低濃度側へシフトした。反対に細胞容積が増加する条件 (*amiloride* と *strophanthidin* ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase 阻害剤) を加えた KCl 溶液中で灌流) で *terbutaline* 刺激を行った。この条件では *terbutaline* による CBF 増加は抑制された。これらの結果から *terbutaline* による CBF 増加は細胞容積減少により増強され、反対に細胞容積増加により抑制されることが明らかとなった。

また、*terbutaline* 刺激時に浸透圧負荷を加えた。CBF に対する浸透圧性細胞容積変化と等張性細胞容積変化の効果は反対の結果 (低張負荷による細胞容積増加は *terbutaline* 刺激による CBF 増加を増強し、高張負荷による細胞容積減少は *terbutaline* 刺激による CBF 増加を抑制した) となった。

#### 《考察》

今回の結果は、ラット細気管支線毛細胞において等張条件下で *terbutaline* は、cAMP を介して CBF の増加と細胞容積減少を引き起こしていることが明らかになった。

また細胞容積の減少は *terbutaline* 感受性を増加させることにより、CBF の増加を増強していることが明らかとなった。細胞容積が種々の細胞機能を修飾することはすでに報告されているが、今回の結果は、細気管支線毛細胞においても CBF の調節に細胞容積が重要な役割を果たしていることを示している。

一方で浸透圧性細胞容積変化と等張性細胞容積変化の CBF に対する効果は反対であった。このことは、浸透圧負荷の条件と等張の条件では CBF 調節に関わる細胞内シグナルが同じではないことを示している。同時に、等張性の容積変化によって引き起こされた細胞内の変化 (例えば細胞内イオン濃度変化等) により CBF 増加が調節されている可能性を示唆している。

結論として、等張条件下では、*terbutaline* で刺激した単離細気管支線毛細胞では、cAMP を介して CBF が増加し、同時に起っている細胞容積の減少はこの CBF 増加をさらに増強していることが明らかとなった。

## 審査結果の要旨および担当者

報告番号	甲 第 号	氏 名	木 下 ち さ
論文審査担当者		主 査 教 授 花 房 俊 昭 主 査 教 授 窪 田 隆 裕 副 査 教 授 宮 崎 瑞 夫 副 査 教 授 南 敏 明 副 査 教 授 勝 間 田 敬 弘	
主論文題名			
<p><math>\beta_2</math>-adrenergic regulation of ciliary beat frequency in rat bronchiolar epithelium: potentiation by isosmotic cell shrinkage (ラット細気管支上皮線毛運動周波数の<math>\beta_2</math>刺激薬による調節:等張性細胞容積減少による増強)</p>			
論文審査結果の要旨			
<p>肺の防御機構である mucociliary clearance では、線毛細胞の線毛運動とイオン輸送が重要な役割を果たしている。さらに、イオン輸送活性化は細胞容積の変化を介して細胞機能(開口放出、apoptosis、イオンチャネル等)を修飾する。</p> <p>申請者は、ラットの肺細気管支から単離した線毛細胞の線毛運動周波数(CBF)に対する terbutaline(<math>\beta_2</math>刺激薬)の効果についてビデオ顕微鏡を用いて検討し、terbutaline が cAMP を介して線毛運動周波数(CBF)を増加させると同時に、細胞容積も減少させていることを見出した。また、等張条件下でイオン輸送を変化させることにより、細胞容積の減少、或は増加する条件を作成し、terbutaline の CBF に対する効果を測定している。結果は、細胞容積減少は terbutaline による CBF 増加を増強し、細胞容積増加は CBF 増加を抑制するというものであった。一方で、浸透圧負荷による細胞容積変化を起こし、CBF に対する効果も検討している。結果は、細胞容積減少は terbutaline による CBF 増加を抑制し、細胞容積増加は CBF 増加を増強した。</p> <p>したがって、等張性の細胞容積変化により引き起こされた変化(例えば、細胞内イオン濃度)により CBF が調節されている可能性を示唆している。</p> <p>以上より、本論文の知見は細胞機能調節の研究に新しい視点を提供していると同時に、線毛運動の活性化という臨床応用のための重要な情報を提供している。</p> <p>以上により、本論文は本学大学院学則第9条に定めるところの博士(医学)の学位を授与するに値するものと認める。</p>			
(主論文公表誌)			
The Journal of Physiology 554(2): 403 - 416, 2003			