



Title	Epidermal Growth Factor Induces Dose-dependent Calcium Oscillations in Single Fura-2-loaded Hepatocytes
Author(s)	田中, 由宇志
Citation	大阪大学, 1993, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/38144
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	田中由志
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第10659号
学位授与年月日	平成5年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学研究科内科系専攻
学位論文名	Epidermal Growth Factor Induces Dose-dependent Calcium Oscillations in Single Fura-2-loaded Hepatocytes (fura-2を負荷した単一肝細胞におけるEGFによる濃度依存性カルシウムoscillation)
論文審査委員	(主査) 教授 鎌田 武信 (副査) 教授 谷口 直之 教授 多田 道彦

論文内容の要旨

(目的)

細胞内情報伝達系は、細胞増殖や細胞機能発現のメカニズム解明の鍵として注目を集めている。細胞内カルシウム($[Ca^{2+}]_i$)は、phenylephrine等のホルモンの細胞内メッセンジャーとして知られているが、近年EGF等の増殖因子がPLC-γのtyrosineリン酸化により $[Ca^{2+}]_i$ の上昇を起こす可能性が示され、増殖シグナルにおける伝達系間のクロストークが注目されつつある。そこでデジタル蛍光顕微鏡を用い初代培養肝細胞におけるEGFおよびcomitogenとして知られるphenylephrineによる $[Ca^{2+}]_i$ の反応、相互作用について単一細胞レベルで検討した。

(方法)

①初代培養肝細胞の調整

SD系雄性ラット肝臓を経門脈的に、 Ca^{2+} free、0.5mM EGTAを含むHanks-HEPES buffer(pH7.4)にて前灌流し、次に5mM Ca^{2+} 、0.5% albumin、0.05% collagenase、0.005% trypsin inhibitorを含むHanks-HEPES buffer(pH7.5)にて灌流して遊離肝細胞を得た。5% fetal bovine serum、1μM insulin、1μM dexamethasoneを含むWilliams E培養液にて肝細胞浮遊液とし、collagenにてcoatingしたカバーガラス上に 1×10^6 cells/ $0.2\text{ml}/\text{cm}^2$ の細胞密度でまき、37°C、5% CO₂の条件で培養した。

②細胞内カルシウムの測定

培養後2~8時間でfura-2を負荷したのち(3.3~5μM fura-2/AMを含むHanks-HEPES bufferにて37°C 60分間incubation)新しいHanks-HEPES bufferに交換し、カルシウム測定に供した。 $[Ca^{2+}]_i$ は、デジタル蛍光顕微鏡システムを用い、340nm、380nm二波長励起による、510nm蛍光比より単一細胞レベルで測定した。すなわち、fura-2を取り込んだ培養肝細胞の付着したchamberを顕微鏡上に設置し、経時に上記2波長にて交互に励起し、5~20分間にわたって、視野内の数十個の細胞の出す510nmの蛍光像をSIT-カメラにて取り込み、分解能8bitにてコンピュータのメモリーに取り込ませた。測定終了後、画像間演算により、510nm蛍光比画像を算出させ、各細胞ごとに関心領域を設定し単一細胞ごとのagonist刺激による $[Ca^{2+}]_i$ の経時的変動を検討した。蛍光比から $[Ca^{2+}]_i$ への変換は、Grynkiewiczらの方法により作成したcalibration curveを用いて行った。

(成績)

I. 単一細胞と細胞集団での観測される細胞内カルシウム反応の差異

phenylephrine 刺激により、単一細胞レベルでは視野内のほとんどの細胞で周期的に繰り返すピークからなる oscillation が検出されたが、これら同一視野内の細胞の蛍光データを使って、シミュレーションにより、細胞集団としてのカルシウムの反応を計算すると、僅かに biphasic な反応しか得られなかった。

II. 増殖因子 (EGF, phenylephrine) による細胞内カルシウム動態

①細胞内カルシウム oscillation

EGF 刺激による $[Ca^{2+}]_i$ は、従来より細胞集団にて報告されている持続性の上昇と異なり、周期的に繰り返すピークからなる oscillation を示した。EGF 0.1nM 刺激で、視野内の 79 % の細胞が反応し、そのうち 78 % が oscillation を示したが、その周波数は同一刺激、同一視野内であるにもかかわらず細胞間でかなりの差が認められた。

②oscillation 周波数の刺激濃度依存性

EGF に対する反応性に 細胞間でかなりの差が認められたため、刺激濃度による反応性の変化を調べるために、灌流下に同一細胞を順次異なる濃度の EGF で刺激して反応を比較した。刺激濃度の増加により oscillation の周波数が増加したが、各ピークの振幅には明らかな増加は認められなかった。

③EGF と phenylephrine での oscillation パターン

oscillation のパターンは tyrosine kinase 系を介するとされている EGF 刺激と、phosphatidylinositol 系を介するとされている phenylephrine 刺激とではかなり異なり、phenylephrine に比して、EGF では刺激から oscillation 開始までの latency が著明に長く、各ピークの duration が長く、より低い周波数の oscillation を示した。飽和刺激濃度とその 1/10 濃度で oscillation のパターンを比較したところ、latency, duration, frequency いずれの parameter においても両 agonist 間で有意差を認めた。

④EGF による $[Ca^{2+}]_i$ oscillation の phenylephrine 追加刺激による影響

comitogen とされている phenylephrine による、EGF の情報伝達系への影響を調べるために、同一肝細胞をまず EGF で刺激し、引き続いて phenylephrine で刺激したところ、EGF により引き起こされた oscillation の周波数が増加した。

(総括)

① $[Ca^{2+}]_i$ 反応の測定には単一細胞レベルでの検討が重要と考えられた。

② EGF 刺激により、従来からの報告と異なり $[Ca^{2+}]_i$ の oscillation が認められた。

③ EGF においても周波数依存性の情報伝達が行われている可能性が示唆された。

④ EGF と phenylephrine では oscillation のパターンに差が認められ、伝達系の差が反映されていると考えられた。

⑤ phenylephrine の comitogenic な作用が EGF の細胞内情報伝達系の修飾により行われている可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

近年、細胞内カルシウムが、EGF 等の増殖因子の細胞内セカンドメッセンジャーとして働いている可能性が示唆されているが、増殖因子による細胞内カルシウム動態に関しては単一細胞レベルでの検討がほとんどなく、その詳細はまだほとんど判明していない。本論文は、fura-2 を付加した初代培養肝細胞を用い、デジタル蛍光顕微鏡により、肝細胞における増殖因子である EGF と、comitogen として知られる phenylephrine による肝細胞内カルシウム動態を検討し、EGF による肝細胞内 oscillation、その刺激濃度依存性、および両アゴニスト間の相互作用を初めて明かにしたものであり、その意義は大きく、学位論文に値すると考えられる。