

審査の結果の要旨

氏名 大沼 仁

Endothelin (ET)-1 は、気道上皮細胞から分泌される強力な気道収縮物質である。また ET-1 遺伝子の発現及び ET-1 ペプチドの放出が気管支喘息患者の気道上皮や肺胞洗浄液にて増加していることが報告されている。ET-1 は気管支喘息の病態生理において重要な役割を果たしている可能性があり、本研究ではヒト気管支平滑筋 (HBSMC) における ET-1 の作用について検討を行った。以下に研究結果の要点を示す。

1. HBSMC の ET-1 による作用を明らかにするために、細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) と電気生理学的活動に及ぼす効果を細胞内 Ca^{2+} 濃度測定法とパッチクランプ法を用いてヒスタミンと比較、検討した。
2. ET-1 または histamine 投与後、一過性のピークとなる $[Ca^{2+}]_i$ の上昇を認めた後に徐々に減少し定常状態の $[Ca^{2+}]_i$ 上昇を認めた。nicardipine や nifedipine は、ET-1 による定常成分の $[Ca^{2+}]_i$ の上昇を部分的に減少させたが、非特異的 Ca^{2+} チャネルのブロッカーである La^{3+} を加えることで定常成分の $[Ca^{2+}]_i$ の上昇は完全に消失した。外液に histamine (100 μ M) または ET-1 (100nM) を投与すると、膜電位は急速に脱分極して約 -20mV の定常状態に達した。電極内液に低濃度 EGTA を含む K^+ 細胞内液を充填して、保持電位を +0mV にして、histamine または ET-1 を投与したところ、一過性に外向き K^+ 電流の活性化を認めた。パッチ電極内に Cs^+ 及び低濃度 EGTA を充填し、保持電位を -40mV にして histamine または ET-1 を投与したところ一過性内向き Cl^- 電流を認めた後、持続的 inward 電流を認めた。まれに oscillatory な内向き電流も認められた。ET-1 もしくは histamine による持続的 inward 電流は、パッチ内液を Cs^+ 、10mM EGTA の条件下でも認められ、又 heparin をパッチ内液に入れた条件でもこの内向き電流は消失しなかった。この電流の逆転電位は約 +0mV であり、外液の $[Cl^-]_o$ もしくは $[Cl^-]_i$ を変化させても逆転電位に影響を与えなかったことから ET-1 もしくは histamine にて活性化される持続的な内向き電流は Cl^- 電流ではなく非選択性陽イオン電流 (I_{cat}) と考えられた。

3. ET-1 と histamine は濃度依存的に Icat を活性化させ、half-maximal effective concentration (EC₅₀) は ET-1 が 12nM で histamine では 11 μM であった。La³⁺ もしくは Cd²⁺ は ET-1 もしくは histamine にて活性化される Icat を完全に抑制したが、nicardipine や nifedipine は Icat を抑制しなかった。ET-1 による [Ca²⁺]_i 上昇 もしくは Icat 活性化は、BQ123 (ET-A 阻害剤) 及び BQ788 (ET-B 阻害剤) 両方の存在下で完全に抑制された。BQ123 の濃度を 10 μM から 20 μM に、BQ788 の濃度を 2 μM から 10 μM にそれぞれ増加させても [Ca²⁺]_i 上昇 もしくは Icat の活性化を認めない (追加実験)。Sarafotoxin S6c (ET-B アゴニスト) は [Ca²⁺]_i を上昇させ、かつ Icat を活性化させた。RT-PCR 法にて ET-A, B 両受容体の mRNA の発現が認め、免疫染色法にて両タンパクの発現を認めた。
4. HBSMC において ET-1 は ET-A, B 両受容体を介して強力に Icat を活性化させた。ET-1 による Icat の活性化はヒト気道平滑筋の Ca²⁺ 流入にとって重要な役割を果たしていると考えられた。

今後、非選択性陽イオンチャネルの抑制薬が開発されることにより気管支喘息などの閉塞性肺疾患への臨床応用も期待できると思われる。本研究において ET-1 による非選択性陽イオンチャネルの活性化は気管支喘息などの病態生理における気道収縮に関与している可能性が示唆され、学位の授与に値するものと考えられる。