

[別紙 1]

論 文 の 内 容 の 要 旨

論文題目

培養ヒト平滑筋細胞に発現する

電位依存性 Na⁺チャネルに関する検討

指導教官 滝澤 始 助教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 12 年 4 月入学

医学博士課程

内科学専攻

氏名 城 大祐

電位依存性 Na⁺チャネル(I_{Na})は神経、心筋、骨格筋など種々の興奮性細胞に存在し、脱分極刺激に反応してチャネルが開き活動電位の立ち上がり相の形成に必須の役割を演じている。これは刺激の生成と伝導に重要である。I_{Na}は α サブユニットと補助的な β サブユニットからなる膜蛋白であり、複数の α サブユニットがクローニングされ機能解析がなされている。I_{Na}は TTX の感受性により TTX 感受性と非感受性の 2 種類に分けられる。現在までに SCN1A から 11A までの 10 種類の α サブユニット遺伝子が同定されており、これらは様々な哺乳類に分布している。I_{Na}は一般的には平滑筋での発現は認められず、血管、尿路、消化管などの平滑筋を含む一部の平滑筋でのみ報告されている。空腸の平滑筋には、心筋に発現している SCN5A と考えられる TTX 非感受性の I_{Na}が発現している。一方、ヒト食道平滑筋には TTX 感受性の SCN4A とされる骨格筋型の I_{Na}が発現している。ヒト気管支、冠動脈、肺動脈平滑筋などの培養ヒト平滑筋細胞においても I_{Na}の発現が報告されているがその種類及び生理的意義については依然として不明である。そこで、我々はこれらの培養ヒト平滑筋に発現する I_{Na}の生理学的、薬理的及び分子生物学的特徴につき検討した。

パッチクランプ法を用いた検討では、ヒト気管支平滑筋においては -40 mV より脱分極側で一過性の内向き電流が見られた。電流のピークより得られた電流電圧関係で、この電流は $-10\sim+0$ mV で最大となり、不活性化は、単一の指数でプロットされた。不活性化の時定数は 1.1 ± 0.2 ms ($n=5$) であった。同様の一過性内向き電流は hPASCs と hCASCs でも認められた。細胞外液の Na^+ を膜非透過性の陽イオンの NMDG⁺ に置換すると、この電流は完全に消失した。ニフェジピン (10 μM) はこの電流を阻害しなかった。同様のことが hPASCs、hCASCs でも確認された。それに対し、TTX (1 μM) は、この一過性内向き電流を完全に阻害した。よって、この電流は I_{Na} であることが示された。抗不整脈薬であるリドカイン (300 μM) は、ほぼ完全に I_{Na} を消失させた ($n=4$)。次に hBSCs において、 I_{Na} に対する TTX の濃度依存性の効果を検討した。TTX ($1\text{--}1000$ nM) は濃度依存性に I_{Na} を抑制し、その 50%抑制濃度は 7 nM ($n=5$) であった。これらの結果は hBSCs に発現する I_{Na} が TTX 感受性であることを示す。同様に hCASCs に発現する I_{Na} も TTX により抑制され、その 50%抑制濃度は 9 nM であった。さらに Na^+ チャンネル電流のキネティックスの解析をおこなった。 I_{Na} の定常状態の活性化、不活性化をボルツマン方程式でプロットした。50%不活性化電位は -37 ± 5 mV であり、50%活性化電位は -16 ± 5 mV あった。定常状態の活性化と不活性化により決定されるウィンドウ・カレントは -40 mV より脱分極側に見られた。不活性化からの回復は単一の指数関数で近似され、その回復の時定数は 24 ± 5 ms ($n=4$) であった。クロラミン T とベラトリジンは I_{Na} の不活性化を遅延させることが報告されているため、hBSCs における効果について検討した。クロラミン T (0.3 mM) は I_{Na} 電流のピークを著明に増大させるとともに、 I_{Na} の不活性化を有意に遅延し、その結果、内向きの総電流は増加した。不活性化の時定数は、コントロールで 1 ± 0.2 ms であり、クロラミン T 存在下では 32.0 ± 2.3 ms ($n=4$) であった。ベラトリジン (100 μM) も不活性化を著明に遅延した。TTX (1 μM) は遅延した内向き電流を完全に抑制した。

次に、これらの細胞に発現する SCN チャンネルの種類について、SCN6A と同一であるとされる SCN7A を除く SCN1A \sim 11A の検討を RT-PCR 法で行った。SCN8A は hBSCs と hPASCs で見られたが、hCASCs では見られなかった。SCN5A、3A は hCASCs でのみ見られ、SCN1A、2A、4A、6A と 10A、11A はいずれの hSCs でも

見られなかった。これに対し、SCN9AはいずれのhSMCsにおいても発現がみられ、その濃度は他のSCNより著明に高かった。定量RT-PCR法でSCN5A、SCN9Aの発現量を検討した結果は、通常のRT-PCR法で得られた結果に矛盾の無いものであった。免疫細胞染色ではいずれも α サブユニットの共通抗体であるanti-Pan Na_vで染色された。また更にSCN8A、SCN9Aに対する抗体を用いて染色を行い比較したところ、SCN9Aは染色されたが、SCN8Aは染まらなかった。これはRT-PCRの結果を支持し、いずれの細胞でも主に、SCN9AがI_{Na}を形成していると考えられた。一方、事前に抗原ペプチドで処理された抗体を用いたコントロールでは染色が見られなかった。

ネイティブな気管・気管支におけるI_{Na}の発現をanti-Pan Na_vを用いた免疫組織染色で検討したところ、染色は見られなかった。このことからネイティブな気管・気管支平滑筋にはI_{Na}が存在しない可能性が示唆された。また肺腺癌及び肺小細胞癌の、anti-Pan Na_vを用いた免疫組織染色ではいずれも染色が見られ、肺の悪性腫瘍にもI_{Na}が存在する可能性が示唆された。

さらにhBSMCsを細胞の分化を誘導することで知られるレチノイド酸の投与下で培養し、平滑筋細胞の分化の指標となる α -アクチンとSCN9Aに対する抗体で免疫細胞染色を行った。この結果、レチノイド酸の投与は α -アクチンの発現を増強する一方で、SCN9Aの発現を抑制する可能性が示唆された。

今回の研究により、培養ヒト平滑筋細胞にI_{Na}が存在することが示された。I_{Na}は、調べられたhBSMCsの約38%、約hPASMCsの25%、hCASMCsの約20%に存在した。しかしながら、anti-Pan Na_vを用いた免疫染色ではほとんどの細胞で濃淡の差はあるものの、び慢性の染色が見られたことから、I_{Na}はこれらの細胞に広く分布していると考えられた。また、TTXはhBSMCs、hCASMCsに発現するI_{Na}を濃度依存性に抑制し、その50%抑制濃度はそれぞれ7 nMと9 nMであった。これはヒトの脳や骨格筋で発見されたTTX感受性のI_{Na}に類似し、ヒトの心臓で発見されたものとは異なる。似たようなTTX感受性のI_{Na}は組織から単離された新鮮な血管平滑筋細胞や培養された血管平滑筋細胞など幾つかの種類の平滑筋細胞で報告されている。今回のRT-PCRを用いた検討では、培養ヒト平滑筋細胞に発現するI_{Na}は、主としてSCN9Aが構成していると考えられた。また特異的抗体を用いた免疫細胞染色では、SCN9Aの著明な発現が見られ、これはRT-PCR

の結果と合致していた。hSMCs で発現する I_{Na} は、-40 mV より脱分極側で活性化され、50%不活性化電位であり、一般的には、これらの値は、筋、神経やネイティブな平滑筋に発現した I_{Na} で報告されている値よりも脱分極側であった。しかし、今回用いた培養平滑筋細胞は、いずれも静止膜電位は約-40 mV であることより、hSMCs に発現する I_{Na} はこれらの細胞での膜電位形成と興奮に参与することが示唆された。細胞が脱分極すると I_{Na} が活性化され、それにより Na^+ が流入し細胞内 Na^+ 濃度 ($[Na^+]_i$) が増加する。 $[Na^+]_i$ の増加は、 Na^+/K^+ ポンプや Na^+/Ca^{2+} 交換を介して細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) を変化させ、平滑筋のトーンに影響すると考えられる。以上より、これらの細胞で発現した I_{Na} は平滑筋の興奮性に影響する可能性が示唆された。さらに、クロラミン T とベラトリジンは I_{Na} を介し、多量の Na^+ 流入を誘発し $[Na^+]_i$ を増加させ、 $[Ca^{2+}]_i$ をも増加させると考えられる。

SCN9A の発現は末梢神経や神経内分泌細胞で認められ、細胞の興奮性、分泌に参与すると考えられている。最近ではラットやヒトの前立腺癌や褐色細胞腫、甲状腺髄様癌で報告されている。前立腺癌に発現する I_{Na} の生理的意義は依然としてはっきりしないが、腫瘍の浸潤や転移、増殖に参与している可能性がある。今回の検討では肺癌細胞にも I_{Na} が発現している可能性が示唆され、今後その分子的本体や役割についての検討が必要と考えられた。また、 I_{Na} は活動電位を発生する幾つかの種類の特徴的な平滑筋で見つかっている。一方、トニックな平滑筋では、一般的には発現はみられない。実際に、ヒトのネイティブな肺動脈や気管支平滑筋では I_{Na} の発現は報告がなく、今回の免疫組織染色の結果からもヒトのネイティブな気管・気管支の平滑筋では I_{Na} が発現していないと考えられた。また、レチノイド酸処理を行った hBSMCs で α -アクチンとは対照的に SCN9A の発現は減少したと考えられ、これは SCN9A が分化・脱分化に参与している可能性を示唆する。したがって、このように hSMCs における I_{Na} の発現は培養された条件下に限定され、細胞の脱分化などが参与しているかもしれない。このような病態は、動脈硬化や気管支喘息など様々な病的な状態で見られるため、各種病態での I_{Na} 発現の検討、その生理的、病的意義について、さらなる検討が必要であると考えられた。