

学位論文

「Anoctamin 1 antagonism potentiates conventional
tocolytic-mediated relaxation of pregnant human uterine
smooth muscle

(アノクタミン 1 拮抗薬は、従来の子宮収縮抑制薬による妊娠ヒ
ト子宮平滑筋弛緩作用を増強する)」

指導教授名 岡本 浩嗣

申請者氏名 日向 俊輔

著者の宣言

本学位論文は、著者の責任において実験を遂行し、得られた真実の結果に基づいて正確に作成したものに相違ないことをここに宣言する。

学位論文要旨

背景

切迫早産は分娩 10 件当たり 1 件の割合で発生し、米国における新生児死亡原因の第 1 位となっている。しかしながら、現在切迫早産の治療に使用されている子宮収縮抑制薬には、48 時間以上の早産に対して有効な治療薬が存在しない。その主な理由は、母体に低血圧や頻脈などの副作用が生じ、有効な定常状態の薬物濃度を維持できないことにある。切迫早産の薬理的治療法には、このような副作用を軽減する方法が求められているが、その一つとして相乗効果のある複数の薬剤を組み合わせる方法がある。私たちはこれまでに、3 種類のアノクタミン 1 (Anoctamin 1 ; ANO1) 拮抗薬 (ベンズブロマロン (Benzbromarone ; BB)、タニン酸、MONNA (MN)) が、妊娠正期のヒト子宮平滑筋に対し強力な弛緩作用を持つことと、それぞれの薬理的相違について報告している¹⁾。本研究では、従来からある子宮収縮抑制薬 (L 型電位依存性カルシウムチャネル (voltage-gated calcium channels ; VGCC) 遮断薬のニフェジピン (nifedipine; NIF) および $\beta 2$ アドレナリン ($\beta 2$ -adrenoreceptor ; $\beta 2$ AR) 作動薬のテルブタリン (terbutaline; TRB) のいずれかと 2 種類の ANO1 拮抗薬 (BB および MN) のいずれかを、それぞれ効果発現濃度以下の用量で混合した場合、ヒト子宮筋弛緩作用を増強するかどうかを調べることを目的とした。

目的

本研究では、2 種類の ANO1 拮抗薬 (BB および MN) と従来の子宮収縮抑制薬との相乗効果とそのメカニズムを検討した。評価したエンドポイントは、妊娠正期のヒト子宮筋組織の弛緩、細胞内カルシウム放出の抑制、およびヒト子宮平滑筋細胞における自発的一過性内向き電流 (spontaneous transient inward current ; STIC) 記録の減少である。

方法

ヒト子宮平滑筋組織およびヒト子宮平滑筋細胞を用いて、ANO1 拮抗薬 (BB および MN) と NIF または TRB のそれぞれ最小効果発現濃度以下の用量を異なる組み合わせで用いた妊

妊娠ヒト子宮平滑筋切片を用いたオルガンバス試験、妊娠ヒト子宮平滑筋細胞を用いたカルシウム流出試験およびパッチクランプ電気生理学試験を行い、ANO1拮抗薬が従来から用いられている子宮収縮抑制薬であるVGCC遮断薬や $\beta 2AR$ 作動薬の効果を増強するかどうかを検討した。また相互作用の機序を考察すべく、カルシウムカルモジュリン依存性タンパク質キナーゼ(calmodulin-dependent protein kinase ; CaMK) IIの阻害によって、効果発現濃度以下のANO1拮抗薬とTRBの組み合わせによるオキシトシン誘発性ヒト子宮平滑筋収縮の抑制に変化が生じるか検討した。

結果

ANO1拮抗薬(BBおよびMN)とNIFまたはTRBとの低用量の組み合わせにより、ヒトUSM細胞におけるオキシトシン誘発性収縮とカルシウム流出は相乗的に抑制された。また、TRBとANO1拮抗薬の併用によりSTICの減少が認められた。さらに、CaMKIIの阻害によって、TRBとBBの相乗的な弛緩作用は減弱した。

結論

効果発現濃度以下のVGCC遮断薬と $\beta 2AR$ 作動薬にANO1拮抗薬を併用することで、*ex vivo*での妊娠正期ヒト子宮平滑筋に対するオキシトシン誘発性収縮とカルシウム放出の弛緩作用が増強された。NIFとANO1拮抗薬の相乗効果に関しては、ANO1を遮断することで起こる過分極によってヒト子宮平滑筋細胞におけるVGCCの閾値電圧への到達能力を減弱させることによると考えられる。またTRBとANO1拮抗薬との相乗効果に関しては、TRBが双方の重要な媒介者であるCaMKIIを介して、ANO1の活性に影響を与えることが示唆された。本研究によりANO1拮抗薬とTRBおよびNIFとの相乗効果の機序が明らかとなったことで、切迫早産を管理するための新しい子宮収縮抑制薬の混合療法(multimodal tocolysis)の開発につながる可能性がある。

引用文献1. Hyuga S, et al. J Smooth Muscle Res. 2018; 54 :28-42.

目次

	頁
1. 序論 -----	1
2. 方法	
2-1. 試薬・化学物質 -----	3
2-2. ヒト USM 検体 -----	3
2-3. 細胞培養 -----	3
2-4. カルシウムフラックス試験 -----	3
2-4-1. 予備的な単剤投与による用量反応性試験 -----	3
2-4-2. 併用薬物増強試験 -----	4
2-5. 機能的なオルガンバスでの収縮力の測定記録 -----	4
2-5-1. NIF および TRB の薬理学的特徴を明らかにするための予備的な単剤投与反応試験 -----	4
2-5-2. 併用薬物増強試験 -----	5
2-6. ANO1 阻害剤および β -作動薬の増強に対する CaMKII 阻害の効果 -----	5
2-7. テルブタリンを投与したヒト USM 細胞におけるパッチクランプ電気生理学的試験 -----	5
2-8. 統計分析 -----	6
3. 結果	
3-1. NIF と TRB は、細胞内カルシウム反応のピーク値とオキシトシンによる収縮力の両方を用量依存的に低下させる -----	6
3-2. 低用量 NIF と ANO1 の阻害剤：細胞内カルシウム反応とオキシトシンによる収縮力は 2 つの治療法の併用で有意に低下する -----	6
3-3. NIF と TRB は、細胞内カルシウム反応のピーク値とオキシトシンによる収縮力の両方を用量依存的に低下させる -----	7
3-4. テルブタリンはヒト USM 細胞の STIC を用量依存的に阻害する -----	8
3-5. CaMKII が仲介する、予備収縮させたヒト USM 短冊標本における β 2AR 作動薬と ANO1 阻害剤の併用による相乗的な弛緩作用 -----	9
4. 考察 -----	10
5. 総括 -----	11
6. 今後の課題 -----	11

7. 謝辞	11
8. 引用文献	11
9. 業績目録	15
9-1. 原著	15
9-2. 著書	15
9-3. 総説・講座	16
9-4. 症例・臨床治験・その他	16
(10. 図表	18)

1. 序論

早産 (preterm birth; PTB) は現在もなお、出産の 10 件に 1 件の割合で発生し、米国における新生児死亡の主要な原因となっている^{1,2)}。PTB の病因は様々であるが、PTB の最も一般的な原因の 1 つは切迫早産 (preterm labor; PTL) である。近年、プロゲステロン療法³⁾など PTB の予防法が進歩しているが、早期の開始が必要であり、自然発症の PTL の治療には適応されていない。現在使用されている子宮収縮抑制剤 (ニフェジピン

(nifedipine; NIF)、テルブタリン (terbutaline; TRB)、インドメタシン (indomethacin)) は、母体の副作用の併発により効果的な定常状態の薬物濃度を維持することができず、48 時間を超えると临床上の有効性が低下するという問題がある⁴⁾。これらの副作用は、NIF では低血圧、TRB では頻脈や頻尿などがある。PTL の有効性に限界があることから、PTL の薬理的治療には、母体の副作用を軽減する新しい治療戦略が必要である。他の疾患では、組み合わせて相乗効果を持つ薬剤を再利用して、各薬剤の投与量を減らして、慢性的な高用量治療後に発生することが知られている副作用を避けることに関心が高まっている⁵⁻¹⁰⁾。本論文は、すでに臨床で使用されている従来の子宮収縮抑制薬を、臨床的に有用な薬剤の組み合わせに転用できるかどうかを判断しようとするものである。薬剤の組み合わせが成功すると、最終的な機能経路を共有していることが多い。したがって、子宮の興奮と静止の両方のメカニズムを理解することが必要である。

子宮平滑筋 (uterine smooth muscle; USM) 細胞が活性化され、協調的に子宮を収縮させることは、複雑で多面的なプロセスである。それは、USM 細胞の収縮性作動薬受容体の変化、イオンチャネルの構成の変化、細胞間の活動電位を伝達するチャネルであるギャップ結合の増加などが関与している。このような変化により、子宮は、固有の興奮性が低い静止筋床から、固有の興奮性が高い、より反応性の高い収縮性 USM 表現型へと変化する¹¹⁻¹⁵⁾。このプロセスの重要な要素として、いくつかの USM 細胞のイオンチャネル間に、膜電位の変化を促す相互作用があると理解されている。特に、USM 細胞のイオンチャネルの影響を受けて、より低電位にシフトすると、電圧依存性イオンチャネル (電位依存性カルシウム チャネル [voltage-gated calcium channel ;VGCC] など) が活性化され、細胞内カルシウムの侵入が促進され、隣接する子宮筋細胞に広範に活動電位波が伝わる。ただし、これらのチャネルは電圧依存性であるため、活性化するためには脱分極の閾値を満たす必要があることを強調しておく必要がある。妊娠期と陣痛期が近づくと、USM の静止膜電位は閾値に近いところで脱分極するが、この先行的な脱分極ドライブには、カルシウム活性化塩素イオンチャネル (calcium-activated chloride channel ;CaCC) ファミリーが重要であると考えられている。CaCC 電流は、平滑筋の興奮性を調節する重要な因子であることが古くから知られている¹⁶⁻¹⁹⁾。興奮との機械的結合に関しては、Jones らが、VGCC を介してカルシウムが取り込まれると、CaCC が活性化されることを示し、子宮筋層の自然収縮とオキシトシン刺激収縮の両方において、CaCC と VGCC の関係を強調している¹⁶⁾。USM 細胞では、CaCC の活性化により、外向きの塩素イオン電流が増加し、子宮平滑筋細

胞の膜をさらに脱分極させ、興奮性を高める。このため、CaCC チャンネルを介した脱分極が VGCC (L 型) の活性化を促し、活動電位の発生を促進する可能性がある。

子宮平滑筋の興奮性を調節するもう一つの重要な因子は、 $\beta 2$ アドレナリン受容体 ($\beta 2$ adrenaline receptor; $\beta 2$ AR) である。 $\beta 2$ AR は G タンパク質共役受容体で、アデニルシクラーゼを活性化し、cAMP を増加させ、プロテインキナーゼ A (protein kinase A) を活性化する^{20,21)}。PKA は最終的にミオシン軽鎖のリン酸化を抑制し、間接的に平滑筋線維の弛緩を促進する。興味深いことに、 $\beta 2$ AR の作動薬は、Ca²⁺/カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ II (Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II; CaMKII) の活性化につながるという証拠がいくつかある²²⁻²⁴⁾。さらに、CaMKII が CaCC を阻害することが示唆されており²⁵⁾、最近では、CaMKII が CaCC として定着しているアノクタミン 1 (Anoctamin 1; ANO1) を特異的に阻害することが示されている²⁶⁻²⁸⁾。このことから、 $\beta 2$ AR の活性化は、CaMKII による阻害を介して、陣痛期における CaCC ANO1 の活性に影響を与えるのではないかと考えられる。

我々は、これまでに、ヒトとマウスの USM の収縮性を促進する上で、ANO1 の機能的な重要性を明らかにしてきた。ANO1 は、妊娠期間中、ヒトの子宮筋層組織に発現しており、これらのチャンネルを遮断することで、オキシトシンによって誘発されるヒトおよびマウスの USM 収縮性およびカルシウム放出が抑制される^{29,30)}。さらに我々は、いくつかの ANO1 拮抗薬 (ベンズブロマロン [benzbromarone; BB] およびモンナ [MONNA; MN] を含む) の、妊娠中のヒト USM の弛緩、収縮頻度の減少、細胞内カルシウム放出の抑制、および膜の過分極に対する効力の比較について報告した³¹⁾。CaCC と従来の子宮収縮抑制剤である VGCC や $\beta 2$ AR とのメカニズム的な相互作用を考慮すると、ANO1 拮抗薬とこれらの子宮収縮抑制剤を併用することで、より少ない投与量で効果を上げることができ、有害な副作用を回避できる可能性があるという仮説が立てられる。本研究は、ANO1 の拮抗作用が、L 型 VGCC 遮断薬 NIF や $\beta 2$ AR 作動薬 TRB の低用量投与と相乗的に作用して、オキシトシン誘発性のヒト USM の収縮とカルシウムフラックスを抑制するかどうかを確認することを目的としている。

2. 方法

2-1. 試薬・化学物質

すべての試薬は、特に明記しない限り、Sigma-Aldrich 社（米国ミズーリ州セントルイス）から購入した。BB、MN および NIF は、ジメチルスルホキシド（Dimethyl sulfoxide ; DMSO）に溶解させた。TRB は、二重蒸留水（double-distilled H₂O ; ddH₂O）に溶解させた。

2-2. ヒト USM 検体

治験審査委員会の承認を受けたプロトコル（#AAAL4005）に従い、妊娠 38～40 週の選択的帝王切開術後に行われた子宮切開の上部縁から、匿名化した新鮮なヒト子宮組織を採取した。すべての組織サンプルは、出産していない患者から採取されたものである。いずれの場合も、組織はすぐに氷上で冷やした無菌のハックス平衡塩溶液（Hanks' Balanced Salt Solution ; HBSS）に入れられた。その後、組織サンプルを処理して、オルガンバス試験用の平滑筋短冊標本を作成した。

2-3. 細胞培養

妊娠中のヒト USM 細胞は、酵素細胞解離キット（Worthington, Lakewood, NJ, USA）を用いて、上述の組織サンプルから培養に使用するために採取した。この細胞を 75cm² の培養フラスコに播き、メーカー推奨の添加剤を加えた平滑筋基礎培地-2（smooth muscle cell basal medium-2; SmBm-2）で培養した（Lonza, Walkersville, MD, USA）。

2-4. カルシウムフラックス試験

カルシウムの試験はすべて、比率測定蛍光カルシウムインジケーター Fura-2（Calbio-chem, Billerica, MA, USA）を用いて行った³²⁾。ヒト USM 細胞は、96 ウェルの黒壁透明底プレートで 100%コンフルエントになるまで培養し、継代 4～8 で使用した。細胞を改良 HBSS（濃度（mM）：NaCl 137.9、KCl 5.3、CaCl₂ 2.0、MgSO₄ 1.0、HEPES 2.4、およびグルコース 5.5、pH 7.4）で洗浄した。その後、加湿した 37°C のインキュベーター（95% 空気/5% CO₂）内で 5 μM の Fura-2 AM を 100 μL 入れ、30 分間細胞をロードした。細胞を HBSS で再度洗浄した後、HBSS で 20 分間インキュベートし、指示薬の脱エステル化を行った。

2-4-1. 予備的な単剤投与による用量反応性試験

NIF、TRB（各 0.1nM～100 μM）、またはビヒクルで前処理（10 分）した。その後、細胞にオキシトシン 1 μM を作用させ、G タンパク質共役型受容体（G protein-coupled receptor ; GPCR）を介したカルシウム放出を誘導した。励起波長 340nm および 380nm、発光波長 510nm、カットオフフィルター 495nm の条件で、Flex Station 3（Molecular

Devices 社) を用いて、37℃でリアルタイムに蛍光を測定した。蛍光の値は $F - F_0$ として報告され、カルシウムフラックスは以下のように計算された。 $[\Delta F = F_{\text{peak}}(340 \text{ nm})/F_{\text{peak}}(380 \text{ nm}) - F_0(340 \text{ nm})/F_0(380 \text{ nm})]$ ここで、 F_0 はベースライン蛍光を、 F_{peak} はピーク蛍光を表す。

2-4-2. 併用薬物増強試験

各濃度の閾値は、以前の研究で確立された BB と MN の濃度を除いて、2-4-1 の予備試験の結果を採用した³¹⁾。細胞は、単剤 (ANO1 阻害剤である BB (1 μM) または MN (10 μM)、NIF (0.001 μM)、TRB (0.001 μM)、または BB (1 μM) または MN (10 μM) と NIF (0.001 μM) または TRB (0.001 μM) の組み合わせ、もしくはビヒクルで 10 分間前処理した。次に、GPCR を介したカルシウム放出を誘導するために、細胞をオキシトシン 1 μM に曝した。蛍光は、2-4 の方法で測定した。

2-5. 機能的なオルガンバスでの収縮力の測定記録

採取したばかりの妊娠後期の子宮筋層サンプルを 4 × 6 × 15mm の短冊標本に細かく切り分け、下側は 16mL のオルガンバス (Radnoti Glass Technology, Monrovia, CA) に固定した組織フックに、上側は Grass FT03 力変換器 (Grass Telefactor, (Biopac Systems, Goleta, CA)) に取り付けた。力変換器 Grass FT03 を用いて、短冊標本の引張力を連続的に記録した。子宮片は、改良クレブス-ヘンセライト緩衝液 (濃度(mM): 塩化ナトリウム [NaCl] 112.0、塩化カリウム [KCl] 5.0、塩化カルシウム [CaCl₂] 2.5、硫酸マグネシウム [MgSO₄] 1.2、炭酸水素ナトリウム [NaHCO₃] 25.0、リン酸二水素ナトリウム [NaH₂PO₄] 1.0、D-グルコース 11.5) 中で、2.5g の張力をかけて 1 時間平衡化した。緩衝液を 37℃に温め、15 分ごとに交換しながら 1 時間、95%O₂/5%CO₂ で連続的にバブリングを行った。その後、外因性オキシトシン (0.5 μM) に反応させ、インタクトな子宮片の筋力を 60 分間にわたって測定した。収縮の頻度と時間経過に伴う減衰の変動を抑えるために、EC₈₅ (85% effective concentration [有効濃度]) 用量のオキシトシン (0.5 μM) を用いて収縮を刺激した³³⁾。

2-5-1. NIF および TRB の薬理学的特徴を明らかにするための予備的な単剤投与反応試験

オキシトシンを加えて収縮刺激を行った後、子宮組織片を 60 分間、増加したベースライン収縮力で平衡させ、その後、コントロールとして NIF または TRB (それぞれ 0.1nM ~ 100 μM) またはビヒクル (それぞれ 0.1%DMSO または ddH₂O) で処理した。これらの薬剤を添加した後、次の 60 分間の引張力を分析した。各短冊標本について、子宮収縮抑制処理期間中の積分力 (g · s) を、それぞれの平衡状態のベースラインの積分力に対して正規化した。処理した短冊標本は、時間を合わせたコントロールおよびビヒクル処理したコントロールと比較した。

2-5-2. 併用薬物増強試験

オキシトシンによる収縮刺激に続いて、子宮組織片を 60 分間、増加したベースライン収縮力で平衡させた後、被験薬の低用量共投与の効果を評価した。各薬物濃度は、先行研究³¹⁾で確立した BB と MN の濃度を除き、2-5-1 の予備試験より導出した。具体的には、ビヒクル（最終濃度 0.1%DMSO）、BB ($5\mu\text{M}$)、MN ($25\mu\text{M}$)、NIF ($0.01\mu\text{M}$)、TRB ($0.01\mu\text{M}$) のいずれか、または BB ($5\mu\text{M}$)、MN ($25\mu\text{M}$) と NIF ($0.01\mu\text{M}$)、TRB ($0.01\mu\text{M}$) の共投与による弛緩効果を評価した。これらのレジメンを追加した後、次の 60 分間で引張力を分析した。力の変化は、治療期間中の積分力を、各短冊標本の平衡状態のオキシトシン誘発収縮力の積分力で正規化することにより測定した。

2-6. ANO1 阻害剤および β -作動薬の増強に対する CaMKII 阻害の効果

オキシトシンによる収縮刺激に続いて、子宮組織片を 60 分間、増加したベースライン収縮力で平衡化させた。CaMKII Inhibitor [阻害剤] XII (Calbiochem, Billerica, MA, USA) を用いて CaMKII を標的とし、CaM-KII の IC_{50} は $0.063\mu\text{M}$ 、他の試験対象キナーゼの IC_{50} は $10\mu\text{M}$ を超えるものであった³⁴⁾。収縮した短冊標本をビヒクル (0.1% DMSO) または CaMKII Inhibitor XII ($1\mu\text{M}$) でさらに 60 分間処理した。その後、ビヒクル (0.1% DMSO) または BB ($5\mu\text{M}$) と TRB ($0.01\mu\text{M}$) の共投与によって誘発される弛緩を評価した。これらのレジメンを追加した後、次の 60 分間で引張力を分析した。力の変化は、治療期間中の積分力を、各短冊標本の平衡状態のオキシトシン誘発収縮力の積分力で正規化することにより測定した。

2-7. テルブタリンを投与したヒト USM 細胞におけるパッチクランプ電気生理学的試験

収縮の生理学に関連する膜電位の流れを評価するために、全細胞パッチクランプ試験を行った。ヒト USM をコラゲナーゼタイプ IV で 37°C で 5~10 分間消化した。放出された USM 細胞をポリ 10 L-リジン 12mm カバースリップ (BD, San Jose, CA) にプレーティングし、0.5mg/ml コラーゲンタイプ I (Sigma) でコーティングし、さらに 1~3 日間インキュベートした。全細胞記録のために、カバースリップを倒立顕微鏡 (Nikon) のステージ上の 0.5mL チャンバーに移した。膜電流は全細胞構成で記録した。細胞外液は、130.0 NaCl、5.5 テトラエチルアンモニウム塩化物 (TEA-Cl)、2.2 CaCl_2 、1.0 MgCl_2 、10.0 HEPES、10.0 グルコースを含み、NaOH で pH を 7.35 に調整した (単位: mM)。ピペット液は以下を含む (単位: mM)。75.0 CsCl, 64.0 Cs-グルコン酸, 1.0 MgCl_2 , 10.0 HEPES, 3.0 Na_2ATP , pH は CsOH で pH7.3 に調整。全細胞電流は、Axopatch 200B と 1322A デジタイザーを組み合わせで記録した。パッチピペットの抵抗値は 3~5M Ω であった。すべての記録は室温で行った。自発的一過性内向き電流 (spontaneous transient inward currents; STIC) の定量化の基準は、pCLAMP10 で検出したベースラインの 2 倍の振幅を持つ電流とし、Origin 8 ソフトウェアで解析した。電圧を -60mV から 40mV に変化さ

せ、STIC を記録して電圧-電流関係を作成した。STIC 活性に対する特異的な ANO1 の遮断の効果を示すために、STIC の生細胞測定において、機能的な TMEM16A (ANO1) 抗体 (完全かつ特異的な遮断を誘発する) を用いた³⁵⁾。これらの試験では、細胞を TMEM16A 抗体 (Abcam ab53213、1:5 希釈) またはコントロールとして抗体に使用したビヒクル希釈液 (0.1% アジ化ナトリウム、1% BSA、50mM Tris、pH7.6) のいずれかと 3 時間 (37°C、5%CO₂) インキュベートした後、STIC 活性を測定した。並行して、USM の自然な静止膜電位と関連させるために、-60 mV の保持電位で TRB の STIC への影響を分析した³⁶⁾。簡単に言えば、自発的な STIC を記録した後、3 種類の異なる濃度 (10 μ M、50 μ M、100 μ M) の TRB を適用し、STIC を測定した。TRB は、実験当日にストック液から最終使用濃度まで再構成したものを使用した。

2-8. 統計分析

特に明記しない限り、データは一元配置分散分析 (one-way analysis of variance; ANOVA) を使用して分析し、必要に応じて多重比較または独立両側 t 検定 (2 つのグループを比較するため) のボンフェローニ補正を行った。データは、GraphPad ソフトウェアを用いて図示し、平均値 \pm 標準誤差 (SE) で表し、 $p < 0.05$ を統計的に有意であるとした。

3. 結果

3-1. NIF と TRB は、細胞内カルシウム反応のピーク値とオキシトシンによる収縮力の両方を用量依存的に低下させる

NIF および TRB による収縮力低下の可能性を評価するための、予備的な用量反応 Fura-2 カルシウムアッセイでは、カルシウムフラックスが用量依存的に減少した。(Fig. 1a)。NIF および TRB による収縮力低下の可能性を評価するための、予備的な用量反応オルガンバス試験では、用量依存的な力の低下が認められた (図 1b)。しかし、NIF と TRB は、0.001 μ M ではカルシウムフラックスを、0.01 μ M では積分力を有意に減少させなかった。その後の実験では、これらの確立された治療量以下の NIF および TRB を使用した。

3-2. 低用量 NIF と ANO1 の阻害剤：細胞内カルシウム反応とオキシトシンによる収縮力は 2 つの治療法の併用で有意に低下する

本研究では、低用量の NIF を ANO1 阻害剤と併用することが、ヒト USM 細胞におけるオキシトシン誘発性の細胞内カルシウムの増加と、ex vivo のヒト USM 短冊標本中のオキシトシンによる収縮力を相乗的に低下させるかどうかを調べた。ヒト USM 細胞を用いた実験では、1 μ M のオキシトシンを添加したときの Fura-2 蛍光の時間変化の代表的なプロットを図 2a に示した。その結果、低用量 NIF+BB/MN では、BB、MN、NIF 単独での治療に比べて、統計的に有意な反応の低下が認められた (** $p < 0.001$ 、図 2b)。コント

ロールと比較して、カルシウムフラックスの減少は、BB 単独で 6.6%、MN 単独で 15.7%、NIF 単独で 12.1%であった。一方、カルシウムフラックスの減少は、NIF+BB で 36.6%、NIF+MN で 40.4%であった。特に、これらの組み合わせは、個々の薬物の減少の合計よりも大きな減少を示す。

Ex vivo でヒト USM 短冊標本を用いた実験では、低用量の NIF と BB/MN の併用が、オキシトシン誘発収縮の振幅と積分力（曲線下面積で測定）の両方に対して、低用量の単独投与やビヒクルに比べてより高い効力を発揮したことが、代表的な力のプロットによって示されている（図 2c）。低用量 NIF+BB/MN では、BB、MN、NIF のいずれかを単独で投与した場合と比較して、有意に大きな弛緩効果が認められた（*** $p < 0.001$ 、図 2d）。コントロールと比較して、収縮力の低下は、BB 単独で 6.4%、MN 単独で 10.3%、NIF 単独で 8.8%であった。一方、収縮力の低下は、NIF+BB で 34.1%、NIF+MN で 33.9%であった。これらの組み合わせでは、個々の薬剤の減少量の合計よりも減少量が再び大きくなることから、L 型 VGCC ブロッカー NIF と ANO 拮抗薬の間には、治療量以下の用量でメカニズムの相乗効果があると考えられる。

3-3. 低用量 TRB と ANO1 の阻害剤：細胞内カルシウム反応とオキシトシンによる収縮力は 2 つの治療法の併用で有意に低下する

次に、低用量の TRB と ANO1 阻害剤を併用することで、ヒト USM 細胞でのオキシトシン誘発性の細胞内カルシウムの増加と、ex vivo のヒト USM 短冊標本でのオキシトシンによる収縮力を相乗的に低下させることができるかどうかを調べた。ヒト USM 細胞を用いた実験では、 $1\mu\text{M}$ のオキシトシンを添加したときの Fura-2 蛍光の時間変化の代表的なプロットを図 3a に示した。その結果、低用量 TRB+BB/MN では、BB、MN、NIF 単独での治療に比べて、統計的に有意な反応の低下が認められた（*** $p < 0.001$ 、図 3b）。コントロールと比較して、カルシウムフラックスの減少は、BB 単独で 6.1%、MN 単独で 13.2%、TRB 単独で 8.9%であった。一方、カルシウムフラックスの減少は、TRB+BB で 30.7%、TRB+MN で 30.4%であった。特に、これらの組み合わせは、個々の薬物の減少の合計よりも有意に大きな減少を示す。

Ex vivo でヒト USM 短冊標本を用いた実験では、オキシトシンによって誘発された収縮の代表的な力のプロットを、低用量の単独投与やビヒクルと比較して示している（図 3c）。低用量 TRB+BB/MN では、BB、MN、TRB のいずれかを単独で投与した場合と比較して、有意に大きな弛緩効果が認められた（*** $p < 0.001$ 、図 3d）。コントロールと比較して、収縮力の低下は、BB 単独で 6.4%、MN 単独で 10.3%、TRB 単独で 7.2%であった。一方、収縮力の低下は、TRB+BB で 41.2%、TRB+MN で 42.9%であった。これらの組み合わせでは、個々の薬剤の削減量の合計よりも大きな削減量が再び得られたことから、 $\beta 2\text{AR}$ 作動薬の TRB と ANO 拮抗薬との間には、治療量以下の用量でメカニズムの相乗効果があると考えている。

3-4. テルブタリンはヒト USM 細胞の STIC を用量依存的に阻害する

VGCC の阻害と CaCC の阻害の相乗効果のメカニズムは確立されているが、 β 2AR の作動薬である TRB と ANO1 の拮抗薬の相乗効果のメカニズムはよくわかっていない。そこで我々は、低用量の TRB および ANO1 拮抗薬がヒト USM の弛緩を増強するメカニズムを解明することを目的とした。我々は以前、マウス USM において、ANO1 が STIC を媒介することを明らかにした²⁹⁾。我々は、ヒト超音波皮膚腫において、ANO1 が STIC を媒介していることを確認するために、TRB が STIC に及ぼす影響、ひいては ANO1 の活性を調べた。培養したヒト USM 細胞から -60mV の保持電位下で記録した STIC は、自発的なリズムを伴った連続したランダムな内向き電流 (図 4a) を示した (図 4a, 挿入図)。自発的なリズム電流の平均振幅と頻度は、それぞれ $-100.2 \pm 22\text{pA}$ (範囲 : $-400 \sim 76\text{pA}$)、 $18.2 \pm 3\text{Hz}$ (範囲 $60 \sim 4\text{Hz}$) である ($n=36$ 、算出事象数 1260)。この電流の平均測定値は、平均上昇時間 $10.3 \pm 3\text{ms}$ でピークに達し、 $18.8 \pm 6\text{ms}$ の単一指数関数の減衰時間を示した ($n=36$ 、計算事象数 1260)。図 4b は、ランピング保持電位を変化させたときの STIC をプロットしたものである。ECL の平均値は $-7.5 \pm 1.0\text{ mV}$ ($n=4$) で、予測される塩化物反転電位(ECL)の -13.8 mV に近い値であった³⁷⁾。 -7.5 mV より負の電位では電流は内向きになり、ECL 反転電位より正の電位では STIC は内向きから外向きに方向転換した。このデータは、STIC が ANO1 のような塩素イオンチャンネルを介して起こることと一致している。これらの結果を裏付けるために、STIC の活性が ANO1 (TMEM16A) チャンネルの活性に依存していることを明確に示すために、生細胞でチャンネルの活性を特異的に阻害する、ANO1 チャンネルを標的とした TMEM16A 抗体も使用した。抗体を媒介とした TMEM16A 阻害剤 (ANO-1) により、ビヒクル処理した細胞に比べて STIC 活性が機能的に失われた (図 4c,d)。その結果、抗体を添加した 20 個の細胞のうち 14 個で STIC 活性が消失したのに対し、ビヒクルを添加したパッチを当てた 20 個の細胞のうち 3 個では STIC 活性が低下していた。コントロールと比較して、 $82 \pm 6\%$ ($p < 0.01$) の有意な振幅の減衰が見られた。以上のことから、ヒト USM 細胞では、STIC が ANO1 を介して発現することが証明された。

次に、TRB が用量依存的にベースラインの STIC 活性を急速に低下させることを発見した。保持電圧 -60mV の電位において、 $10\text{ }\mu\text{M}$ の TRB を用いた場合の平均振幅は、コントロールの $-385.2 \pm 82\text{pA}$ (事象数 247 ± 67 , $n=6$ 、図 5a) に対し、 $-359.8 \pm 97\text{pA}$ (事象数 251 ± 99 , $n=5$) であった。TRB $50\text{ }\mu\text{M}$ を投与した場合、平均振幅は $-320 \pm 69.5\text{ pA}$ (事象数 181 ± 45 , $n=5$) であった。TRB $100\text{ }\mu\text{M}$ では、平均振幅が $-165.6 \pm 44.1\text{pA}$ (事象数 108 ± 35 , $n=5$) となり、コントロールグループと比較して有意に異なっていた ($*p < 0.05$, $n=5$ 、図 5b)。図 5c は、STIC の振幅に対する TRB の異なる濃度 ($10\text{ }\mu\text{M}$ 、 $50\text{ }\mu\text{M}$ 、 $100\text{ }\mu\text{M}$) の結果をまとめた棒グラフで、 $100\text{ }\mu\text{M}$ の TRB がコントロールと比較してヒト USM 細胞の STIC を減少させたことを示している ($*p < 0.05$, $n=6$)。これらのデータは、TRB が STIC を減少させることを示しており、これは TRB が ANO1 の機能活性を阻害するこ

とを示す証拠である。

3-5. CaMKII が仲介する、予備収縮させたヒト USM 短冊標本における β 2AR 作動薬と ANO1 阻害剤の併用による相乗的な弛緩作用

STIC 試験で TRB が ANO1 活性を減衰させることを確認後、CaMKII がこの効果を媒介しているかどうかを調べた。CaMKII Inhibitor XII は、CaMKII を特異的に阻害するために Asano らによって開発されたもので³⁴⁾、他の多くの研究でも検証されている^{38,39)}。我々は、CaMKII Inhibitor XII を用いて、ex vivo でのヒト USM 短冊標本のオキシトシン誘発性収縮に対する TRB と BB の間に見られる弛緩効果における CaMKII の役割を調べた(図 6)。CaMKII Inhibitor XII は、単独では収縮性に影響を及ぼさなかったが、低用量の TRB + BB では、弛緩性が有意に増強された ($p < 0.001$)。しかし、CaMKII Inhibitor XII で前処理を行うと、TRB と BB の併用による弛緩が緩和された ($p < 0.05$)。以上のことから、 β 2AR 作動薬である TRB と ANO1 阻害剤である BB との相乗効果に CaMKII が重要な役割を果たしていることが示唆された。

4. 考察

早期の分娩・出産は、依然として医療上の大きな課題である。早産予防の近年の進歩にもかかわらず、現在入手可能な子宮収縮抑制剤(硫酸マグネシウム、NIF、TRB、インドメタシン)による自然切迫早産の管理は、48 時間を超えると効果がない⁴⁾。妊娠中のこれらの薬剤の慢性的な使用は、これらの子宮収縮抑制剤の副作用に関連した妊産婦の罹患率の増加につながる可能性がある⁴⁰⁻⁴²⁾。検討すべき治療法の一つは、併用療法によって臨床効果を高めることができるかどうかである。本研究では、ANO1 拮抗薬が、従来の VGCC ブロッカーや β 2AR 作動薬と低用量で相乗的に機能し、ヒト USM 細胞におけるオキシトシン誘発性収縮とカルシウムフラックスを抑制することが明らかになった。本研究で得られた知見は、ANO1 拮抗薬とこれらの従来の子宮収縮抑制剤との相乗効果を示唆している。

カルシウム活性化塩素イオンチャネル ANO1 の拮抗薬は、現在の子宮収縮抑制剤である NIF (VGCC ブロッカー) との併用療法のための新しい候補の一群である。ANO1 阻害剤を使うと過分極状態になるため³¹⁾、USM 細胞の VGCC の電圧ゲーティング閾値への到達能力が低下する。また、他のメカニズムも寄与している可能性がある。例えば、VGCC を介した非活性化 Ca^{2+} 電流は、静止膜電位の範囲内でより負の電位では大きさが小さくなることが実証されている⁴³⁾。ANO1 阻害剤が過分極を引き起こすことから、ANO1 阻害剤と NIF による非活性化 Ca^{2+} 電流の抑制効果が相まって、両剤の相乗効果が発揮されたものと考えられる(図 2)。今回の結果は、CaCC チャネルを介した脱分極が VGCC の活性化を補完して活動電位の発生を促進し、VGCC と ANO1 の阻害剤を併用することで、それぞれの拮抗薬を低用量で使用しても逆に相乗効果が得られることを示している。

さらに、ANO1 拮抗薬は、 β 2 作動薬である現在の子宮収縮抑制剤 TRB との併用療法の

新しい候補でもある。低用量 TRB と BB/MN を併用することで、BB、MN、TRB のいずれかを単独で投与した場合と比較して、弛緩効果が統計的に有意に増強されることが、機能的なオルガンバス浴およびカルシウムフラックス試験で確認された (図 3)。B2 作動薬と ANO1 拮抗作用の間のメカニズムはあまり明らかになっていないので、そのメカニズムをさらに探ってみた。TRB による STIC の減少は、TRB が単独で ANO1 の活性に影響を与えることを示唆している (図 4, 5)。CaMKII を阻害すると相乗的な弛緩作用が弱まることから、CaMKII が B2 作動性と ANO1 拮抗作用の相互作用の重要な媒介物であることが確認された (図 6)。本研究では、子宮収縮抑制 TRB と ANO1 拮抗薬が相乗的に作用し、それぞれの薬剤を低用量で USM を弛緩させることができることを示し、PTL 治療の新たな可能性を示した。なお、 β -作動性と CaMKII の活性化については、いまだ議論が存在することに注意すべきである。非選択的な β -作動性は CaMKII を活性化し、B2AR の過剰発現が CaMKII 活性の上昇を引き起こすことが示されている²²⁻²⁴⁾。しかし、循環器系の研究では、Mangmool らのデータに基づき、B2AR ではなく B1AR が CaMKII を活性化している⁴⁴⁾。彼らのデータは、B1-KO および B2-KO マウスを使用して、イソプロテレノールによる非選択的 β -作動性による CaMKII 活性化における両方の受容体の役割を評価している。B2-KO マウスでは CaMKII の活性化が高かったが、B1-KO マウスでは p-CaMKII が約 2 倍、統計的に有意に増加していた。さらに、 β -アドレナリン受容体の組織内での発現の違いはよく知られており、特に心臓では子宮に比べて β 2AR の発現が非常に少なく、心臓では B1AR が、子宮では B2AR が主なサブタイプとなっている⁴⁵⁻⁴⁷⁾。この結果は、TRB による ANO1 の阻害が、少なくとも部分的には CaMKII を介したメカニズムであることを示している。

我々の研究にはいくつかの強みと限界がある。ANO1 拮抗薬が現行の子宮収縮抑制剤である NIF や TRB と低用量でペアになることで、これらの薬剤に伴う母体への副作用を回避できる可能性を厳密に示した。さらに、この併用療法では、48 時間経過後に子宮収縮抑制作用が低下し始めると、有効性を維持するために、併用する低用量から標準的な用量まで投与量を増やすことができる。最後に、ANO1 拮抗薬と TRB および NIF との相乗効果のメカニズムを調べたことで、子宮平滑筋における ANO1 と他の前収縮促進経路との重要な相互作用が明らかになった。ANO1 の薬理的阻害剤の使用は、より特異的な遺伝学的手法と比較して、ANO1 に起因する効果の特異性を制限するものである。しかし、ANO1 の 2 種類の薬理的阻害剤で観察された効果の一貫性は、これらの懸念を払拭するものである。また、PTL をターゲットにした薬物研究の初期段階では、ex vivo での子宮片モデルがゴールドスタンダードとなっているが、併用療法は、臨床試験に移行する前に in vivo での研究が必要である。

結論として、低用量の ANO1 拮抗薬と低用量の現行の子宮収縮抑制剤の組み合わせは、共に相乗的に作用する。ANO1 拮抗薬を含む薬剤開発は、切迫早産を管理するための子宮収縮抑制剤として有望であることを示している。

5. 総括

低用量の VGCC 遮断薬と β_2 AR 作動薬に ANO1 拮抗薬を併用することで、ex vivo での妊娠中期ヒト子宮平滑筋に対するオキシトシン誘発性収縮とカルシウム放出の弛緩作用が増強された。依然として有効な治療法の少ない切迫流産の臨床において、本研究により明らかになった ANO1 拮抗薬と TRB および NIF との相乗効果を応用した新しい子宮収縮抑制薬の混合療法 (multimodal tocolysis) の開発が期待される。

6. 今後の課題

本研究は動物実験ではなく、ヒト子宮平滑筋組織および細胞を用いた点で医学的意義が高いと考えられるが、in vitro および ex vivo での研究であるため、動物を用いた in vivo 試験およびヒトを対象とした臨床試験が必要である。

7. 謝辞

本研究は、米国ニューヨーク州ニューヨーク市にあるコロンビア大学医学部、コロンビア大学医療センターで行われました。研究指導および研究環境を整えてくださった Charles Emala 教授、研究室主宰の George Gallos 准教授に心より感謝申し上げます。

8. 引用文献

1. Iams JD. Prevention of preterm parturition. N Engl J Med 2014; 370(3):254–61
2. Prevention, C.f.D.C.a. Preterm Birth. 2013.
<http://www.cdc.gov/reproductivehealth/MaternalInfantHealth/PretermBirth.htm>.
3. Simhan HN, Caritis SN. Prevention of preterm delivery. N Engl J Med 2007;357(5):477–87
4. Haas DM, Caldwell DM, Kirkpatrick P, McIntosh JJ, Welton NJ. Tocolytic therapy for preterm delivery: systematic review and network meta-analysis. BMJ 2012;345:e6226
5. Chiossi G, Costantine MM, Betancourt A, Hankins GD, Longo M, Saade GR, et al. Does sildenafil citrate affect myometrial contractile response to nifedipine in vitro? Am J Obstet Gynecol. 2010;203(3):252.e1-5.
6. Lovasz N, Ducza E, Zupko I, Falkay G. Increase of the uterus-relaxant effect of nifedipine by the Abcg2 efflux protein inhibitor KO134 in the rat in vivo. In Vivo. 2013 ;27(3):363-9.
7. Hajagos-Tóth J, Kormányos Z, Falkay G, Pál A, Gáspár R. Potentiation of the uterus-relaxing effects of β -adrenergic agonists with nifedipine: studies on rats and the human myometrium. Acta Obstet Gynecol Scand. 2010;89(10):1284-9.

8. Verli J, Klukovits A, Kormányos Z, Hajagos-Tóth J, Ducza E, Seres AB, et al. Uterus-relaxing effect of β_2 -agonists in combination with phosphodiesterase inhibitors: studies on pregnant rat in vivo and on pregnant human myometrium in vitro. *J Obstet Gynaecol Res.* 2013;39(1):31-9.
9. Meloni A, Melis M, Alba E, Deiana S, Atzei A, Paoletti AM, et al. Medical therapy in the management of preterm birth. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2009;22 Suppl 3:72-6
10. Gálik M, Gáspár R, Kolarovszki-Sipiczki Z, Falkay G. Gestagen treatment enhances the tocolytic effect of salmeterol in hormone-induced preterm labor in the rat in vivo. *Am J Obstet Gynecol.* 2008;198(3):319.e1-5.
11. Garfield RE, Sims S, Daniel EE. Gap junctions: their presence and necessity in myometrium during parturition. *Science.* 1977;198(4320):958-60.
12. Fuchs AR, Fuchs F, Husslein P, Soloff MS, Fernström MJ. Oxytocin receptors and human parturition: a dual role for oxytocin in the initiation of labor. *Science.* 1982;215(4538):1396-8.
13. Slater DM, Berger LC, Newton R, Moore GE, Bennett PR. Expression of cyclooxygenase types 1 and 2 in human fetal membranes at term. *Am J Obstet Gynecol.* 1995;172(1 Pt 1):77-82.
14. Maner WL, Garfield RE. Identification of human term and preterm labor using artificial neural networks on uterine electromyography data. *Ann Biomed Eng.* 2007 ;35(3):465-73.
15. Garfield RE, Maner WL. Physiology and electrical activity of uterine contractions. *Semin Cell Dev Biol.* 2007;18(3):289-95.
16. Jones K, Shmygol A, Kupittayanant S, Wray S. Electrophysiological characterization and functional importance of calcium-activated chloride channel in rat uterine myocytes. *Pflugers Arch.* 2004;448(1):36-43.
17. Cotton KD, Hollywood MA, McHale NG, Thornbury KD. Ca^{2+} current and Ca^{2+} -activated chloride current in isolated smooth muscle cells of the sheep urethra. *J Physiol.* 1997;505:121-31.
18. Saleh SN, Greenwood IA. Activation of chloride currents in murine portal vein smooth muscle cells by membrane depolarization involves intracellular calcium release. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2005;288(1):C122-31.
19. Hashitani H, Van Helden DF, Suzuki H. Properties of spontaneous depolarizations in circular smooth muscle cells of rabbit urethra. *Br J Pharmacol.* 1996;118(7):1627-32.
20. Morgan SJ, Deshpande DA, Tiegs BC, Misior AM, Yan H, Hershfeld AV, et al. β -Agonist-mediated relaxation of airway smooth muscle is protein kinase A-dependent. *J Biol Chem.* 2014;289(33):23065-23074.

21. Billington CK, Ojo OO, Penn RB, Ito S. cAMP regulation of airway smooth muscle function. *Pulm Pharmacol Ther.* 2013;26(1):112-20.
22. Xu Q, Jennings NL, Sim K, Chang L, Gao XM, Kiriazis H, et al. Pathological hypertrophy reverses β_2 -adrenergic receptor-induced angiogenesis in mouse heart. *Physiol Rep.* 2015;3(3):e12340.
23. Mundiña-Weilenmann C, Vittone L, Ortale M, de Cingolani GC, Mattiazzi A. Immunodetection of phosphorylation sites gives new insights into the mechanisms underlying phospholamban phosphorylation in the intact heart. *J Biol Chem.* 1996 ;271(52):33561-7.
24. Curran J, Hinton MJ, Ríos E, Bers DM, Shannon TR. Beta-adrenergic enhancement of sarcoplasmic reticulum calcium leak in cardiac myocytes is mediated by calcium/calmodulin-dependent protein kinase. *Circ Res.* 2007;100(3):391-8.
25. Wang YX, Kotlikoff MI. Inactivation of calcium-activated chloride channels in smooth muscle by calcium/calmodulin-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94(26):14918-23.
26. Lin CX, Lv XF, Yuan F, Li XY, Ma MM, Liu CZ, et al. Ca^{2+} /Calmodulin-Dependent Protein Kinase II γ -Dependent Serine727 Phosphorylation Is Required for TMEM16A Ca^{2+} -Activated Cl^- Channel Regulation in Cerebrovascular Cells. *Circ J.* 2018;82(3):903-913.
27. Yang YD, Cho H, Koo JY, Tak MH, Cho Y, Shim WS, et al. TMEM16A confers receptor-activated calcium-dependent chloride conductance. *Nature.* 2008;455(7217):1210-5.
28. Schroeder BC, Cheng T, Jan YN, Jan LY. Expression cloning of TMEM16A as a calcium-activated chloride channel subunit. *Cell.* 2008;134(6):1019-29.
29. Bernstein K, Vink JY, Fu XW, Wakita H, Danielsson J, Wapner R, et al. Calcium-activated chloride channels anoctamin 1 and 2 promote murine uterine smooth muscle contractility. *Am J Obstet Gynecol.* 2014;211(6):688.e1-10.
30. Danielsson J, Vink J, Hyuga S, Fu XW, Funayama H, Wapner R, et al. Anoctamin Channels in Human Myometrium: A Novel Target for Tocolysis. *Reprod Sci.* 2018;25(11):1589-1600.
31. Hyuga S, Danielsson J, Vink J, Fu XW, Wapner R, Gallos G. Functional comparison of anoctamin 1 antagonists on human uterine smooth muscle contractility and excitability. *J Smooth Muscle Res.* 2018;54(0):28-42.
32. Marshall IC, Boyfield I, McNulty S. Ratiometric Ca^{2+} measurements using the FlexStation scanning fluorometer. *Methods Mol Biol.* 2006;312:119-24.

33. Balki M, Erik-Soussi M, Kingdom J, Carvalho JC. Comparative efficacy of uterotonic agents: in vitro contractions in isolated myometrial strips of labouring and non-labouring women. *Can J Anaesth*. 2014;61(9):808-18.
34. Asano S, Komiya M, Koike N, Koga E, Nakatani S, Isobe Y. 5,6,7,8-Tetrahydropyrido[4,3-d]pyrimidines as novel class of potent and highly selective CaMKII inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett*. 2010;20(22):6696-8.
35. Thomas-Gatewood C, Neeb ZP, Bulley S, Adebiyi A, Bannister JP, Leo MD, et al. TMEM16A channels generate Ca^{2+} -activated Cl^- currents in cerebral artery smooth muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2011;301(5):H1819-27.
36. Aguilar HN, Mitchell BF. Physiological pathways and molecular mechanisms regulating uterine contractility. *Hum Reprod Update*. 2010;16(6):725-44.
37. Casteels R, Kuriyama H. Membrane potential and ionic content in pregnant and non-pregnant rat myometrium. *J Physiol* 1965; 177(2):263–287
38. Czikora I, Alli AA, Sridhar S, Matthay MA, Pillich H, Hudel M, et al. Epithelial Sodium Channel- α Mediates the Protective Effect of the TNF-Derived TIP Peptide in Pneumolysin-Induced Endothelial Barrier Dysfunction. *Front Immunol*. 2017;8:842.
39. Fujii S, Tajiri Y, Hasegawa K, Matsumoto S, Yoshimoto RU, Wada H, et al. The TRPV4-AKT axis promotes oral squamous cell carcinoma cell proliferation via CaMKII activation. *Lab Invest*. 2020;100(2):311-323.
40. Benedetti TJ. Maternal complications of parenteral beta-sympathomimetic therapy for premature labor. *Am J Obstet Gynecol*. 1983;145(1):1-6.
41. Lam F, Elliott J, Jones JS, Katz M, Knuppel RA, Morrison J, et al. Clinical issues surrounding the use of terbutaline sulfate for preterm labor. *Obstet Gynecol Surv*. 1998 ;53(11 Suppl):S85-95.
42. Administration, T.U.S.F.a.D. FDA Drug Safety Communication: New warnings against use of terbutaline to treat preterm labor. 2011.
<https://www.fda.gov/drugs/drug-safety-and-availability/fda-drug-safety-communication-new-warnings-against-use-terbutaline-treat-preterm-labor>.
43. Nakayama S, Brading A. Possible contribution of long open state to noninactivating Ca^{2+} current in detrusor cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 1995; 269(1):C48–C54
44. Mangmool S, Shukla AK, Rockman HA. β -Arrestin-dependent activation of Ca^{2+} /calmodulin kinase II after β_1 -adrenergic receptor stimulation. *J Cell Biol* 2010; 189(3):573–587
45. Brauer MM, Burnstock G. Expression of β -ADRENERGIC receptors in the rat uterus: effects of puberty and oestrogen treatment during prepubertal development. *Int*

J Dev Neurosci 2010;16(1):29-39

46. Brodde O-E, Leifert F-J, Krehl H-J. Coexistence of beta 1 and beta 2-adrenoceptors in the rabbit heart: quantitative analysis of the regional distribution by (-)-3H-dihydroalprenolol binding. J Cardiovasc Pharmacol 1982; 4(1):34-43

47. Hedberg A, Minneman KP, Molinoff PB. Differential distribution of beta-1 and beta-2 adrenergic receptors in cat and guinea-pig heart. J Pharmacol Exp Ther 1980; 212(3):503-508

9. 業績目録

9-1. 原著

1. Hyuga S, Parry RC, Danielsson J, Vink JY, Fu XW, Wu AD, et al. Anoctamin 1 antagonism potentiates conventional tocolytic-mediated relaxation of pregnant human uterine smooth muscle. J Physiol Sci 2021; 71(1):7

2. Yim PD, Hyuga S, Wu AD, Dan W, Vink JY, Gallos G. Activation of an Endogenous Opsin 3 Light Receptor Mediates Photo-Relaxation of Pre-Contracting Late Gestation Human Uterine Smooth Muscle Ex Vivo. Reprod Sci 2020; 27(9):1791-1801

3. Hosokawa Y, Okutomi T, Hyuga S, Kato R, Kuczkowski KM: The concordance rate of L3/4 intervertebral lumbar level estimated by palpation and ultrasonography in Japanese parturients. J Matern Fetal Neonatal Med 2020; 33(14):2354-2358

4. Hyuga S, Danielsson J, Vink J, Fu XW, Wapner R, Gallos G: Functional comparison of anoctamin 1 antagonists on human uterine smooth muscle contractility and excitability. J Smooth Muscle Res 2018;54(0):28-42

5. Danielsson J, Vink J, Hyuga S, Fu XW, Funayama H, Wapner R, Blanks AM, Gallos G. Anoctamin Channels in Human Myometrium: A Novel Target for Tocolysis. Reprod Sci 2018; 25(11):1589-1600

6. 田中秀典, 川股知之, 日向俊輔, 上山博史, 角倉弘行, 川真田樹人: 帝王切開術麻酔の現況に関する全国アンケート調査の結果報告. 日本臨床麻酔学会誌 2013; 33 : 411-20

9-2. 著書

1. 日向俊輔 : LiSA 徹底分析シリーズ : 一時総括 COVID-19 時代の麻酔、COVID-19 妊婦の特徴と出産への対応 麻酔科医の新しいかわり方、初版、メディカル・サイエンス・インターナショナル、東京、2021.

2. 日向俊輔 : 産科麻酔 All in One、VII 産科的合併症を持つ母体の管理と麻酔、1 妊娠高血圧症候群, HELLP 症候群、初版、文光堂、東京、2020.

3. 島岡享生、ウッドハムス玲子、日向俊輔、加藤里絵、奥富俊之 : 緊急産科手術の麻酔に備える、第II章 症例提示 2. 弛緩出血、第2版、克誠堂出版、東京、2019.

4. 河野照子、日向俊輔、加藤里絵：緊急産科手術の麻酔に備える、第Ⅱ章 症例提示 2. 妊娠高血圧症候群・妊娠 高血圧腎症・子癇、第 2 版、克誠堂出版、東京、2019.
5. 日向俊輔、奥富俊之、加藤里絵、天野完：緊急産科手術の麻酔に備える、第Ⅰ章 総論 2. 麻酔前評価、第 2 版、克誠堂出版、東京、2019.
6. 日向俊輔、奥富俊之：麻酔科医のための困ったときの 3 分コンサルト、第Ⅰ章 術前評価・管理と周術期計画、29 抗リン脂質抗体症候群、初版、克誠堂出版、東京、2016.
7. 日向俊輔：まれな疾患の麻酔 A to Z、17. 妊娠・分娩の合併症、全身性エリテマトーデス、初版、文光堂、東京、2015.
8. 島岡享生、ウッドハムス玲子、日向俊輔、加藤里絵、奥富俊之：緊急産科手術の麻酔に備える、第Ⅱ章 症例提示 2. 弛緩出血、初版、克誠堂出版、東京、2015.
9. 河野照子、日向俊輔、加藤里絵：緊急産科手術の麻酔に備える、第Ⅱ章 症例提示 2. 妊娠高血圧症候群・妊娠 高血圧腎症・子癇、初版、克誠堂出版、東京、2015.
10. 日向俊輔、奥富俊之、加藤里絵、天野完：緊急産科手術の麻酔に備える、第Ⅰ章 総論 2. 麻酔前評価、初版、克誠堂出版、東京、2015.
11. 日向俊輔、橋本悟：V 章 救急・集中治療に関連した重要事項 4. 急性呼吸促迫 症候群 (ARDS)、救急・集中治療医学レビュー 最新主要文献と解説、初版、克誠堂出版、東京、2014.

9-3. 総説・講座

1. 日向俊輔：COVID-19 感染妊婦の分娩・麻酔管理. 臨床麻酔 2021;45(増):319-26

9-4. 症例・臨床治験・その他

1. Adachi M, Adachi T, Fujita T, Hyuga S, Onishi Y, Okutomi T. Venoarterial extracorporeal membrane oxygenation as an early treatment for amniotic fluid embolism with cardiac arrest: A case report. J Obstet Gynaecol Res. 2021 Jun 15. doi: 10.1111/jog.14880. Epub ahead of print.
2. Kondo H, Hyuga S, Fujita T, Adachi M, Mochizuki J, Okutomi T: First Report of Spinal Anesthesia for Cesarean Delivery in a Parturient With Jeune Syndrome: A Case Report. A A Pract 2021;15(2): e01400,
3. Hyuga S, Okutomi T, Kato R, Hosokawa Y: Continuous spinal labor analgesia for two deliveries in a parturient with severe subvalvular aortic stenosis. J Anesth 2016;30(6):1067-1070
4. 浦澤方聡, 日向俊輔, 山田由香里, 加藤里絵, 奥富俊之: 弾性ストッキングの関与が疑われた, 術後腓骨神経麻痺の 1 例. 分娩と麻酔 2013;95: 36-9
5. 日向俊輔, 加藤里絵, 奥富俊之: 発症直後に蘇生を開始し後遺症なく救命しえた羊水塞栓症の 1 症例. 麻酔 2013;62 : 1435-9

6. 日向俊輔, 坂本明之, 川股知之, 清水俊行, 川真田樹人: :妊娠中に脊髄腫瘍摘出術を施行した 1 症例. 麻酔 2013;62 : 609-12
7. Hyuga S, Sekiguchi T, Ishida T, Yamamoto K, Sugiyama Y, Kawamata M : Successful tracheal intubation with the McGrath® MAC video laryngoscope after failure with the Pentax-AWS™ in a patient with cervical spine immobilization. Can J Anesth. 2012;59 : 1154-1155

10. 図表

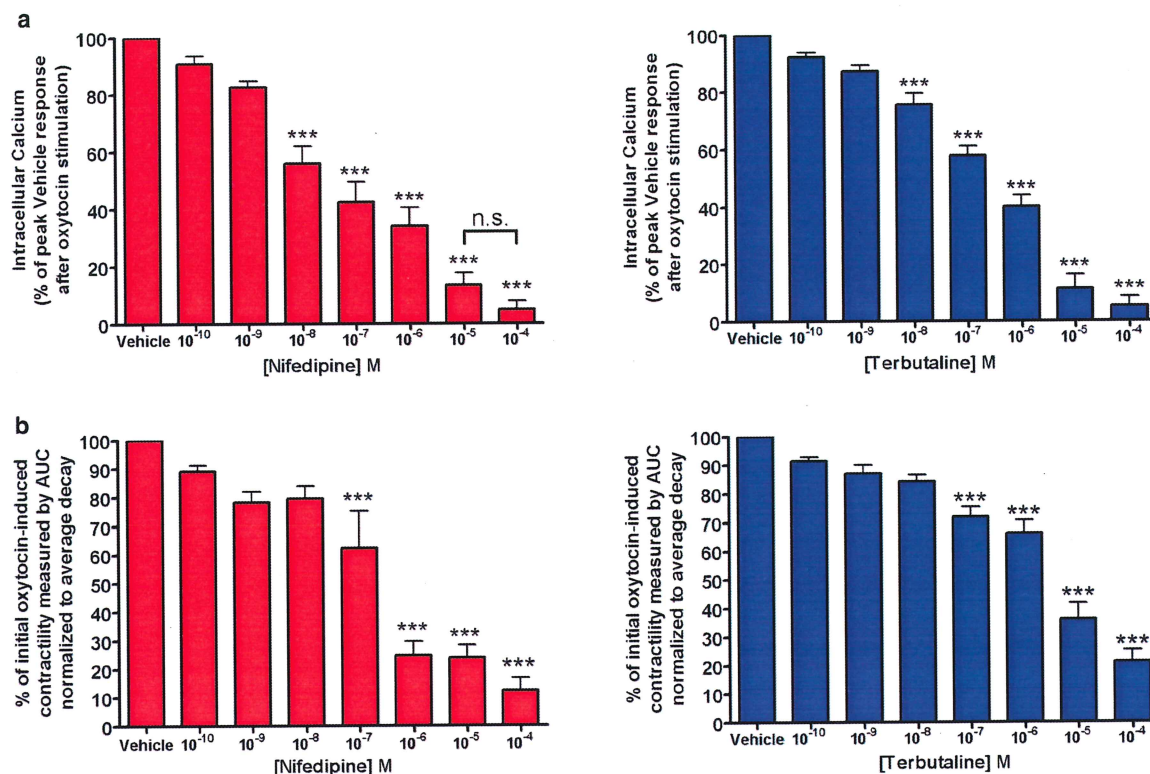


図 1 . テルブタリンおよびニフェジピンの薬理的用量は、オキシトシンによって誘発される細胞内カルシウムフラックスおよび収縮力の減少を用量依存的に仲介する。

a ニフェジピンおよびテルブタリンの治療下限濃度の決定。ニフェジピン（左）およびテルブタリン（右）による細胞内カルシウムフラックスの有意な減少を評価するために行った初期の用量反応実験では、 10^{-9} M までの用量で細胞内カルシウムが統計的に有意に減少した (***) $p < 0.001$, $n = 10$)。

b ニフェジピンおよびテルブタリンの治療下限濃度の決定。ニフェジピン（左）とテルブタリン（右）による収縮力の有意な低下を評価するために行った初期の用量反応実験では、 10^{-8} M までの用量で非統計学的な力の低下が認められた (***) $p < 0.001$, 8 人の異なる患者からの 38 サンプル)。

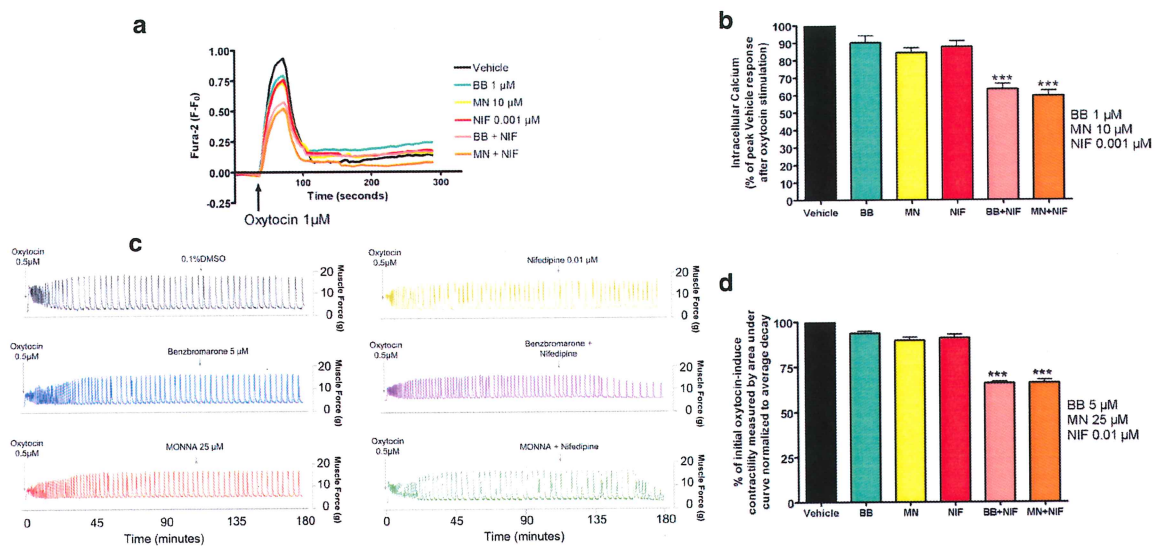


図2 低用量L型電位依存性カルシウムチャネル阻害剤とANO-1阻害剤の併用は、細胞内カルシウムフラックスおよび収縮力の点でヒト子宮平滑筋の弛緩を促進する。

a BBまたはMNをNIFと併用して前処理することにより、オキシトシンによる細胞内カルシウムの増加が抑制されることを示す代表的なfura-2カルシウムプロット。BB = ベンズブロマロン, MN = MONNA, NIF = ニフェジピン。

b オキシトシン1 μ Mで誘導された細胞内カルシウムの平均ピークは、前処理後、低用量のNIF+BBまたはNIF+MNにより、細胞内カルシウムがBB、MNまたはNIF単独グループに比べて有意に減少したことを示した (** $p < 0.001$; BB、MN、NIFについては、それぞれ $n=10$; NIF+BBまたはNIF+MNについては、それぞれ $n=14$)。

c 低用量のNIFとBB(紫)またはMN(緑)を併用することで、オキシトシン誘発収縮の頻度と力が、低用量の単独投与(BB 5 μ M: 青、MN 25 μ M: 赤、NIF 0.01 μ M: 黄)またはビヒクルコントロール(0.1%DMSO: 黒)に比べて増強されることを示す代表的な力のプロット。

d 集計されたデータは、ベースラインのオキシトシン誘発収縮力と比較した積分力($g \cdot sec$)の割合を投与グループ間で示している。結果はコントロールに対して正規化し、平均 \pm SEMとして報告した。低用量のNIF+BB/MNを投与した場合、コントロールと比較して統計的に有意な弛緩の増強が認められた (** $p < 0.001$; 9人の異なる患者からの64サンプル)。

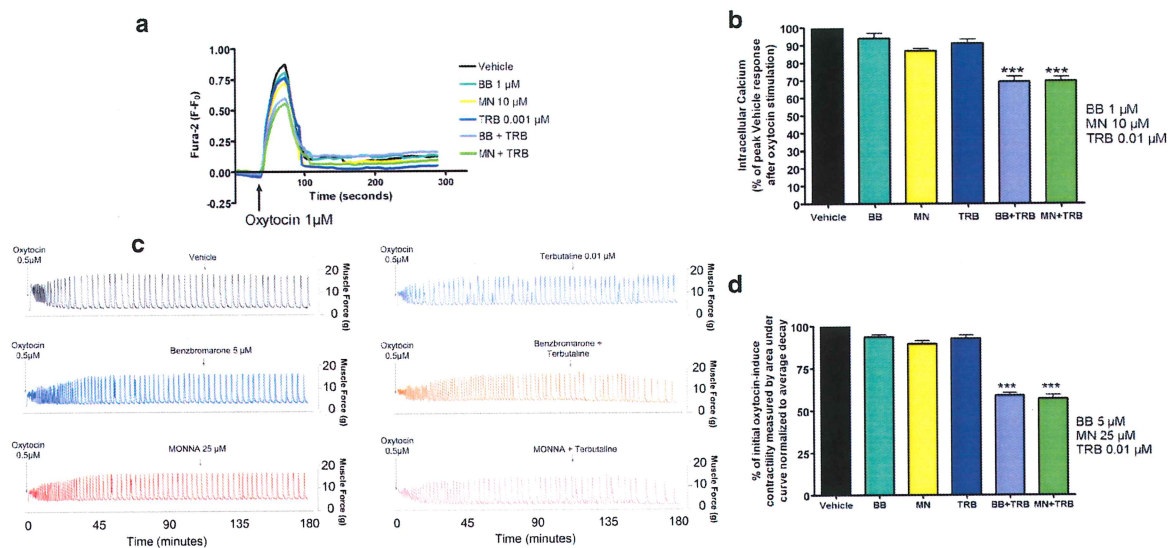


図3 B2 アドレナリン受容体作動薬と ANO-1 阻害剤の併用により、ヒト子宮平滑筋の細胞内カルシウム増加と収縮力の観点から弛緩が促進される。

a BB または MN と TRB の併用による前処理が、オキシトシンによる細胞内カルシウムの増加を抑制することを示す代表的な fura-2 カルシウムのプロット。BB = ベンズブロマロン, MN = MONNA, TRB = テルブタリン

b オキシトシン 1 μ M で誘導される細胞内カルシウムの前処理後の平均ピークは、低用量の TRB+BB または TRB+MN で細胞内カルシウムが BB、MN、TRB 単独グループに比べて有意に抑制されたことを示している (** $p < 0.001$; BB、MN、TRB については、それぞれ $n=10$; TRB+BB または TRB+MN については、それぞれ $n=14$)。

c 低用量の TRB と BB (橙) または MN (ピンク) を併用することで、オキシトシン誘発収縮の頻度と力が、低用量の単独投与 (BB 5 μ M : 青、MN 25 μ M : 赤、TRB 0.01 μ M : 淡青) またはビヒクルコントロール (黒) と比較して増強されたことを示す代表的な力のプロット。

d 投与グループ間で、ベースラインのオキシトシン誘発収縮力と比較した積分力 (g \cdot sec) の割合を示す集計データ。結果はコントロールに対して正規化し、平均 \pm SEM として報告した。低用量の TRB+BB/MN を投与した場合、コントロールと比較して統計的に有意な弛緩の増強が認められた (** $p < 0.001$; 9 人の異なる患者からの 64 サンプル)。

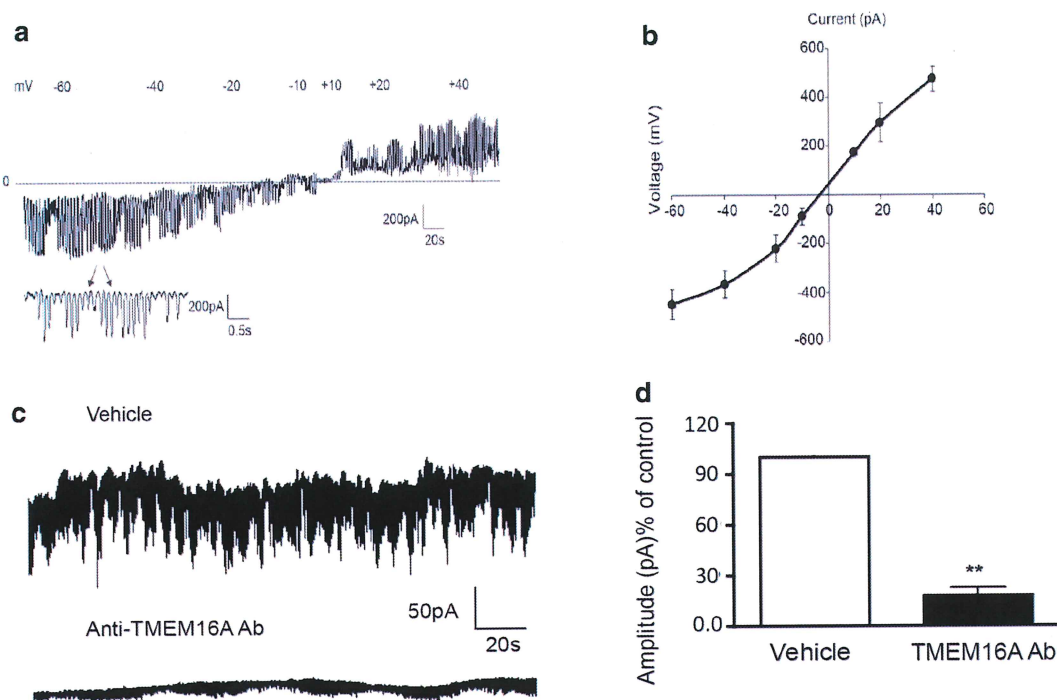


図4 ヒト一次子宮培養細胞で記録された自発的一過性内向き電流 (STIC) は、ANO1 を介している。

a 異なる保持電位 (Vm) で記録した自発的一過性内向き電流 (STIC) の代表的なプロット。挿入図は、STIC をより高解像度の時間軸で表示したもの。

b I/V 関係 (STIC の平均ピーク振幅対保持電圧) をまとめると、STIC の観察された逆電位は $-7.5 \pm 10 \text{ mV}$ ($n=4$) であり、塩化物の予測される反転電位 ($E_{\text{Cl}} = -13.8 \text{ mV}$) に近いことがわかる。

c ビヒクルバッファ (上部プロット) または TMEM16A (ANO1) 抗体を用いて灌流したヒト USM 細胞からの代表的な全細胞膜 STIC の記録 (下部プロット)。抗体を用いたインキュベーション後には、ビヒクルを用いたインキュベーション (パッチした 20 個の細胞のうち 3 個) と比較して、STIC 活性の消失が観察された (パッチした 20 個の細胞のうち 14 個)。

d ビヒクルまたは TMEM16A(ANO1)抗体で処理した細胞間の ICTS 振幅の比較。STIC の振幅はビヒクルコントロールと比較して $82 \pm 6\%$ と大幅に減少した (** $p < 0.01$)。

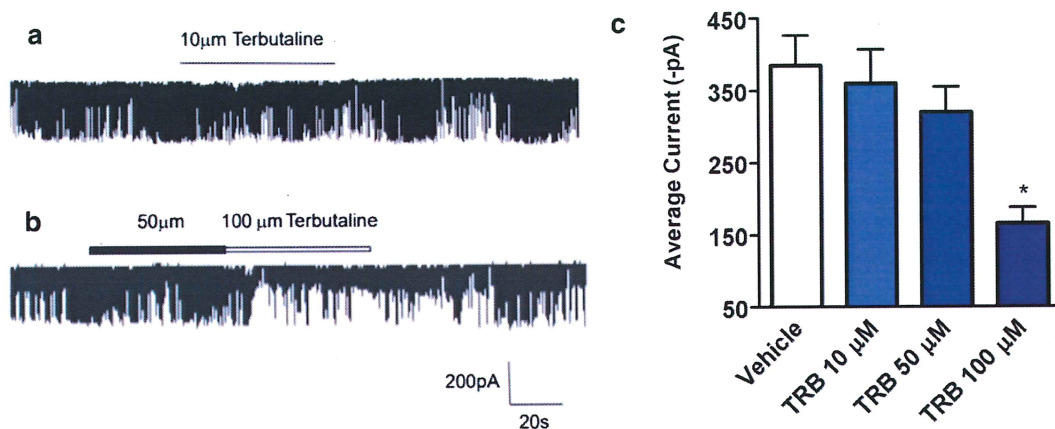


図5 子宮一次培養細胞から記録された自発的一過性内向き電流 (STIC) のテルブタリンによる阻害

a テルブタリン 10 μM に反応した STIC の代表的な全細胞記録保持電圧 -60mV 電位では、平均電流はコントロールの $-385.2 \pm 82 \text{ pA}$ (事象数 247 ± 67 , $n=6$) に対し、 $-359.8 \pm 97 \text{ pA}$ (事象数 251 ± 99 , $n=5$) であった。

b エルブタリン 50 μM または 100 μM に反応した STIC の代表的な全細胞記録。保持電圧 -60mV でテルブタリン 50 μM を流したところ、平均電流は $320 \pm 69.5 \text{ pA}$ (事象数 181 ± 45 , $n=5$) となった。テルブタリン 100 μM では、平均電流は $-165.6 \pm 44.1 \text{ pA}$ に減少した (事象数 108 ± 35 , $n=6$)。

c 異なる濃度のテルブタリンが STIC の平均電流に及ぼす影響を示す棒グラフ。テルブタリン 100 μM では、コントロールとの差が統計的に異なっていた (* $p<0.05$)。

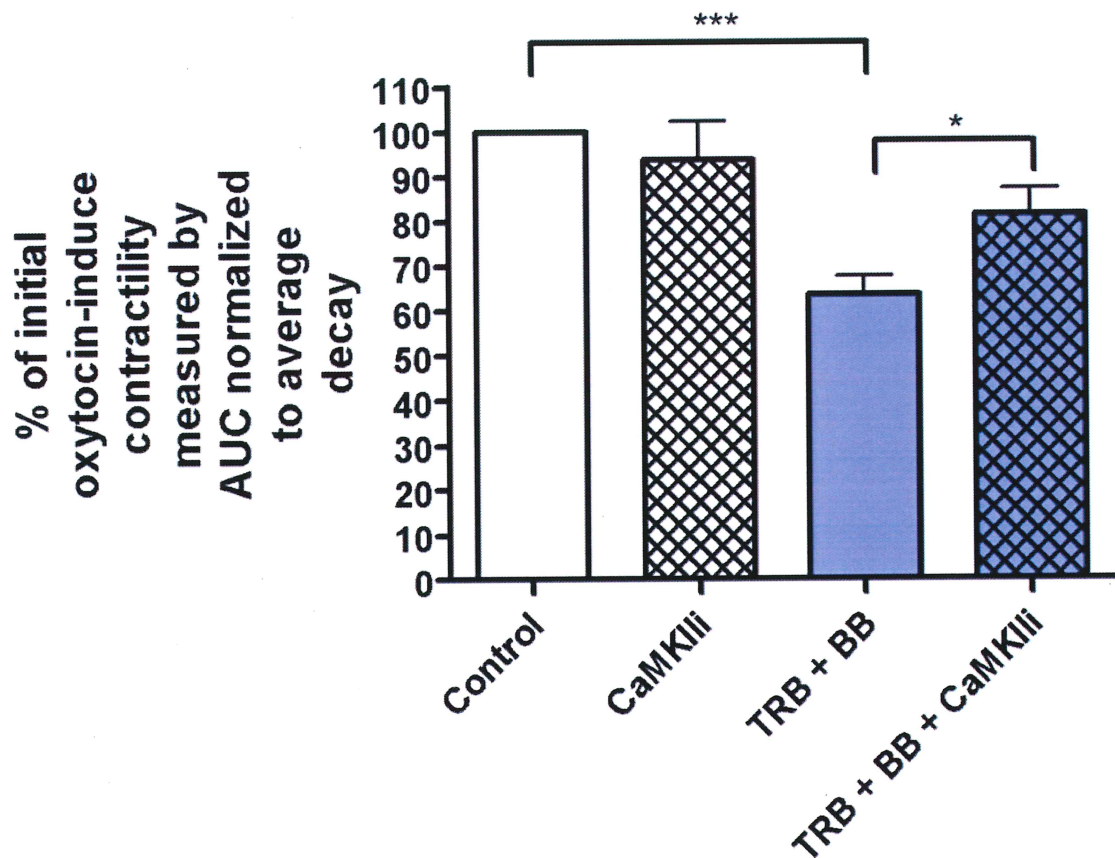


図6 予備収縮させたヒト USM 短冊標本の β_2 AR 作動薬と ANO1 阻害剤を併用することで得られる相乗的な弛緩作用を CaMKII が仲介する。集計されたデータは、ベースラインのオキシトシン誘発性収縮力からの積分力 ($\text{g} \cdot \text{sec}$) の減少率を治療グループ間で示している。結果はコントロールに対して正規化し、平均 \pm SEM として報告した。また、CaMKII 阻害剤 XII ($1 \mu\text{M}$) のみでは変化が見られず、低用量の TRB+BB を投与した場合には、コントロールと比較して統計的に有意な弛緩作用が見られた。興味深いことに、CaMKII 阻害剤 XII の前処理により、TRB と BB の併用による弛緩作用が緩和された(* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$; 7 人の異なる患者から 48 サンプル)。