



Title	Endothelin-1 Enhances Nitric Oxide-Induced Cytotoxicity in Vascular Smooth Muscle.
Author(s)	中橋, 穀
Citation	大阪大学, 1998, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/41013
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏名	なか 中 橋 毅
博士の専攻分野の名称	博士 (医学)
学位記番号	第 13508 号
学位授与年月日	平成 10 年 1 月 7 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学位論文名	Endothelin-1 Enhances Nitric Oxide-Induced Cytotoxicity in Vascular Smooth Muscle. (血管平滑筋におけるエンドセリン 1 の一酸化窒素による細胞傷害の増強効果)
論文審査委員	(主査) 教授 萩原 俊男 (副査) 教授 三木 直正 教授 網野 信行

論文内容の要旨

[目的]

一酸化窒素（以下 NO）は生体内において非常に多様な役割を担っているが、 Ca^{2+} 依存性の constitutive NO 合成酵素により産生される NO は血管拡張物質と知られる EDRF や神経伝達物質等として働いているのに対し、 Ca^{2+} 非依存性の inducible NO 合成酵素（以下 iNOS）により産生される NO は、マクロファージなどが産生し前者に比べて非常に大量で細胞傷害作用を有することが知られている。血管系においても iNOS は動脈硬化巣や血管形成術後の再狭窄部位、実験動物におけるバルーン傷害部位などに発現が認められ、培養平滑筋細胞においてもインターロイキン-1（以下 IL-1）等の刺激で誘導される。この iNOS が産生する NO は血管平滑筋細胞自身に細胞傷害作用を発揮するが、その病態生理学的意義については未だ明らかにされていない。一方、エンドセリン-1（以下 ET-1）は大動脈血管内皮細胞より単離された強力な血管収縮作用を有するペプチドであるが、動脈硬化巣における ET-1 の mRNA の発現の亢進や動脈硬化病変が進行した症例での高い血中濃度などが報告されている。また内因性の ET-1 により心筋梗塞サイズが拡大する可能性も言われており、我々は NO による細胞傷害によよぼす ET-1 の作用を検討した。

[方法]

血管平滑筋細胞は 8 週令雄性 Wistar 系ラットの胸部大動脈より explant 法により得た細胞の第 4 ~ 9 繼代のものを用いた。血管内皮細胞は Bovine 大動脈由来の内皮細胞の第 4 ~ 8 繼代のものを用いた。細胞は 10% FCS を含むダルベッコ・イーグル培地で confluent とした後、48 時間無血清として実験に供した。また、共存培養系は培地の共有が可能なメンブランで仕切られた容器を使用し、平滑筋細胞と内皮細胞のコンタクトがない状態で培養した。iNOS の誘導の指標となる NO の産生量は培養上清中の NO の代謝産物である Nitrite をグリース法にて測定した。細胞傷害は培養上清中の LDH 活性の測定、および $[^3\text{H}]$ ロイシンの 4 時間パルスラベル時の取り込み量の測定にて評価した。

[成績]

培養平滑筋細胞を IL-1 (1 nmole/L) で刺激すると時間依存性に NO の産生量は増加した。iNOS の阻害薬である $\text{N}^{\text{o}}\text{-monomethyl-L-arginine}$ （以下 L-NMMA, 3 mmole/L）を同時に添加すると NO の産生は抑制された ($p < 0.05$)。

このときの細胞傷害作用を培養上清中の LDH 活性で評価すると、IL-1 で刺激した場合には48時間以降に LDH 活性の上昇がみられた($p<0.05$)。L-NMMA はこの細胞傷害作用を抑制し、NO のドナーである sodium nitroprusside(以下 SNP, 0.1 mmole/L) はこの細胞傷害作用を模倣した。ET-1 は 1 nmole/L を越える濃度で IL-1 による LDH 活性の上昇を有意に増加させた ($p<0.05$)。しかし、このときの NO 産生量は不变であった。内皮細胞との共存培養系の平滑筋細胞に IL-1 を作用させると、単独培養に比し有意にロイシンの取り込み量が減少した($p<0.05$)。ET_A 受容体の阻害薬である BQ485を加えるとロイシンの取り込み量は単独培養と同じレベルまで回復した。さらに、過剰の ET-1 をこの系に加えると平滑筋細胞の傷害作用は再び増強が認められた($p<0.05$)。一方、これらのいずれの場合においても単独培養と共存培養の間に NO の産生量の差異は認められなかった。

[総括]

IL-1 で長時間平滑筋細胞を処置することにより、平滑筋細胞からの NO の産生と平滑筋細胞自身の傷害作用が認められたが、iNOS の阻害薬がこの効果を打ち消すこと、NO のドナーである SNP がこの細胞傷害作用を有することから、平滑筋細胞の傷害は平滑筋に誘導された NO 合成酵素が産生した NO によるものと考えられた。ET-1 は IL-1、SNP 両者の細胞傷害の増強作用を示すことから、ET-1 は NO による細胞傷害を増強していると考えられた。共存培養系では培養上清中の ET-1 の濃度は約100 nmole/L であり、内皮より産生された ET-1 が平滑筋細胞の傷害を増強したことが示唆された。さらにこの効果は BQ485により消失したことから、ET-1 の効果は平滑筋細胞が有する ET_A 受容体を介したものと考えられた。さらに ET-1 同様細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇をもたらすアンジオテンシンII は ET-1 のような NO による細胞傷害の増強作用を示さなかったことから、細胞内 Ca^{2+} 濃度を修飾することは ET-1 の細胞傷害増強作用の機序ではない可能性が考えられた。以上から、内因性の ET-1 は NO による平滑筋の細胞傷害作用を ET_A 受容体を介して増強し、動脈硬化巣においても平滑筋細胞の傷害に関与している可能性が考えられた。

論文審査の結果の要旨

本研究は、動脈硬化巣における血管平滑筋細胞の動態を細胞死の観点から明らかにする目的で、培養平滑筋細胞を用いて一酸化窒素やエンドセリンの細胞傷害作用を理解しようとしたものである。これまでに平滑筋細胞の増殖について検討した研究は多いが、内皮細胞との相互作用や細胞傷害の側面から検討したものは少なく、この点が本研究の特色である。

培養血管平滑筋細胞をインターロイキン1 β で刺激すると誘導型一酸化窒素合成酵素が誘導され大量の一酸化窒素が産生される。この一酸化窒素に長時間暴露された平滑筋細胞は傷害を受けるが、同時にエンドセリン1 で刺激した場合には一酸化窒素の産生量を変化させることなく細胞傷害作用が増強される。さらに、これらの作用は受容体阻害薬を用いた検討などから ET_A 受容体を介した細胞内のフリーラジカルの関与の可能性が考えられた。また、内皮細胞との共存培養の検討から、内皮細胞の産生する内因性エンドセリン1 によって平滑筋細胞の細胞傷害作用が増強し、内皮細胞により平滑筋細胞の細胞死が制御されている可能性が示された。動脈硬化巣においてもこのようなサイトカインを介した細胞相互の作用機序が動脈硬化の発症・進展に関与していると考えられる。

以上、本研究は動脈硬化の進展の抑制や心筋梗塞の発症予防に道を開く研究と位置づけられ、動脈硬化巣におけるエンドセリン1 や誘導型一酸化窒素合成酵素の平滑筋細胞に対する役割と作用機序を明らかにしたものであり、学位論文に値するものと評価される。