

## 学位論文内容の要旨

論文提出者氏名	論文審査担当者
清水 祥子	主査 教授 南 敏 明 副査 教授 宮 崎 瑞 夫 副査 教授 窪 田 隆 裕 副査 教授 北 浦 泰 副査 教授 勝 間 田 敬 弘
主論文題名 Intravenous Anesthetics Inhibit Capacitative Calcium Entry in Pulmonary Venous Smooth Muscle Cells (静脈麻酔薬は、肺静脈平滑筋細胞における容量性カルシウム流入を抑制する)	
学位論文内容の要旨	
<p>《研究目的》</p> <p>容量性カルシウム流入(Capacitative Calcium Entry: CCE)は、細胞内カルシウムストアの枯渇により活性化される細胞内へのカルシウム流入機構であり、持続的に細胞内カルシウム濃度を維持するのに重要である。肺静脈は様々な刺激で収縮するが、平滑筋の細胞内カルシウム濃度の上昇は主要な刺激とされている。肺動脈平滑筋細胞において、静脈麻酔薬であるプロポフォールはプロテインキナーゼCを介してCCEを抑制することが報告されているが、肺静脈平滑筋細胞におけるCCEの役割は、あまり知られていない。そこで今回、CCEが肺静脈平滑筋細胞に存在するかを確認し、プロテインキナーゼC、チロシンキナーゼ、Rhoキナーゼが伝達機構に関わっているかを検討した。さらに、静脈麻酔薬(チオペンタール、ミダゾラム、ケタミン、プロポフォール)のCCEに対する影響および機序を調べた。</p> <p>《方法》</p> <p>雑種のイヌから心臓と肺を一塊に取り出した後、肺静脈を分離した。肺静脈から内皮細胞と外膜を除去した後2 mm<sup>2</sup>に切り取り、プラスチック容器に入れて肺静脈平滑筋細胞を培養した。肺静脈平滑筋細胞は7日後に外植片から増殖し、10-14日後に直径35 mmの皿に継代し、カルシウム蛍光指示薬であるfura-2を負荷した。これを蛍光顕微鏡にて、340 nmと380 nmの惹起光で発生した510 nmの蛍光比を計算して、細胞内カルシウム濃度を測定した。細胞外カルシウムフリーの状態の小胞体のカルシウムポンプ阻害剤であるthapsigarginを用い小胞体のカルシウムを枯渇させた後、細胞外液にカルシウムを負荷してCCEを惹起させた。CCE惹起前にプロテインキナーゼC阻害薬、チロシンキナーゼ阻害薬、Rhoキナーゼ阻害薬、静脈麻酔薬であるチオペンタール、ミダゾラム、ケタミン、プロポフォールを細胞外液に投与し、コントロールと比較した。</p> <p>《結果》</p> <p>Thapsigarginの負荷で小胞体からカルシウムが流出することによって、340/380強度比(細胞内カルシウム濃度)は一時的に上昇した後(160 ± 6%)基線に戻った。その後細胞外カルシウム(2.2 mM)を負荷すると、340/380強度比は一時急激に上昇しピークに達した後(P値: 155 ± 7%)、緩やかに減少し、一定の値で持続(S値: 129 ± 5%)した。つまり、肺静脈平滑筋細胞においてCCEが存在することが</p>	

確認された。プロテインキナーゼ C 阻害剤、Rho キナーゼ阻害剤を CCE 惹起前に細胞外液に投与しても、CCE の P 値、S 値に変化はみられなかったが、チロシンキナーゼ阻害剤を投与すると、コントロールに対し CCE の P 値が  $68 \pm 6\%$ 、S 値が  $65 \pm 8\%$  となった ( $P < 0.05$ )。静脈麻酔薬を CCE 惹起前に投与すると、コントロールに対しチオペンタール P 値  $79 \pm 6\%$ 、S 値  $80 \pm 4\%$ 、ミダゾラム P 値  $72 \pm 6\%$ 、S 値  $69 \pm 3\%$ 、ケタミン P 値  $84 \pm 7\%$ 、S 値  $69 \pm 4\%$ 、プロポフォール P 値  $72 \pm 3\%$ 、S 値  $83 \pm 4\%$  となった ( $P < 0.05$ )。チロシンキナーゼ阻害剤投与下で、プロポフォールを投与すると、相加効果が認められたが(チロシンキナーゼ阻害剤単独と比較して、P 値  $62 \pm 7\%$ 、S 値  $79 \pm 7\%$ 、 $P < 0.05$ )、チオペンタール、ミダゾラム、ケタミンを投与しても認められなかった。

#### 《 考察 》

イヌの肺静脈平滑筋細胞に、CCE が存在することが確認された。これは、プロテインキナーゼ C、Rho キナーゼの伝達経路を介さず、チロシンキナーゼを介していると考えられた。静脈麻酔薬であるチオペンタール、ミダゾラム、ケタミン、プロポフォールは、CCE を抑制した。チオペンタール、ミダゾラム、ケタミンによる CCE の抑制は、チロシンキナーゼ阻害剤で抑制されたことから、チロシンキナーゼを介していると考えられた。しかし、プロポフォールによる CCE の抑制は、チロシンキナーゼ阻害剤で抑制されなかったことより、チロシンキナーゼとは独立した伝達経路を介していると考えられ、プロテインキナーゼ C を介して CCE を抑制する肺動脈平滑筋細胞とは、異なった機序が存在すると考えられた。

## 審査結果の要旨および担当者

報告番号	乙 第 号	氏 名	清水 祥子
論文審査担当者		主 査 教授 南 敏 明 副 査 教授 宮 崎 瑞 夫 副 査 教授 窪 田 隆 裕 副 査 教授 北 浦 泰 副 査 教授 勝 間 田 敬 弘	
主論文題名 Intravenous Anesthetics Inhibit Capacitative Calcium Entry in Pulmonary Venous Smooth Muscle Cells (静脈麻酔薬は、肺静脈平滑筋細胞における容量性カルシウム流入を抑制する)			
論文審査結果の要旨			
<p>容量性カルシウム流入(CCE)は様々な細胞に存在し、細胞内カルシウム濃度を維持するのに重要な機構である。肺動脈平滑筋細胞において、チロシンキナーゼとプロテインキナーゼ C を介する CCE が存在し、静脈麻酔薬であるプロポフォールはプロテインキナーゼ C を介して CCE を抑制することが報告されている。しかし、肺静脈の平滑筋細胞における CCE については、あまり知られていない。</p> <p>申請者は、健常イヌの肺静脈平滑筋細胞を用いて CCE の存在を確認した後その機序を調べた。結果は、肺静脈平滑筋細胞にチロシンキナーゼを介する CCE が存在し、肺静脈平滑筋の細胞内カルシウム濃度の調節に CCE が関わっていることが明らかになった。</p> <p>さらに申請者は、肺静脈平滑筋細胞における静脈麻酔薬による CCE への影響、その機序を検討した。結果は、静脈麻酔薬であるチオペンタール、ケタミン、ミダゾラムは、チロシンキナーゼを介して CCE を抑制したが、プロポフォールはチロシンキナーゼと独立した機序で CCE を抑制し、プロテインキナーゼ C を介して CCE を抑制する肺動脈平滑筋細胞とは異なった機序が存在することを明らかにした。</p> <p>静脈麻酔薬は肺静脈の収縮を抑制することが報告されていたが、本研究により、静脈麻酔薬は肺静脈平滑筋細胞の CCE を介して細胞内カルシウム濃度を低下させることが明らかになった。本研究における肺静脈への静脈麻酔薬の影響は、この分野に新しい見識をもたらす可能性が示唆された。</p> <p>以上により、本論文が本学学位規程第 3 条第 2 項に定めるところの博士(医学)の学位を授与するに値するものと認める。</p> <p>(主論文公表誌) Anesthesiology 104 (4):791-797, 2006</p>			