

氏 名 福永 健太郎

学 位 の 種 類 博士 (医学)

学 位 記 番 号 博士甲第771号

学 位 授 与 の 要 件 学位規則第4条第1項

学 位 授 与 年 月 日 平成29年 3月10日

学 位 論 文 題 目 Involvement of Ca<sup>2+</sup> Signaling in the Synergistic Effects  
between Muscarinic Receptor Antagonists and  $\beta_2$ -  
Adrenoceptor Agonists in Airway Smooth Muscle

(気道平滑筋でのムスカリン受容体拮抗薬と $\beta_2$ アドレナリン  
受容体刺激薬の相乗作用における細胞内 Ca<sup>2+</sup>シグナリングの  
関与)

審 査 委 員 主査 教授 清水 猛史

副査 教授 村田 喜代史

副査 教授 永田 啓

## 論文内容要旨

※整理番号	778	(ふりがな) 氏名	ふくなが けんたろう 福永 健太郎
学位論文題目	Involvement of $Ca^{2+}$ Signaling in the Synergistic Effects between Muscarinic Receptor Antagonists and $\beta_2$ -Adrenoceptor Agonists in Airway Smooth Muscle (気道平滑筋でのムスカリン受容体拮抗薬と $\beta_2$ アドレナリン受容体刺激薬の相乗作用における細胞内 $Ca^{2+}$ シグナリングの関与)		
<p><b>[背景]</b>          長時間作用性ムスカリン受容体拮抗薬(long-acting muscarinic antagonist : LAMA)の定期吸入は, COPD 患者の症状や呼吸機能の改善をもたらす. 一方, 短時間作用性 <math>\beta_2</math> 刺激薬 (short-acting <math>\beta_2</math>-agonist : SABA) は COPD 患者が運動や日常動作を行う際に, 呼吸困難を軽減するためにアシストユースとして使用される. 両者は COPD の治療において重要な役割を果たしている. この研究では, モルモットの気管平滑筋を用いて, LAMA を前投与した際に SABA の気管支拡張効果が有意に増強するかどうか検討した. さらに, 両者による気管支拡張効果の相乗作用のメカニズムについて, 気管平滑筋細胞内 <math>Ca^{2+}</math> シグナリングに焦点をあてて検討した.</p> <p><b>[方法]</b>          モルモットの気管平滑筋の切片を, Fura2 で負荷し, 実験槽内に装着して, 等尺性収縮と細胞内 <math>Ca^{2+}</math> の指標である F340/F380 を測定した. 薬剤は, SABA として, Procaterol (PRO) および Salbutamol (SB), LAMA として Glycopyrronium bromide (GB) および Tiotropium bromide (TIO), 選択的 <math>K_{Ca}</math> channel 阻害薬として Iberitoxin(IbTx), Rho-kinase 阻害剤として Y-27632, Protein kinase C (PKC) 阻害剤として Bisindolylmalamide (BIS) を使用した. 各試薬の投与時間は 15 分とした. <math>1\mu M</math> MCh で収縮させた気管平滑筋の切片に, PRO および SB 単剤を濃度を変化させ累積的に投与し, 各濃度における平滑筋弛緩率と F340/F380 変化率を算出した. 次に <math>3 nM</math> GB を 15 分間先行投与し, <math>3 nM</math> GB 存在下で PRO あるいは SB を濃度を変更して投与し, <math>3 nM</math> GB と, 両者併用時の平滑筋弛緩率および F340/F380 変化率を算出した. さらに <math>K_{Ca}</math> チャネル, Rho kinase, PKC の関与を調べるために, <math>1\mu M</math> MCh で収縮させた気管平滑筋の切片に, これらの阻害剤を先行投与し, その後 <math>3 nM</math> GB と <math>1 nM</math> PRO を併用し, 平滑筋弛緩率および F340/F380 の変化率を算出した. 相乗効果の客観的な評価としては, Bliss independence (BI) theory を用いた.</p>			

- (備考) 1. 論文内容要旨は, 研究の目的・方法・結果・考察・結論の順に記載し, 2千字程度でタイプ等を用いて印字すること.  
 2. ※印の欄には記入しないこと.

**[結果]**

1  $\mu$ M MCh で収縮した組織に 3 nM GB を先行投与し、その後に PRO (0.1, 0.3, 1 nM) または SB (3, 10 nM) を投与したところ、平滑筋は両者の弛緩率の和と比較して相乗的に弛緩したが、F340/F380 は変わらなかった。この現象は 1 nM TIO と PRO の併用でも同様に認められた。BIS 存在下で、3 nM GB を投与すると、2 剤の抑制率と比較して、F340/F380 の減少は認めず、張力は相乗的に弛緩した。一方、この現象は、Y-27632 では見られなかった。また選択的  $K_{Ca}$  チャネル阻害剤である IbTx の存在下で、GB と PRO あるいは SB の相乗効果を検討したところ、相乗効果は、IbTX の投与で著明に抑制された。

**[考察]**

今回の研究により、LAMA の存在下に SABA を投与することで、気管平滑筋を相乗的に弛緩させることが示された。その機序として細胞内  $Ca^{2+}$  動態だけでなく、細胞内  $Ca^{2+}$  感受性が関与していることが示唆された。気管平滑筋の収縮および弛緩における細胞内  $Ca^{2+}$  感受性は、RhoA/Rho-kinase あるいは PKC を介する経路が知られている。今回の研究では、GB と SABA を併用した際の張力および F340/F380 の抑制効果は、BIS と GB を併用した際の抑制効果と同様であったが、Y-27632 と GB を併用した際の抑制効果とは異なっていた。そのため、LAMA と SABA の相乗効果の機序の一つとして、PKC による  $Ca^{2+}$  感受性の抑制が考えられた。 $K_{Ca}$  チャネルは、 $\beta_2$  受容体とムスカリン受容体において、機能的に拮抗しており、このことが相乗効果に寄与していることが予想される。今回の研究においても、選択的  $K_{Ca}$  チャネル阻害剤である IbTx を先行して投与すると、SABA と LAMA の平滑筋弛緩作用が、F340/F380 の抑制率の減少を伴って、相乗的に抑制された。そのため、 $\beta_2$  刺激薬とムスカリン受容体拮抗薬の併用による平滑筋弛緩の相乗効果には、 $K_{Ca}$  チャネルを介した細胞内  $Ca^{2+}$  動態が関与していることが示唆された。

**[結論]**

LAMA 存在下で SABA を投与することで、気管平滑筋は相乗的に弛緩した。その機序として、PKC を介した細胞内  $Ca^{2+}$  感受性の減弱および  $K_{Ca}$  channel の活性化を介した細胞内  $Ca^{2+}$  動態の抑制が重要な役割を果たしている。COPD の治療において、ムスカリン受容体拮抗薬と  $\beta_2$  受容体刺激薬の併用は、上述した機序を介して COPD の症状緩和ならび呼吸機能の改善に有効であることが薬理的にも示唆された。

## 学位論文審査の結果の要旨

整理番号	778	氏名	福永健太郎
論文審査委員			
<p>(学位論文審査の結果の要旨) ※明朝体 11ポイント、600字以内で作成のこと</p> <p>本論文は、モルモットの気管平滑筋を用いて、ムスカリン受容体刺激による平滑筋収縮に対する、<math>\beta_2</math>受容体刺激薬とムスカリン受容体拮抗薬の平滑筋弛緩に関する相乗作用の発現と、その細胞内 <math>Ca^{2+}</math>シグナリングについて検討を行い、以下の点を明らかにした。</p> <ol style="list-style-type: none"><li>1) 長時間作用性ムスカリン受容体拮抗薬 (LAMA) を先行投与し、短時間作用性 <math>\beta_2</math>受容体刺激薬 (SABA) を併用すると、気管平滑筋は相乗的に弛緩した。</li><li>2) 細胞内 <math>Ca^{2+}</math>濃度の抑制を増強することなく、張力を有意に弛緩したことから、この相乗作用には細胞内 <math>Ca^{2+}</math>-independent な経路が関与していることが示唆された。</li><li>3) PKC 阻害剤である bisindorylmalaimide (BIS) を用いた実験により、この相乗効果の機序の一つとして、PKC を介する細胞内 <math>Ca^{2+}</math>-independent な経路の抑制が考えられた。</li><li>4) 選択的 <math>K_{Ca}</math>チャネル阻害剤を用いた実験により、この相乗効果には <math>K_{Ca}</math>チャネルを介した細胞内 <math>Ca^{2+}</math>動態が関与していることも示唆された。</li></ol> <p>本論文は、<math>\beta_2</math>受容体刺激薬とムスカリン受容体拮抗薬の併用による、気管平滑筋弛緩作用とその機序について新たな知見を与えたものであり、また最終試験として論文内容に関連した試問を実施したところ合格と判断されたので、博士(医学)の学位論文に値するものと認められた。</p> <p style="text-align: right;">(総文字数 576文字) (平成 29年 1月 23日)</p>			