

A Study of the Role of Endothelin in the Pathogenesis of Diabetic Angiopathy in Streptozotosin-induced Diabetic Rats

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/8510

ストレプトゾトシン糖尿病ラットの血管障害に果たす エンドセリンの役割に関する研究

金沢大学医学部内科学第二講座 (主任: 竹田亮祐教授)

米 田 隆

糖尿病では血管障害が主要な合併症であるが、血管内皮傷害が特に血管障害の原因になっていると考えられている。エンドセリン-1 (endothelin-1, ET-1) は強力な血管収縮作用を示す活性ペプチドであり、血管内皮細胞より産生される。ET-1 の産生は動脈硬化の一因であるトロンビンやシアストレスによって増加し、血管収縮作用以外にも成長因子様作用を有し血管平滑筋に対し細胞増殖を引き起こす。これまで糖尿病を含め血管内皮傷害を伴う種々の疾患において血漿 ET-1 濃度の上昇が報告され、その病因論的意義について検討されている。

本研究では糖尿病性血管障害の発生、進展に果たす ET の役割を明らかにするため、ストレプトゾトシン投与による実験的糖尿病ラットを作製し、以下の実験を行った。すなわち、1) 血中 ET-1、およびその前駆体であるビッグエンドセリン-1 (big endothelin-1, b-ET-1) 濃度の測定、2) 摘出腸間膜動脈標本系における ET-1、および b-ET-1 の産生量の定量的評価、3) 特異的 ET_A 受容体拮抗剤である BQ-123 の体内投与に対する血圧への影響、4) 摘出腸間膜動脈標本系における内皮依存性血管拡張反応、および cGMP 放出に対する BQ-123 の影響についての 4 項目である。その結果、糖尿病ラットにおける血漿 ET-1、および b-ET-1 濃度はそれぞれ $5.1 \pm 0.6 \text{ pg/ml}$ 、 $12.7 \pm 0.6 \text{ pg/ml}$ であり、正常対照ラットの $3.2 \pm 0.3 \text{ pg/ml}$ 、 $7.1 \pm 0.4 \text{ pg/ml}$ に比して有意に上昇していた ($p < 0.05$)。単位時間あたりの腸間膜動脈の ET-1 の産生量、および b-ET-1 産生量は糖尿病ラットでは $24.3 \pm 3.6 \text{ pg/hr}$ 、 $42.5 \pm 2.8 \text{ pg/hr}$ であり正常対照ラットの $14.1 \pm 1.2 \text{ pg/hr}$ 、 $25.4 \pm 2.0 \text{ pg/hr}$ に比して有意に増加していた ($p < 0.05$)。血圧も糖尿病ラットでは $145 \pm 5 \text{ mmHg}$ と正常対照ラットの $116 \pm 3 \text{ mmHg}$ に比して有意に上昇していた ($p < 0.05$)。しかし、BQ-123 投与により糖尿病ラットにおける血圧上昇は抑制された。BQ-123 投与群糖尿病ラット腸間膜動脈標本におけるアセチルコリンに対する血管拡張反応、およびその際生成される cGMP も非投与群に比して有意に増加していた ($p < 0.05$)。これらの結果より、糖尿病における ET-1 増加は糖尿病に合併する高血圧ならびに血管障害の進展に重要な役割を果たしていると考えられた。

Key words endothelin-1, big endothelin-1, diabetes mellitus, diabetic angiopathy, endothelin receptor antagonist (BQ-123)

血管障害は糖尿病の主要な合併症の一つであるが、その成因に関しては未だ十分解明されていない。糖尿病においては血管障害発生前より第 8 凝固因子の増加¹⁾やプロスタサイクリン、プロテオグリカン、プラスミノゲンアクチベーターなど生理活性物質の低下^{2)~4)}が報告されており、血管障害の一因となっている可能性が提唱されている。即ち、これらの物質は主として血管内皮に於いて産生され、その均衡の破綻が内皮細胞の機能異常をきたし、その結果、血管障害を発生、進展させると考えられている。

エンドセリン-1 (endothelin-1, ET-1) は、ブタ大動脈内皮細胞の培養細胞の上清から血管収縮作用を示すペプチドとして、1988年、Yanagisawa らによって単離、同定された⁵⁾。ET-1 の前駆体であるプレプロエンドセリン-1 (preproendothelin-1, pp-ET-1) の cDNA もクローニングされ、ET-1 の生成過程に中間体としてビッグエンドセリン-1 (big endothelin-1, b-ET-1) が

生成されることも明らかとなっている⁶⁾。b-ET-1 はほとんど活性を持たないため、b-ET-1 が血管内皮に局在するエンドセリン変換酵素 (endothelin converting enzyme, ECE) によって活生 ET-1 に変換されると考えられている⁷⁾。更に遺伝子解析より、ET には構造と薬理活性の異なる 3 種のアイソペプチドが存在することが明らかにされ、各々、ET-1, ET-2, ET-3 と命名されている⁸⁾。生体内における ET アイソペプチドの分布は血管内皮以外に腎臓、肺、副腎、神経系など広範な組織に分布しているが、血管内皮では主に ET-1 が産生されていると考えられている。ET のアイソペプチドの薬理活性の差は ET 受容体サブタイプに対する親和性の違いによって生じ、ET 受容体には現在少なくとも 2 種のサブタイプの存在が明らかになっている^{9)~11)}。ET_A 受容体は、ET-1 と ET-2 に対して同等の親和性を持ち、ET-3 に対しては比較的弱い親和性を持つ。その受容体を介した作用は血管収縮以外に、子宮収縮、気管収縮、細胞増

平成 5 年 11 月 8 日受付、平成 5 年 12 月 24 日受理

Abbreviations: Ach, acetylcholine; C, control; DM, diabetes mellitus; ECE, endothelin converting enzyme; ET, endothelin; HPLC, high performance liquid chromatography; NA, noradrenaline; NG, nitroglycerin; STZ, streptozotocin

殖などに認められている。ET_B 受容体は、ET-1、ET-2、および ET-3 の各アミノペプチドに対してほぼ同等の親和性を持ち、その作用は血管内皮依存性血管拡張作用、血小板凝集抑制などである。即ち、ET_B 受容体は主に血管内皮に存在し血管保護的に作用するが、ET_A 受容体は血管平滑筋に存在し血管収縮、および細胞増殖作用により血管壁の肥厚を促進すると考えられている。

糖尿病患者においては血管障害の発症前より血漿 ET-1 濃度の上昇があり、特に腎症を伴う例では著しい増加が報告されており、ET-1 の糖尿病性血管障害への関与が示唆される¹²⁾¹³⁾。

ET の血管作用の解明はその特異的拮抗剤による効果を観察することによっても可能である。最近、*Streptomyces misakiensis* の生成物より ET 受容体拮抗剤が単離精製され¹⁴⁾、それを基に ET_A 受容体に特異的な拮抗剤、BQ-123 が Ihara らにより合成された¹⁵⁾。BQ-123 は、アミノ酸 5 個より成る環状構造ペプチド化合物で、その Ki 値 4nM が示す様に極めて特異性の高い結合阻害を示す¹⁶⁾。

今回、著者はストレプトゾトシン (streptozotocin, STZ) による実験糖尿病ラットを作製し、その摘出腸間膜動脈を用いた灌流実験系、および BQ-123 投与実験から ET-1 の血管障害の発生、進展に果たす役割について検討した。

対象および方法

I. 対象

体重 250-300g の雄性ウイスターラットを用い、血圧、心拍数を tail-cuff 法にて測定 (理研開発, 東京) 後、以下の如く対象群と糖尿病モデル群を作製した。

1. 対照群

0.1M のクエン酸ナトリウムバッファー (和光純薬, 大阪) を尾静脈より体重 1Kg あたり 2.25ml 投与した。

2. 糖尿病モデル群

STZ (Upjohn CO, Kalamazoo, U.S.A.) を体重 1Kg あたり 45mg (STZ 20mg/10ml 濃度のクエン酸ナトリウムバッファー溶液 2.25ml) を尾静脈より投与した。STZ 投与後 2 日目の血糖値が 300mg/dl 以上のラットを 8 週間飼育し実験に用いた。

II. 腸間膜動脈灌流実験

McGregar らの方法¹⁷⁾に基づき、当教室にて若干改良を加えた方法にて下記の如く、ラット腸間膜動脈の分離および灌流を施行した^{18)~20)}。ペントバルビタール (Abbott, Chicago, U.S.A.) 麻酔下にて開腹後、22G テフロン製カニューレ (八光, 東京) にて腸間膜動脈に大動脈分岐部より約 1cm の深さまでカニューレを挿入した。ヘパリン添加 Krebs-Ringer 液 (NaCl 118mM, KCl 4.75mM, CaCl₂ 2.5mM, KH₂PO₄ 1.2mM, MgSO₄ 1.2mM, NaHCO₃ 24.3mM, デキストロース 1g/l) にて血管内腔の血液除去後、ただちに腸間膜動脈を腸管より分離、体外へと取り出した。この時、同時に大動脈にもカニューレを挿入し採血を施行、採取した血液より血糖値、血漿 ET-1 濃度、および血漿 b-ET-1 濃度を測定した。

取り出した腸間膜動脈は 37°C に調整したマグナス灌流装置 (池本理化, 東京) 内に置き、95% 酸素、5% 二酸化炭素で通気した Krebs-Ringer 液で灌流した。灌流はローラーポンプ (Masterflex, Colo, Chicago, USA) を用い、同時に灌流圧を圧トランスデューサー (日本光電, 東京) にてモニターした。灌流速度は 4ml/min に設定した。灌流圧は平均 20mmHg であった。

尚、灌流前、および灌流後にノルアドレナリン (noradrenaline, NA (三共, 東京) 1μmol にて腸間膜動脈の反応性を確認した。

III. ET 受容体拮抗剤, BQ-123 を用いた実験

予備実験として、ラットに糖尿病作製後、血管内皮傷害の発症時期を確認する目的で、アセチルコリン (acetylcholine, Ach) に対する血管拡張反応を一週毎に検討したところ、糖尿病作製後 4 週後より拡張反応低下が認められた。この成績結果を基に、前述の如く糖尿病ラットを作製し、作製後 4 週目より一週間薬剤投与し、以下の如く ET_A 受容体拮抗剤、BQ-123 (萬有, 東京) 投与群、および非投与群を作製した。

1. BQ-123 投与群

糖尿病作製後 4 週目より皮下に浸透圧ポンプを埋め込み 1 週間、BQ-123 を 0.1mg/Kg/min で投与した。

2. BQ-123 非投与群

同様に生理食塩水を投与した。

上記 2 群の血圧を糖尿病作製後より 1 週毎に測定した。糖尿病作製後 5 週目に前述の如くラット腸間膜動脈灌流標本を作製した。200μM の NA 添加 Krebs-Ringer 液で灌流し、灌流圧を約 90mmHg に保った。その状態にて血管内皮傷害の指標とし

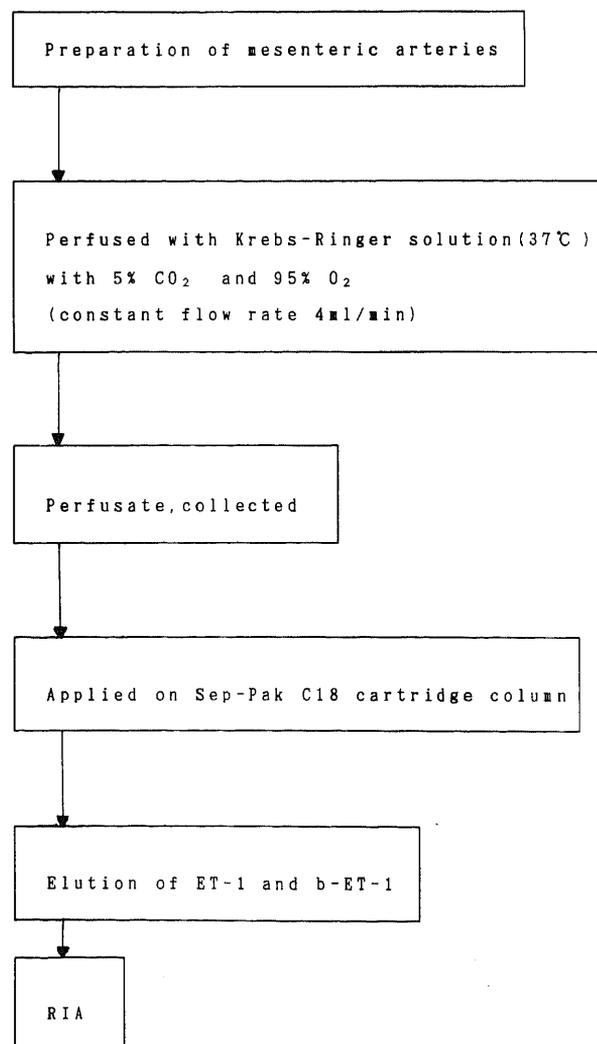


Fig. 1. Flow sheet of extraction procedure of endothelin-1 and big endothelin-1. ET-1, endothelin-1; big ET-1, big endothelin-1.

て各種濃度の Ach (10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} M), およびニトログリセリン (nitroglycerin, NG) (10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} M) を 25 μ l 投与し, その際認められる灌流圧低下反応を記録した. またこの時灌流液中に生じる cGMP を測定した.

IV. 検体の抽出および測定

Sep-Pak C-18 カラム (Waters Associates, Milford Massachusetts, U.S.A.) を 5ml ずつのメタノール, 4% 酢酸 86% エタノール, 精製水, 4% 酢酸で洗浄後, 血漿, および60分間の灌流液を通した. その後 4% 酢酸 1ml にて洗浄し更に精製水

10ml で洗浄後, 4% 酢酸 86% エタノールで溶出し, 凍結乾燥した. ET-1 の測定はラジオイムノアッセイキット (アマチュム・ジャパン, 東京) を用いた. 用いた抗体の交差活性は ET-1 に対して 100% とすると ET-2 に対して 144%, ET-3 に対して 52%, b-ET-1 に対して 0% であった. b-ET-1 の測定も同様, ラジオイムノアッセイキット (Peninsula, California, U.S.A.) を用いた. 用いた抗体の交差活性は b-ET-1 を 100% とすると ET-1, ET-2 に対してはそれぞれ $<0.001\%$ であり ET-3 に対しては 0% であった. 血糖値はグルコースオキシダーゼ法 (和光純薬) にて測定した.

V. ET-1 および b-ET-1 の同定

高速液体クロマトグラフィー (high performance liquid chromatography, HPLC) にて検体の一部を用い, ET-1, および b-ET-1 の同定を行った. HPLC には, グラジエントポンプ, LKB-2249 (Pharmacia, Uppsala, Sweden), カラムにはアサヒ

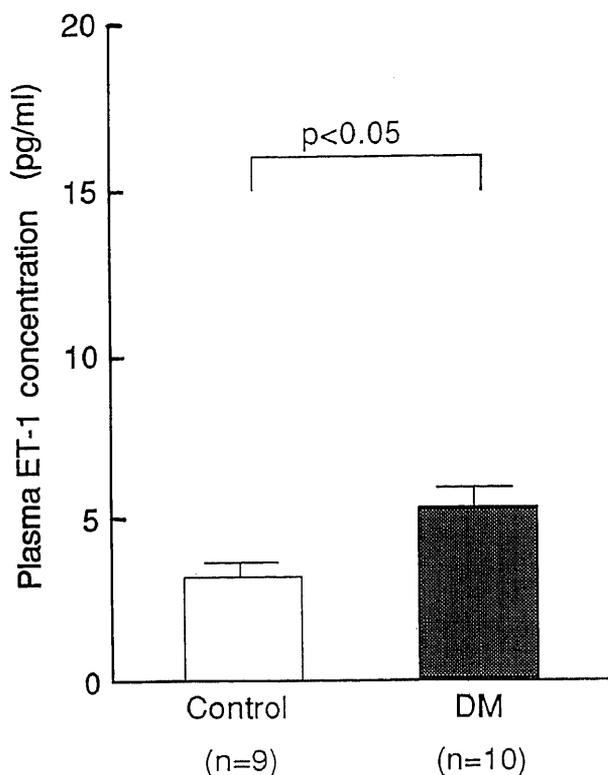


Fig. 2. Plasma ET-1 concentration in control and diabetic rats. To induce diabetes, STZ was injected to rats via the tail vein. Control rats received only the equivalent vehicle. Two days after the injection of STZ, the plasma glucose level was determined by the glucose oxidase method using blood samples obtained from the tail vein. Diabetic rats with plasma glucose level higher than 300 mg/dl were used in these experiments, which were carried out eight weeks after the STZ injection. Mesenteric arteries and prepared for perfusion. At the same time, blood samples were obtained from the aorta. Plasma ET-1 concentration was measured by radioimmunoassay after extraction. Each column represents mean \pm S.E.M.

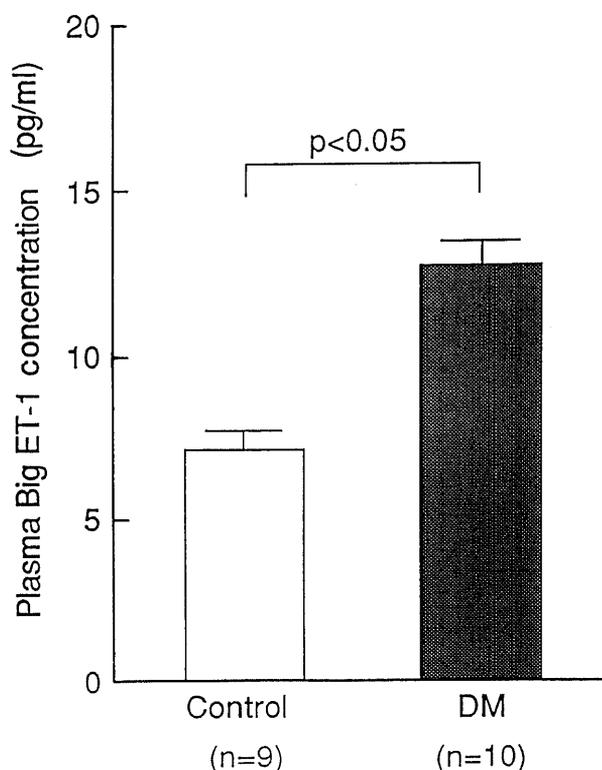


Fig. 3. Plasma big ET-1 concentration in control and diabetic rats. The experimental procedures were as described in the legend of Fig. 2. Plasma big ET-1 concentration was measured by radioimmunoassay after extraction. Each column represents mean \pm S.E.M.

Table 1. Body weight, systolic blood pressure, heart rate and blood glucose level of control and diabetic rats

Group	Body weight (g)	Blood pressure (mmHg)	Heart rate (bpm)	Blood glucose level (mg/dl)
Control (n=9)	307 \pm 2	116 \pm 3	412 \pm 10	142 \pm 13
DM (n=10)	268 \pm 7*	145 \pm 5*	402 \pm 8	489 \pm 19*

All values represent mean \pm S.E.M.

* $p < 0.05$ VS. the control by Wilcoxon t-test. DM, diabetic rats.

バック ODP50 (粒径, 5 μ m) (旭化成工業, 東京) を使用した。移動相には, 0.05% トリフルオロ酢酸 (trifluoroacetic acid, TFA) (和光純薬) を含むアセトニトリル (acetonitrile) (和光純薬) を用いて30分間で 20% から 50% のとなる直線的濃度勾配を設定し, 流速 1.0ml/分で溶出した。溶媒は, すべて液体クロマトグラフィー用 (和光純薬) を使用した。溶出液はフラクション・コレクター FRAC-100 型 (Pharmacia) にて 1分間毎に採取し, 各分画を Sep-C 18カラム (Waters Associates) で抽出し, ラジオイムノアッセイにて ET-1, b-ET-1 を測定した。

VI. 統計学的検定法

測定値は, 平均値 \pm 標準誤差で示した。平均値の有意差検定は Wilcoxon-t 検定を用い, 血圧の変化は ANOVA 法により解析した。危険率 $p < 0.05$ を有意差ありと判定した。

成 績

I. 腸間膜動脈灌流実験について

1. 各群における基礎値 (表 1)

体重は対照 (Control, C) 群 307 \pm 2g に比して糖尿病 (diabetes mellitus, DM) 群 252 \pm 9g と有意に低下していた ($p < 0.05$)。

血圧は C 群 116 \pm 3mmHg に対して DM 群 145 \pm 5mmHg と有意に上昇していた ($p < 0.05$)。

心拍数は C 群 412 \pm 10bpm, DM 群 402 \pm 8bpm であり両群間に有意差は認められなかった。

血糖値は C 群 142 \pm 13mg/dl に対して DM 群 489 \pm 19mg/dl と有意に上昇していた ($p < 0.05$)。

2. 血漿 ET-1 濃度および血漿 b-ET-1 濃度 (図 2, 図 3)

血漿 ET-1 濃度は C 群 3.2 \pm 0.3pg/ml に対して DM 群 5.1 \pm 0.6pg/ml と有意に上昇していた ($p < 0.05$)。

同様に, 血漿 b-ET-1 濃度も C 群 7.1 \pm 0.4pg/ml に比して DM 群 12.7 \pm 0.6pg/ml と有意に上昇していた ($p < 0.05$)。

3. 腸間膜動脈における ET-1 および b-ET-1 生産量 (図 4, 図 5)

単位時間あたりの腸間膜動脈の ET-1 生産量は C 群 14.1 \pm 1.2pg/hr に対して DM 群 24.3 \pm 3.6pg/hr と有意に上昇していた ($p < 0.05$)。

同様, b-ET-1 生産量に関しても C 群 25.4 \pm 2.0pg/hr に対して DM 群 42.5 \pm 2.8pg/hr と有意に産生増加を認めた ($p < 0.05$)。

4. 血漿濃度および腸間膜動脈生産量における b-ET-1 に対する ET-1 の比

血漿 b-ET-1 濃度に対する血漿 ET-1 濃度の比は対照群 0.42 \pm 0.02, 糖尿病群 0.40 \pm 0.03 であり両群間に有意差を認めなかった。ET-1 と b-ET-1 の腸間膜動脈からの産生量の比も対照群 0.51 \pm 0.04, 糖尿病群 0.55 \pm 0.02 であり両群間に有意差は認められなかった (表 2)。

5. ET-1 および b-ET-1 の同定

血漿および灌流液を HPLC を用いて検討したところ, 23分の合成 ET-1, および18分の合成 b-ET-1 に一致したピークが得られた (図 6)。

II. 糖尿病ラット血管内皮障害に対する ET_A レセプター拮抗剤, BQ-123 の影響について

1. 各群における基礎値 (表 3)

体重は BQ-123 投与群 268 \pm 7g に対して非投与群 252 \pm 9g

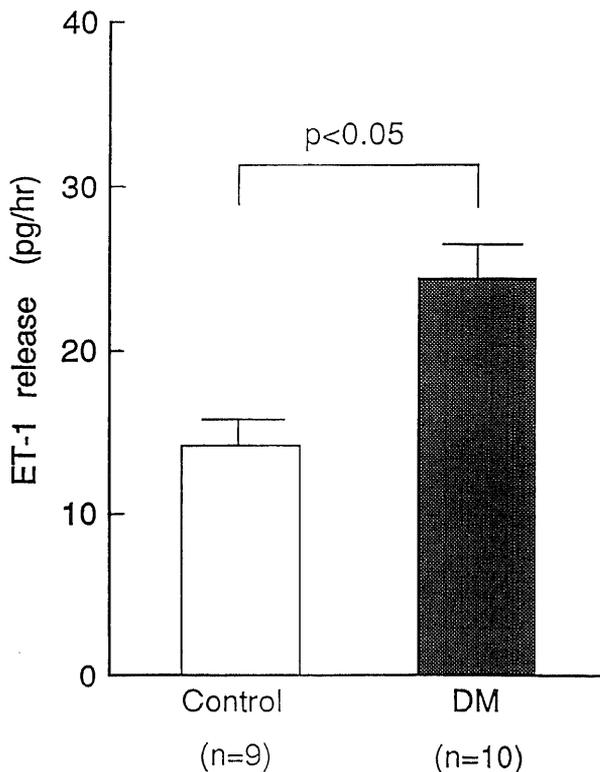


Fig. 4. ET-1 release from rat mesenteric arteries in control and diabetic rats. The methods of the experiments were as shown in Fig. 1. Each column represents mean \pm S.E.M.

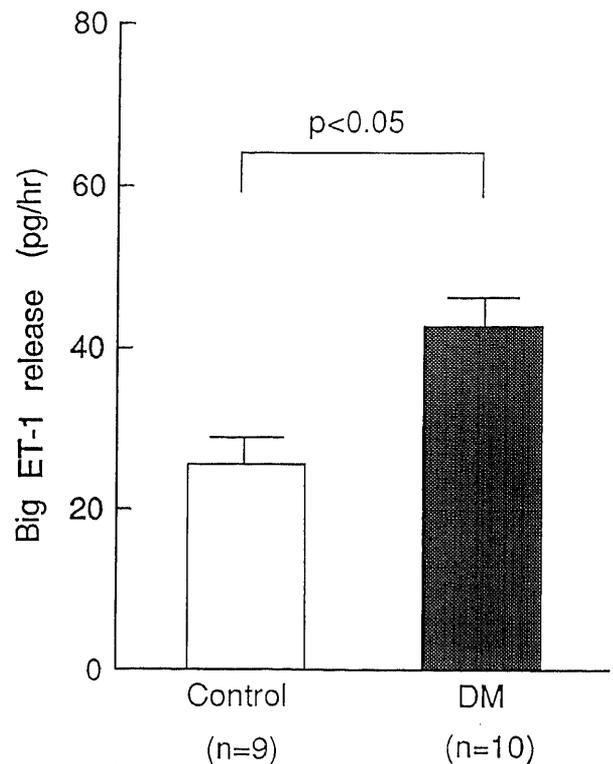


Fig. 5. Big ET-1 release from rat mesenteric arteries in control and diabetic rats. The methods of the experiments were as shown in Fig. 1. Each column represents mean \pm S.E.M.

と有意差を認めなかった。

血糖値は BQ-123 投与群 $388 \pm 14 \text{ mg/dl}$ 、非投与群 $372 \pm 12 \text{ mg/dl}$ であり、両群間に有意差は認めなかった。

BQ-123 投与群における血中 BQ-123 濃度は、 $5.7 \mu\text{g/ml}$ であり有効濃度と考えられた。血漿 ET-1 濃度は BQ-123 投与群において $8.9 \pm 0.2 \text{ pg/ml}$ であり、非投与群 $5.4 \pm 0.4 \text{ pg/ml}$ に対して有意に高値であった ($p < 0.05$)。

2. BQ-123 の血圧および心拍数に対する影響

Table 2. The ratio of plasma concentration of ET-1 to that of big ET-1 and the ratio of amount of release of ET-1 to that of big ET-1 from mesenteric arteries in control and diabetic rats

Group	P-ET-1/P-big ET-1	ET-1 release/big ET-1 release
Control (n=9)	0.42 ± 0.02	0.51 ± 0.04
Diabetic rats (n=10)	0.40 ± 0.03	0.55 ± 0.02

All values represent mean \pm S.E.M. There is no significant difference in the both ratios between control and diabetic rats. P-ET-1, plasma concentration of ET-1; P-big ET-1, plasma concentration of big ET-1.

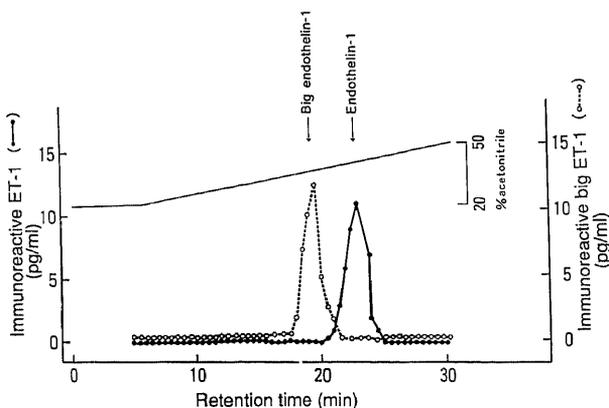


Fig. 6. High performance liquid chromatography (HPLC) profile of immunoreactive ET-1 and big ET-1 in the perfusate of rat mesenteric arteries. Asahi pak ODP 50 column was used. The solvent was a linear gradient of 20–50% acetonitrile in 0.05% trifluoroacetic acid, which was applied over a period of 30 minutes at a flow rate of 1 ml/min. The elution positions of standard ET-1 and big ET-1 are shown by the arrows. Retention time of standard ET-1 and big ET-1 were 23 and 18 minutes, respectively.

Table 3. Body weight, systolic pressure, heart rate, blood glucose level and plasma ET-1 concentration in diabetic rats treated with BQ-123 and mock-treated diabetic rats

Group	Body weight (g)	Blood pressure (mmHg)	Heart rate (bpm)	Blood glucose level (mg/dl)	P-ET-1 (pg/ml)
Diabetic control (n=8)	252 ± 9	141 ± 7	406 ± 6	372 ± 12	5.4 ± 0.4
BQ-123 rats (n=10)	268 ± 7	$104 \pm 8^*$	408 ± 4	388 ± 14	$8.9 \pm 0.2^*$

All values represent mean \pm S. E. M.

* $p < 0.05$ VS. the control by Wilcoxon t-test. P-ET-1, plasma ET-1 concentration.

血圧は BQ-123 投与前までは両群間に有意差はなく、1週間投与後では、投与群 $104 \pm 8 \text{ mmHg}$ に比して非投与群 $141 \pm 7 \text{ mmHg}$ と有意に低下した ($p < 0.05$)。心拍数は BQ-123 投与群 $408 \pm 4 \text{ bpm}$ に対して非投与群 $406 \pm 6 \text{ bpm}$ であり両群間に有意差を認めなかった (表 3, 図 7)。

3. Ach, および NG に対する拡張反応

Ach, および NG に対する拡張反応を図 8, 9 に示す。拡張反応は灌流圧に対する圧低下の度合い (パーセント表示) で表した。

NG に対する拡張反応は NG 10^{-7} M 投与に対して非投与群 $11 \pm 2\%$ 、投与群 $15 \pm 4\%$ 、NG 10^{-6} M に対して非投与群 $15 \pm 2\%$ 、投与群 $17 \pm 3\%$ 、NG 10^{-5} M に対して非投与群 $28 \pm 4\%$ 、投与群 $30 \pm 5\%$ 、NG 10^{-4} M に対して非投与群 $30 \pm 5\%$ 、投与群 $33 \pm 8\%$ であり、両群ともに濃度依存性に拡張反応は増大し、NG 各濃度における拡張反応は両群間に有意差は認めなかった。Ach に対する拡張反応は Ach 10^{-8} M に対して非投与群 $15 \pm 2\%$ 、投与群 $22 \pm 2\%$ 、Ach 10^{-7} M に対して非投与群 $19 \pm 4\%$ 、投与群 $26 \pm 5\%$ 、Ach 10^{-6} M に対して非投与群 $29 \pm 6\%$ 、投与群 $48 \pm 5\%$ 、Ach 10^{-5} M に対して非投与群 $37 \pm 7\%$ 、投与群 $55 \pm 8\%$ であり、両群ともに濃度依存性に拡張

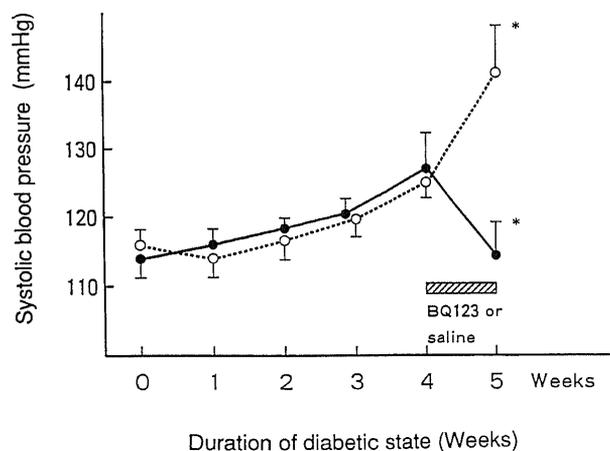


Fig. 7. The effect of ET_A receptor antagonist, BQ-123 on blood pressure in diabetic rats. Diabetes was induced in rats by injection of STZ. Four weeks after the injection, BQ-123 or saline (mock-treated) was administered to the diabetic rats by osmotic pump over a week. Systolic blood pressure was determined by the tail-cuff method. Closed and open circles show the blood pressure of the diabetic rats treated with BQ-123, and that of mock-treated diabetic rats, respectively. * $p < 0.05$ VS. 4 weeks rats. Vertical bars indicate mean \pm S.E.M.

張反応は増大したが、Ach に対する拡張反応は低濃度 (10^{-8} M, 10^{-7} M) においては両群間に有意差は認めなかったが、高濃度 (10^{-6} M, 10^{-5} M) においては BQ-123 非投与群の拡張反応は有意に低下していた ($p < 0.05$)。その際の灌流液中の

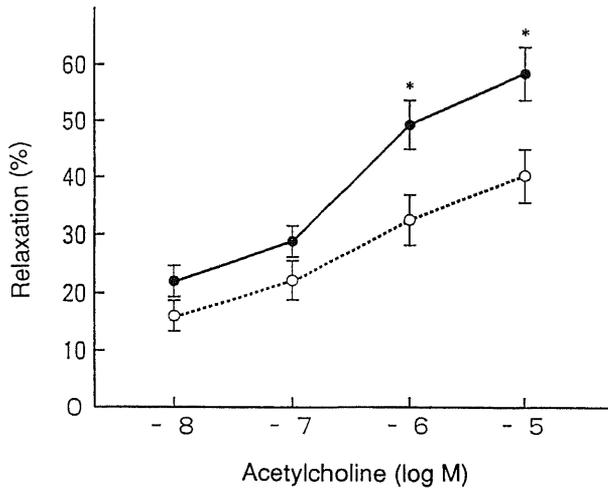


Fig. 8. The relaxation response to acetylcholine (Ach) in diabetic rats treated with BQ-123 or saline. BQ-123-treated, or mock-treated diabetic rats were prepared as described in Fig. 7. Five weeks after the injection of STZ, mesenteric arteries were excised and perfused with Krebs-Ringer solution containing 0.1 M noradrenaline. Peak decreases in the perfusion pressure of precontracted mesenteric arteries were measured on infusion of various concentration of Ach and evaluated as the relaxation response to Ach. Closed and open circles show the relaxation response of BQ-123 rats and diabetic controls, respectively. * $p < 0.05$ VS. diabetic controls. Vertical bars indicate mean \pm S.E.M.

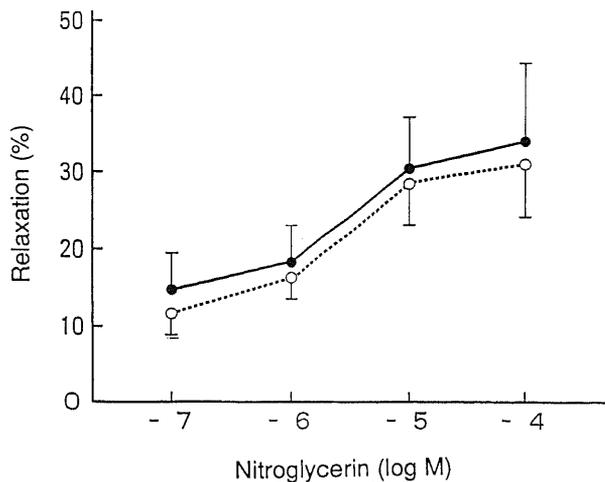


Fig. 9. The relaxation response to nitroglycerin in the diabetic rats treated with BQ-123 or saline. The methods of excision and perfusion of mesenteric arteries were described in the legend of Fig. 8. Peak decreases in the perfusion pressure of precontracted mesenteric arteries were measured on infusion of various concentration of nitroglycerin and evaluated as the relaxation response to nitroglycerin. Closed and open circles show the relaxation response of BQ-123 rats and diabetic controls, respectively. * $p < 0.05$ VS. diabetic controls. Vertical bars indicate mean \pm S.E.M.

cGMP 量も同様の結果であり、Ach 低濃度 (10^{-8} M, 10^{-7} M) では両群間に有意差を認めなかったが、高濃度 (10^{-6} M, 10^{-5} M) では両群間に有意差を認め、Ach 10^{-6} M 投与時の灌流液中の cGMP 量は BQ-123 投与群 34.4 ± 0.9 fmol/min/kg, 非投与群 22.5 ± 1.3 fmol/min/kg であり投与群で有意に高値を示した ($p < 0.05$)。

考 察

ET は、1988年、Yanagisawa らによって培養血管内皮細胞上清より単離、同定された21個のアミノ酸よりなる血管内皮由来収縮ペプチドである⁷⁾。その作用は、アンジオテンシン II (angiotensin II, ANG II) やバゾプレッシン (vasopressin, AVP) に比し、モル比で10倍以上強力で、即知の血管収縮物質のなかで最も強力である。また、その作用時間も長く、抽出血管系で数時間におよぶことが知られており、血管トーンスの調節に関与していると考えられている^{22)~25)}。今日、その DNA 解析により ET には構造と薬理活性の異なる3種のアイソペプチドが存在し、それぞれ、ET-1, ET-2, ET-3, と命名されている⁸⁾。ET は内皮より単離、同定されたが、その産生部位は血管内皮のみならず、神経細胞²⁶⁾²⁷⁾や尿細管上皮細胞²⁸⁾など多くの細胞で産生が確認されている。血管内皮で合成、分泌される ET は主に ET-1 と考えられている。ET の標的臓器である血管平滑筋細胞においても ET-1 の mRNA の発現が認められること

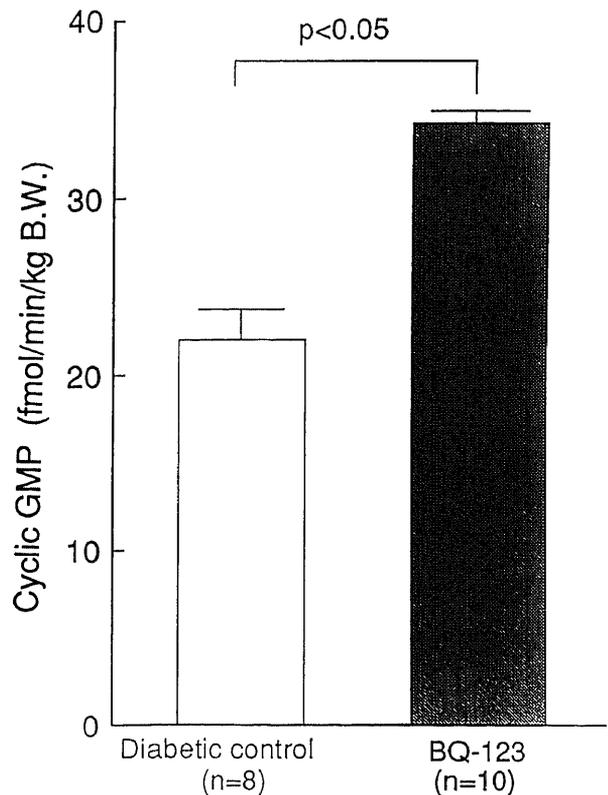


Fig. 10. Cyclic GMP release induced by 10^{-6} M acetylcholine from mesenteric arteries of the diabetic rats treated with BQ-123 or saline. The methods of excision and perfusion of mesenteric arteries were described in the legend of Fig. 8. After beginning of the infusion of acetylcholine, effluents from mesenteric arteries were collected at 3 min. to determine their cGMP level. Each column represents mean \pm S.E.M.

が報告されている²⁹⁾³⁰⁾。今回、血漿及び腸間膜動脈灌流液を HPLC を用いて検討したが合成 ET-1、および b-ET-1 に一致した単一ピークが得られたことは血液中、および灌流液中にこれらのペプチドが存在することを示唆するものであり、また血管内皮より合成、産生される ET は主に ET-1 であることが確認された。

外因性に ET-1 を投与した場合、摘出血管標本ではその ED50 は 10^{-10} M 程度であり、生体投与の実験からも 10^{-10} mol/kg と考えられる⁷⁾²³⁾²⁴⁾。一方、ヒトにおいて血中 ET-1 濃度を測定した成績では正常人で 1.5–4 pg/ml (0.6–1.6 pmol/l) に対し³¹⁾³²⁾、様々な疾患、病態によって血中 ET-1 濃度の上昇が報告されている^{12)13)33)–44)}。しかし、その濃度は正常の数倍程度に留まる。正常人血中 ET-1 濃度の 10^{-12} M は血管収縮を引き起こすには生理的にも不十分な量であり、更に血中における ET-1 の生物学的半減期は 3.6 分と短い⁴⁵⁾。これらの成績に基づけば血管内皮より分泌された ET-1 は循環ホルモンとしての作用は少なく、内皮細胞近傍に存在する血管平滑筋に対してパラクリンあるいは内皮細胞自身にオートクリンとして局所で作用していると想定される。実際、臨床的には ET のその強力な血管収縮作用に注目して本態性高血圧患者における血中 ET-1 濃度に関する検討がなされているが、Shichiri ら³³⁾、Saito ら³⁴⁾、Kohno ら³⁵⁾ は、正常対照群に比し本態性高血圧群で 1.6–2 倍程度有意に血中 ET-1 濃度が上昇していたと報告している一方、Miyachi³⁶⁾、Predel³⁷⁾、Davenport³⁸⁾、Schiffman ら³⁹⁾、Naruse ら⁴⁰⁾ は、高血圧症例と対照群には有意差は認めなかったと報告している。しかし、高血圧症に伴う臓器障害の重症度と血中 ET-1 濃度の間には正の相関があることが報告されている³⁴⁾⁴⁰⁾。従って軽度の高血圧症ではたとえ局所 ET-1 産生が増加していたとしても血中 ET-1 濃度には反映されることはなく、高血圧症の進展に伴い臓器障害が進行すると局所 ET-1 産生量が増加し血中 ET-1 濃度が上昇すると考えられる。血中 ET-1 濃度は血管内皮より分泌された量を反映していると考えられるが、ET-1 のような局所ホルモンの産生量を定量的に評価する手段としては既報の腸間膜動脈灌流実験方法が有用であった。

臨床面では、高血圧症以外にも、動脈硬化症⁴¹⁾、肺高血圧⁴²⁾、腎不全⁴³⁾、心筋梗塞⁴⁴⁾、ショック状態⁴⁵⁾などの病態で血中 ET-1 濃度が上昇することが報告されており、その病因的意義が注目されている。著者は、ET-1 は高血圧というシヤストレスだけではなくその血管内皮への傷害が刺激となり ET-1 産生が増加すると考えている。

今回、血管内皮由来である ET-1、および b-ET-1 に関してラット糖尿病モデルにおいて血漿濃度を、また局所でのそれぞれのペプチド産生量を評価する方法として腸間膜動脈灌流実験法を用いた。HPLC を用いた検討より ET-1、および b-ET-1 が血中及び灌流液中に存在することが示唆された。ラット糖尿病モデルは STZ にて作製 8 週後のものを用いたが、糖尿病群の体重が正常対照群に比べ低下していたことは糖尿病により異化作用がかなり亢進した状態であったこと示唆する。この時期には既に心血管系には組織学的変化が生じているとの報告もあり血管内皮傷害もかなり進展していると考えられる⁴⁶⁾⁴⁷⁾。本実験で ET-1、および b-ET-1 の腸間膜動脈からの産生量のみならず血漿 ET-1、および b-ET-1 濃度が正常対照群に比べ糖尿病群において増加していたことはかなりの血管内皮傷害の存在を示唆する。実験結果を ET-1 の有する血管収縮作用、および細胞増

殖作用⁴⁸⁾の面から考察すると、血管内皮傷害によって増加した ET-1 は更にその傷害を進展させるという悪循環を生じていることが推測され、糖尿病における血管障害の進展に果たす ET-1 の意義が極めて重要であると考えられる。臨床上、糖尿病患者にしばしば高血圧が合併する事は知られているがその機序は不明な点が多い。今回の検討で強力な血管収縮物質である ET-1 の産生量が糖尿病群において対照群より増加しており、また、糖尿病群で血圧の有意な上昇がみとめられたことは糖尿病に伴う高血圧発症に ET-1 が関与している可能性を示唆する。

高血糖自体が ET 産生を亢進させる可能性に関しては血糖値と ET 産生量との間には有意な相関は得られなかった。また、糖尿病作製直後のラットを用い腸間膜動脈からの ET-1 産生量についても検討したが高血糖にもかかわらず腸間膜動脈からの ET-1 産生量は対照群と差は認めなかった。Takahashi ら¹²⁾も高血糖が ET-1 産生を刺激しないことを報告している。ET-1 産生は動脈硬化に関わる諸因子で亢進することが報告されている。血管組織の低酸素状態は動脈硬化の原因と成りうるが、この低酸素状態は ET-1 の mRNA の発現を亢進させる⁴⁹⁾。シヤストレスも動脈硬化部位で発生し更に動脈硬化を進展させるが、このシヤストレスは内皮細胞において ET-1 mRNA の発現、および ET-1 の分泌を亢進する⁵⁰⁾。また動脈硬化病変においては血栓形成状態が認められるが、その血栓形成に関与するトロンビンや血小板、およびその中に多量に存在するトランスフォーミング成長因子 (transforming growth factor β , TGF β) も内皮細胞における ET-1 mRNA の発現を誘導し、ET-1 の産生を促進させる⁷⁾⁵¹⁾⁵²⁾。その他、ET-1 mRNA の発現誘導因子としてサイトカインであるインターロイキン-1 (interleukin-1, IL-1) があるが⁵³⁾、これは動脈硬化進展の主役の一つであるマクロファージより分泌される。これらの ET-1 の産生刺激因子は内皮細胞の受容体に結合し、セカンドメッセンジャー (second messenger) によって情報が細胞核内に伝達され、活性化された DNA 結合性蛋白が ET-1 遺伝子発現調節領域の cis 配列に結合し、mRNA の転写を促進すると考えられている。

ET-1 は、アミノ酸 203 残基からなる pp-ET-1 を前駆体とし、これがエンドペプチダーゼによって切断され、まずアミノ酸 39 残基よりなる b-ET-1 が生成する。b-ET-1 は ECE により活生ペプチド ET-1 に変換される⁸⁾。ECE 活性が亢進すれば ET-1 の産生が亢進することが考えられるが、現在この変換酵素の同定はされておらず、今日、この酵素活性を直接測定することは困難である。しかし、ET-1/big ET-1 比は変換酵素活性をある程度反映する。今回の検討では血中及び灌流液中の ET-1/big ET-1 の値は対照群と糖尿病群で比べたが有意差を認めず、両群間で ECE の活性には差がないと考えられる。

最近、ET 受容体に関し薬理的に少なくとも二種類のサブタイプに分類され、それらの cDNA もクローニングされている^{9)–11)}。それぞれ、ET_A 受容体、および ET_B 受容体と名づけられている。血管壁においては ET_A 受容体は血管平滑筋に、ET_B 受容体は血管内皮に存在し、それぞれの作用は血管収縮、および血管拡張である。Ihara ら¹⁴⁾は、バクテリアの一種より得られた生成物質から ET_A 受容体拮抗剤を精製した。その誘導体である BQ-123 は ET_A 受容体に特異的に作用する拮抗剤であり¹⁵⁾、血管収縮作用を低濃度阻害する他、細胞増殖に抑制的に作用することが期待される。

血管内皮には以前より弛緩因子も存在することが報告されていたが⁵⁴⁾、近年、この物質が一酸化窒素 (nitrogen monoxide, NO) あるいは NO 関連物質であることが明らかにされた⁵⁵⁾。この血管内皮由来弛緩因子 (endothelium-derived relaxing factor, EDRF) は Ach によって血管内皮より遊離され、血管平滑筋において cGMP の産生を刺激し平滑筋を拡張させる。一方、NG は血管拡張作用を有するが、これは Ach と異なり血管内皮非依存性である。Ach により血管弛緩反応は、高血圧症や動脈硬化症においては減弱している⁵⁶⁾。その機序として ET-1 産生亢進による血管の緊張、または EDRF の産生能の低下が想定されており、糖尿病においても同様な病態が考えられる。今回、STZ 糖尿病モデルのラットを用い、ET_A 受容体拮抗剤投与による血圧、および血管内皮の障害程度の評価として Ach 投与における灌流圧低下度とその際に生成される cGMP の量を測定した。前述したように STZ 糖尿病ラットでは糖尿病作製 8 週後では既に組織学的変化が心血管系にみられている。

BQ-123 投与群の投与 1 週後の BQ-123 濃度は 5.7 μg/dl と有効濃度に達しており、BQ-123 投与群の血圧が非投与群に比して有意に低下したことは、この ET_A 受容体拮抗薬、BQ-123 は降圧薬として作用をもつと考えられる。同量の ET-A 受容体拮抗剤の前投与により STZ-DM ラットにおける血圧上昇を防止することができたことは、糖尿病における高血圧の発症及び進展に ET が関与していることを示す成績である。BQ-123 投与群と非投与群において、NG による血管内皮依存性の血管拡張反応には両群間に有意差は認められなかったが、Ach による血管内皮依存性の血管拡張反応は BQ-123 投与群よりも非投与群において低下が認められた。その拡張反応時に生成される cGMP も BQ-123 投与群に比して非投与群で低下していた。これらの結果より、ET_A 受容体拮抗剤、BQ-123 は糖尿病における血管内皮傷害の進行を阻害すると考えられた。今後、糖尿病の血管合併症である網膜症、腎症、脳血管障害、心筋梗塞等の発症防止における ET_A 受容体拮抗剤の臨床的応用が期待される。

結 論

雄性ウイスターラットに STZ を投与し糖尿病モデル (STZ-DM) ラットを作製、その血圧、血漿 ET-1, b-ET-1 濃度、および腸間膜動脈灌流液中の ET-1, b-ET-1 産生量を測定した。更に ET_A 受容体特異的拮抗剤である BQ-123 を同糖尿病モデルに投与し、その血圧に及ぼす影響を検討した。更にその腸間膜動脈標本を用い Ach 負荷時の血管弛緩反応を灌流圧低下度、および灌流液中に生成される cGMP 量にて評価検討し、以下の結論を得た。

1. STZ-DM ラットは、正常対照ラットに比して血漿 ET-1, b-ET-1 濃度が高値であり、また腸間膜動脈におけるそれらの産生量も増加していた。よって糖尿病においては ET-1 産生が亢進していると考えられた。

2. STZ-DM ラットにおいて有意な血圧の上昇がみられた。STZ-DM ラットにおいて血管収縮ペプチドである ET-1 産生が亢進していることより、また ET-A 受容体拮抗剤により血圧上昇を阻止できることより、糖尿病における高血圧の合併には ET-1 の関与が想定された。

3. ET-A 受容体拮抗剤の投与により糖尿病ラット腸間膜動脈における血管内皮依存性血管弛緩反応の低下を阻止すること

が可能であった。

以上の成績より、糖尿病の合併症の進展には ET-1 産生亢進が関与しており、その防止に ET_A 受容体拮抗剤が有用と考えられた。今後、同拮抗剤の臨床的応用が期待される。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導と御校閲を賜りました金沢大学第二内科竹田亮祐教授に深謝致します。また終始直接御指導、御助言頂きました金沢大学第二内科宮森勇講師ならびに金沢大学医療短期大学武田仁勇講師、研究に御協力頂きました第二内科内分泌、高血圧研究グループ、および教室員の皆様へ感謝致します。さらにエンドセリン A 受容体拮抗剤、BQ-123 を御提供いただいた萬有製薬中央研究所、矢野光夫博士に深く感謝致します。

なお、本論文の要旨の一部は第64回日本内分泌学会学術総会、第56回日本循環器学会学術集会および第15回日本高血圧学会総会において発表された。

文 献

- 1) Porta, M., Townsend, C. & Clover, G. M.: Evidence for functional endothelial cell damage in early diabetic retinopathy. *Diabetologia*, 20, 597-601 (1981).
- 2) Crreras, L. O., Chamone, D. A. F., Klerckx, P. & Vermeylen, J.: Decreased vascular prostacyclin (PGI₂) in diabetic rats. Stimulation of PGI₂ release in normal and diabetic rats by the antithrombotic compound Bay g 6375. *Thromb Res.*, 19, 663-670 (1980).
- 3) Jennings, P. E., Chirico, S., Jones, A. F., Lunec, J. & Barnet, A. H.: Vitamin C metabolites and microangiopathy in diabetes mellitus. *Diabetes Res.*, 6, 151-154 (1987).
- 4) Hanssen, K. F., Dhal-Joregensen, K., Lauritzen, T., Feldt-Ramussen, B., Brinchmann-Hansen, & Deckert, T.: Diabetic control and microvascular complications; the nearnormoglycaemic experience. *Diabetologia*, 29, 677-684 (1986).
- 5) Fuller, J. H., Keen, H. & Jarrett, R. J.: Haemostatic variables associated with diabetes and its complications. *Br. Med. J.*, 2, 964-966 (1979).
- 6) Almer, L. O., Pandolfi, M. & Nilsson, I. M.: Diabetic retinopathy and the fibrinolytic system. *Diabetes.*, 24, 529-534 (1975).
- 7) Yanagisawa, M., Kurihara, S. & Kimura, S.: A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature*, 332, 411-415 (1988).
- 8) Inoue, A., Yanagisawa, M. & Kimura, S.: The human endothelin family-three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 86, 2863-2867 (1989).
- 9) Miyazaki, H.: Affinity labelling of endothelin receptor and characterization of solubilized endothelin-receptor complex. *Eur. J. Biochem.*, 187, 125-129 (1990).
- 10) Sakurai, T., Yanagisawa, M., Takuwa, Y., Miyazaki, H., Kimura, S., Goto, K. & Masaki, T.: Cloning of a cDNA encoding a nonisopeptide-selective subtype of endothelin receptor. *Nature*, 348, 732-735 (1990).
- 11) Arai, H., Hori, S., Aramori, I., Ohkubo, H. &

- Nakanishi, S.: Cloning and expression of a cDNA encoding an endothelin receptor. *Nature*, **348**, 730-732 (1990).
- 12) Takahashi, K., Ghatei, M. A., Lam, H. C., O'Halloran, D. J. & Bloom, S. R.: Elevated plasma endothelin in patients with diabetes mellitus. *Diabetologia*, **33**, 306-310 (1990).
- 13) Takeda, R., Morise, T., Takeda, Y., Miyamori, I. & Yoneda, T.: Significance of increased plasma endothelin-1 (ET-1) as a marker of diabetic angiopathy. In G. Mimura & C. Zhiseng (eds.), *Recent Progress of Diabetes Mellitus in East Asia*, 1st ed., p171-173, Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam, 1992.
- 14) Ihara, M., Fukuroda, T., Saeki, T., Nisikibe, M. & Kojiri, K.: An endothelin receptor (ET_A) antagonist isolated from *Streptomyces misakiensis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **178**, 132-137 (1991).
- 15) Ihara, M., Noguchi, K., Saeki, T., Fukuroda, T., Tsuchida, S., Kimura, S., Fukami, T., Ishikawa, K., Nishikibe, M. & Yano, M.: Biological profiles of highly potent novel endothelin antagonists selective for the ET_A receptor. *Life Sci.*, **50**, 247-255 (1992).
- 16) Eguchi, T., Hirata, Y., Ihara, M., Yano, M. & Marumo, F.: A novel ET_A antagonist (BQ-123) inhibits endothelin-1-induced phosphoinositide breakdown and DNA synthesis in rat vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett.*, **302**, 243-246 (1992).
- 17) McGregor, D. D.: The effect of sympathetic nerve stimulation on the vasoconstrictor responses in perfused mesenteric blood vessels of the rat. *J. Physiol. Lond.*, **177**, 21-30 (1965).
- 18) Miyamori, I., Yasuhara, S., Ikeda, M., Koshida, H., Takeda, Y., Morise, T. & Takeda, R.: Effect of sodium intake on prostacyclin generation in rabbit mesenteric artery. *Jap. Cir. J.*, **47**, 1216-1220 (1983).
- 19) Miyamori, I., Yasuhara, S., Ikeda, M., Koshida, H., Takeda, Y., Morise, T., Nagai, K., Okamoto, S. & Takeda, R.: Participation of experimental glucocorticoid hypertension in rats. *Clin. Exp. Hypert.*, **A7**, 513-524 (1985).
- 20) Miyamori, I., Matubara, T., Takeda, Y., Koshida, H., Soma, R. & Takeda, R.: Angiotensin II generation in mesenteric artery in rats: Effects of nephrectomy, deoxycorticosterone and dexamethasone. *Endocrinol. Japon.*, **37**, 9-17 (1990).
- 21) Miyamori, I., Takeda, Y., Yoneda, T. & Takeda, R.: Endothelin release from the mesenteric arteries in spontaneously hypertensive rats. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **17** (Suppl. 7), S408-S410 (1991).
- 22) Brain, S., Tippins, J. R. & Williams, T. J.: Endothelin induces potent microvascular constriction. *Brit. J. Pharmacol.*, **95**, 1005-1007 (1988).
- 23) Miyamori, I., Itoh, Y., Matubara, T., Koshida, H. & Takeda, R.: Systemic and regional effects of endothelin in rabbits; Effect of endothelin antibody. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, **17**, 691-696 (1990).
- 24) Miyauchi, T.: Characteristics of pressor response to endothelin response in spontaneously hypertensive and Wistar-Kyoto rats. *Hypertension*, **14**, 427-434 (1989).
- 25) Fukuda, Y., Hirata, Y. & Yoshimi, H.: Endothelin is a potent secretagogue for atrial natriuretic peptide in cultured rat atrial myocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **155**, 167-172 (1988).
- 26) Giaid, A., Gibson, S. J., Herrero, M. T., Gentleman, S., Legon, S., Yanagisawa, M., Masaki, T., Ibrahim, N. B. N., Roberts, G. W., Rossi, M. L. & Polak, J. M.: Topographical localisation of endothelin mRNA and peptide immunoreactivity in neurons of the human brain. *Histochemistry*, **95**, 303-314 (1991).
- 27) MacCumber, M. W., Ross, C. A. & Snyder, S. H.: Endothelin in brain; Receptors, mitogenesis and biosynthesis in glial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **85**, 9797-9800 (1988).
- 28) Ziedel, M. L., Brady, H. R., Kone, B. C., Gullans, S. R. & Brenner, B. M.: Endothelin, a peptide inhibitor of Na-K-ATPase in intact renal tubular cells. *Am. J. Physiol.*, **257**, C1101-C1107 (1989).
- 29) Hahn, A. W. A., Resink, T. J., Scott-Burden, T., Powell, J., Dohi, Y. & Buhler, F. R.: Stimulation of endothelin mRNA and secretion in rat vascular smooth muscle cells; a novel autocrine function. *Cell Regul.*, **1**, 649-659 (1990).
- 30) Takeda, Y., Itoh, Y., Yoneda, T., Miyamori, I. & Takeda, R.: Cyclosporine A induces endothelin-1 release from cultured rat vascular smooth muscle cells. *Eur. J. Pharmacol.*, **233**, 299-301 (1993).
- 31) Ando, K., Hirata, Y., Shichiri, M., Emori, T. & Marumo, F.: Presence of immunoreactive endothelin in human plasma. *FEBS Lett.*, **245**, 164-166 (1989).
- 32) Suzuki, N., Matumoto, H., Kitada, C., Masaki, T. & Fujino, M.: A sensitive sandwich-enzyme immunoassay for human endothelin. *J. Immunol. Methods.*, **118**, 245-250 (1989).
- 33) Shichiri, M., Hirata, Y., Ando, K., Emori, T., Ohta, K., Kimoto, S., Ogura, M., Inoue, A. & Marumo, F.: Plasma endothelin levels in hypertension and chronic renal failure. *Hypertension*, **15**, 493-496 (1990).
- 34) Saito, Y., Nakano, K., Mukoyama, M. & Imura, H.: Increased plasma endothelin level in patients with essential hypertension. *N. Engl. J. Med.*, **322**, 205 (1990).
- 35) Kohno, M., Yasunari, K., Murakawa, K., Yokokawa, K., Horio, T., Fukui, T. & Takeda, T.: Plasma immunoreactive endothelin in essential hypertension. *Am. J. Med.*, **88**, 614-648 (1990).
- 36) Miyauchi, T.: Venous plasma concentration of endothelin in normal and hypertensive subjects. *Circulation*, **80** (Suppl. II), 573 (1989).
- 37) Predel, H. G.: Plasma concentration of endothelin in patients with abnormal vascular reactivity. *Life Sci.*, **47**, 1837-1843 (1990).

- 38) Davenport, A. P.: A sensitive radioimmunoassay measuring endothelin-like immunoreactivity in human plasma; comparison of levels of patients with essential hypertension and normotensive control subjects. *Clin. Sci.*, **78**, 261-264 (1990).
- 39) Schiffrin, E. L. & Thibault, G.: Plasma endothelin in essential hypertension. *Am. J. Hypertens.*, **4**, 303-308 (1991).
- 40) Naruse, M., Kawana, M., Hifumi, S., Naruse, K., Yoshihara, I., Oka, T., Kato, Y., Monzen, C., Kurimoto, F., Ohsumi, F., Hosoda, S. & Demura, H.: Plasma immunoreactive endothelin, but not thrombomodulin, is increased in patients with hypertension and ischemic heart disease. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **17** (Suppl. 7), S471-S474 (1991).
- 41) Lerman, A., Edwards, B. S., Hallett, J. W., Heublein, D. M., Sandberg, S. M. & Burnett, Jr. J. C.: Circulating and tissue endothelin immunoreactivity in advanced atherosclerosis. *New Engl. J. Med.*, **325**, 997-1001 (1991).
- 42) Stewart, D. J., Levy, R. D., Cernacek, P. & Langleben, D.: Increased plasma endothelin-1 in pulmonary hypertension, marker or mediator of disease? *Ann. Int. Med.*, **114**, 646 (1991).
- 43) Miyauchi, T. & Yanagisawa, M.: Increased plasma concentrations of endothelin-1 and big endothelin-1 in acute myocardial infarction. *Lancet*, **2**, 53-54 (1989).
- 44) Cernacek, P. & Stewart, D. J.: Immunoreactive endothelin in human plasma, Marked elevations in patients in cardiogenic shock, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **161**, 562 (1989).
- 45) Vierhapper, H.: Effect of endothelin-1 in man. *Circulation*, **81**, 1415-1418 (1990).
- 46) Tahiliani, A. G. & McNeill, J. H.: Diabetes-induced abnormalities in the myocardium, *Life Sci.*, **38**, 959-974 (1986).
- 47) Nayler, W. G., Liu, J., Panagiotopoulos, S. & Casley, D. J.: Streptozotocin-induced diabetes reduced the density of [¹²⁵I]-endothelin binding sites in rat cardiac membrane, *Brit. J. Pharmacol.*, **97**, 993-996 (1989).
- 48) Hirata, Y., Takagi, Y., Fukuda, Y. & Marumo, F.: Endothelin is a potent mitogen for rat vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis*, **78**, 225-228 (1989).
- 49) Kourembanas, S., Marsden, P. A., McQuillan, L. P. & Faller, D. V.: Hypoxia induces endothelin gene expression and secretion in cultured human endothelium. *J. Clin. Invest.*, **88**, 1054-1057 (1991).
- 50) Yoshizumi, M., Kurihara, H., Sugiyama, T., Takaku, F., Yanagisawa, M., Masaki, T. & Yazaki, Y.: Hemodynamic shear stress stimulate endothelin production by cultured endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **161**, 859-864 (1989).
- 51) Ohlstein, E. H., Storer, B. L., Butcher, J. A., Debouck, C. & Feuerstein, G.: Platelets stimulate expression of endothelin mRNA and endothelin biosynthesis in cultured endothelial cells. *Circulation Res.*, **69**, 832-841 (1991).
- 52) Kurihara, H., Masaki, T., Hamaoki, M., Kato, H. & Yazaki, Y.: Transforming growth factor- β stimulates the expression of endothelin mRNA by vascular endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **159**, 1435-1440 (1989).
- 53) Yoshizumi, M., Kurihara, H., Morita, T., Yamashita, T., Ohhashi, Y., Sugiyama, T., Kakaku, F., Yanagisawa, M., Masaki, T. & Yazaki, Y.: Interleukin-1 increases the production of endothelin-1 by cultured endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **166**, 324-329 (1990).
- 54) Furchgott, R. F. & Zawadzki, J. V.: The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, **288**, 373-376 (1980).
- 55) Palmer, R. M., Ferrige, A. G. & Moncada, S.: Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*, **327**, 524-526 (1987).
- 56) Vanhooutte, P. M.: Endothelium and control of vascular function. *Hypertension*, **13**, 658-667 (1989).

A Study of the Role of Endothelin in the Pathogenesis of Diabetic Angiopathy in Streptozotocin-induced Diabetic Rats Takashi Yoneda, Department of Internal Medicine (II), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. J. J. Med. Soc., 103, 36—46 (1994)

Key words endothelin-1, big endothelin-1, diabetes mellitus, diabetic angiopathy, endothelin receptor antagonist (BQ-123)

Abstract

Angiopathy is one of the major complications of diabetes mellitus, and it has been considered that endothelial cell damage is an important cause of the angiopathy. Endothelin (ET)-1 is a potent vasoconstrictor peptide released from the endothelial cells and its release is stimulated by thrombin formation as well as by shear stress, resulting in atherogenic lesions. ET-1 also acts as a growth factor on the proliferation of the vascular smooth muscle cell. In various diseases associated with vasculoendothelial damages, including diabetes, plasma concentration of ET-1 is reported to increase and its pathological role has been examined. In order to clarify a possible pathogenetic role of ET-1 in diabetic angiopathy, the author used STZ-induced diabetic rats and carried out the following experiments: 1) measurement of plasma concentration of ET-1 and its precursor, big ET-1. 2) evaluation of ET-1 and big ET-1 release from rat mesenteric arteries. 3) evaluation of the effect of ETA receptor antagonist (BQ-123) on blood pressure. 4) examination of Ach-dependent vasodilatation and cGMP release of mesenteric arteries. The plasma level of ET-1 and big ET-1 in STZ-DM rats (5.1 ± 0.6 pg/ml, 12.7 ± 0.6 pg/ml) were significantly elevated as compared to those of controls (3.2 ± 0.3 pg/ml, 7.1 ± 0.4 pg/ml). The release rate of ET-1 and big ET-1 from mesenteric arteries of the diabetic rats (24.3 ± 3.6 pg/hr, 42.5 ± 2.8 pg/hr) were also significantly enhanced, as compared to those of controls. The systolic blood pressure of the diabetic rats was significantly higher than that of the controls. In contrast, it was not elevated when the diabetic rats were treated with ETA receptor antagonist (BQ-123). The Ach-dependent vasodilatation of mesenteric arteries and the cGMP release from them in the diabetic rats treated with BQ-123 were significantly greater than those of control diabetic rats. These findings suggest that the ET-1 increasing in diabetes may play an important role in the progression of diabetic angiopathy as well as in the progression of hypertension complicated with diabetes mellitus.