The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Endothelin-1 Enhances Nitric Oxide-Induced Cytotoxicity in Vascular Smooth Muscle.
Author(s)	中橋, 毅
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

【 75 】

氏　　名	中橋　毅（なかはし　たけし）
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　荻原　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による細胞傷害におよぼす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継代のものを用いた。血管内皮細胞はBovine大動脈由来の内皮細胞の第4～8継代のものを用いた。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}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N^G-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産生量は不変であった。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1β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。