

博士（医学） 武 田 洋 司

学 位 論 文 題 名

DHP 系  $\text{Ca}^{2+}$  アゴニストによる

L型  $\text{Ca}^{2+}$  チャネル活動促進作用に関する解析的研究

—単一チャネル・レベルにおける YC-170 と BAY K 8644 の  
膜電位依存性からみた作用比較—

学位論文内容の要旨

I 研究目的

ジヒドロピリジン（DHP）系薬物はL型  $\text{Ca}^{2+}$  チャネルに特異的に結合し、その機能を修飾する。DHP系薬物のなかには  $\text{Ca}^{2+}$  チャネルに抑制的に作用するもの（ $\text{Ca}^{2+}$  アンタゴニスト）と、 $\text{Ca}^{2+}$  チャネルに対し、促進的に作用するもの（ $\text{Ca}^{2+}$  アゴニスト）がある。これらDHP系薬物の  $\text{Ca}^{2+}$  チャネルに対する作用は膜電位を変化させることにより、減弱あるいは反転することが報告されているが、DHP系薬物の作用の膜電位依存性の機序について、単一チャネル・レベルでは未だ詳細に検討されていない。本研究の目的は、心筋L型  $\text{Ca}^{2+}$  チャネルの単一チャネル活動を記録し、DHP系  $\text{Ca}^{2+}$  アゴニストのチャネル動態に対する作用の膜電位依存性を比較検討し、その発現機序を明らかにすることである。本研究に使用したDHP系  $\text{Ca}^{2+}$  アゴニストは、そのアゴニスト作用に強い膜電位依存性があることが報告されている YC-170、および  $\text{Ca}^{2+}$  アゴニストとして最初に報告され、単一チャネル・レベルにおける解析が最も進んでいる BAY K 8644である。

II 実験方法

ウサギ単一心室筋細胞を、既に記載されている方法（Tohse, 1990）にしたがって分離した。すなわち、ウサギから摘出した心臓をランゲンドルフ式に、collagenase (0.01% Wt. / vol. 和光純薬) を含む無  $\text{Ca}^{2+}$  Tyrode 液にて灌流した後、心室を細切して細胞を分離した。Tyrode 液の組成は、 $\text{NaCl}$  143.9 :  $\text{KCl}$  5.4 :  $\text{CaCl}_2$  1.8 :  $\text{MgCl}_2$  0.5 : glucose 5.5 : HEPES - NaOH buffer 5 mM (pH7.4) であり、無  $\text{Ca}^{2+}$  Tyrode 液はこの組成から  $\text{CaCl}_2$  を除去して作成し

た。Hamill ら (Pflügers Arch, 1982) の patch clamp を用いて、单一チャネル電流を記録した。電極内液は、110mM BaCl<sub>2</sub> とし、高カリウム液 (KCl 145 : MgCl<sub>2</sub> 0.5 : glucose 5.5 : EGTA 10 : HEPES 5 mM を含み KOH にて pH 7.4 に調整) 中に細胞を置いて、保持電位 (HP) を -80mV、あるいは、-40mV として 0 mV ～ 50ms の脱分極パルスを 0.5Hz の頻度であたえて Ca<sup>2+</sup> チャネル電流を記録した。薬物の濃度は、それぞれのアゴニスト作用が最大となる濃度を用い、YC-170 については 10 μM、BAY K 8644 については 1 μM であった。

### III 実験結果

HP を -80mV として、YC-170 を灌流液中に投与すると、bursting 様開口が著明に増加し、遷延性開口が頻繁に観察される様になった。YC-170 により NP<sub>o</sub> 値は 710 ± 96% に増加した (n = 5)。平均開口時間は YC-170 により 0.50 ± 0.03ms から、1.2 ± 0.05ms に増加した (n = 5)。このことは、開口時間のヒストグラムにおいて、YC-170 により、薬物非存在下ではみられなかった遅い成分が出現したことに対応する。HP を -40mV とした場合、YC-170 により、遷延性開口が観察されたが、無開口掃引は増加し、NP<sub>o</sub> 値は 94 ± 6.6% とわずかに減少した (n = 5)。平均開口時間は 0.64 ± 0.05ms から、1.2 ± 0.11ms に増加し (n = 5)、開口時間のヒストグラムにおいて、やはり遅い成分が出現した。以上のごとく、YC-170 のアゴニスト作用には強い膜電位依存性がみられたが、開口時間を延長する作用については膜電位依存性はみられなかった。このことは、YC-170 のアゴニスト作用の膜電位依存性は開口時間の延長作用とは別の作用機序が膜電位に依存することによることを示唆する。YC-170 の Ca<sup>2+</sup> チャネルの開口頻度に対する作用について検討したところ、YC-170 は HP -80mV では開口頻度を 231.9 ± 33.2% と著明に増加させたが、HP -40mV では 70.6 ± 14.2% と、むしろ減少させた。このことは閉口時間のヒストグラムにおいて、HP -80mV では YC-170 により遅い時定数が小さくなつたが、HP -40mV では遅い時定数が大きくなつたことに対応するものである。また、YC-170 は HP -80mV では無開口掃引を減少させ、HP -40mV では無開口掃引を増加させた。これらの結果は YC-170 が HP -80mV では Ca<sup>2+</sup> チャネルの再開口を促進するが、HP -40mV では Ca<sup>2+</sup> チャネルの開口を抑制することを示唆する。

BAY K 8644 は HP -80mV としても、-40mV としても、開口時間を著明に延長し、NP<sub>o</sub> 値は HP -80mV において 920 ± 93% (n = 5) に、HP -40mV において 990 ± 85% に増加した (n = 5)。この様に、BAY K 8644 のアゴニスト作用には膜電位依存性はみられなかった。BAY K 8644 により、平均開口時間は YC-170 に比し著明に延長し、HP -80mV では 0.66 ±

0.09ms から  $3.3 \pm 0.50$ ms に (n = 3), HP -40mV では  $0.68 \pm 0.06$  から,  $4.9 \pm 1.2$ ms に増加し (n = 4), いずれの HP においても, 開口時間のヒストグラムでは BAY K 8644により, 薬物非存在下ではみられなかった遅い成分が出現した。BAY K 8644は HP を -80mV としたときには  $104.9 \pm 5.2\%$  と開口頻度を変化させなかったが, -40mV としたときには  $138.5 \pm 20.7\%$  とわずかに増加させた。閉口時間のヒストグラムでは, いずれの HP においても BAY K 8644により遅い時定数が小さくなかった。HP -80mV では BAY K 8644により無開口掃引の頻度は減少した。これらの結果から, BAY K 8644はどちらの HP においても  $\text{Ca}^{2+}$  チャネルの再開口を促進すると考えられる。

#### IV 考 察

本研究は, DHP 系薬物の L型  $\text{Ca}^{2+}$  チャネルに対するアゴニスト作用には, 2つの機序が関与していることを明らかにした。ひとつはチャネルの開口時間の延長であり, いまひとつはチャネル再開口の促進である。DHP 系薬物の開口時間延長作用には膜電位依存性はなく, 再開口促進作用に膜電位依存性が存在すると考えられた。YC-170は BAY K 8644に比し, 開口時間の延長の程度は小さく, アゴニスト作用を示した -80 mV の HP において再開口を著明に促進したことから, YC-170のアゴニスト作用は主に再開口の促進によると考えられる。一方, BAY K 8644は開口時間を著明に延長させたが, 再開口を促進する作用は YC-170に比し弱く, BAY K 8644のアゴニスト作用は主に開口時間の延長によるものであると考えられた。また, 浅い膜電位 (-40mV) における YC-170による再開口の抑制と無開口掃引の増加は, この薬物が  $\text{Ca}^{2+}$  チャネルに対し抑制作用を及ぼしていることを示すものであるが, この作用の発現に関わる薬物の作用点は, 深い膜電位 (-80mV) における, 再開口促進と無開口掃引の減少というアゴニスト作用の発現に関わる作用点と同一であると考えられる。以上の知見により, DHP の L型  $\text{Ca}^{2+}$  チャネルに対する作用点が 2つあることが示唆される。すなわち, 1つは遷延性開口を促進する部位であり, もう 1つはチャネルが開口するか否か (あるいは再開口するか否か) を決定する部位である。前者には膜電位依存性はなく, 後者にのみ膜電位依存性があると考えられる。

## 学位論文審査の要旨

主査 教授 菅野盛夫

副査 教授 小山富康

副査 教授 齋藤秀哉

L型  $\text{Ca}^{2+}$  チャネルに特異的に結合して、その機能を修飾する一連のジヒドロピリジン(DHP)系薬物の  $\text{Ca}^{2+}$  チャネルに対する作用は、抑制的であれ、促進的であれ、膜電位を変化させることによりその程度が変化したり、時には作用の方向が逆転することがよく知られている。しかし、その膜電位依存性の機序は明確ではなく、单一チャネルのレベルで記録した  $\text{Ca}^{2+}$  チャネル活動に基づいた詳細な解析は未だなされていない。本論文の研究目的は、心筋L型  $\text{Ca}^{2+}$  チャネルの单一チャネル活動を記録し、 $\text{Ca}^{2+}$  チャネルに促進的に作用する DHP 系薬物の  $\text{Ca}^{2+}$  チャネル動態におよぼす影響の膜電位依存性を比較検討し、その発現機序を明らかにすることである。

本研究に使用した DHP 系  $\text{Ca}^{2+}$  アゴニストは、そのアゴニスト作用に強い膜電位依存性がある YC-170 と、最初に報告された  $\text{Ca}^{2+}$  アゴニストである BAY K 8644 で、薬理学的には妥当な選択と言える。

実験には酵素法で分離したウサギ単一心室筋細胞を用いて、Hamill らが記載した patch clamp 法により単一  $\text{Ca}^{2+}$  チャネル電流を記録した。保持電位 (HP) を  $-80\text{mV}$ 、あるいは、 $-40\text{mV}$  とし、 $0\text{mV}$  ～ $50\text{ms}$  の脱分極パルスを  $0.5\text{Hz}$  の頻度でたてて記録した  $\text{Ca}^{2+}$  チャネル電流トレースから、開口時間、閉口時間、開口確率、開口時間および閉口時間のヒストグラム、開口頻度を求め、アゴニスト作用が最大となる濃度の YC-170 ( $10\text{\mu M}$ ) および BAY K 8644 ( $1\text{\mu M}$ ) を用い、これら薬物のチャネル促進作用の膜電位依存性を比較検討した。

得られた結果は次の通りである。HP を  $-80\text{mV}$  として、YC-170 を灌流液中に投与すると、bursting 様開口の著明増加と遷延性開口の発現が観察され、開口確率 (NPo 値) の増加と平均開口時間の延長を認めた。後者に対応して、開口時間のヒストグラムに遅い成分が出現した。HP を  $-40\text{mV}$  にすると、YC-170 により HP が  $-80\text{mV}$  の場合と同程度に平均開口時間は増加したが、無開口掃引は増加し NPo 値はわずかに減少した。開口時間ヒストグラムにやはり遅い成分が出現した。この様に、YC-170 のアゴニスト作用には強い膜電位依存性がみられたが、開口時間の延長については膜電位依存性はみられず、開口時間の延長作用とは別の機序が膜電位に依存するすることが示唆された。開口頻度に対して、YC-170 は HP  $-80\text{mV}$  では著明に増

加させたが、HP-40mVでは減少させ、強い膜電位依存性を示した。これを反映して、二つの指数関数からなる閉口時間ヒストグラムにおいて、HP-80mVでは遅い成分の時定数が小さくなつたが、HP-40mVでは大きくなつた。また、YC-170はHP-80mVでは無閉口掃引を減少させ、HP-40mVでは無閉口掃引を増加させた。これらの結果は、YC-170がHP-80mVではCa<sup>2+</sup>チャネルの再開口を促進するが、HP-40mVではCa<sup>2+</sup>チャネルの開口を抑制することを示唆する。

BAY K 8644は、いずれの保持電位において、開口時間を著明に延長し、NPo値を同程度に増加した。すなわち、BAY K 8644のアゴニスト作用には膜電位依存性はみられなかった。開口頻度に対して、BAY K 8644はYC-170と異なり、HPを-80mVとした時には影響を与えず、-40mVではわずかに増加させた。HP-80mVではBAY K 8644により無閉口掃引の頻度は減少した。これらの結果は、BAY K 8644はどちらのHPにおいてもCa<sup>2+</sup>チャネルの再開口を促進することを示している。

以上の結果から、DHP系薬物のL型Ca<sup>2+</sup>チャネルに対するアゴニスト作用には2つの機序、すなわち、チャネル開口時間の延長とチャネルの再開口の促進が関与していて、開口時間延長作用には膜電位依存性はなく、再開口促進作用に膜電位依存性が存在すると結論した。Ca<sup>2+</sup>チャネル動態への作用から、YC-170のアゴニスト作用は主に再開口の促進によると考え、一方、BAY K 8644のアゴニスト作用は主に開口時間の延長によると考えた。さらに、浅い膜電位(-40mV)で観察されたYC-170による再開口の抑制と無閉口掃引の増加は、Ca<sup>2+</sup>チャネルへのアンタゴニスト作用を意味するが、その作用点は深い膜電位でのアゴニスト作用の発現に関わる作用点と同一と考えられるとしている。

口頭発表に際して、斎藤(秀)教授より、YC-170の浅い保持電位での作用特性および検討した二つの保持電位の中間での作用特性、さらに、両薬物の作用部位の相違について、小山教授より、膜電位依存性を示したYC-170の膜電位が変化する病態時の薬理学的特性、ならびにCa<sup>2+</sup>チャネルの分子構造とDHP系薬物の作用点や膜電位にともなう構造の変化について試問がなされたが、申請者は概ね適切な解答を成し得た。さらに、副査の斎藤教授および小山教授に面接による試問を受け、合格と判定されている。

したがって、Ca<sup>2+</sup>チャネルにアゴニスト作用を示すジヒドロピリジン系薬物について、アゴニスト作用の膜電位依存性機序を单一チャネル活動の解析から検討して、アゴニスト作用の二つの作用点を提唱した本論文は、博士(医学)号を授与するに値するものと判定する。