

論文の内容の要旨

論文題目 Roles of Potassium Channels in Tissue Factor Expression
in Human Monocytic Cells.
ヒト単球系細胞の組織因子発現における、カリウムチャネルの役割について
の検討

氏名 山本 由美子

組織因子 (tissue factor) は、凝固系の開始因子であり、血栓形成において重要な役割を担っている。一方、Ⅲ群の抗不整脈薬であるアミオダロンは、カリウムチャネル阻害薬である。アミオダロンは様々な電気生理学的作用を持ち、カリウムチャネル阻害のみでなく、ナトリウムチャネル阻害、 α および β アドレナリン受容体阻害、L型カルシウムチャネル阻害作用も持っている。さらにアミオダロンには抗血栓作用も報告されており、臨床的には、虚血性心疾患後やうっ血性心不全後の患者にアミオダロンを投与することにより、不整脈死や突然死だけではなく、全体的な死亡率を減少させることが報告されている。

本研究では、ヒト単球系細胞 THP-1 を用いて、単球系細胞の組織因子発現に対するアミオダロンの抑制作用をしらべた。THP-1 はヒト単球性白血病細胞由来の培養細胞で、ホルボールエステル刺激によりマクロファージ様細胞へ分化する。THP-1 細胞にはいくつかのカリウムチャネルの存在が報告されており、その代表的な 2 つが電位依存性カリウムチャネル Kv1.3 と内向き整流カリウムチャネル Kir2.1 である。分化した THP-1 細胞には、高コンダクタンス Ca^{2+} 依存性カリウムチャネル $\text{K}_{\text{Ca}}1.1$ も存在することが報告されている。アミオダロンは様々なチャネルを阻害することから、THP-1 細胞に存在するカリウムチャネルのうち、アミオダロンにより抑制され、組織因子発現に対して抑制作用を及ぼすチャネル、つまり鍵となるチャネルを見つけるため、それぞれのチャネルの選択的阻害薬を用いて、組織因子発現に対する抑制効果を比較した。

組織因子の mRNA および蛋白の発現をしらべるために、定性的および定量的 RT-PCR、ウェスタンブロッティング解析を行った。THP-1 細胞を腫瘍壊死因子 (TNF) - α (100ng/ml) で刺激すると、3 時間後に組織因子の mRNA は著明に増加し、刺激前のほぼ 4~8 倍となるが、24 時間後には減少する。THP-1 細胞に TNF- α とともにアミオダロン (10 μ M) を加えると、TNF- α により 3 時間後に誘導された組織因子の mRNA は有意に低下し、完全に抑制された。また、アミオダロンの用量を 3、10、30 μ M の 3 つに変化させて効果を比較したところ、アミオダロンによる組織因子の mRNA 発現抑制効果は用量依存性を示した。ウェスタンブロッティング解析では、TNF- α の刺激により 6 時間後、24 時間後に増加した組織因子の蛋白を、アミオダロン (10 μ M) が有意に減少させた。

アミオダロンの組織因子発現抑制作用の鍵となるチャネルを見つけるため、THP-1 細胞に存在することが知られているカリウムチャネルについて、選択的阻害薬を用いて組織因子の発現抑制作用を比較した。電位依存性カリウムチャネル Kv1.3 は未分化の THP-1 細胞に多く存在しているが、THP-1 細胞が分化するとほとんど認められなくなることが知られている。THP-1 細胞を TNF- α (100ng/ml) で刺激したときに増加する組織因子の mRNA については、Kv1.3 の選択的阻害薬であるマルガトキシシン (1nM) では有意な変化を認めず、さらに高用量のマルガトキシシン (10nM) でも有意な変化を認めなかった。一方、ウェスタンブロッティング解析では、TNF- α の刺激により 6 時間後、24 時間後に組織因子の蛋白が増加したが、マルガトキシシン (1nM) は 24 時間後の蛋白を有意に減少させた。

内向き整流カリウムチャネル Kir2.1 は、Ba²⁺により阻害され、未分化の THP-1 細胞での存在は少ないが、THP-1 細胞が分化すると多く存在するようになることが知られている。Ba²⁺ (1mM) は、THP-1 細胞を TNF- α (100ng/ml) で刺激したとき 3 時間後、6 時間後に増加する組織因子の mRNA を有意に減少させた。またウェスタンブロッティング解析では、TNF- α の刺激により 6 時間後、24 時間後に増加した蛋白を、Ba²⁺ (1mM) は有意に減少させた。

分化した THP-1 細胞に存在することが知られている高コンダクタンス Ca²⁺依存性カリウムチャネル K_{Ca}1.1 には、選択的阻害薬イベリオトキシシンが存在する。イベリオトキシシン (10nM) は、THP-1 細胞を TNF- α (100ng/ml) で刺激したとき 3 時間後、6 時間後に増加する組織因子の mRNA を有意に減少させた。ウェスタンブロッティング解析では、TNF- α の刺激により 3 時間後、6 時間後、24 時間後に組織因子の蛋白が増加したが、イベリオトキシシン (10nM) は 6 時間後の蛋白を有意に減少させた。

パッチクランプ法を用いた電気生理学的検査では、未分化の THP-1 細胞で記録された Kv1.3 による電位依存性電流をアミオダロン (10 μ M) が一部抑制し、細胞外液を洗い流し

たあとマルガトキシン (1nM) を投与すると、マルガトキシンはその電流をほぼ完全に抑制した。このことから、アミオダロンが Kv1.3 を抑制すること、さらに、マルガトキシンが 1nM の濃度で THP-1 細胞の Kv1.3 を抑制するのに十分であることを確認した。

本研究では、アミオダロンが単球系細胞の組織因子発現を転写レベルで抑制することを初めて見出した。アミオダロンによって阻害され、THP-1 細胞の組織因子発現を抑制する働きを担っているカリウムチャンネルについては、電位依存性カリウムチャンネル Kv1.3、内向き整流カリウムチャンネル Kir2.1、さらに高コンダクタンス Ca²⁺依存性カリウムチャンネルすべてが関与している可能性がある。Kv1.3 については、投与した用量 (1nM) のマルガトキシンの十分チャンネルが阻害されていると考えられるものの、組織因子を転写レベルで抑制する所見を認めなかった。Kir2.1 と K_{Ca}1.1 は、アミオダロンと同様に THP-1 細胞における組織因子の発現を転写レベルで抑制する機序が働いているものと考えられるが、Kv1.3 については別の作用機序の存在が示唆された。これら 3 種のカリウムチャンネル抑制効果はアミオダロンのそれと比較すると不十分であり、アミオダロンはこれらのチャンネル抑制以外の作用機序をもつ可能性が示唆された。

本研究で示された、単球系細胞におけるアミオダロンの組織因子発現抑制効果が、血栓形成の促進された病的状態にある患者においてアミオダロンの抗血栓作用につながる可能性がある。本研究は培養細胞における実験であり、アミオダロンの抗血栓作用の機序解明には、今後の更なる研究が必要である。