



Roles inhibitors of myosin light chain kinase and tyrosine kinase on cation influx in agoniststimulated endothelial cells

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-11-05 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 高橋, 玲子 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1114

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博第 261号	学位授与年月日	平成10年 3月26日
氏 名	高 橋・玲 子		
論文題目	<p>Roles inhibitors of myosin light chain kinase and tyrosine kinase on cation influx in agonist-stimulated endothelial cells (アゴニスト刺激された内皮細胞への陽イオン流入におけるミオシン軽鎖キナーゼ阻害剤とチロシンキナーゼ阻害剤の役割)</p>		

博士(医学) 高橋 玲子

論文題目

Roles of inhibitors of myosin light chain kinase and tyrosine kinase on cation influx in agonist-stimulated endothelial cells

(アゴニスト刺激された内皮細胞への陽イオン流入におけるミオシン軽鎖キナーゼ阻害剤とチロシンキナーゼ阻害剤の役割)

論文内容の要旨

〔はじめに〕

血管内皮細胞は、血液と組織間質の透過性隔壁機能を有するのみならず、血管弛緩因子、収縮因子により血管トーンスを調節し、抗凝固反応、炎症反応、血管新生にも関与する多機能細胞であるが、その機能発現には細胞内Caイオン (Ca^{2+}) が重要な働きをする。しかし、血管内皮細胞内Caイオン濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) を調節する機構は十分には解明されていない。これまで、アゴニスト刺激された細胞における細胞外からの Ca^{2+} 流入には、非特異的陽イオンチャネルの関与が示唆されてきたが、本研究ではこの経路における選択性を明らかにするため、ブラジキニン (BK) 刺激時の細胞外からの Ca^{2+} 流入と Mn^{2+} 流入に及ぼす、ミオシン軽鎖キナーゼ (MLCK) 阻害剤とチロシンキナーゼ (TK) 阻害剤の作用を比較検討した。

〔材料ならびに方法〕

ブタ下行大動脈より分離した初代培養血管内皮細胞を対象とした。 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の測定は蛍光指示薬である fura-2/AM を負荷後、細胞内イオン濃度解析装置 (ARGUS; 浜松ホトニクス) を用いて、340nm および380nm で励起時の510nm での蛍光像を求め、蛍光強度比 ($\text{F}_{340}/\text{F}_{380}$) で表示した。また、 Ca^{2+} と同じ2価の陽イオンである Mn^{2+} の細胞内への流入を検討するために、 $[\text{Ca}^{2+}]$ の変化には非依存的な isobestic point である、360nm の励起波長による蛍光強度 (F_{360}) の時間的減弱率を解析した。

〔結果〕

(1) 細胞外 Ca^{2+} が存在している条件下では BK (10nM) 刺激により、 $\text{F}_{340}/\text{F}_{380}$ はコントロール値の1.2より30秒後には約4.2へと急激に上昇し、その後、徐々に低下していったが、10分以上にわたって3.5以上の持続的上昇を認めた。細胞外 Ca^{2+} の非存在下では、一過性に約2.0まで上昇したが、持続的な上昇は認められなかった。また、BK 投与5分後に F_{360} は初期値の23%に減弱し、細胞内への Mn^{2+} 流入がBKにより促進された。

論文審査の結果の要旨

血管内皮の役割である (1) 透過性隔壁機能 (2) 血管トーンスの調節 (3) 抗凝固反応 (4) 炎症反応 (5) 血管新生などの機能発現には、細胞内Caイオンが重要な働きをしている。

アゴニストによる刺激があると、細胞内 Ca^{2+} ストアからの Ca^{2+} 放出に続き、細胞外からの Ca^{2+} 流入が生じるが、この二つを結びつけるシグナルについては、いまだはっきりしない。また、細胞外からの Ca^{2+} 流入には細胞膜にある、非特異的陽イオンチャネルが関与しており、この経路の選択性を明らかにすることを目的として申請者は実験を行った。

ブタ下行大動脈より分離した、初代培養血管内皮細胞を用い、刺激物質としてブラジキニン (BK) を、ミオシン軽鎖キナーゼ (MLCK) 阻害剤として ML-9、チロシンキナーゼ (TK) 阻害剤としてゲニステインを、また非特異的陽イオンチャンネルの選択性を明らかにするために、細胞外溶液の Ca^{2+} を Mn^{2+} に置き換えた。細胞内 Ca^{2+} イオン及び、 Mn^{2+} イオンの測定は蛍光指示薬として fura-2 を細胞に負荷後、細胞内イオン濃度解析装置を用いて行った。

この結果、細胞外からの Ca^{2+} 流入は、MLCK 阻害剤により完全に抑制され、TK 阻害剤は部分的に抑制した。一方、 Mn^{2+} の流入は、TK 阻害剤の方が MLCK 阻害剤より強く抑制した。これは、非特異的陽イオンチャンネルに選択性があることを明らかにしたものである。

この研究に関連して、次のような質問を行った。

- 1) 動脈と静脈の内皮の違いの有無
- 2) 内皮細胞と平滑筋細胞との Ca^{2+} 流入の違い
- 3) ML-9 の全身投与はどのような作用を示すか
- 4) 培養細胞でのデータは *in situ* でもあてはまると考えるか
- 5) アゴニストとして BK を使用した理由
- 6) BK レセプターについて
- 7) 細胞内 Ca^{2+} 流入抑制と心筋保護作用
- 8) Mn^{2+} を使用した理由
- 9) MLCK ノックアウトマウス実験の可能性

これらの質問に対し申請者の解答は適切であり、問題点も十分理解しており、博士 (医学) の学位論文にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者 主査 教授 中 島 光 好

副査 教授 数 井 暉 久 副査 助教授 小 林 隆 夫