

氏名	わた 綿 ぬき 貫 まさ 正 と 人
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学位記番号	医 博 第 2102 号
学位授与の日付	平 成 11 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	医 学 研 究 科 内 科 系 専 攻
学位論文題目	Endothelin-1 inhibition of cardiac ATP-sensitive K <sup>+</sup> channels via pertussis-toxin-sensitive G-proteins (エンドセリン-1の百日咳毒素感受性 G タンパクを介する心筋 ATP 感受性カリウムチャネルの制御) (主査)
論文調査委員	教 授 大 森 治 紀 教 授 中 尾 一 和 教 授 篠 山 重 威

論 文 内 容 の 要 旨

<目的>心筋梗塞など心筋細胞に代謝性のストレスがかかった場合、エンドセリン-1 (ET-1) の分泌は増加し、一方ATP感受性カリウム (K<sub>ATP</sub>) チャネルは活性化される。本研究にて、K<sub>ATP</sub>チャネルとET-1との機能的連関について、その作用及び機序の検討をおこなった。

<方法>酵素処理により単離したモルモットの心室筋細胞を細胞接着型電圧固定法を用い単一チャネル電流を測定した。さらに一部の実験では、ストレプトリジンOにより細胞膜を処理した後、細胞接着型パッチクランプ法を用いて実験を行った。

<結果>ET-1は代謝阻害薬の投与により活性化したK<sub>ATP</sub>チャネルを濃度依存性に抑制し、そのIC<sub>50</sub>は3.8±0.7pMであった。ET<sub>A</sub>受容体アンタゴニストであるBQ-123はET-1のこの抑制効果を阻害した。百日咳毒素で処理した細胞ではET-1のK<sub>ATP</sub>チャネルに対する抑制効果は消失した。ストレプトリジンOにより細胞膜を処理することにより、細胞膜にATP分子が自由に通過できるだけの小孔を作成し、細胞外ATP濃度を変化させ細胞内ATP濃度を一定にコントロールすると、ET-1のK<sub>ATP</sub>チャネルに対する抑制効果は認められなくなった。また、ムスカリン刺激によりK<sub>ATP</sub>チャネルは抑制され、β受容体刺激により活性化した。Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>ポンプ阻害薬であるウアバイン投与で、K<sub>ATP</sub>チャネル活性は抑制された。ウアバイン投与下で再度活性化したK<sub>ATP</sub>チャネルは、ET-1の追加投与にて再抑制された。

<結論>ET-1は濃度依存性に、また可逆的にK<sub>ATP</sub>チャネルを抑制した。ET<sub>A</sub>受容体アンタゴニストであるBQ-123がET-1のこの作用を抑制したことより、ET-1がET<sub>A</sub>レセプターを介しK<sub>ATP</sub>チャネルに作用することが明らかとなった。また百日咳毒素によりET-1のK<sub>ATP</sub>チャネルへの抑制効果が消失したことより、ET<sub>A</sub>レセプターと会合する百日咳毒素感受性G蛋白を介しての作用と考えられた。ムスカリン刺激によりK<sub>ATP</sub>チャネルは抑制され、β受容体刺激により活性化したが、その機序は細胞膜直下ではNa、K、ATPといった細胞内物質の濃度がダイナミックに変化していることが知られており、ムスカリン刺激によりアデニレートサイクラーゼ活性が阻害されることにより細胞膜直下のATP濃度が上昇したためK<sub>ATP</sub>チャネルは抑制されたと考えられ、反対にβ受容体刺激ではアデニレートサイクラーゼ活性がたかまることによりATP消費が増え、細胞膜直下のATP濃度が低下したためK<sub>ATP</sub>チャネルが活性化したものと考えられた。同様に、ストレプトリジンOにて細胞膜を処理し、細胞内ATP濃度を一定にコントロールすると、ET-1のK<sub>ATP</sub>チャネルに対する抑制効果が認められなくなった実験結果から、ET-1が細胞膜直下のATP濃度を変化させることによりK<sub>ATP</sub>チャネルに作用することが強く示唆された。更に、Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>ポンプ阻害により膜直下のATP濃度を上昇させるウアバインを、活性化したK<sub>ATP</sub>チャネルに作用させたところ、K<sub>ATP</sub>チャネルは抑制された。更に時間経過とともに活性化したK<sub>ATP</sub>チャネルに対しET-1が抑制効果を示したが、ウアバインとET-1両者の細胞膜直下のATP濃度を上昇させる機序の違いによるものと考えられた。これらの実験結果より、ET-1のK<sub>ATP</sub>チャネルへの抑制効果の作用機序は、ET<sub>A</sub>レセプターと会合する百日咳毒素感受性G蛋白を介してアデニレー

トサイクラーゼ活性が抑制され、細胞膜直下のATP濃度が上昇する結果生じたものと推測された。

### 論文審査の結果の要旨

ET-1が $K_{ATP}$ チャネル活性を抑制することを発見した。その作用機序について検討をおこなった。

酵素処理により単離したモルモットの心室筋細胞を細胞接着型電圧固定法を用い単一チャネル電流を測定した。

ET-1は活性化した $K_{ATP}$ チャネルを濃度依存性に抑制し、その $IC_{50}$ は $3.8 \pm 0.7 \text{ pM}$ であった。ET<sub>A</sub>受容体アンタゴニストであるBQ-123はET-1の、この抑制効果を阻害した。百日咳毒素で処理した細胞ではET-1の $K_{ATP}$ チャネルに対する抑制効果は消失した。ストレプトリジンOにより細胞膜を処理することにより、細胞膜にATP分子が自由に通過できるだけの小孔を作成し、細胞外ATP濃度を変化させ細胞内ATP濃度を一定にコントロールすると、ET-1の $K_{ATP}$ チャネルに対する抑制効果は認められなくなった。また、ムスカリン刺激により $K_{ATP}$ チャネルは抑制され、 $\beta$ 受容体刺激により活性化した。 $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ポンプ阻害薬であるウアバイン投与で、 $K_{ATP}$ チャネル活性は抑制された。ウアバイン投与下で $K_{ATP}$ チャネルは、ET-1の追加投与にて再抑制された。

ET-1は濃度依存性に、また可逆的に $K_{ATP}$ チャネルを抑制した。ET-1の $K_{ATP}$ チャネルへの抑制効果の作用機序は、ET<sub>A</sub>レセプターと会合する百日咳毒素感受性G蛋白を介してアデニレートサイクラーゼ活性が抑制され、細胞膜直下のATP濃度が上昇する結果生じたものと推測された。

以上の研究は $K_{ATP}$ チャネルとET-1との機能的連関についてその作用及び機序の解明に貢献し、循環器病学の発展に寄与するところが多い。

従って、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成11月2月5日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。