

氏 名	い 市	か 川	じゅん 純
学位(専攻分野)	博 士 (学 術)		
学 位 記 番 号	博 甲 第 230 号		
学位授与の日付	平成 13 年 3 月 26 日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当		
研究科・専攻	工芸科学研究科 機能科学専攻		
学位論文題目	The role of Ca²⁺ signalling on cell proliferation in mouse mammary epithelial cells.		
	(主査)		
審 査 委 員	教 授 清 原 壽 一		
	教 授 遠 藤 泰 久 教 授 宗 川 吉 汪		

論 文 内 容 の 要 旨

申請論文は、マウス乳腺上皮細胞における上皮成長因子 Epidermal Growth Factor(EGF)による細胞増殖と細胞内カルシウム上昇経路の関連についてまとめられている。本研究では、マウス乳腺上皮細胞の初代培養系においてカルシウム蛍光指示薬である fura-2/AM を用いた細胞内カルシウム測定をおこない、カルシウムシグナリングと細胞増殖、それと妊娠に伴う発達との関連を調べた

本論文の内容は 3 部より構成されている

第 1 部では、マウス乳腺分泌上皮細胞のカルシウムシグナリングに対する EGF の効果を、1) 分泌上皮細胞の持つ P2Y2 型 ATP 受容体の代表的なアゴニストである UTP に対するカルシウム応答、2) 細胞内カルシウムストアからのカルシウム放出量、3) 細胞内カルシウムストアの枯渇により引き起こされる容量性カルシウム流入、という 3 つのカルシウムシグナリングについて、1) control、2) IFP 処理 (分化した状態)、3) EGF 処理 (増殖した状態) という 3 つの状態の細胞において、fura-2 を用いた細胞内カルシウム濃度の測定を行うことにより検討した。増殖活性(mitotic activity)は PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen:細胞周期の S 期に入っている、すなわち増殖している細胞の核を染める)抗体を用いた免疫染色法によりチェックし、EGF による増殖が誘導されていることを確認した。検討の結果、EGF 処理により、UTP に対するカルシウム応答、細胞内カルシウムストアからのカルシウム放出および容量性カルシウム流入が増強されることが明らかとなった。これらの EGF による様々なカルシウム応答の増強は EGF レセプターのブロッカーである genistein による増殖抑制に伴い減少した。注目すべき点は、各カルシウム応答の EGF 処理日数経過に伴う増大の度合いであり、ストアからのカルシウム放出量は細胞増殖とパラレルに増大しているのに対し、UTP に対するカルシウム応答および容量性カルシウム流入は増殖に先だって増大していることから、EGF により細胞膜の P2Y2 型 ATP 受容体および容量性カルシウム流入チャネルの活性化が起こり、それらが増殖に必要なファクターとして働き増殖が促されるのではないかと予測した。

第 2 部ではこの予測を確かめるため、P2Y2 型 ATP 受容体のブロッカーである suramin と容量性カルシウム流入のブロッカーである SK & F96365 が EGF による乳腺細胞増殖を抑制するかどうかについて検討した。その結果、SK & F96365 が増殖を強く抑制することが明らかになり、容量性カルシウム流入による増殖制御機構の存在が明らかとなった。

第 3 部では、実際の妊娠に伴う発達過程における容量性カルシウム流入についても検討した。その結果、増殖活性の高い妊娠初期に容量性カルシウム流入が大きく、発進が進み増殖活性が減ずるにつれて容量性

カルシウム流入も減少することが明らかとなった。このことから、増殖と容量性カルシウム流入機構との深い関連性がうかがえた。

論文審査の結果の要旨

本研究では、マウス乳腺上皮細胞の増殖とカルシウムシグナリングとの関連が調べられた。まず、EGFにより増殖が誘導された分泌上皮細胞において、P2Y₂受容体を介したカルシウム応答、ストアからのカルシウム放出、および容量性カルシウム流入が増強されることが明らかとなった。P2Y₂受容体を介したカルシウム応答および容量性カルシウム流入は増殖活性に先立ち増強されたことから、P2Y₂受容体および容量性カルシウム流入チャネルがEGFにより活性化され、その結果増殖が起こるのではないかと考えられた。次に、それらのチャネルのブロッカーがEGFによる増殖を抑制するかについて検討した。その結果、容量性カルシウム流入チャネルのブロッカーであるSK & F96365が増殖を抑制することが明らかとなり、容量性カルシウム流入が増殖のコントロールを担っていることが示唆された。また、妊娠に伴う発達過程においても、増殖活性の高い初期に容量性カルシウム流入の増強が確認されたことから、乳腺上皮細胞の増殖と容量性カルシウム流入の深い関連性が明確となった。

以上の結果より、マウス乳腺上皮細胞の増殖のコントロールに、容量性カルシウム流入が密接な役割を果たしていることが示唆された。容量性カルシウム流入は、その現象自体は明らかであるものの、そのメカニズムについては諸説が発表されては否定されるという状況である。また、このチャネルのクローニングも今だ成功していない。その生理学的意識も不明である。増殖との関連については、血液細胞の活性化に容量性カルシウム流入が不可欠であるという報告がある以外はほとんどない。そのような中で、増殖に伴って容量性カルシウム流入が増大するという結果をnativeに近い系で明らかにし、かつ、容量性カルシウム流入の増強メカニズムを、EGFという具体的な因子と関連させて推察できる良い題材を提供した。

本論文の基礎となる論文

1. Ichikawa J, Furuya K, Miyata S, Nakashima T, Kiyohara T. Developmental changes in capacitative Ca^{2+} entry in mouse mammary epithelial cells. *Cell Biochem. Funct.* 2000; 18:147-150.
2. Ichikawa J, Furuya K, Miyata S, Nakashima T, Kiyohara T. EGF enhances Ca^{2+} mobilization and capacitative Ca^{2+} entry in mouse mammary epithelial cells. *Cell Biochem. Funct.* 2000; 18:215-225.
3. Ichikawa J, Kiyohara T. Suppression of EGF-induced cell proliferation by the blockade of Ca^{2+} mobilization and capacitative Ca^{2+} entry in mouse mammary epithelial cells. *Cell Biochem. Funct.* 2001; in press.