論文内容の要旨

論文題目　Voltage-Gated Sodium Channel ($Na_V1.7$) in Aortic Smooth Muscle Cells: Potentiation of Cell Migration, Endocytosis and Secretion.

和訳　大動脈平滑筋細胞における電位依存性ナトリウムチャネル（$Na_V1.7$）の機能とその役割

指導教員　永井　良三　教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 16 年入学

医学博士課程

内科学専攻

氏名　目黒　健太郎

電位依存性ナトリウムチャネルは一般的には神経線維、骨格筋や心筋に見られる。現在までのところ、10 種類の電位依存性ナトリウムチャネルが同定されており、それぞれ発現の部位や性質が異なる事が知られている。最近では培養下での血管平滑筋や気管支平滑筋にも発現していることが報告されているが、その性質、機能及び役割は十分に解明されていない。特に血管平滑筋においては細胞の増殖、遊走、貪食及び分泌という機能が動脈硬化の進展やバルーン拡張後の内膜肥厚と関与しているといわれている。

そこで我々はまず培養ヒト大動脈平滑筋細胞における電位依存性ナトリウムチャネルの電気生理学的特徴を調べるとともに増殖、遊走、貪食及び分泌における電位依存性ナトリウムチャネルの役割を調べた。続いて再狭窄モデルとして用いられるウサギの大動脈バルーン傷害モデルを用いて電位依存性ナトリウムチャネルの生体内での内膜肥厚との関わりを調べた。

培養ヒト大動脈平滑筋細胞をパッチクランプ法にて膜電流測定を行ったところ、一過性の内向き電流がみられた。この電流は、細胞外液のナトリウムイオンを膜非透過性の陽イオンである $NMDG^+$に置換することにより電流が見られ

なくなることより、電位依存性ナトリウム電流と考えられた。この電流はテトロドトキシン（TTX）にて用量依存的に阻害され（IC_{50} = 17 nmol/L）、TTX 感受性のナトリウム電流と考えられた。この細胞において電位依存性ナトリウムチャネルの遺伝子の発現を SCN1A から SCN9A まで RT-PCR を用いて調べたところ、SCN9A の発現がみられた。定量的 RT-PCR 法にても他の電位依存性ナトリウムチャネルと比して SCN9A の著明な発現を認めた。一方、生体内の大動脈平滑筋においては SCN9A の発現はほとんど見られず、培養下に SCN9A の発現が特異的にみられると考えられた。SCN9A によりコードされたタンパクである $Na_V1.7$ の発現は培養ヒト大動脈平滑筋細胞の免疫染色にても確かめられた。さらに、この電位依存性ナトリウムチャネルの β サブユニットは β1 サブユニットにより構成されている事が定量的 RT-PCR 法にて確かめられた。

そこで、我々は培養ヒト大動脈平滑筋細胞へ SCN9A に対する siRNA を導入することで、SCN9A 遺伝子の役割を調べた。SCN9A 遺伝子の発現は約 3 分の 1 に減少し、パッチクランプ法にてナトリウム電流はほぼ消失する事を確かめた。

この培養ヒト大動脈平滑筋細胞で、このチャネルの細胞増殖、遊走、貪食能及びマトリックスメタロプロテアーゼ-2（MMP-２）分泌における役割について、ナトリウムチャネルを特異的にブロックする TTX 及び siRNA を用いて調べた。増殖に対しては、24 時間、48 時間後においても TTX 及び siRNA にて抑制はみられず、電位依存性ナトリウムチャネルが増殖に関与している可能性は低いと考えられた。一方、8 μm サイズの穴のあるフィルタにて遊走能を調べたところ、TTX 10 μmol/L、siRNA とも約 20%遊走が抑制された（それぞれ $p<0.05$, $p<0.01$）。細胞の貪食能を調べるため、horse radish peroxidase の取り込み能を調べたところ、TTX 10 μmol/L にて約 20%抑制された（$p<0.01$）。また、MMP-2 の分泌は 6 時間及び 12 時間において有意に TTX 10μmol/L にて抑制がみられた（それぞれ $p<0.01$, $p<0.05$）。以上より、この培養ヒト大動脈平滑筋細胞に発現している電位依存性ナトリウムチャネルは細胞の遊走、貪食及び MMP-2 の分泌に関与していることが確かめられた。

血管平滑筋の電位依存性ナトリウムチャネルの貪食能へのかかわりはいろいろなメカニズムが想定される。電位依存性ナトリウムチャネルにより細胞ナトリウム濃度が上昇し、ナトリウムーカルシウム交換系や水素イオンの上昇を介

して細胞内カルシウム濃度を上昇させ、貪食能を賦活化させる事や、ナトリウムイオン自体がカルシウムイオン濃度の上昇を伴うことなしに Adenylate cyclase を介して貪食能を賦活化させる事が報告されている。また、電位依存性ナトリウムチャネルの血管平滑筋細胞の遊走能へのかかわりについては、血管平滑筋細胞においてナトリウムーカルシウム交換系やカルシウムイオン濃度の上昇を介して貪食能が活性化される事が報告されている。また、細胞の貪食能は分泌能を反映することが報告されており、MMP-2 や各種サイトカインの分泌を介して動脈硬化や内膜増殖を促進する可能性も考えられた。

続いて、ウサギ大動脈平滑筋細胞を用いて電位依存性ナトリウムチャネルの発現について調べた。大動脈より単離した新鮮ウサギ大動脈平滑筋細胞をパッチクランプ法にて膜電流を調べたところ、電位依存性の Ca^{2+}チャネルがみられた。この電流は、nifedipine (1 μmol/L)にてブロックされ L 型カルシウムチャネルであると考えられたが、電位依存性ナトリウムチャネルはみられなかった。一方、培養ウサギ大動脈平滑筋細胞では、電位依存性の一過性内向き電流がみられが、この電流は細胞外液のナトリウムを $NMDG^{+}$に置換することにより電流が見られなくなることより、電位依存性ナトリウムチャネルと考えられ、また、TTX（1 μmol/L）にて完全にブロックされた。培養ウサギ大動脈平滑筋細胞には RT-PCR 及び定量的 RT-PCR にて SCN9A 遺伝子の発現がみられたが、生体内での新鮮な大動脈平滑筋では発現はみられなかった。さらに、SCN9A によりコードされたタンパクである $Na_V1.7$ の発現は培養ウサギ大動脈平滑筋細胞の免疫染色にても確かめられた。

本実験及び以前の報告より、ヒト及びウサギにおいて大動脈血管平滑筋で発現しているチャネルは通常の状態では L 型カルシウムチャネルであるが、培養下においてはナトリウムチャネル、とりわけ $Na_V1.7$ の発現へと変化していることが確かめられた。ラットでの報告では、培養下にてもナトリウムチャネルはみられないとの報告があり、動物の種による違いが存在する可能性があると考えられる。動脈硬化巣や血管内膜増殖時にみられる血管平滑筋細胞の形態は収縮型の血管平滑筋細胞よりは培養時の形態に近いとの報告がある。今回我々の示した培養時に出現する SCN9A がバルーン拡張後の内膜肥厚における血管平滑筋の変化に関与していることを確かめるため、再狭窄モデルとして用いられ

るウサギの大動脈バルーン傷害モデルを用いて検討を行った。バルーン傷害 2 日後の血管においては RT-PCR にて SCN9A の発現が軽度みられ、定量的 RT-PCR において、正常大動脈に比して約 6 倍の SCN9A 遺伝子の発現がみられた。又、$Na_V1.7$ の発現を蛍光免疫染色にて観察したところ、正常大動脈平滑筋では発現がみられず、バルーン傷害 2 日後には、大動脈中膜の平滑筋に $Na_V1.7$ の発現がみられた。このバルーン傷害 2 日後という時期には、他に VCAM-1、α4β1、NF-κB や T 型カルシウムチャネルといった炎症に関与すると考えられる遺伝子の発現も見られることが報告されている事から、バルーン傷害の結果として生じる炎症や内膜増殖のプロセスの一部である可能性が考えられた。

結論として、SCN9A 遺伝子は培養ヒト及びウサギ大動脈平滑筋細胞に発現していたが、生体内の大動脈平滑筋においては発現していなかった。ヒト大動脈平滑筋細胞にて SCN9A にてコードされた Nav1.7 は細胞の遊走、貪食及び分泌に関与したが、増殖には関与しなかった。ウサギでのバルーン傷害モデルで傷害 48 時間後の血管中膜の平滑筋細胞にても SCN9A は発現しており、これは血管中膜での細胞の遊走や貪食を介して内膜増殖に関与している可能性が考えられた。このことからナトリウムチャネルを抑制することが、内膜増殖や動脈硬化に対して治療上での標的となりうる可能性が示唆された。