

氏名(本籍)	二宮浩樹(茨城県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	博甲第1025号
学位授与年月日	平成4年3月25日
学位授与の要件	学位規則第5条第1項該当
審査研究科	医学研究科
学位論文題目	Endothelin and bronchoconstriction—production, binding site and contractile activity— (エンドセリンと気道収縮—産生, 結合部位, 収縮活性—) (Dissertation 形式)
主査	筑波大学教授 医学博士 小形 岳三郎
副査	筑波大学教授 医学博士 福 富 久之
副査	筑波大学教授 医学博士 杉 田 良 樹
副査	筑波大学助教授 医学博士 吉 田 薫
副査	国立環境研究所上席研究官 農学博士 三 浦 卓

論 文 の 要 旨

〈目 的〉

エンドセリン(以下 ET)は血管内皮細胞より分離, 同定された強力な血管平滑筋収縮活性を有するペプチドである。本論文は ET が内因性因子として気道平滑筋の収縮を調節しているかを検討することを目的として, 1) ET の気道収縮活性およびその収縮機序の薬理的検討, 2) 肺での ET 結合部位, 3) 気道及び肺組織の ET 含量, 4) 培養気道上皮細胞よりの ET 遊離能等に関して実験的に検討を行った。

〈材料および方法〉

1) ET の気道収縮活性の検討

In vitro 系: モルモットとヒトの気管切片を organ chamber 内に静置し, ET を加えてその張力を測定した。次に, その結果と他の気道収縮物質(ニューロキニン A, サブスタンス P, ヒスタミン, ロイコトリエン D₄) の収縮活性とを同様な方法で比較的検討した。

In vivo 系: 麻酔下のモルモットに気管チューブを挿入し, 静脈内に種々の濃度の ET-1 を注入後, 気道内圧の変化をモニターし検討した。

2) ET の気道収縮の機序に関する検討

a. 気道収縮での電位依存性カルシウムチャンネルの関与: 上記のバイオアッセイ装置を用い

て、電位依存性カルシウムチャンネルの拮抗剤ニカルジピンおよびジルチアゼムによる収縮活性への影響を調べた。また、chamber内カルシウムをEGTAにより除いて、ET-1の活性を観察した。

b. ロイコトリエン、トロンボキサン_{A₂}を介しての収縮：ロイコトリエン拮抗剤FPL55712および血小板活性化因子拮抗剤SC47014A、サイクロオキシゲナーゼ阻害剤インドメサシンを前投与して、ETの活性を観察した。

c. 肥満細胞由来のヒスタミンを介しての収縮：ヒスタミンの拮抗剤ジフェンヒドラミンにて前処置して、ETの活性を観察した。肥満細胞の脱顆粒をコンパウンド48/80にて惹起させた後、或いは、肥満細胞の細胞安定剤であるアゼラスチンの前処置した後、ETの気道収縮活性を観察した。次に、モルモット肺より肥満細胞分画を作製し、ET-1刺激により放出するヒスタミン量を測定した。

3) 肺でのET結合部位の検討

モルモット肺より膜分画を抽出し、その¹²⁵I-ET-1の結合性を調べ、飽和実験および競合置換実験にて、ET-1、ET-2、ET-3の結合性の違いを検討した。

4) 気道と肺組織のET含量と気道上皮のET産生能の検討

モルモットの気道および肺組織のET含量を免疫酵素測定法と高速液体クロマトグラフィーを用いて測定した。つぎに、気道上皮を培養し、その培養上清のET-1を測定した。

〈結果〉

1) ETの気道収縮活性

In vitro系にて、ET-1は濃度依存性に気管標本を収縮させ、その収縮活性はニューロキニンAやロイコトリエンD₄の約100倍の活性を示した。ET-1、ET-2、ET-3の活性度を比較した結果、ET-1=ET-2>ET-3の順であった。In vivo系にて、ET-1 100pmol/kg以上の血中投与にて有為に気道内圧を上昇させた。以上の結果より、ETは既存の気道動収縮物質のうち最も気道収縮活性が高く、特にET-1とET-2の活性が高いことがわかった。

2) ETの気道収縮の機序

ETの気道収縮活性は、電位依存性カルシウムチャンネル拮抗剤により減退した。次に、カルシウムを除いた液内での観察にて、その収縮活性は著しく減退したが、完全に消失しなかった。このことより、気道収縮へのETの直接作用には、電位依存性カルシウムチャンネルを介しての細胞外カルシウム流入と細胞内の貯蔵カルシウムの利用の両者が関与していることが推察された。

つぎに、各種メディエーターの拮抗剤及び酵素阻害剤の前投与により、ETの収縮活性は減退したことにより、血小板活性化因子、ロイコトリエン、トロンボキサン_{A₂}を介して、ETが間接的に気道収縮に関与することが推察された。

肥満細胞の脱顆粒後、または、細胞膜安定剤投与により、ETの収縮活性は著しく減退した。また、ET-1の投与によりモルモット肺よりえた肥満細胞のヒスタミンの放出が確かめられた。このことからETが肥満細胞のヒスタミンを介して間接的に筋収縮を起こすことがわかった。

3) 肺での ET 結合部位

モルモット肺では、Scatchard analysis より ET-1結合部位は単一であると考えられた。競合置換実験にて、ET-1および ET-2に高い親和性を示し、肺での ET receptor は ET_A receptor である可能性が推察された。

4) 気道および肺組織の ET 含量と気道上皮の ET 産生

モルモット気道および肺組織には、多量の ET-1と少量の ET-3を認めた。また、気道上皮剥離組織では、ET-1の含量が著しく減少した。更に、培養上皮細胞を用いた実験にて、ET-1が気道上皮細胞により産生されることを確かめた。

〈結 論〉

1. ET-1は強力な気道収縮活性を示すことをモルモット気管を用いて明らかにした。その気道筋の収縮機序には、電位依存性カルシウムチャンネルを介する筋への直接作用の他に、肥満細胞等よりのヒスタミンの放出や、炎症細胞等よりのメディエーターの産生を誘導させ間接的に気道筋に作用する二つの機序があることが示唆される。

2. モルモット肺組織には ET-1に対する結合部位があり、その tye は ET_A receptor であることが示唆された。

3. モルモットの気道・肺は気道を収縮するに充分な ET-1を含有し、その産生部位は気道上皮であることを確かめた。

以上のことより、気道上皮由来の内因性の ET-1が気道収縮機構に深く関与していると考えられる。

審 査 の 要 旨

本論文は、エンドセリン特に ET-1が気道上皮より産生され、強力な気道収縮活性を示すことを明らかにしたものである。更に、その作用機序には、気道筋への直接作用の他に、肥満細胞を含む種々の炎症細胞よりのメディエーターを介して間接的な作用機序のあることを示したことは興味深い。この研究は内在性因子による気道収縮機構の研究に新しい分野を開いたものであり、示唆に富んだ知見が多い。今後、ヒトの喘息における気道収縮機序でのエンドセリンの役割を解析する上に、資するものが多いと考えられる。従って、本論文は学位論文として十分評価に値する。

よって、著者は博士 (医学) の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。