

論 文 内 容 要 旨

気道平滑筋は気管や気管支の構造の維持にあずり、その収縮は気管支喘息の病態を特徴づけるものとして重要である。しかし、概して気道平滑筋に対する生理学的知見は乏しく、混乱している状態である。

本研究では、ウシとモルモットの気管平滑筋でパッチクランプ法を用い、電気生理学的立場から脱分極-収縮という関係が成り立つのか、種々の収縮物質を用いて収縮と膜電位の関係を検討した。また、時に観察される自発性の一過性の外向き電流 (spontaneous transient outward currents : STOCs) から、膜の電気現象に及ぼす細胞内の Ca^{2+} 動員の関係について検討した。

Whole-cell configuration で、電流固定法により膜電位の変化を観察すると、気道平滑筋の収縮物質であるテトラエチルアンモニウム (TEA)、アセチルコリン (ACh)、ヒスタミン (HA)、エンドセリン (ET) は、TEA、ACh が膜を脱分極させるのに対し、HA、ET は膜を過分極させ、ET は小さなコンダクタンスで、細胞内の Ca^{2+} に感受性を持たない遅延整流型 K^+ チャネルを開いて、HA による膜過分極をさらに増強させる傾向を示した。従って、脱分極-収縮という関係はアゴニスト単位で個別に考慮されるべきであると考えられた。また、等尺性張力測定で、ET を、それだけでは直接収縮しない低濃度で処理しておく、処理しない場合と比べて HA による収縮は増強した。

STOCs は、1) 電位依存性である、2) Ca^{2+} 感受性がある、3) K^+ チャネル阻害薬である TEA に感受性がある、4) STOCs と同期して膜が過分極を繰り返す、という特性を示した。これは、大きなコンダクタンスを持ち、 Ca^{2+} 依存性のある K^+ チャネル (K_{Ca} チャネル) を介した K^+ 電流であり、細胞内からの Ca^{2+} の放出で活性化されることを示している。STOCs は普通にはおよそ 16% の細胞で観察されたが、ピペットの中にイノシトール 1,4,5-三リン酸 (IP_3) を 10-20 μM 加えると、およそ 70% で観察された。従って、STOCs は平滑筋内で生成された IP_3 を介して生じると考えられた。シクロオキシゲナーゼ阻害薬であるインドメタシンを投与すると STOCs は減弱するが、ピペットの中に IP_3 を入れておくと STOCs の抑制効果は見られなくなり、平滑筋細胞で普段 IP_3 を生成しているのはアラキドン酸のシクロオキシゲナーゼ代謝産物が考えられた。収縮をおこす ACh、カルバコール (CCh) も弛緩をおこすカフェインも STOCs を一過性に増強させた後抑制した。 Ca^{2+} イオノフォアのイオノマイシンを投与すると、若干活性化された後抑制される。このことは、刺激により細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) が上昇すると、 K_{Ca} チャネルが活性化され STOCs は増強するが、過度に上昇した $[\text{Ca}^{2+}]_i$ は、 IP_3 誘発性の Ca^{2+} 放出に対して、negative feedback に作用することを示唆した。HA は、抑制効果を示すことなく

STOCsを増強させた。HAは、コリン作働性物質と比べてIP₃生成量が少ないとの報告があり、生じた[Ca²⁺]_iがnegative feedbackに作用するほど十分に上昇していないと考えられた。

収縮物質のACh、HAも弛緩物質のカフェインもSTOCsを一時的にでも活性化した。従って、STOCsを生じるIP₃を介したCa²⁺の放出は、収縮、弛緩とは直接関係ないと考えられる。収縮の由来となるCa²⁺を検討する目的で等尺性張力を測ると、細胞外のCa²⁺をEGTAでキレートすると、TEA、ACh、HAはいずれも収縮を示さないが、次にCa²⁺を細胞外から投与すると、いずれも収縮した。従って、収縮には細胞外からの流入によるCa²⁺が関与していると考えられた。

また、イソプロテレノールはSTOCsを抑制した。イソプロテレノールを含むβ-agonistは細胞内cAMPの上昇を介して気道平滑筋を弛緩することが知られている。細胞内をIP₃で灌流するとβ-agonist、CPT-cAMP+IBMX、アミノフィリンは、逆にSTOCsを強く活性化した。これは、IP₃により遊離したCa²⁺が存在すればcAMPはK_{Ca}チャンネルの活性化をおこすこと、cAMPは同時に、アラキドン酸代謝産物によるIP₃の生成を抑制することを示している。

今までには脱分極-収縮の関係に一定した知見が得られていなかったが、上記の結果は、必ずしも関係しないとの結論をはっきり示している。また、平滑筋のSTOCsは今までに血管、腸管、気道での報告があるが、STOCsをおこす細胞内のCa²⁺放出がIP₃を介することを明確に示し、さらにIP₃生成の由来にまで検討した研究は、全平滑筋を含めて本研究が初めてである。また、本研究は、気道平滑筋でのIP₃を介したCa²⁺放出が最大張力の発生とは直接関係しないことを初めて示している。以上の結果は気道平滑筋の収縮を直接の原因とする気管支喘息の治療に関連して意義のあるものと考えられる。

審査結果の要旨

気道平滑筋は気管支の主要構成成分の1つでその構造の維持にあずかるとともに、その収縮は気管支喘息の病態を特徴づけるものであり、気道平滑筋細胞に関する知見は極めて重要である。しかしながら、概して気道平滑筋に関する細胞生物学的知見は乏しく、気道平滑筋に対する知識の多くは血管平滑筋や腸管平滑筋によるものから類推されているのが現状である。

本研究では、ウシとモルモットの気管平滑筋細胞で、パッチクランプ法を用いて主として電気生理学的立場から収縮と膜電位の関係を観察し、種々の収縮物質で脱分極-収縮という関係が成り立つのか検討している。また、時に観察される自発性の一過性の外向き電流 (spontaneous transient outward currents : STOCs) から、膜の電気現象に及ぼす細胞内の Ca^{2+} 動員の関係について検討している。

検討の結果、次の事柄が明らかにされた。1) 気道平滑筋の収縮物質であるテトラエチルアンモニウム (TEA), アセチルコリン (ACh), ヒスタミン (HA), エンドセリン (ET) は, TEA, ACh が膜を脱分極させるのに対し, HA, ET は膜を過分極させた。ET は HA による膜過分極をさらに増強させる傾向を示した。脱分極-収縮という関係はアゴニスト単位で個別に考慮されるべきである。2) さらに等尺性張力を測定すると, ET は, それだけでは直接収縮させない低濃度で HA による収縮を増強させる。3) STOCs は K 電流で, IP_3 を介した細胞内プールからの Ca^{2+} 放出により生じる。また細胞内の IP_3 の生成には, アラキドン酸のシクロオキシゲナーゼ代謝産物の関与が示唆される。4) 収縮をおこす ACh, カルバコール, HA, 弛緩をおこすカフェインはいずれも STOCs を一時的にでも活性化した。従って, STOCs を生じる IP_3 を介した Ca^{2+} 放出は収縮, 弛緩とは直接関係ないと考えられる。5) ウシ, モルモットの気管平滑筋では, 収縮には主として細胞外からの流入による Ca^{2+} が関与している。

従来の報告では、気道平滑筋で細胞膜の脱分極-収縮の関係に一定した知見が得られていなかったが、本研究では必ずしも細胞膜の脱分極が平滑筋の収縮と直接的に関連しないことを明確に示した。更に、平滑筋の STOCs は従来血管、腸管、気道でその存在は知られていたが、STOCs を生じる機序が IP_3 を介した細胞内の Ca^{2+} 放出であることを明確に示し、加えてその IP_3 生成の由来にまで言及した研究は、全平滑筋を含めて本研究が初めてである。また、本研究は、気道平滑筋での IP_3 を介した Ca^{2+} 放出が最大張力の発生とは直接関係しないことを初めて示している。以上の結果は気道平滑筋の収縮を直接の原因とする気管支喘息の新しい治療法の開発に関連して極めて重要な新しい知見であり、本論文は、学位論文に充分値すると考えられる。