

## 学位論文の要旨

学位の種類	博士	氏名	大谷 真一
<p>学位論文題目</p> <p>Histamine elicits dilation of isolated porcine retinal arterioles: Role of Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor (EDHF)</p> <p>(ヒスタミンは摘出豚網膜細動脈を拡張させる:内皮由来過分極因子 EDHF の役割)</p> <p>共著者名</p> <p>長岡 泰司、大前 恒明、大野 晋治、吉田 晃敏</p> <p>未発表</p> <p>研究目的</p> <p>糖尿病網膜症は糖尿病細小血管合併症の1つで成人失明の主な原因である。その社会経済的損失は大きく、糖尿病網膜症の治療確立は急務である。我々は2型糖尿病患者において血管内皮機能が障害されていること<sup>1</sup>、網膜症の発症以前から網膜血流が低下していること<sup>2</sup>を報告しており、血管内皮機能低下と網膜血流低下が網膜症の発症・進展に関わっている可能性を指摘してきた。</p> <p>網膜血管内皮は、一酸化窒素(NO)、プロスタサイクリン(PGI<sub>2</sub>)、内皮由来過分極因子(EDHF)などの内皮由来血管拡張因子(EDRF)を産生し網膜血流を調整しており、糖尿病患者ではEDRFの産生が減少していることが報告されている。従って、減少したEDRFの作用を補うことにより網膜血流を改善させ、網膜症の悪化を抑制できる可能性がある。我々は内皮から産生されたNOまたはPGI<sub>2</sub>が網膜血管を拡張させることを報告してきた。しかし、網膜においてEDHFを介した血管拡張についての報告はこれまでに存在しない。</p> <p>ヒスタミンはアミノ酸であるヒスチジンの誘導体でオータコイドの一種であり、H1、H2、H3、H4の受容体を介して血管拡張、アレルギー反応、神経伝達、胃酸分泌、気管支収縮など多様な作用を持っていることが知られている。ヒスタミンが網膜血管を拡張させ、さらにラットの腸間膜動脈においてヒスタミン H3 受容体アゴニストによる血管拡張にEDHFが関与しているという報告<sup>3</sup>があり、ヒスタミンによる網膜血管拡張にはEDHFが関与している可能性がある。現在のところ、EDHFを標的とした血流改善薬はないが、網膜血管拡張にEDHFが関与するならば、将来的に網膜症の治療につながる可能性がある。本研究では、摘出血管を用いてヒスタミンの網膜細動脈への作用とその機序を検討した。</p>			

## 材 料 ・ 方 法

### 1. 実験動物

実験にはブタ(週齢 16-24 週、体重 25-35kg)の眼球を用いた。

### 2. 実験方法

ブタを屠殺後、速やかに眼球を摘出し、網膜から細動脈を剥離し、その両端をピペットに結紮した。摘出した血管に生理的な圧をかけ、基礎緊張を確認後、各種薬剤を血管外腔に投与し、血管径の変化をビデオカメラ付き顕微鏡で測定した。

基礎緊張の血管径を 0%とし、さらにカルシウムフリー溶液で完全に弛緩した時の血管径を 100%とし、薬物投与後血管径を基礎緊張からの変化率(%)で表し、網膜血管の反応性の指標とした。

### 3. ヒスタミンの網膜血管への影響

#### a) ヒスタミンの網膜細動脈への影響

ヒスタミン(0.1-30  $\mu$ M)を投与し、網膜血管の濃度依存性の反応を評価した。

#### b) ヒスタミンの網膜血管への反応におけるヒスタミン受容体の関与

ヒスタミン H1 受容体、H2 受容体、H3 受容体、H4 受容体それぞれの阻害薬を前投与し、網膜血管への反応を比較した。

#### c) ヒスタミンの網膜血管への反応における内皮の関与

網膜血管の内皮を剥離し、その前後でヒスタミンの網膜血管への反応を比較した。

#### d) ヒスタミンの網膜血管への反応における EDRF の関与

EDRF (NO、PGI<sub>2</sub>、EDHF)のそれぞれの阻害薬を投与し、網膜血管への反応を比較した。

#### e) ヒスタミンの網膜血管への反応における EDHF の検討

NO と PGI<sub>2</sub> の阻害薬である L-NAME + indomethacin を前投与した状態でのヒスタミンによる血管拡張反応と、L-NAME + indomethacin に加えて EDHF の本体と考えられているギャップジャンクション、過酸化水素、エポキシエイコサトリエン酸 EET それぞれの阻害薬を前投与した状態でのヒスタミンによる血管拡張反応を比較した。

### 4. 網膜細動脈におけるヒスタミン H1 受容体と H2 受容体の局在

ブタ網膜細動脈の凍結切片標本を作成し、抗ヒスタミン H1 受容体抗体、抗ヒスタミン H2 受容体抗体を用いて免疫染色を行い、ヒスタミン H1 受容体、H2 受容体の網膜細動脈における局在を検討した。

### 5. 統計学的処理

対照と薬剤(阻害剤)投与群との比較には、二元配置分散分析(Two-way ANOVA)後、Bonferroni multiple-range test を行った。危険率 5%未満を統計学的有意とした。

## 成 績

### 1. ヒスタミンの網膜細動脈への影響

ヒスタミンは網膜細動脈を濃度依存性に拡張させ、最高濃度である  $30 \mu\text{M}$  において約 85%の血管拡張が得られた。

### 2. ヒスタミンの網膜血管への反応におけるヒスタミン受容体の関与

ヒスタミンの血管拡張は H1 受容体の阻害薬 chlorpheniramine、H2 受容体の阻害薬 famotidine により、それぞれ有意に抑制された。Chlorpheniramine と famotidine の同時投与により、ヒスタミンの血管拡張反応は完全に消失した。H3,4 受容体の阻害薬 thioperamide はヒスタミンの血管拡張反応に影響を与えなかった。

### 3. 網膜細動脈における H1 受容体と H2 受容体の局在

ブタ網膜細動脈において、血管内皮のみに H1 受容体、H2 受容体の発現が認められた。

### 4. ヒスタミンによる拡張作用における血管内皮細胞の関与

血管内皮の剥離後、ヒスタミンによる網膜血管の血管拡張は完全に抑制された。

### 5. 血管内皮依存性の拡張経路の検討

ヒスタミンの血管拡張は、NO、 $\text{PGI}_2$ 、EDHF の阻害薬である L-NAME、indomethacin、apamin + charybdtoxin の前投与によりそれぞれ有意に抑制された。L-NAME + indomethacin + apamin + charybdtoxin の同時投与により、ヒスタミンによる血管拡張は完全に抑制された。

### 6. EDHF の検討

L-NAME + indomethacin に加えて EET の阻害薬である sulfaphenazole の前投与により、ヒスタミンによる血管拡張反応はほぼ完全に抑制された。ギャップジャンクション、過酸化水素の阻害薬である carbenoxolone、catalase の前投与ではヒスタミンによる血管拡張は抑制されなかった。

## 考 案

本研究により、ヒスタミンは濃度依存性に網膜細動脈を拡張させることが明らかとなった。この拡張作用は、H1 受容体阻害薬 chlorpheniramine、H2 受容体の阻害薬 famotidine により、有意に抑制され、Chlorpheniramine と famotidine の同時投与により完全に消失したことから、H1 受容体と H2 受容体の両方を介する反応であることが示唆された。このヒスタミンによる拡張作用は、血管内皮剥離により完全に抑制されたことから、血管内皮依存性経路の存在が示唆された。これらの結果は免疫染色において血管内皮のみに H1 受容体、H2 受容体の発現が認められたことから確認できた。内皮依存性経路とし

てはNO合成酵素阻害薬であるL-NAMEとプロスタノイド合成酵素阻害薬であるindomethacin、EDHF阻害薬である apamin + charybdtoxin の前投与により、それぞれ有意に抑制され、L-NAME + indomethacin + apamin + charybdtoxin の同時投与では、完全に抑制されたことから、NO、PGI<sub>2</sub>、EDHF が関与していると推測された。EDHF については、実験的には NO 合成酵素とプロスタノイド合成酵素を薬物を用いて抑制した状態で発生する弛緩を、主に EDHF による弛緩であるとみなしており、L-NAME + indomethacin の同時前投与群と比較して、L-NAME + indomethacin に加えてEETの阻害薬である sulfaphenazole の前投与を行った群でヒスタミンによる血管拡張が有意に抑制されたため、EET が EDHF として関与していることが示唆された。

今回我々はヒスタミンを用いた検討によって、網膜細動脈拡張のメカニズムに EDHF が関与することを初めて明らかにした。ヒスタミンは、網膜細動脈における EDHF による血管拡張についての研究ツールとして有用であると考え。今後、EDHF を介した網膜血流改善による糖尿病網膜症の新規治療法の開発について、さらなる検討を行いたい。

#### 結 論

豚摘出血管を用いてヒスタミンの網膜細動脈への作用とその機序を検討し、以下の結論を得た。

1. ヒスタミンは血管内皮の H1 受容体と H2 受容体を介して、網膜細動脈を拡張させる。
2. この内皮依存性の血管拡張には、NO、PGI<sub>2</sub>、EDHF の産生が関与している。
3. ヒスタミンによる網膜細動脈の血管拡張には EET が EDHF として関与している。




#### 引 用 文 献

1. Sogawa K, Nagaoka T, Tanano I, et al. Association between diabetic retinopathy and flow-mediated vasodilation in type 2 DM. *Curr Eye Res* 2012;37:446-451.
2. Nagaoka T, Sato E, Takahashi A, Yokota H, Sogawa K, Yoshida A. Impaired retinal circulation in patients with type 2 diabetes mellitus: retinal laser Doppler velocimetry study. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010;51:6729-6734.
3. Sun P, Jin X, Koyama T, Li S, Kitamura Y, Kawasaki H. R-(-)-alpha-methylhistamine, a histamine H3 receptor agonist, induces endothelium-dependent vasodilation in rat mesenteric resistance arteries. *Biol Pharm Bull* 2010;33:58-63.

#### 参 考 文 献

1. Ono S, Nagaoka T, Omae T, Tanano I, Kamiya T, Otani S, Ishibazawa, Yoshida A. Beraprost sodium, a stable prostacyclin analogue, elicits dilation of isolated porcine retinal arterioles: roles of eNOS and potassium channels. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2014;55:5752-5759.

## 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	大谷 真一
<p>審査委員長 柏柳 誠 </p> <p>審査委員 廣川 博之 </p> <p>審査委員 船越 洋 </p>			
<p>学位論文題目</p> <p><b>Histamine elicits dilation of isolated porcine retinal arterioles: Role of Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor (EDHF)</b></p> <p>(ヒスタミンは摘出豚網膜細動脈を拡張させる：EDHFの役割)</p>			
<p>糖尿病網膜症は成人失明の主な原因であることから、治療確立は急務である。2型糖尿病患者においては、血管内皮機能が障害されていることと網膜症の発症以前から網膜血流が低下していることから、血管内皮機能低下と網膜血流低下が網膜症の発症・進展に関わっている可能性が考えられる。網膜血管内皮は、一酸化窒素、プロスタサイクリン、内皮由来過分極因子などを介して網膜血流を調整している。ヒスタミンはこれらの因子を介して、網膜血管を拡張する可能性が考えられるが、その詳細は不明であった。学位申請者は、ブタの摘出血管を用いてヒスタミンの網膜細動脈への作用とその機序を検討した。</p>			

ヒスタミンは網膜細動脈を濃度依存性に拡張させ、その拡張は H1 受容体の阻害薬と H2 受容体の阻害薬により抑制された。また、免疫組織化学的な実験から、ブタ網膜細動脈では、血管内皮のみに H1 受容体と H2 受容体の発現が認められた。血管内皮を剥離するとヒスタミンによる網膜血管拡張は完全に抑制された。ヒスタミンによる血管拡張は、一酸化窒素とプロスタサイクリンの阻害薬でそれぞれ抑制されたが両者を同時に投与しても完全には抑制されなかったことから、内皮由来過分極因子が関与していることが示唆された。内皮由来過分極因子が関係する応答は、エポキシエイコサトリエン酸の阻害薬で抑制された。

本研究は、ヒスタミンがブタ網膜細動脈の血管内皮に存在する H1 および H2 受容体を介して血管拡張作用を有することを明らかにした。また、ヒスタミンは一酸化窒素、プロスタサイクリンおよび内皮由来過分極因子を介する経路を経由して血管拡張を引き起こすことを示した。さらに、エポキシエイコサトリエン酸が内皮由来過分極因子として働くことを明らかにした。これらの知見は、糖尿病網膜症などの網膜血流障害を引き起こす疾患の治療に対して、新たな薬物治療の可能性を広げる有益なものである。論文内容と関連領域についての各審査委員による試問に対しても適切な回答が得られ、提出者はこの領域において十分な知識を有することが示された。以上の審査結果から、本審査委員会は、本論文が博士（医学）の学位に値するものであると判定した。