

[別紙 2]

審 査 の 結 果 の 要 旨

氏 名 飯 田 陽 子

本研究は、培養ヒト肺動脈平滑筋細胞における電位依存性カリウムチャンネル (K_V)、とくに一過性外向き電流 (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、以下の結果を得ている。

1. RT-PCR 法により K_V チャンネル遺伝子の発現についてスクリーニングを行い、 I_A に関連する $K_V3.4$, $K_V4.1$, $K_V4.2$, $K_V4.3$ をコードする遺伝子が発現していることを明らかにした。さらに、定量 RT-PCR 法でその発現量を比較し、 $K_V4.2$ が最も多く、ついで $K_V3.4$, $K_V4.3(\text{long})$, $K_V4.1$ の順に発現していることを示した。

2. 免疫細胞染色法によっても、培養ヒト肺動脈平滑筋細胞における $K_V3.4$, $K_V4.2$, $K_V4.3$ の存在を示した。さらに正常ヒト肺動脈組織切片を用いた免疫組織化学法でも同様の結果を示した。

3. 電気生理学的手法により、培養ヒト肺動脈平滑筋細胞において 4-AP によって阻害される一過性外向き電流 (I_A) が存在することを示した。次に TEA に対する感受性により、この I_A が異なる 2 種の構成成分より成りたっていることが明らかにした。1つは、比較的 low 濃度の TEA に感受性がある成分であり、もう1つは、TEA に非感受性の成分である。TEA は low 濃度では $K_V3.4$ を抑制するが、 K_V4 ファミリーにはその影響を与えないことが知られており、RT-PCR の結果と合わせ、これらの 2 つの成分がそれぞれ $K_V3.4$, K_V4 ファミリーからなる可能性を示した。

4. それぞれの K_V に対する特異的阻害薬の I_A に対する効果を調べたところ、 I_A は $K_V3.4$ の特異的阻害薬である BDS-II 及び $K_V4.2$, $K_V4.3$ の特異的阻害薬であるフリクソトキシン-II によっても阻害されることを示した。フレカイナイドは K_V4 チャンネルで形成される I_A に対する阻害効果が高いことが報告されているが、培養ヒト肺動脈平滑筋細胞において、フレカイナイドは TEA 感受性成分より非感受性成分をより強く抑制することを示した。さらに $K_V1.1$, $K_V1.2$ の阻害薬であるデンドロトキシン, $K_V1.2$, 1.3 の阻害薬であるカリブドトキシン, そして $K_V1.5$ の阻害薬であるクロフィリウムがいずれ

も I_A 電流を阻害しないことを示した。

5. グルタチオン・ペルオキシダーゼの基質であり、細胞の抗酸化容量を減少させることによってオキシダント・ストレスを生じさせる薬剤であり、 $K_v1.4$, $K_v3.3$, $K_v3.4$ を含む特定の K_v チャネルをアミノ酸末端のシステインを酸化することによって、不活性化を遅延させることが知られているターシャルヒドロペルオキシダーゼ (t-BHP) が、ヒト肺動脈平滑筋細胞において、 K_v の不活性化を遅延させ、TEA 非感受性 K_v には影響を与えないことを明らかにした。

6. さらに、この I_A を電気生理学的に区別する指標として、不活性化、活性化曲線及び不活性化からの回復の経時的変化などのパラメータを測定し、TEA 感受性成分の $V_{0.5inact}$ が -23.2mV 、 τ_{recov} が $1521 \pm 143 \text{ ms}$ 、TEA 非感受性成分の $V_{0.5inact}$ が -54.5mV 、 τ_{recov} が $238 \pm 30\text{m}$ であった。これらの特徴は、前者が $K_v3.4$ 、後者が K_v4 ファミリーの、これまでの報告と矛盾しないことを明らかにした。

7. K_v4 ファミリーの生理的な機能の修飾に重要な役割をもつ EF-hand を有するカルシウム結合蛋白であるカリウムチャネル相互作用蛋白 (K^+ channel interacting protein, KChIP)、主に KChIP3 が、 K_v4 ファミリーとともに存在することを定量 RT-PCR 法によって明らかにし、 K_v4 -KChIP3 がヒト肺動脈平滑筋細胞において生理的な役割を担っている可能性を示した。

以上、本論文は、培養ヒト肺動脈平滑筋細胞には $K_v3.4$, $K_v4.1$, $K_v4.2$, $K_v4.3$ が存在することを RT-PCR 法及び定量 RT-PCR 法、免疫染色法によって明らかにし、さらに、培養ヒト肺動脈平滑筋細胞に存在する I_A 電流は、これら $K_v3.4$, $K_v4.2$, $K_v4.3$ によって構成されていることを電気生理学的・薬理学的分析によって明らかにしたものである。これまでヒトの肺動脈平滑筋細胞において I_A を形成する K_v の詳細な検討はなされておらず、本研究は、培養ヒト肺動脈平滑筋細胞における $K_v3.4$, K_v4 ファミリーの存在をはじめて直接的に証明したものであるといえる。これまで知られていなかった培養ヒト肺動脈平滑筋細胞における I_A についての詳細な検討は、電位依存性カリウムチャネルの肺動脈平滑筋における生理的狀態及び肺高血圧症などのさまざまな病態への関与の解明に貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。