

氏名	知崎圭吾
生年月日	
本籍	愛知県
学位の種類	博士(薬学)
学位記番号	博甲第440号
学位授与の日付	平成13年9月28日
学位授与の要件	課程博士(学位規則第4条第1項)
学位授与の題目	血管内皮細胞における、胆汁酸によるNO産生ならびに多価不飽和脂肪酸によるNOおよびエンドセリン-1産生に関する研究
論文審査委員(主査)	清水 栄(自然科学研究科・教授)
論文審査委員(副査)	宮本 謙一(医病院・教授) 米田 幸雄(自然科学研究科・教授) 鈴木 永雄(自然科学研究科・教授) 横川 弘一(医病院・助教授)

## 学位論文要旨

In patients with hepatobiliary diseases, hemodynamic changes, such as arterial hypotension and reduced pressor effects of vasoconstrictor substrates, are commonly observed. The mechanisms for the hemodynamic changes observed in patients with hepatobiliary diseases remain unknown. To clarify the involvement of bile acids, the effects of bile acids on intracellular  $Ca^{2+}$  concentration ( $[Ca^{2+}]_i$ ) and nitric oxide (NO) production were investigated in vascular endothelial cells. Moreover, the relationships between clinical concentrations of individual bile acids observed in patients with hepatobiliary diseases and endothelial NO production induced by each bile acid were investigated.

Deoxycholic acid, chenodeoxycholic acid and the taurine conjugates increased  $[Ca^{2+}]_i$  in a concentration-dependent manner, while cholic acid and taurocholic acid showed no significant effect. These effects resulted from the first mobilization of  $Ca^{2+}$  from an inositol 1,4,5-triphosphate-sensitive store, which was released by ATP, then followed by  $Ca^{2+}$  influx.

Deoxycholic acid and chenodeoxycholic acid also enhanced NO production in a concentration-dependent manner, while cholic acid and taurocholic acid did not enhance it at all. The effects of individual bile acids on NO production were additive. The bile acid-induced NO production was suppressed by  $N^G$ -nitro-L-arginine methyl ester, exclusion of extracellular  $Ca^{2+}$  or calmodulin inhibitors. In patients with hepatobiliary diseases, the plasma concentrations of chenodeoxycholic acid, ursodeoxycholic acid and cholic acid (free acid, taurine and glycine conjugates) were markedly elevated. Patients with hepatobiliary diseases had higher plasma levels of  $[NO_2^-/NO_3^-]$  than control subjects.

These results provide novel evidence showing that bile acids increase  $[Ca^{2+}]_i$  and subsequently NO production in vascular endothelial cells. Increased plasma

concentrations of chenodeoxycholic acid (free, taurine and glycine conjugates) in patients with hepatobiliary diseases may induce endothelial nitric oxide production. Thus, the NO production induced by bile acids may be involved in the pathogenesis of circulatory abnormalities in patients with hepatobiliary diseases.

Cis-polyunsaturated fatty acids such as eicosapentaenoic acid (EPA) are the major components among fatty acids contained in fish oil. EPA has been reported to decrease systemic vascular reactivity to noradrenaline and lower systemic blood pressure in man. To clarify the involvement of EPA, the effects of EPA on NO production and endothelin-1 (ET-1) production in vascular endothelial cells were investigated. The results showed that EPA increased both  $[Ca^{2+}]_i$  and NO production in a concentration-dependent manner, while it significantly inhibited basal ET-1 production and ET-1 mRNA expression. Insulin (1  $\mu$ M) markedly increased ET-1 production, but decreased NO production. EPA decreased or abolished these effects induced by insulin.

These findings suggest that EPA enhances NO production, possibly due to the activation of calcium-calmodulin-dependent NO synthase elicited by intracellular  $Ca^{2+}$  increase, while it reduces basal and insulin-enhanced ET-1 production via the inhibition of ET-1 mRNA expression. These effects of EPA may contribute to the vasorelaxant effects of EPA.

血管内皮細胞は、種々の生理活性物質を放出して血管平滑筋のトーンスを調節している。血管作動性生理活性物質としては、一酸化窒素 (NO) のほか、エンドセリン-1 (ET-1)、プロスタサイクリン ( $PGI_2$ )、内皮由来血管成長因子 (endothelium-derived growth factor : EDGF) 等が知られている。

NO は、血管内皮細胞から種々の生理的刺激によって NO 合成酵素 (NOS) が活性化され、L-アルギニンと分子酸素より生成され放出される血管拡張物質である。一方、ET-1 は、21 残基のアミノ酸よりなるペプチドで、血管内皮細胞をはじめさまざまな組織で発現し、極めて強力で持続の長い血管収縮作用をもつ。ET-1 はサイトカインなどの刺激により、ET-1 遺伝子からの mRNA 転写、Prepro ET-1 への翻訳、酵素的切断を経て生成される。NO と ET-1 の産生バランスが血管のトーンス調節に重要と考えられている。

本研究では、血圧低下作用を有すると考えられる胆汁酸ならびに多価不飽和脂肪酸の、血管内皮細胞における細胞内  $Ca^{2+}$  濃度、NO 産生ならびに ET-1 産生に対する影響を検討し、それらの血圧低下作用機序を解明することを目的とした。

#### 1. 血管内皮細胞における細胞内 $Ca^{2+}$ 濃度ならびに NO 産生に対する胆汁酸の作用

血中の総胆汁酸量は、健常人では腸肝循環により 1  $\mu$ g/mL 以下の極めて低濃度に保たれている。この濃度は、2~4  $\mu$ M に相当する。しかし肝硬変患者では、肝細胞における胆汁酸の取り込み低下により、血中胆汁酸量が著しく増加している。また肝硬変患者では、一般に血圧の低下が認められているが、その機序は完全に解明されているとはいえない。著者は、まず、胆汁酸の血管内皮細胞における細胞内  $Ca^{2+}$  濃度ならびに NO 産生に対する影

響を検討した。

デオキシコール酸 (DC) やケノデオキシコール酸 (CDC) ならびにそのタウリン抱合体 (TDC、TCDC) は、血管内皮細胞の  $[Ca^{2+}]_i$  を用量依存的に上昇させた。またこれらは、血管内皮細胞の NO 産生も用量依存的に増加させた。この作用は、コール酸 (C) ならびにタウロコール酸 (TC) には認められなかった。

細胞外  $Ca^{2+}$  存在下では、CDC、DC、TCDC、TDC は、二相性に  $[Ca^{2+}]_i$  を上昇させた。最初の  $[Ca^{2+}]_i$  の上昇は、細胞外の  $Ca^{2+}$  を除去しても認められることから、主として細胞内ストアからの  $Ca^{2+}$  の遊離の結果である。一方、一過性の上昇に続く持続的な  $[Ca^{2+}]_i$  の上昇は、細胞外の  $Ca^{2+}$  除去あるいは  $Ca^{2+}$  チャンネルブロッカーである  $Ni^{2+}$  の投与により阻害されることから、細胞外からの  $Ca^{2+}$  の流入によるものと考えられる。これら胆汁酸による  $[Ca^{2+}]_i$  の上昇は、 $Ca^{2+}$  依存性  $K^+$  電流の活性化により生じた膜の過分極にも反映されている。さらに、二次元画像解析法の結果から、DC (300  $\mu$ M) 投与時には、 $[Ca^{2+}]_i$  上昇が細胞から細胞に移動してみられるオシレーションが観察された。同様なオシレーションは、パッチクランプを用いた  $Ca^{2+}$  依存性  $K^+$  電流の測定結果にも反映されている。これらのオシレーションは、アゴニストによる細胞内ストアからの  $Ca^{2+}$  の遊離と細胞外からの  $Ca^{2+}$  の流入ならびに放出のメカニズムのバランスによる細胞内の  $[Ca^{2+}]_i$  の維持に関与していると考えられる。胆汁酸ならびに ATP は、主として細胞内ストアからの  $Ca^{2+}$  の遊離による一過性の  $Ca^{2+}$  依存性  $K^+$  電流の活性化を引き起こした。この  $Ca^{2+}$  依存性  $K^+$  電流の活性化は、細胞外  $Ca^{2+}$  非存在下でも認められた。しかし、細胞外  $Ca^{2+}$  非存在下では、ATP、胆汁酸あるいは inositol 1,4,5-triphosphate ( $IP_3$ ) を投与し、一過性に  $K^+$  電流が活性化した後 ATP や胆汁酸を追加しても、再び活性化することはなかった。これらの結果は、胆汁酸は  $IP_3$  感受性  $Ca^{2+}$  ストアから  $Ca^{2+}$  を遊離させていることを示唆している。しかし、 $IP_3$  受容体拮抗薬ヘパリンは、ATP による  $Ca^{2+}$  依存性  $K^+$  電流の活性化を完全に阻害したが、胆汁酸による  $Ca^{2+}$  依存性  $K^+$  電流の活性化は阻害しなかった。このことより、胆汁酸による内皮の  $[Ca^{2+}]_i$  上昇は、 $IP_3$  受容体に直接作用してはいないと考えられた。

NOS には 3 つのタイプが存在するが、そのうちの 1 種は内皮で発現する  $Ca^{2+}$ -カルモデュリン依存性の酵素である。DC や CDC は血管内皮細胞の NO 産生を増加させたが、細胞外  $Ca^{2+}$  の除去やカルモデュリン阻害薬である W-7 やカルミダゾリウムによって、胆汁酸による NO 産生は抑制されたため、この NO 産生増加には  $Ca^{2+}$ -カルモデュリンが関与していると考えられた。さらに、DC や CDC は  $[Ca^{2+}]_i$  を用量依存的に上昇させるとともに、NO 産生も用量依存的に増加させたが、C や TC は  $[Ca^{2+}]_i$  も NO 産生も増加させなかったことから  $Ca^{2+}$ -カルモデュリンが NO 産生に寄与していることが示唆される。

本研究の結果、CDC、DC などの胆汁酸は  $[Ca^{2+}]_i$  を上昇させ、その結果、血管内皮細胞の NO 産生を亢進させることが明らかとなった。

## 2. 肝胆道系疾患患者におけるケノデオキシコール酸と NO 産生との関連

CDC、DC ならびにそのタウリン抱合体が、血管内皮細胞において、 $[Ca^{2+}]_i$  を上昇させ、NO 産生を促進することが明らかとなった。しかし、肝胆道系疾患患者でみられる各種胆汁酸量の変化が、実際に NO 産生に寄与しているかどうかは不明である。そこで、肝硬変や閉塞性黄疸患者でみられる血中胆汁酸濃度の上昇と、それら胆汁酸の血管内皮細胞の NO 産生に与える影響の関係を検討した。その結果、肝胆道系疾患患者の血中胆汁酸濃度

は著しく上昇していることがわかった。また、肝胆道系疾患患者の血中 $[\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-]$ は、健康人に比べ著しく上昇していた。DC、CDC およびその抱合体は内皮細胞の NO 産生を亢進させたが、C ならびに肝硬変の治療に用いられるウルソデオキシコール酸 (UDC) は NO 産生を亢進させなかった。

今回測定した健康人の総胆汁酸量 (15 種類の総和) は、 $4.2 \pm 2.8 \mu\text{M}$  ( $n=8$ ) だった。一方、肝硬変患者ならびに閉塞性黄疸患者の総胆汁酸量は、 $93.8 \pm 44.1 \mu\text{M}$  ( $n=8$ ) ならびに  $111.1 \pm 80.0 \mu\text{M}$  ( $n=6$ ) であり、肝胆道系疾患患者の血中胆汁酸濃度は、健康人に比べ有意に高いものであった。特に、総 C (C、TC、GC) ならびに総 CDC (CDC、TCDC、GCDC) が増加していた。また、測定した 15 種のうち 12 種の胆汁酸は検出されたが、リトコール酸 (LC) ならびにその抱合体は検出されなかった。肝硬変患者の血中 UDC 濃度は上昇していたが、これは UDC 治療によるものであった。

15 種の胆汁酸の内皮細胞による NO 産生に対する効果を検討した結果、DC および CDC ならびにそれらのタウリンおよびグリシン抱合体は、有意に NO 産生を増加させた。しかし、抱合体の NO 産生増加作用は非抱合体より弱いものであった。一方、C およびその抱合体は NO 産生を増加させなかった。また各胆汁酸の効果は、併用により相加的に働いた。したがって、単独ではともに殆ど NO 産生を増加させなかった濃度の TCDC と GCDC を併用すると、NO 産生を有意に増加させた。

これらの結果は、肝胆道系疾患患者でみられた血中胆汁酸濃度の増加は、胆汁酸による内皮細胞の NO 産生増加に関係していることを示している。特に CDC ならびにその抱合体が、強く関与していることが示唆された。したがって、肝胆道系疾患患者では、胆汁酸による内皮細胞の NO 産生増加により血中 NO 濃度が上昇し、血圧低下が生じたものと考えられる。UDC は、 $300 \mu\text{M}$  以下では内皮細胞の NO 産生を増加させなかった。

### 3. 血管内皮細胞の NO ならびに ET-1 産生に対する多価不飽和脂肪酸の作用

エイコサペンタエン酸 (EPA) は、血中コレステロールの低下、血小板凝集能抑制などの効果が報告されている。EPA にはさらに血圧低下作用も認められることから、最近、その作用機序の研究も試みられている。しかし、その解明は十分とはいえない。著者は、EPA の血圧低下作用機序解明の手段として、EPA の血管内皮細胞における NO 産生ならびに ET-1 産生に対する作用を検討した。さらにこれら作用に対する EPA の効果を、他の不飽和脂肪酸と比較した。また、インスリンの NO 産生、ET-1 産生に及ぼす影響に対する EPA の効果も検討した。

EPA は、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$  と NO 産生を用量依存的に増加させた。また EPA は、ET-1 産生を用量依存的に減少させた。インスリンは、ET-1 産生を増加させ NO 産生を減少させた。また EPA は、これらインスリンの作用を用量依存的に抑制した。EPA を 7 日間連続投与することにより、単回投与では効果が認められなかった濃度でも、NO 産生を増加させた。

以上より、これら EPA の NO 産生増加作用と ET-1 産生抑制作用が、EPA の血圧低下作用に寄与していると考えられる。

EPA は胆汁酸と同様、血管内皮細胞の  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  を二相性に上昇させた。細胞外の  $\text{Ca}^{2+}$  を除去すると、持続的な  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  の上昇は観察されなかった。また、持続的な  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  の上昇は、 $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルブロッカーの  $\text{Ni}^{2+}$  投与により完全に消滅した。これらの結果より、EPA は最初細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  ストアより  $\text{Ca}^{2+}$  を放出させ、続いて細胞外から  $\text{Ca}^{2+}$  を流入させ  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  を

上昇させることが示唆された。したがって、本研究でみられた EPA による用量依存的な NO 産生の増加は、Ca<sup>2+</sup>-カルモデュリン依存性 NOS の活性化によるものと考えられる。また、EPA は血管内皮細胞の ET-1 産生を抑制した。RT-PCR の結果から、EPA は ET-1 mRNA の発現を抑制することより、転写レベルで ET-1 産生を抑制すると考えられる。

ET-1 の産生は、NO によって阻害されることが知られている。したがって、EPA の ET-1 産生抑制作用は、NO 産生増加による抑制がその一役を担っていると考えられるが、これについてはさらなる検討が必要である。本研究結果より、EPA は今回検討した脂肪酸のなかで、最も強力な NO 産生増加作用と ET-1 産生抑制作用を有していた。

#### 4. 結論

本研究では、ある種の胆汁酸は内皮細胞の [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> を上昇させることにより NO 産生を増加させるこという新しい知見を得た。また、肝硬変や閉塞性黄疸のような肝胆道系疾患患者では、胆汁酸の血中濃度が健常人に比べ著しく上昇しており、さらに血中 NO<sup>2-</sup>/NO<sup>3-</sup>濃度も上昇していることがわかった。したがって、肝胆道系疾患患者にみられる血圧低下などの血行動態変化に、胆汁酸により亢進した NO 産生増加が関与していることが示唆された。

さらに、多価不飽和脂肪酸の EPA も胆汁酸と同様な機序により NO 産生を増加させることが確認された。また同時に EPA は、ET-1 mRNA の発現を抑制することにより ET-1 産生を抑制することが明らかとなった。したがって、NO 産生の亢進と ET-1 産生の抑制が、EPA の血圧低下作用に関与していることが示唆された。

## 学位論文審査結果の要旨

血管内皮細胞は、様々な刺激に反応して種々の生理活性物質を放出して血管平滑筋のトーンスを調節している。一酸化窒素 (NO) は血管拡張物質として、エンドセリン-1 (ET-1) は血管収縮物質として知られている。そして、これらの血管内皮細胞での産生バランスが血管のトーンス調節に重要と考えられている。また、肝硬変や閉塞性黄疸などの肝胆道系疾患の患者では血圧低下傾向、高脂血症患者では血圧上昇などの血行動態変化が生じることが知られている。

本研究は、まず、肝胆道系疾患にともなう血圧低下機序を同疾患時血中に増加する胆汁酸に求め、解明を試み、以下のような知見を得た。1) 胆汁酸のうち、デオキシコール酸 (DC) やケノデオキシコール酸 (CDC) ならびにそのタウリン抱合体は、血管内皮細胞において細胞内カルシウム濃度 ( $[Ca^{2+}]_i$ ) を用量依存的に上昇させた。2) またこれら胆汁酸による  $[Ca^{2+}]_i$  の上昇は二相性であり、最初の  $[Ca^{2+}]_i$  の上昇は inositol 1, 4, 5-triphosphate 感受性  $Ca^{2+}$  ストアからの  $Ca^{2+}$  遊離、引き続いて起こる持続的な  $[Ca^{2+}]_i$  の上昇は細胞外からの  $Ca^{2+}$  の流入であった。3) これらの胆汁酸は、 $Ca^{2+}$ -カルモデュリン依存性 NO 合成酵素 (NOS) を活性化することにより NO 産生を亢進させることを明らかにした。一方、4) コール酸 (C) ならびにタウロコール酸には、そのような作用は認められなかった。5) 肝硬変や閉塞性黄疸患者では、血中胆汁酸、特に、C と CDC、およびそれらの抱合体濃度が著しく上昇し、血中  $[NO_2^-/NO_3^-]$  も健常人に比べて有意に上昇していた。6) それぞれの胆汁酸は CDC と NO 産生を相乗的に増加させた。以上より、肝胆道系疾患患者では、血中に増加した胆汁酸が血管内皮細胞での NO 産生を介して血圧低下を惹起させていることが示唆された。

申請者は、さらに、不飽和脂肪酸の血圧低下機序についても検討を加えた。その結果、不飽和脂肪酸は、血管内皮細胞において  $Ca^{2+}$ -カルモデュリン依存性に NOS を活性化して NO 産生を亢進させると同時に、ET-1 の産生を転写レベルで抑制することを明らかにした。そして、このような作用は、エイコサペンタエン酸 (EPA) が最も強いものであった。このことから、EPA が高脂血症ならびにその随伴症状としての血行動態変化の改善物質として優れた薬理作用を有することを証明した。

以上、本研究は、肝胆道系疾患患者にみられる血圧低下などの血行動態変化は、血中に増加した胆汁酸が血管内皮細胞に作用して細胞内  $Ca^{2+}$  濃度の上昇を介して NO 産生増加をもたらすためであることを明らかにした。さらに、多価不飽和脂肪酸の EPA も胆汁酸と同様な機序により NO 産生を増加させるとともに、ET-1 mRNA の発現を抑制することにより ET-1 産生を抑制することにより血圧低下作用を示すことを明らかにするなど、病態生理学分野に有用な知見を与えたのみならず、今後の医薬品開発においても重要な示唆を提出している。よって、本論文は博士 (薬学) 論文に値するものと判定された。