

氏 名	奥 村 法 昭
学 位 の 種 類	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	博 士 第 5 9 9 号
学 位 授 与 の 要 件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
学 位 授 与 年 月 日	平 成 2 1 年 9 月 9 日
学 位 論 文 題 目	Regulatory role of tyrosine phosphorylation in the swelling-activated chloride current in isolated rabbit articular chondrocytes (家兔関節軟骨細胞の swelling-activated Cl ⁻ 電流におけるチロシンリン酸化の調節的役割)
審 査 委 員	主 査 教 授 大 久 保 岩 男 副 査 教 授 吉 田 不 空 雄 副 査 教 授 山 本 学

論文内容要旨

※整理番号	604	(ふりがな) 氏名	おくむら のりあき 奥村 法昭
学位論文題目	Regulatory role of tyrosine phosphorylation in the swelling-activated chloride current in isolated rabbit articular chondrocytes (家兔関節軟骨細胞の swelling-activated Cl ⁻ 電流における チロシンリン酸化の調節的役割)		
<p>【目的】 関節軟骨細胞は軟骨組織内に存在する唯一の細胞であり、コラーゲンやプロテオグリカンといった細胞外基質の産生、維持に主要な役割を担っている。その周囲の浸透圧環境は特殊であり、プロテオグリカンが陰性荷電を側鎖に持ち陽イオンをひきつけるため、正常の軟骨組織内の浸透圧は 350-450mOsm と他の組織や血漿に比べ高い。更に荷重負荷が加わると、陰性荷電間の距離が接近する結果、軟骨組織内の浸透圧は上昇する。一方、過度の荷重負荷や外傷などによりコラーゲンネットワークが破壊されると、陰性荷電間の距離は離れ水分子の流入が起こり組織内浸透圧は低下する。また、変形性関節症などの変性疾患では、細胞外基質の変性により水分子を留めて浸透圧を維持することが困難になる。このように軟骨組織、および軟骨細胞にとって浸透圧環境は重要な生理学的要因となっている。一般に細胞は低浸透圧環境にさらされたとき、細胞膨張といった危機的な状態に陥る。このとき細胞は調節性容積減少：regulatory volume decrease (RVD) という機構を働かせ、膨張した体積をもとの大きさに回復する。軟骨細胞においても低浸透圧下に働くこの機構が、基質代謝や軟骨組織の恒常性維持に重要な役割を担っていると考えられるが、他の細胞で確認されている swelling-activated Cl⁻電流 ($I_{Cl,swell}$) の関与については知られていない。磯矢らは、$I_{Cl,swell}$ の機能的発現を軟骨細胞において電気生理学的に確認しているが、RVD への直接的な関与とその活性化機序についての報告は無い。本研究の目的は RVD における $I_{Cl,swell}$ の機能的役割とその活性化機序について検討することである。</p> <p>【方法】 日本白色家兔の両膝、肩、股関節より軟骨組織を採取、DMEM 培地内で培養後 (1-3 日間) コラゲナーゼ処理を行ない、細胞を単離した。単離後 10 時間以内の細胞を実験に使用することで脱分化の影響を最小限にした。倒立顕微鏡に設置した記録槽に細胞を静置し、37℃の細胞外液を持続的に還流しながら、CCD カメラにて細胞のイメージを経時的に撮影した。画像解析により細胞横断面積を求め、細胞容積変化を記録した。電流の計測にはホールセルパッチクランプ法を適応し、同様の細胞に対してピペット電極を密着させ、膜電位固定下で全細胞膜電流を記録、解析した。</p> <p>【結果】 低浸透圧液に曝された軟骨細胞は速やかに膨張を始め (1.22 倍)、その後徐々に減少し</p>			

- (備考) 1. 論文内容要旨は、研究の目的・方法・結果・考察・結論の順に記載し、2千字程度でタイプ等で印字すること。
2. ※印の欄には記入しないこと。

たため、RVD機構を計測できることが確認できた。 $I_{Cl,swell}$ のRVDにおける役割を確認するため、 $I_{Cl,swell}$ の選択的ブロッカーであるDCPIBを低浸透圧液と同時に投与したところ、細胞膨張は認められたもののその後の減少は有意に抑制された。そのため $I_{Cl,swell}$ はRVDに不可欠な役割を持つと考えられた。次にホールセルパッチクランプ法を適用し、低浸透圧刺激に伴い活性化される全細胞膜電流を記録した。低浸透圧液に曝された軟骨細胞は速やかに膨張し、同時に外向き整流性を示す電流が可逆的に活性化された。この電流は、+50mV以上の膜電位では時間依存性に不活性化し、ネルンストの式で計算した Cl^- の平衡電位付近に逆転電位を持ち、 $I_{Cl,swell}$ の特徴を有していた。DCPIBにより大部分の電流は抑制され、タウリンの透過性を有する($P_{tau}/P_{Cl}=0.21$)ことも、今までの報告に見られる $I_{Cl,swell}$ と同様であった。

この活性化された電流に tyrosine kinase の阻害剤である genistein を投与したところ、大部分の電流が抑制され、不活性 analogue である daidzein には影響されなかった。また同薬剤で前処置したところ、genistein はこの電流の活性化も有意に抑制した。このことから tyrosine kinase 活性が $I_{Cl,swell}$ の活性化に必要であることが示唆された。チロシンリン酸化の役割について検討するため protein tyrosine phosphatase の阻害剤である orthovanadate をピペット電極を介して細胞内投与したところ、等浸透圧液下にも関わらず、活性化される電流を記録した。この電流は $I_{Cl,swell}$ の特徴を有していた。genistein で前処置した軟骨細胞ではこの反応は有意に抑制されたため、orthovanadate による電流の活性化には tyrosine kinase 活性が必要であることが示唆された。

【考察】多くの細胞において、細胞容積調節に Cl^- チャンネルの関与が報告されているが、今回の実験により、軟骨細胞においても $I_{Cl,swell}$ が低浸透圧刺激によって起こる細胞膨張とその後の RVD 機構に重要な役割を担っていることが確認できた。現在までに軟骨細胞の RVD 機構には、タウリン輸送経路の関与が報告されているのみであったが、 $I_{Cl,swell}$ がタウリン透過性を有することは過去の報告と矛盾しないものであった。ただし、同一チャンネルタンパク質を介したものかどうかは今後の研究が必要である。

$I_{Cl,swell}$ の活性化機序にチロシンリン酸化が関与するという報告は他の細胞で見られるが、その詳細はいまだ分かっていない。今回の結果より、チロシンリン酸化と脱リン酸化の適切なバランスによって調節されている可能性が示唆された。特に tyrosine kinase 活性によって、等浸透圧下でも $I_{Cl,swell}$ が活性化されるという結果は、変形性関節症などで見られる炎症性サイトカインなどが tyrosine kinase 活性を高めることや、等浸透圧下での $I_{Cl,swell}$ の活性化が apoptosis を誘導することとの関連性を考えると興味深いものである。

【結論】家兎関節軟骨細胞において、細胞膨張に伴い $I_{Cl,swell}$ が活性化され、その後の RVD 機構に寄与していることを明らかにした。 $I_{Cl,swell}$ の活性化はチロシンリン酸化の程度により調節されていることを示した。

学位論文審査の結果の要旨

整理番号	604	氏名	伊藤 隆雄
論文審査委員			
(学位論文審査の結果の要旨)			
<p>軟骨細胞は高浸透圧下にあるのみでなく、常に浸透圧変化に曝される環境にあり、浸透圧変化に対応することを求められる。しかし浸透圧変化によって引き起こされた容積変化に対応するための容積調節機構については未だ明らかではない。本研究は、家兔関節軟骨細胞を用いて、swelling-activated Cl電流 ($I_{Cl,swell}$) の容積調節性減少 (RVD) における機能的役割と、この電流の活性化機構におけるチロシンリン酸化の関与について検討を行ない、以下の点を明らかにした。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) $I_{Cl,swell}$ は RVD 過程に必要不可欠であった。 2) $I_{Cl,swell}$ の活性化は、チロシンリン酸化による調節を受けていた。 3) 軟骨細胞では、tyrosine kinase と tyrosine phosphatase が等浸透圧下で共に活性を持ち平衡状態にある。 <p>本論文は軟骨細胞の $I_{Cl,swell}$ の活性化機構と、その機能的役割について新しい知見を与えたものであり、最終試験として論文内容に関連した試問を受け、博士 (医学) の学位論文に値するものと認められた。</p>			
(平成 24 年 9 月 2 日)			