

腸間膜動脈血管の内皮除去による血管弛緩反応増強機序

岩谷有希子,^{*,a} 沼 裕美,^a 能木沙織,^a 高山房子,^a 見尾光庸,^b 川崎博己^a**Mechanisms Underlying Enhanced Vasodilator Responses to Various Vasodilator Agents following Endothelium Removal in Rat Mesenteric Resistance Arteries**Yukiko IWATANI,^{*,a} Hiromi NUMA,^a Saori ATAGI,^a Fusako TAKAYAMA,^a
Mitsunobu MIO,^b and Hiromu KAWASAKI^a*Department of Clinical Pharmaceutical Science, Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Science, Okayama University, 1-1-1 Tsushima-naka, Okayama City 700-8530, Japan, Laboratory of Pharmacology, School of Pharmacy, Shujitsu University, 1-6-1 Nishikawahara, Okayama City 703-8516, Japan*

(Received January 5, 2007)

We reported that vasodilator responses to various vasodilator agents were augmented by endothelium removal. To explain this mechanism, we hypothesized that endothelium removal eliminates the release of endothelium-derived contracting factor EDCF, which counteracts the vasodilation. However, the underlying mechanism is unknown. Therefore the present study investigated the second messenger system further to investigate the mechanisms underlying enhanced vasodilator response after endothelium removal in rat mesenteric resistance arteries. Mesenteric vascular beds isolated from Wistar rats were perfused and perfusion pressure was measured. The vascular endothelium was removed by 30-s perfusion of sodium deoxycholate. Vasodilator responses to sodium nitroprusside (SNP) perfusion were markedly augmented and prolonged by endothelium removal. In preparations with intact endothelium and active tone, 5-min perfusion of sodium azide (non-specific guanylate cyclase (GC) activator), ANP (membrane-linked GC activator), and 8-Br-cGMP (cGMP analogue) caused a concentration-dependent vasodilation that was markedly augmented by endothelium removal. However, vasodilation induced by YC-1 and BAY41-2272 (selective soluble GC activator) was not augmented by endothelium removal. When methylene blue (soluble GC inhibitor) was present in the medium, SNP caused a concentration-dependent vasodilation in the preparation with intact endothelium, which was less augmented by endothelium removal compared with control (preparation without methylene blue). These findings suggest that endothelium removal affects intracellular cGMP-mediated signal transduction system in vascular smooth muscle cells.

Key words—endothelium-derived relaxing factor (EDRF); vasodilation; cyclic GMP

1. はじめに

血管内皮細胞 (endothelial cell) は、血液と血管壁の中間に位置する単層の細胞である。従来、血管内皮細胞は血液が直接血管壁に接着しないための障壁と考えられてきたが、近年、内腔側に様々な生理活性物質を生産することによって、血栓形成や炎症の抑制、血管緊張度の調節、血管壁の細胞数の調節など、心血管系の恒常性を維持する上で非常に重要な役割を担っていることが明らかにされている。血

管内皮細胞が産生する血管作動性の生理活性物質として、血管内皮細胞由来収縮因子 (endothelium-derived contracting factor: EDCF) 及び血管内皮細胞由来弛緩因子 (endothelium-derived relaxing factor: EDRF) があり、血管内皮細胞はこれら弛緩因子と収縮因子双方を産生することによって血管緊張度を適度にコントロールしていると考えられている。¹⁾

1980年 Furchgott ら²⁾が EDRF の存在を明らかにして以来、今日までに、血管内皮細胞依存性の反応、特に EDRF を介した弛緩反応について、多くの研究がなされてきた。その結果、外因性及び内因性血管作動物質が内皮細胞に依存した血管反応を起こすことが明らかにされた。^{3,4)} これらは、内皮細胞

^a岡山大学大学院医歯薬学総合研究科臨床薬学 (〒700-8530 岡山市津島中 1-1-1) ^b就実大学薬学部薬効解析学分野 (〒703-8516 岡山市西川原 1-6-1)

*e-mail: dph17010@cc.okayama-u.ac.jp

本総説は、日本薬学会第 126 年会シンポジウム GS-1 で発表したものを中心に記述したものである。

依存性収縮及び弛緩反応と呼ばれている。一方、外因性及び内因性血管収縮物質による収縮反応は内皮細胞除去により著明に増大されることが知られているが、内皮細胞非依存性の弛緩反応に対して内皮細胞がどのような影響を及ぼしているかはほとんど検討されていない。

血管内皮細胞から様々な血管作動性の因子が産生・遊離されるためには、様々な生理活性物質や血管作動物質のほかに、ずり応力や血管伸展刺激などの物理的因子も遊離させる因子として働くことが明らかにされている。⁵⁻⁸⁾そこで本研究では、内皮細胞非依存性の血管反応が起こった場合、その弛緩若しくは収縮の物理的な情報が内皮細胞に伝えられ、内皮細胞から様々な因子が産生・遊離され、結果として過度の収縮や弛緩が抑制されるのではないかと、また、常に内皮細胞から過度の血管反応を抑制するために内皮細胞由来物質が遊離されているのではないかとという仮説を考えた。血管内皮細胞から血管平滑筋細胞への情報伝達機構が存在することは、近年多くの研究から確認されている。⁹⁻¹¹⁾また、多くの平滑筋細胞同士、内皮細胞同士といった同種細胞間のみならず、平滑筋と内皮細胞といった異種細胞間にもギャップ結合が存在することが明らかにされて以来、これら過分極や内皮細胞由来の NO などの伝播がギャップ結合を介して起こっていること¹²⁾が明らかになってきた。しかし、内皮細胞非依存性の弛緩反応を起こす物質が、血管平滑筋に作用し弛緩反応を起こす際、何らかの情報が内皮細胞へと伝達され、内皮細胞から様々な因子が産生・遊離されている可能性も提唱されている。¹²⁻¹⁶⁾血管弛緩反応に関する内皮細胞の関与について、上記のように様々な仮説や可能性が提唱されてきたが、細胞内の情報伝達系の関与、すなわち血管平滑筋細胞内における機序については不明である。そこで、本研究では、内皮細胞除去後にみられる血管弛緩反応の増大に関する平滑筋内における細胞内情報伝達系の変化に注目し、その機序を明らかにすることを目的とした。

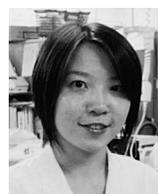
2. SNP による血管内皮細胞除去による血管反応変化

本研究においては、細動脈の血管反応を観察できる腸間膜動脈灌流標本を用いて実験を行った。200—300 g の Wistar 系雄性ラット（清水実験材料より

購入）を MacGregor 法の変法¹⁷⁾（Kawasaki の方法^{18,19)}に従って灌流標本を作成し、Krebs 液にて定流量灌流を行った。Guanethidine (5 μM) を含む Krebs 液を灌流して交感神経を遮断し、さらに methoxamine (7 μM) で血管を収縮させ灌流圧を一定レベルまで上昇させた。灌流圧が安定した後 acetylcholine (0.5 nmol) を灌流液中に注入し、血管内皮細胞依存性の弛緩反応が起こることで正常内皮の存在を確認した。SNP は、灌流液中に溶解し、標本内を灌流させ弛緩反応を観察した。なお、灌流時間は、弛緩物質の内皮細胞から平滑筋への移行が平衡に達する時間と考えると、5 分間とした。その後、methoxamine を含まない灌流液に切り換えることによって、灌流圧を低下させた。また、Takenaga らの方法に従い²⁰⁾ sodium deoxycholate (1.8 mg/ml- 生理食塩水) を静止状態下の標本に 30 秒間灌流することで内皮細胞の除去を行った。約 60 分間の洗浄後、再び methoxamine (2 μM) で血管を収縮させることで灌流圧を上昇させ、acetylcholine (0.5 nmol) 注入によって血管内皮細胞依存性の弛緩反応が消失することを観察し内皮の除去を確認した。その後、同様に SNP の弛緩反応を観察した。血管弛緩反応の程度は、実験の最後の papaverine (100 μM) 灌流によって起こる弛緩反応を 100%とした弛緩率で表した。

SNP 各濃度 (10^{-9} — 10^{-6} M) の 5 分間灌流により、濃度依存的な弛緩反応が観察された。血管内皮細胞除去後には、弛緩反応は著明に増強され、反応の持続時間も延長し、血管内皮細胞保持時の弛緩反応に比べて増大した。

この弛緩反応の増大機序として、血管内皮細胞保持時に常時遊離されている血管内皮細胞由来の血管収縮因子である EDCF が、血管弛緩反応を抑制する機構が、血管内皮細胞を除去することにより消失し、結果として、過度の弛緩反応が惹起されたものと考えられる。しかし、血管平滑筋内の情報伝達系



岩谷有希子

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科臨床薬学、博士後期課程 2 年。2003 年神戸学院大学薬学部卒業、2005 年岡山大学大学院自然科学研究科臨床薬学、博士前期課程修了。研究テーマ：血管内皮細胞による血管弛緩反応制御に関する研究。趣味：映画鑑賞、お笑いの追求。

が変化することによっても弛緩反応増大機序が起こる可能性も考えられる。したがって、次に細胞内情報伝達系に着目して機序解明の検討を行った。

3. 血管弛緩反応増大時における平滑筋細胞内情報伝達系

血管作動物質が作用を発揮するには、シグナル伝達や細胞情報伝達機構と呼ばれている受容体刺激に始まる細胞応答が必要である。この中心的役割を果たすものが cAMP, cGMP, Ca²⁺ などであるが、今回、この中でも cGMP に着目した。

cGMP を介する弛緩反応としては、NO の作用がよく知られている。NO は細胞膜受容体を介さない血管作動物質として異色の存在である。NO は、血管内皮細胞において L-アルギニンから、NO 合成酵素 (eNOS) により酸化反応を経て生成される。そこから遊離された NO や、細胞内で NO を産生する SNP は、可溶性型の GC を活性化し細胞内 cGMP を増大させる。一方、受容体に結合した ANP (atrium natriuretic peptide; 心房性ナトリウム利尿ペプチド) は、膜型の GC を活性化し細胞内 cGMP を増大させる。その後、PKG (protein kinase G) が活性化され、これによって Ca²⁺ ポンプが活性化され Ca²⁺ が流出する。また、この情報は細胞膜の K⁺ チャンネルをリン酸化させて開口させ、細胞

外へ K⁺ 流出が生じて、膜の過分極が起こる。その結果、電位依存性 Ca²⁺ チャンネルが閉口し細胞内への Ca²⁺ 流入が抑制される。これらの結果、細胞内 Ca 濃度が低下することで弛緩反応が起こると考えられている (Fig. 1)。

そこで、本実験では細胞内 cGMP が関与する血管弛緩反応に及ぼす内皮細胞除去の影響について検討した。血管内皮細胞が、EDCF や EDRF を遊離することで、血管の緊張度を適度に調節しているならば、同じように血管内皮細胞から遊離された物質は、血管平滑筋細胞内の細胞内情報伝達系のどこかに働き、抑制をかけているのではないかというのが、本研究で提示した仮定である。したがって、GC (可溶性型 GC, 膜型 GC), cGMP 及び PKG に着目し、それぞれを活性化させたときの内皮細胞保持時と除去時との血管反応性の違いについて検討した。

3-1. GC と PKG が関与する血管弛緩反応の変化 Sodium azide は、GC を直接活性化する物質である。内皮細胞保持標本において、SNP と同様に sodium azide (10⁻¹²—10⁻⁶ M) を 5 分間灌流することにより、10⁻⁹ M あたりから緩和で濃度依存的な弛緩反応が観察された。Sodium azide による弛緩反応は強くなく、10⁻⁶ M においても最大反応は、

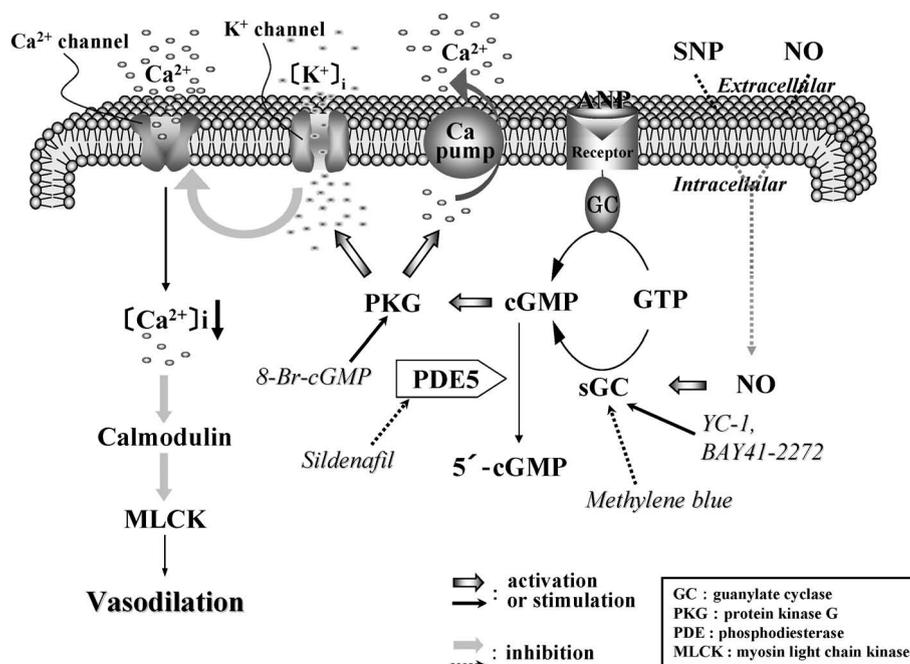


Fig. 1. Mechanisms Underlying Vasodilation Induced by NO (Nitric Oxide), SNP (Sodium Nitroprusside) and ANP (Atrial Natriuretic Peptide) in Blood Vessels

27.7%であった。一方、内皮細胞除去後、この弛緩反応は 10^{-9} Mから発現し、著明に増大し、 3×10^{-8} Mで最大となった。また、弛緩反応の持続時間も延長した。内皮細胞除去後は、血管内皮細胞保持時の弛緩反応に比べて増大した。

次に8-Br-cGMPを用いてPKGの変化を検討した。8-Br-cGMPは、cGMP類似体であり、cGMPよりも細胞膜透過性が高く平滑筋細胞内に到達し易い物質であり、PKGを活性化させる。内皮細胞保持標本において、8-Br-cGMP (10^{-7} — 10^{-4} M)の5分間灌流により、 10^{-5} Mから濃度依存的な弛緩反応が観察された。しかし、その弛緩反応は弱く 10^{-4} M投与でも最大弛緩反応は約40%であった。一方、内皮細胞除去後では、8-Br-cGMPの弛緩反応は 10^{-6} Mから出現し、最大弛緩反応も約90%と著明に増大した。また、弛緩反応の持続時間も延長した。内皮細胞除去後は、用量反応曲線は左側に移行し、血管内皮細胞保持時の弛緩反応に比べて増大した。

以上の結果から、内皮細胞除去により細胞内情報伝達系が変化していることが示された。本実験でGC活性化薬として用いたsodium azideは、二種類のGC、すなわち膜型GCと可溶性型GCを非選択的に活性化する。そこで、いずれの型のGCが変化しているかについて検討した。

3-2. 膜型GC及び可溶性型GCの反応 膜型GCの検討においては、ANPを 3×10^{-9} — 10^{-7} Mの濃度範囲で、5分間灌流した。その結果、内皮細胞保持時には20—30%の軽度な弛緩反応しかみられなかったが、内皮細胞を除去することで、弛緩反応は濃度依存的に増大し、最大反応も約60%と増大した。

可溶性型GCの検討は、 10^{-9} — 10^{-5} MのYC-1を同様に5分間灌流することで行った。内皮細胞保持時には、濃度依存的な用量反応曲線が得られた。しかしながら、その反応は、内皮細胞除去後によっても変化せず差は認められなかった。

SNPは、前述したように可溶性型GCを介して弛緩反応を起こし、内皮細胞除去後にはその反応は増大した。したがって、筆者は、当然、可溶性型GCの活性によって生じる弛緩反応は、内皮細胞除去後には、SNPの内皮細胞除去後の弛緩反応と同様に増大が認められると推察した。しかし、YC-1の

結果からはこの推察は否定された。そこで、再度の確認として、より選択的で活性の強いBAY41-2272を用いての検討を行った。 10^{-10} — 10^{-7} MのBAY41-2272を5分間灌流した結果は、YC-1と同様、内皮細胞保持時と除去時とで濃度依存的な用量反応曲線が認められたものの、差は認められなかった。

以上の結果、可溶性型GCを選択的に活性化させるYC-1とBAY41-2272による弛緩反応が、内皮細胞除去後に増大しないという事実は、内皮細胞除去後に弛緩反応が増大する機序として、EDCFを介する血管弛緩反応への抑制的な機構が、血管内皮細胞を除去することにより消失したためであるというだけではないことを示唆している。また、内皮細胞除去後に弛緩反応が増大する機序は、可溶性型よりも膜型GCの方が関与している可能性が考えられる。

3-3. sGCを抑制した状態でのSNPの血管弛緩反応 SNPは前述したように可溶性型GCのみを介して弛緩反応を起こすと考えられているため、上記の仮説は、この定説と矛盾する。したがって、筆者は、可溶性型GCを抑制した状態でSNPの弛緩反応が認められるかどうか検討を行った。

可溶性型GCの抑制は、guanethidine (5 μ M)、methoxamine (7 μ M)とともにKrebs液にmethylene blueを 10^{-7} Mに溶解し、灌流させることで行った。可溶性型GC抑制の確認は、YC-1及びBAY41-2272の弛緩反応消失と、ANPの弛緩反応の出現で行った。これまでと同様にメキサンで灌流圧を上昇させた後、methylene blue存在下においてYC-1及びBAY41-2272の弛緩反応は消失した。一方、methylene blue存在下においても、SNP (10^{-9} — 10^{-6} M)を5分間灌流させると、弛緩反応は消失することなく、濃度依存的な弛緩反応が観察された。内皮細胞除去標本においてもSNPの弛緩反応は消失せず、内皮細胞保持標本の反応に比べて軽度ではあるが有意な差を持って弛緩反応の増大が認められた。

4. 考 察

膜型GC活性化薬による弛緩反応は、内皮細胞除去により増強したが、可溶性型GC活性化薬による弛緩反応は、内皮細胞保持時と内皮細胞除去時とで変化は認められなかった。また、SNPの弛緩反応は、可溶性型GC抑制薬の存在下でも消失せず、内皮細胞除去時にその反応は増強した。このことから、

SNP は、可溶性型 GC を介する経路以外でも弛緩反応を起こしている可能性が考えられる。その弛緩反応が内皮細胞除去によって増大する機構には、可溶性型よりも膜型 GC が関与している可能性も考えられる。

また、8-Br-cGMP の実験において、内皮細胞除去後に弛緩反応は増大するということから、仮説として提示した血管内皮細胞由来の血管作動物質が、PKG 以降の伝達系を抑制している可能性が考えられる。これらの結果から、cGMP 情報伝達系が内皮細胞除去によって変化した可能性が高いと考えられる。

以上、本研究結果から、内皮細胞は内皮細胞由来物質を介して、血管弛緩を発現する cGMP の関与する細胞内情報伝達系を制御し、過剰な血管弛緩が生じないように調節していることが示唆される。

高血圧が原因である高血圧性臓器障害は、圧負荷による動脈硬化などの血管障害を基盤として生じるものであり、このような血管では、内皮細胞が障害されているため、内皮細胞依存性の弛緩機構が減弱している。したがって、このような血管では、細胞内情報伝達系が正常に働いていないと考えられる。このような血管内皮細胞の障害は、血管内皮細胞の機能変化、さらには内膜における血管平滑筋細胞の遊走や中膜の異常増殖に結びついているという仮説が提唱されている。本研究で得られた結果は、これら高血圧や血管病変によって起こる血管弛緩反応減弱機構についての原因を知る一助となる可能性ばかりでなく、循環器薬の新たな作用機序の解明に寄与するものと考えられる。

REFERENCES

- 1) Vanhoutte P. M., Mombouli J. V., *Prog. Cardiovasc. Dis.*, **1119**(3), 229–238 (1996).
- 2) Furchgott R. F., Zawadzki J. V., *Nature*, **288**, 373–376 (1980).
- 3) Urabe M., Kawasaki H., Takasaki K., *Br. J. Pharmacol.*, **102**, 85–90 (1991).
- 4) Dora K. A., Hinton J. M., Walker S. D., Garland C. J., *Br. J. Pharmacol.*, **129**, 381–387 (2000).
- 5) Vanhoutte P. M., *J. Hypertens.*, **14**, S83–S93 (1996).
- 6) Tanko L. B., Mikkelsen E. O., Simonsen U., *Br. J. Pharmacol.*, **128**, 165–173 (1999).
- 7) Huang A., Sun D., Koller A., *Hypertension*, **35**, 925–930 (2000).
- 8) Nakayama K., Ueta K., Tanaka Y., Tanabe Y., Ishii K., *Br. J. Pharmacol.*, **122**, 199–208 (1997).
- 9) Chaytor A. T., Evans W. H., Griffith T. M., *J. Physiol.*, **508**, 561–573 (1998).
- 10) Yamamoto Y., Imaeda K., Suzuki H., *J. Physiol.*, **514**, 505–513 (1999).
- 11) Suzuki H., Yamamoto Y., Fukuda H., *Folia Pharmacol. Jpn.*, **112**, 195–202 (1998).
- 12) Chaytor A. T., Evans W. H., Griffith T. M., *J. Physiol.*, **503** (15), 99–110 (1997).
- 13) von der Weid P. J., Beny J. L., *J. Physiol.*, **471**, 13–24 (1993).
- 14) Xia J., Little T. J., Duling B. J., *Am. J. Physiol.*, **269**, 2031–2038 (1995).
- 15) Beny J. L., *Pflugers Arch.*, **433** (3), 364–367 (1997).
- 16) Yamamoto A., Masaki R., Guttman P., Schmahl G., Kihara H., *J. Synchrotron Radiat.*, **1**; 5 (Pt 3), 1105–1107, (1998).
- 17) McGregor D. D., *J. Physiol.*, **177**, 21–30 (1965).
- 18) Kawasaki H., Takasaki K., Saito A., Goto K., *Nature*, **335**, 164–167 (1988).
- 19) Kawasaki H., Nuki C., Saito A., Takasaki K., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **252**, 403–409 (1990).
- 20) Takenaga M., Kawasaki H., Wada A., Eto T., *Circ. Res.*, **76**, 935–941 (1995).