

氏 名 (本籍) おお るい たかし
大 類 孝

学 位 の 種 類 博 士 (医 学)

学 位 記 番 号 医 第 2 4 2 2 号

学 位 授 与 年 月 日 平 成 4 年 2 月 2 6 日

学 位 授 与 の 条 件 学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当

最 終 学 歴 昭 和 5 9 年 3 月 2 7 日
東 北 大 学 医 学 部 医 学 科 卒 業

学 位 論 文 題 目 Histamine N-methyltransferase controls the
contractile response of guinea pig trachea
to histamine
(モルモットのヒスタミンによる気道収縮反応
に対するヒスタミンNメチル基転移酵素によ
る調節)

(主 査)

論 文 審 査 委 員 教 授 瀧 島 任 教 授 本 宮 雅 吉

教 授 佐 々 木 英 忠

論文内容要旨

【目的】

ヒスタミンは、アレルギー反応の化学伝達物質の1つとして重要な役割を演じており、気道過敏性を評価する際、臨床上吸入試験も行われている。しかし、これまで、気道におけるヒスタミンの代謝ならびにヒスタミン分解酵素の局在および病態生理学的意義に関する報告は、極めて稀である。哺乳動物では、ヒスタミンの代謝経路として、ヒスタミンNメチル基転移酵素（HMT）によるメチル化経路と、ジアミン酸化酵素（DAO）による酸化経路の二経路が知られており、どちらが主かは、種差、組織差が著しいといわれている。今回、私は、モルモットの気管を摘出し、気道におけるヒスタミンの分解酵素を同定し、定量化し、酵素抑制剤を用いて気道平滑筋の収縮反応に対するヒスタミン分解酵素の役割について明らかにし、また、その局在について検討を加え報告する。

【方法ならびに結果】

- (1) ヒスタミンの気道収縮反応に対する酵素阻害剤の効果：雄のハートレイモルモット（ $n=7$ ）をベントバルビタールで麻酔後と殺し気管を摘出後、4 mm の長さに切り出し、クレブスヘンゼライト液で満たしたチャンバーに入れ、ゲージにつるして連続的に等尺性張力を記録した。初めに、ヒスタミン $2 \times 10^{-6} \text{M}$ に対する張力を求め、それを基準にして、種々の濃度の HMT および DAO の阻害剤（SKF91488 および アミノグアニジン）で 20 分間インキュベートした後、再び $2 \times 10^{-6} \text{M}$ のヒスタミンに対する張力を求め、基準値に対する % で表現をし作図した。その結果、HMT の阻害剤である SKF91488 処理群で、濃度依存性にヒスタミンに対する収縮反応が増強された。最大効果は、SKF91488 10^{-4}M で認められた。一方、DAO の阻害剤であるアミノグアニジン処理群では、コントロールに比して変化は認められなかった。次に、ヒスタミンの容量反応曲線に対する SKF91488 およびアミノグアニジンの効果を検討した。即ち、初めに $10^{-9} \text{M} \sim 3 \times 10^{-4} \text{M}$ までのヒスタミンに対する気管切片の張力を測定し、容量反応曲線を作製し、次に 10^{-4}M の SKF91488 もしくはアミノグアニジンで 20 分間インキュベートした後、2 度目の容量反応曲線を作製した（ $n=7$ ）。その結果、SKF91488 処置後では、およそ 1.1 log unit ほど容量反応曲線が左に shift しており、これは統計学的に有意であった。即ち、ヒスタミンに対する過敏性の亢進が認められた。一方、アミノグアニジン処置群では変化は認められなかった。同様に、気道上皮をはく離させた気管切片でもヒスタミンに対する容量反応曲線を作製し、過敏性の亢進が示された。

- (2) モルモットの気管におけるヒスタミン分解酵素の定量：雄のハートレイモルモットをペントバルビタールで麻酔後開胸し、心臓にカニューレーションし、生理食塩水でかん流し脱血する。その後、気管を摘出しミンチした後冷却したPH7.4のリン酸ナトリウム緩衝液に入れてホモジェナイズし、4℃1万gで遠心しその上清を用いてHMTおよびDAO活性を測定した。HMT活性はヒスタミンを基質とし、緩衝液中で2時間インキュベートし、生成されたメチルヒスタミンをHPLC法を用いて分離し、蛍光吸光度計を用いて定量し、単位蛋白量あたりの活性を算出した。一方、DAO活性は、ヒスタミンを基質とし、生成されたH₂O₂を比色法で定量化した。その結果、モルモットの気管では、HMTが45 pmol/min/mg proteinと活性を示したが、DAO活性は検出されなかった。
- (3) モルモット気管におけるHMT mRNAの局在：方法(1)と同様に、モルモットの気管を摘出後、液体窒素に入れて固定し、10μmに切り出し、ジゴキシゲニンをラベルしたオリゴヌクレオチドプローブを用いて、in situ hybridizationを行いHMT mRNAの検出を行った。その結果、HMT mRNAが主に気道上皮に一部は血管内皮に認められた。

【考 察】

今回の一連の研究によって、モルモットの気道では、ヒスタミンは主にヒスタミンNメチル基転移酵素によるメチル化機構によって代謝されていることが示され、また、HMTはヒスタミンを代謝することによってヒスタミンに対する気道平滑筋の収縮反応を調節しうること、その局在は主に気道上皮にあることが示された。これまで、気道上皮のはく離による気道過敏性亢進のメカニズムとして、EDRF (epithelial derived relaxing factor) の減少などが考えられていたが、今回の結果によって、上皮のはく離に伴うHMT活性の消失が、気道過敏性亢進の新たなメカニズムとして考えられた。気管支喘息や気管支炎の際に気道過敏性が亢進し、気道上皮のはく離が認められるが、これらの病態にHMT活性の低下が関与している可能性が示唆された。

審査結果の要旨

ヒスタミンは、アレルギー反応等における重要な化学伝達物質の1つとして、古くから研究され、呼吸器の分野では気道平滑筋の収縮作用が注目されてきた。しかし、これまで気道におけるヒスタミンの代謝に関する研究は、きわめて稀であった。本研究で、論文提出者は、3つの観点から気道におけるヒスタミンの代謝を明らかにした。即ち、まず第一に、モルモットの気管切片をオーガンバスにつるし、種々の濃度のヒスタミンで収縮させその時生じる等尺性張力を測定し、用量反応曲線を作製した。そこで、ヒスタミン代謝の二大経路の担い手であるジアミン酸化酵素もしくはヒスタミンNメチルトランスフェラーゼ（HMT）の特異的阻害剤で前処置することにより、容量反応曲線がシフトするか否かによって実際にヒスタミンの分解に携さわっている酵素を同定した。その結果、モルモットの気道では、HMTがヒスタミンの分解に主として関与していることが明らかにされ、ヒスタミンに対する気道収縮反応を調節していることが示された。これまで、HMTの生理学的意義については全く知られていなかったことから、極めて画期的な発見と考えられる。第二に、ヒスタミンを基質として、気道における酵素活性を定量化し、他臓器との比較を可能にした。第三に、*in situ hybridization*法で、HMTのmRNAの局在を明らかにし、その活性が主として気道上皮に存在することを明らかにした。これまでは、気道においては、その局在は全く不明であったが、本研究によりヒスタミンの代謝における気道上皮の重要性が明らかにされた。実際、論文提出者は、気道上皮はく離群と上皮のintactな気道を比較し上皮はく離群でヒスタミンに対する反応が亢進することを示した。これは、気道上皮のはく離に伴う気道過敏性の亢進のメカニズムを考える上で重要な知見と考えられる。即ち、気道上皮は、外的刺激からの物理的バリアとしての役割のみならず、経気道的投与によるヒスタミンや、抗原抗体反応時や種々の刺激で肥満細胞より放出されるヒスタミンを分解し、気道の収縮反応を調節し得ることを証明した。临床上、気道過敏性を評価する際、ヒスタミンの吸入試験はしばしば行われておりその気道における代謝は極めて重要な問題でその解明を試みた本研究は、極めて有意義である。また、気管支喘息や気管支炎などでは病理学的に、気道上皮のはく離がしばしば認められており、本研究は、今後、気管支喘息をはじめとする閉塞性気道病変の病態解明ならびに治療に関して、有用な新しい知見を与えられるものであり、学位授与に値すると考えられる。