

氏 名	箕 輪 哲 也
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 1863 号
学位授与の日付	平 成 9 年 3 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	Inhibitory effect of nitrovasodilators and cyclic GMP on ET-1-activated Ca^{2+} -permeable nonselective cation channel in rat aortic smooth muscle cells (ラット大動脈平滑筋細胞に於いてエンドセリン-1で誘発される Ca^{2+} 透過性非選択的陽イオンチャネルに対する NO/cGMP の抑制効果に関する研究)
論文調査委員	(主 査) 教 授 成 宮 周 教 授 野 間 昭 典 教 授 眞 崎 知 生

論 文 内 容 の 要 旨

強力な血管収縮ペプチドである Endothelin-1 (ET-1) は、 IP_3 による細胞内 Ca^{2+} ストアからの Ca^{2+} 遊離と、チャネルを介した細胞外からの Ca^{2+} 流入によって、細胞内 Ca^{2+} 濃度を上昇させる。 Ca^{2+} 流入経路に関しては、電位依存性 Ca^{2+} チャネル (VOC) が ET_A 受容体と機能的に共役していることが確立しているが、この他にも、膜電位に関係なくアゴニスト刺激によって直接活性化する非選択的陽イオンチャネルが示唆されている。

内皮由来の血管弛緩因子である一酸化窒素 (NO) は、細胞内で guanylate cyclase を活性化し cyclic GMP の合成を促進する。血管平滑筋細胞において cyclic GMP は、 K^+ チャネルを活性化し、細胞膜を過分極させ間接的に VOC を不活性化することが知られている。しかし、アゴニスト刺激によって誘発される Ca^{2+} 流入も NO および cyclic GMP によって抑制されるという報告があり、非選択的陽イオンチャネルが NO および cyclic GMP によって抑制される可能性が示唆されている。

今回、ET-1 により誘発される非選択的陽イオンチャネルを介した Ca^{2+} 流入に対する NO および cyclic GMP の影響を検討した。実験方法としては、ラットの胸部大動脈から酵素的に単離した血管平滑筋細胞を用いて、蛍光 Ca^{2+} 指示薬である fura-2 による細胞内 Ca^{2+} 濃度の測定と、whole-cell patch clamp による全細胞電流の測定を行った。

2mM Ca^{2+} を含む通常の溶液中では、ET-1 (10^{-8}M) は最初のピークに引き続き持続的な細胞内 Ca^{2+} の上昇を来すが、溶液中から Ca^{2+} を除去すると後半の持続相は消失する。また、VOC の阻害剤である Nifedipine の投与だけでは、持続的な細胞内 Ca^{2+} の上昇は完全には消失しないが、さらに非選択的陽イオンチャネルの阻害剤と考えられる SK&F 96365 を投与することによって完全に消失する。つまり、最初のピークは細胞内ストアからの Ca^{2+} 遊離によるものであり、後半の持続相は VOC と非選択的陽イオン

チャネルを介した細胞外からの Ca^{2+} 流入によるものであることを示している。

ET-1 で誘発される Ca^{2+} 上昇のうち、Nifedipine 抵抗性の後半の持続相、つまり、非選択的陽イオンチャネルを介した Ca^{2+} 流入は、NO ドナーである sodium nitroprusside (SNP) および S-nitroso-N-acetylpenicillamine (SNAP)、さらに、細胞膜透過性 cyclic GMP である 8-bromo-cyclic GMP の投与によって完全に消失した。つまり、NO および cyclic GMP がいずれも非選択的陽イオンチャネルを抑制したと考えられる。

血管平滑筋細胞の膜電位を -60 mV に固定し全細胞電流を記録すると、ET-1 (10^{-8} M) によって持続的な内向き電流が誘発された。この電流は逆転電位がほぼ 0 mV であり、SK&F 96365 と Cd^{2+} によって抑制されることから非選択的陽イオンチャネルによるものであることがわかった。

ET-1 で誘発される持続的な内向き電流は、SNP、SNAP、さらに 8-bromo-cyclic GMP の投与によって可逆的に抑制された。さらに、灌流液中のチャネル透過性陽イオンを Ca^{2+} だけにしても ET-1 により同様の持続的な内向き電流が誘発され、これも、SNP、SNAP、8-bromo-cyclic GMP によって可逆的に抑制された。

以上の結果から、血管平滑細胞において、ET-1 は Ca^{2+} 透過性非選択的陽イオンチャネルを活性化し細胞内への Ca^{2+} 流入を促進するが、このチャネルに対して、NO は cyclic GMP の合成を介して抑制的に作用して、結果的に細胞内への Ca^{2+} 流入を抑制すると考えられる。

論文審査の結果の要旨

本論文は血管平滑筋細胞の Ca^{2+} 透過性非選択的陽イオンチャネルに対する一酸化窒素 (NO) の抑制効果を検討し、NO の血管弛緩機序を明らかにしたものである。NO はアゴニスト刺激によって誘発される血管収縮、および Ca^{2+} 流入を抑制するが、その機序については不明な点が多かった。本研究においては、ラットの胸部大動脈から酵素的に単離した血管平滑筋細胞を用いて、エンドセリン-1 (ET-1) により誘発される非選択的陽イオンチャネルを介した Ca^{2+} 流入に対する NO および cyclicGMP の影響を検討した。細胞内 Ca^{2+} 濃度および全細胞電流の測定により、ET-1 で誘発される非選択的陽イオンチャネルを介した Ca^{2+} 流入は、NO 供与体である sodium nitroprusside および S-nitroso-N-acetylpenicillamine、さらに、細胞膜透過性 cyclicGMP 類似物質である 8-bromo-cyclicGMP の投与によって抑制されることを示した。つまり、NO が cyclicGMP の合成を介して Ca^{2+} 透過性非選択的陽イオンチャネルを抑制することを明らかにした。

以上の研究は、NO の血管弛緩因子としての新しい作用機序を解明したものであり、循環薬理学の研究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 9 年 2 月 4 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。