

## 学位論文題名

## Alterations in EDHF-mediated hyperpolarization and relaxation in mesenteric arteries of female rats in long-term deficiency of oestrogen and during oestrus cycle

(血管内皮由来過分極因子 (EDHF) 反応における  
内因性エストロゲンの役割に関する薬理学的研究)

## 学位論文内容の要旨

閉経期の女性においては、動脈硬化性疾患、特に心血管疾患が著しく増加する事がよく知られている。これは閉経によるエストロゲンレベルの低下による心血管系への保護作用の破綻がその大きな要因として考えられている。閉経後女性にたいしてエストロゲン補充療法を行うことで動脈硬化性疾患の発症頻度が減少する事が明らかになり、エストロゲンの抗動脈硬化作用が言われる様になった。その機序として、糖や脂質代謝改善の他に、エストロゲンの血管内皮に対する直接作用が指摘されている。エストロゲンは血管内皮細胞の内皮由来血管弛緩物質 (EDRF) の一つである NO の産生を高めることは知られているが、新たな内皮由来の弛緩物質として近年注目を浴びている血管内皮由来過分極因子(EDHF)に対する影響は全く検討されていない。内皮依存性血管弛緩反応の障害をはじめとする内皮機能異常は、高血圧症、動脈硬化症、高脂血症等の病態で認められ、これがこれら病態での末梢循環障害の原因となっていると考えられている。内皮細胞は、NO に加えて、EDHF およびプロスタノイドを産生、放出し、これら各々が内皮依存性血管弛緩反応を構成している。プロスタノイドによる弛緩反応は、血管の種類によってその程度は異なるが、内皮依存性弛緩反応全体から見ると大きいものではない。一方、EDHF による血管弛緩は、大血管よりも抵抗血管やそれよりも細い動脈で大きいことから、EDHF は微小循環調節に NO より重要な役割を果たしていることが考えられる。EDHF は血管平滑筋に作用して  $K^+$  チャネルを開口して膜電位を過分極させる。膜電位の過分極は血管平滑筋細胞膜に存在する L 型  $Ca^{2+}$  チャネル活性の抑制をもたらし、細胞内への  $Ca^{2+}$  流入を減少させ、平滑筋の弛緩を起こす。EDHF による血管弛緩反応に  $K^+$  チャネルの活性化が関与することは、脱分極により  $K^+$  コンタクトスを減少させる高カリウム環境や、特異的な  $Ca^{2+}$  感受性  $K^+$  チャネル阻害薬である apamin, charybdotoxin (ChTX) および両者の併用によって EDHF の作用が抑制されることから推定されている。本研究では、長期と短期的なエストロゲンが与える血管内皮依存性弛緩因子である NO および EDHF への影響を検討した。

8週令の雌 Wistar ラットを対照群 (Sham 群)、卵巣摘除群 (OVX 群) およびそれにエストロゲンを補充する群 (OVX+E2 群) (浸透圧ポンプにて  $17\beta$ -estradiol を  $10\mu\text{g}/\text{日}$  投与) の 3 群に分けた。4 週後に上腸間膜動脈を摘出し、等尺性張力変化および微小電極による膜電位の測定を行った。さらに、性周期による NO と EDHF の血管内皮依存性弛緩反応における短期的なエストロゲンの影響を検討した。

上腸間膜動脈リング標本においては、OVX 群および休止期群では、 $1\mu\text{M}$  phenylephrine (Phe) による血管収縮反応は Sham 群 (発情期) と OVX+E2 群に比べて有意に増強していたが、NO 合成

酵素阻害薬である nitro-L-arginine (L- NNA, 100  $\mu$ M) による血管収縮反応は各群間で有意差は認められなかった。これはエストロゲンレベルの低下によって、非刺激時での NO 産生が障害されていることを示唆する。10  $\mu$ M Phe で前収縮させた摘出上腸管膜動脈リング標本の Acetylcholine (ACh) による内皮依存性弛緩反応の濃度反応は卵巣摘除によって ACh による血管内皮依存性弛緩反応は有意に減弱したが、この減弱は 17  $\beta$ -estradiol の投与によって消失した。同様に、休止期群では ACh による血管内皮依存性弛緩反応は発情期群に比べて有意に減弱を示した。Indomethacin (10  $\mu$ M) 存在下での ACh による血管内皮依存性弛緩反応は各群間で有意な変化は認められなかったため、PGI<sub>2</sub> による血管内皮依存性弛緩反応への関与は殆どないものと考えられる。また、indomethacin および apamin (500 nM) + ChTX (100 nM) 存在下で ACh による血管弛緩反応は各群間で有意な変化は認められなかったが、血管リング標本における、indomethacin および L-NNA 存在下での ACh による血管弛緩反応は卵巣摘出により有意に低下し、17  $\beta$ -estradiol の補充により回復した。同様に、休止期群では ACh による血管内皮依存性弛緩反応は発情期群に比べて有意に減弱したことが認められた。ACh は血管内皮存在下では、濃度依存性に、ラット腸間膜動脈平滑筋細胞の膜電位を過分極させた。ACh の膜電位過分極反応は indomethacin および L-NNA の前処置により影響を受けなかった。これは、ACh によって内皮細胞から放出される EDHF はプロスタノイドや NO 以外の物質であることを示唆する。ACh による過分極反応が EDHF 介していることは、apamin と ChTX の併用によって抑制されることにより確認された。Sham 群、OVX 群、OVX+E2 群および休止期群の静止膜電位および K<sup>+</sup> チャネルの開口薬である pinacidil による過分極反応には変化を認められなかったが、ACh による過分極反応は卵巣摘出により有意に低下し、17  $\beta$ -estradiol 投与により回復した。休止期群では ACh による過分極反応は発情期に比べて有意に減弱した。さらに、Ca<sup>2+</sup> ionophore である A23187 および Ca<sup>2+</sup>-ATPase 阻害薬である cyclopiazonic acid (CPA) による内皮細胞依存性の膜電位過分極反応も卵巣摘出により有意に低下し、その反応が一過性となる傾向が認められた。休止期群でも同様の変化が認められた。これらの結果から EDHF 反応低下の原因は EDHF の標的 K<sup>+</sup> チャネルの機能に変化を来しているか、あるいは最近 EDHF 反応のメカニズムとして注目されている血管内皮と平滑筋の間の gap junction の構造的変化を来している可能性が高いと推測された。

以上より、血管内皮依存性弛緩反応の内、非刺激時の NO および ACh などによって誘発された EDHF を介する血管平滑筋過分極反応は閉経モデルラットにおいて著明に低下し、17  $\beta$ -estradiol の補充により改善することを認めた。また、性周期による同様の変化を認めることができたため、内因性卵巣ホルモンの生理的変動、特にエストロゲンが血管内皮細胞機能に促進的に影響することが示唆された。したがって、本研究により、血管機能調節因子としてのエストロゲンの役割として、抵抗血管の弛緩に重要な意義をもつ EDHF を介した反応への関与が大きいことが明らかにされた。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 三 輪 聡 一  
副 査 教 授 丸 藤 哲  
副 査 教 授 北 島 顕

学 位 論 文 題 名

## Alterations in EDHF-mediated hyperpolarization and relaxation in mesenteric arteries of female rats in long-term deficiency of oestrogen and during oestrus cycle

(血管内皮由来過分極因子 (EDHF) 反応における  
内因性エストロゲンの役割に関する薬理学的研究)

閉経期の女性においては、動脈硬化性疾患、特に心血管疾患が著しく増加することがよく知られている。これは閉経によるエストロゲンレベルの低下による心血管系への保護作用の破綻がその大きな要因として考えられている。閉経後女性にたいしてエストロゲン補充療法を行うことで動脈硬化性疾患の発症頻度が減少することが明らかになり、エストロゲンの抗動脈硬化作用がいわゆるようになった。その機序として、糖や脂質代謝改善の他に、エストロゲンの血管内皮に対する直接作用が指摘されている。エストロゲンは血管内皮細胞の内皮由来血管弛緩物質 (EDRF) の一つである NO の産生を高めることは知られているが、新たな内皮由来の弛緩物質として近年注目を浴びている血管内皮由来過分極因子(EDHF)に対する影響は全く検討されていない。本研究では血管内皮由来過分極因子 (EDHF) 反応における内因性エストロゲンの役割を明らかにするため、雌性ラットの性周期の中で発情期と休止期 (短期モデル)、長期モデルとして卵巣摘出群 (OVX 群) およびこの群にエストロゲン補充療法を行った群間で血管内皮依存性弛緩反応および血管平滑筋過分極反応の変化を検討した。上腸間膜動脈輪状標本においては、OVX 群および休止期群では、1  $\mu\text{M}$  phenylephrine (Phe) による血管収縮反応は Sham 群 (発情期) と OVX+E2 群に比べて有意に増強していたが、NO 合成酵素阻害薬である nitro-L-arginine (L-NNA, 100  $\mu\text{M}$ ) で前処置しておくことと血管収縮反応は各群間で有意差は認められなかった。これはエストロゲンレベルの低下によって、非刺激時での NO 産生が障害されていることを示唆する。10  $\mu\text{M}$  Phe で前収縮させた摘出上腸間膜動脈輪状標本の Acetylcholine (ACh) による内皮依存性弛緩反応は卵巣摘除によって有意に減弱したが、この減弱は 17  $\beta$ -estradiol の投与 (OVX+E2) によって消失した。同様に、休止期群では ACh による血管内皮依存性弛緩反応は発情期群に比べて有意に減弱した。Indomethacin (10  $\mu\text{M}$ ) 存在下での ACh による血管内皮依存性弛緩反応は各群間で有意な変化は認められなかったため、血管内皮依存性弛緩反応への PGI<sub>2</sub> の

関与は殆どないものと考えられる。また、indomethacin および apamin (500 nM) + charybdotoxin (ChTX, 100 nM) 存在下においても ACh による血管弛緩反応は各群間で有意な変化は認められなかった。一方、indomethacin および L-NNA 存在下では ACh による血管弛緩反応は卵巣摘出により有意に低下し、17  $\beta$ -estradiol の補充により回復した。同様に、休止期群では ACh による血管内皮依存性弛緩反応は発情期群に比べて有意に減弱していた。ACh は血管内皮存在下では、濃度依存性にラット腸間膜動脈平滑筋細胞の膜電位を過分極させた。ACh の過分極反応は indomethacin および L-NNA の前処置により影響を受けなかった。これは、ACh によって内皮細胞から放出される EDHF はプロスタノイドや NO 以外の物質であることを示唆する。ACh による過分極反応が EDHF 介していることは、apamin と ChTX の併用によって抑制されることにより確認された。Sham 群、OVX 群、OVX+E2 群および休止期群の静止膜電位および  $K^+$  チャネルの開口薬である pinacidil による過分極反応には変化が認められなかったが、ACh による過分極反応は卵巣摘出により有意に低下し、17  $\beta$ -estradiol 投与により回復した。休止期群では ACh による過分極反応は発情期に比べて有意に減弱した。さらに、 $Ca^{2+}$  ionophore である A23187 および  $Ca^{2+}$ -ATPase 阻害薬である cyclopiazonic acid (CPA) による内皮細胞依存性の膜電位過分極反応も卵巣摘出により有意に低下し、その反応が一過性となる傾向が認められた。休止期群でも同様の変化が認められた。以上より、血管内皮依存性弛緩反応のうち、非刺激時の NO および アセチルコリン (ACh) によって誘発される EDHF を介した過分極反応は、OVX 群において著明に低下し、17  $\beta$ -estradiol の補充により改善した。また、性周期の休止期でも同様の変化を認めたため、内因性卵巣ホルモンの生理的変動、特にエストロゲンが血管内皮細胞機能に促進的に影響することが示唆された。本研究により、エストロゲンは抵抗血管の弛緩に重要な意義をもつ EDHF を介した反応において重要な役割を果たすことが明らかになった。

口頭発表に際し、北畠頭教授から EDHF の本体や、エストロゲンと動脈硬化と EDHF の関係について、丸藤哲教授から女性の月経周期における血管内皮由来物質による反応の変化の生理的意義およびエストロゲンの低下による EDHF 反応の減弱に関して機序について質問があった。

いずれの質問に対しても、申請者は本研究の結果や文献を引用し、概ね妥当に解答した。

この論文は、エストロゲンが短期的および長期的に血管内皮を介して、血管の緊張（トーン）の調節を行っていることを明らかにしたものであり、今後、閉経後の女性に多発する心血管疾患の新しい治療法の開発に資することが期待される。

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断した。