

氏 名 (本籍) 竹 内 和 久

学 位 の 種 類 医 学 博 士

学 位 記 番 号 医 第 2 1 3 9 号

学 位 授 与 年 月 日 平 成 元 年 9 月 27 日

学 位 授 与 の 要 件 学 位 規 則 第 5 条 第 2 項 該 当

最 終 学 歴 昭 和 57 年 3 月
 東 北 大 学 医 学 部 医 学 科 卒 業

学 位 論 文 題 目 The Cellular Effect of Bredykinin in Cultured
 Rat Vascular Smooth Muscle Cell : A Possible
 Interaction among Phospolipase C, Phospholi-
 pase A₂ and Calcium.

(ブラジキニンの欠陥平滑筋作用機構：ホスホリ
パーゼC, ホスホリパーゼA₂およびカルシウムの
相互作用)

(主 査)

論 文 審 査 委 員 教 授 吉 永 馨 教 授 滝 島 任

教 授 渡 辺 建 彦

論文内容要旨

ブラジキニン (BK) は降圧性脈管作動物質として知られ、高血圧の成因の一部にも関与していると考えられている。また、このBKは内皮依存性の血管弛緩作用を有することが知られている。一方、BK刺激により血管組織より血管弛緩性のプロスタグランジン (PG) が生成されBKの血管弛緩作用の一部に関係していることが示されている。しかしBKの血管作用およびその細胞性作用機構は未だ十分には明らかとなっていない。本研究においては、特にBKの血管平滑筋への直接作用の細胞内機構に焦点をあて検討を加えた。

【目 的】

血管平滑筋におけるBKの細胞作用機構を細胞内作用伝達物質のカルシウム・イオン (Ca^{2+})、イノシトールリン酸 ($InsP$, ホスホリパーゼC代謝産物であり、細胞内 Ca^{2+} 動員のメディエーター) およびプロスタグランジンI (PGI_2) (ホスホリパーゼ A_2 の代謝産物) に対する作用を調べ、それらの相互作用をも合わせて検討すること。

【方 法】

細胞は培養ラット血管平滑筋を用いた。細胞内 Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_i$) は蛍光光度計内に固定した単層培養細胞 (カバーガラス上に培養) にて蛍光 Ca^{2+} インジケイターのFura-2を用いて測定した。また、単層培養細胞を灌流し、細胞内 Ca^{2+} と灌流液中に測定される PGI_2 生成 (ラジオイムノアッセイにて測定) を同時に経時的にモニターし、細胞内 Ca^{2+} と PGI_2 生成の経時的関係を調べた。 $InsP$ の測定は 3H -myo-Inositolでラベルした細胞より抽出した 3H - $InsP$ をカラムクロマトグラフィー法または高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 法にて分離し、その放射活性を測定した。

【結 果】

細胞灌流システムによる検討では、BK ($1.0 \mu M$) およびバソプレシン (AVP, $0.1 \mu M$) にて $[Ca^{2+}]_i$ は瞬時に増加し、さらにその後、増加の持続がみられた。PG合成阻害剤であるアスピリン ($1.0 \mu M$) 処理にてBKによる PGI_2 生成は抑制されたが、 $[Ca^{2+}]_i$ 増加には変化がなかった。BKによる $[Ca^{2+}]_i$ 増加および PGI_2 生成には濃度依存性がみられ、その ED_{50} はほぼ同一であった (BK, 約 $1.0 \mu M$)。さらに細胞内 Ca^{2+} 貯蔵部位よりの Ca^{2+} 動員の阻害剤と考えられるTMB-8にて、BKによる PGI_2 生成は濃度依存性に抑制された。一方、カラムクロマトグラ

フィーによる InsP の測定では、各 InsP すなわち InsP_1 、 InsP_2 および InsP_3 が分離され、それぞれの分画は BK ($1.0 \mu\text{M}$) 刺激にて増加した。また、BK による総 InsP 生成量は濃度依存性に増加した。HPLC による分析結果からは、BK 刺激により瞬時の $\text{Ins}(1, 4, 5) \text{P}_3$ の増加 (5 秒以内) がみられ、 $\text{Ins}(1, 3, 4) \text{P}_3$ の増加がこれに続いた。 $\text{Ins}(1, 3, 4, 5) \text{P}_4$ は漸次増加した。また、 InsP_5 および InsP_6 と考えられるピークが分離されたが、これらは BK 刺激により生成量に変化はなかった。

【考察および結論】

以上より、BK によって PGI_2 生成および細胞内 Ca^{2+} 動員が同時におこることが示された。BK により、細胞内 Ca^{2+} 動員作用を有する $\text{Ins}(1, 4, 5) \text{P}_3$ 生成がもたらされることより、BK による細胞内 Ca^{2+} 増加には、 $\text{Ins}(1, 4, 5) \text{P}_3$ 生成が一部に関与しているものと考えられる。また PG 生成成阻害剤によって、BK による PG 合成は抑制されるが細胞内 Ca^{2+} 増加には変化がないことより、細胞内 Ca^{2+} 増加は PG によってもたらされるのではないと考えられる。本研究によって示されたように細胞内 Ca^{2+} 動員の抑制剤の TMB-8 によって BK による PG 生成が抑制されたこと、また一方、PG 生成の前駆体のアラキドン酸が Ca^{2+} 依存性のホスホリパーゼ A_2 の活性化により細胞膜より放出されることを考慮すると、結論として、ホスホリパーゼ C 代謝産物である $\text{Ins}(1, 4, 5) \text{P}_3$ 生成が BK により生じ、これが細胞内 Ca^{2+} 動員をおこす。さらにこの Ca^{2+} 動員が、PG 生成に関与する Ca^{2+} 依存性ホスホリパーゼ A_2 に Ca^{2+} を供給することによりアラキドン酸が放出され、それが BK による PGI_2 生成をもたらす可能性が考えられる。この現象の生理的意義としては、平滑筋収縮の細胞内メディエーターの Ca^{2+} および弛緩のメディエーターの PGI_2 の、二つの系の相互作用により BK の平滑筋生理活性が発現しているものと解釈された。

審査結果の要旨

筋収縮の細胞内メカニズムが解明されつつあるが、平滑筋は随意筋と異り、その収縮機構はより複雑であり、なお多くの研究の余地を残している。竹内和久は、ラットの血管平滑筋を培養し、その収縮機構を系統的に研究しているが、今回はブラジキニンの作用につき研究したところを論文としてまとめた。

細胞内 Ca^{++} はFura₂法によった。血管平滑筋はカバーグラス上に培養した。培養細胞を灌流し、灌流液中に遊離してくる PGI_2 をRIA法で測定した。イノシトールリン酸 (Ins P) はカラムクロマトグラフィーまたは高速液体クロマトグラフィー (HPLC) にて分離・測定した。

ブラジキニンおよびバゾプレシンは細胞内 Ca^{++} を増加させ、 PGI_2 の産生を増やした。アスピリンによって PGI_2 の産生を抑制しても細胞内 Ca^{++} の増加は変らなかった。ブラジキニンによってIns P₁, Ins P₂, Ins P₃が増加した。Ins (1, 4, 5)P₃が最初の5秒以内に増加し、Ins (1, 3, 4)P₃の増加がこれに続いた。Ins (1, 3, 4, 5)P₄は漸次増加した。Ins P₅およびIns P₆と考えられるピークが分離されたが、これらはブラジキニン刺激によって変化しなかった。

以上の結果から、ブラジキニンはIns (1, 4, 5)P₃の生成を介して細胞内 Ca^{++} を動員するものと考えられた。細胞内 Ca^{++} の動員によってフォスホリパーゼA₂が活性化され、アラキドン酸が遊離し、 PGI_2 合成に至るものと解釈された。

竹内和久のこの研究は、ブラジキニンの作用機序を詳細に分析したものであり、血管平滑筋収縮の細胞内機序について新しい知見を加えたものである。よってこの研究は充分学位に相当するものと認めたい。