

氏 名	張 曉 峰
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 2159 号
学位授与の日付	平 成 11 年 9 月 24 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 生 理 系 専 攻
学位論文題目	Pharmacological characterization of Ca^{2+} entry channels in ET-1-induced contraction in rat aorta using LOE 908 and SK&F 96365 (エンドセリン-1によるラット大動脈の収縮に関する電位非依存性カルシウムチャンネルの薬理学的解析)

論文調査委員 (主 査) 教 授 成 宮 周 教 授 野 間 昭 典 教 授 武 藤 誠

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。我々は、血管平滑筋において、 Ca^{2+} 流入経路として、電位依存性 Ca^{2+} チャンネル (VOCC) の他に、3種類の電位非依存性 Ca^{2+} チャンネルが活性化されること、さらに新しい Ca^{2+} チャンネル遮断薬 (SK&F 96365 および LOE 908) を導入し、これらのチャンネルを薬理学的に区別できることを示した。すなわち、非選択的陽イオンチャンネル1型 (NSCC-1) は、SK&F 96365 に抵抗性であるが LOE 908 に感受性であり、NSCC-2 は SK&F 96365 および LOE 908 の両方に感受性であり、さらに、ストア作動性 Ca^{2+} チャンネル (SOCC) は SK&F 96365 に感受性を有するが LOE 908 には抵抗性である。しかし、ET-1 により誘発される血管収縮に、これらの Ca^{2+} 透過性チャンネルが実際に関与しているのか不明である。本研究では、ET-1 による血管収縮におけるこれらのチャンネルの生理学的意義を明らかにするため、ET-1 により誘発されるラット胸部大動脈平滑筋の収縮および $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の増加に対する SK&F 96365 および LOE 908 の影響を検討した。

【方法】ラットの胸部大動脈から輪状標本および単離平滑筋細胞を作製し、それぞれ等尺性張力の測定および fluo-3 を用いた $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の測定を行った。

【結果】ET-1 により誘発されるラット胸部大動脈の収縮は、細胞外液の Ca^{2+} を除去するとほぼ消失したが、電位依存性 Ca^{2+} チャンネルの阻害薬であるニフェジピンでは全く影響を受けなかった。低濃度 ($\leq 0.1 \text{ nM}$) ET-1 による収縮は SK&F 96365 または LOE 908 の単独投与によりほぼ完全に抑制された。一方、高濃度 ($\geq 1 \text{ nM}$) ET-1 による収縮は、LOE 908 または SK&F 96365 の単独投与により約 30-40% および約 10% まで抑制された。LOE 908 および SK&F 96365 を同時に投与すると収縮はほぼ完全に消失した。また、ET-1 の濃度を高くすると、LOE 908 抵抗性の部分が増加した。

ラット単離平滑筋細胞の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の測定では、高濃度 ET-1 により一過性の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液の Ca^{2+} を除去すると消失した。低濃度および高濃度 ET-1 による $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の増加に対するニフェジピン、SK&F 96365 および LOE 908 の影響を検討した場合にはいずれも収縮とはほぼ同じ結果が得られた。

また、ラット胸部大動脈および単離平滑筋細胞を小胞体の Ca^{2+} ポンプの阻害剤である thapsigargin により前処理した後に Ca^{2+} を添加すると収縮および $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の増加が誘発された。この収縮および $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の増加は SK&F 96365 により完全に抑制されたが、ニフェジピンまたは LOE 908 では影響を受けなかった。

【観察】以上の結果より、ET-1 によるラット胸部大動脈の収縮は、1) 細胞外からの Ca^{2+} 流入に全面的に依存する、2) 電位依存性 Ca^{2+} チャンネルは全く関与しない、3) 3種類の電位非依存性 Ca^{2+} チャンネルを介した Ca^{2+} 流入によるこ

とが明らかとなった。すなわち、低濃度の ET-1 刺激による血管収縮には NSCC-2 のみが関与するが、高濃度の ET-1 刺激による血管収縮には NSCC-1, NSCC-2 および SOCC を介した Ca^{2+} 流入が約 10%, 50-60% および 30-40% の比率で関与することを示した。また、ET-1 の濃度を高くすると SOCC の比率が増加した。

論文審査の結果の要旨

エンドセリン-1 は強力な血管収縮ペプチドであり、その作用には細胞外からの Ca^{2+} イオンの流入が必要である。しかしながら、この Ca^{2+} 流入がどのようなチャンネルを介して生じるのか不明であった。最近、申請者らは、培養血管平滑筋細胞 (A7r5 細胞) において、エンドセリン-1 により 3 種類の電位非依存性 Ca^{2+} チャンネルが活性化されること、また、これらのチャンネルが新しい Ca^{2+} チャンネル遮断薬 (SK&F 96365 および LOE 908) により薬理的に区別できることを示した。本研究では、これらの Ca^{2+} チャンネル遮断薬を用いて、エンドセリン-1 により誘発される血管収縮および細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇に関与する Ca^{2+} チャンネルを薬理的に解析した。その結果、低濃度エンドセリン-1 による収縮および細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇には LOE 908, SK&F 96365 の両方に感受性を有するチャンネル、すなわち、非選択的陽イオンチャンネルタイプ-2 が関与することが分かった。一方、高濃度エンドセリン-1 の場合には、非選択的陽イオンチャンネルタイプ-1 (LOE 908 感受性 /SK&F 96365 抵抗性)、タイプ-2 およびストア作動性カルシウムチャンネル (LOE 908 抵抗性 /SK&F 96365 感受性) が関与することが分かった。

以上の研究はエンドセリンおよび他のアゴニストによる血管収縮の機序の解明に貢献し、血管生理学の発展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 8 月 9 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。