

学 位 論 文 題 名

Reciprocal changes in endothelium-derived hyperpolarizing factor-and nitric oxide-system in the mesenteric artery of adult female rats following ovariectomy

(ラット腸間膜動脈の内皮由来過分極因子系と NO 系は
卵巣摘出により逆方向に変化する)

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

<背景及び目的>

エストロゲン補充療法が閉経後女性での心血管イベントのリスクを減少させることは疫学的データからもよく知られているが、その機序は完全には解明されていない。その機序の解明のために、卵巣摘出動物の血管を用いて弛緩反応の変化が検討されてきたが、これらの研究は一種類の血管における一種類の血管弛緩因子の解析に限られていた。すなわち大動脈などの伝導血管での NO もしくは腸間膜動脈などの抵抗血管での内皮由来過分極因子(EDHF)などである。一般的には血圧調節には抵抗血管が重要であり、また抵抗血管は大血管と異なり、弛緩因子として NO および EDHF の両者を遊離することが知られている。そこで本研究では、腸間膜動脈を用いて、卵巣摘出による EDHF 系と NO 系の変化およびその機構について検討した。

<方 法>

40 週齢雌性 Wistar ラットを、偽手術施行群 (CON)、卵巣摘出術施行群(OVX)および卵巣摘出術後エストロゲン補充療法施行群(OVX+E2)の 3 群に分け、4 週間飼育後に実験に用いた。摘出した腸間膜動脈を用いて血管平滑筋の膜電位測定および等尺性張力測定を行った。膜電位測定および張力測定は常法のごとく行った。腸間膜動脈の弛緩反応の測定はフェニレフリン処理により前収縮させた後、ACh を投与することにより行った。遮断薬のない場合を全弛緩反応とし、COX 阻害薬 (インドメタシン) と Ca 活性化 K チャネル遮断薬 (アパミンとシャリブドトキシシン) 存在下における ACh による弛緩反応を NO 誘発性弛緩反応とし、COX 阻害薬と NOS 阻害薬 (L-NOARG) 存在下における ACh による弛緩反応を EDHF 誘発性弛緩反応とした。腸間膜動脈から抽出した total RNA を用い、RT-PCR を施行した。Western blot 法を用いて、connexin (cx)-40, cx-43, eNOS, calmodulin, heat shock protein 90 (hsp90), caveolin-1, iNOS の蛋白レベルを定量した。

<結 果>

OVX 群では子宮重量と血漿 17β -estradiol は減少し、血中 NO 代謝物、総コレステロールは増加した。血圧と心拍数に変化はみられなかった。

OVX 群の腸間膜動脈においては、ACh によって誘発される EDHF を介した弛緩反

応と膜過分極反応は減少したが、ACh 誘発性の NO による弛緩反応は増加した。また ACh による全弛緩反応は変化しなかった。OVX 群及び対照群において、EDHF による弛緩反応は gap junction 遮断薬である 18 β -グリチルリチン酸の投与によりほぼ完全に抑制された。

OVX により gap junction の主要構成成分である cx-40、cx-43 の蛋白レベルは減少した。eNOS 及びその活性化因子である calmodulin や hsp90 のレベルは変化しなかったが、eNOS 抑制因子である caveolin-1 は減少した。また iNOS レベルが増加した。

eNOS および iNOS の収縮反応への寄与を検討するためフェニレフリン収縮に対する各 NOS 阻害薬の影響を検討した。対照群の収縮反応は非特異的 NOS 阻害薬 (両 NOS を阻害) である L-NOARG により増大したが、iNOS 特異的阻害薬であるアミノグアニジンでは変化しなかった。OVX 群のフェニレフリン収縮は減弱していたが、L-NOARG により対照群と同程度まで回復するとともに、アミノグアニジンにより増大した。

OVX+E2 群では OVX 群で生じた全ての変化が対照群のレベルに戻った。

< 考 察 >

OVX はラット腸間膜動脈の EDHF による弛緩反応を減弱させたが、NO による弛緩反応を増強する結果、全弛緩反応には影響を与えなかった。すなわちエストロゲン低下は内皮依存性の血管弛緩反応には影響を与えなかった。

EDHF による反応は 18 β -グリチルリチン酸によりほぼ完全に抑制されることからラット腸間膜動脈における EDHF の本体は gap junction を介した内皮細胞から平滑筋細胞への膜過分極の伝達と考えられた。エストロゲン欠乏における EDHF 反応の減弱は gap junction の主要構成成分である cx-40、cx-43 の蛋白レベルの低下が原因であると考えられた。ラットの cx-40、cx-43 遺伝子のプロモーター領域にはエストロゲン応答エレメント(ERE)が存在しており、cx-40 や cx-43 の蛋白レベルの変化はおそらく ERE を介した転写調節によると考えられる。

エストロゲン欠乏における NO 弛緩反応の増強は、caveolin-1 蛋白レベルの減少によって生じる eNOS 活性化の増強及び iNOS 蛋白レベルの増加が原因であると考えられた。caveolin-1 のプロモーター領域にも ERE が存在しており、cx-40、cx-43 と同様なメカニズムにより caveolin-1 が減少すると考えられた。iNOS のプロモーター領域には ERE は存在しないが、NF- κ B、AP-1 の転写因子の結合領域を持つことが報告されている。エストロゲンレセプターがこれらの部位に対し抑制的に働くことが知られており、このメカニズムによっておそらくエストロゲンが iNOS を制御していると考えられた。

フェニレフリンによる収縮は OVX 群において減少し、L-NOARG により対照群と同レベルまで増強した。これは、OVX 群の動脈が対照群に比べてより多くの NO を放出することを示す。対照群では収縮はアミノグアニジンにより変化せず、OVX 群で増強した。これは OVX 群で iNOS による NO 産生が亢進していることを示し、Western blot での iNOS レベルの増加と一致する。L-NOARG 投与後の収縮とアミノグアニジン投与後の収縮量の差は eNOS 由来の NO が関与する部分とみなされるが、OVX 群でその差は増大した。これは、eNOS 抑制因子である caveolin-1 レベルの減少の結果と一致する。

以上の結果、エストロゲン欠乏は血管径には影響を与えないが、iNOS レベルの増加による過剰な NO 産生は血中コレステロール増加とともに動脈硬化促進的に作用することが明らかとなった。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 筒 井 裕 之
副 査 教 授 三 輪 聡 一
副 査 教 授 吉 岡 充 弘

学位論文題名

Reciprocal changes in endothelium-derived hyperpolarizing factor-and nitric oxide-system in the mesenteric artery of adult female rats following ovariectomy

(ラット腸間膜動脈の内皮由来過分極因子系と NO 系は
卵巣摘出により逆方向に変化する)

エストロゲン補充療法が閉経後女性での心血管イベントのリスクを減少させることは疫学的データからもよく知られているが、その機序は完全には解明されていない。その機序の解明のために、卵巣摘出ラットの腸間膜動脈を用いて、内皮由来過分極因子(EDHF)系と NO 系の変化およびその機構について検討した。卵巣摘出によるエストロゲン減少は、ACh によって誘発される EDHF を介した弛緩反応と膜過分極反応を減弱させたが、その一方 ACh によって誘発される NO による弛緩反応を増強させた。その結果 ACh による全弛緩反応には影響がないことが確認された。EDHF による反応がギャップジャンクション遮断薬の投与によりほぼ完全に抑制されることから、ラット腸間膜動脈における EDHF の本体はギャップジャンクションを介した内皮細胞から平滑筋細胞への膜過分極の伝達であることが確認された。エストロゲン減少による EDHF 反応減弱のメカニズムとして、ギャップジャンクションの主要構成蛋白質である connexin-43, 40 の減少が原因であることが確認された。ラットの connexin-43, 40 遺伝子のプロモーター領域にはエストロゲン応答エレメント(ERE)が存在しており、connexin 蛋白レベルの変化は ERE を介した転写調節が関与している可能性が示唆された。

エストロゲンの減少によって、eNOS 及びにその活性増強因子である calmodulin, hsp90 の蛋白レベルには変化はなかったが、eNOS 活性抑制因子である caveolin-1 の蛋白レベルの低下を認めた。このことからエストロゲン減少における NO による弛緩反応の増強は、caveolin-1 蛋白レベルの減少によって生じる eNOS 活性化の増強が原

因であることが確認された。caveolin-1 のプロモーター領域にも ERE が存在しており、connexin-43, 40 と同様なメカニズムにより caveolin-1 が減少することが示唆された。

フェニレフリン収縮に対する各種 NOS 阻害薬を用いた実験において、卵巣摘出群の腸間膜動脈での収縮反応の減弱が認められた。この原因としては eNOS 由来の NO 産生の亢進及び iNOS 由来の NO 産生が亢進していることが確認された。卵巣摘出群での iNOS 蛋白レベルの増加は Western blot によっても証明されている。iNOS のプロモーター領域には ERE は存在しないが、NF- κ B, AP-1 の転写因子と結合する領域を持つことが報告されており、エストロゲンレセプターがこれらの部位に対し抑制的に働くことが知られており、このメカニズムによって iNOS が制御されていると考えられた。

以上から卵巣摘出でのエストロゲンの減少により、EDHF 系と NO 系が逆方向に働くことで、血管径自体には影響を与えないが、iNOS の増加に伴う過剰な NO 産生と血中コレステロール増加の影響が、動脈硬化促進性に作用する可能性が示唆された。

口頭発表に際し、吉岡教授からは、卵巣摘出モデルにおける体重増加のメカニズムについて、ギャップジャンクションを介する過分極伝達のメカニズムについて、iNOS 由来の NO と動脈硬化の関連について、血管内皮細胞におけるエストロゲンレセプターの局在についての質問があった。三輪教授からは今回の研究の意義及び過去の研究との相違点についての意見が述べられた。筒井教授からはエストロゲン補充による EDHF 反応の回復のメカニズムについて、エストロゲンの急性効果における EDHF 反応への影響についての質問があった。いずれの質問に対しても、申請者は研究結果に基づいて、あるいは文献的知識により、概ね適切に回答し得た。

この論文は、卵巣摘出におけるエストロゲン減少での EDHF と NO の変化及びにその機序を明らかにしたものとして意義のあるものと評価された。審査員一同は、これらの成果を高く評価し、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。