

学位論文題名

Relaxation in Different-Sized Rat Blood Vessels Mediated
by Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor :
Importance of Processes Mediating Precontractions

(内皮細胞由来過分極因子による血管弛緩反応の
特性に関する薬理学的研究)

学位論文内容の要旨

要旨

【背景】血管内皮細胞はアセチルコリン(ACh), ブラデキニン等の血管作動物質に反応し血管弛緩反応を起こし血管のトーンスを調節している。この内皮依存性の弛緩反応には内皮細胞より産生・遊離されたプロスタサイクリン(PGI₂)と NO が関与していることはよく知られている。しかしプロスタノイドおよび NO の産生を阻害した状況においても内皮依存性の弛緩反応が認められ、この弛緩反応は血管平滑筋細胞の過分極が関係していることから、内皮由来過分極因子 (endothelium-derived hyperpolarizing factor: EDHF) によると提唱された。EDHF の本体は未だ同定されていないが、血管平滑筋の K⁺チャンネルを開口して過分極を起こすと考えられている。

【目的】近年、EDHF は抵抗血管である微小血管において NO より内皮依存性弛緩反応に寄与する程度が大きいとされており、このことは血圧の調節や臓器灌流に EDHF が重要な役割を果たしているものと考えられる。しかしながら、EDHF の関与についての血管径による違いがなぜ起こり得るのかについては未だ十分な検討はされていない。本研究ではラットより径の異なった血管を摘出し、その等尺性張力及び血管平滑筋膜電位を測定し EDHF 反応性の血管径による違いに関与する機構について検討した。

【方法】

血管標本の作製; 週齢 20-35 週、体重約 200-400g の Wistar 系雄性ラットを使用した。エーテル麻酔下に胸部大動脈および腸間膜動脈主幹と第一分枝を摘出した。酸素化した生理的塩類溶液(PSS) 中で、内皮を損傷しないように結合組織および脂肪組織を剥離してから、長さ約 3 mm の輪状標本作製した。

等尺性張力の測定; 温度を 37°C に保った、95%O₂と 5%CO₂の混合ガスで通気し、PSS 溶液を満たした器官槽内に輪状標本を懸垂した。各標本に一定の静止張力をかけ、等張性高 K⁺溶液(80 mM)による収縮反応を繰り返し惹起させ、安定した収縮が得られるようになった後、実験を開始した。

膜電位測定; 輪状標本をさらに長軸に沿って切断し、長方形の血管標本作製した。標本は内皮細胞側を上面にして約 3 ml の器官槽内にピンで固定し、37°C の PSS 溶液で灌流した。3 M の KCl に満たしたガラス電極を内皮細胞側より血管平滑筋に刺入し、約 2 分間の安定した膜電位を確認した後に膜電位変化を記録した。

【結果および考察】 Phenylephrine で前収縮させた大動脈、腸間膜動脈本幹、および第一分枝いずれにおいても ACh は濃度依存性に弛緩反応を惹起し、この弛緩反応は内皮細胞の剥離により消失したことから、内皮依存性であると確認された。最大弛緩反応は三群間に違いは認められなかったが、その感受性は径の小さな血管ほど高い傾向が認められた。Cyclooxygenase 阻害薬である indomethacine 前処置は ACh による弛緩反応に影響せず、用いられた血管での ACh による弛緩反応にプロスタノイドの関与はほとんど無いと考えられた。Indomethacine と NO 合成阻害薬である L-NNA で処置した時、ACh による弛緩反応は胸部大動脈では認められず、腸間膜動脈本幹では濃度反応曲線は有意差をもって右方に偏位し、最大弛緩反応も有意差をもって減少した。腸間膜動脈第一分枝においては最大弛緩反応には影響は認められなかったが ACh に対する感受性は有意に低下した。この NO、PGI₂ 非依存性の内皮依存性弛緩反応を EDHF によるものとした。すなわち EDHF を介する弛緩反応は抵抗血管に近い細い径の血管でより強く、一方、大動脈での内皮依存性の弛緩には EDHF はほとんど関与せず NO を介すると示唆された。血管平滑筋の静止膜電位は大動脈で -49 ± 1 mV、腸間膜動脈本幹で -52 ± 1 mV、第一分枝では -60 ± 1 mV と細い血管で深い傾向がみられた。ACh は内皮存在下で濃度依存的な過分極反応を引き起こし、その程度は、大動脈で -8 ± 1 mV、腸間膜動脈本幹で -16 ± 1 mV、腸間膜動脈第一分枝では -17 ± 1 mV と細い血管でより強い傾向がみられ、結果として膜電位は小さな径の血管で深い膜電位となった。EDHF は血管平滑筋細胞の K⁺ チャネルを開口する事が知られているので、ATP 感受性 K⁺ チャネル開口薬である pinacidil を用い EDHF と弛緩反応及び過分極反応を測定し比較した。Pinacidil は濃度依存性にどの群においても内皮非依存性弛緩反応を惹起し、最大弛緩反応は三群間で差は認められなかったが、細い血管でより感受性が高かった。一方、pinacidil による過分極反応は EDHF による反応とは逆に太い血管でより強い傾向がみられた。EDHF は血管平滑筋の過分極を引き起こし、その過分極により L 型 Ca²⁺ チャネルを不活化し平滑筋への Ca²⁺ の流入が妨げられ弛緩反応を惹起すると考えられる。大動脈では phenylephrine の収縮が nifedipine によりほとんど抑制されないことから、その収縮に L 型 Ca²⁺ チャネルが関与していないため、EDHF により弛緩反応が惹起されないものと結論された。一方、腸間膜動脈では phenylephrine の収縮は nifedipine に強い感受性をもつことから、収縮に L 型 Ca²⁺ チャネル活性化が強く関与するため EDHF による弛緩反応が顕著に認められるものと推察された。さらに、nifedipine 前処置にて L 型 Ca²⁺ チャネルを抑制した状態で EDHF による弛緩反応を検討したところ、腸間膜動脈本幹ではほぼ完全に抑制されたにもかかわらず、第一分枝においては最大弛緩反応は部分的にのみ抑制されたことから、残りの 50% 近い部分は L 型 Ca²⁺ チャネル不活性化以外の収縮抑制によるものと考えられた。Phorbol ester は protein kinase C を介し収縮蛋白の Ca²⁺ 感受性を亢進させることにより血管収縮を惹起する事が報告されている。Nifedipine 存在下での phorbol ester で収縮させた血管における EDHF による弛緩反応は大動脈および腸間膜動脈本幹ほとんど認められなかったが、第一分枝においては部分的にのみ抑制を受けた。このことから径の細い血管では EDHF による弛緩反応に収縮蛋白の Ca²⁺ 感受性を低下が関与する機構が存在していることが示唆された。

【結論】 EDHF を介した血管弛緩反応は径の小さな抵抗血管に近い血管系においてより強く認められた。これは、EDHF による血管弛緩反応の主たる機序が過分極による L 型 Ca²⁺ チャネル不活性化であるため前収縮過程に導血管では L 型 Ca²⁺ チャネル活性の関与の少なく、逆に微小血管では、このチャネルの活性の寄与が大きいことによると考えられる。さらに、膜電位の深い微小血管では EDHF による過分極反応がより顕著となるため、収縮蛋白の Ca²⁺ 感受性低下作用を引き起こして、それが血管弛緩反応に貢献するものと考えられた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 安 田 慶 秀
副 査 教 授 菅 野 盛 夫
副 査 教 授 北 畠 顕

学 位 論 文 題 名

Relaxation in Different-Sized Rat Blood Vessels Mediated by Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor : Importance of Processes Mediating Precontractions

(内皮細胞由来過分極因子による血管弛緩反応の
特性に関する薬理学的研究)

血管内皮細胞はアセチルコリン(ACh)等の血管作動物質に反応しプロスタサイクリン(PGI₂)と NO を産生・遊離し血管弛緩反応を起こす。しかしプロスタノイドおよび NO の産生を阻害した状況においても内皮依存性の弛緩反応が認められ、この弛緩には血管平滑筋細胞の過分極を伴うことより、内皮由来過分極因子 (endothelium-derived hyperpolarizing factor: EDHF)によると提唱された。EDHFは血管平滑筋のK⁺チャネルを開口して過分極を起こすと考えられている。近年、EDHF は抵抗血管である微小血管においてNO より内皮依存性弛緩反応に寄与する程度が大きいとされており、血圧の調節や臓器灌流に重要な役割を果たしていると考えられる。しかし EDHF 反応の血管径による違いがなぜ起こるのかについては十分な検討はされていない。本研究ではラットより径の異なった血管を摘出し、その等尺性張力及び血管平滑筋膜電位を測定し、EDHF 反応性の血管径による違いに関与する機構について検討した。Phenylephrine で前収縮させた大動脈、腸間膜動脈主幹部、腸間膜動脈第一分枝いずれにおいてもAChは濃度依存性に弛緩反応を惹起し、三群とも100%近い最大弛緩反応を示した。Cyclooxygenase 阻害薬であるindomethacine 前処置はAChによる弛緩反応に影響せず、用いた血管でのAChによる弛緩反応にプロスタノイドの関与はほとんど無いと考えられた。Indomethacine と NO 合成阻害薬であるL-NNA 前処置時、AChによる弛緩反応は胸部大動脈では消失、腸間膜動脈主幹部では最大弛緩反応は75%程度に減少、第一分枝においては最大弛緩反応には影響は認めなかった。このNO、PGI₂非依存性の内皮依存性弛緩反応をEDHFによるものとした。すなわちEDHFを介する弛緩反応は細い径の血管でより強く、一方、大動脈での内皮依存性の弛緩はNOによると示唆された。AChは濃度依存的に過分極反応を引き起こし、その程度は静止膜電位の深い細

い血管でより強くみられた。EDHFは血管平滑筋の過分極を引き起こし、L型Ca²⁺チャンネルをブロックし、弛緩反応を惹起すると考えられる。大動脈ではphenylephrineの収縮がnifedipineによりほとんど抑制されないことから、その収縮にL型Ca²⁺チャンネルが関与していないため、EDHFによる弛緩反応が惹起されないものと結論された。一方、腸間膜動脈ではphenylephrineの収縮はnifedipineに強い感受性をもつことから、収縮にL型Ca²⁺チャンネル活性化が強く関与するためEDHFによる弛緩反応が顕著に認められると推察された。さらに、nifedipine前処置下でEDHFによる弛緩反応を検討したところ、腸間膜動脈本幹ではほぼ完全に抑制されたが、第一分枝では部分的にのみ抑制され、L型Ca²⁺チャンネルブロック以外の収縮抑制の機序が考えられた。PDBuはprotein kinase Cを介し収縮蛋白のCa²⁺感受性を亢進させることにより血管収縮を惹起する事が報告されている。Nifedipine存在下、PDBuで収縮させた血管におけるEDHFによる弛緩反応は、第一分枝においてのみ部分的に抑制を受けた。このこと。とから径の細い血管ではEDHFによる弛緩反応に収縮蛋白のCa²⁺感受性を低下が関与する機構が存在していることが示唆された。口頭発表に際し、北畠教授からEDHFの候補因子、血管径によりEDHF反応の違いに寄与する因子、アンギオテンシン変換酵素阻害薬がEDHF反応を改善する可能性についての質問がなされた。安田教授からモデル設定の理由、人の血管におけるEDHF反応について質問がなされた。菅野教授から過分極とCa²⁺感受性低下作用の関連、病態時における変化について質問がなされた。また出席者より各種血管におけるEDHF反応性の機序に関する質問がなされた。いずれの質問に対しても、申請者は過去のデータや関連論文を引用し、概ね妥当な回答を行った。

この論文は、Journal of Vascular Researchで高く評価され、今後の血管内皮機能ならびに微小循環の解明に貢献することが期待される。

審査員一同は、これらの研究成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（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。