

氏 名 ・ (本籍)	新保 知規 (新潟県)
専攻分野の名称	博士 (医学)
学 位 記 番 号	医博甲第 934 号
学位授与の日付	平成 29 年 3 月 22 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研 究 科 ・ 専 攻	医学系研究科医学専攻
学 位 論 文 題 名	In vitro effect of nicorandil on the carbachol-induced contraction of the lower esophageal sphincter of the rat (カルバコールによって収縮させたラット下部食道括約筋に対するニコランジルの抑制作用)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教授 吉富 健志 (副査) 教授 飯島 克則 教授 本山 悟

学位論文内容要旨

In vitro effect of nicorandil on the carbachol-induced contraction of the lower esophageal sphincter of the rat

(カルバコールによって収縮させたラット下部食道括約筋に対するニコランジルの抑制作用)

申請者氏名 新保 知規

研究目的

下部食道括約筋 (Lower Esophageal Sphincter, LES) は食道から胃への移行部に位置し、輪状及び縦走平滑筋からなる構造をしている。LES は食道から胃への食物通過を促進する一方で、胃から食道への胃内容物の逆流を防ぐ等重要な役割を担っており、その機能は自律神経系や神経因性物質により制御されている。中でも、一酸化窒素 (Nitric oxide, NO) は抑制性の神経伝達物質として自律神経末端より分泌されるのみならず、平滑筋により合成・分泌され、平滑筋細胞に存在する Ca 依存性 K チャネルを活性化させて筋弛緩をもたらすことが報告されている。日常臨床においてみられる痙性括約筋機能障害において、亜硝酸剤や Ca 拮抗薬がしばしば著効を示すことが知られており、内因性 NO のみならず外から投与した NO も LES の弛緩をもたらすことが期待される。Nicorandil は NO ドナーとしての役割と K_{ATP} チャネルアゴニストとしての役割を有する薬物として開発され、血管拡張薬として主に狭心症の治療に用いられている。しかしながら、LES に対する Nicorandil の効果については未だ報告されていない。

本研究では、下部食道平滑筋に対する Nicorandil の作用とその機序を明らかにすることを目的とし、1) ラット下部食道のリング標本を用いた収縮張力の測定、および 2) RT-PCR 法、免疫組織染色による K_{ATP} チャネルサブユニットの同定をおこなった。

研究方法

研究には、体重 230-520g の雄 Wistar ラットを用いた。ペントバルビタール腹腔内投与 (50mg/kg) による麻酔後に食道から胃上部までを一括して摘出し、幅 3mm の LES リング標本を作製した。LES 標本を実験槽に移した後、一端を実験槽に固定し、他端は張力測定用のトランスデューサーに接続した。実験槽には酸素化したタイロッド液を灌流し 35℃に維持す

るとともに、リング標本の静止張力が 1g となるよう負荷をかけ、1 時間以上安定したことを確認し、各種薬物の投与実験を開始した。

K_{ATP} チャネルの 2 種類のサブユニット (Kir6.x 及び SURx) の同定は、RT-PCR 法及び免疫組織染色によりおこなった。RT-PCR 法においては、KCNJ8 (Kir6.1)、KCNJ11 (Kir6.2)、ABCC8 (SUR1) 及び ABCC9 (SUR2) に対するプライマーを作成し、上部、中部及び下部食道標本に対してサブユニットの検出をおこなった。また、それぞれのサブユニットに対する抗体を用いて免疫組織染色をおこなった。

研究成績

LES リング標本を用いた収縮測定実験の結果は次の通りである。

- カルバコールによって予め収縮させたラット LES 標本に対して、 K_{ATP} チャネル開口薬である Nicorandil、Diazoxide、Pinacidil はいずれも用量依存的に弛緩作用を示し、その 50% 抑制濃度 (IC_{50}) は、Pinacidil (1.2 μM) \gg Nicorandil (37.4 μM) $>$ Diazoxide (83.8 μM) の順であった。これは、平滑筋型 K_{ATP} チャネル (SUR2B/Kir6.2) において報告されている値と同等であった。
- Nicorandil の弛緩作用は、 K_{ATP} チャネル阻害薬 Glibenclamide により有意に抑制されたが、その効果は最大濃度 (100 μM) においても 50% 程度であった。一方、グアニル酸シクラーゼ阻害薬 (1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one, ODQ) や Ca 活性化 K チャネル阻害薬 iberiotoxin は Nicorandil の弛緩作用に対して無効であった。
- NO ドナーである sodium nitroprusside (SNP) は、カルバコールによって予め収縮させた LES を用量依存的に弛緩させ、その作用は ODQ により抑制されたものの、Ca 活性化 K チャネル阻害薬 (iberiotoxin, charybdotoxin) は無効であった。
- 高 K 液で収縮させた LES に対する効果を検討したところ、Ca 拮抗薬 Nifedipine は有意に弛緩させたが、Nicorandil 及び SNP は弛緩作用を示さなかった。

以上のことから、Nicorandil の LES 弛緩作用は主として K_{ATP} チャネルの活性化によると考えられた。また、 K_{ATP} チャネル及び Ca 依存性 K チャネル以外の K チャネルが、Nicorandil の LES 弛緩作用に部分的に関与していることが示唆された。

RT-PCR 法及び免疫組織染色においては、SUR1、SUR2、Kir6.1、Kir6.2 いずれも存在することが示された。

結論

Nicorandil は、予めカルバコールによって収縮させたラット LES を用量依存的に弛緩させた。Nicorandil による LES 弛緩作用は主として平滑筋型 K_{ATP} チャネル (SUR2B/Kir6.2) の活性化によると考えられ、さらに K_{ATP} チャネル及び Ca 依存性 K チャネル以外の K チャネルが、Nicorandil の弛緩作用に関与していることが示唆された。

学位（博士一甲）論文審査結果の要旨

主 査： 吉富 健志

申請者： 新保 知規

論文題名： In vitro effect of nicorandil on the carbachol-induced contraction of the lower esophageal sphincter of the rat. (カルバコールによって収縮させたラット下部食道括約筋に対するニコランジルの抑制作用)

要旨 下部食道括約筋(Lower Esophageal Sphincter, LES) は 食道から胃への移行部に位置し、食道から胃への食物通過を促進する一方で、胃から食道への胃内容物の逆流を防ぐ重要な役割を担っている。著者の研究は、LES に対する Nicorandil の影響を検討したものである。この薬剤は NO ドナーとしての役割と KATP チャネルアゴニストとしての役割を有する薬物として開発され、血管拡張薬として主に狭心症の治療に用いられている。しかしながら、LES に対する Nicorandil の 効果については未だ報告されていない。本研究では、ラット下部食道のリング標本を用いた収縮張力の測定を行って Nicorandil の効果を調べると同時に、RT-PCR 法、免疫組織染色による KATP チャネルサブユニットの同定を行い、作用機序の検討を行った。

本論文の斬新さ、重要性、実験方法の正確性、表現の明瞭さは以下の通りである。

1) 斬新さ

この研究では、雄 Wistar ラットを用いて幅 3mm の LES リング標本を作製し、カルバコールによって予め収縮させたラット LES 標本に対する Nicorandil の弛緩作用をさまざまな薬剤を用いてその作用機序を詳細に検討したもので、非常に意義のあるものと考えられる。本研究の斬新さは Nicorandil の LES に対する作用を初めて明らかにしたことにある。すなわち Nicorandil は平滑筋型 KATP チャネル(SUR2B/Kir6.2)の活性化で LES を弛緩させる。

さらに KATP チャネル及び Ca 依存性 K チャネル以外の K チャネルも Nicorandil の弛緩作用に関与していることを示唆している。

2) 重要性

常に LES が収縮した状態にある食道アカラシアについての薬物治療は、まだ不十分なものがある。今回の研究では少なくとも Nicorandil が平滑筋型 KATP チャネル(SUR2B/Kir6.2)の活性化という薬理作用で LES 弛緩に働くことが明らかになった。この薬剤が、LES に作用することを示したこの研究は将来的な食道アカラシア治療を考える上で臨床上也重要であると考えられる。

3) 実験方法の正確性

LES リング標本を用いた収縮測定実験は既に著者らのグループが開発し、報告した方法を用いている。さらに KATP チャネルの 2 種類のサブユニット(Kir6.x 及び SURx)の同定には、RT²-PCR 法及び免疫組織染色によりおこなっており、この方法にも特に問題はなく、統計学的検討も加えられており、客観的な評価法で、正確性があると考えられる。

4) 表現の明瞭さ

ラット LES 標本に対する Nicorandil の弛緩作用をを明らかにするための研究目的, 方法, 実験結果, 考察を簡潔、明瞭に記載していると考ええる。

以上述べたように、本論文は学位を授与するに十分値する研究と判定された。