

論文内容要旨

論文題目

Azelnidipine reduces cell-surface expression of $Ca_v1.2$
(アゼルニジピンによる $Ca_v1.2$ 膜発現量の減少)

責任講座： 薬理学 講座
氏 名： 那須 史明

【内容要旨】(1,200 字以内)

背景:第三世代ジヒドロピリジン系 Ca^{2+} チャネル遮断薬であるアゼルニジピンの降圧作用は特徴的であり、血漿中濃度がゼロになったあとも作用が持続する。この特徴的な作用は、アゼルニジピンが血管平滑筋に長くとどまるためであると考えられているが、詳細は不明である。一方、電位依存性イオンチャネルは、開口確率の変化など質的な制御に加え、チャネル数の変化である量的な制御を受ける。受容体を量的に修飾する薬物では、しばしば血漿中濃度とその作用は相関しないことから、アゼルニジピンの特徴的な降圧作用にも $Ca_v1.2$ の量的修飾が関与する可能性を考えた。

目的:アゼルニジピンが $Ca_v1.2$ を量的に修飾するかどうかを明らかにする。

方法: $Ca_v1.2$ (α_{1c} サブユニット)、 β_{2c} 及び $\alpha_2\delta$ サブユニットを発現させた HEK293 細胞及び、内因性に $Ca_v1.2$ チャネルが発現しているラット肺動脈平滑筋細胞を用いた。薬物処置による $Ca_v1.2$ 蛋白発現量ならびに mRNA 発現量の変化を、蛍光免疫染色法及びウェスタンブロッティング法、定量的 RT-PCR 法により検討した。

結果・考察:①蛍光免疫染色法： $Ca_v1.2$ チャネルを発現させた HEK293 細胞を用いた検討によって、アゼルニジピン $10 \mu M$ 6 hr 処置により $Ca_v1.2$ の膜発現量が減少することが明らかになった。このとき細胞内には $Ca_v1.2$ が存在していたが、その局在はインターナリゼーションの初期段階である初期エンドソームとは異なっていた。アゼルニジピンによる $Ca_v1.2$ 膜発現量の減少は、ダイナミン阻害剤である dynasore 処置では抑制されなかった。比較として用いたジヒドロピリジン系 Ca^{2+} チャネル遮断薬であるニカルジピン、アムロジピンでは、 $Ca_v1.2$ 膜発現量の減少は認められなかった。②ウェスタンブロッティング法：HEK293 細胞及びラット肺動脈平滑筋細胞を用いて検討したところ、アゼルニジピンは異所性に発現させた $Ca_v1.2$ 及び内因性の $Ca_v1.2$ を減少させることが明らかになった。続いて、HEK293 細胞を用いて検討したところ、アゼルニジピンによる $Ca_v1.2$ の減少はプロテアソーム阻害剤である MG132 によって抑制された。また、アゼルニジピンは $Ca_v1.2$ のシャペロン蛋白である β_{2c} 蛋白を減少させなかった。③定量的 RT-PCR 法：ラット肺動脈平滑筋細胞を用いた検討によって、アゼルニジピンは $Ca_v1.2$ の転写には影響を与えないことが明らかになった。

以上の結果から、アゼルニジピンによる $Ca_v1.2$ 蛋白の減少にはプロテアソーム系による分解が関与しており、その結果 $Ca_v1.2$ の膜発現量が減少している可能性が示唆された。アゼルニジピンによるこの現象は、他のジヒドロピリジン系 Ca^{2+} チャネルブロッカーでは見られない新たな作用である可能性が示唆された。

平成 29 年 1 月 12 日

山形大学大学院医学系研究科長 殿


学位論文審査結果報告書

申請者氏名： 那須 史明

論文題目： Azelnidipine reduces cell-surface expression of Ca_v1.2

(アゼルニジピンによる Ca_v1.2 膜発現量の減少)


審査委員： 主審査委員

真弘 光章 

副審査委員

白石 正 

副審査委員

佐藤 慎哉 

審査終了日：平成 29 年 1 月 10 日

【 論 文 審 査 結 果 要 旨 】

第三世代ジヒドロピリジン系 Ca²⁺チャネル遮断薬であるアゼルニジピンの降圧作用は血漿中濃度がゼロになった後も作用が持続する特徴がある。

電位依存性イオンチャネルは、開口確率の変化など質的な制御に加え、チャネル数の変化による量的な制御を受けるとされ、アゼルニジピンの特徴的な降圧作用には Ca_v1.2 の量的修飾が関与する可能性が推測され、以下の一連の研究を行った。研究方法には、Ca_v1.2 (α_{1c} サブユニット)、β_{2c} 及び α_{2δ} サブユニットを発現させた HEK293 細胞、及び、内因性に Ca_v1.2 チャネルが発現しているラット肺動脈平滑筋細胞を用い、薬物処置による Ca_v1.2 蛋白発現量ならびに mRNA 発現量の変化、蛍光免疫染色法及びウェスタンブロッティング法、定量的 RT-PCR 法により検討した。

蛍光免疫染色法では、アゼルニジピン 10 μM 投与下の 6 hr 処置により Ca_v1.2 の膜発現量が減少することが明らかとなり、これは他のジヒドロピリジン系 Ca²⁺チャネル遮断薬では見られない現象であった。このアゼルニジピンによる Ca_v1.2 膜発現量の減少は、ダイナミン阻害剤である dynasore 処置で抑制されず、インターナリゼーションによる膜発現量減少の経路は否定された。一方でアゼルニジピンは異所性に発現させた Ca_v1.2 及び内因性の Ca_v1.2 を減少させ、その Ca_v1.2 の減少はプロテアソーム阻害剤である MG132 によって抑制されることがウェスタンブロッティング法で明らかになった。また、RT-PCR 法でアゼルニジピンは Ca_v1.2 の転写には影響を与えないこと判明した。

以上の結果から、アゼルニジピンによる Ca_v1.2 蛋白の減少にはプロテアソーム系による分解が関与しており、その結果 Ca_v1.2 の膜発現量が減少している可能性が示唆され、他のジヒドロピリジン系 Ca²⁺チャネルブロッカーでは見られない新たな作用である可能性が示唆された。本研究は Ca²⁺チャネルブロッカーの作用に関する新知見を導くとともに、研究手法も確立しており、審査委員会は医学博士 (博士課程) に値するものと判断した。