

機関番号：27102

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2009 年～2010 年

課題番号：21890233

研究課題名（和文）

血管内皮機能保持における内皮由来過分極因子による代償機構の検討

研究課題名（英文）

The role of EDHF-mediated responses under pathological conditions

研究代表者 後藤 健一 (GOTO KENICHI)

九州歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：30549887

研究成果の概要（和文）：Dahl 食塩感受性ラットの腸間膜動脈では、高食塩負荷により一酸化窒素（NO）を介した弛緩反応が障害されていた。一方、内皮由来過分極因子（EDHF）による過分極・弛緩反応は高食塩負荷後も減弱しておらず、EDHF は NO を介した反応の障害を代償し、内皮機能の保持に関与していると考えられた。さらに、高食塩負荷状態下では、BKCa チャンネルが活性化されることで EDHF が保たれている可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：High salt diet up-regulates EDHF-mediated relaxation through the activation of BKCa in mesenteric arteries of Dahl salt-sensitive hypertensive rats. Up-regulation of EDHF compensates for the loss of NO to maintain overall endothelial function in salt-sensitive hypertension.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	740,000	222,000	962,000
2010 年度	950,000	285,000	1,235,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,690,000	507,000	2,197,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：内皮機能、内皮由来過分極因子、一酸化窒素、食塩感受性高血圧

1. 研究開始当初の背景

(1) 血管内皮は、内皮由来一酸化窒素（NO）、プロスタサイクリン、内皮由来過分極因子（EDHF）などの種々の生理活性物質を産生・放出し、血管平滑筋の緊張調節に極めて重要な役割をはたしている。大血管レベルでは NO が内皮依存性弛緩反応に主要な役割をはた

しているが、抵抗血管レベルでは内皮依存性弛緩反応の大部分は EDHF により惹起されることが知られている。したがって EDHF は抵抗血管レベルでの血管の緊張調節、さらには血圧調節に重要な役割をはたしていると考えられ、EDHF 反応の減弱は血圧の上昇から内

皮機能障害を惹起し、心血管疾患発症のリスクになると思われる。

(2) 我々の研究グループでは、EDHFによる血管の過分極・弛緩反応が12ヶ月齢の高血圧自然発症ラット (SHR) の腸間膜動脈において減弱していることを既に報告しており、長期にわたる高血圧の持続はEDHFを介した弛緩反応を障害すると考えられる (Goto K *et al.* Hypertension 36:575-580, 2000)。一方、食塩と臓器障害との関係も研究が進められている。9週齢の食塩負荷 Sprague-Dawley ラットの腸間膜動脈ではNOを介した弛緩反応が障害されるものの、EDHFを介した弛緩反応は代償的に亢進したと報告されている (Sofola OA. *et al.* J. Physiol. 543:255-260, 2002)。この実験結果は、EDHFがNOのバックアップ機構として内皮機能保護的に作用している可能性を示唆していると考えられる。同様に、高脂血症や心不全モデル動物でもNOを介した反応の障害をEDHFが代償するとの報告もあり (Bryan RM Jr *et al.* Anesthesiology 102:1261-1277, 2005)、血管内皮機能における障害されたNOのバックアップ機構としてEDHFが重要な役割を果たしていることが期待される。しかし、血管内皮障害におけるEDHFによる代償機構に関して焦点を絞った報告はなく、その機序に関しても不明である。

2. 研究の目的

高血圧、心不全などの病態においては、最終的にはEDHFを含めた内皮機能は全般的に障害されると考えられる。しかし、病初期においてはEDHFが内皮機能障害の進展を抑制し、血管の恒常性維持に重要な役割をはたしている可能性がある。内皮機能障害が更に進展し、この代償機構に破綻を来せば、血管緊張の調節に重大な支障をきたし、結果として心

血管病のリスクを高めることが予測される。従って、NOを介する反応が障害される病態においてEDHF反応が代償的に亢進する機序を解明することは、心血管病予防・治療の観点から極めて重要と考えられる。本研究課題では、臓器障害モデルとして確立しているDahl食塩感受性ラットの腸間膜動脈を用い、EDHFによる代償機構とそのメカニズムについて、解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 食塩感受性高血圧モデルでの内皮依存性過分極・弛緩反応の検討

食塩感受性高血圧モデルであるDahl食塩感受性 (Dahl S) ラットを用いて、内皮依存性過分極ならびに弛緩反応の検討を行う。

実験には6週齢の雄性Dahl Sラットを用い、0.4% 低食塩食または8% 高食塩食を12週間まで6週間投与し、腸間膜動脈を摘出して実験に用いる。微小電極法および等尺性収縮法により膜電位、血管張力を測定する。収縮期血圧の推移は、治療前後で覚醒下にtail cuff法を用いて測定する。

① 血管平滑筋膜電位の測定

長さ3mmのリング状標本を長軸に沿って切断して、短冊状の腸間膜動脈標本を作製する。標本はチェンバー内に内皮側を上面にしてステンレスピンで固定し、95% O₂ と5% CO₂ の混合ガスで通気した36℃のクレブス溶液で少なくとも60分間灌流した後に血管平滑筋の膜電位を測定する。血管平滑筋の膜電位は3 mol/LのKClを満たしたガラス微小電極を内皮細胞側より血管平滑筋細胞に刺入することにより測定する。AChによる膜電位変化は、シクロオキシゲナーゼの阻害薬のインドメタシン (10⁻⁵ mol/L)、およびNO合成酵素阻害薬であるN^G-ニトロ-L-アルギニン (L-NNA, 10⁻⁴ mol/L) 存在下に、静置膜電位下およびノルエピネフリン (NE, 10⁻⁵ mol/L)

で脱分極させた状態下で記録する。各濃度の ACh は十分な時間をおいて投与する。

② 等尺性張力の測定

等尺性張力の測定には長さ 1.2mm の内皮保持リング状標本を用いる。93% O₂ と 7% CO₂ の混合ガスで通気した 36°C のクレブス溶液で満たしたチェンバー内に固定する。リング状標本は 2 本のステンレス製ワイヤで内腔側より懸垂固定し、一側のワイヤはチェンバーに固定し、もう 1 本はトランスデューサーに取り付け張力を等尺性に測定する。標本には 1g の前張力をかけ 60 分間安定させた後、高カリウム溶液により収縮反応を惹起させる。

次に、標本を以下の 3 群に割り当てて内皮依存性弛緩反応を記録する。1. コントロール、2. インドメタシン (10⁻⁵ mol/L) 投与、3. インドメタシンおよび N^G-ニトロ-L-アルギニン (L-NNA, 10⁻⁴ mol/L) 投与 (EDHF を介した弛緩反応)。リング状標本を NE (10⁻⁵ mol/L) で収縮させ、収縮が安定した後に、ACh (10⁻⁹ - 3×10⁻⁵ mol/L) による内皮依存性弛緩反応を記録する。一部の標本では、インドメタシン (10⁻⁵ mol/L) 投与下に 77 mmol/L 高カリウム溶液で収縮させ、ACh による NO を介した内皮依存性弛緩反応を記録する。レブクロマカリムによる内皮非依存性弛緩反応は、インドメタシン (10⁻⁵ mol/L) 投与下に NE (10⁻⁵ mol/L) で収縮させた標本において記録する。弛緩の程度は前収縮に対する弛緩の割合で表示する。

(2) 食塩感受性高血圧病態下で EDHF が代償的に亢進する機序の解明

高血圧モデルラットの腸間膜動脈では large conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel (BK_{Ca}) の発現亢進を認めるとの報告もあり、食塩感受性高血圧モデルラットにおける EDHF 反応の代償的亢進には BK_{Ca} を介した血管平滑筋過

分極反応の増強が関与している可能性があると考えられる。そこで、高食塩負荷 DS ラットの腸間膜動脈において、BK_{Ca} の特異的阻害薬である Iberiotoxin (10⁻⁷ mol/L) が EDHF を介した過分極・弛緩反応に及ぼす効果を微小電極法および等尺性収縮法を用いて検討する。

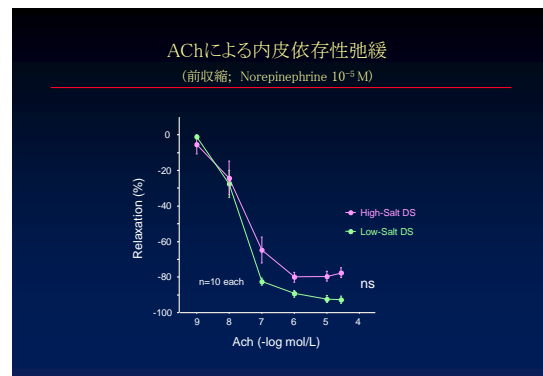
4. 研究成果

(1) 食塩感受性高血圧モデルでの内皮依存性過分極・弛緩反応の検討

① 治療前後での血圧の推移

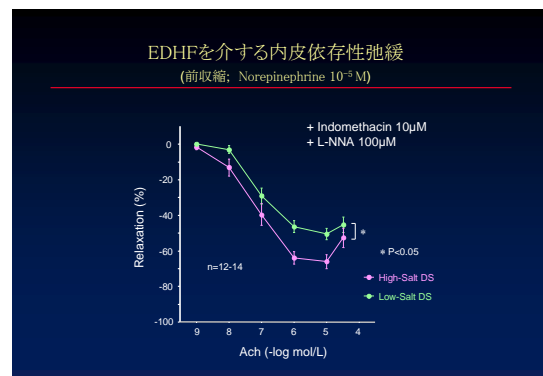
6 週間の治療終了後、収縮期血圧は高食塩群で低食塩群に比し有意に上昇した (225±7 vs. 138±3 mmHg; p<0.001; n=12 each)。

② ACh による内皮依存性弛緩



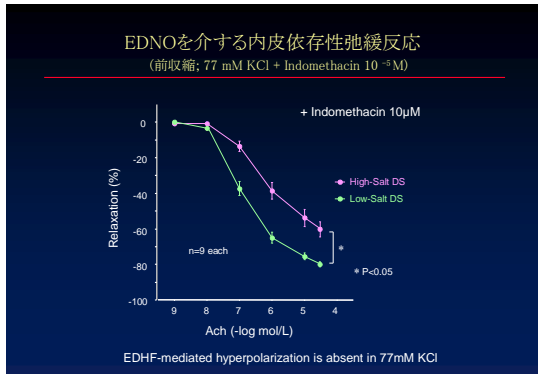
ACh による内皮依存性弛緩反応には高食塩群 (High-Salt DS) と低食塩群 (Low-Salt DS) で有意な差は認められなかった

③ ACh による EDHF を介した内皮依存性弛緩



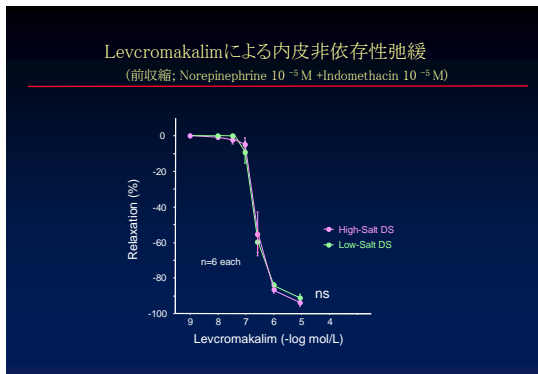
プロスタノイドと NO を阻害した条件下での EDHF を介した弛緩反応は、高食塩群で低食塩群に比し有意に増強していた（最大弛緩；66 ±4 vs. 50 ±3 % ; p<0.01; n=12-14）。

④ ACh による NO を介した内皮依存性弛緩



一方、ACh による NO を介した内皮依存性弛緩は高食塩群で低食塩群に比し有意に減弱していた（最大弛緩；60 ±4 vs. 80 ±1%; p<0.001; n=8-9）。

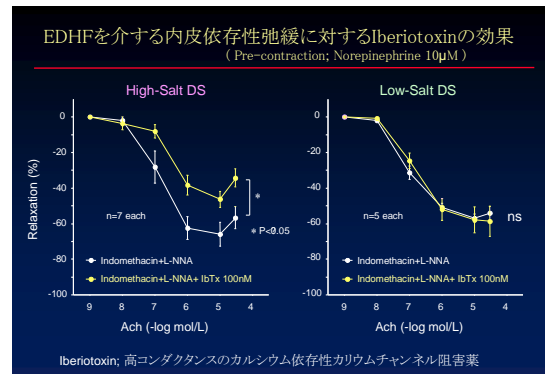
⑤Levcromakalim による内皮非依存性弛緩



Levcromakalim による内皮非依存性弛緩反応には群間で差を認めなかった。

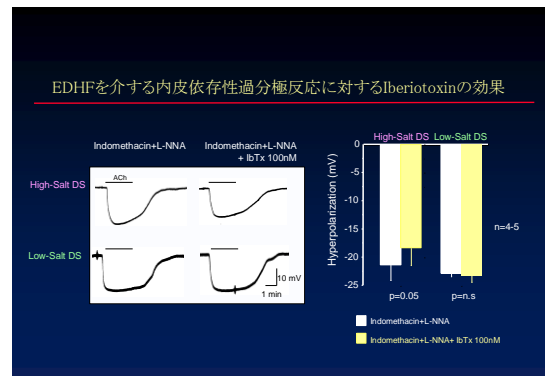
(2) 食塩感受性高血圧病態下で EDHF が代償的に亢進する機序の解明

① ACh による EDHF を介した内皮依存性弛緩に対する iberiotoxin の効果



EDHF を介した弛緩反応は、高食塩群では高コンダクタンスのカルシウム依存性カリウムチャンネル (BKCa) 阻害剤である iberiotoxin 処置で有意に抑制されたが、低食塩群では iberiotoxin 処置で影響を受けず、iberiotoxin 存在下では EDHF を介した弛緩反応に群間で差を認めなかった。

② ACh による EDHF を介した内皮依存性過分極に対する iberiotoxin の効果



ACh による内皮依存性過分極反応には群間で差を認めなかったが、過分極反応は高食塩群でのみ iberiotoxin 処置で減弱する傾向にあった（低食塩群：-22.8 ±0.6 vs. -23.2 ±1.2 mV; p=n. s; n=5, 高食塩群：-21.5 ±2.9 vs. -18.3 ±3.1 mV; p=0.05; n=4）。

以上、Dahl 食塩感受性ラットの腸間膜動脈で

は、高食塩負荷により NO を介した弛緩反応が障害されていた。一方、EDHF による過分極・弛緩反応は高食塩負荷後も減弱しておらず、NO を介した弛緩反応の障害を代償することで、内皮機能の保持に関与していると考えられた。さらに、高食塩負荷状態下では、BKCa チャンネルが活性化されることで EDHF 反応が保たれている可能性が示唆され、食塩感受性高血圧病態下において EDHF が代償的に亢進する機序の一端を明らかにすることができた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

1. Ellis A, Goto K, Chaston DJ, Brackenbury TD, Meaney KR, Falck JR, Wojcikiewicz RJH, Hill CE. Enalapril treatment alters the contribution of EETs but not gap junctions to EDHF activity in mesenteric arteries of spontaneously hypertensive rats. *J Pharmacol Exs Ther.* 330:413-422, 2009. 査読あり
2. Kansui Y, Goto K, Fujii K, Oniki H, Matsumura K, Iida M. Cilostamide produces hyperpolarization associated with K_{ATP} channel activation, but does not augment EDHF-mediated hyperpolarization in the rat mesenteric arteries. *Clin Exp Pharm Physiol.* 36:729-733, 2009. 査読あり

[学会発表] (計 3 件)

1. 後藤 健一、松村 潔、大坪 俊夫、寒水 康雄、鬼木 秀幸、Dahl 食塩感受性高血圧ラットの腸間膜動脈ではBKCaチャンネルの活性化により内皮由来過分極因子を介した弛緩反応が保持されており、障害されたNOの代償機構として内皮機能保護的に作用している、

第33回日本高血圧学会総会、2010年10月15-17日、福岡

2. Goto K, Matsumura K, Ohtsubo T, Iida M. Effects of Na-K-2Cl Cotransporter NKCC1 on Endothelial Function in Arteries of Salt Sensitive Hypertensive Rats. The 23rd scientific meeting of the international society of hypertension, Sep26-30 2010, Vancouver Canada.

3. 後藤 健一、松村 潔、大坪 俊夫、飯田 三雄、Dahl 食塩感受性ラットの摘出腸間膜動脈では、 $Na^+/K^+/2Cl^-$ cotransporter 阻害薬による内皮依存性弛緩反応の改善は認められない、第32回日本高血圧学会総会、2009年10月1-3日、大津

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)

[その他]
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

後藤 健一 (GOTO KENICHI)
九州歯科大学・歯学部・助教
研究者番号：30549887

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし