

氏 名	磯 矢 英 士
学 位 の 種 類	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	博 士 (論) 第 3 6 5 号
学 位 授 与 の 要 件	学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
学 位 授 与 年 月 日	平 成 2 1 年 3 月 2 5 日
学 位 論 文 題 目	Swelling-activated Cl ⁻ current in isolated rabbit articular chondrocytes: inhibition by arachidonic acid (ウサギ培養関節軟骨細胞における Swelling-activated Cl ⁻ 電流の検討およびアラキドン酸による抑制効果)
審 査 委 員	主 査 教 授 村 上 節 副 査 教 授 山 本 学 副 査 教 授 田 中 俊 宏

論文内容要旨

※整理番号	369	(ふりがな) 氏名	いそや えいじ 磯矢 英士
学位論文題目	Swelling-activated Cl ⁻ current in isolated rabbit articular chondrocytes: inhibition by arachidonic acid (ウサギ培養関節軟骨細胞における Swelling-activated Cl ⁻ 電流の検討 およびアラキドン酸による抑制効果)		
目的	<p>関節軟骨細胞は、コラーゲンやプロテオグリカンからなる軟骨基質の合成・維持に重要な役割を果たしている。プロテオグリカンは多数の硫酸基をもっており、周囲に陽イオンが引き寄せられるため、軟骨基質内の浸透圧は 350-450 mOsm と血漿浸透圧 (~280 mOsm) に比べて高い。さらに、軟骨への荷重にともなうプロテオグリカンの局在変化や変形性関節症などにみられる軟骨基質の変性によりその浸透圧は大きく変動する。このような浸透圧ストレスに曝される軟骨細胞において、細胞膜上にある種々のイオンチャネルやトランスポーターを介したイオン(オスモライト)の移動は正常な細胞容積調節に必須の役割を果たしている。変形性関節症の初期の軟骨浮腫にみられる細胞死(apoptosis や necrosis)の一部はこのようなイオン機序の破綻により引き起こされると考えられる。本研究はパッチクランプ法を用いて低浸透圧刺激による軟骨細胞の膨張にともない活性化される Cl⁻チャネル電流の存在を明らかにし、その電気生理学的ならびに薬理学的特性を明らかにすることを目的としている。</p>		
方法	<p>日本白色家兔の両膝、肩、股関節から軟骨組織を採取し、コラゲナーゼ処理により細胞を単離した。1-2日間の単層培養を行い実験に供した。軟骨細胞の全 RNA を抽出し、RT-PCR法を用いて I 型ならびに II 型コラーゲンの mRNA 発現を調べた。培養軟骨細胞から膜電流を記録は、ホールセルパッチクランプ法を用いて行った。倒立顕微鏡に設置した記録槽に細胞を静置し、37°Cの細胞外液を持続的に灌流した。先端径が約 1 μm のパッチガラス電極を単一軟骨細胞膜に密着させ(1 GΩ以上の強固なシールを形成)、膜電位固定下で全細胞膜電流の記録・解析を行った。</p>		
結果	<p>軟骨細胞は単層培養により比較的速やかに脱分化し、軟骨特異的な II 型コラーゲンの発現は減少し、I 型コラーゲンの発現が増加すること知られている。軟骨組織から単離直後の軟骨細胞と 2 日間単層培養を行った細胞でコラーゲンの mRNA 発現を調べたところ、いずれも II 型コラーゲンの発現はみとめられたものの、I 型コラーゲンの発現は検出できなかった。したがって本研究は軟骨特異的なコラーゲンの発現パターンを維持している単層培養 2 日以内の細胞を用いて全ての実験を行った。</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。

単一軟骨細胞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。軟骨細胞を低浸透圧（5%あるいは32%減）に曝すと細胞容積が速やかに増大し、同時に外向き整流性を示す電流が可逆性に活性化された。この電流は、+50 mV以上の膜電位では時間依存性に不活性し、ネルンストの式で計算したCl⁻の平衡電位付近で逆転した。また、5-nitro-2-(3-phenylpropylamino)benzoic acid, glibenclamideあるいはtamoxifenのような種々のCl⁻チャンネル遮断薬の投与により強く抑制された。このことから、軟骨細胞において低浸透圧刺激による膨張にともない活性化されるCl⁻電流 ($I_{Cl,swell}$) の存在が明らかになり、その電気生理学的ならびに薬理学的性質は心筋細胞や内皮細胞などの他の多くの細胞で同定されている $I_{Cl,swell}$ と同様であった。

低浸透圧刺激による細胞が膨張すると、ホスホリパーゼ A₂ が活性化し、膜リン脂質からアラキドン酸が遊離する。アラキドン酸やその代謝産物は、細胞容積調節に関わる種々のイオンチャンネルやトランスポーターの活性を修飾することが知られていることから、軟骨細胞の $I_{Cl,swell}$ におよぼすアラキドン酸の効果を調べた。低浸透圧刺激下で $I_{Cl,swell}$ を活性化した後、アラキドン酸を投与すると $I_{Cl,swell}$ は濃度依存性に抑制され、10 μ M でほぼ完全に抑制された。半最大抑制濃度 (IC_{50}) は0.81 μ Mであった。一方、アラキドン酸の代謝産物であるプロスタグランジン E₂, ロイコトリエン B₄ ならびにロイコトリエン D₄ はいずれも $I_{Cl,swell}$ に明らかな作用をおよぼさなかったことから、アラキドン酸の $I_{Cl,swell}$ 抑制効果にその下流代謝産物が関与する可能性は低いと考えられた。

考察

多くの細胞は、低浸透圧環境に曝されると一時的に膨張するものの、種々のイオンチャンネルやトランスポーターの活性化を介したイオン（オスモライト）の流出により、その後速やかに正常容積へと復帰する（調節性細胞容積減少：RVD）。これまでに軟骨細胞の RVD のイオン機序として、膜伸展感受性 K⁺チャンネルや Ca²⁺依存性 K⁺チャンネルの関わりがすでに明らかにされている。 $I_{Cl,swell}$ を介したCl⁻の流出はこれら K⁺流出経路の活性化と同時に起こることで細胞内の電気的中性を維持した RVD の達成に重要であると考えられる。一方、軟骨細胞において低浸透圧刺激で活性化されるタウリン輸送経路の存在が明らかにされており、これを介したアミノ酸の流出も RVD に関与することが示唆されている。 $I_{Cl,swell}$ は様々な有機アニオンにも透過性を示すことが知られていることから、軟骨細胞におけるタウリン輸送系と $I_{Cl,swell}$ との類似性が指摘されるが、薬理的性質の相違から両者は必ずしも共通のチャンネルタンパク質を介するものではないと考えられた。

変形性関節症由来の培養軟骨細胞においてはアラキドン酸ならびにその代謝産物の濃度上昇がみられる。アラキドン酸による $I_{Cl,swell}$ の過度な抑制は細胞容積調節に破綻を来し、変形性関節症における軟骨細胞の基質合成機能の低下の一因となる可能性が考えられた。

結論

家兎関節軟骨細胞において低浸透圧刺激による細胞膨張にともない活性化される $I_{Cl,swell}$ の存在を初めて明らかにした。 $I_{Cl,swell}$ の活性化ならびにアラキドン酸によるその修飾は、軟骨細胞の生理学的ならびに病態生理学的な細胞容積調節に重要であると考えられた。

学位論文審査の結果の要旨

整理番号	369	氏名	磯矢 英士
論文審査委員			
<p>(学位論文審査の結果の要旨)</p> <p>多くの細胞は低浸透圧環境に晒されると膨張するが、種々のイオンチャネルやトランスポーターを介して正常容積へと復帰する。本論文は、関節軟骨細胞におけるこの調節性細胞容積減少：RVDの新しい経路について研究したものである。結果を以下に示す。</p> <p>1) 関節軟骨細胞において、低浸透圧刺激により活性化するCl⁻イオンチャネルが存在することを確認した。阻害剤を用いた検討から、この経路はタウリン輸送体とは異なる経路であると結論した。</p> <p>2) この経路の活性化は、アラキドン酸の添加により抑制された。このアラキドン酸による負の修飾が病態に関与する可能性があると結論した。</p> <p>本論文は、軟骨細胞のRVD時のイオン流出経路としてこれまで知られていないCl⁻の流出経路が存在すること、並びにこの経路の活性化は、変形性関節症への関与が指摘されているアラキドン酸により抑制されることを初めて明らかにしたものである。</p> <p>この結果は、同疾患の病態・進展を解明する上で新しい知見を提供するものであり、博士(医学)の学位論文に値するものと認められた。</p> <p>(449字)</p>			
(平成21年2月20日)			