

審査の結果の要旨

氏名 岸田 信也

本研究は、抗不整脈薬である塩酸アミオダロン($C_{25}H_{29}I_2NO_3 \cdot HCL$; 以下アミオダロン)が、強い抗不整脈作用を有するにもかかわらず、他の抗不整脈薬と比べて、催不整脈性が低く、さらに、心機能が低下した患者における生存率に対して悪影響を及ぼさないばかりではなく、むしろ心血管系保護作用を呈するという特異的な作用を有することに着目し、ヒト臍静脈内皮細胞(HUVEC)を用いて一酸化窒素(NO)産生の観点から研究を行ったものであり、下記の結果を得ている。

1. 心筋および HUVEC における NO 合成酵素(NOS)の存在を RT-PCR 法および real-time RT-PCR 法により解析した結果、HUVEC 中に存在する NOS は、主として eNOS であり、iNOS, nNOS は有意には存在しないことが示された。また、ヒト左心室断面を用いた免疫染色写真上、eNOS は心内膜および心筋細胞両方に存在していることが示された。
2. HUVEC におけるアミオダロンおよびその代謝物 DEA、さらには開発中薬剤であるドロネダロンによる NO 産生への効果を調べたところ、これらの薬剤は濃度依存的に NO を産生することが明らかとなり、その作用は、DEA>ドロネダロン>アミオダロンとなっていた。
3. アミオダロンや DEA が NO 産生を促進すると同時に細胞障害性を有しないか否か調べるために、様々な濃度および処理時間における LDH 測定、アポトーシス誘導の検討、細胞数の検討を行ったが、臨床血中濃度においては、今回実験を行った処理時間では、これらの薬剤は細胞死やアポトーシスをもたらさないことが示された。
4. NO 産生増加をもたらす機序を調べるため、各種阻害薬をアミオダロンや DEA と同時投与してみたところ、カルシウムキレート作用を有する EGTA や NOS 阻害薬である L-NAME により NO 産生作用が減弱することがわかった。アミオダロン $30 \mu M$ まででは 6 時間および 24 時間処理によって eNOS mRNA 発現は有意に変化しないことが示された。
5. fura-2 AM を用いた二波長励起法により、DEA は投与開始間もなくから細胞内カルシウムイオン濃度を上昇させることが示され、これは過去の研究内容と一致するものであった。アミオダロンと DEA とでは DEA のほうがカルシウム上昇作用がより強力であることがわかった。DEA 投与後、 La^{3+} を加えたところ、カルシウムイオン濃度が低下したことが再現性をもって示されたことから、細胞外からのカルシウムイオン流入が原因であると推測された。

6. whole-cell patch-clamp 法を用いて、DEA による膜電流への影響を調べたところ、DEA による内向き電流は、 La^{3+} 、 Gd^{3+} により阻害されることが示された。また、これらの膜電流は、アミオダロンよりも DEA の方が強力に誘導することが示された。さらに、アミオダロンおよび DEA は、ともに濃度依存的に膜電流を増加させることが示され、 $\text{DEA} > \text{アミオダロン}$ であった。細胞外 Cl^- イオンを低濃度にしても内向き電流に影響を与えないことから、 Cl^- 電流の関与は否定的であったが、 NMDG^+ を Na^+ に置換したところ、その内向き電流は減弱したこと、さらにその逆転電位が 0 mV 付近であったから、この膜電流は非選択的陽イオンチャンネルを介するものと結論付けられた。

以上、本論文では、抗不整脈薬アミオダロンおよびその代謝物による心血管系保護作用の原因として、NO 産生に着目し、さらにそのメカニズムについて、これまで未知であった、アミオダロンによる非選択的陽イオンチャンネルを介した膜電流増加による細胞内カルシウムイオン濃度増加をその機序として特定している。本研究は、アミオダロンによる心血管系保護作用の解明に重要な貢献をなす故に、学位の授与に値するものと考えられる。