

論文の内容の要旨

獣医学専攻

平成 10 年度博士課程進学

氏名 矢来 幸弘

指導教官名 局 博一

論文題目 気管平滑筋の収縮性に及ぼす K_{Ca} チャネルの役割に関する研究

気管平滑筋細胞において静止膜電位は $-45 \sim -60$ mV と細胞外に対して陰性を示す。この電位は細胞内外のイオンの濃度勾配により生じるもので、静止時に最も透過性が高いイオンは K^+ イオンであり、 K^+ チャネルの活動は静止膜電位に強い影響を与える。 K^+ チャネルは活性化して開くと膜電位は陰性側へ深く傾き（過分極）、逆に閉じると膜電位は陽性側に向かい浅くなる（脱分極）。現在、数多くの K^+ チャネルが同定されているが、気管平滑筋で存在が確認されているものは Ca^{2+} 感受性 K^+ チャネル (K_{Ca} チャネル)、遅延整流電流 K^+ チャネル (K_{dr} チャネル) および ATP 感受性 K^+ チャネル (K_{ATP} チャネル) などの数種類に過ぎない。この K^+ チャネルの中では、 K_{Ca} チャネル、特にコンダクタンスの大きい K_{Ca} チャネル (BK_{Ca} チャネル) が気管平滑筋の外向き電流に強く関与していると考えられている。

K_{Ca} チャネルは細胞内への Ca^{2+} の流入および細胞膜の脱分極によって活性化されるチャネルで、種々の組織に分布しており、他の組織に比べて平滑筋表面において非常に高密度に分布していることが知

られている。また、 K_{Ca} チャンネルは G タンパクや種々の細胞内セカンドメッセンジャーによっても制御されていると考えられている。気管平滑筋において K_{Ca} チャンネルの活性化は、膜を過分極し収縮を抑制する作用を持つ。実際、 K_{Ca} チャンネルは β アドレナリン受容体刺激によって活性化されることが知られており、 K_{Ca} チャンネルの活性化は平滑筋弛緩薬の作用機序の一端を担っているものと考えられている。この β アドレナリン受容体刺激薬は気管支喘息の治療薬として用いられていることから、気管支喘息の治療において K_{Ca} チャンネルの活性化が臨床上重要な意味を持つものと思われる。反対に、 K_{Ca} チャンネルの抑制は膜を脱分極させて平滑筋弛緩作用を抑制する。ムスカリン受容体刺激が K_{Ca} チャンネルを抑制するなど、 K_{Ca} チャンネルの抑制は収縮薬の作用機序の一つと示唆する報告もある。近年、好酸球から分泌される major basic protein (MBP) などの炎症性物質も K_{Ca} チャンネルの抑制を通して気管平滑筋を収縮させることが示唆されており、気管支喘息における気道閉塞などの病態発現機構としても K_{Ca} チャンネルが重要な役割を担っていることが推測される。

このように、 K_{Ca} チャンネルは気管平滑筋収縮および弛緩反応の調節に重要な役割を担っており、気管支喘息の病態発現機構の解明や、治療の開発にとっても重要な研究課題であると考えられる。しかしながら、 K_{Ca} チャンネルが気管平滑筋における収縮および弛緩作用に及ぼす影響に関する詳細な研究は行われていない。本研究では、モルモットの気管平滑筋を用いて K_{Ca} チャンネルが気管平滑筋の収縮性に及ぼす影響について細胞内情報伝達機構の関与を含めた機序に関して明らかにすることを目的とした。

K_{Ca} チャンネル、 K_{dr} チャンネルおよび K_{ATP} チャンネルの阻害薬が気管平滑筋に及ぼす影響について検討した。静止状態の気管平滑筋において、 K_{ATP} チャンネルの阻害薬である glibenclamide および SK_{Ca} チャンネルの阻害薬である apamin を投与しても収縮反応は認められなかった。 K_{dr} チャンネルの阻害薬である 4-AP を投与すると高濃度において収縮反応が認められたが、高濃度においてはムスカリン受容体を阻害するという報告もあり、薬物の副作用も考えられる。 BK_{Ca} チャンネルの阻害薬である tetraethylammonium ions (TEA)、charybdotoxin (ChTX) および iberiotoxin (IbTX) を投与するとオッシレーション様の収縮が認められた。したがって、静止状態では特に BK_{Ca} チャンネルが重要な役割を果たしていることが示唆された。

特に顕著な反応が認められた ChTX 投与によって誘発されるオッシレーション様収縮についてその

メカニズムを Ca^{2+} の動態を中心に検討した。ChTX 投与により誘発されるオッシレーション様収縮は細胞外液の Ca^{2+} 濃度が 0 mM では認められなかった。電位依存性 Ca^{2+} チャンネル (VDC) の阻害薬である nifedipine 投与によっても抑制されたことから、この ChTX 投与により誘発されるオッシレーション様収縮には細胞外液からの Ca^{2+} 流入、とくに VDC からの Ca^{2+} 流入が必要不可欠であることが明らかとなった。また、ChTX 投与により誘発されるオッシレーション様収縮は ryanodine によってオッシレーション頻度が顕著に増加し、thapsigargin によって細胞内 Ca^{2+} ストアを枯渇させるとオッシレーション様収縮から持続性の収縮に変化したことから、ChTX により誘発されたオッシレーション様収縮は細胞内 Ca^{2+} ストアに取り込まれた Ca^{2+} が ryanodine 受容体から放出されることによって引き起こされることが示唆された。また、この ChTX により誘発されるオッシレーション様収縮は PKC の活性化薬である PMA によって亢進され、反対に PKC の阻害薬である BMI によって抑制されることから、PKC が ChTX 投与により誘発されるオッシレーション様収縮を修飾していることが明らかとなった。これらの結果より、ChTX は細胞膜を脱分極し VDC からの Ca^{2+} 流入を促すことで、SR の ryanodine 受容体および PKC を活性化してオッシレーション様収縮を誘発することが示された。

一方、TEA および ChTX によって誘発されるオッシレーション様収縮はシクロオキシゲナーゼ (COX) の阻害薬である indomethacin によって抑制されることから、この収縮における COX の関与を検討した。COX はアラキドン酸からプロスタグランジン (PG) G_2 という中間体を経て PGH_2 を産生する酵素であり、2 つのアイソエンザイムの存在が認められている。COX-1 は構成型遺伝子としていろいろな器官に発現しているのに対し、COX-2 はエンドトキシンやサイトカインによって刺激された細胞に誘導型として存在し、大量の PG を産生する要因となることが知られている。ChTX により誘発されるオッシレーション様収縮は COX-1 の選択的阻害薬である valeryl salicylate (VSA) の投与では影響を受けないが、COX-2 の選択的阻害薬である NS-398 の投与によって完全に抑制された。また、タンパク合成阻害薬である cycloheximide の前処置によっても ChTX により誘発される収縮は完全に抑制された。マウスの気管平滑筋を使った実験ではあるが ChTX 処置によって COX-2 の mRNA の発現が亢進されることも確認された。しかしながら、IL-1 α/β KO マウスでは COX-2 の mRNA の発現は誘導されなかった。ChTX により誘発されるオッシレーション様収縮は IL-1 β 投与により亢進され逆に IL-1ra 投与

により抑制された。これらの結果から、ChTXはCOX-2の発現を誘導し、そのCOX-2が活性化されることによってオキシレーション様収縮が誘発されることが示され、ChTXのCOX-2の誘導にはIL-1 β の関与していることが示唆された。また、気管平滑筋をChTXで処置することによりPGE₂の産生が有意に上昇し、ChTXによって誘発されるオキシレーション様収縮はEP₁受容体の阻害薬であるSC-51322によって完全に抑制されたことから、ChTXによって誘導されたCOX-2はPGE₂を産生し、その産生されたPGE₂がEP₁受容体を刺激することでオキシレーション様収縮を誘発することが明らかとなった。

アラキドン酸カスケードの初発酵素はホスホリパーゼA₂(PLA₂)であり、PLA₂が膜リン脂質からアラキドン酸を遊離するステップはアラキドン酸代謝系全体を作動させる重要な律速反応であるため、ChTXにより誘発されるオキシレーション様収縮においてもPLA₂の役割について検討する必要があるものと考えられた。ChTXにより誘発されるオキシレーション様収縮はcPLA₂の阻害薬であるarachidonyl trifluoromethyl ketone(ATK)によって抑制されたため、この収縮にはcPLA₂によって遊離されるアラキドン酸が必要であることが明らかとなった。また、ChTXにより誘発されるオキシレーション様収縮はMEKの阻害薬であるPD98059またはp38の阻害薬であるSB202190の投与によって阻害されたが、アラキドン酸を加えることによってオキシレーション様収縮が回復した。cPLA₂の活性化にはMEKおよびp38が関与しているという報告があるため、ChTXにより誘発されるオキシレーション様収縮においてもMEKおよびp38がcPLA₂の活性化に関与していることが考えられた。また、アデニル酸シクラーゼの阻害薬であるSQ-22536およびPKAの阻害薬であるH-89によってChTXにより誘発されるオキシレーション様収縮が抑制された。これは、ERKおよびp38を介したPLA₂によるアラキドン酸代謝が抑制されたためではないかと推察された。

本研究により、モルモットの気管平滑筋においてK_{Ca}チャンネルは膜電位およびCa²⁺動態の制御のみならず、COX-2の誘導においても重要な役割を担っていることが明らかとなった。本研究の成果は気管平滑筋の収縮機構の解明および気道の病態生理学的な研究において新たな論点を提供するものと考えられた。