

WIII-2

肥満細胞における脱顆粒現象と Ca^{2+} 動態

片桐 聡、南川 哲寛（京都府立医大・第2病理）

【はじめに】肥満細胞はI型アレルギー反応のエフェクター細胞であり、抗原刺激によって脱顆粒を起こし、ヒスタミンを放出する。この脱顆粒現象はexocytosisによって起こり、細胞内 Ca^{2+} 濃度（ $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ）の上昇が必須であることが明らかになっている。しかしその分子レベルでの機構について解明されているのは、抗原による受容体刺激によりホスホリパーゼCの活性化が起こり、イノシトール磷脂質代謝経路で IP_3 が生産され、それが細胞内 Ca^{2+} storeである小胞体から Ca^{2+} の放出を促すという過程までであり、それ以降どのように脱顆粒に至るかに関しては依然不明な点が多い。私たちは脱顆粒が起こるまでの過程で Ca^{2+} の時空間分布がどのような変化するかを知るために、共焦点レーザー走査顕微鏡(CLSM)を用いて、方法論的吟味を加えながら解析した。すなわち、抗原刺激と同様にイノシトール磷脂質代謝を活性化するとされるcompound 48/80刺激により、脱顆粒の初期過程における細胞内シグナルとしての $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の変化を Ca^{2+} 感受性蛍光プローブを用いて三次元的に観察し、さらに $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の定量を試みた。

【方法】ラットの腹腔灌流により得た肥満細胞をfluo-3/AM(20 μM)で1時間負荷後、観察チャンバーに静置し、compound 48/80で刺激し、CLSMのフレーム走査、ライン走査モードで観察した。compound 48/80は細胞外液中に添加し細胞全体を刺激したほか、マイクロピペットを用いて細胞表面の極小部分を刺激する方法も試みた。また、核の位置を正確に把握するため一部の細胞はDAPIで核染色し、紫外光レーザーCLSMで観察した。更にfluo-3の欠点を補い定量性を得るため、indo-1、fura-2による解析も行い、結果を批判的に考察した。

【結果・考察】compound 48/80刺激の数秒後、脱顆粒に先立って30~40 $\mu\text{m}/\text{sec}$ で細胞内を伝播する Ca^{2+} 波がみられた。この Ca^{2+} 波は細胞全体を刺激した場合には、細胞膜側から中心部に向かい、局所刺激では刺激部位から反対方向へ核の領域を含む細胞内を伝播していくのが捉えられた。また刺激後、核内の Ca^{2+} 濃度は細胞質に比し、より高い状態に維持されることがfluo-3、indo-1、fura-2のいずれのプローブでも証明された。これは脱顆粒後約2分で元のレベルに戻った。以上の結果は、 Ca^{2+} 波を伝播させる機構は核内にも存在することを示唆しており、さらに数分の間、核内から細胞質への Ca^{2+} の拡散を妨げるなんらかの機構が存在すると考えられた。