

学位論文内容の要旨

論文提出者氏名	論文審査担当者
村尾 仁	主査 教授 清 水 章 副査 教授 窪 田 隆 裕 副査 教授 花 房 俊 昭 副査 教授 林 秀 行 副査 教授 宮 崎 瑞 夫
主論文題名 Cell shrinkage evoked by Ca ²⁺ -free solution in rat alveolar type II cells:Ca ²⁺ regulation of Na ⁺ /H ⁺ exchange (Ca ²⁺ -free 溶液によるラット肺胞Ⅱ型細胞の細胞容積減少:Na ⁺ /H ⁺ 交換輸送の Ca ²⁺ 調節)	
学位論文内容の要旨	
<p>《研究の背景及び目的》</p> <p>肺胞上皮Ⅱ型細胞(ATⅡ細胞)は、CO₂排泄経路に位置しており、CO₂処理時に生じるH⁺イオンの排泄はATⅡ細胞において重要な意味を持っている。また細胞機能の修飾因子でもある細胞内pH(pH_i)の恒常性維持はATⅡ細胞、さらには生体にとって不可欠である。ATⅡ細胞で細胞外液からCa²⁺を取り除くとATⅡ細胞の容積が減少し、Na⁺/H⁺交換輸送の選択的阻害薬であるmethyl-isobutyl-amiloride(MIA)存在下ではこの細胞容積減少が消失することから、Na⁺/H⁺交換輸送がこの細胞容積減少に大きく関与していることが示唆された。ATⅡ細胞の基底側膜にはNa⁺/H⁺交換輸送体のサブタイプNHE1が発現していることが知られており、本研究においてはATⅡ細胞のNa⁺/H⁺交換輸送体(NHE1)に対する細胞内Ca²⁺濃度の効果について検討した。</p> <p>《材料と方法》</p> <p>溶液は、HCO₃⁻・HEPES buffered solution (pH 7.4)を使用し、混合ガス(95% O₂, 5% CO₂)で飽和した。実験は、37°Cで行った。ラット(雄、体重約200~250g)から肺を摘出し、エラスターゼで処理し、ATⅡ細胞を単離した。</p> <p>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、ビデオ顕微鏡法を用いATⅡ細胞をビデオ画像として記録観察した。得られたビデオ画像から20秒~1分毎に細胞面積(A)を測定し、静止時の値をA₀とし、得られた面積比(A/A₀)から体積変化(V/V₀)=(A/A₀)^{1.5}を計算した。</p> <p>細胞内pH(pH_i)の測定では、単離したATⅡ細胞を5μM BCECF-AMを含む溶液に30分間浮遊させ、pH指示蛍光色素であるBCECFを細胞内に負荷した。BCECFは450/490nmの2波長で励起し、530nmの蛍光強度を倒立型顕微鏡(Olympus IX70)に接続したpH測定システム(ARGUS/HiSCA, 浜松ホトニクス)を用いて測定し、その蛍光強度比(F₄₅₀/F₄₉₀)からpH_iを求めた。また細胞内Ca²⁺濃度([Ca²⁺]_i)は、Ca²⁺蛍光色素であるFura2を細胞内に負荷して測定した。340/380nmの2波長で励起して510nmの蛍光強度を測定し、[Ca²⁺]_iを蛍光強度比(F₃₄₀/F₃₈₀)で表現した。</p>	

《結果及び考察》

Ca²⁺-free 溶液は AT II 細胞の細胞容積減少を引き起こした。また、1 μ M amiloride (上皮性 Na⁺ チャンネル阻害剤)も methyl-isobutyl-amiloride (MIA, Na⁺/H⁺交換輸送阻害剤)も、それぞれ単独で細胞容積の減少を引き起こした。しかし、この Ca²⁺-free 溶液による細胞容積減少は、amiloride に影響されず、MIA 処置により消失した。このことは Ca²⁺-free 溶液による細胞容積減少が Na⁺ チャンネルではなく Na⁺/H⁺交換輸送によるものであることを示唆している。

そして Cl⁻/HCO₃⁻交換輸送の阻害剤である diisothiocyanostilbene disulfonic acid (DIDS)も acetamide isothiocyanatostilben disulfonic acid (SITS)も共に細胞容積を減少させた。しかし、Cl⁻/HCO₃⁻交換輸送の阻害剤投与後には Ca²⁺-free 溶液や MIA による細胞容積減少はみられなかった。このことは Na⁺/H⁺交換輸送と Cl⁻/HCO₃⁻交換輸送が機能的に連結して NaCl を細胞内に取り込んでいることを示唆している。

さらに Na⁺/H⁺交換輸送が細胞容積調節の役割を果していることを示すために、quinine (K⁺ チャンネル阻害剤)と amiloride で前処置をして、細胞内への Na⁺の流入経路を Na⁺/H⁺交換輸送だけにした上で細胞を ionomycin (Ca²⁺ ionophore)で刺激した。細胞の容積は amiloride と quinine 投与により増加するが、ionomycin 投与で更に増加した。また、MIA で前処置をすると、amiloride と quinine を投与してもこの細胞容積の増加は見られなかった。このことは、Ca²⁺の上昇による細胞容積の増加も Na⁺/H⁺交換輸送を介したものであることを示唆している。

一方、NHE1 の活性化を pH_i測定からも検討した。pH_iは Ca²⁺-free 溶液、MIA 投与、そして DIDS 投与では低下し、ionomycin 投与では上昇した。さらに NH₄Cl pulse 法による酸負荷後の MIA により阻害される pH_i回復過程が ionomycin により促進された。[Ca²⁺]_iは、ionomycin 投与により増加したので、[Ca²⁺]_iの上昇が細胞容積の増加およびアルカリ化を引き起こしたと考えられた。

本研究では[Ca²⁺]_iの上昇が NHE1 を活性化して Na⁺の細胞内への取り込みおよび H⁺の細胞外への汲み出しを促進し、逆に、[Ca²⁺]_iの低下は Na⁺/H⁺交換輸送を抑制することを示している。これらの結果から、AT II 細胞の NHE1 が[Ca²⁺]_iにより調節されていると考えられた。

以上より、AT II 細胞においては、NHE1 の活性が[Ca²⁺]_iによって調節されていると考えられた。また近年、細胞容積は種々の細胞機能調節因子として注目されており、NHE1 はその細胞容積の調節に重要な役割を果していると考えられた。

審査結果の要旨および担当者

報告番号	乙 第 号	氏 名	村 尾 仁
論文審査担当者		主 査 教授 清 水 章 副 査 教授 窪 田 隆 裕 副 査 教授 花 房 俊 昭 副 査 教授 林 秀 行 副 査 教授 宮 崎 瑞 夫	
主論文題名 Cell shrinkage evoked by Ca^{2+} -free solution in rat alveolar type II cells: Ca^{2+} regulation of Na^+/H^+ exchange (Ca^{2+} -free 溶液によるラット肺胞 II 型細胞の細胞容積減少: Na^+/H^+ 交換輸送の Ca^{2+} 調節)			
論文審査結果の要旨			
<p>申請者は雄ラットの肺から肺胞上皮 II 型細胞 (AT II 細胞) を単離し、AT II 細胞における Na^+/H^+ 交換輸送の Ca^{2+} 調節機構を解明しようとしている。まず Ca^{2+}-free 溶液灌流で AT II 細胞の容積が減少することに着目し、その減少が Na^+/H^+ 交換輸送の抑制によることを Na^+/H^+ 交換輸送の阻害剤、$\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 交換輸送の阻害剤、その他各種イオンチャネル阻害剤などの実験を組み合わせることにより証明している。さらに細胞内 pH (pH_i) を測定することにより Na^+/H^+ 交換輸送の調節機構を調べている。結果は Na^+/H^+ 交換輸送体が細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇により活性化され、反対に細胞内 Ca^{2+} 濃度の低下により抑制されることを示している。また、細胞容積は種々の細胞機能の調節因子として注目されており、Na^+/H^+ 交換輸送がその細胞容積の維持調節にとって重要であることもあわせて示している。</p> <p>本研究は肺胞上皮細胞のイオン輸送、pH_i 調節に関して新しい知見を見出しており、呼吸不全等の CO_2 排泄障害に伴う病態モデル構築のための基礎的な知識を提供していると考えられる。</p> <p>以上により、本論文は本学学位規程第 3 条第 2 項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> <p>(主論文公表誌) Experimental Physiology, 2005 in press</p>			