

氏 名 いわ 岩 室 康 司
 学位(専攻分野) 博 士 (医 学)
 学 位 記 番 号 医 博 第 2113 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 脳 統 御 医 科 学 系 専 攻
 学 位 論 文 題 目 Activation of three types of voltage-independent Ca^{2+} channel in A 7r5 cells by endothelin-1 as revealed by a novel Ca^{2+} channel blocker LOE 908に関する研究

(新しいカルシウムチャンネル阻害薬である LOE908を用いて示された、
 A7r5 細胞におけるエンドセリン-1により活性化される3種類の電
 位非依存性カルシウムチャンネル)

(主査)

論文調査委員 教 授 中 西 重 忠 教 授 井 出 千 束 教 授 橋 本 信 夫

論 文 内 容 の 要 旨

【目的】

エンドセリン-1 (ET-1) は強力な血管収縮性を持つペプチドであり、その作用は細胞内遊離 Ca^{2+} 濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) の増加を介するが、これは細胞外からの Ca^{2+} 流入に依存する。流入経路として、電位依存性 Ca^{2+} チャンネル (VOCC) の他に、 Ca^{2+} 透過性非選択的陽イオンチャンネル (nonselective cation channel ; NSCC) が重要であることはすでに示した。また、ET-1 が受容体と結合することにより小胞体から Ca^{2+} が放出されるためストア作働性 Ca^{2+} チャンネル (SOCC) が活性化することが予想される。しかし、ET-1により誘発される $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の増加に、これらの Ca^{2+} 透過性チャンネルがどの程度関与しているのか不明である。本研究では、新しい Ca^{2+} チャンネル遮断薬 (SK&F96365およびLOE908) を導入し、これらのチャンネルを薬理的に区別し、ET-1 刺激により誘発される $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 増加におけるこれらのチャンネルの関与の程度を検討した。

【方法】

ラットの大動脈平滑筋由来の系統細胞であるA7r5細胞を用いた。 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の測定には蛍光指示薬であるfura-2あるいはfluo-3を用いた。また全細胞記録では細胞膜の電位を -60mV に固定した。灌流液にはKrebs-HEPES溶液を、また、ピペット液には 10mM EGTAを含むCsCl溶液を用いた。また灌流液にはVOCCを遮断するためにニフェジピンをあらかじめ添加した。

【結果】

全細胞記録では、ET-1により Ca^{2+} 透過性NSCCを介し内向き電流が誘発された。低濃度 ($\leq 1\text{ nM}$) のET-1により誘発される電流はSK&F96365抵抗性で、高濃度 ($\geq 10\text{ nM}$) のET-1により誘発される電流はSK&F96365により約50%が抑制された。一方、LOE908はいずれの電流も完全に遮断した。また、SOCCを活性化する小胞体の Ca^{2+} ポンプの阻害薬であるthapsigarginを灌流液に添加しても電流は検出されなかった。

$[\text{Ca}^{2+}]_i$ の測定では、高濃度ET-1により一過性上昇とそれに続く持続相が、また、低濃度ET-1では持続相のみが観察された。これらの持続相はいずれも細胞外の Ca^{2+} を除去すると消失したことから、 Ca^{2+} 流入によると考えられた。低濃度ET-1による $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の増加はLOE908で完全に抑制されたが、SK&F96365では影響を受けなかった。一方、高濃度のET-1による $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の増加の約65%が、LOE908またはSK&F96365の単独投与で抑制され、2つの薬物の同時投与により完全に抑制された。また、thapsigargin投与により $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の増加がみられた。この増加はSK&F96365により完全に抑制さ

れたが、LOE908では影響を受けなかった。

【考察】

以上の結果から、ET-1 刺激により、3つの電位非依存性Ca²⁺チャンネルが活性化されることが明らかとなった。すなわち、2種類のCa²⁺透過性非選択的陽イオンチャンネル（NSCC-1とNSCC-2と命名した）とストア作動性Ca²⁺チャンネル（SOCC）である。また、これらのチャンネルはLOE908およびSK&F96365により、薬理的に区別され、NSCC-1は、LOE908感受性ならびにSK&F96365抵抗性であり、NSCC-2はLOE908およびSK&F96365感受性であり、SOCCはLOE908抵抗性ならびにSK&F96365感受性である。また、低濃度のET-1 刺激による[Ca²⁺]_iの増加にはNSCC-1のみが関与するが、高濃度のET-1 刺激による[Ca²⁺]_iの増加には上記3つの電位非依存性Ca²⁺チャンネルが関与することを示した。

論文審査の結果の要旨

エンドセリン-1（ET-1）の血管収縮作用は細胞内遊離Ca²⁺濃度（[Ca²⁺]_i）の増加を介するが、これは細胞外からのCa²⁺流入に依存する。ラット大動脈平滑筋由来の系統細胞であるA7r5細胞でET-1により誘発される[Ca²⁺]_i増加に関与する電位非依存性Ca²⁺チャンネルを、新しいCa²⁺チャンネル遮断薬（SK&F96365とLOE908）を用いて検討した。全細胞記録と[Ca²⁺]_i測定の結果より、ET-1により、2種類のCa²⁺透過性非選択的陽イオンチャンネル（NSCC-1とNSCC-2）とストア作動性Ca²⁺チャンネル（SOCC）が活性化することが明らかとなった。NSCC-1は、LOE908感受性/SK&F96365抵抗性、NSCC-2はLOE908およびSK&F96365感受性、SOCCはLOE908抵抗性/SK&F96365感受性であった。また、低濃度ET-1による[Ca²⁺]_i上昇にはNSCC-1のみが関与するが、高濃度ET-1による[Ca²⁺]_i上昇には上記3つの電位非依存性Ca²⁺チャンネルがほぼ同程度関与した。

以上の研究は、血管収縮の細胞内メカニズムの解明に貢献し、脳血管攣縮治療に寄与するところが多い。

したがって、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年2月8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。