

学位論文の要旨

学位の種類	博士	氏名	山田 武宏
-------	----	----	-------

学位論文題目

Thromboxane A₂ regulates vascular tone via its inhibitory effect on the expression of inducible nitric oxide synthase

(トロンボキサン A₂ は誘導型一酸化窒素合成酵素の発現抑制を介して血管緊張を調節する)

共著者名

藤野 貴行、結城 幸一、原 明義、荻部 英寿、
高畑 治、岡田 優二、肖 春陽、高山 浩二、
栗山 周子、谷口 隆信、塩越 隆広、大崎 能伸、
菊池 健次郎、成宮 周、牛首 文隆

掲載学会雑誌名

Circulation **108**: 2381-2386, 2003 (平成 15 年)

研究目的

一酸化窒素 (NO) は、血管張力の恒常性維持に重要な役割を果たす血管拡張性因子である。しかし、敗血症など全身性炎症時には、誘導型 NO 合成酵素 (iNOS) が血管平滑筋細胞において過剰に発現誘導され、多量の NO が産生される。この結果、NO は血管の昇圧物質に対する反応性低下を惹起し、時に急性循環不全を引き起こす。またこの時、血管平滑筋細胞には誘導型のシクロオキシゲナーゼ (COX) である COX-2 が発現誘導され、プロスタグランジン (PG) やトロンボキサン (TX) などの産生が亢進する。しかし、これらのプロスタノイドの全身性炎症時の血管緊張維持における役割は不明である。

TXA₂ は、強力な血管収縮作用と血小板活性化作用に加え、血管平滑筋細胞に対して増殖作用あるいは肥大作用 (引用文献 1) を示す。最近我々は、炎症性サイトカインで刺激したラット培養血管平滑筋細胞において、TXA₂ 受容体 (TP) 拮抗薬が iNOS 発現および NO 産生を促進することを見出し、TXA₂ が iNOS-NO 系に対し抑制作用を有することを明らかにした (引用文献 2)。しかし、この作用が実際の生体において、どのような生理的意義を持つかは不明であった。そこで本研究は、培養血管平滑筋細胞を用いた *in vitro* の実験に加え、摘出血管を用いた *ex vivo* の系、さらに菌体成分である lipopolysaccharide (LPS) 投与による *in vivo* 敗血症モデルを用い、全身性炎症時の血管緊張維持における TXA₂ の役割解明を目指した。

材 料 ・ 方 法

1. 使用動物

動物は、雄性の野生型マウスおよび TP 欠損マウス (10~15 週齢) を用いた。

2. 培養血管平滑筋細胞

マウスより胸部大動脈を摘出し、エキスプラント法により血管平滑筋細胞を得た。実験には、継代 4~9 代目の細胞を用いた。

3. サイトカイン刺激

インターロイキン (IL)-1 β (20 ng/ml)、腫瘍壊死因子 (TNF)- α (20 ng/ml) およびインターフェロン (IFN)- γ (10 ng/ml) の組合せで、血管平滑筋細胞あるいは摘出血管を 24 時間処理した。

4. 誘導型 NO 合成酵素 (iNOS) 蛋白質の検出

サンプルを SDS-PAGE に供し、ウエスタンブロットング法により iNOS 蛋白質を特定した。抗体は、抗 iNOS モノクローナル抗体を用い、enhanced chemiluminescence により特異的バンドを検出した。

5. NO 産生量の定量

血管平滑筋細胞あるいは摘出血管の培養上清、もしくはマウス右心室血より調製した血漿を用い、グリース法により NO 代謝物 (NO $_x$) の nitrite と nitrate の濃度を測定することにより NO 産生量の指標とした。

6. 血管張力の測定

マウスより胸部大動脈を摘出し、3 mm 長のリング状標本を調製した。この標本を、95% O $_2$ -5% CO $_2$ 通気下、37°C の Krebs-Henseleit 緩衝液中に懸垂し、その収縮張力を求めた。なお、初期張力は 1.0 g とした。血管収縮薬として、 α_1 アドレナリン受容体アゴニストである phenylephrine を累積投与した。

7. *In vivo* 敗血症モデル

マウスに LPS (30 mg/kg) を腹腔内投与後、ただちにエーテル麻酔下で U-46619 (100 μ g/kg) を尾静脈より投与した。20 時間経過後、血漿中の NO $_x$ 濃度を測定した。

成 績

1. サイトカイン刺激による培養血管平滑筋細胞での iNOS 蛋白質発現誘導

野生型マウス由来血管平滑細胞をサイトカイン刺激することにより、経時的な iNOS 蛋白質の発現誘導が認められた。また、その発現量は刺激後 24 時間で最大となった。

2. 内因性 TXA $_2$ の血管平滑筋細胞でのサイトカイン誘発 iNOS 蛋白質発現および NO 産生への作用

TP 欠損マウス由来血管平滑筋細胞では、サイトカイン刺激後 24 時間の iNOS 蛋白質発現量および NO 産生量は、野生型マウス由来血管平滑筋細胞に比し有意に増加していた。

3. TP アゴニストの血管平滑筋細胞でのサイトカイン誘発 iNOS 蛋白質発現および NO 産生への作用

TP アゴニストである U-46619 を血管平滑筋細胞培養系に加え、その作用を解析した。なお、内因性プロス

タノイドの影響を除外するため、COX 阻害薬である indomethacin (10 μ M) を予め処理した。野生型マウス由来血管平滑筋細胞において、U-46619 は濃度依存的にサイトカイン刺激による iNOS 蛋白質発現誘導および NO 産生亢進を著明に抑制した。しかし、U-46619 のこれらの作用は、TP 欠損マウス由来血管平滑筋細胞では認められなかった。

4. サイトカインによる摘出大動脈の反応性低下における内因性 TXA₂ の役割

野生型マウスの摘出大動脈での NO 産生は、サイトカイン処理により有意に増加した。しかし、この NO 産生の増加は、TP 欠損マウスの摘出大動脈において、野生型マウスの摘出大動脈に比し有意に亢進していた。また、野生型マウスと TP 欠損マウスの摘出大動脈の phenylephrine による収縮張力は、サイトカイン処理により各対照群の約 50% と約 20% に低下しており、サイトカインによる血管反応性低下は TP 欠損マウスにおいて野生型マウスに比し有意に増強していた。この血管収縮力の低下は、iNOS 阻害薬である aminoguanidine (100 μ M) の前処理により、野生型および TP 欠損マウスの両者で各対照群と同程度にまで回復した。

5. *In vivo* 敗血症モデルにおける NO 産生での TXA₂ の役割

LPS 敗血症モデルでは、大動脈の反応性低下は認められなかった。しかし、LPS 投与後のマウスの血圧は徐々に低下したことから、抵抗血管での反応性低下が示唆された。そこで、NO 産生を指標に解析を行った。野生型マウスでは、LPS 投与により血漿 NO_x 濃度は対照マウスの約 20 倍と著明に増加した。しかし、LPS 投与後の NO 産生増加の程度は、TP 欠損マウスと野生型マウス間で差を認めず、このモデルでの TXA₂ 産生量は iNOS 発現誘導に影響するのに不十分と考えられた。したがって、外因性に投与した U-46619 の NO 産生への効果を解析した。U-46619 は、野生型マウスにおいて LPS による NO 産生の亢進を有意に抑制した。しかし、TP 欠損マウスでは、U-46619 の NO 産生への効果は消失していた。

考 案

本研究により、TXA₂ が固有の受容体である TP を介して iNOS-NO 系を抑制することを明らかにした。まず、サイトカイン刺激による培養血管平滑筋細胞および摘出血管からの NO 産生が TP 欠損マウスで有意に亢進していたことから、内因性 TXA₂ が iNOS 発現および NO 産生に対し、抑制的に作用することを示した。また、外因性に TP 刺激を加えた場合も、サイトカイン誘発性の iNOS 蛋白質の発現および NO 産生が抑制されることを示した。

摘出血管を用いた *ex vivo* の実験系では、サイトカインによる血管収縮力低下が TP 欠損マウスで野生型マウスに比し有意に増強していた。また、血管収縮力の低下は、iNOS 阻害薬によりほぼ完全に回復した。したがって、この現象は誘導発現された iNOS 由来の NO により惹起され、その影響は TP 欠損マウスでより増強したと考えられた。

In vivo 敗血症モデルでの検討では、LPS による iNOS 発現誘導を介した NO 産生の著明な増加が認められ、その U-46619 による有意な低下を観察した。この結果、TXA₂ が *in vivo* においても iNOS-NO 系に対して抑制作用を示すことを明らかにした。

結 論

本研究は、TXA₂が TP を介し、サイトカインや LPS などの炎症性刺激によって誘導される iNOS の発現を抑制することを明らかにした。敗血症などに合併する播種性血管内凝固 (DIC) 症候群発症時などでは、血小板の活性化に伴い循環器系での TXA₂ 産生の亢進が認められる。このような病態において、TXA₂ は直接的な血管収縮作用に加え、血管平滑筋細胞における iNOS 発現の抑制を介した間接的な作用により、血管緊張を調節していると考えられる。これらの知見は、敗血症性ショックなどの病態形成に重要な血管反応性低下の機構解明に資するのみでなく、その治療の開発にも貢献することが期待される。

引 用 文 献

1. Fujino, T., Yuhki, K., Yamada, T., Hara, A., Takahata, O., Okada, Y., Xiao, CY., Ma, H., Karibe, H., Iwashima, Y., Fukuzawa, J., Hasebe, N., Kikuchi, K., Narumiya, S. and Ushikubi, F. Effects of the prostanoids on the proliferation or hypertrophy of cultured murine aortic smooth muscle cells. *Br. J. Pharmacol.* **136**: 530-539, 2002.
2. Shiokoshi, T., Ohsaki, Y., Kawabe, J., Fujino, T. and Kikuchi, K. Downregulation of nitric oxide accumulation by cyclooxygenase-2 induction and thromboxane A₂ production in interleukin-1 β -stimulated rat aortic smooth muscle cells. *J. Hypertens.* **20**: 455-461, 2002.

学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第 号		
学位の種類	博士 (医学)	氏 名	山田 武宏
<p>審査委員長 若 宮 伸 隆 (印)</p> <p>審査委員 谷 口 隆 信 (印)</p> <p>審査委員 伊 角 文 隆 (印)</p>			
<p>学 位 論 文 題 目</p> <p>Thromboxane A₂ regulates vascular tone via its inhibitory effect on the expression of inducible nitric oxide synthase</p> <p>(トロンボキサン A₂ は誘導型一酸化窒素合成酵素の発現抑制を介して血管緊張を調節する)</p>			
<p>敗血症など全身性炎症時の血圧低下には、誘導型 NO 合成酵素 (iNOS) 発現誘導により多量に産生される NO が関与している。その一方で、シクロオキシゲナーゼ-2 (COX-2) から TXA₂ をはじめとしたプロスタノイドも多量に産生されるが、このプロスタノイドの全身性炎症時の血管緊張維持における役割は不明であった。</p> <p>そこで著者は、iNOS 発現に及ぼす TXA₂ の作用に着目し、TXA₂ 受容体 (TP) 欠損マウスを用いて、TXA₂ の全身性炎症時の血管緊張維持における役割解明を目指した。</p> <p>まず、細胞レベルでの検討では、野生型マウスの血管平滑筋細胞 (VSMC) において、サイトカイン刺激により、iNOS 蛋白質の発現誘導が認められ、同時に NO 産生も増加した。このような現象は TP 欠損マウスの細胞においても認められたが、iNOS 蛋白質発現量および NO 産生量はいずれも野生型に比して有意に増加していた。本実験事実から、内因性 TXA₂ が iNOS 発現を抑制していると考えられた。さらに、野生型マウスの VSMC において、U-46619 (TP アゴニスト) 処理により、サイトカイン刺激による iNOS 蛋白質の発現誘導は濃度依存的に抑制された。</p> <p>次に臓器レベルでの実験系として、野生型マウスの摘出血管 (大動脈) を取り出し、サイトカイン刺激を行い、器官培養上清中に NO 産生量の増加を認めた。</p>			

一方、TP 欠損マウスでは、サイトカイン刺激による NO 産生量が野生型マウスに比して有意に上昇していた。さらに、これら大動脈の血管収縮薬に対する反応性は、対照群に比して有意に低下したが、TP 欠損マウス大動脈においては、より著明な反応性の低下が認められた。したがって、TP 欠損マウス大動脈は、サイトカインによる NO 産生の亢進により、野生型マウスよりも著明な血管反応性の低下がもたらされることが明らかとなった。

個体レベルの実験系では、*in vivo* 敗血症モデルとして LPS を投与したマウスにおいて、生体内 NO 産生の著明な上昇が認められた。この現象は野生型 TP 欠損マウスに同程度に認められた。しかし、野生型マウスでは、LPS と同時に U-46619 を投与すると、LPS のみの時に比して、NO 産生が有意に低下した。

以上の結果から、TXA₂ が TP を介し、サイトカインなどの炎症性刺激によって誘導される iNOS の発現を抑制することが明らかにされた。

TXA₂ は強力な血管収縮作用を有するプロスタノイドであるが、血管への直接作用以外にも、炎症時には VSMC における iNOS 発現を抑制して、過度の血管拡張を抑えることにより、血管緊張の調節に関与していることが、本研究において初めて明らかとなった。

本論文に示されたこれらの知見は、敗血症性ショック等の炎症性状態における血管反応性低下の機構解明のみならず、その新たな治療法開発にも貢献することが期待される。

なお、論文提出者に対する試問審査においても、適切かつ論理的な回答が得られ、関連分野に関する十分な知識を有していることが認められた。以上の審査結果から、本論文は博士の学位論文として適切であると判定した。