



Tumor necrosis factor- α augments contraction and cytosolic Ca^{2+} sensitivity through phospholipase A2 in bovine tracheal smooth muscle

中谷, 裕司

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2004-09-08

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙2771

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2002771>

※ 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。



【 1 3 1 】

氏 名・（本 籍） 中谷 裕司 （ 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1923号
学位授与の 要 件 学位規則第5条第2項該当
学位授与の 日 付 平成16年9月8日

【 学位論文題目 】

Tumour Necrosis Factor- α Augments Contracation
and Cytosolic Ca²⁺ Sensitivity through Phospholipase A2
In Bovine Tracheal Smooth Muscle
(Tumour Necrosis Factor- α はウシ気管平滑筋の
収縮と細胞内 Ca 感受性を Phospholipase A2 を
介して増大させる。)

審 査 委 員

主 査 教 授 尾原 秀史
教 授 杉村 和朗
教 授 中村 俊一

I.序文

Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α)は広範囲の炎症と抗腫瘍活性を持ったサイトカインである。TNF- α はアレルゲン暴露時に形質細胞から放出され、有症状の気管支喘息患者において喀痰やBALF中のTNF- α 濃度が上昇していることより、気管支喘息に重要な役割を果たしていると考えられている。またTNF- α の直接吸入はラットや健常人においてヒスタミンやメサコリンによる気道収縮性を亢進させることが報告されている。しかしこのTNF- α による気道過敏性亢進の機序については明らかではない。

気管支喘息の気道過敏性の原因の一つとして気道平滑筋における細胞内カルシウム動態の変化が考えられるが、その測定の困難さから現在にいたるまで殆ど解明されていない。近年、fura2を始めとする蛍光指示薬を用いることで平滑筋における細胞内カルシウムと張力の同時測定が可能になった。一方、炎症性サイトカインであるTNF- α は、気管平滑筋においてPhospholipase A₂ (PLA₂)の発現や、そのkinase活性を増強させることが報告されているが、その機序については明らかではない。

今回我々は、TNF- α による気道過敏性亢進の機序についてその詳細を明らかにするために、ウシ気管平滑筋の等尺性収縮と細胞内カルシウム濃度に及ぼすTNF- α の影響とそれらに対するPLA₂の関与について検討した。

II.方法

上皮剥離したウシ気管平滑筋片(1mm巾×5mm長)を37°C、95% O₂、5% CO₂で通気しpH 7.4とした5 M fura2-AM含有の栄養塩液に3時間暗所保存した。fura2を負荷させた筋片を等尺性張力と細胞内カルシウム濃度同時測定装置であるCAF110の恒温槽内に装着し、張力および細胞内カルシウムの指標であるF340/F380(蛍光強度比; F340: 340 nmの励起光による蛍光強度、F380: 380 nmの励起光による蛍光強度)を同時測定した。測定は1 gの静止張力にて約60-90分間安定化させたのち、72.7 mM カリウム溶液による収縮反応を100%基準値とし、まずTNF- α (1-100 ng/ml)による収縮反応の有無を測定した。次に、高カリウム溶液およびアセチルコリン(Ach)の収縮反応に及ぼすTNF- α (10 ng/ml)の影響を調べた。また、これらの収縮反応が、PLA₂と関連しているかを調べるため、PLA₂阻害剤(manoalide)で前処置し、TNF- α (10 ng/ml)の収縮反応に及ぼす影響を調べた。

III.結果

fura2が充分負荷されていない筋片では、測定中F340、F380共に増加するためその比であるF340/F380は変化しない。反対に、fura2が充分負荷された筋片では、細胞内カルシウム濃度の増加の際F340が増加しF380が減少する、いわゆる鏡面像を呈する。このような鏡面像を呈する筋片のみを実験に用いた。TNF- α は1 ng/mlから100 ng/mlの濃度において直接筋片を収縮させなかった。TNF- α (10 ng/ml、30分間)存在下で、AChに対する収縮反応は細胞内Caの反応亢進を伴わず増強した。高カリウムに対する収縮反応と細胞内Caの反応はTNF- α 存在下では変化しなかった。細胞内Ca-張力曲線によりTNF- α が収縮蛋白のCa感受性亢進を介して気管平滑筋のACh反応性を高めたことが示された。TNF- α (10 ng/ml)存在下でのACh収縮反応曲線の亢進は、PLA₂阻害剤(manoalide)を加えることで一部抑制された。

IV.考察

今回の研究によりTNF- α は10倍以上気管平滑筋の感受性を増強させることが示された。しかし、この濃度のTNF- α は気管平滑筋の収縮をおこさなかった。この感受性亢進はCaに対する収縮蛋白の感受性亢進の結果と考えられる。TNF- α 存在下での高カリウムに対する収縮反応に関して細胞内Ca濃度の増強はみられず、AChに対する収縮反応が細胞内Ca濃度の反応亢進を伴わず増強されたことより、ムスカリン受容体関連の経路が選択的に増強されたことが推察される。このような、TNF- α がCa感受性を変化させることによってAChの気道過敏性を増強させるという報告は我々の知る限り最初のものである。TNF- α やinterleukin-1 β などの炎症性サイトカインは、気管平滑筋細胞においてPLA₂の発現やそのキナーゼの活性を増強させる。Palombella、Vilcekらの研究によって、TNF- α の細胞障害性と細胞増殖性はPLA₂阻害剤によって減弱もしくは阻害され、平滑筋張力におけるCa感受性の増強はG protein関連のミオシン軽鎖キナーゼ/phosphatase活性を調節することによっておこるとされている。また、ノルエピネフリンによって活性化された血管平滑筋のmyofilamentのCa感受性増強はprotein kinase Cの活性が原因とされている。

Penningらはモルモットの気管においてTNF- α (1 pM、30 pM、100 pM)の30分間の前処置により、pD₂の変化なしにmethacholineに対する最大収縮反応を増強したと報告している。この結果はpD₂の関係に関して我々のものと異なっている。その原因として、

我々が上皮、結合組織、軟骨を取り除いたウシ気管平滑筋を使用したのに対し、Penningらは上皮、軟骨を伴うモルモットの気管を使用したことが挙げられる。Munakataらは、TNF- α は気管上皮から分泌される一酸化窒素によって気管平滑筋の弛緩をおこすことを示し、TNF- α は直接作用として平滑筋収縮に作用する一方、上皮を介した弛緩に影響を与えることを報告している。Amraniらはヒト気管平滑筋細胞への24時間のTNF- α (10 ng/ml) 前処置はpD₂の変化を伴わず、bradykininとcarbacholによる細胞内Caを増強させると報告している。これらの結果により、気道平滑筋細胞においてTNF- α が蛋白合成に依存した活性経路を通じて、G protein関連のシグナル伝達を調整することが示された。pD₂に関連して、これらの結果は我々のものとは異なるが、我々の検討では前処置は30分間であったのに対し、Amraniらは24時間であった。TNF- α による長時間の前処置は蛋白合成を誘導するが、短時間の前処置はPLA₂の活性化を介して気道平滑筋細胞を直接刺激することが示唆される。

PLA₂は種々の炎症細胞の細胞膜リン脂質からアラキドン酸代謝産物を遊離し、エイコサノイドを産生する重要な役割をはたしている。TNF- α 存在下でのAch収縮反応曲線の増大は、PLA₂阻害剤を加えることにて一部阻害されたことにより、TNF- α による気道過敏性亢進はPLA₂活性を通じて生じていることが推察される。以上より、低濃度のTNF- α はアセチルコリンによる平滑筋収縮反応を増強させ、それはPhospholipase A₂により促進されたとの結論が得られた。

神戸大学大学院医学系研究科 (博士課程)

論文審査の結果の要旨			
受付番号	乙 第 1925 号	氏 名	中谷裕司
論文題目	Tumor Necrosis Factor- α Augments Contraction and Cytosolic Ca ⁺⁺ Sensitivity through Phospholipase A ₂ In Bovine Tracheal Smooth Muscle (Tumor Necrosis Factor- α はウシ気管平滑筋の収縮と細胞内Ca感受性をPhospholipase A2を介して増大させる。)		
審査委員	主 査 尾原秀史 副 査 杉村和朗 副 査 中村俊一		
審査終了日	平成 16 年 8 月 11 日		

(要旨は1,000字～2,000字程度)

Tumor Necrosis Factor- α Augments Contraction and Cytosolic Ca^{2+} Sensitivity through Phospholipase A2 in Bovine Tracheal Smooth Muscle

(Tumor Necrosis Factor- α はウシ気管平滑筋の収縮と細胞内 Ca 感受性を Phospholipase A2 を介して増大させる)

Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α) は広範囲の炎症と抗腫瘍活性を持ったサイトカインである。TNF- α はアレルゲン暴露時に形質細胞から放出され、有症状の気管支喘息患者において喀痰やBALF中のTNF- α 濃度が上昇していることより、気管支喘息に重要な役割を果たしていると考えられている。またTNF- α の直接吸入はラットや健常人においてヒスタミンやメサコリンによる気道収縮性を亢進させることが報告されている。しかしこのTNF- α による気道過敏性亢進の機序については明らかではない。fura2を負荷させた上皮剥離したウシ気管平滑筋片を等尺性張力と細胞内カルシウム濃度同時測定装置であるCAF110の恒温槽内に装着し、張力および細胞内カルシウムの指標であるF340/F380を同時測定した。まずTNF- α (1~100ng/ml) による収縮反応の有無を測定した。TNF- α は1ng/mlから100ng/mlの濃度において直接筋片を収縮させなかった。次に、高カリウム溶液およびアセチルコリン(Ach)の収縮反応に及ぼすTNF- α (10ng/ml) の影響を調べた。TNF- α 存在下で、Achに対する収縮反応は細胞内Caの反応亢進を伴わず増強した。高カリウムに対する収縮反応と細胞内Caの反応はTNF- α 存在下では変化しなかった。細胞内Ca-張力曲線によりTNF- α が収縮蛋白のCa感受性亢進を介して気管平滑筋のAch反応性を高めたことが示された。この感受性亢進はCaに対する収縮蛋白の感受性亢進の結果と考えられる。このような、TNF- α がCa感受性を変化させることによってAchの気道過敏性を増強させるという報告は我々の知る限り最初のものである。Phospholipase A2 (PLA2) は種々の炎症細胞の細胞膜リン脂質からアラキドン酸代謝産物を遊離し、エイコサノイドを産生する重要な役割をはたしている。また、これらの収縮反応が、PLA2と関連しているかを調べるため、PLA2阻害剤 (manoilide) で前処置し、TNF- α の収縮反応に及ぼす影響を調べた。TNF- α 存在下でのAch収縮反応曲線の増大は、PLA2阻害剤を加えることにて一部阻害されたことにより、TNF- α による気道過敏性亢進はPLA2活性を通じて生じていることが推察される。TNF- α などの炎症性サイトカインは、気管平滑筋細胞においてPLA2の活性やそのリパーゼの活性を増強させる。Palombella, Vilcekらの研究によって、TNF- α の細胞障害性と細胞増殖性はPLA2阻害剤によって減弱もしくは阻害され、平滑筋張力におけるCa感受性の増強はG protein関連のミオシン軽鎖キナーゼ/phosphatase活性を調節することによっておこるとされている。また、ノルエピネフリンによって活性化された血管平滑筋のmyofilamentのCa感受性増強はprotein kinase Cの活性が原

因とされている。以上より、TNF- α はアセチルコリンによる平滑筋収縮反応を増強させ、それはPhospholipase A2により促進されたとの結論が得られた。本研究は、気道過敏性亢進の機序について、TNF- α の関与を研究したものであるが、従来行われなかったTNF- α のウシ気管平滑筋の等尺性収縮と細胞内カルシウム濃度に及ぼす影響とそれらに対するPLA2の関与について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と認める。