

氏 名 山田 一貴

学位の種類 博士 (医学)

学位記番号 博士第 925 号

学位授与の要件 学位規則第 4 条第 1 項

学位授与年月日 令和 4 年 3 月 1 0 日

学位論文題目 Expression and functional maintenance of
voltage-regulated anion channels in myometrial smooth
muscles of pregnant mice
(妊娠マウス子宮平滑筋細胞における細胞容積調節陰イオン
チャンネルの発現と機能保持)

審査委員 主査 教授 宇田川 潤

副査 教授 勝山 裕

副査 教授 平田 多佳子

論文内容要旨

※整理番号	933	(ふりがな) 氏名	やま だ かず たか 山 田 一 貴
学位論文題目	Expression and functional maintenance of volume-regulated anion channels in myometrial smooth muscles of pregnant mice (妊娠マウス子宮平滑筋細胞における細胞容積調節陰イオンチャネルの発現と機能保持)		
<p>【目的】妊娠子宮において、細胞容積の増大や水分含有量の変化などの様々な変化が起こる。しかし、この変化に対する子宮平滑筋細胞の構造保護と機能維持を果たす機序は明らかでない。そこで、Volume-Regulated Anion Channel (VRAC)に着目した。VRAC は、ほとんどすべての脊椎動物細胞で普遍的に発現しており、低浸透圧下の細胞の膨張に対して塩化物イオンと有機オスモライトを放出し抗する際に Swelling-induced Cl⁻ Current ($I_{Cl, swell}$) が発生する。また、VRAC の構成に Leucine-rich repeat containing protein 8A (LRRC8A)が必須とされ、細胞死や細胞増殖などの広範の生物学的過程に VRAC は関与する。しかし、子宮平滑筋細胞における VRAC の局在や機能、特に妊娠中の変化については不明である、この研究では、マウス子宮平滑筋における VRAC の存在を証明し、その機能及び発現の妊娠に伴う変化について調査することで、妊娠子宮平滑筋の構造保護及び機能維持における VRAC の寄与の可能性について検討した。</p> <p>【方法】週齢 10-22 週のマウス (C57BL/6J)の未妊娠期・妊娠第 1 三半期・妊娠第 2 三半期・妊娠第 3 三半期それぞれで、子宮平滑筋組織及び単離細胞を収集した。全細胞パッチクランプ法を用いて、妊娠に伴って子宮平滑筋細胞が増大することを電氣的膜容量変化によって確認した。また、灌流液を等浸透圧液から低浸透圧液に変えて子宮平滑筋単離細胞を膨張させ、その際に発生した電流を VRAC 阻害剤である glibenclamide または 4-(2-butyl-6,7-dichloro-2-cyclopentyl-indan-1-on-5-yl) oxobutyric acid (DCPIB) によって抑制することで $I_{Cl, swell}$ の関与を確認した。さらに、$I_{Cl, swell}$ を測定することで電気生理学的に VRAC の存在を証明するとともにその機能を調査した。</p> <p>抗 LRRC8A 抗体を用いたウェスタンブロッティング法では、子宮平滑筋における LRRC8A の発現と、妊娠に伴う LRRC8A タンパク量 (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)との比率) の変化を調査した。</p> <p>抗 LRRC8A 抗体を用いた蛍光免疫細胞化学法で LRRC8A の細胞内発現と局在を明らかにし、妊娠による変化を調査した。</p>			

- (備考) 1. 論文内容要旨は、研究の目的・方法・結果・考察・結論の順に記載し、2千字程度でタイプ等を用いて印字すること。
2. ※印の欄には記入しないこと。

【結果】全細胞パッチクランプ法で、マウス子宮平滑筋細胞容積に対応する細胞膜容量 (C_m) を調査したところ、妊娠に伴って子宮平滑筋細胞容積が増加することが確認された。さらに、低浸透圧条件下で増大した電流は実験条件下のネルンストの式で計算される平衡電位付近で逆転し、増加した膜電流が glibenclamide または DCP IB でほぼ抑制されたことから測定した電流が $I_{Cl,swell}$ であると推定され、VRAC がマウス子宮平滑筋細胞に存在することが電気生理学的に証明された。しかし、 $I_{Cl,swell}$ の電流密度は妊娠経過によって有意に変化しなかった。

ウェスタンブロッティング法で評価したマウス子宮平滑筋細胞における GAP DH に対する LRRC8A の比率において、妊娠経過による有意な変化を認めなかった。

LRRC8A は細胞膜を含む子宮平滑筋細胞全体にびまん性に存在しており、妊娠によってその細胞全体の発現密度の有意な変化は観察されなかったが、未妊娠期と比較して第 3 三半期には細胞膜上に存在する LRRC8A は有意に増加することが蛍光免疫細胞化学法で確認できた。

【考察】この研究は、子宮平滑筋組織及び細胞、特に妊娠期における VRAC の機能と LRRC8A の細胞内局在、発現密度に関する最初の研究である。VRAC に関する先行研究のほとんどが培養細胞株を用いられていたが、この研究ではマウス子宮から単離された初代細胞で調査した。

一方で、VRAC の感受性は、細胞周囲の浸透圧だけでなく、細胞膜張力、細胞内イオン濃度、細胞内オスモライト濃度、細胞内 ATP 濃度にも依存するが、この研究では細胞周囲の浸透圧変化以外の要因については調査していない。VRAC は、LRRC8A と LRRC8B-E のうち少なくとももう一つの LRRC8 ヘテロマーで構成され、その機能と感受性はサブユニットの構成によって異なることがわかっている。マウス子宮平滑筋細胞の VRAC サブユニットの構成は不明であるが、妊娠に関連する構造変化が VRAC の機能と感受性を変化させる可能性については調査しなかった。加えて、この研究はげっ歯類を用いた研究であり、ヒトにおいても同様の変化であるかも今後の研究課題である。

【結論】

この研究より、マウス子宮平滑筋において妊娠中に細胞膜上の VRAC の発現が増加し、VRAC の電気生理学的機能が維持されることで、妊娠子宮平滑筋における恒常性の維持などの役割を担っている可能性が示唆された。

学位論文審査の結果の要旨

整理番号	933	氏名	山田 一貴
論文審査委員			
<p>(学位論文審査の結果の要旨) ※明朝体 11ポイント、600字以内で作成のこと</p> <p>子宮では妊娠に伴って平滑筋細胞の増大、水分含量増加、イオン濃度変化などの変化が生じる。しかし、これらの変化に対する子宮平滑筋細胞の構造と機能の維持機構は不明である。本論文では、細胞容積調節、細胞死、細胞増殖などに関与し、低浸透圧下で Cl^- 電流 ($I_{Cl, swell}$) を発生させる VRAC について、未妊娠および妊娠マウスの子宮平滑筋細胞における機能と細胞内局在を検討し、以下の点を明らかにした。</p> <ol style="list-style-type: none">1) 全細胞パッチクランプ法により測定した細胞膜容量 (C_m) の増加から、細胞容積が妊娠経過とともに増加することを示した。2) 低浸透圧下で増大した膜電流がネルンストの式より計算される Cl^- の平衡電位付近で逆転し、かつ VRAC 阻害剤でほぼ完全に抑制されたことから、測定した電流は $I_{Cl, swell}$ と同定され、子宮平滑筋細胞における VRAC の存在が示された。3) $I_{Cl, swell}$ の電流密度には妊娠経過による変化が認められなかったが、LRRC8A は妊娠後期に細胞膜上に強く発現していた。VRAC は妊娠後期に細胞膜上に移行することによって、分娩期の急激な変化に対する子宮平滑筋の保護に役立っている可能性が示唆された。 <p>本論文は、子宮平滑筋での VRAC の機能について新たな知見を与えたものであり、また最終試験として論文内容に関連した試問を実施したところ合格と判断されたので、博士 (医学) の学位論文に値するものと認められた。</p> <p style="text-align: right;">(総字数 599 字)</p> <p style="text-align: right;">(令和 4 年 1 月 26 日)</p>			