



Cyclooxygenase-dependent vasoconstricting factor(s) in remodeled rat femoral arteries

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2013-08-27 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 平尾, 晃子 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/366

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博第 496号	学位授与年月日	平成20年 1月18日
氏 名	平 尾 晃 子		
論文題目	Cyclooxygenase-dependent vasoconstricting factor(s) in remodeled rat femoral arteries (再構築されたラット大腿動脈におけるシクロオキシゲナーゼ依存性血管収縮因子)		

博士(医学) 平 尾 晃 子

論文題目

Cyclooxygenase-dependent vasoconstricting factor(s) in remodeled rat femoral arteries

(再構築されたラット大腿動脈におけるシクロオキシゲナーゼ依存性血管収縮因子)

論 文 の 内 容 の 要 旨

[はじめに]

血管内皮細胞は、血管の恒常性維持に重要な役割を担っており、内皮細胞の傷害は、動脈硬化、高血圧、心筋梗塞などさまざまな循環器疾患の誘因となることが知られている。傷害を受けた内皮細胞は脱落したのち再生するが、この再生内皮細胞の機能については未だ不明な点が多い。そこで、内皮細胞を選択的に傷害する光増感法モデルを用いて、内皮細胞が再生した血管の拡張応答変化を検討した。

[材料ならびに方法]

Wistar系雄性ラットにローズベンガルを静注後、右肢大腿動脈に540 nmの光を照射し、発生した活性酸素種により血管の内側から内皮細胞に傷害を与えた。翌日、1、2、4週目に傷害部位をリング状に摘出し、等尺性張力を測定した。対照は、対側肢とした。また、摘出血管からパラフィン包埋切片を作成し、内皮細胞の脱落、再被覆および内膜肥厚の変化、そしてシクロオキシゲナーゼ(COX)の発現を免疫組織学的に検討した。

[結果]

傷害血管における内皮細胞の脱落、再被覆を確認するため、内皮細胞の指標となるvon Willebrand因子を免疫組織学的に染色したところ、傷害前は血管内腔全周に染色が認められたが、傷害翌日は染色が認められず、傷害1週後に再び内腔全周に染色が認められた。形態学的測定では、傷害前は内膜の肥厚が認められなかったが、傷害1週以降に経時的に内膜肥厚の増加が認められた。次に、等尺性張力測定により傷害血管と対照血管のフェニレフリンによる収縮を比較したところ、傷害後1、2、4週目のどの時点においても両者に有意な差は認められなかった。また、血管内皮非依存性血管弛緩物質であるsodium nitropruside(SNP)による弛緩反応も、傷害後1、2、4週目では傷害血管と対照血管に有意な差は認められなかった。内皮依存性血管弛緩物質であるアセチルコリン(ACh)による弛緩反応は、傷害翌日では全く認められなかったが、1週目で対照血管と同程度の最大弛緩率を示すまでに回復した。傷害後2週目以降も最大弛緩率は対照血管と同等であったが、AChに対する感受性は経時的に低下した。一酸化窒素(NO)合成酵素阻害剤であるN^G-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME)存在下で、ACh依存性血管弛緩反応は、傷害血管、対照血管ともに減弱した。一方、COX阻害剤であるインドメタシンとL-NAMEの共存下で、対照血管ではACh依存性血管弛緩反応がほとんど変化しなかったのに対し、傷害血管では弛緩反応の増強が認められた。傷害血管における弛緩反応の増強は、インドメタシンのみでなくCOX-1阻害剤であるSC-560あるいはCOX-2阻害剤であるNS-398によっても認められた。さらに、トロンボキサン(TX)A₂/プロスタグランジン(PG)H₂受容体阻害剤であるSQ-29548あるいはPGF_{2α}受容体阻害剤AL-8810存在下でも、ACh依存性血管弛緩反応の増強が認められた。しかし、TXA₂合成酵素阻害剤であるOKY-046存在下では弛緩反応の増強は認められなかった。L-NAMEおよびインドメタシン、高濃度KCl存在下では、傷害血管および対照血

管ともにACh依存性血管弛緩反応は完全に消失した。COX-1およびCOX-2のタンパク発現を免疫組織学的に観察したところ、COX-1は、対照血管および傷害血管ともに内皮細胞において発現が認められ、COX-2は、傷害血管の内皮細胞において発現が認められた。

[考察]

光増感法による血管傷害では、傷害翌日、傷害部位にvon Willebrand因子の発現が認められず、AChによる内皮依存性血管弛緩反応は完全に消失した。さらに、傷害1週以降、フェニレフリンによる血管収縮反応、および内皮非依存的なSNPによる血管弛緩反応には、対照血管と傷害血管に差が認められなかった。これらの結果により、光増感法モデルは、平滑筋細胞への傷害を回避し、血管内皮細胞を選択的に剥離可能にするモデルであると考えられた。AChによる血管弛緩反応には、内皮細胞から遊離されるNO、COX由来PG、内皮細胞由来過分極因子が関与することが知られている。傷害血管のAChに対する弛緩反応は、L-NAME存在下で減弱したが、インドメタシン存在下で増強したことから、本モデルでの再生内皮細胞は、AChに対してNOのほかにCOX由来の血管収縮性因子を産生する可能性が示唆された。COX阻害剤存在下で増強した血管弛緩反応は、高濃度KCl溶液で完全に消失したことから、内皮細胞由来過分極因子の遊離も関与していることが示唆された。傷害血管では、ACh刺激により血管弛緩因子とともに血管収縮性因子が遊離されるにも関わらず、対照血管と同等の最大収縮率を示したことは、内皮細胞由来過分極因子の産生が代償機構として増強している可能性が考えられた。また、PG関連阻害剤の検討から、COX依存性血管収縮因子は、COX-1およびCOX-2の両者から産生されること、この因子の候補は、TXA2ではなく、PGH2およびPGF2 α であることが示唆された。免疫組織学的観察からも、再生内皮細胞にCOX-1およびCOX-2両者の発現が示唆された。

[結論]

再生内皮細胞では、ACh刺激によりNOおよび内皮細胞由来過分極因子などの血管拡張因子のみならず、PGH2あるいはPGF2 α などの血管収縮性PGがCOX-1およびCOX-2により産生されることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

申請者は、血管の恒常性維持に重要な役割を担っている血管内皮細胞傷害時の再生過程における血管拡張性応答の変化とその基盤となる機構を、内皮細胞を選択的に傷害する光増感法を用いた血管内皮再生モデルにより検討した。

Wistar系雄性ラットにローズベンガルを静注後、右肢大腿動脈に540 nmの光を照射し、発生した活性酸素種により血管の内側から内皮細胞に傷害を与えた。翌日、1、2、4週目に傷害部位をリング状に摘出し、等尺性張力を測定した。対照は、対側肢とした。また、摘出血管からパラフィン包埋切片を作成し、内皮細胞の脱落、再被覆および内膜肥厚の変化、更にシクロオキシゲナーゼ(COX)の発現を免疫組織学的に検討した。

内皮細胞の指標となるvon Willebrand因子は、傷害前には血管内腔全周に染色を認めたのに対し、傷害翌日は消失しており、内皮細胞特異的な傷害と脱落が確認できた。傷害1週後に再び内腔全周に染色を認め、その後経時的に内膜肥厚を認めた。平滑筋細胞の機能を α 1受容体刺激薬であるフェニレフリン刺激

による等尺性張力により検討したところ、傷害後1、2、4週目のどの時点においても傷害血管と対照血管の間に有意な差を認めなかった。また、一酸化窒素(NO)供与物質であるsodium nitroprusside(SNP)投与による血管弛緩反応も有意差を認めなかった。これより光増感法モデルは血管内皮細胞を選択的に剥離可能にするモデルであり、傷害血管の平滑筋は血管内皮非依存性の収縮ならびに弛緩機能を保持している事が確認できた。一方、内皮依存性血管弛緩物質であるアセチルコリン(ACh)による弛緩反応は、傷害翌日では傷害血管において全く認めなかった。1週目に回復し、以降の最大弛緩率は対照血管と同程度であった。しかし感受性は1週目以降経時的に低下した。AChによる血管弛緩反応には、内皮細胞から遊離されるNO、COX由来プロスタグランジン(PG)、内皮細胞由来過分極因子が関与することが知られていることから、各々の阻害剤の影響を検討した。NO合成酵素阻害剤であるN^ω-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME)存在下で、ACh依存性血管弛緩反応は傷害血管、対照血管ともに減弱した。L-NAMEにCOX阻害剤であるインドメタシンを併用しても、対照血管ではL-NAME 単独と変わらなかったのに対し、傷害血管ではACh依存性血管弛緩反応の増強を認めた。同様の増強は、COX-1阻害剤であるSC-560あるいはCOX-2阻害剤であるNS-398によっても認めた。これより、再生内皮細胞は、COX由来の血管収縮性因子を産生している事が示唆された。さらに、トロンボキサン(TX)A₂/ (PG)H₂受容体阻害剤であるSQ-29548あるいはPGF₂ α 受容体阻害剤AL-8810存在下でも、ACh依存性血管弛緩反応の増強を認めたが、TXA₂合成酵素阻害剤であるOKY-046存在下では弛緩反応の増強は認めなかった。これより、血管収縮性因子はTXA₂ではなく、PGH₂およびPGF₂ α であることが示唆された。COXのタンパク発現を免疫組織学的に観察したところ、COX-1は、対照血管および傷害血管ともに内皮細胞において発現を認め、COX-2は、傷害血管の内皮細胞において発現を認めた。COX阻害剤存在下で増強した血管弛緩反応は、高濃度KCl溶液で完全に消失したことから、内皮細胞由来過分極因子の遊離も関与していることが示唆された。また傷害血管では、ACh刺激により血管弛緩因子とともに血管収縮性因子が遊離されるにも関わらず、対照血管と同等の最大収縮率を示したことは、内皮細胞由来過分極因子の産生が代償機構として増強している可能性が考えられた。

以上より申請者は、再生内皮細胞は、ACh刺激によりNOおよび内皮細胞由来過分極因子などの血管拡張因子のみならず、COX-1およびCOX-2依存性にPGH₂あるいはPGF₂ α などの血管収縮性プロスタノイドを産生するとした。

審査委員会は、今回の研究により、傷害後の再生血管内皮細胞はCOX 依存性に収縮性プロスタノイドを産生し、傷害血管の収縮性が高まっている事実を初めて明らかにしたことを高く評価した。またその後も研究を続け収縮性ロイコトリエンの産生に関わる研究に発展させた事実を高く評価した。

審査の過程において、審査委員会は次のような質問を行った。

- 1) 摘出血管のバイアビリティはどの程度保たれたか
- 2) 正常血管内皮細胞のターンオーバーはどれくらいか
- 3) 肥厚内膜はどのような細胞で構成されているか
- 4) マウスの週齢により平滑筋収縮能は変化するか
- 5) 再生内皮においてACh 感受性が低下する理由は何か
- 6) L-NAME による血管弛緩阻害効果が2相性を示すのはなぜか
- 7) L-NAME 投与の前にインドメタシン処理すると収縮能の変化は変わるか
- 8) 高濃度 KCl により内皮細胞非依存性平滑筋収縮は変化するか

- 9) 個々の阻害薬の濃度はどのように決めたか
- 10) SNP は生体内でどのように NO を供給するか
- 11) 収縮性プロスタノイドが選択的に多く産生される機序は何か
- 12) 収縮性プロスタノイドが増加する、生理的意味は何か
- 13) 局所的な血管収縮物質の産生増加によりどのような血管病変がおこるか
- 14) 本モデルの内膜肥厚はどのような病態を反映するか

これらの質問に対し申請者の解答は適切であり、問題点も十分理解しており、博士(医学)の学位論文にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者	主査	浦野哲盟	
	副査	佐藤重仁	副査 難波宏樹