

## 論文の内容の要旨

### 論文題目

肺動脈平滑筋細胞の電位依存性カリウムチャネルについての電気生理学的及び分子生物学的検討

指導教官 永井良三教授

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 飯田陽子

### 《研究の背景と目的》

電位依存性カリウムチャネル( $K_V$ )は、血管平滑筋細胞において、膜電位の形成などに関与しており、 $K_V$ の正常な発現及び機能は血管張力の維持に不可欠である。この $K_V$ の発現及び機能の変化は、多くの病的状態に関与している。このことは、肺動脈平滑筋細胞においても同様である。たとえば、虚血やフェンフラミンのような薬物によって誘発される肺動脈の血管収縮の状態下では、 $K_V$ の発現と機能が変化していることが報告されている。また原発性肺高血圧症の患者でも $K_V$ の機能不全を起こしていることが報告されている。

この $K_V$ の形成する電流は平滑筋細胞では遅延性整流カリウム電流( $I_K$ )と一過性外向き電流( $I_A$ )に分類される。 $I_K$ はゆっくりと活性化し、ゆっくりと不活性化する電流であり、膜電位の形成などに関与し、血管張力の調節に重要である。一方、 $I_A$ はすべての平滑筋に存在するのではないが、ヒトを含めたさまざまな種の血管平滑筋でその細胞膜の興奮に関わっていることが知られている。

この $K_V$ はイオンの通過孔を形成する $\alpha$ サブユニットから構成されている。 $K_V \alpha$ サブユニット蛋白は6回膜貫通型蛋白であり、9種ファミリーが存在する。このうち $K_V1 \sim 4$ ファミリーでは同種のあるいは異なったサブファミリーの $\alpha$ サブユニットが4個組み合

わさることにより、ひとつのチャネルを形成しており、このうち  $I_A$  を形成するものとして  $Kv1.4$ ,  $Kv3.3$ ,  $Kv3.4$ ,  $Kv4.1\sim 4.3$  がある。また  $Kv1$  ファミリーは修飾因子である  $\beta$  サブユニットとともに存在することにより  $I_A$  を形成しうる。

これまでに  $I_K$ ,  $I_A$  それぞれを形成する  $\alpha$  サブユニットのいくつかがクローニングされており、ラットやヒトの肺動脈平滑筋細胞でも、実際にいくつかの  $Kv$  の遺伝子や蛋白の発現が確認されている。しかし、ヒト肺動脈平滑筋細胞における  $I_A$  を形成する  $Kv$   $\alpha$  サブユニットの発現について、薬理的及び分子生物学的に詳細な検討を試みた研究はまだなされていない。

そこで、本研究は、培養ヒト肺動脈平滑筋細胞における  $Kv$ 、とくに  $I_A$  の電気生理学的及び分子生物学的特徴を明らかにすることを目的として行われた。

#### 《方法》

培養ヒト肺動脈平滑筋細胞における  $I_A$  の電気生理学的・薬理的な特徴を調べるためにパッチクランプ法(ホール・セル・クランプ法)を用いた。培養ヒト肺動脈平滑筋細胞における  $Kv$  遺伝子の発現を調べるためにリバーソ・トランスクリプシオン・ポリメラーゼ・チェーン・リアクション(RT-PCR)法( $Kv1.1\sim 1.6$ ,  $Kv2.1\sim 2.2$ ,  $Kv3.1\sim 3.4$ ,  $Kv4.1\sim 4.3$ )を用い、さらに  $I_A$  をコードする  $Kv$  遺伝子及び  $Kv4$  ファミリーの関連蛋白であるカリウムチャネル相互作用蛋白( $K^+$  channel interacting protein, KChIP)遺伝子の発現を定量的に評価するために定量 RT-PCR 法を用いた。培養及び正常組織のヒト肺動脈平滑筋細胞での  $Kv$  蛋白の発現を調べるために免疫細胞及び組織染色法を用いた。

#### 《結果》

EGTA 10 mM 及び ATP 3 mM をピペット内に充填し、培養ヒト肺動脈平滑筋細胞を用いて、ホール・セル・ボルテージ・クランプ法を行った。保持電位-70 mV とし、種々の脱分極パルスを与えると、外向き電流が一過性に活性化( $I_A$ )し、その後急速に減少して定常状態への電流( $I_K$ )へと移行した。この一過性外向き電流( $I_A$ )及び定常状態の電流( $I_K$ )は、ピペット内のカリウムをセシウムに置換すると消失することから、カリウム電流と考えられた。この  $I_A$  電流は、4 アミノピリジン(4-AP)により、濃度依存性に阻害され、その 50% 阻害濃度( $IC_{50}$ )は 794  $\mu M$ ( $n=3\sim 5$ )であった。これにより、培養ヒト肺動脈平滑筋細胞において電位依存性カリウム電流、とくに  $I_A$  電流の存在が示唆された。

次に RT-PCR 法を用い、電位依存性カリウムチャネル遺伝子の発現を体系的にスクリーニングした結果、 $I_K$  をコードする  $Kv1.1$ ,  $Kv1.5$ ,  $Kv2.1$  の発現とともに  $I_A$  をコードする  $Kv3.4$ ,  $Kv4.1$ ,  $Kv4.2$ ,  $Kv4.3$  の発現が認められた。定量 RT-PCR 法によってその発現量を比較すると、 $Kv4.2 > Kv3.4 > Kv4.3$  (long)  $> Kv4.1 > > Kv1.4$  の順であった。 $Kv4.3$  (short) の発現は認めなかった。このことから、培養ヒト肺動脈平滑筋細胞において  $I_A$  を形成する  $Kv$  は主に  $Kv3.4$  及び  $Kv4$  ファミリーであることが示唆され

た。

この  $I_A$  は、薬理的に、非選択的カリウムチャネル阻害薬であるが低濃度では  $K_v3.4$  を抑制するとされるテトラエチルアンモニウム (TEA) に対する感受性によって 2 種の構成成分に分けることができた。ひとつは低濃度 (1 mM) の TEA に感受性のある成分であり、もうひとつは TEA に非感受性であった。1つの細胞における 2 種の成分の存在比は TEA 感受性成分が  $71.8 \pm 6.4\%$ 、非感受性成分が  $28.2 \pm 6.4\%$  であった ( $n=12$ )。

$I_A$  は、 $K_v3.4$  の特異的阻害薬である BDS-II (3  $\mu\text{M}$ ) に対して感受性が認められた (阻害率:  $67.0 \pm 4.7\%$ ,  $n=3$ )。また、 $K_v4.2$ 、 $K_v4.3$  の特異的阻害薬であるフリクソトキシン-II (1  $\mu\text{M}$ ) によって阻害された (阻害率:  $36.5 \pm 2.0\%$ ,  $n=3$ )。

$K_v4$  ファミリーが形成する  $I_A$  に対して阻害効果が高いとされるフレカイナイドは  $I_A$  を濃度依存性に阻害し、不活性化を加速させた。その阻害は TEA 非感受性成分に対してより強い効果を示した。TEA 感受性成分に対する  $IC_{50}$  は 113  $\mu\text{M}$  ( $n=3\sim 8$ ) であったが、TEA 非感受性成分に対する  $IC_{50}$  は、30  $\mu\text{M}$  であった ( $n=3$ )。不活性化の時定数は、+40 mV の脱分極パルスにおいてコントロールが  $15.7 \pm 1.9$  ms であるのに対し、フレカイナイド 100  $\mu\text{M}$  存在下では  $5.8 \pm 0.7$  ms であった ( $n=3$ )。

オキシダント・ストレスを引き起こすターシャールブチルヒドロペルオキシダーゼ (t-BHP) は、 $K_v3.4$  を含む特定の  $K_v$  の不活性化を遅延させ、 $K_v4$  ファミリーにはその影響を与えないとされている。この t-BHP (1 mM) は  $I_A$  の不活性化を遅延させた ( $\tau$ :  $14.9 \pm 1.0 \rightarrow 30.7 \pm 1.8$ ,  $n=3$ ,  $p < 0.01$ ) が、TEA 非感受性成分の  $I_A$  の不活性化にはほとんど影響を与えなかった ( $\tau$ :  $13.6 \pm 1.4 \rightarrow 13.8 \pm 1.2$ ,  $n=4$ , 有意差なし)。

$K_v1.1$ 、 $K_v1.2$  の阻害薬であるデンドロトキシン (100 nM)、 $K_v1.2$ 、 $K_v1.3$  の阻害薬であるカリブドトキシン (100 nM)、 $K_v1.5$  の阻害薬であるクロフィリウム (10  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ ) はいずれも  $I_A$  をほとんど阻害しなかった ( $n=3\sim 4$ )。

また、2つの成分は電気生理学的なパラメータによっても区別することが可能であった。TEA 感受性成分の 50% 不活性化を与える電位は -23.2 mV、不活性化からの回復の時定数は  $1521 \pm 143$  ms であるのに対し ( $n=5$ )、TEA 非感受性成分の 50% 不活性化を与える電位は -54.5 mV、不活性化からの回復の時定数は  $238 \pm 30$  ms であった ( $n=3$ )。

免疫細胞染色法によって、培養ヒト肺動脈平滑筋細胞における  $K_v3.4$ 、 $K_v4.2$ 、 $K_v4.3$  蛋白の存在が確認できた。さらに免疫組織染色法によって、正常ヒト肺動脈組織切片においても  $K_v3.4$ 、 $K_v4.2$ 、 $K_v4.3$  蛋白の存在を確認した。

最後に、 $K_v4$  ファミリーの修飾蛋白である KChIP 遺伝子の発現量を定量 RT-PCR 法によって比較した結果、KChIP2、KChIP3 は存在した (KChIP2 < KChIP3) が、KChIP1 及び KChIP4 は存在しなかった。

《考察》

本研究は、培養ヒト肺動脈平滑筋細胞における  $I_A$  が  $Kv3.4$  及び  $Kv4$  ファミリーによって形成されていることを明らかにしたものである。

ヒトの肺動脈平滑筋細胞において  $I_A$  を形成する  $Kv$  の詳細な検討はいまだなされておらず、本研究は、培養ヒト肺動脈平滑筋細胞における  $Kv3.4$ ,  $Kv4$  ファミリーの存在をはじめて直接的に証明したものと見える。さらに、 $Kv4$  ファミリーとともに存在し、その機能を修飾するとされる  $KChIP$  遺伝子の発現も明らかにし、このことから、 $Kv4$  は、 $KChIP$  とともに、生理的に機能している可能性が考えられた。

$I_A$  電流は門脈などの **phasic** な平滑筋においては、細胞の膜電位形成、活動電位発生、ならびに、それによる自発興奮頻度の調節に深く関与しているとされている。**tonic** な平滑筋である肺動脈平滑筋における  $I_A$  の機能については不明であるが、肺動脈平滑筋では、さまざまな生理的状态ならびに病的状態により、活動電位が発生し、電氣的活動が変化することが知られており、とくに、虚血状態において、膜電位の脱分極、さらに活動電位の発生をきたすことが報告されている。今回の検討において、ヒト肺動脈平滑筋細胞で認められた2種類の  $I_A$  電流の50%不活性化を起こす電位が、正常細胞の静止膜電位 ( $\sim 40$  mV) に近いところで観察されたことから、 $I_A$  電流は、虚血などさまざまな病態における肺動脈平滑筋の電氣的活動に関与している可能性が考えられる。

今後、肺高血圧症を含めたさまざまな病態下での  $Kv$  及び  $KChIP$  などの修飾蛋白の発現の変化などについてさらに検討が必要である。