



Heterogeneous pathways of Ca²⁺ metabolism in the triggering of the proliferative process in rat thymocytes

木本, 裕由紀

(Degree)

博士（医学）

(Date of Degree)

1984-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲0536

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1000536>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏名・(本籍) 木 本 裕 由 紀 (兵庫県)

学位の種類 医学博士

学位記番号 医博い第458号

学位授与の要件 学位規則第5条第1項該当

学位授与の日付 昭和59年3月31日

学位論文題目 **HETEROGENEOUS PATHWAYS OF Ca^{2+}
METABOLISM IN THE TRIGGERING OF
THE PROLIFERATIVE PROCESS IN
RAT THYMOCYTES**

(ラット胸腺細胞の増殖過程の Ca^{2+} 代謝に関する研究)

審査委員 主査 教授 藤田拓男
教授 岩村昇 教授 山口延男

論文内容の要旨

〔目的〕

細胞の増殖機構には、種々の物質が関与している。そしてこれらの物質の作用発現は、細胞膜の受容体活性化が第一のシグナルになる場合が多く、続いて膜の脂質代謝や蛋白のメチル化等の生化学的变化に伴い、細胞内外の電解質輸送の変化が認められる。とりわけ、細胞内カルシウム濃度の上昇が、細胞増殖過程に重要な役割を果している、と考えられている。そこで、胸腺細胞をモデルとして、細胞の増殖機構を、カルシウム代謝を中心とした電解質代謝の観点より検討した。

〔方法〕

ウイスター系ラットの胸腺細胞を用い、con Aによる mitogen 反応を、in vitro のモデルとして、培養液中に valinomycin, monensin, ouabain, trifluoperazine を加え、初期における ^{45}Ca の取り込みを1時間パルスラベル法にて測定し、また、con A刺激後3, 6, 15, 24, 48, 72時間後の ^3H -thymidineの取り込みを3時間パルスラベル法にて測定した。更に、calmodulin活性を、同様に0, 1, 6, 15, 24, 48, 72時間と経時的に測定した。

[結 果]

con A 添加後, ^{45}Ca の取り込みは, 1時間以内に高まり, DNA合成は, 48時間より始まり, 72時間で最高に達する。それと平行して calmodulin活性も48時間より上昇し, 72時間では約3倍まで上昇した。

valinomycin (K^+ ionophore), monensin (Na^+ ionophore), ouabain ($\text{Na}^+ \text{K}^+$ -ATPaseの阻害剤)で, ^{45}Ca の取り込みは上昇したが, DNA合成は認められなかった。calmodulin 阻害剤である trifluoperazine では, ^{45}Ca の取り込み亢進や, DNA合成は認められなかった。なお, 培養72時間後の各薬剤添加群の cell viability は, 88~96%の範囲にあり, control culture の viability 94%を100%とすると, 土10%以内にあり, 各実験が薬理作用による toxicity でないことを確認した。

[考 察]

T細胞培養液中に, conA や A23187 (Ca^{2+} -ionophore)を添加すると, DNA合成をおこす事実は知られている。しかし, 1価の ionophore である valinomycin や monensin は, ^{45}Ca の取り込みを高めるが, DNA合成は抑制する。このことは, 1価イオンの移動に付随する Ca^{2+} の流入は, DNA合成の trigger となりえないのか, または ionophore により, 核膜に対する, あるいは核膜を介して核に毒性的に働くことによるものか等が考えられる。 $\text{Na}^+ \text{K}^+$ -ATPaseの阻害剤である ouabain も, Ca^{2+} の取り込みの亢進が認められるにもかかわらず, DNA合成はある程度抑制されており, 結果的に同様の機序が原因と考えられる。calmodulin の阻害剤である trifluoperazine による ^{45}Ca の取り込みの抑制は認められなかつたが, DNA合成は抑制された。このことは, trifluoperazineが, early effect の指標としての Ca^{2+} の取り込みや, $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -ATPase とどのように関与しているかは不明であるが, late effect としては, Ca^{2+} -calmodulin 複合体の phosphodiesterase 活性化の段階で阻害する可能性が考えられる。

論文審査の結果の要旨

細胞の増殖に関する種々の因子の中でカルシウムは特に注目をあつめており, 細胞の分裂と増殖の多くの段階で重要な役割を果たし, カルシウムの含まれない培養液中では細胞の増殖が起らないことが指摘されている。しかしながらカルシウムの他にも1価2価の種々の陽イオン, 脂質, 蛋白及びその磷酸化等細胞の増殖に関与する因子は多くその作用は複雑であるので本研究者は細胞増殖のモデルとしてレクチンによって刺激されたリンパ球の増殖, 具体的にはラット胸腺細胞のコンカナバリンAによって刺激された増殖反応をモデルとして用い次の様な研究を行った。

ウイスター系雄ラットの生後6~8週のものから胸腺を取り出し小片に切断し, ナイロンを通過させた右23, 25, 27口経の針から噴射しヘペス緩衝液を加えた RPMI 培養液で洗い, 同じ培養液に牛胎児血清と抗生物質を加えて 1ml 中 5×10^6 個の浮遊液をつくり試験物質を加えて37°Cで5%炭酸ガ

スの存在下に培養し細胞増殖の指標として、 $\text{Iu Ci } [{}^3\text{H}]$ サイミジンを加えて3時間後にそのとりこみを測定した。又 Iu Ci の ^{45}Ca のとりこみを同様に測定しコンカナバリンAの効果を検討するとともに、カリウムイオンのイオノフォアであるバリノマイシン、ナトリウムイオンのイオノフォアであるモネンシン、 $\text{Na}^+ \text{K}^+$ ATPase の阻害物質であるウアバイン、及びカルモジュンの阻害物質であるトリフルオペラジンのコンカナバリンによる細胞増殖の刺激及びカルシウムのとりこみに対する影響をみた。又カルモジュリンの活性をフォスフォダイエステレース活性を指標として測定した。

コンカナバリンAはラット胸腺細胞のカルシウムのとりこみを急速に増加させ1時間後にその作用は最大であった。一方 $[{}^3\text{H}]$ サイミジンのとりこみによって示される細胞増殖は24時間から48時間で明確に増加した。トリフルオペラジンはカルシウムのとり込みに影響を与えたかった。

バリノマイシン、モネンシン、ウアバインは恐らく1価陽イオンナトリウム、カリウム等の移動を介して二次的に胸腺細胞へのカルシウムのとりこみを促進したが、バリノマイシンは胸腺細胞の増殖に対して効果がなく、モネンシンはむしろ増殖を対照の15%に抑制し、ウアバインも胸腺細胞の増殖を軽度に抑制した。トリフルオペラジンは胸腺細胞の増殖を部分的に抑制した。

以上の結果からラット胸腺細胞を用いたモデルにおいて、カルシウムのとりこみと増殖の刺激はコンカナバリンAの刺激によっては平行するがイオノフォアであるバリノマイシン、モネンシン、又 $\text{Na}^+ \text{K}^+$ ATPase 阻害剤であるウアバインは胸腺細胞のとりこみを促進するが、細胞の増殖には影響がないか、むしろ抑制することが明確であり、カルシウムのとりこみと、増殖の間に解離がみとめられ、少くともレクチン処理早期のカルシウムのとりこみの増加は細胞の増殖と直結したものではないことが明確である。又カルモジュリン阻害剤のトリフルオペラジンが細胞の増殖を抑制することからカルシウム、カルモジュリン複合体はDNA合成の開始に何等かの役割を果たすことが推定された。又カルシウムの細胞内へのとりこみの増加の意義と機序も、コンカナバリンA等のレクチンセ2価陽イオンイオノフォア A 23187の場合と1価陽イオンイオノフォアであるバリノマイシンセモネンシン或いはウアバインでは明確にことなることが考えられた。

以上本研究者は従来殆ど研究されていないラット胸腺リンパ球のカルシウムとりこみと増殖の相関と各種刺激物質の作用の差について実験を行ったものであり、独自の知見をもった価値ある集積があり、医学博士の学位を得る資格があると判定した。