

		わらしな あきら
氏名	薬科	彬
学位	博士	(医学)
学位記番号	新大博(医)第1719号	
学位授与の日付	平成20年1月25日	
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当	
博士論文名	Modeling of stimulation-secretion coupling in a chromaffin cell (クロマフィン細胞の「刺激-分泌」連関のモデル化)	
論文審査委員	主査 教授	長谷川 功
	副査 教授	牛木辰男
	副査 教授	車田正男

博士論文の要旨

副腎髄質細胞(adrenal chromaffin 細胞)からのカテコルアミン分泌応答の解析結果から、Douglasらは1965年、ホルモン分泌制御に Ca^{2+} が主要な役割を演ずることを明らかにした。以来、副腎の灌流標本や分離培養細胞を用いて、この細胞の電気生理学的性質と分泌関連事象は詳しく研究されてきた。しかし、これらのデータは膨大な文献の中に分散しており、有効に利用することは容易ではない。そこで、知見を集約したコンピューターモデルを作成し、シミュレーションにより、種々の状況における「刺激-分泌」過程を定量的、経時的に表すことができれば、この細胞に関する実験の予測や結果の解析に大変有用なものになると考えられる。この初めての試みとして申請者は「クロマフィン細胞モデル」を作製し、その有用性の評価を行った。以下はその要約である。

副腎髄質細胞からのカテコルアミン分泌の主経路は、内臓神経からのアセチルコリンによる興奮性伝達で髄質細胞に活動電位が発生し、同時に活性化される Ca^{2+} チャネルからの Ca^{2+} 流入により、分泌顆粒の開口放出が惹起されるという過程である。これに従い、直径 $15\mu m$ の球形モデル細胞に以下の機能を数式化により付与した。細胞膜にシナプス電流と Na^+ , K^+ , Ca^{2+} チャネルによる膜電位依存性のイオン電流発生機構を持たせた。これらの機能に係わるパラメーターの値は、ラット副腎髄質細胞で報告されているシナプス電流、膜電位-電流関係、活動電位の性状を再現するように決定された。流入 Ca^{2+} の細胞内での拡散は細胞内を同心球面で6殻層に区分し、殻層間の Ca^{2+} の移動として扱われた。また、各殻層では細胞内 Ca^{2+} 緩衝物質、および添加 Ca^{2+} 指示薬による Ca^{2+} の結合と遊離反応が行われる。本論文には含まれていないが、ミトコンドリアと小胞体による Ca^{2+} 吸収と放出に関するモデルの作成は各々、参考論文(1)と(2)に記載した。細胞膜に接する最外層の Ca^{2+} 濃度を感受して、ミカエレーメンテン型の Ca^{2+} 排出、および Ca^{2+} 依存型の K^+ チャネルのコンダクタンスが制御された。更に、分泌応答も最外層の Ca^{2+} 濃度に依存して起きるが、これは分泌顆粒が貯溜状態から細胞膜への繫留状態へと動員され、開口放出に至るといふ、Heinemann ら(Pflugers Arch, 424:105-119, 1993)による定

式化に従った。このように構築したモデルはシミュレーションプログラム“NEURON”により計算され、文献中の実験結果が適切に再現できるように標準的パラメーターの値が決定された。

次の段階では、分離培養細胞における実験・解析データに基づき構築した上記モデルが生理的な状況における副腎髄質からのカテコラミン分泌応答をどの程度適切に表現できるかを検討するため、灌流副腎を用いた分泌刺激実験とそのシミュレーションを行った。実験にはラット摘出副腎を副腎静脈より Krebs 液で灌流した標本を用いた。副腎皮質の半面を切除し、露出した副腎髄質部位を倒立蛍光顕微鏡の対物レンズ方向に向け、予め Ca^{2+} 指示薬 (Fura-2) を負荷した髄質細胞の遊離 Ca^{2+} 濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) の変動を顕微蛍光分析により計測した。また、これと同時に灌流液中に分泌されたカテコラミン濃度を炭素線維電極により検出した。この実験における単離副腎当たりの分泌量と単一細胞の分泌を扱うシミュレーション結果の比較に際してはラット副腎中の平均髄質細胞数、分泌顆粒に含まれるカテコラミンの量に関する文献値を用い換算を行った。髄質細胞の刺激は二方法で行われ、第一の方法では、外部銀線電極により髄質部位全体に渡る電気パルスを掛け、髄質内に存在する内臓神経終末部位を刺激し、シナプスを介する興奮性伝達により髄質細胞を刺激した。2.5 Hz 以下の低頻度パルス刺激ではパルス毎の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の上昇が識別され、20 回刺激後の到達 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ レベルも低い。一方、10 Hz 以上の高頻度パルス刺激ではパルス毎の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の上昇は重畳して融合し、20 回刺激後にはほぼ飽和レベルに達した。この $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の上昇モードを反映し、20 秒間の刺激による分泌量は 1-5 Hz の間の刺激頻度の増加で急激に増加するが、5 Hz 付近で飽和レベルに達して、50 Hz までの刺激頻度増加による分泌量の変化はほとんど見られない。このような実験に対応するシミュレーションを実行し、実験に近い結果が得られた。次に、第二の刺激方法として、灌流液の K^+ 濃度を正常の 5.4 mM から 40 mM に 10 分間切り替え、髄質細胞を持続的に -30mV に脱分極させた。この刺激の間、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ と分泌は、初期の一過性の増加とその後の持続的な応答を示した。これらの応答の特性は定量的な観点からも、シミュレーションで良く再現できた。

以上の結果から、多くの文献上の知見を編集して構築した本クロマフィン細胞モデルは、組織中の副腎髄質細胞の「刺激-分泌」連関を有効に表現しており、実験結果の予測や解析に使用可能であり、更に将来の生体機能全体のモデル化に際し、副腎機能として組み込む素材となり得ると考えられる。

(論文審査の要旨)

申請者は副腎髄質クロマフィン細胞で、内臓神経刺激により Ca イオンが流入しカテコラミンが分泌される過程をコンピュータでシミュレートし、モデルの有用性を評価した。

まず、シミュレーションのために、シナプス電流、膜電位依存型 Na, K, Ca チャネル、Ca 依存型 K チャネル、細胞内 Ca 緩衝、Ca 開口放出と再吸収を定式化したモデルを作り、培養細胞系での文献値に適合するよう諸変数を定めた。また、このモデルの評価のために、ラット副腎組織の灌流標本で①電気刺激②高濃度 K 灌流による脱分極刺激を行い、Fura-2 を用いて Ca 濃度を光学測定し、灌流液に分泌されたカテコラミン濃度を炭素電極で計測した。

その結果、①低頻度パルス刺激に応答する細胞内 Ca 上昇、Ca 飽和レベル、高頻度刺激による Ca 上昇の重畳、カテコラミン分泌量の刺激頻度応答特性の何れにおいても、シミュレーションにより実験結果がほぼ再現された。また、②Ca 濃度と分泌は一過性の増加とその後の持続的な応答を示し、シミュレーションで良く再現できた。

以上、本研究では副腎クロマフィン細胞の刺激分泌連関のモデルを初めて構築し、このモデルでラット灌流組織標本での実験結果を定量的に再現することに成功した。この点に学位論文としての価値を認める。