

学 位 論 文 題 名

ブタ培養顆粒膜細胞における膜電流系に関する研究

学位論文内容の要旨

細胞膜に存在するイオンチャンネルは、種々の細胞機能に密接に関与している。ステロイド産生細胞である卵巢顆粒膜細胞では、その培養系において Ca^{2+} の除去や Ca^{2+} チャンネルブロッカー投与により、プロゲステロンやステロイド産生促進効果を有する黄体化ホルモン（LH）のセカンドメッセンジャーであるcAMPの産生が抑制される。また、LHは顆粒膜細胞を脱分極させ、細胞内 Ca^{2+} 濃度（ $[\text{Ca}]_i$ ）を上昇させる。一方、黄体細胞において細胞外 K^+ 濃度を上昇させて細胞膜の脱分極を引き起こすと、プロゲステロン産生が増加する。したがって、顆粒膜細胞におけるステロイド産生に細胞膜の電位依存性イオンチャンネルが関与していることが推察される。本研究では、パッチクランプ法を用いて、培養ブタ卵巢顆粒膜細胞の膜電流系を解析し、そのLHによる影響を検討した。さらに、 K^+ チャンネルブロッカーのプロゲステロン産生への影響を検討した。

実験材料および方法

ブタ顆粒膜細胞は、屠殺場にて得られた生後6ヶ月のブタ卵巢の中卵胞（直径3～5 mm）より卵胞液を吸引して採取した。卵を除去した後、ブタFSH（10 ng/ml）を添加した無血清培地にて、95 % air・5 % CO_2 、37℃の条件下で48時間前培養した。その後は無血清培地のみにて培養を継続した。

単一顆粒膜細胞の膜電流の測定は、培養開始後3～5日に、先端内径が2～3 μm のガラス吸引電極を用いて、パッチクランプ法の全電流測定法により記録した。細胞外溶液および電極内液の組成は、各々 NaCl 143 mM; KCl 5.4 mM; CaCl_2 1.8 mM; MgCl_2 0.5 mM; NaH_2PO_4 0.33 mM; glucose 5.5 mM; HEPES 5.0 mM (pH 7.4) および K-aspartate 100 mM; KCl 20 mM; MgCl_2 1.0 mM; ATP- K_2 5.0 mM; phosphocreatine- K_2 5.0 mM; EGTA 0.5 mM; HEPES 5.0 mM (pH 7.4, pCa 8) とした。膜電流は、通常持続時間 300 msec の矩形波電圧パルスを0.1 Hzで与えて記録した。

K^+ チャンネルブロッカーのプロゲステロン産生への影響を検討するため、培養開始3日後に、LH非添加群、LH（100 ng/ml）添加群のそれぞれについて、培養液に K^+ チャンネルブロッカーである tetraethylammonium（TEA; 2～50 mM）もしくは 4-aminopyridine（4-AP; 0.2～5 mM）を加えて4時間培養した後、培養液中のプロゲステロン濃度を無抽出RIA法を用いて測定した。

得られた諸値は、平均値±標準誤差で表した。プロゲステロン濃度は、unpaired t-testにて有意差を検定し、 $p < 0.05$ で有意差ありとした。

結 果

1 膜電流系の解析とLHによる影響

保持電位を-70 mVとして、脱分極パルスを与えると、異なった時間依存性を持つ二種類の電位依存性 K^+ 電流が認められた。一過性外向き電流（ I_o ）は、試験パルス開始後急速に活性化して、5～20 msecで最大となり、100 msec以内に完全に不活化した。活性化閾値は

-40mV付近にあり、強い外向き整流特性を認めた。その不活化曲線より $V_{1/2}$ (50 %の不活化を示す膜電位)、 k (slope factor) は各々 -42.2 mV、3.8 mV ($n=9$) であった。遅延整流外向き電流 (I_K) は、5 sec 以上のパルスでも不活化を認めず、約 -30 mV で活性化して、やはり外向き整流特性を示した。 I_o および I_K は、膜電流を記録し得た 130 個の細胞のうち各々 33 個 (25 %)、21 個 (16 %) にほぼ単独に認められ、残りの細胞では、両者の K^+ 電流が種々の割合で合わさって認められた。両電流は、 K^+ チャンネルブロッカーである 4-AP (2 mM) により完全に抑制された。 I_K は別の K^+ チャンネルブロッカーである TEA (2~10 mM) により抑制されたが、 I_o はほとんど影響されなかった。また、両電流は Co^{2+} もしくは Ni^{2+} (2 mM) の細胞外溶液投与により抑制された。

細胞外溶液に 4-AP (2 mM) を加えて K^+ 電流を抑制した条件下で、保持電位 -70 mV より脱分極パルスを与えると、急速な活性化の後、50 msec 以内に不活化する Ca^{2+} 電流 (I_{Ca}) が認められた。その活性化閾値は -50 mV であり、-20 mV 付近で最大値をとった。 I_{Ca} は、L 型 Ca^{2+} チャンネルブロッカーである nifedipine、verapamil (10 μ M) に影響されず、T 型 Ca^{2+} チャンネルブロッカーである tetramethrin (1 μ M) により減少した。また、不活化曲線から $V_{1/2}$ 、 k は各々 -50.3 mV、4.8 mV ($n=3$) であった。

LH (100 ng/ml) の細胞外溶液投与により、 I_o は 13.9 ± 1.8 % ($n=7$) 抑制されたが、 I_K および I_{Ca} は影響を受けなかった。また、cAMP の同族体で細胞膜を透過する dibutyryl cAMP (1 mM) も同様に I_o のみを 21.0 ± 1.5 % ($n=4$) 抑制した。

2 K^+ チャンネルブロッカーのプロゲステロン産生に及ぼす影響

TEA は、LH 添加、非添加両群において 2~10 mM の濃度ではプロゲステロン産生に影響しなかったが、20 mM 以上の濃度で対照と比較して有意 ($p<0.05 \sim p<0.001$) にプロゲステロン産生を抑制した。4-AP は、LH 添加、非添加両群において、濃度依存性にプロゲステロン産生を抑制し、0.5 mM 以上の濃度で有意 ($p<0.01 \sim p<0.001$) な差を認めた。

考 察

本研究により、培養ブタ顆粒膜細胞において、二種類の K^+ 電流 (I_o 、 I_K) と、 Ca^{2+} 電流 (I_{Ca}) の存在を確認した。これらの K^+ 電流は Co^{2+} 、 Ni^{2+} により抑制されることから、 Ca^{2+} 依存性であると考えられた。一方、 I_{Ca} は、比較的過分極側での不活化 ($V_{1/2} = -50.3$ mV) と低閾値 (約 -50 mV) を示したこと、T 型チャンネルブロッカーである tetramethrin により減少したことから、T 型 Ca^{2+} 電流であると思われる。

細胞外液への LH 投与により I_o は減少し、同様の効果は dibutyryl cAMP によっても認められた。 I_{Ca} は LH の影響を受けなかった。したがって、LH は cAMP を介して I_o を抑制し、細胞膜の脱分極を引き起こして電位依存性 Ca^{2+} チャンネルを、二次的に開口する結果、 $[Ca]_i$ を上昇させてステロイド産生などの細胞機能に作用するものと考えられた。一方、 K^+ 電流の強い Ca^{2+} 依存性から、LH による $[Ca]_i$ の上昇が K^+ 電流を活性化し、膜電位の再分極を引き起こして Ca^{2+} チャンネルを閉じる事も予想される。したがって、 K^+ 電流は、LH 作用に強く関わっているものと思われる。

また、今回検討した二種類の K^+ チャンネルブロッカーのうち、 I_o および I_K の両者を抑制する 4-AP は、プロゲステロン産生を抑制したが、TEA は、 I_K のみを抑制する 10 mM 以下の濃度では影響を認めなかった。即ち、4-AP のプロゲステロン産生抑制効果は、 I_o の抑制によるものと思われる。したがって、 K^+ チャンネルブロッカーを用いた実験においても、 I_o がプロゲステロン産生に関与することが示唆された。ところで、LH が I_o を抑制したことから、同じ I_o 抑制作用を有する 4-AP もプロゲステロン産生を促進することが予想され、実際の実験結果とは矛盾する。その説明として、4-AP による持続的な K^+ チャンネルの抑制のため、脱分極が持続して Ca^{2+} チャンネルの不活化を引き起こし、細胞内への Ca^{2+} 流入がとまってステロイド産生が抑制されることが考えられる。

以上、本研究により、卵巣顆粒膜細胞におけるプロゲステロン産生および LH 作用に、 I_o をはじめとする K^+ 電流が重要な役割をもっていることがはじめて具体的に示された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 菅 野 盛 夫

副 査 教 授 本 間 研 一

副 査 教 授 藤 本 征 一 郎

学 位 論 文 題 名

ブタ培養顆粒膜細胞における膜電流系に関する研究

本研究は、ブタ卵胞顆粒膜細胞の膜電流系をパッチクランプ法によって解析し、この細胞の生理機能であるプロゲステロン産生機構との関連について明らかにすることを目的に行ったものである。

研究には、生後6ヶ月のブタ卵巢の中型卵胞(直径2~5mm)より採取した顆粒膜細胞をブタ卵胞刺激ホルモン(FSH: 10 ng/ml)を添加した無血清培地にて48時間前培養し、その後は無血清培地のみにて培養して用いている。単一顆粒膜細胞の膜電流は、ガラスピペット電極を用いて、パッチクランプ法の全電流測定法により測定している。顆粒膜細胞のステロイド産生能を、培養開始3日後に黄体化ホルモン(LH)添加群および非添加群のそれぞれについて、培養液にK⁺チャンネルブロッカーであるtetraethylammonium (TEA)もしくは4-aminopyridine (4-AP)を加えて4時間培養した後、無抽出RIA法によって測定された培養液中のプロゲステロン濃度から評価した。

得られた結果は次の通りである。すなわち、

- 1) ブタ培養顆粒膜細胞には、異なった時間依存性を持つ2種類の電位依存性K⁺電流が認められた。すなわち、一過性外向き電流(I_{to})と遅延整流外向き電流(I_K)である。膜電流を記録し得た130個の細胞のうち、33個(25%)の細胞には I_{to} のみが、21個(16%)の細胞には I_K のみが記録され、残りの細胞では両者のK⁺電流が種々の割合で合わさって認められた。K⁺チャンネルブロッカーである4-AP (2 mM)は両者を完全に抑制し、別のK⁺チャンネルブロッカーであるTEA (2~10 mM)は I_K を抑制したが、 I_{to} にはほとんど影響を与えなかった。両電流はCo²⁺もしくはNi²⁺ (2 mM)の細胞外溶液投与により抑制された。
- 2) ブタ顆粒膜細胞で記録されるCa²⁺電流(I_{Ca})は、L型Ca²⁺チャンネルブロッカーによって影響されず、T型Ca²⁺チャンネルブロッカーであるtetramethrin (1 μ M)により減少したことから、T型Ca²⁺電流と結論した。
- 3) LH (100 ng/ml)の細胞外溶液投与により、 I_{to} は13.9%抑制されたが、 I_K および I_{Ca} は影響を受けなかった。また、cAMPの同族体で細胞膜を透過するdibutyryl cAMP (1 mM)も同様に I_{to} のみを21.0%抑制した。
- 4) プロゲステロン産生に対し、2~10mMの濃度で I_K 抑制作用を示したTEAは影響を与えなかった。しかし、 I_{to} および I_K を抑制する4-APは、0.5 mM以上の濃度でLH添加、非添加両群において、濃度依存性にプロゲステロン産生を抑制した。

以上の結果から、申請者は次のような結論に到達している。すなわち、ブタ培養顆粒膜細胞において、LHは、cAMP産生を介して I_{to} を抑制する結果、細胞膜の脱分極を引き起こしてT型Ca²⁺チャンネルを開口させ、[Ca]_iを上昇させてプロゲステロン産生を亢進する。一

方、K⁺電流の細胞内Ca²⁺依存性から、LHによる[Ca]_iの上昇がK⁺電流を活性化し、膜電位の再分極を引き起こしてCa²⁺流入を制御する。したがって、顆粒膜細胞のK⁺電流は、LH作用に強く関わっているとしている。しかしながら、この仮説に矛盾するのはI_{to}およびI_Kの両者を抑制する4-APの前処置がプロゲステロン産生を促進せずに、むしろ抑制したことである。その説明として、LH作用の発現には機能性をもつI_{to}の存在が必要であり、その背景には、4-APによる持続的なK⁺チャンネル抑制が膜の脱分極を持続してCa²⁺チャンネル不活化を引き起こすことが考えられるとしている。

本研究の発表に際して、実験方法、実験結果の解釈、さらに得られた結論の妥当性等に関し本質的な質疑がなされた。主要なものをあげると、本間研一教授からは、パッチクランプ法による細胞内環境変化やEGTAによる細胞内Ca²⁺濃度の固定が実験結果に与える影響を無視できるのか、LHが産生するcAMPによる蛋白キナーゼ活性化の経路を考えなくても良いのか、藤本教授からは、発現してくるK⁺電流に細胞差がみられる理由はなにか、卵胞にあっては顆粒膜細胞は集団として機能しているから、細胞集団として膜電位固定による電流解析が出来ないのか、得られた結果の臨床的意義はなにか、牧野田助教授からは、性周期に関連してK⁺電流発現に差異は観られないか、また、プロゲステロン産生との関連はどうか、菅野教授からは、この領域における最近の進展はなにか、K⁺チャンネルブロッカーによるホルモン産生抑制の機序は、などである。申請者は未発表データや豊かな学識を駆使してこれらの質問に適切に解答し得た。

発表終了後に、主査および2名の副査は審査委員会を開催し、本研究の新規性、実験方法の妥当性、実験結果の信頼性、結果の解釈と結論に至る論理の妥当性などについて審議した結果、いずれも水準を越えていて、高く評価し得るとの判定がなされた。

本研究はブタ培養顆粒膜細胞の膜電流系を解析して、この細胞の生理機能であるプロゲステロン産生機構との関連に関し妥当な仮説を提唱したものである。審査員一同は、本研究がこの領域の研究に重要な示唆を与え、今後の研究の発展に寄与するところが大きいと評価し、申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。