



|              |                                                                                                                                                 |
|--------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Title        | 心血管系病態におけるエンドセリンの作用に関する研究                                                                                                                       |
| Author(s)    | 梶原, 洋子                                                                                                                                          |
| Citation     | 大阪大学, 2000, 博士論文                                                                                                                                |
| Version Type |                                                                                                                                                 |
| URL          | <a href="https://hdl.handle.net/11094/43041">https://hdl.handle.net/11094/43041</a>                                                             |
| 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、<a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文について</a>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

|               |                                                                        |
|---------------|------------------------------------------------------------------------|
| 氏 名           | 梶 原 洋 子                                                                |
| 博士の専攻分野の名称    | 博 士 (薬 学)                                                              |
| 学 位 記 番 号     | 第 15077 号                                                              |
| 学 位 授 与 年 月 日 | 平 成 12 年 2 月 21 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     | 心血管系病態におけるエンドセリンの作用に関する研究                                              |
| 論 文 審 査 委 員   | (主査)<br>教 授 山 元 弘<br>(副査)<br>教 授 真 弓 忠 範    教 授 松 田 敏 夫    教 授 森 崎 隆 幸 |

## 論 文 内 容 の 要 旨

エンドセリン (ET) は21個のアミノ酸から成るペプチドであり、3つのアイソフォーム (ET-1、ET-2、ET-3) と2種類の受容体サブタイプ (ET<sub>A</sub>、ET<sub>B</sub>) が存在することが明らかにされている。ET-1 は強力な血管収縮作用や細胞増殖、細胞遊走促進作用を有することから、心血管系における生理的・病態生理的な役割に関する研究が精力的に行われている。これまでの研究から ET は高血圧症や急性心筋梗塞の急性期、心不全などの心血管系疾患において産生が増加することが知られており、またこれらの疾患モデルにおいて ET 拮抗薬の有効性が示されつつある。従って、心血管系病態の形成や悪化への ET の関与について詳細に検討することは、病態の原因解明のみならず、ET 拮抗薬の臨床的意義に重要な情報を与えると考えられる。本研究では心血管系における ET の作用について、病態形成への関与のメカニズムを中心に検討した。

最近、肥満細胞から放出された chymase が ET の産生系に関与することが報告されたこと、肥満細胞が心筋梗塞辺縁部や血管傷害性内膜肥厚部などにおいて増加することから、これらの病態時に肥満細胞から放出された chymase が ET を産生し病態形成に何らかの影響を及ぼすと推察された。そこで chymase により big ET から産生される ET<sub>1-31</sub> に着目し、ET<sub>1-31</sub> の作用発現機序についてヒト培養平滑筋細胞を用いて検討した。その結果、ET<sub>1-31</sub> は濃度に依存した細胞内 Ca<sup>2+</sup> 濃度上昇作用を示し、その作用は ECE/NEP 阻害剤である phosphoramidon と NEP 阻害剤である thiorphan により阻害された。さらに ET<sub>1-31</sub> は [<sup>125</sup>I]ET-1 結合を濃度に依存して阻害したが、その作用は phosphoramidon と thiorphan 処置により減弱された。これらの結果は、ET<sub>1-31</sub> が NEP により ET に変換された後、ET 受容体に作用することを強く示唆している。すでに ET 産生系として ECE を介した経路が知られているが、big ET-2 は big ET-1 に比べて ECE の良い基質となり難く、これまで ET-2 の産生系については明らかにされていなかった。しかしながら今回の実験成績から、big ET-2 は big ET-1 と異なり NEP により直接 ET-1 に変換されないが、chymase により ET-2<sub>1-31</sub> に変換されると NEP により効率よく ET-2 に変換されることが明らかになった。これらの結果は、ET<sub>1-31</sub> を介した ET 産生系が ECE を介した経路よりも病態時に特異的に活性化されて ET を産生し、心臓や肺の病態悪化に関与する可能性を示唆している。

心肥大は左室心筋が肥大することで収縮力を高め心拍出量を正常に保持するための適応現象であるが、この状態が持続するとやがて心機能低下を来し、心不全を発症させる最大の危険因子となっている。すでに ET が PKC を介する肥大誘発因子であること、in vivo において NHE 阻害剤が心肥大を抑制することが報告されているにもかかわらず、これまで心肥大における ET と NHE との関連性については明らかにされていなかった。そこで、ET などの PKC を介する肥大誘発因子により生じる心肥大に NHE がどのように関与しているのかについて新生児ラット培養心筋細胞を用いて検討した。その結果、ET-1 や  $\alpha_1$  受容体刺激、PKC 活性化剤の PMA などの PKC を介した刺激により心筋細胞は肥大し、その作用は NHE 阻害剤である HOE694 処置により部分的ではあるが有意に抑制された。この結果は、すでに肥大により NHE の発現が高まることが報告されていることから、病態が進行するに伴い NHE を介した心肥大形成作用が増加される可能性を示唆している。さらに NHE 活性化を介する作用機序について詳細に検討するために、NHE の活性化に伴い流入する  $\text{Na}^+$  に着目し、 $\text{Na}^+$  流入を惹起する薬剤を用いて肥大誘発作用について検討したところ、 $\text{Na}^+$  流入により PKC- $\delta$  と PKC- $\epsilon$  の 2 種の PKC アイソザイムが再び活性化することを見出すことが出来た。

ET は心肥大のみならず、急性心筋梗塞の発症早期に問題となる虚血性再灌流障害においても重要な役割を演じていると考えられる。実際に ET 拮抗薬が虚血再灌流障害を抑制することが報告されているが、これまで虚血再灌流障害の原因とされる好中球の浸潤と ET の関連について検討した報告はなかった。そこで、好中球の浸潤に関与する接着分子、ICAM-1 の発現に対する ET の関与についてラット培養内皮細胞と心筋細胞を用いて検討した。その結果、ET はいずれの細胞においても ICAM-1 の発現を促進した。また ET 受容体拮抗薬を用いた実験からその作用は心筋細胞では  $\text{ET}_A$  受容体を内皮細胞では  $\text{ET}_B$  受容体を介していること、さらに PKC 阻害剤を用いた実験からこれらの作用はいずれの受容体以降においても PKC の活性化を介していることが示された。これらの結果は、ET が ICAM-1 の発現を介して好中球の心筋組織内への浸潤を促進し心筋障害を悪化させる方向へ働く可能性を示唆している。

#### 結論

- 1) 心臓、血管、肺などに存在する肥満細胞から各種刺激によって遊離される chymase により変換された ET-1<sub>1-31</sub> や ET-2<sub>1-31</sub> は NEP により ET<sub>1-21</sub> に効率よくに変換された後、ET 受容体に作用することを明らかにした。本経路は、これまで知られている ET 変換酵素 (ECE) を介した経路よりも病態時に特異的に活性化されて ET を産生し、種々の心臓・肺疾患などの病態悪化に関与する可能性があるとして推察される。
- 2) ET-1 による心肥大には、 $\text{Na}^+/\text{H}^+$  交換系の活性化を介した細胞内情報伝達系が関与し、NHE の活性化に伴い流入する  $\text{Na}^+$  がさらに PKC- $\delta$ 、 $\epsilon$  を活性化し、心肥大を誘発することを明らかにした。
- 3) ET は心筋では  $\text{ET}_A$  受容体を、また内皮細胞では  $\text{ET}_B$  受容体を介して ICAM-1 の発現を促進することを明らかにした。このことから虚血後の再灌流時における好中球の心筋組織内への浸潤に ET が関与する可能性が示唆された。

本研究により、病態時に活性化される ET 産生や ET による心肥大の作用機序、さらには虚血再灌流障害の作用機序の一部を明らかにすることが出来た。従って、今回得られた成果は ET の心血管系における生理的役割の解明に寄与するのみならず、ET 拮抗薬の臨床的意義に重要な情報を与えると確信している。

### 論文審査の結果の要旨

エンドセリン (ET) は 21 アミノ酸からなるペプチドで、3 つのアイソフォーム (ET-1、ET-2、ET-3) と、2 種類の受容体サブタイプが存在する。ET は強力な血管収縮作用や細胞増殖、細胞遊走促進作用を有しており、心血管系における生理的・病態生理的な役割が注目されている。本研究では、ET の心血管系病態の形成や悪化の過程への関与のメカニズムについて検討した。

- (1): 心臓、血管、肺などに存在する肥満細胞から、種々の刺激で放出される chymase によって big ET から変換され

た ET-1<sub>1-31</sub>、ET-2<sub>1-31</sub> は、中性エンドペプチダーゼにより ET<sub>1-21</sub> に効率よく変換された後、ET 受容体に作用することを明らかにした。本経路は、これまでに知られている ET 変換酵素を介した経路よりも、病態時に特異的に活性化されて ET を産生し、種々の心・肺疾患などの病態の悪化に関与すると推察される。

(2) : ET-1 による心肥大には、Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> 交換系 (NHE) の活性化を介した細胞内情報伝達系が関与し、NHE の活性化にともない流入する Na<sup>+</sup> が、さらに protein kinase C- $\delta$ 、 $\epsilon$  を活性化し、心肥大を誘発することを明らかにした。

(3) : ET は、心筋では ET<sub>A</sub> 受容体を、また内皮細胞では ET<sub>B</sub> 受容体を介して細胞接着分子 ICAM-1 の発現を促進することを明らかにした。このことから、虚血後の再灌流時における好中球の心筋内への浸潤に ET が関与する可能性が示唆された。

以上本研究により、病態時に活性化される ET 産生系や ET による心肥大の作用機序、さらには虚血再灌流障害の作用機序の一端を明らかにした。したがってこれら成果は、ET の心血管系における生理的役割の解明に寄与するのみならず、ET 拮抗薬の開発やその臨床的意義に重要な情報を与えるものであり、薬学博士の学位を授与するにふさわしいものとする。