



Augmented receptor-mediated Ca^{2+} mobilization causes supersensitivity of contractile response to serotonin in atherosclerotic arteries

三輪, 陽一

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1996-03-07

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙1998

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2001998>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏名・（本籍）	三輪陽一（兵庫県）
博士の専攻分野の名称	博士（医学）
学位記番号	博ろ第1498号
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位授与の日付	平成8年3月7日
学位論文題目	Augmented receptor-mediated Ca^{2+} mobilization causes supersensitivity of contractile response to serotonin in atherosclerotic arteries (動脈硬化血管でのセロトニンの過剰収縮は平滑筋細胞の受容体依存性のカルシウム動員の亢進によって惹起される)
審査委員	主査 教授 横山 光宏 教授 岡田 昌義 教授 尾原 秀史

論文内容の要旨

[序文]

冠動脈攣縮は異型狭心症をはじめとして、不安定狭心症、急性心筋梗塞などの種々の虚血性心疾患の病因、病態に重要な役割を果たしている。動脈硬化血管では、セロトニン(5-hydroxytryptamine [5-HT])、エルゴノビン、ヒスタミン等のある特定の収縮物質に対して血管収縮反応が亢進していることが知られており、この機序として、血管平滑筋細胞と血管内皮細胞の機能異常、すなわち、動脈硬化または血管を取り巻く脂質環境の変化によって生じる冠動脈平滑筋の収縮反応の亢進と内皮依存性拡張反応の低下が考えられている。

平滑筋細胞においては、受容体依存性の細胞内カルシウム(Ca^{2+})の動員、即ち筋小胞体よりの Ca^{2+} 遊離とそれに引き続く細胞外からの Ca^{2+} 流入によって血管収縮が生じることが知られており、この細胞内 Ca^{2+} 濃度が平滑筋の収縮弛緩を調節している。しかし最近、受容体刺激薬が平滑筋収縮タンパク質の Ca^{2+} 感受性を調節するという機構の存在が明らかになった。

本研究では、動脈硬化血管平滑筋での5-HTに対する収縮反応の亢進に、細胞内 Ca^{2+} 濃度あるいは Ca^{2+} 感受性の調節機構がどのように関与しているかを明らかにするために、血管の張力と平滑筋細胞内 Ca^{2+} 濃度を同時に測定し検討した。

[方法]

1. 実験動物

実験には8～15か月齢（平均11.8か月齢）の遺伝性高脂血症家兎（WHHL家兎）を用い、対照としての日本白色家兎と比較検討した。

2. 摘出血管条片での等尺性張力と平滑筋細胞内 Ca^{2+} 濃度の同時測定

静脈麻酔下に家兎の下行胸部大動脈を摘出し、幅約2mmの輪状血管条片を作製し、WHHL家兎では粥状硬化病変を肉眼的に血管内膜面に約50%認める血管条片を実験に用いた。血管条片はすべて内膜擦過により内皮を剥離し、実験終了後、顕微鏡下でその剥離を確認した。血管平滑筋細胞内の遊離

Ca²⁺濃度は蛍光色素fura 2を用い、fura 2-Ca²⁺シグナルを測定すると同時に血管標本の等尺性張力を測定した。細胞内Ca²⁺濃度はGrynkiewiczらの計算式により求めた。

まず、高カリウム刺激(72.7mM)による収縮を観察し、洗浄後5-HT(0.1nM-10 μM)及びフェニレフリン(PE, 3nM-30 μM)を累積的に投与し各々の細胞内Ca²⁺濃度変化と収縮反応を観察した。一部の実験ではカリウム刺激(5.4, 15.0, 24.6, 72.7mM)による濃度反応関係を求めた。実験結果は72.7 mM K⁺投与時の張力と細胞内Ca²⁺濃度をそれぞれ100%として表示した。

3. 5-HT受容体サブタイプの同定

さらに、5-HTによる収縮にどのサブタイプの5-HT受容体が関与しているかを調べるために、5-HT₂受容体拮抗薬ケタンセリンの5-HT収縮に及ぼす影響と、5-HT₁-like受容体刺激薬5-carboxa midotryptamine(5-CT)による収縮反応をWHHL家兎と正常家兎とで比較検討した。

[結果]

1. 静止時と高カリウム刺激時における平滑筋細胞内Ca²⁺濃度

静止時における平滑筋細胞内Ca²⁺濃度は正常群で148±7nM, WHHL群で148±21nMと両群間で差異を認めず、高カリウム(72.7mM)刺激時における平滑筋細胞内Ca²⁺濃度もそれぞれ2363±166 nM, 2180±171nMと両群間で差を認めなかった。

2. 等尺性張力と平滑筋細胞内Ca濃度

高カリウム(72.7mM)刺激時における等尺性張力は正常群で1.0±0.1 g, WHHL群で0.9±0.1 g と両群間で差異を認めなかった。

WHHL群における5-HTに対する張力の濃度反応曲線は、正常群に比し左上方に偏位しており、即ちWHHL群の反応閾値とone-half maximally effective dose(ED₅₀)は正常群に比し有意に低下していた。(閾値: 28±9vs83±7 nM; ED₅₀: 251±45vs627±96 nM)。加えて、WHHL群と正常群の5-HTによる最大収縮反応は高カリウム(72.7mM)収縮の123±17%, 33±7%, とWHHL群で約4倍亢進していた。平滑筋細胞内Ca²⁺濃度の反応曲線についても同様にWHHL群において曲線は左上方に偏位しており(閾値: 8.7±2.5vs61±7 nM; ED₅₀: 100±22vs244±28nM), WHHL群と正常群の最大反応もそれぞれ高カリウム(72.7 mM)刺激による細胞内Ca²⁺濃度上昇の29±4%, 10±0.9%とWHHL群で約3倍亢進していた。以上より、5-HTによる平滑筋細胞内Ca²⁺濃度の上昇は収縮反応の亢進と平行して増強していることが判明した。

一方、PEに対する張力及び細胞内Ca²⁺濃度の濃度反応曲線は両群で有意な差を認めなかった。

3. 平滑筋収縮蛋白のCa²⁺感受性

平滑筋収縮蛋白のCa²⁺感受性の変化を検討するために両群で細胞内Ca²⁺濃度-張力関係を求めた。いずれの群においても5-HTとPE刺激による直線の勾配は高カリウム刺激に比べて大であり、5-HT及びPEは収縮蛋白のCa²⁺感受性を亢進させることが示された。しかし、WHHL群の5-HT刺激時の直線の勾配は正常群と同じであり、動脈硬化血管の5-HTに対する収縮蛋白のCa²⁺感受性は正常血管に比し亢進していないことが示された。PE刺激時の収縮蛋白のCa²⁺感受性も両群間で差異を認めなかった。

4. 5-HT₂受容体拮抗薬及び5-HT₁-like受容体刺激薬の効果

5-HT₂受容体拮抗薬のケタンセリン(0.01-1 μM)は正常群での5-HTによる収縮を競合的に抑制したが、WHHL群では抑制しなかった。一方、5-HT₁-like受容体刺激薬の5-CT(0.1-1 μM)は5-HTと同様にWHHL群で収縮反応の亢進を示した。

[考察]

本研究により、(1)WHHL家兎の大動脈中膜平滑筋において5-HTによる収縮反応の亢進には平滑筋細胞内の Ca^{2+} 濃度上昇の亢進を伴う、(2)細胞内 Ca^{2+} 濃度-張力関係よりWHHL家兎の5-HT刺激における収縮蛋白の Ca^{2+} 感受性は正常家兎に比し亢進していない、(3)ケタンセリンは正常家兎大動脈における5-HTによる収縮を競合的に抑制したが、WHHL家兎においては抑制せず、さらにWHHL家兎大動脈は5-HTと同様に5-CTによる収縮反応の亢進をきたすことが示された。以上より、動脈硬化血管における5-HTの収縮反応の亢進は収縮蛋白の Ca^{2+} 感受性の亢進によるのではなく、5-HT受容体を介した平滑筋細胞内 Ca^{2+} 動員の亢進によることが明らかにされ、また、5-HTによる収縮には正常血管では5-HT₂が受容体が、動脈硬化血管では5-HT₁-like受容体が主として関与していることが示された。

これまでの動脈硬化血管での5-HTの収縮反応亢進については血管内皮細胞の機能異常に関する報告が中心であったが、今回の研究で動脈硬化血管では血管平滑筋自身が5-HTに対する感受性の亢進を示すことが明らかにされた。また、平滑筋細胞内 Ca^{2+} 濃度-張力関係を調べるために、intactな平滑筋の細胞内 Ca^{2+} 濃度と張力を同時測定するという最近開発された方法を用い、WHHL家兎大動脈における5-HTの収縮反応の亢進は収縮蛋白の Ca^{2+} 感受性の亢進によるものではないことを明らかにした。

WHHL家兎大動脈において細胞内 Ca^{2+} 動員が亢進している機序の詳細は不明であるが、細胞膜5-HT受容体を介した細胞内情報伝達系の異常が関与していると考えられる。本研究で、5-HTによる収縮には正常血管においては5-HT₂受容体が、動脈硬化血管においては5-HT₁-like受容体が主として関与していることが示され、動脈硬化血管における5-HTの収縮反応亢進機序として動脈硬化による5-HT受容体の変化が重要である可能性が示された。

以上、家兎大動脈標本の張力と平滑筋細胞内遊離 Ca^{2+} 濃度を同時に測定し、動脈硬化血管における5-HTの収縮反応の亢進が5-HT受容体を介した平滑筋細胞内 Ca^{2+} 動員の亢進によることを明らかにした。

論文審査の結果の要旨

冠動脈攣縮は異型狭心症をはじめとして、不安定狭心症、急性心筋梗塞などの種々の虚血性心疾患の病因、病態に重要な役割を果たしている。動脈硬化血管では、セロトニン(5-hydroxytryptamine [5-HT])、エルゴノビン等のある特定の収縮物質に対して血管収縮反応が亢進していることが知られており、この機序として、血管平滑筋細胞と血管内皮細胞の機能異常、すなわち、動脈硬化または脂質環境の変化によって生じる冠動脈平滑筋の収縮反応の亢進と内皮依存性拡張反応の低下が考えられている。

平滑筋細胞の収縮は、受容体依存性の細胞内カルシウム(Ca^{2+})の動員、即ち筋小胞体よりの Ca^{2+} 遊離とそれに引き続く細胞外からの Ca^{2+} 流入によって生じることが知られており、この細胞内 Ca^{2+} 濃度が平滑筋の収縮弛緩を調節している。しかし最近受容体刺激薬が平滑筋収縮タンパク質の Ca^{2+} 感受性を調節するという機構の存在が明らかになった。

本研究では、動脈硬化血管平滑筋での5-HTに対する収縮反応の亢進に、細胞内 Ca^{2+} 濃度あるいは Ca^{2+} 感受性の調節機構がどのように関与しているかを明らかにするために、intactな血管の張力と平滑筋細胞内 Ca^{2+} 濃度を同時に測定するという最近開発された方法を用いて検討した。

実験には平均11.8か月齢の遺伝性高脂血症家兎（WHHL家兎）を用い、対照としての日本白色家兎の成績と比較検討した。

静脈麻酔下に家兎の下行胸部大動脈を摘出し、血管条片を作製し、内膜擦過により内皮を剥離したものを用いた。また、WHHL家兎では粥状硬化病変を肉眼的に血管内膜面に約50%認める血管条片を実験に用いた。血管平滑筋細胞内の遊離 Ca^{2+} 濃度は蛍光色素fura 2を用い、fura 2- Ca^{2+} シグナルを測定すると同時に血管標本の等尺性張力を測定した。細胞内 Ca^{2+} 濃度はGrynkiewiczらの計算式により求めた。研究結果を以下に示す。

静止時および高カリウム(72.7mM)刺激時における平滑筋細胞内 Ca^{2+} 濃度は正常群とWHHL群間で差異を認めなかった。高カリウム(72.7mM)刺激時における等尺性張力も正常群とWHHL群間で差異を認めなかった。WHHL群における5-HTに対する張力の濃度反応曲線は、正常群に比し左上方に偏位しており、即ちWHHL群の反応閾値とone-half maximally effective dose(ED_{50})は正常群に比し有意に低下していた。加えて、WHHL群と正常群の5-HTによる最大収縮反応はWHHL群で約4倍亢進していた。平滑筋細胞内 Ca^{2+} 濃度の反応曲線についても同様にWHHL群において曲線は左上方に偏位しており、WHHL群と正常群の最大反応もWHHL群で約3倍亢進していた。以上より、5-HTによる平滑筋細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇は収縮反応の亢進と平行して増強していることが判明した。

一方、phenylephrine(PE)に対する張力及び細胞内 Ca^{2+} 濃度の濃度反応曲線は両群間で有意な差異を認めなかった。

次に、平滑筋収縮蛋白の Ca^{2+} 感受性の変化を検討するために両群で細胞内 Ca^{2+} 濃度-張力関係を求めた。いずれの群においても5-HTとPE刺激による直線の勾配は高カリウム刺激に比べて大であり、5-HT及びPEは収縮蛋白の Ca^{2+} 感受性を亢進させることが示された。しかし、WHHL群の5-HT刺激時の直線の勾配は正常群と同じであり、動脈硬化血管の5-HTに対する収縮蛋白の Ca^{2+} 感受性は正常血管に比し亢進していないことが示された。PE刺激時の収縮蛋白の Ca^{2+} 感受性も両群間で差異を認めなかった。さらに5-HTの血管収縮に關与する血管平滑筋の5-HT受容体のサブタイプについて検討した。5-HT₂受容体拮抗薬のketanserineは正常群での5-HTによる収縮を競合的に抑制したが、WHHL群では抑制しなかった。一方、5-HT₁-like受容体刺激薬の5-carboxamidotryptamineは5-HTと同様にWHHL群で収縮反応の亢進を示した。

本研究は、血管標本の張力と平滑筋細胞内 Ca^{2+} 濃度を同時に測定したものであるが、動脈硬化血管における5-HTの収縮亢進は収縮蛋白の Ca^{2+} 感受性の亢進によるのではなく、5-HT受容体を介した平滑筋細胞内 Ca^{2+} 動員の亢進によることを明らかにし、また、5-HTによる正常血管の収縮には5-HT₂受容体が、動脈硬化血管の収縮反応の亢進には5-HT₁-like受容体が主として關与していることを明らかにした。以上の結果は新しい重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。

よって、本研究者は博士（医学）の学位を得る資格があるものと認める。