



Effect of urinary trypsin inhibitor on potassium currents: fetus modulates membrane excitability by production of UTI

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-31 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 竹内, 欽哉 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1251

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 398号	学位授与年月日	平成15年 3月26日
氏 名	竹 内 欽 哉		
論文題目	<p>Effect of urinary trypsin inhibitor on potassium currents : fetus modulates membrane excitability by production of UTI (尿中トリプシンインヒビターのカリウム電流に対する影響 : 胎児は尿中トリプシンインヒビターを産生することにより膜の興奮性を調節している)</p>		

博士(医学) 竹内 欽 哉

論文題目

Effect of urinary trypsin inhibitor on potassium currents : fetus modulates membrane excitability by production of UTI

(尿中トリプシンインヒビターのカリウム電流に対する影響：胎児は尿中トリプシンインヒビターを産生することにより膜の興奮性を調節している)

論文の内容の要旨

[はじめに]

羊水の成分はほとんどが胎児尿であり、これには高濃度の尿中トリプシンインヒビター(UTI)が含まれている。UTIは胎児の肝臓で生成され尿中に分泌される。UTIは現在、急性肺炎やショックの治療薬として臨床的に広く用いられている。我々は、UTIが子宮筋へのカルシウム流入を抑制し、その結果子宮収縮を抑制することを報告した。現在UTIは切迫早産の治療薬としても普及している。UTIの作用機序を明らかにするため、細胞膜の興奮性を調節する上で重要な因子であるカリウム電流に対するUTIの作用を検討した。

[材料ならびに方法]

1) 細胞培養：

ヒト皮膚由来の線維芽細胞株を37℃、5% CO₂下にて継代培養した。培地には10%ウシ胎仔血清含有、ダルベッコ改変イーグル培地を用い、これを2～3日毎に交換、継代後3～6日目の細胞を実験に用いた。

2) パッチクランプ法：

1個の線維芽細胞にガラス電極(先端径3-5μm、抵抗5-7MΩ)を接触させ、電極内に陰圧をかけると、細胞膜と電極間の抵抗が上昇しギガシールと呼ばれる状態が形成され、さらに陰圧をかけると接触面の細胞膜が破れ細胞内液が電極内液に置換される。この状態で電圧刺激を与えたときの細胞全体に流れる電流を記録した(全細胞記録、電位固定法)。5分間以上安定して電流が記録された後、UTI及び、種々のブロッカーを5分間投与後の電流を投与直前の電流と比較した。

3) 灌流液(細胞外液)：

1μMのUTI非存在下/存在下、カリウムチャンネルの非特異的ブロッカーである20mMのテトラエチルアンモニウム(TEA)存在下、カルシウムチャンネルの非特異的ブロッカーである2mMの塩化カドミウム存在下において、それぞれ脱分極刺激を与えたときの電流を測定した。上記の物質含有の細胞外液は、灌流開始直後より細胞表面に接触するよう、記録細胞近傍に設置した20Gのカテーテルより灌流した。

[結果]

- 1) 保持電圧を-90mVとし-60mVから+80mVの範囲へ+10mV毎のステップ状の脱分極刺激を与えると、+30mV付近から外向き電流が記録された。また、-90mVから+120mVまでの傾斜状の脱分極刺激でも、同様に+30mV付近から外向き電流が記録された。これらの電流はTEAによって抑制された。以上のことから、この電流はTEA感受性カリウム電流であることが示された。
- 2) TEA感受性カリウム電流で記録されている状態でUTIを投与すると、この電流は5分後には16.9%

増加した。

- 3) TEA 感受性カリウム電流にカドミウムを投与すると、13.4%電流が減少した。これは、記録された電流の13.4%がカルシウム依存性カリウム電流、残りの86.6%がカルシウム非依存性カリウム電流であることを示している。カドミウム存在下、すなわち、カルシウム非依存性カリウム電流のみが記録されている状態で、UTI を投与すると、この電流は4.8%増加した。
- 4) 以上のことから、UTI のカリウム電流に対する増加作用のうち、カルシウム非依存性カリウム電流に対しては4.8%、カルシウム依存性カリウム電流に対しては、間接的に計算すると94.8%の増加作用があることが示唆された。

〔考察〕

細胞膜の脱分極により電位依存性カルシウムチャンネルからカルシウムの細胞内への流入がおこるが、カルシウム依存性カリウムチャンネルは細胞内カルシウムの上昇が引き金となってカリウムを細胞外へ排出させる作用がある。今回の実験ではカルシウム依存性カリウム電流を直接計測していないが、UTI のカリウム電流増加作用はそのほとんどがカルシウム依存性カリウム電流成分の上昇作用であることが間接的に示された。UTI にはすでに報告されているようなカルシウム流入を抑える作用以外に、脱分極した細胞膜を速やかに過分極させ、細胞膜が興奮しにくい状態を作っていることが考えられる。実際、あるカルシウム依存性カリウムチャンネルオープナーは子宮収縮抑制作用があることが報告されている。また、現在子宮収縮抑制剤として広く用いられている塩酸リトドリンにもカリウム電流増加作用があることが報告されている。これらの物質は妊婦に対する安全性や副作用の問題があるのに対し、UTI はカリウム電流増加の作用は少ないものの、羊水中に存在する生理的物質である。UTI は早産防止作用のみならず、細胞膜の興奮性を調節して、胎児自身に生体防御的な役割があることが示唆された。

〔結論〕

UTI はカリウム電流を調節する生理的物質である。UTI はカルシウム依存性カリウム電流を増加させることにより、脱分極した細胞膜を速やかに過分極させることにより細胞膜の興奮性を調節していることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

尿中トリプシンインヒビター(UTI)は肝臓で生成され尿中に排泄される物質で、膀胱などを沈静させる目的で治療にも使われている。特に胎児の尿中や羊水中にはUTIが高濃度に含まれており、その生理的意義が注目される。実際、UTIは頸管熟化と子宮平滑筋収縮とを抑制し、早産を防ぐ作用を持っている。この作用の根底には細胞の興奮活性化を抑える機構があると考えられるが、UTIが Ca^{2+} チャンネルを阻害して細胞内への Ca^{2+} 流入を減少させること以外のことは、あまり多く分かっていない。そこで申請者は、細胞膜を興奮状態から静止状態に引き戻す作用を担っている K^{+} チャンネルに着目し、それに対するUTIの効果を調べて、UTIによる早産抑止の基本的な仕組みを解明しようとした。

〔方法〕

培養ヒト繊維芽細胞において、パッチクランプ用電極を細胞膜に密着させ、電圧固定条件下に-90mV

の保持電圧からの脱分極性パルスを加えて、 K^+ チャネルを介して発生する外向き電流の記録を行った。 K^+ チャネルの特異的な阻害剤としてテトラエチルアンモニウムを、また、電圧依存性に活動する Ca^{2+} チャネルの特異的な阻害剤としてカドミウムイオンを使用した。これらの阻害剤の使用によって、記録された外向き電流を2つの K^+ 電流成分に分けた。細胞外に UTI を加えた溶液を灌流することによって、それらの K^+ 電流成分に対する効果を検定した。

〔結果〕

脱分極のレベルが +30mV 以上になると外向き電流が生ずるのが観察された。この外向き電流は、テトラエチルアンモニウムを細胞外液に加えることによって抑制されたので、 K^+ チャネルの活性化によって起こる K^+ 電流であると考えられた。脱分極パルスの大きさを一定にしたときに見られる K^+ 電流は、UTI を投与すると有意に増加した。また K^+ 電流は、電位依存性 Ca^{2+} チャネルを選択的に阻害するカドミウムを投与すると減少し、その減少分は Ca^{2+} 依存性の K^+ 電流成分と考えられた。この Ca^{2+} 依存性の成分をカドミウムで抑制した状態で UTI の効果を調べると、電流はわずかしき増加しないことが分かった。したがって UTI は、大部分が、 Ca^{2+} 依存性に活性化する K^+ 電流成分を増加させるものであることが明らかになった。

〔考察〕

Ca^{2+} 依存性に関与する K^+ チャネルは、 K^+ 電流を生ずることによって、一時、脱分極した細胞膜の電位を静止電位側に引き戻す作用をする。この作用は細胞膜の興奮を停止させる方向に働き、細胞の活性化を抑えることに繋がる。UTI はこの K^+ 電流を増加させる効果を持つことが明らかになり、確かに細胞を静止状態に維持する働きをすることが証明された。この繊維芽細胞で観察された性質が一般化されるならば、UTI は子宮平滑筋に対して収縮抑制的に働き、妊娠を継続させる力を発揮することが理解できる。

審査委員会は、申請者が UTI の K^+ チャネルに対する新しい効果を見出したこと、その効果によって胎児尿や羊水が早産を抑制する機構を強化していることを理解できるようにしたことを高く評価した。

上記のような申請者の論文の示説に対し、審査委員会は次のような質問を行った。

- 1) UTI の胎児血中と羊水中の濃度差は
- 2) UTI のみで早産抑制効果があるか
- 3) 頸管熟化とはどのようなことか
- 4) 細胞外からの Ca^{2+} 流入と細胞内からの Ca^{2+} 放出の区別
- 5) LPS の効果と切迫流産の機構との関係
- 6) K^+ チャネルの流産誘発への関与
- 7) 繊維芽細胞を用いた理由
- 8) 測定された平衡電位は K^+ 依存性か
- 9) 過分極応答はあったか
- 10) UTI の効果に対して K^+ チャネル阻害剤である TEA は影響するか
- 11) UTI で静止電位が変わらない理由
- 12) 虚血で $[Ca^{2+}]_i$ が上昇する理由
- 13) ATP 依存性 K^+ チャネルの存在

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	寺川進			
	副査	林秀晴	副査	最上秀夫	