



Title	Superoxide anion increases intracellular free calcium in human myometrial cells.
Author(s)	増本, 伸之
Citation	大阪大学, 1991, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/37827
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏名・(本籍)	増	本	伸	之
学位の種類	医	学	博	士
学位記番号	第	9814		号
学位授与の日付	平成3年5月28日			
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当			
学位論文名	Superoxide anion increases intracellular free calcium in human myometrial cells. (スーパーオキシドのヒト子宮筋細胞内 Ca^{2+} に及ぼす影響)			
論文審査委員	(主査)			
	教授	谷澤	修	
	(副査)			
	教授	和田	博	教授 荻原 俊男

論文内容の要旨

〔目的〕

近年、活性酸素とりわけスーパーオキシドの生体内における役割が、組織、細胞レベルで研究されている。しかしその標的細胞の細胞内情報伝達機構に及ぼす影響について検討した報告は少ない。そこで私は妊娠末期の子宮筋単一細胞を用いてスーパーオキシドが細胞内遊離 Ca^{2+} 濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) に与える影響をオキシトシンによる場合と比較検討した。

〔方法〕

帝王切開時に得た子宮筋を16～18時間コラゲナーゼで処理し、得られた遊離細胞を特殊ディッシュのカバーガラス上に24～48時間単層培養した。まず細胞を抗デスミン、抗ミオシンモノクローナル抗体で標識、FITC間接蛍光抗体法にて染色し、単層培養による表現型の変化を検討した。細胞内 Ca^{2+} 測定は、 Ca^{2+} 感受性蛍光色素 Indo 1-AM と蛍光顕微鏡2次元画像処理システムを用いて行なった。まず Indo-1 AM を $5\mu\text{M}$ 、60分負荷し、洗浄の後種々の添加物を加え実験した。スーパーオキシドはヒホキサンチン (HX) にキサンチンオキシダーゼ (XO) を添加して発生させた。

〔成績〕

子宮筋細胞の単層培養における表現型の変化を検討したが培養2～4日目では、ほとんどすべての細胞が両抗体で強く染色され、我々の培養条件では細胞は筋収縮型の表現型を維持していることが確認された。子宮筋細胞において HX-XO 添加直後より $[\text{Ca}^{2+}]_i$ は上昇し、30秒でピークに達し、120

秒では基礎値にもどった。2次元画像では基礎レベルの $[Ca^{2+}]_i$ の分布は核周辺に高い部分が見られたが、HX-XO添加により細胞膜近傍の不均一な $[Ca^{2+}]_i$ 上昇が見られた。HXとXOは単独ではどちらも $[Ca^{2+}]_i$ 上昇作用を認めなかった。スーパーオキシドディスムターゼ(SOD)およびSOD+カタラーゼの前処置を加えるとHX-XOによる $[Ca^{2+}]_i$ 上昇作用は有意に抑制された。HXを一定(1mM)にした場合、 $[Ca^{2+}]_i$ はXO 1-100 mU/mlの間で濃度依存性に上昇した。次にHX-XO刺激前後で、生理的子宮筋収縮物質であるオキシトシンを添加したが $[Ca^{2+}]_i$ の基礎値及びオキシトシンによる上昇作用に変化は、みられなかった。以上よりHX-XO添加による $[Ca^{2+}]_i$ 上昇は細胞障害によるものではないことが示された。次にこの $[Ca^{2+}]_i$ 上昇メカニズムを調べる為に、 Ca^{2+} -freeの培養液又は通常の培養液に Ca^{2+} チャンネルブロッカー(ニフェジピン)を加えた液で同様の実験を行った。これらの条件下では、スーパーオキシドによる $[Ca^{2+}]_i$ 上昇は有意に抑制された。

この結果より $[Ca^{2+}]_i$ 上昇の大部分は細胞外からの流入、特にL型 Ca^{2+} チャンネルを介したものであることが示唆された。次にスーパーオキシドとオキシトシンの律動刺激による $[Ca^{2+}]_i$ の変動を連続的に検討した。その結果スーパーオキシドによる $[Ca^{2+}]_i$ の反応はオキシトシンによるものと比較して、応答期が短く、感受性低下も小さいことが明らかとなった。

〔総括〕

今回の実験でスーパーオキシドは細胞を障害することなく特異的に子宮筋 $[Ca^{2+}]_i$ を上昇させ、その大部分が細胞外 Ca^{2+} の流入によること、その $[Ca^{2+}]_i$ 上昇作用は Ca^{2+} チャンネルブロッカーで抑制されることをはじめて明らかにした。この結果より子宮感染巣で好中球やマクロファージにより産生されるスーパーオキシドは、主に細胞膜 Ca^{2+} チャンネルを介して、子宮収縮に関与している可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

本研究は、子宮内感染巣で発生するスーパーオキシドが子宮筋細胞内 Ca^{2+} を上昇させることをはじめて明らかにした。研究は、蛍光色素による細胞内 Ca^{2+} 濃度測定法と還流システムを組み合わせた独創的な手法で行われ、得られた結果は過去の論文には見いだされていない。本研究は早産管理法に示唆をあたえる重要な研究である。

以上より本研究は博士論文に値する。