

[別紙 2]

審 査 の 結 果 の 要 旨

氏名 城 大祐

本研究は、種々の興奮性細胞に存在し、脱分極刺激に反応して開口し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、電位依存性 Na^+ チャネル (I_{Na}) の培養ヒト平滑筋（培養ヒト気管支平滑筋、肺動脈平滑筋、冠動脈平滑筋）における発現とその生理学的、薬理学的、分子的生物学的特徴を検討し、下記の結果を得ている。

1. パッチクランプ法による検討では、培養ヒト平滑筋にはテトロドトキシン (TTX) 感受性の I_{Na} が発現することが確認された。このチャネルは TTX により濃度依存性に抑制された。培養ヒト気管支平滑筋細胞における、50%抑制濃度は 9 nM であった。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すると、50%不活性化電位は -37 ± 5 mV、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 とベラトリジンによりこのチャネルの不活性化が遅延することが確認された。培養ヒト肺動脈平滑筋、冠動脈平滑筋でも同様の結果が得られた。
2. RT-PCR 法により I_{Na} の α サブユニット遺伝子である SCN1A から SCN11A の mRNA の発現が検討された結果、SCN9A がいずれの培養ヒト平滑筋細胞においても、最も強く発現していることが示された。培養ヒト気管支平滑筋細胞における定量 RT-PCR 法では、SCN5A と比較し SCN9A の mRNA が 1852 倍量発現していることが示された。
3. 免疫細胞染色による検討ではいずれの培養ヒト気管支平滑筋も α

サブユニットの共通抗体である anti-Pan Na_v 及び SCN9A で染色されたが、SCN8A は染色されなかった。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} を形成している事を示した。

4. ネイティブな気管・気管支における I_{Na} の発現が anti-Pan Na_v を用いた免疫組織染色により検討されているが、いずれも染色は見られていない。このことはネイティブな気管・気管支平滑筋には I_{Na} が存在しない可能性を示唆している。一方、肺腺癌及び肺小細胞癌組織は、anti-Pan Na_v による染色が見られ、肺の悪性腫瘍には I_{Na} が存在する可能性が示唆された。

5. 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ヒト気管支平滑筋細胞を培養し、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ところ、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された。

以上、本論文はパッチクランプ法及び RT-PCR 法、免疫染色法を用いて培養ヒト平滑筋細胞発現する I_{Na} の生理学的、薬理的、分子的生物学的特徴を明らかにした。本研究は、検討された培養ヒト平滑筋細胞に発現する I_{Na} と、これまで他の平滑筋で報告されてきた I_{Na} との異同を示した。また神経内分泌細胞や一部の腫瘍細胞でのみ発現が報告されていた SCN9A が培養などの条件下では平滑筋細胞にも発現することを示し、さらに SCN9A が分化・脱分化に関与する可能性を示した。このことは、SCN9A が動脈硬化、気管支喘息や腫瘍など、増殖や分化・脱分化を生じる病的状態で発現する可能性を示唆することから、これらの病因や病態の解明に貢献すると考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。