

学位論文題名

内皮細胞由来過分極因子に関する研究

—生理的意義および病態における変化—

学位論文内容の要旨

血管内皮細胞は、従来、血液と血管平滑筋細胞を隔離する単なるバリアーと考えられてきたが、Furchtgottら(1980)が内皮細胞依存性の血管弛緩反応を発見して以来、多くの生理学ならびに薬理学領域の研究者は血管内皮細胞の機能に魅了され、その研究に傾注してきた。現在に至り、血管内皮細胞は、acetylcholine(ACh)、bradykinin、substance P、ATP、ADP、histamineなどのアゴニスト刺激や血流に起因する shear stressなどの刺激により種々の血管収縮物質や弛緩物質を放出し血管のトーヌスを調節している重要な細胞であることが明白となり、また人も含めたほとんどすべての動物種の、ほとんどすべての血管において、血管のトーヌス調節に血管内皮細胞が重要な役割を果たしていることが明らかとなった。内皮細胞由来血管弛緩因子としてnitric oxide(NO)が同定され、生理学的研究のみならず、生化学的または分子生物学的手法を用いての研究でも大きな発展を遂げ成果をあげてきた。しかし、内皮細胞依存性の血管弛緩反応として、NOおよびPGI₂では説明できない現象が見出されていた。すなわち、ある種の血管では、NOやprostaglandinの産生を抑制するような状況下においても、内皮細胞依存性の血管弛緩反応が認められ、この弛緩反応は血管平滑筋細胞の膜電位過分極反応を伴うという特徴があった。AChが血管平滑筋細胞の膜電位を過分極させることは、FurchtgottらのEDRFの発見よりも早く1978年に遡る。そして、1984年にBoltonらはこの膜電位過分極反応が血管内皮細胞依存性であることを発見し、さらに、1988年SuzukiらはAChによる血管内皮細胞依存性の膜電位過分極反応が、EDRF-NOを抑制する処置によっても変化を受けないことから、NO以外の内皮細胞由来血管弛緩因子を想定し、血管平滑筋細胞の膜電位過分極反応を伴うことから、内皮細胞由来過分極因子(endothelium-derived hyperpolarizing factor: EDHF)と命名した。EDHFの研究は血管平滑筋細胞の膜電位変化を測定するという難度の高い技術を必要とするため、研究が限定されてしまい、NOなどの急速な研究の発展は起こらなかった。すなわち、EDHFの存在が指摘されて以来、約10年経った現在においても、EDHFの本体ないしその合成酵素は未同定であり、またEDHFの標的イオンチャネルも未だに同定されていない。従来、血管における研究は、大動脈など大血管に関する研究が主体であったが、近年、微小血管における研究方法の確立と共に、生理学的に重要と思われる微小血管における研究が盛んとなり、大血管と小血管での血管反応の様々な違いが指摘されるようになってきた。その結果、EDHFは抵抗血管である微小血管においてEDRF-NOよりも強力に作用しており、血圧の調節および臓器血流の調節に関してはNOよりもむしろEDHFが重要であることが明らかとなってきた。病態における血管変化を考える上でも微小血管の研究は重要であり、高血圧や糖尿病などの微小循環障害を伴う病態形成において、EDHFの変化が大きく影響している可能性がある。本研究はEDHFの本体・放出機序・標的イオンチャネルおよび生理学的病態生理学的意義を追求する目的で開始した。血管平滑筋細胞の膜電位変化は、微小電極法により、また、血管弛緩反応は、等尺性張力変化を測定することにより検討した。

AChは内皮細胞依存性に、濃度依存性に、ラット腸間膜動脈平滑筋細胞の膜電位を過分極させた。AChの膜電位過分極反応はindomethacin, N^G-nitro-L-arginine(L-NNA), oxyhaemoglobinの前処置により影響を受けなかった。したがって、AChによって内皮細胞から放出されるEDHFはprostaglandinないしはNO以外の物質と考えられた。AChによる過分極反応は、20 mM K⁺溶液により抑制され、1 mM K⁺溶液により増強された。また、TBAおよびapaminの前処置により抑制されたが、TEA, charybdotoxin, glibenclamide, ouabainにより影響を受けなかった。これらの結果から、ラット腸間膜動脈平滑筋細胞におけるAChによる膜電位過分極反応は、少なくとも一部はapamin感受性のK⁺チャネルの活性化によるものと推定された。AChによるEDHFの放出は、血管内皮細胞内のCa²⁺上昇によって引き起こされるが、一過性のEDHFの放出は、phospholipase Cの活性化により放出された IP₃がIP₃感受性のCa²⁺ storeからCa²⁺を放出することにより惹起され、持続性のEDHFの放出は、IP₃感受性Ca²⁺ storeの枯渇化により引き起こされる細胞外から細胞内へのCa²⁺流入により惹起されることが推定された。このCa²⁺流入経路はL-typeCa²⁺チャネルとは異なり、Ni²⁺に阻害される経路であることが判明した。EDHFの本体について、アラキドン酸のcytochrome P450代謝産物であるepoxyeicosatrienoic acidが推定されているが、少なくともラット腸間膜動脈においては否定的な見解を得た。AChおよびCa²⁺ionophoreであるA23187による内皮細胞依存性の膜電位過分極反応は糖尿病病態で減弱し、その時間経過も一過性となる傾向が認められた。この変化はL-NNA, indomethacin, superoxide dismutaseの前処置により影響を受けなかった。ATP感受性K⁺チャネル開口薬であるpinacidilによる内皮細胞非依存性の過分極反応には変化が認められなかった。この糖尿病による過分極反応の変化はインスリン治療により予防された。AChによる血管弛緩反応も糖尿病病態において減弱しており、また一過性となる傾向が認められた。糖尿病病態ばかりではなく、高血圧病態においてもEDHF反応が低下していた。この原因の一つとして、酸化LDL中にあるlysophosphatidylcholine(LPC)が重要な役割をしている可能性が示された。すなわち、LPCは濃度依存性にEDHFによる内皮細胞依存性の過分極反応を抑制したが、pinacidilによる内皮細胞非依存性の過分極反応には影響を与えなかった。またLPCはNOによる血管弛緩反応よりも、EDHFによる弛緩反応をより選択的に抑制し、病態におけるEDHF変化の重要性が推定された。次に、リン脂質の構造とEDHF反応に対する抑制作用との関連を検討すると、まず第一に、リン脂質のグリセロール骨格の第1位のアルキル基がC14以上で十分に長いこと、第二に、リゾ体ないしは類似した一本鎖の構造であること、第三に、第3位の構造はそのチャージは関係なく、大きさがある程度以上大きいこと、がEDHFによる過分極反応を抑制する必要条件と考えられた。これらのリゾ体リン脂質類似構造物質は、血管内皮細胞障害の原因ないしは増悪因子の一つと考えられ、病態生理学上重要であると考えられた。

以上より、少なくともラット腸間膜動脈において、NOでもないprostaglandinでもない物質がAChなどの刺激により、血管内皮細胞内のCa²⁺の上昇に伴って血管内皮細胞より産生されて、血管平滑筋細胞のK⁺チャネルを開口し膜電位を過分極させて血管を弛緩することが判明した。この弛緩反応は小血管に特異的で、生理学的病態生理学的に非常に重要なことが推定された。EDHFの発見以来約10年経過し、EDHFの特徴は徐々に解明されつつある。しかし、EDHFの本体も、その合成酵素も、またその標的イオンチャネルも未だに同定されていない。この意味において、EDHFの研究はまだ始まったばかりであり、今後、分子生物学的手法を用いた更なる研究が必要であると思われる。

学位論文審査の要旨

主査教授 菅野盛夫

副査教授 北畠顯

副査教授 川口秀明

学位論文題名

内皮細胞由来過分極因子に関する研究

—生理的意義および病態における変化—

Furchtgott ら(1980)が内皮細胞依存性の血管弛緩反応を発見して以来、血管内皮細胞は生理的および病理的刺激に反応して種々の血管収縮物質や弛緩物質を放出し血管の緊張を調節している重要な細胞であることが明白となった。内皮細胞由来血管弛緩因子としてnitric oxide (EDNO)はよく知られている所であるが、これに加えて、血管平滑筋細胞の膜電位過分極反応を伴う内皮細胞由来過分極因子(EDHF)の存在が確実視されるに至った。しかし、EDHFの本体ないしその合成酵素は未同定であり、またEDHFの標的イオンチャネルも未だに明らかされていないのが現状である。EDHFは抵抗血管である微小血管においてEDNOよりも強力に作用しており、血圧の調節および臓器血流の調節に関してはNOよりもむしろ重要であることが明らかとなってきている。本研究は、EDHFの本体、放出機序、標的イオンチャネルおよび生理学的病態生理学的意義を明らかにすることを目的におこなったものである。実験には、ラット腸管膜動脈を用い、血管平滑筋細胞の膜電位変化を微小電極法により、また、血管弛緩反応を等尺性張力変化を測定することにより検討した。本研究は、申請者が筆頭著者として発表した7編の論文を集大成したものであって、その内容は次ぎのように要約出来る。内皮細胞依存性に生じるアセチルコリン(ACh)によるラット腸間膜動脈平滑筋細胞膜電位の過分極はイオンドメタシン、NG-ニトロ-L-アルギニン(L-NNa)、オキシヘモグロビンの前処置により影響を受けなかったことから、AChによって内皮細胞から放出されるEDHFはプロスタグランジンないしはNO以外の物質と考えられ、AChによる過分極反応に及ぼす諸種K⁺チャネル阻害薬の影響の解析から、AChによる膜電位過分極反応はアパミン感受性のK⁺チャネルの活性化によるものと推測されるとしている。AChによるEDHF放出に必要な血管内皮細胞内Ca²⁺上昇は、ホスホリパーゼCの活性化によるIP₃感受性Ca²⁺貯蔵部位からのCa²⁺放出と、IP₃感受性Ca²⁺貯蔵部位の枯渇化により引き起こされる細胞外から細胞内へのCa²⁺流入により惹起されることを明らかにしている。EDHFの本体について、アラキドン酸チトクロームP450代謝産物であるエポキシヘキサトリエン酸が報告されているが、少なくともラット腸間膜動脈においては否定的な結果を得ている。興味あることに、内皮細胞依存性膜電位過分極反応は糖尿病および高血圧病態で減弱していることを認めた。この原因の一つとして、酸化LDL中に含まれているリゾホスファチジルコリン(LPC)が重要な役割をしている可能性を示し

た。すなわち、LPCは濃度依存性にEDHFによる内皮細胞依存性過分極反応を抑制すること、そして、NOによる血管弛緩反応に比べてEDHFによる弛緩反応をより選択的に抑制する事を示し、病態におけるEDHF変化の重要性を明らかにした。LPCに関する、リン脂質およびその代謝物のEDHF反応抑制について構造-活性相関を解析した結果から、リゾ体リン脂質類似構造物質に血管内皮細胞障害作用を認め、リン脂質異常代謝物が病態生理学上重要であると結論している。学位論文の発表に際して、副査の北畠教授からは、EDHFの生理学的意義および微小循環障害時の病態生理学的意義について、副査の川口教授からは、血管部位によりEDHF作用に差異が生じる機序、血管内皮細胞におけるEDHFの存在形式、すなわち、貯蔵されているのか、それとも、刺激によって生成され遊離されるのか、EDHF合成酵素について、血管の種類によっては細胞外マトリックスが異なるが、内皮細胞から遊離したEDHFの血管平滑筋細胞へのアクセスを決定している可能性、EDHFの本体などの本質的な質問があったが、申請者は豊富な実験データと蓄積された学識でもって概ね適切に回答し得た。さらに、循環器内科佐久間博士からは、LPCのEDHF抑制作用の機序について質問があったが、文献に基づいた回答があった。

申請者のEDHFに関する一連の研究は、EDHFの多彩な特性の一部を明らかにしたにすぎないが、膨大な実験データに基づく新知見の数々はEDHFの生理学的および病態生理学的意義についての今後の研究に重要な示唆を与えるものと評価できる。

審査員一同は、血管生物学に関する申請者の豊かな学識に加えて、申請者の国際的な水準に到達している血管内皮細胞EDHFに関する一連の研究が今後のEDHF研究の進展に資するところが多大であると高く評価し、申請者が博士（医学）の学位を受けるのに充分な資格を有するものと判定した。