

氏 名 (本籍) し 清 みず 水 まさ 雅 ゆき 行

学 位 の 種 類 博 士 (医 学)

学 位 記 番 号 医 博 第 1 4 0 1 号

学 位 授 与 年 月 日 平 成 9 年 9 月 10 日

学 位 授 与 の 条 件 学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当

研 究 科 専 攻 東 北 大 学 大 学 院 医 学 系 研 究 科
(博 士 課 程) 外 科 学 系 専 攻

学 位 論 文 題 目 Ca^{2+} influxes and force in porcine coronary
arterial smooth muscle under the depletion of
intracellular Ca^{2+} stores.

(ブタ冠動脈平滑筋における細胞内カルシウムス
トア枯渇時のカルシウム流入および張力の検討)

(主 査)

論 文 審 査 委 員 教 授 田 林 暁 一 教 授 丸 山 芳 夫

教 授 白 土 邦 男

論文内容要旨

研究目的

近年非興奮性細胞において、細胞内カルシウムストアが枯渇すると細胞膜からのカルシウム流入が促進されるという、capacitative Ca^{2+} entry 機構の存在が報告されている。本研究は、ブタ冠動脈標本を用いて細胞内カルシウム濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) および血管張力の同時測定を行うことにより、capacitative Ca^{2+} entry 機構がブタ冠動脈平滑筋においても存在するか否かを検討し、さらにカルシウム流入機構、特に receptor-operated Ca^{2+} channel を通じての流入機構と発生張力に及ぼす細胞膜電位の状態等の影響を解明することを目的に行った。

研究結果

ブタ摘出心の冠動脈より血管リング標本を作成し fura-2 を負荷した後、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ と張力の同時測定を行った。Ryanodine ($30 \mu\text{M}$) と caffeine (25mM)、あるいは thapsigargin ($3 \mu\text{M}$) の処置によって細胞内カルシウムストアを完全に枯渇させ、細胞内カルシウム濃度変化がカルシウム流入を反映する状態で、細胞外液 Ca^{2+} 濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_o$)、 K^+ 濃度 ($[\text{K}^+]_o$) 等の種々の条件を変化させ、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ と張力に対する影響を経時的に観察した。 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の resting level は $[\text{Ca}^{2+}]_o$ の増加と共に上昇したが、細胞内カルシウムストアの activity の有無による差異は認めず、L-type Ca^{2+} channel を完全に遮断する用量の nifedipine ($0.1 \mu\text{M}$) によっても抑制は軽度であった。従って resting の状態においては、カルシウム流入は主に nifedipine 非感受性の経路によると考えられ、capacitative Ca^{2+} entry 機構は認められなかった。

ストアの枯渇後に histamine ($30 \mu\text{M}$) によって惹起されたカルシウム流入 (peak $[\text{Ca}^{2+}]_i$) には、voltage-dependent Ca^{2+} channel である L-type Ca^{2+} channel を経由する nifedipine 感受性のコンポーネントと、抑制されない nifedipine 非感受性の receptor-operated Ca^{2+} channel を経由するコンポーネントに区別されたが、共に capacitative Ca^{2+} entry による増加は認めなかった。後者のカルシウム流入は、nifedipine 存在下においても $[\text{Ca}^{2+}]_o$ の増加と共に増加した。また $[\text{K}^+]_o$ の増加に伴う脱分極によってむしろ抑制され、逆に K^+ channel opener の levromakalim ($3 \mu\text{M}$) 投与で生じる過分極によって増加する傾向を示した。この際の発生張力のカルシウム感受性は、過分極側から脱分極側へ進むに従って亢進した。

以上の結果より、ブタ血管平滑筋細胞においては非興奮性細胞と異なり、細胞内カルシウムストアの枯渇に起因する有為なカルシウム流入の増加は、resting 状態および agonist の histamine 存在下のいずれでも認められず、capacitative Ca^{2+} entry 機構は存在しないと考えられ

た。また、histamineを作用させた際のカルシウム流入経路は voltage-dependent Ca^{2+} channel すなわち L-type Ca^{2+} channel に加え、receptor-operated Ca^{2+} channel の関与が大きいことが示された。後者は nicardipine で抑制されず、さらに K^+ channel opener による過分極効果によってむしろ促進されることが示された。

研究の意義・独創的な点

$[\text{Ca}^{2+}]_i$ と張力の同時測定は、血管平滑筋におけるカルシウム動態の解明に有用な実験方法である。本研究では、この方法とカルシウムストア枯渇法を併用することにより、ブタ冠動脈平滑筋には capacitative Ca^{2+} entry 機構が存在しないことが明らかにされた。また、receptor-operated Ca^{2+} channel に対する K^+ channel opener による過分極効果を検討した報告もこれまでに無く、本研究によって冠動脈平滑筋におけるカルシウム流入の性質とその張力発生機構がより明らかにされた。

審査結果の要旨

本研究は、ブタ冠動脈を用いて細胞内カルシウム濃度および血管張力の同時測定を行うことにより、capacitative Ca^{2+} entry 機構がブタ冠動脈平滑筋においても存在するか否かを検討し、さらにカルシウム流入機構、特に receptor-operated Ca^{2+} channel を通じての流入機構と発生張力に及ぼす細胞膜電位等の影響を解明することを目的に行ったものである。

本研究では ryanodine と caffeine, あるいは thapsigargin によって細胞内カルシウムストアを完全に枯渇させ、細胞内カルシウム濃度変化がカルシウム流入のみを反映する状態で、細胞膜電位等の種々の条件を変化させた際の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ と張力に対する影響を観察した。

$[\text{Ca}^{2+}]_i$ の resting level は $[\text{Ca}^{2+}]_o$ の増加と共に上昇したが、細胞内カルシウムストアの activity の有無による差異は認めず、L-type Ca^{2+} channel を完全に遮断する用量の nicardipine によっても抑制は軽度であった。従って resting の状態においては、カルシウム流入は主に nicardipine 非感受性の経路によると考えられ、capacitative Ca^{2+} entry 機構は存在しないことが示された。また、ストアの枯渇後に histamine によって惹起されたカルシウム流入には、voltage-dependent Ca^{2+} channel である L-type Ca^{2+} channel を経由する nicardipine 感受性のコンポーネントと、抑制されない nicardipine 非感受性の receptor-operated Ca^{2+} channel を経由するコンポーネントに区別されたが、共に capacitative Ca^{2+} entry による増加は認めなかった。後者は、nicardipine 存在下においても $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の増加と共に増加した。また $[\text{K}^+]_o$ の上昇に伴う脱分極によってむしろ抑制され、逆に K^+ channel opener の levromakalim 投与で生じる過分極によって増加する傾向を示した。この際の発生張力のカルシウム感受性は、過分極側から脱分極側へ進みに従って亢進した。

以上より、ブタ血管平滑筋細胞においては非興奮性細胞と異なり、resting 状態および agonist の histamine 存在下のいずれでも capacitative Ca^{2+} entry 機構は存在しないことが示された。また、histamine を作用させた際のカルシウム流入経路としては voltage-dependent Ca^{2+} channel すなわち L-type Ca^{2+} channel に加え、receptor-operated Ca^{2+} channel の関与が大きいこと示された。後者は nicardipine で抑制されず、さらに K^+ channel opener による過分極効果によってむしろ促進されることが示された。

本研究でブタ冠動脈平滑筋に capacitative Ca^{2+} entry 機構が存在しないことが示され、さらに K^+ channel opener の過分極効果による receptor-operated Ca^{2+} channel に及ぼす影響とその張力に対する効果等が明らかにされたことは学問的意義があり、従って学位論文として妥当であると判断した。