

論文の内容の要旨

論文題目

K⁺ channels and cell functions in pituitary folliculo-stellate cells

(下垂体前葉濾胞星状細胞におけるカリウムチャンネルと細胞機能について)

山崎知子

下垂体濾胞星状細胞 (FS 細胞) は多くの細胞突起を有しホルモン分泌細胞を取り囲むような形で存在している。これまで FS 細胞は下垂体の支持細胞と考えられてきた。しかし最近、ホルモン分泌細胞のパラクリン的な調節など、新しい機能が明らかとなってきた。また FS 細胞は S100 蛋白やグリア線維性蛋白が陽性であることなど、中枢神経系のグリア細胞と類似した性質を有している。グリア細胞では、イオンチャンネルや神経伝達物質の受容体の存在が報告されている。これらのチャンネルなどは隣接する神経細胞の興奮性に直接影響を与え得るものであり、中枢神経系におけるグリア細胞の重要性が注目を集めている。下垂体のホルモン分泌細胞は神経細胞と同じようにカルシウム依存性の活

動電位を示し、電位依存性チャネルから流入するカルシウムイオンがホルモン分泌に密接に関わっている。FS 細胞はグリア細胞と類似しているが、イオンチャネルの解析はこれまで報告がなく、このイオンチャネルがどのような機能と関連しホルモン分泌細胞に影響を与えうるかについては検討されていない。よって本研究では FS 細胞のイオンチャネルを解析し (Part I)、これらと細胞機能、特に細胞増殖との関連について検討した (Part II)。

(Part I) 実験には FS 細胞の樹立細胞株であるマウス TtT/GF 細胞を用い、チャネルの解析にはパッチクランプ法の変法であるホールセルクランプ法を用いた。TtT/GF 細胞はその培養時の形態から、培養皿に強く付着して突起のある細胞と突起が無く付着の弱い円形の細胞とに区別され、さらにこれらの細胞が他の細胞と接触しているか否かに区別された。他の細胞と接触していない円形の細胞以外では、脱分極によって活性化される外向き電流が認められた。このことは細胞の接触状態がカリウム電流の発現に関与していることを示唆する。テール電流の反転電位からこの電流はカリウム電流であることが明らかとなった。細胞外のカルシウムイオンをコバルトイオンに置換したり、パッチ電極から細胞内に EGTA を作用させて細胞内カルシウムイオンをキレートしても、このカリウム電流は変化しなかった。よって遅延整流性カリウム電流であると結論された。チャネルの活性化、不活性化過程は一次対数式で近似でき、その時定数はグリア細胞やシュワン細胞のカリウム電流の時定数と類似していた。カリウムチャネル阻害剤である 4-アミノピリジン(4AP)、テトラエチルアンモニウム(TEA)、バリウムはこの電流を抑制し、 EC_{50} はそれぞれ 0.2 mM, 0.8 mM, 8 mM であった。グリア細胞に見られる内向き整流性カリウム電流は認められず、電位依存性カルシウム、及びナトリウム電流も認められなかった。FS 細胞の静止膜電位は -30~-50mV の間にあり、カリウムチャネルの閾値に非常に近い値で

あった。以上より TtT/GF 細胞には細胞の接触状態により変化する遅延整流カリウムチャンネルが存在し、これは TEA や 4AP によって抑制されることがわかった。よって膜電位の変化がカリウムチャンネルの透過性を変え、隣接するホルモン分泌細胞に影響を与えることが示唆された。

(Part II) 次にカリウムチャンネルと細胞の機能、特に細胞増殖について検討した。TtT/GF 細胞以外に下垂体ホルモン分泌細胞であるラット GH₃ 細胞とマウス AtT-20 細胞を用い比較検討した。TEA と 4-AP を作用させたところ、TEA により用量依存性に TtT/GF 細胞と AtT-20 細胞の増殖が抑制された。EC₅₀ はそれぞれ 5 mM, 1.2 mM であった。4-AP は AtT-20 細胞の増殖を用量依存性に抑制し、EC₅₀ は 1.2 mM であった。TEA、4-AP は GH₃ 細胞の増殖にはほとんど影響を与えなかった。細胞周期の解析では、TEA により TtT/GF 細胞と AtT-20 細胞に G₀/G₁ 期停止が起こることが明らかとなった。さらにアポトーシスについても検索したが、TEA により AtT-20 細胞にアポトーシスが誘導されることが判明した。よって TEA は TtT/GF と AtT-20 細胞に G₀/G₁ 期停止やアポトーシスを起こして細胞増殖を抑制すると結論され、4-AP による AtT-20 細胞の増殖抑制はこれ以外の機序によると考えられた。GH₃ 細胞と AtT-20 細胞のカリウム電流に対する TEA と 4-AP の効果を検討したが、TEA がより効果的にカリウム電流を抑制した。EC₅₀ はそれぞれ 2.5 mM と 1.6 mM であった。4-AP はいずれの細胞においても著明な電流抑制効果を示さなかった。TEA や 4-AP によるカリウム電流抑制は細胞増殖抑制とは十分一致しなかったため、カリウムチャンネルのサブタイプを RT-PCR により検索した。その結果 TtT/GF 細胞では Kv1.2 と Kv2.1 が、GH₃ 細胞では Kv1.4、Kv1.5、Kv2.1 が、AtT-20 細胞では Kv1.2 と Kv1.3 が認められた。TtT/GF 細胞と AtT-20 細胞では Kv1.2 が共通しており、よって Kv1.2 が増殖に関与している可能性が示唆された。以上より TtT/GF 細

胞では TEA によって細胞増殖が抑制され、その機序としては G0/G1 期停止を起こすことが明らかになった。カリウムチャネルのサブタイプとしては Kv1.2 が関係している可能性が示唆された。Kv1.2 はこれまでに細胞内情報伝達系との関連が示唆されており、TtT の増殖調節においても同様の機序が考えられる。

本論文の結果よりグリアと神経細胞の関係同様に、FS 細胞と内分泌細胞との間にイオンチャネルによる調節が関与している可能性があること、イオンチャネルは従来考えられていた「単なるイオンの通路」ではなく、細胞機能調節の上でも重要な役割を有すると考えられた。