

学 位 論 文 題 名

Experimental and/or genetically controlled alterations
of the renal microsomal cytochrome P450 epoxygenase
induce hypertension in rats fed a high salt diet

(食塩誘発性高血圧ラットにおける腎チトクローム P450
エポキシゲナーゼの高血圧抑制作用に関する研究)

学位論文内容の要旨

1. はじめに

アラキドン酸およびその代謝産物は生体の重要な生理活性物質である。アラキドン酸は主としてシクロオキシゲナーゼ系、リポキシゲナーゼ系という二つの大きな代謝経路を介してそれぞれプロスタグランジン、ロイコトリエンへと代謝される。近年、第三の経路としてチトクローム P450 エポキシゲナーゼを介する代謝経路が注目されている。P450 エポキシゲナーゼは NADPH 依存性に、epoxyeicosatrienoic acid (EET) を産生する。EET とその水酸化物 dihydroxyeicosatrienoic acid (DHET) は、様々な生理活性を示すが、特に腎臓においては、1) バゾプレッシン刺激による水再吸収の抑制、2) 腎糸球体濾過量の低下、3) 集合管における Na⁺再吸収と K⁺分泌の阻害などの作用を示す。最近、高血圧妊婦において尿中 DHET 分泌が増加しているおり、自然発症高血圧ラット (SHR) においても P450 エポキシゲナーゼ 4 A 2 の発現が変化していることが報告され、高血圧発症における P450 エポキシゲナーゼの関与が示唆されている。また、ラットに食塩負荷をすることによって、通常は検出されない P450 エポキシゲナーゼアイソフォーム蛋白が腎臓に発現し、尿中のエポキシゲナーゼ代謝産物が増加することが証明されている。

本研究の目的は、「食塩摂取によって腎 P450 エポキシゲナーゼの発現が誘導され、その降圧作用によって血圧上昇が抑制されるのではないか」という仮説を検証することである。

2. 方法

1) 実験群 (A)

動物はオスの Sprague-Dawley を用いた。エポキシゲナーゼの機能的役割を調べるため、ラットを 4 つのグループ (各 10 匹) に分けた。A 群: 通常餌料 (0.4% NaCl 含有) を 37 日間投与。B 群: 通常餌料を 37 日間投与。但し、36 日目と 37 日目にチトクローム P450 エポキシゲナーゼの選択的阻害剤クロトリマゾールを腹腔内投与 (80 mg/kg)。C 群: 高食塩含有餌料 (8% NaCl 含有) を 37 日間投与。D 群: C 群と同様の餌料を 37 日間投与し、B 群と同様にクロトリマゾールを投与。37 日後、各々のグループのラットから 8-12 時間にわたり尿を採取、尿中の EET 及び DHET をガスクロマトグラフィー/マススペクトロスコープを用いて定量した。また、大腿動脈よりカテーテルを挿入し観血的に平均動脈圧を測定した。

2) 腎ミクロゾームのエポキシゲナーゼ活性

ラット腎をホモジナイズ後、超遠心法でミクロゾーム分画を分離した。これを [1-¹⁴C] アラキドン酸と共に NADPH 存在下に 30 °C でインキューベーションし、代謝産物を抽出後、

C18 逆相高速液体クロマトグラフィー(HPLC)にて解析した。

3) 実験群(B)

動物は Dahl ラットを用いた。Dahl ラットは腎の Na⁺代謝異常による遺伝的高血圧モデルで、食塩負荷によって高血圧を発症する DS (Dahl Sensitive)と発症しない DR (Dahl Resistant) という二種類の亜種が存在する。DS 及び DR ラットに通常飼料あるいは高食塩含有飼料を 2-3 週間投与した後、Sprague-Dawley ラットと同様に血圧測定、腎ミクロゾームのエポキシゲナーゼ活性を測定した。

3. 結果

1) Sprague-Dawley ラットを用いた実験

通常飼料投与群の A 群と B 群では、クロトリマゾール投与による尿量、尿中のエポキシゲナーゼ代謝物の変化はみられなかった。尿中 Na⁺分泌にも AB 両群に違いは認められなかったが、血圧は B 群で若干低下した。一方、食塩負荷群では、尿量が 5-6 倍に増え、尿中のエポキシゲナーゼ代謝物は 6-7 倍に増加した。しかし、クロトリマゾール投与によって (D 群) 48 時間以内に尿量及びエポキシゲナーゼ代謝物が著しく減少した。C 群では尿中 Na⁺分泌は著しく増加したが、血圧は A 群同様の正常血圧を示した。一方、D 群では、尿中 Na⁺分泌は C 群のほぼ半分であり、血圧が有意に上昇した。すなわち、正常ラットの血圧は、食塩負荷+クロトリマゾール投与群でのみ上昇した。さらに、食塩負荷またはクロトリマゾール投与いずれか一方の中止により、血圧は正常化した。C 群と D 群の腎ミクロゾームを [1-14C] アラキドン酸とともにインキュベーションし、その代謝産物を HPLC で解析した結果、D 群では C 群に比べて EET の産生が少なく、クロトリマゾールが選択的にエポキシゲナーゼの酵素活性を阻害していることが明らかとなった。

2) Dahl ラットを用いた実験

通常の飼料を与えられた DR 及び DS ラットのアラキドン酸代謝には違いがみられなかった。食塩負荷 DR ラットでは腎のアラキドン酸エポキシゲナーゼ活性が上昇し、血圧は正常を保っていた。一方、同様の条件下の DS ラットでは、腎ミクロゾームのエポキシゲナーゼ活性は上昇せず、血圧は急速に上昇し食塩負荷開始後 14-17 日で 200 ± 20mmHg に達した。

4. 考察

我々の体は、日常塩分を摂取するたびに血圧が変動することのないように体液・電解質のホメオスタシスが保たれているが、腎臓はその中心的役割を担う臓器である。本研究では高血圧発症の機序解明のために、腎において体液・電解質の調節に強くかかわっていると考えられる P450 エポキシゲナーゼについて食塩誘発性高血圧性モデル動物を用いて検討した。正常ラットと、腎の Na⁺代謝異常を持たない Dahl ラット(DR)では、食塩負荷によって腎ミクロゾームの EET 産生が上昇し、血圧に変化はなかった。またクロトリマゾールによりエポキシゲナーゼ活性が阻害された正常ラットでは、腎の Na⁺代謝異常を持つ DS ラットと同様に、食塩負荷によって血圧が上昇した。これらの実験事実はチトクローム P450 エポキシゲナーゼは高血圧抑制作用を有することを示唆する。すなわち、過剰の食塩摂取に反応して腎のエポキシゲナーゼ活性が上昇し、高血圧発症を予防している。

我々は予備的に、食塩負荷をしたラット腎において、エポキシゲナーゼ 2C23 とは違う 2C サブファミリーのアイソフォームの発現が上昇することを確認している。このアイソフォームが全く新しい P450 なのか、どのような機序で食塩が蛋白の発現を制御するのかは現在のところ不明だが、高血圧抑制効果を持つ可能性がある。

5. 結語

ラットにおける食塩負荷に対するチトクローム P450 エポキシゲナーゼの抗高血圧作用に関する研究を行い次のような結果を得た。

1. 正常ラットでは、食塩負荷により腎臓のエポキシゲナーゼ活性が上昇し、血圧は正常を保つが、クロトリマゾール投与によりエポキシゲナーゼ活性は低下し、血圧は上昇する。
2. Dahl ラットに食塩負荷をすると、DR では腎臓のエポキシゲナーゼ活性が上昇し、血圧は正常を保つが、DS ではエポキシゲナーゼ活性は上昇せず血圧が上昇する。

以上より、ラット腎のチトクローム P450 エポキシゲナーゼは、高血圧抑制効果を有すると考えられる。

食塩感受性はヒトの高血圧発症における重要な要因であると考えられている。ラットのチトクローム P450 2C サブファミリーの、ヒトホモログに対する分子生物学的・遺伝子学的研究が、今後、高血圧の原因の解明・治療に役立つと期待される。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 藤 堂 省

副 査 教 授 小 柳 知 彦

副 査 教 授 石 橋 輝 雄

学 位 論 文 題 名

Experimental and/or genetically controlled alterations of the renal microsomal cytochrome P450 epoxigenase induce hypertension in rats fed a high salt diet

(食塩誘発性高血圧ラットにおける腎チトクローム P450
エポキシゲナーゼの高血圧抑制作用に関する研究)

人体は、日常塩分を摂取するたびに血圧が変動することのないように体液・電解質のホメオスタシスが保たれているが、腎臓はその中心的役割を担う臓器である。アラキドン酸代謝をつかさどる P450 エポキシゲナーゼ及びその代謝産物である EET と DHET は、腎臓において、ナトリウム代謝に強く関わっている。最近、高血圧妊婦において尿中 DHET 分泌の増加が報告され、高血圧発症における P450 エポキシゲナーゼの関与が示唆されている。申請者は「食塩摂取によって腎 P450 エポキシゲナーゼの発現が誘導され、その降圧作用によって血圧上昇が抑制されるのではないか」という仮説を検証した。実験は、正常ラットに食塩負荷+エポキシゲナーゼ阻害剤投与、あるいは遺伝的食塩感受性高血圧ラットに食塩負荷を行い、尿中 EET+DHET の定量、腎ミクロゾームのエポキシゲナーゼ活性の測定などを行って、コントロールと比較した。その結果、正常ラットに食塩負荷をした場合、コントロール群では尿中 EET+DHET の増加、エポキシゲナーゼ活性の上昇がみられ、血圧は正常を保ったが、食塩負荷+エポキシゲナーゼ阻害剤投与群では尿中 EET+DHET はコントロール群の 50%であり、エポキシゲナーゼ活性の上昇はみられず、高血圧を発症した。遺伝的食塩感受性高血圧ラットでも同様に、食塩負荷によりコントロール群はエポキシゲナーゼ活性が上昇し、血圧は正常であったが、食塩感受性群はエポキシゲナーゼ活性の上昇は見られず、高血圧を発症した。これらの実験事実はチトクローム P450 エポキシゲナーゼが高血圧抑制作用を有することを示唆する。さらにラットのエポキシゲナーゼのヒトホモログに対する分子生物学的・遺伝子学的研究によりヒト高血圧の原因の解明・治療に役立つと期待される。

審査にあたって、小柳教授から心房性利尿ホルモン (ANP) とエポキシゲナーゼとの関係、エポキシゲナーゼの臨床応用、ナトリウム長期負荷によるエポキシゲナーゼ活性の変

化、低レニンの本態性高血圧とエポキシゲナーゼとの関係について質問があった。申請者は ANP の作用機序に関する文献、申請者自身の実験データを用いて ANP は独自の情報伝達系を有し、エポキシゲナーゼが直接 ANP の作用に関与している報告は現在までみられていないこと、抗高血圧作用を有するエポキシゲナーゼアイソフォームは今のところ同定されておらず、まだ臨床応用には至らないこと、ナトリウム長期負荷はラットに著しい病的状態を引き起こすため、エポキシゲナーゼ活性の変化の評価がなされていないこと、高食塩負荷の環境下では低レニン状態であると考えられ、エポキシゲナーゼは低レニンの本態性高血圧の発症機序に関与している可能性が高いことを回答した。続いて石橋教授より EET 異性体と生理活性の関係、エポキシゲナーゼの酵素学的な検討、酵素の細胞レベルでの局在について質問があった。申請者は、チトクローム P450 の生理学的、酵素学的、組織学的文献、自身の実験データを用いて、EET は構造特異性に違った生理作用を有する特徴を有するが、今回の実験系では高血圧群、コントロール群を比較して4つの異性体の組成比に差は見られなかったこと、酵素活性は HPLC を用いて測定したこと、細胞レベルでの局在の報告は見られないが、in situ hybridization にて腎皮質に 2 C11 の局在が見られたことを回答した。次いで主査よりエポキシゲナーゼのアイソザイムの存在、高血圧全般におけるエポキシゲナーゼの意義についての質問があった。申請者はチトクローム P450 の生理学的文献、自身の実験データを用いて、今までのところチトクローム P450 のサブファミリーである 2C11,2C23,2C24 などがエポキシゲナーゼとして報告されているが、その生理活性の違いについてはまだ詳しい報告がないこと、エポキシゲナーゼは正常状態では明らかな生理活性を示さないが、ナトリウム負荷、あるいは肝腎症候群などの病的な状態において強い生理活性を発現すると思われることを明快に答えた。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。