



Cell-to-cell propagation of intracellular signals
fluorescently visualized with acridine orange in
the gastric glands of guinea pigs

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-12-17 キーワード: 作成者: 福司, 康子 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/2774

博士(医学) 福司 康子

論文題目

Cell-to-cell propagation of intracellular signals fluorescently visualized with acridine orange in the gastric glands of guinea pigs

(アクリジンオレンジで蛍光可視化したモルモット胃腺における細胞内シグナルの細胞間伝播)

論文の内容の要旨

[はじめに]

胃腺は壁細胞、副細胞、主細胞、クロム親和性細胞様 (ECL) 細胞など様々な種類の細胞で構成されており、各細胞から、塩酸、粘液、酵素等が分泌されている。このとき、塩酸などで自己組織を壊すことなく消化が行われるよう各細胞が協調的に働くものと考えられる。これまで胃腺内のギャップ結合の存在は報告されており、ギャップ結合が塩酸分泌に関わる可能性も検討されているが、実際に細胞間の協調性を示す生理学的な証拠は乏しい。そこで本研究では、生きた単離胃腺でアクリジンオレンジ (AO) による蛍光染色を行い、壁細胞などを識別しながら、異種の細胞間の活性化反応を比較観察した。これにより、ギャップ結合を介すると思われる腺細胞間のシグナル伝播が捉えられ、単一胃腺内の統合された働きが可視化できた。

[材料ならびに方法]

モルモット (4 週齢、雄) をエーテル麻酔し、胃を取り出した。胃体部胃粘膜を剥離し、1-2 mm に細切後、酵素処理を行い、ピペッティング後、遠心分離を行って、胃腺を単離した。胃腺を 2 枚のカバーガラスで挟み込み (間隙 = 80 μm)、その間隙を 5% CO_2 + 95% O_2 ガスを飽和させた生理塩溶液で灌流しながら、落射蛍光顕微鏡で観察した。ヒスタミン刺激による細胞内 Ca^{2+} 反応を Fluo-4 AM で、細胞間シグナルを AO で、および pH 変化を LysoSensor (LS) で、それぞれ蛍光可視化した。刺激する場合には、ヒスタミン (100 μM) を灌流液に加えた。一部の細胞のみに局所的な刺激を行う場合は、ヒスタミン (500 μM) 添加生理塩溶液を、先端直径 5 μm のガラスピペットから、胃腺細胞のごく近傍に、連続的に噴射した。このとき、同時に、標本全体に対して、プリン受容体阻害剤であるスラミン (100 μM) を添加した生理塩溶液を高速灌流して層流を作り、ヒスタミンおよび細胞外 ATP が、標的とした細胞以外には作用しないようにした。層流の様子は、刺激溶液にルシフアーイエローを加えて流れを蛍光化して確かめた。胃腺内の壁細胞の位置を確認するのに、抗 H^+, K^+ -ATPase の免疫染色法を用いた。

尚、動物の使用に関しては浜松医科大学の動物実験委員会による承認を得て実験を行った。

[結果]

1. 胃腺の AO (2 μM) 染色と同一胃腺の壁細胞の免疫染色を対比させ、AO で壁細胞は暗い緑色に、副細胞の細胞質は明るい緑色に、細胞内顆粒はオレンジ色に染色されることがわかった。暗い緑色に染まった細胞は、ヒスタミン刺激で Ca^{2+} 反応を示した。つまり AO 染色で壁細胞を識別できることが示唆された。
2. 100 μM ヒスタミン刺激をすると、刺激後平均 5 分後から、胃腺内の多数の細胞に散発的に Ca^{2+} 反応が起こった。反応は、多くは個々の細胞単独で、ときに細胞 1-2 個に伝播した。一

方、同濃度のヒスタミン刺激によって、AO 染色した細胞でも蛍光の反応が見られた。主に胃腺中央部にある壁細胞の細胞質の緑色蛍光が一時的に強くなり、その反応が胃腺長軸方向に隣接する細胞 10 個程度に順を追って次々と伝播した。AO の反応は、Ca²⁺反応よりも早く（平均で刺激後 2 分半後に）起こった。LS は胃腺底部側の管腔内に集積しており、ヒスタミン刺激によって、蛍光強度の高い部分が表層方向に移動した。

3. PKA 阻害剤である H-89 存在下でヒスタミン刺激を行うと、上記の AO 反応は抑制された。
4. 胃腺の一部細胞のみに局所的なヒスタミン刺激をしても、細胞から細胞への AO 反応の伝播が見られた。プリン受容体阻害剤のスラミン存在下でも、この AO 反応の伝播は抑えられなかった。

[考察]

AO 反応は PKA 阻害剤の H-89 で抑制されたことから、この反応は酸分泌の上流にある細胞内シグナルであるといえる。細胞間のシグナル伝達は、ギャップ結合を介するものや、ATP の傍分泌効果によるものがあるが、モルモット胃腺では、AO 蛍光反応の伝播は、プリン作動性アンタゴニストであるスラミンを細胞外に投与しても阻害されなかったことから、ギャップ結合を介したものと推測される。細胞内信号の cAMP が細胞質間を拡散することで、各細胞の反応のタイミングに秩序が生じるものと考えられる。このような信号の伝播反応は、胃腺における様々な細胞の協調的な活動を反映する。ヒスタミンは主細胞や ECL 細胞には直接作用しないものの、壁細胞で増加した cAMP が、ギャップ結合を介して、主細胞や ECL 細胞に伝播して Ca²⁺反応が起きる可能性が高い。

胃腺全体を刺激したときに、なぜ特定の細胞から反応が始まるのか、理由は不明である。可能性として、壁細胞の成熟性に違いがあることが挙げられる。実際、峽部にある壁細胞が胃腺底部にある壁細胞よりも若く、活発な酸分泌を行う、という報告がある。分泌能の高い細胞が先に反応し、他の細胞がそれに確実に従って反応する、という機構が考えられる。

[結論]

モルモット単離胃腺において、2 μM の AO 染色で胃腺細胞間のシグナル伝播を捉えることに成功した。胃腺に沿った伝播反応は、刺激に反応する多くの細胞が協調的な分泌を行う機構を反映するものである、と考えられる。