

審査の結果の要旨

氏名 山本 由美子

本研究は、抗血栓作用をもつことが報告されているアミオダロンについて、単球に対する抗血栓作用を明らかにするため、ヒト単球系細胞 THP-1 を用いて組織因子 (TF) 発現におけるアミオダロンの抑制作用を調べたものである。また、アミオダロンがカリウムチャネルブロッカーであることから、これまで THP-1 細胞に存在することが知られている 3 種のカリウムチャネルについて、それぞれの選択的ブロッカーの作用とアミオダロンの作用の比較検討を試みており、以下の結果を得ている。

1、通常の RT-PCR および定量的 RT-PCR 法を用いて解析したところ、ヒト単球系細胞 THP-1 を腫瘍壊死因子 (TNF) - α (100ng/ml) で刺激すると、TF の mRNA は 3 時間後に刺激前の 4 ~8 倍に増加するが、24 時間後には減少した。アミオダロン (10 μ M) は、TNF- α により誘導された TF の mRNA 増加を有意に、かつ完全に抑制した。また、3 種類の用量のアミオダロン (3、10、30 μ M) の作用を比較したところ、TF の転写抑制作用は用量依存性を示した。

2、ウェスタンブロッティング法を用いて解析したところ、THP-1 細胞を TNF- α で刺激すると、TF の蛋白は 6 時間および 24 時間後に増加した。アミオダロン (10 μ M) は、TNF- α により 6 時間、24 時間後に誘導された TF の蛋白を有意に抑制した。

3、THP-1 細胞についてはこれまでに、電位依存性カリウムチャネル Kv1.3、内向き整流カリウムチャネル Kir2.1、および高コンダクタンス Ca²⁺依存性カリウムチャネル K_{Ca}1.1 の 3 種のカリウムチャネルの存在が報告されている。これらの選択的阻害薬を用いて、TF 発現抑制作用をアミオダロンと比較した。Kv1.3 の選択的阻害薬であるマルガトキシシン (1nM、10nM) を投与したところ、TNF- α により誘導された mRNA の増加については有意な抑制作用を認めなかった。ウェスタンブロッティング解析では、TNF- α により 6 時間後と 24 時間後に TF の蛋白が誘導されたが、マルガトキシシン (1nM) は 24 時間後の蛋白について有意に減少させた。

4、内向き整流カリウムチャネル Kir2.1 は Ba²⁺により阻害される。TNF- α で刺激したとき 3 時間後、6 時間後に増加する TF の mRNA を Ba²⁺ (1mM) は有意に減少させた。また TNF- α の刺激により 6 時間後、24 時間後に増加した TF の蛋白を、Ba²⁺は有意に減少させた。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ンが存在する。イベリオトキシン (10nM) は、THP-1 細胞を TNF- α で刺激したとき 3 時間後、6 時間後に増加する TF の mRNA を有意に減少させた。また TNF- α の刺激により 3 時間後、6 時間後、24 時間後に TF の蛋白が増加したが、イベリオトキシンは 6 時間後の蛋白を有意に減少させた。

5、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。

以上、本研究は、アミオダロンが単球系細胞の TF 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るチャネルについては、本研究で検討した 3 種のカリウムチャネルがすべて関与していると考えられたが、アミオダロンがそれ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 TF 発現抑制効果は、血栓形成の促進された病的状態にある患者におけるアミオダロンの抗血栓作用に加担している可能性があり、カリウムチャネルブロッカーの臨床応用と作用機序解明に重要な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。