

氏 名 にしだ せいいちろう
西田 清一郎

学位の種類 博士 (医学)

学位記番号 富医薬博乙第 59 号

学位授与年月日 平成 28 年 2 月 24 日

学位授与の要件 富山大学学位規則第 3 条第 4 項該当

学位論文題目 **Role of gap junction-mediated endothelium-derived hyperpolarizing factor in vasorelaxation induced by quercetin**
(フラボノイド“ケルセチン”の内皮由来過分極因子を介した弛緩作用におけるギャップジャンクションの役割について)

論文審査委員

(主査) 教授 西田 尚樹
(副査) 教授 関根 道和
(副査) 教授 芳村 直樹
(副査) 教授 嶋田 豊
(紹介教員) 教授 服部 裕一

論文内要の要旨

〔目的〕

血管内皮細胞は、ずり応力のような物理的的刺激や、種々の神経液性物質に反応して、血管拡張物質を放出するが、一酸化窒素(NO)、プロスタサイクリンに続く第三の内皮由来弛緩因子として内皮由来過分極因子(endothelium-derived hyperpolarizing factor: EDHF)の存在が提唱されている。EDHFの本体については、チトクロームP450 monooxygenase系アラキドン酸代謝産物、カリウムイオンそのもの、 H_2O_2 など、多くの諸説があるが、内皮細胞と平滑筋細胞との間のギャップジャンクションを介した電氣的伝搬とする説が有力とされ、EDHFは細小動脈における局所的な血流調節に重要な役割を果たしていると考えられている。

ケルセチンは代表的なフラボノイドのひとつで、健康管理や病態改善に対して有効と考えられている。食品では玉葱などの野菜やリンゴのような果物、さらにワイン等に、また多数の生薬に、広く含まれている。臨床効果として、抗動脈硬化作用、脳血管疾患の予防、抗腫瘍効果を発揮することが知られている。ケルセチンの代表的な薬理作用のひとつに血管弛緩作用があるが、この作用機構についてはまだ明らかにされていない。本研究では、ケルセチンの小血管における弛緩作用機序、とりわけ内皮依存性の弛緩作用について、ラット大動脈および腸間膜動脈の輪状標本を用いて検討した。

〔方法および結果〕

雄性Wistarラット(10-15週齢)を、動物愛護指針に則って安楽死させ、大動脈および腸間膜動脈を摘出し、脂肪組織などを剥離後、大動脈は3 mm、腸間膜動脈は1 mmの輪状切片を作成した。実験は、Krebs液内に、血管を固定し行われた。Krebs液は $37.0^{\circ}C$ に保ち、 $95\%O_2 + 5\%CO_2$ で通気した。大動脈には、1.2 g、腸間膜動脈には、0.5 gの静止張力をかけて、40分間保持し安定させた後、大動脈には、5 μM 、腸間膜動脈には、1 μM のノルエピネフリン(NE)を投与して収縮させ、トランスデューサーを用いて、血管緊張(tonus)の変化を測定した。

ケルセチン(0.1-100 μM)は、NE (5 μM)で収縮させたラット大動脈を、濃度依存的に弛緩させた。この弛緩作用は、血管内皮の機械的な除去、あるいはNO合成酵素(NOS)阻害薬であるL-NAME (100 μM)存在下で、有意に抑制されたことから、内皮由来のNOが弛緩機序に関わっているものと考えられる。さらに、ケルセチンは、内皮非依存性の弛緩反応の部分は、 Ca^{2+} 拮抗薬であるニカルジピンで減弱し、大動脈をKClで収縮させたとき強く弛緩作用がみられたことから、 Ca^{2+} チャネル阻害作用を有していると示唆された。また、非特異的なカリウムチャネルブロッカーであるtetraethylammonium (TEA)によっても、ケルセチンの弛緩作用は抑制されることから、直接大動脈平滑筋のカリウムチャネルを活性化している可能性が認められた。ケルセチンのNE収縮抑制作用には、protein kinase C、中でもPKC δ 阻害作用のあることも明らかにされた。すなわち、大動脈においては、ケルセチンは、内皮由来NOも含めた多様な作用機構で、弛緩作用を惹起していた。

ケルセチン(0.1-100 μM)は、NE (1 μM)で収縮させたラット腸間膜動脈を、濃度依存的に弛緩させた。血管内皮を機械的に除去することにより、ケルセチンの弛緩作用は有

意に減弱した。ケルセチンの弛緩作用は、L-NAMEとシクロオキシゲナーゼ(COX)阻害薬インドメサシンに対して抵抗性で、軽度の減弱を認めたものの有意な影響は受けなかった。非特異的なカリウムチャネルブロッカーTEAを前投与したが、ケルセチンの弛緩作用は減弱傾向を認めたものの、有意な減弱を認めなかった。しかし、L-NAME (100 μM)とインドメサシン(10 μM)存在下で、ギャップジャンクション阻害薬として知られている18 α -グリチルレチン酸(100 μM)あるいは18 β -グリチルレチン酸(50 μM)を投与すると、ケルセチンの血管弛緩作用は、有意に減弱した。以上の結果から、ケルセチンは、ラット腸間膜動脈においては、ギャップジャンクションを介したEDHFがその血管内皮依存性の弛緩作用に関与していると考えられた。

[総括]

本研究において、ケルセチンは、ラット大動脈において多面的作用機構を介して弛緩作用を惹起する一方、腸間膜動脈においては、ギャップジャンクションを介したEDHFによる内皮依存性血管弛緩作用を有することが判明した。EDHFは、全身の細小動脈など抵抗血管での血流調節に重要な役割を担っていることを考えると、このケルセチンの血管弛緩作用は、临床上、降圧作用や抗動脈硬化作用などに貢献していると考えられよう。このEDHFを介した血管拡張作用は、他の多くのフラボノイド類にも期待され、フラボノイド類を含有する生薬や漢方薬、および健康食品も、EDHFを介した血管拡張作用によって、血管緊張の調節に貢献することが推測される。ケルセチンは、非常に複雑で多岐にわたった多彩な作用機序による血管拡張作用を示す。この特性を理解し応用できれば、植物由来構造をもつフィトケミカルを、多彩な血管弛緩作用機序を有した血管弛緩物質として創薬できる可能性も期待できる。

学位論文審査の要旨

【目的】

血管内皮細胞は、ずり応力のような物理的的刺激や、種々の神経液性物質に反応して、血管拡張物質を放出するが、一酸化窒素(NO)、プロスタサイクリンに続く第三の内皮由来弛緩因子として内皮由来過分極因子(endothelium-derived hyperpolarizing factor: EDHF)の存在が提唱されている。EDHFの本体については、チトクローム P450 monooxygenase 系アラキドン酸代謝産物、カリウムイオンそのもの、 H_2O_2 など諸説提唱されてきたが、現在は内皮細胞と平滑筋細胞との間のギャップジャンクションを介した電氣的伝搬とする説が有力とされ、EDHFが細小動脈を主たる作用部位として局所的な血流調節に重要な役割を果たしている可能性が考えられている。

ケルセチンは代表的なフラボノイドのひとつで、健康管理や病態改善に対して有効と考えられている。食品では玉葱などの野菜やリンゴのような果物、さらにワイン等や多数の生薬に、広く含まれている。臨床効果として、抗動脈硬化作用、脳血管疾患の予防、抗腫瘍効果を発揮することが知られている。ケルセチンの代表的な薬理作用のひとつに血管弛緩作用があるが、この作用機構についてはまだ明らかにされていない。そこで西田清一郎君は、ケルセチンの小血管における弛緩作用機序につき、特に内皮依存性の弛緩作用に注目して、ラット大動脈および腸間膜動脈の輪状標本を用いて検討した。

【方法】

雄性 Wistar ラット(10-15 週齢)を、動物愛護指針に則って安楽死させ、大動脈および腸間膜動脈を摘出し、脂肪組織などを剥離後、大動脈は 3 mm、腸間膜動脈は 1 mm の輪状切片を作成した。実験は、Krebs 液内に、血管を固定し行われた。Krebs 液は 37.0°C に保ち、95% O_2 + 5% CO_2 で通気した。大動脈には、1.2g、腸間膜動脈には、0.5g の静止張力をかけて、40 分間保持し安定させた後、大動脈には、5 μ M、腸間膜動脈には、1 mM のノルエピネフリン(NE)を投与して収縮させ、トランスデューサーを用いて、各種条件下における血管緊張(tonus)の変化を測定した。

【結果】

1. ケルセチン(0.1-100 mM)は、NE (5 mM)で収縮させたラット大動脈を、濃度

依存的に弛緩させた。この弛緩作用は、血管内皮の機械的な除去、あるいは NO 合成酵素 (NOS) 阻害薬である L-NAME (100 mM) 存在下で、有意に抑制された。

2. ケルセチンによる内皮非依存性弛緩反応の部分は、 Ca^{2+} 拮抗薬であるニカルジピンで減弱し、大動脈を KCl で収縮させたとき強く弛緩作用を呈した。
3. 非特異的なカリウムチャネルブロッカーである tetraethylammonium (TEA) は、ケルセチンの弛緩作用を抑制した。
4. ケルセチンは、protein kinase C, 中でも PKC δ 阻害作用を示した。
5. ケルセチン (0.1-100 mM) は、NE (1 mM) で収縮させたラット腸間膜動脈を、濃度依存的に弛緩させた。血管内皮を機械的に除去することにより、ケルセチンの弛緩作用は有意に減弱した。
6. ケルセチンの弛緩作用は、L-NAME とシクロオキシゲナーゼ (COX) 阻害薬インドメサシンに対して抵抗性で、軽度の減弱を認めたものの有意な影響はなかった。
7. 非特異的なカリウムチャネルブロッカーである TEA を前投与すると、ケルセチンの弛緩作用は減弱傾向を認めたものの、有意ではなかった。しかし、L-NAME (100 mM) とインドメサシン (10 mM) 存在下で、ギャップジャンクション阻害薬である 18 α -グリチルレチン酸 (100 mM) あるいは 18 β -グリチルレチン酸 (50 mM) を投与すると、ケルセチンの血管弛緩作用が有意に減弱した。

【総括】

本研究はケルセチンがラット大動脈において内皮由来 NO への影響、 Ca^{2+} チャネル阻害作用、大動脈平滑筋のカリウムチャネル活性化作用、PKC δ 阻害作用、など多様な作用機構で、血管弛緩作用を惹起していることを明らかにした。また特に腸間膜動脈においてはギャップジャンクションを介した EDHF による内皮依存性血管弛緩作用を有することを明らかにした。

EDHF は、全身の細小動脈など抵抗血管での血流調節に重要な役割を担っていることからこのケルセチンの血管弛緩作用は、臨床上、降圧作用や抗動脈硬化作用などに貢献していることが示唆される。この EDHF を介した血管拡張作用は、他の多くのフラボノイド類にも期待され、フラボノイド類を含有する生薬や漢方薬、および健康食品も、EDHF を介した血管拡張作用によって、血管緊張の調

節に貢献することが推測される。これらの特性を理解し応用することにより、植物由来構造をもつフィトケミカルを、多彩な血管弛緩作用機序を有した血管弛緩物質として創薬できる可能性も期待できる。

以上のことから本研究はケルセチンがラット細小動脈においてギャップジャンクションを介した EDHF による内皮依存性血管弛緩作用を有することを初めて明らかにした点において新規性があり、フラボノイド類が多彩な作用機序を介した血管拡張作用を有することを示した点において医学における学術的重要性も高いと考えられる。

以上より本審査会は本論文を博士(医学)の学位に十分値すると判断した。