

学位論文内容の要旨

論文提出者氏名	論文審査担当者
大西 益美	主査 教授 窪田 隆裕
	副査 教授 宮崎 瑞夫
	副査 教授 林 秀行
	副査 教授 樋口 和秀
	副査 教授 谷川 允彦
主論文題名 細胞内 Cl^- 濃度変化によるモルモット胃幽門腺粘液開口放出の修飾 (Modulation of exocytosis in guinea pig antral mucous cells by intracellular Cl^- concentration)	
学位論文内容の要旨	
《目的》 モルモット胃幽門腺粘液細胞において粘液開口放出は主に Ca^{2+} によって調節され、この Ca^{2+} 調節性粘液開口放出は細胞容積減少により増強されると報告されている。一方、分泌刺激に伴う細胞容積減少は細胞内 Cl^- 濃度 ($[\text{Cl}^-]_i$) の減少を引き起こすことが知られている。本研究ではビデオ顕微鏡法を用いてモルモット胃幽門腺粘液細胞における粘液開口放出過程への $[\text{Cl}^-]_i$ の関与の可能性を検討した。 《材料および方法》 灌流溶液の組成は (mM) NaCl 121、 KCl 4.5、 NaHCO_3 25、 MgCl_2 1、 CaCl_2 1.5、 NaHEPES 5、 HHEPES 5、 Glucose 5 であり (pH 7.4)、混合ガス (95% O_2 、5% CO_2) で飽和し、37°C で実験を行った。 Cl^- -free 溶液は Cl^- を NO_3^- に置換した。 エーテル麻酔下に Hartley 系雄性モルモット (体重約 250 g) より胃幽門部の粘膜を摘出し、 collagenase (0.1%) 処理により遊離腺に分離した。遊離幽門腺細胞は 4°C で保存し、3 時間以内に使用した。 腺細胞を接着したカバーガラスを灌流チャンバーに装着し、ビデオ強調型顕微鏡を用いて粘液開口放出を観察した。この粘液細胞 4~6 個について 30 秒間を 1 単位として開口放出の頻度を測定し、細胞数で割り、1 細胞あたりの開口放出頻度として表現した。 《結果》 1) モルモット胃幽門腺において Acetylcholine (ACh) は二相性の開口放出反応を引き起こした (一過性・高頻度の初期相および持続性・低頻度の定常相)。 2) Cl^- -free 溶液下では、 ACh 誘発性開口放出 (ACh -induced exocytosis, AIE) は増強された。この増強効果は $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ 共輸送体の阻害剤である bumetanide 投与により細胞内への Cl^- 流入を抑制すると再現された。 3) 一方 $\text{5-nitro-2-(3-phenylpropylamino)benzoic acid}$ (NPPB) (Cl^- チャネル阻害剤) を用いて細胞からの Cl^- の流出を抑制したところ、 AIE は抑制された。 4) Ca^{2+} 非存在下では Cl^- -free 溶液灌流による AIE への増強効果は認められなかった。 5) Ca^{2+} イオノフォアである ionomycin 投与にて細胞内への Ca^{2+} 流入を促進させると、 ACh 刺激と同	

様の開口放出反応がみられ、この反応は Cl^- -free 溶液下では増強された。

- 6) Anoxia 状態および酸化的リン酸化阻害剤である dinitrophenol (DNP) にて ATP を枯渇させると AIE における初期相は消失し、定常相のみが観察された。しかし Cl^- -free 溶液前処理の後に ATP を枯渇させたところ ACh 刺激による開口放出の初期相は保たれた。

《考 察》

Cl^- -free 溶液灌流および bumetanide はいずれも細胞内への Cl^- の流入を減少させ $[\text{Cl}^-]_i$ が低下すると考えられる。逆に、 Cl^- チャネル阻害剤である NPPB 投与により Cl^- の細胞外への流出を阻害すると $[\text{Cl}^-]_i$ は上昇すると考えられる。 Cl^- -free 溶液灌流および bumetanide 投与では AIE は増強され、NPPB 存在下では、 Cl^- -free 溶液による AIE の増強効果も消失した。これらの結果により、 Cl^- -free 溶液の AIE の増強効果は Cl^- 流入減少による $[\text{Cl}^-]_i$ の低下により引き起こされていることが示唆された。

粘液顆粒の Ca^{2+} 調節性開口放出反応の最終段階は、docking、priming、fusion の 3 段階に分けられる。この priming step は ATP 依存性であり、fusion には Ca^{2+} を要するとされている。 Cl^- -free 溶液灌流による AIE への増強効果は Ca^{2+} 非存在下では認められなかった。つまり Cl^- -free 溶液灌流による増強効果は Cl^- が直接開口放出を活性化するのではなく Ca^{2+} の効果を増強していることが示された。次に細胞内 ATP を枯渇させると AIE における初期相は消失するが、 Cl^- -free 溶液を用いて前処理した後に細胞内 ATP を枯渇させた時には初期相が認められた。つまり、 Cl^- -free 溶液灌流下では priming step が活性化され priming された顆粒数が増加したためと考えられる。このことは ACh 連続刺激の実験で priming された顆粒を枯渇させた後の 2 度目の ACh 刺激では初期相が消失するが、 Cl^- -free 溶液灌流下では初期相が認められたことよりも支持された。以上より Cl^- -free 溶液負荷は $[\text{Cl}^-]_i$ の低下を介し、ATP 依存性の priming step を修飾し、priming された顆粒数を増加させて開口放出を増強させる可能性が示唆された。

審査結果の要旨および担当者

報告番号	甲 第 号	氏 名	大 西 益 美
論文審査担当者		主 査 教 授 窪 田 隆 裕	
		副 査 教 授 宮 崎 瑞 夫	
		副 査 教 授 林 秀 行	
		副 査 教 授 樋 口 和 秀	
		副 査 教 授 谷 川 允 彦	
主論文題名 細胞内 Cl^- 濃度変化によるモルモット胃幽門腺粘液開口放出の修飾 (Modulation of exocytosis in guinea pig antral mucous cells by intracellular Cl^- concentration)			
論文審査結果の要旨			
<p>申請者はモルモット胃幽門腺粘液細胞を用いて粘液分泌に対する細胞内 Cl^- 濃度 ($[\text{Cl}^-]_i$) の影響を検討している。本実験において、Cl^--free 溶液にて灌流を行い、$[\text{Cl}^-]_i$ を低下させると acetylcholine 誘発性開口放出 (AIE) は増強された。この増強効果は Na^+/K^+ 2 Cl^- 共輸送体の阻害剤である bumetanide の添加にて $[\text{Cl}^-]_i$ を低下させても再現された。一方、Cl^--free 溶液灌流による AIE への増強効果は Cl^- チャネル阻害剤である 5-nitro-2-(3-phenylpropylamino)benzoic acid 前処理を行い $[\text{Cl}^-]_i$ を上昇させると消失した。以上より、$[\text{Cl}^-]_i$ の変化が AIE を修飾することが示唆された。また、開口放出の最終過程は docking、priming、fusion の 3 段階に分けられ、priming の過程は ATP に依存している。細胞内 ATP を anoxia および dinitrophenol を用いて枯渇させると AIE での初期相は消失するが、Cl^--free 溶液灌流下に細胞内 ATP を枯渇させたところ初期相は再現された。これらの結果より、$[\text{Cl}^-]_i$ の低下は胃幽門腺の開口放出反応を増強するが、その増強効果は priming の過程を修飾していることが示唆された。$[\text{Cl}^-]_i$ は様々な細胞機能を修飾していると報告されている。胃幽門腺においても $[\text{Cl}^-]_i$ の変化が粘液分泌の調節に関与していることを見いだしたことは細胞生理学上大きな成果である。また、胃において酸分泌亢進時には粘液分泌細胞での $[\text{Cl}^-]_i$ の低下が予想され、酸分泌と粘液分泌の連携を考える上でも有意義と思われる。</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> <p>(主論文公表誌) 大阪医科大学雑誌 66(1): 31-41, 2007</p>			