

[ 別紙 2 ]

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 矢来 幸弘

$K_{Ca}$  チャ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。本研究では、モルモットの気管平滑筋を用いて  $K_{Ca}$  チャ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て行われた。

まず、 $K_{Ca}$  チャネル、 $K_{dr}$  チャネルおよび  $K_{ATP}$  チャネルの阻害薬が気管平滑筋に及ぼす影響を検討した。静止状態の気管平滑筋において、 $K_{ATP}$  チャネルの阻害薬である glibenclamide および  $SK_{Ca}$  チャ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。一方、 $BK_{Ca}$  チャ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  $BK_{Ca}$  チャネルが重要な役割を果たしていることが示唆された。

ついで、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 および thapsigargin に対する反応性から、ChTX 誘発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

て引き起こされることが示唆された。また、この収縮には PKC が修飾要因として関与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、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。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。また、ChTX により誘発されるオッシレーション様収縮は IL-1 $\beta$  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ッ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 $\beta$  が関与していることが示唆された。また、ChTX によって誘導された COX-2 は PGE<sub>2</sub> を産生し、その産生された PGE<sub>2</sub> が EP<sub>1</sub> 受容体を刺激することでオッシレーション様収縮を誘発することが明らかとなった。

ChTX により誘発されるオッシレーション様収縮は cPLA<sub>2</sub> 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 cPLA<sub>2</sub> 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ッ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ッシレーション様収縮が回復した。このことからオッシレーション様収縮においても MEK および p38 が cPLA<sub>2</sub> の活性化に関与していることが考えられた。

本研究により、モルモットの気管平滑筋において K<sub>Ca</sub> チャネルは膜電位および  $Ca^{2+}$  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。

以上を要するに、本論文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、その成果は学術上、応用上寄与するところが少なくない。よって、審査員一同は本論文が博士 (獣医学) の学位論文として価値あるものと認めた。