
動脈硬化モデル動物を用いた血管内皮および
支配神経機能に関する研究

(課題番号 12672213)

平成12年度～平成13年度科学研究費補助金 基盤研究(C)(2) 研究成果報告書

平成14年3月

研究代表者 安屋敷 和秀
(滋賀医科大学医学部助教授)

はじめに

動脈硬化血管における内皮機能障害には、様々な機序や硬化の程度による違いが想定されており、一定の結論は得られていない。我々は、摘出ヒト冠状動脈を用いた研究から、受容体刺激物質の種類によっては粥状硬化の有無に関わらず、内皮依存性弛緩反応に差がないこと、高用量の高コレステロール食飼育により動脈硬化を生じた日本ザル腸間膜動脈において、アセチルコリンによる内皮依存性弛緩はわずかに減少するが、アドレナリン作動性神経の機能は障害されないことを報告してきた。また、粥状硬化血管の内皮においてはNO合成能はむしろ上昇しており、受容体ないし受容体とGTP結合蛋白質の共役に障害があるとの報告もある。

そこで本研究は、遺伝性高脂血症モデルウサギならびに高コレステロール食で飼育した日本ザルを用いて動脈硬化が発生する準備状態と考えられる高脂血症モデル動物を作成し、動脈硬化や高脂血症が血管内皮および血管支配神経機能に与える影響を調べた。すなわち、正常対照動物の日本白ウサギと動脈硬化に進展した遺伝性高脂血症モデルウサギを用いて、血清脂質濃度の測定、摘出頸動脈における形態学的変化および内皮機能の変化を薬理的に解析し、また、日本ザルの高脂血症モデル群と正常対照群より採取した血液に含有される脂質の解析と動脈の組織学的検討を行い、摘出した血管を用いて、内皮および支配神経機能に対する高脂血症の影響を薬理的に解析した。遺伝性高脂血症モデルウサギおよび高脂血症モデル日本ザルを用いた研究成果をもとにして、動脈硬化や高脂血症による血管機能への影響を、総合的に理解することを試みた。

滋賀医科大学附属図書館



2001015673

研 究 組 織

研究代表者 安屋敷和秀 (滋賀医科大学医学部助教授)

研究分担者 藤岡 秀行 (滋賀医科大学医学部助手)

研究分担者 岡村 富夫 (滋賀医科大学医学部教授)

研 究 経 費

平成12年度 2,200千円

平成13年度 1,500千円

合 計 3,700千円

研究成果の要約

血管内皮細胞は一酸化窒素 (NO) およびプロスタサイクリン (PGI₂) を産生・遊離し、血管の緊張性を調節している。われわれは、内因性 NO が内皮由来血管弛緩因子(EDRF)として作用するだけでなく、血管および陰茎海綿体支配神経の拡張性伝達物質としても作用していることを報告してきた。内皮細胞は NO や PGI₂ 以外にも内皮由来過分極因子 (EDHF) を含む非 NO 性非 PGI₂ 性の弛緩機序を介して血管を拡張するが、同物質の本体は同定されていない。今回の研究では、動脈硬化によって血管内皮が障害されるとの報告があるため、まず正常動物における内皮機能に関する検討を行った。すなわち、1) 摘出サル舌動脈を用いて、非 NO 性非 PGI₂ 性の内皮依存性弛緩反応に注目し、薬理的解析を行った。2) 摘出イヌ陰茎海綿体標本を用いて、非 NO 性非 PGI₂ 性の内皮依存性弛緩反応を解析し、さらに勃起機能と海綿体支配神経および内皮の役割についてまとめた。つぎに、今回の目的である血管内皮機能および血管支配神経機能に与える動脈硬化や高脂血症の影響を、3) 遺伝性高脂血症ウサギ(WHHL)および4) 高コレステロール食飼育による高脂血症日本ザルを用いて、検討した。

1) NO 以外の内皮由来の血管弛緩物質が、特に抵抗血管の緊張性調節に重要な働きがあると考えられ、注目されている。現在、同物質は血管平滑筋細胞膜の K⁺ チャネルを開口して過分極を生じ、血管弛緩をひき起こすと考えられているが、その本体は不明である。われわれは、非 NO 性非 PGI₂ 性の弛緩に注目し、各種サル摘出動脈で検討したところ、舌動脈が最大の内皮依存性弛緩を示すことを予備実験で明らかにし、NO および PGI₂ 以外の内皮由来弛緩物質の検討に使用した。アセチルコリンは、摘出サル舌動脈標本を内皮依存性

に弛緩し、同弛緩はインドメタシン処置に影響されず、NO合成酵素阻害薬のL-ニトロアルギニン(L-NA)処置により部分的に抑制された。L-NA抵抗性のアセチルコリン弛緩は、Ca²⁺依存性K⁺チャネル阻害薬のチャリブドトキシシン(CHTX)とアパミンの併用処置で消失した。同弛緩は、非選択的チトクロームP450(CYP)阻害薬ならびにCYP3A選択的阻害薬、ケトコナゾールで抑制された。さらに、CYP3Aの豊富なヒト肝ミクロゾームとアラキドン酸の反応生成物を抽出し、血管張力に及ぼす作用を検討した。同生成物は内皮を除去した舌動脈標本を弛緩し、同弛緩はCHTXとアパミンの併用処置で消失した。ケトコナゾールまたはCYP3A4に特異的な抗体を処置した状態での反応生成物は標本を強く弛緩しなかった。また、同抗体を用いた免疫組織染色により、サル舌動脈の内皮細胞にCYP3A4が存在することが確認された。したがって、サル舌動脈におけるアセチルコリンによる内皮依存性弛緩は、PGI₂の関与はほとんどなく、NOとCa²⁺依存性K⁺チャネルを開口させるCYP3A4由来のアラキドン酸代謝物によると考えられた(著書1)。

2) 陰茎勃起は、陰茎海綿体の拡張に基づくことが知られている。われわれはイヌを用いた実験から、陰茎海綿体に分布するNO作動性神経から遊離されたNOが海綿体平滑筋を拡張し、勃起をひき起こすことを生体位および摘出標本を用いて報告きた。また、アセチルコリンは海綿体内皮からNOおよびK⁺チャネル開口物質を遊離し、平滑筋を弛緩することも報告した。この海綿体平滑筋に存在すると推定されるK⁺チャネル開口を介したアセチルコリンによる弛緩は、CHTX処置では影響されず、低コンダクタンスのCa²⁺依存性K⁺チャネル阻害薬であるアパミンまたはシラトキシシン単独処置によって収縮に転じたことから、イヌ海綿体内皮はNOおよび低コンダクタンスのCa²⁺依存性K⁺チャネルの開口物質を遊離して、海綿体平滑

筋を弛緩させると考えられた。このような海綿体内皮による平滑筋拡張作用も NO 作動性神経の役割とともに、勃起機能に関与する可能性が示唆された（論文 2）。さらに、NO と勃起障害について、陰茎海綿体を支配する NO 作動性神経および海綿体内皮機能の障害が重要な原因の一部であり、また、陰茎を灌流する動脈が動脈硬化などによって閉塞された場合には、重大な勃起障害をおこすことなどをまとめた（総説 3）。

3) 高脂血症ならびに動脈硬化症による動脈内皮機能に対する影響が報告されている。本研究では、動脈硬化症に進展した WHHL から摘出した頸動脈標本を用いて、高脂血症や動脈硬化がウサギ頸動脈の内皮機能どのような影響を及ぼすかについて調べた。WHHL ないし同月齢の日本ウサギ(JW)から頸動脈を摘出し、肉眼的および組織学的変化を調べると、WHHL から摘出した頸動脈には、動脈硬化を示す部分と示さない部分が斑状に存在した。WHHL から採取した血清中の脂質（総コレステロール、LDL-コレステロールおよび中性脂肪）は、JW のそれよりも有意に高かった。同動脈から条片標本作製し、等尺性張力変化を測定した。インドメタシン処置下の JW 頸動脈標本は、アセチルコリンの用量に応じて内皮依存性弛緩をひき起こした。WHHL の動脈硬化のある標本におけるアセチルコリン弛緩は、硬化のない標本および JW の標本におけるアセチルコリン弛緩より小さかった。アセチルコリン弛緩は L-NA 処置により部分的に抑制され、L-NA 抵抗性のアセチルコリン弛緩も動脈硬化のある標本において小さかった。L-NA 抵抗性のアセチルコリン弛緩は、CHTX 単独ないしアパミン併用により消失した。サブスタンス P は、用量に応じて各標本を内皮依存性に弛緩させた。WHHL の頸動脈におけるサブスタンス P 弛緩は、動脈硬化の有無に拘わらず、JW の頸動脈での弛緩より大きかった。サブスタンス P 弛緩は L-NA 処置で部分的に

抑制され、残った弛緩も WHHL の頸動脈標本において大きかった。なお、L-NA 抵抗性のサブスタンス P 弛緩は CHTX とアパミンの併用により消失した。NO ドナーである NOC18 は、内皮非依存性に標本を弛緩し、その程度は標本間に差がなかった。以上の成績から、ウサギ頸動脈において、動脈硬化は内皮細胞のムスカリン受容体機能を低下させ、他方、高脂血症は内皮のサブスタンス P 受容体機能を上昇する。したがって、動脈硬化や高脂血症は、血管内皮を一様に障害するのではなく、内皮細胞上の受容体機能に変化を与える可能性が示唆された（論文 4）。

4) 高コレステロール食で飼育した日本ザルの高脂血症モデルの摘出動脈を用いて、高脂血症が霊長類の脳動脈および浅側頭動脈の内皮および支配神経機能に与える影響について調べた。高コレステロール食で飼育した日本ザルより採取した血清における脂質成分（総コレステロール、LDL-コレステロール、HDL-コレステロールおよび中性脂肪）は、普通食で飼育したものよりも有意に高かった。また、肉眼的および組織学的変化を調べたところ、動脈硬化が発生しやすいとされる総腸骨動脈分岐部に近い腹部大動脈においても、中大脳動脈および浅側頭動脈においても動脈硬化所見は認められなかった。高脂血症モデルザルおよび同年齢のサルの中大脳動脈および浅側頭動脈から条片標本を作製し、張力変化を測定した。カルシウムイオノフォア A23187、ADP および外因性 NO は、高脂血症ザルの中大脳動脈標本を、正常対照群の同動脈と同じ程度に弛緩させた。他方、ヒスタミンによる血管内皮に依存した弛緩は、高脂血症ザルの中大脳動脈標本の方が対照標本よりも有意に大きかった。浅側頭動脈動脈におけるアセチルコリンおよびカルシウムイオノフォア A23187 による内皮依存性の弛緩反応は、高脂血症の影響を受けなかった。ADP および外因性 NO による弛緩も、高脂血症による影響は

なかった。われわれは、ニコチンが血管支配神経を刺激して、血管緊張を調節する神経伝達物質を遊離させ、血管平滑筋張力を変化させることを報告してきた。ニコチン適用によって、サル中大脳動脈は弛緩した。同弛緩はNO合成酵素の阻害薬であるL-NA処置によって消失し、NOの基質であるL-アルギニンの大量適用によって、弛緩は回復した。このことから、ニコチンによる神経の化学的刺激によって、中大脳動脈に分布するNO作動性神経が興奮し、NOが合成・遊離されて、動脈を弛緩させると考えられた。しかし、同神経性の弛緩は、高脂血症によって影響を受けなかった。浅側頭動脈は、ノルアドレナリン作動性神経とNO作動性神経による拮抗性の二重支配を受けており、ニコチンはノルアドレナリンとNOの両方を神経から遊離する。無処置条件におけるニコチン適用による神経由来の反応も、高脂血症によって影響を受けず、さらにL-NA処置下のニコチンによるノルアドレナリン遊離に基づく収縮反応も高脂血症によって影響されなかった。したがって、サル中大脳動脈において高脂血症は、血管支配神経や血管内皮を一様に障害せず、おそらく内皮細胞に存在するヒスタミン受容体からNO合成酵素を活性化するまで過程の機能を上昇させる可能性が考えられた（論文 5、Journal of Cardiovascular Pharmacology へ投稿中）。

遺伝性高脂血症ウサギおよび高コレステロール食で飼育した日本ザルの高脂血症モデルを用いた研究を総合すると、動脈硬化や長期間の高脂血症状態は、血管内皮機能および血管支配神経機能を一様に障害するのではなく、動物種や血管部位によって異なるが、内皮細胞の特定の受容体機能に変化を与えることが示唆された。

研 究 発 表

学会誌、総説、著書等

1. Ayajiki, K., Fujioka, H., Toda, N., Okada, S., Minamiyama, Y., Imaoka, S., Funae, Y. and Okamura, T.
An arachidonic acid metabolite(s) produced by the endothelial cytochrome P450 isoform, CYP3A4, relaxes the lingual artery of the monkey via K⁺ channel opening. In: Vanhoutte P. M.(Eds.), EDHF 2000. Taylor & Francis, New York, pp 180-186, 2001.
2. Ayajiki, K., Fujioka, H and Okamura, T.
Mechanisms underlying endothelium-dependent, nitric oxide/prostacyclin-independent, acetylcholine-induced relaxation in canine corpus cavernosum.
Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology 362: 448-451, 2000.
3. 安屋敷 和秀、戸田 昇、岡村 富夫
NO作動性神経と勃起障害。総説 NOの病態生理－創薬への展開－, 日本薬理学会誌 119, 21-28, 2002.
4. Ayajiki, K., Ozaki, M., Shiomi, M., Okamura, T. and Toda, N.
Comparison of endothelium-dependent relaxation in carotid arteries from Japanese white and Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits.
Journal of Cardiovascular Pharmacology 36(5): 662-630, 2000.
5. Ayajiki, K., Fujioka, H., Torii, R., Toda, N. and Okamura, T.
Endothelial and neuronal functions in cerebral and temporal arteries from monkeys fed a high cholesterol diet.
Journal of Cardiovascular Pharmacology (投稿中) .