

学 位 論 文 題 名

血管内皮細胞からの平滑筋弛緩因子の放出における
細胞外および細胞内 Ca^{2+} の意義に関する研究

学位論文内容の要旨

〔緒言〕：血管内皮が産生する血管拡張物質の1つである内皮由来弛緩因子（EDRF：endothelium-derived relaxing factor）は、その本体が一酸化窒素（NO）あるいは S-nitroso-L-cysteine などの NO 関連物質と考えられている。EDRF は、血管平滑筋の細胞内 soluble guanylate cyclase を活性化し cGMP を上昇させ、平滑筋を弛緩し血管を拡張させる。

内皮からの EDRF 放出は、血中のホルモンや、オータコイド、神経間伝達物質などの化学的刺激だけでなく、shear stress などの物理的刺激によっても修飾を受けることが知られている。内皮細胞がこうした外来刺激を受け、その応答として EDRF 放出をおこすメカニズムの詳細は、しだいに解明されつつある。一方、細胞内自由 Ca^{2+} は多くのタイプの細胞で外来刺激情報を細胞内部に伝達する second messenger として働いており、その濃度変化は刺激に対する細胞の応答即ち細胞機能の変化に結びついている。最近、内皮の EDRF 放出反応に、細胞内外の Ca^{2+} が関与すること、特に EDRF 合成酵素 NO synthase（NOS）の活性が細胞内 Ca^{2+} や calmodulin に依存することが指摘されるようになった。しかし、EDRF 放出に細胞外 Ca^{2+} の存在が必須かどうか、あるいは細胞内 Ca^{2+} の濃度変化が EDRF 放出量と直接関連しているかどうかは議論が分かれていて、EDRF 放出における Ca^{2+} の役割はまだ確定していない。そこで本研究では、血管内皮細胞の EDRF 放出反応における細胞外および細胞内 Ca^{2+} の役割を、特に細胞内 Ca^{2+} 濃度変化と EDRF 放出量との関係から検討した。

〔方法〕：ウシ胎児下行胸部大動脈内皮細胞をカバースライドに培養し小型 chamber に取り付け、種々の濃度（ 10^{-8} 、 10^{-7} 、 10^{-6} 、 10^{-5} M）の ATP, acetylcholine（ACh）, bradykinin（BKN）, および Ca^{2+} -ionophore（A23187）をそれぞれ含む Krebs buffer を一定の速度で chamber 内に流し内皮細胞を刺激し、刺激に対する細胞内 Ca^{2+} 濃度（ $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ）の変化を Ca^{2+} 蛍光指示薬である Fura-2 と蛍光測光顕微鏡により測定した。また、同内皮細胞を mi-

cro-carrier beads に培養しカラムに詰め、 $[Ca^{2+}]_i$ 測定時と同様の agonist で刺激し、放出される EDRF の量を、内皮を除去した家兎大動脈切片を用いた bioassay 法と、培養ウシ平滑筋細胞内 cGMP 量の変化 (RIA 法) から測定した。bioassay では、norepinephrine で収縮させた際の切片張力に対するカラムからの effluent の効果による張力減少の割合を弛緩率(% relaxation) として表し、内皮からの EDRF 産生量の指標とした。EDRF 放出における細胞外 Ca^{2+} の関与を検討する目的で、 Ca^{2+} キレート剤である EGTA を用い、内皮の細胞外 Ca^{2+} 濃度をゼロにした際の ATP ($10^{-5}M$)、BKN ($10^{-8}M$)、A23187 ($10^{-6}M$) の各刺激における $[Ca^{2+}]_i$ 、血管切片張力変化、および培養平滑筋細胞内 cGMP を測定した。

また、血管切片張力、平滑筋内 cGMP 量を変化させた物質が NO 関連物質かどうかを知るために、内皮細胞に各刺激 (ATP, BKN, A23187) と同時に NO の産生障害物質である N^G -methyl-L-arginine (L-MNA) を作用させた際の EDRF 放出反応を測定した。さらに NO 合成の基質となる L-arginine を刺激物質、L-NMA と共に作用させた効果についても検討した。

[結果]: カバースリップ上の内皮細胞を ATP で刺激すると、細胞内 Ca^{2+} 濃度は、ATP の濃度依存性に上昇した。カラム内の内皮細胞を刺激する ATP の濃度を増すと、それに伴い血管切片の %弛緩率および平滑筋細胞の cGMP 量で示される EDRF 放出量も増加した。BKN では、 $10^{-8}M$ 濃度の最初の刺激で細胞内 Ca^{2+} 濃度は著明に増加したが、以後 BKN の濃度を高めても Ca^{2+} 濃度はそれ以上増加せず、逆に漸減した。%弛緩率および cGMP 量も、最初の刺激 ($10^{-8}M$) で増加し、その後は濃度を増してもそれ以上の変化は観られなかった。この減少は BKN 刺激に対する desensitization が起こったためと考えられた。ACh による刺激ではどの濃度に於ても細胞内 Ca^{2+} 濃度、%弛緩率及び cGMP 量に有意な変化は生じなかった。A23187 は ATP と同様に濃度依存性に細胞内 Ca^{2+} 濃度、%弛緩率及び cGMP 量を増加させた。切片弛緩率と $[Ca^{2+}]_i$ 、および cGMP 上昇レベルと $[Ca^{2+}]_i$ には、それぞれ統計的に有意な相関がみられた。(それぞれ $r=0.928, p<0.01$; $r=0.975, p<0.01$)。このことは、細胞内 Ca^{2+} 濃度の変化が EDRF 放出量と link している可能性を示すものと思われた。

EDRF 放出における細胞外 Ca^{2+} の役割を検討する目的で、EDRF と刺激物質を作用させた実験では、細胞外 Ca^{2+} 非存在下で、細胞内 Ca^{2+} 濃度は小さな peak 反応を示すものの細胞外 Ca^{2+} 存在下でみられた持続的上昇が消失した。血管切片の弛緩反応や平滑筋細胞内の cGMP の上昇も細胞外 Ca^{2+} 除去により抑制された。これらの結果は、刺激で起こる EDRF 放出に細胞外 Ca^{2+} の存在が必須であることを示唆している。

各刺激で内皮細胞から放出される血管弛緩物質が NO 或いは NO 関連物質であるかどうかを検討した実験では、内皮細胞に L-NMA を作用させると %弛緩率及び平滑筋細胞内 cGMP の上昇反応が著明に抑制された。続いて L-arginine を加えると再び血管切片の弛緩及び平滑筋細胞内 cGMP の上昇反応が出現した。従って、今回の実験で観察された血管の弛緩及び平滑筋細胞内 cGMP を上昇させた物質は NO 或いは NO を産生する物質が主体であると考えられた。

[考按]: 今回の実験で ATP, BKN, A23187などの agonist で培養内皮細胞を刺激すると兎大動脈切片を弛緩する物質が放出されるのが観察された。この弛緩物質の放流は、特異的 NO 産生阻害物質である L-NMA の存在下で著明に抑制され、L-arginine を加えると復活することから、その本体は NO あるいは S-nitrosocysteine などの NO を産生する物質と考えられた。また、今回の実験結果から刺激による内皮細胞からの EDRF 放出には細胞外或いは細胞内 Ca^{2+} の動態が深く関与することが示された。従来、agonist による細胞内 Ca^{2+} 濃度変化と EDRF の放出の関係をみた報告は少なくないが、両者の定量的関係を詳細に検討した研究は今までなかった。今回の検討で、ある刺激レベルでの細胞内 Ca^{2+} 濃度と EDRF の効果とみなされる平滑筋細胞の反応即ち大動脈平滑筋細胞の弛緩と cGMP 上昇との間に統計的に有意な相関関係が認められた。血管内皮細胞に constitutive NOS が存在し、その活性が $1 \text{ nM} - 1 \text{ } \mu\text{M}$ の範囲で細胞内 Ca^{2+} 濃度に依存することが報告されているが、今回培養牛胎児大動脈内皮細胞で観察された結果、即ち EDRF 放出が細胞内 Ca^{2+} レベルに直接的に関連している減少に、この constitutive NOS が関与している可能性が考えられた。また、細胞外 Ca^{2+} を除くと agonist 刺激による Ca^{2+} の持続的上昇が著明に抑制され、EDRF 放出反応も消失することから、細胞外 Ca^{2+} は刺激による持続的な Ca^{2+} 上昇に動員されることで EDRF 放出に関与していると思われた。

今後、 Ca^{2+} と EDRF に関しては、 Ca^{2+} がどのようにして NOS の活性を高めるのか、即ち NOS における Ca^{2+} の作用点はどの部分であるか、内皮細胞において刺激で誘発される EDRF 放出の機序は常に Ca^{2+} 依存性といってよいのか、 Ca^{2+} 非依存の機構があるとするならばそれぞれの役割は何なのかなど、検討すべき重要な問題は多い。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 北 畠 顕
副 査 教 授 阿 部 和 厚
副 査 教 授 牧 田 章

血管内皮細胞は、血管拡張物質の1つである内皮由来弛緩因子（EDRF）を産生・分泌し血管のトーンズの調節に深く関わっている。EDRFは、血管平滑筋の細胞内 cGMP を上昇させ、平滑筋を弛緩し血管を拡張させる。内皮からの EDRF 放出は、ホルモンなどの化学的刺激だけでなく shear stress などの物理的刺激によっても修飾を受けることが知られている。最近、内皮の EDRF 放出反応に、細胞内外の Ca^{2+} が関与すること、特に EDRF 合成酵素の活性が細胞内 Ca^{2+} や calmodulin に依存することが指摘されるようになった。しかし、外来刺激によって生じる内皮細胞内の Ca^{2+} 濃度変化と実際に放出される EDRF 放出量の関係を詳細に検討した報告はなく、両者の定量的な関係は不明である。そこで、本研究では、血管内皮細胞の EDRF 放出機序における細胞外および細胞内 Ca^{2+} の役割を、特に細胞内 Ca^{2+} 濃度変化と EDRF 放出量との関係から検討した。

ウシ胎児下行大動脈内皮細胞をカバースライドに培養し小型 chamber に取り付け、種々の濃度の ATP, acetylcholine (ACh), bradykinin (BKN), および Ca^{2+} -ionophore (A23187) をそれぞれ含む溶液で内皮細胞を刺激し、刺激に対する細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) の変化を Ca^{2+} 蛍光指示薬である Fura-2 と蛍光測光顕微鏡により測定した。また、同内皮細胞を micro-carrier beads に培養しカラムに詰め、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 測定時と同様の agonist で刺激し、放出される EDRF の量を、内皮を除去した家兎大動脈切片を用いた bioassay 法と、培養ウシ平滑筋細胞内 cGMP 量の変化 (RIA 法) から測定した。EDRF 放出における細胞外 Ca^{2+} の関与を検討する目的で、 Ca^{2+} キレート剤である EGTA を用い、内皮の細胞外 Ca^{2+} 濃度をゼロにした際の ATP, BKN, A23187 の各刺激における $[\text{Ca}^{2+}]_i$, 血管切片張力変化、および培養平滑筋細胞内 cGMP を測定した。また、血管切片張力、平滑筋内 cGMP 量を変化させた物質が NO 関連物質かどうかを知るために、内皮細胞に各刺激 (ATP, BKN, A23187) と同時に、NO の産生障害物質である N^G -methyl-L-arginine (L-MNA) を作用させた際の EDRF 放出反応を測定した。さらに NO 合成の基質となる L-arginine を刺激物質、L-NMA と共に作用させた効果についても検討した。

その結果、細胞内 Ca^{2+} 濃度を上昇させる ATP, BKN, A23187では、血管切片の弛緩および平滑筋細胞内 cGMP の上昇すなわち EDRF の放出が観られたが、 Ca^{2+} 濃度の変化しない ACh では血管切片弛緩率、cGMP 量は変化せず EDRF は放出されなかった。このとき、細胞内 Ca^{2+} 濃度と EDRF 放出量（血管切片弛緩率および cGMP 量の変化）の間には統計的に有意な正の相関が認められた。細胞外 Ca^{2+} を除くと、agonist 刺激による細胞内 Ca^{2+} の持続的上昇が起こらず EDRF も放出されなかった。放出された EDRF の血管平滑筋弛緩および cGMP 増加作用は特異的 NO 合成阻害薬により喪失し、NO 基質となる L-arginine で回復したことからその本体は NO であることが示された。

以上の結果より、細胞内情報伝達系でセカンドメッセンジャーとして働く細胞内 Ca^{2+} の濃度変化は直接 EDRF (NO) の産生・放出量と連関していること、細胞外 Ca^{2+} は刺激による細胞内 Ca^{2+} の持続的上昇に動員されることで EDRF (NO) の産生・放出に関与することが示唆された。

口頭発表の審査会において、阿部教授より、静脈をもちいた実験系の有無について、EDRF の作用部位について、EDRF は平滑筋を積極的に弛緩させる物質と考えて良いかについての質問がなされた。牧田教授より EDRF 放出における Ca^{2+} 上昇の機序について、EDRF 放出機序における IP_3 の関与について、本研究で動脈をもちいた理由についての質問がなされた。これらに対し、申請者は概ね妥当な回答を行った。その後、行われた阿部、牧田両審査教授との試問についても、概ね妥当な回答がなされた。

本研究は、血管内皮細胞の EDRF 放出反応について、細胞内 Ca^{2+} 濃度変化が直接 EDRF の産生・放出と連関していることを明らかにしたものであり、有意義な研究と考えられ、学位授与に値する。