

論文の内容の要旨

論文題目 血管壁における内因性 NO 合成酵素阻害物質 ADMA と
その加水分解する酵素 DDAH の病態生理学的役割

指導教官 大内尉義教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 10 年 4 月入学

医学博士課程

生殖発達加齢医学専攻

大池裕美子

はじめに

1980 年に Furchgott らは、内皮を擦過しない血管においてアセチルコリンによる血管弛緩反応が生じたことを観察し、アセチルコリンにより内皮から未知の物質が産生され、血管平滑筋を弛緩させるという結論に達し、それを内皮由来弛緩因子 endothelium derived relaxing factor (EDRF) と名付けた。アセチルコリンなどの液体因子や shear stress などにより、内皮細胞における NO 産生が増加し、産生された NO は血管平滑筋細胞に作用し、soluble guanylate cyclase 活性化を介して細胞内の cyclic GMP レベルを上昇させ、血管平滑筋を弛緩し血管を拡張させる。その他、NO は平滑筋細胞増殖の抑制、血小板の接着、凝集抑制などの作用がある。

一方、NOS の活性を阻害する内因性物質として NG-monomethylarginine (L-NMA) および asymmetric dimethylarginine (ADMA) が同定された。ADMA は尿中に排泄されるだけでなく、dimethylarginine dimethylaminohydrolase (DDAH) により、シトルリンとジメチルアミンに加水分解される。

心血管疾患における、NO の重要性が認識されるに伴い、NOS の活性を調節すると考えられている ADMA および DDAH の生理的ないし病態における役割の検討が必要である。

本研究においては、以下の3つの項目について検討を行った。

研究1 内皮依存性血管拡張反応と血中 ADMA 濃度の検討

研究2 血管平滑筋細胞脱分化と DDAH の発現

研究3 各種病態モデルラットにおける血中 ADMA 濃度および DDAH 発現の検討

研究1

<背景・目的> 動脈硬化の早期病変として、血管内皮細胞の機能異常があり、障害をもつ血管内皮細胞は NO の産生 および放出が減少し、内皮依存性血管拡張反応が低下するといわれている。一方、ADMA は、動脈硬化危険因子を有する患者では、血中濃度が上昇することより、Risk Factor による血管内皮機能低下の一因になっている可能性がある。

他の動脈硬化の危険因子として睡眠時無呼吸症候群 sleep apnea syndrome (SAS)が注目されており、これまで内皮依存性血管拡張反応の低下が報告されているが、血中 ADMA 濃度の検討はなされていない。そこで、本研究では、睡眠時無呼吸症候群の病態を改善するとされている nCPAP 療法の影響を検討した。

<方法> 睡眠時無呼吸症候群 (OSAS)で持続陽圧呼吸療法 (nCPAP) を開始した患者において、内皮依存性血管拡張反応 (%FMD)、内皮非依存性血管拡張反応 (%NTG)と血中 ADMA および NOx 濃度を測定した。

<結果> OSAS 患者の %FMD は、治療により有意に改善を示し、%NTG は、一定の変動を認めなかった。一方、血中 ADMA 濃度は、低下する傾向を認め、治療前後における %FMD と血中 ADMA 濃度が逆相関 ($p<0.05$) を示した。NOx は、%FMD が改善するに伴い、増加傾向が認められ、%FMD と NOx は正相関関係にあった。

<考察> 睡眠時無呼吸症候群において、血中 ADMA 濃度と血管内皮機能が逆相関することが示されており、nCPAP 後の血管内皮機能の改善において血中 ADMA 濃度の低下が重要な機序の一つである可能性がある。

研究2

<背景・目的> 血管平滑筋細胞は、動脈硬化の危険因子により、脱分化し合成型となり新生内膜において増殖すると考えられている。このように血管平滑

筋細胞のフェノタイプ変換 (phenotypic modulation) は、血管病変形成において大きな役割を果たしている可能性がある。前項で、血管内皮機能異常と血中 ADMA 濃度に相関が認められることが示されたが、この ADMA を加水分解する酵素 DDAH の新生内膜における役割は全く知られていない。そこで、本研究では、血管平滑筋細胞の脱分化と DDAH の発現の相関を検討した。

<方法> 頸動脈バルーン傷害モデルにおける免疫染色および IGF-I、PDGF-BB、および serum によって脱分化度を調節した培養血管平滑筋細胞における DDAH の発現をノーザンブロット法およびウエスタンブロット法にて検討した。

さらに、培養血管平滑筋細胞上清中の ADMA 濃度も検討した。

<結果> 頸動脈バルーン傷害モデルの肥厚した内膜の細胞成分と一致して DDAH I、II の発現が認められた。さらに、培養血管平滑筋細胞の脱分化度を軽減する IGF-I 刺激により、DDAH の発現減少を認め、一方、脱分化度を促進するとされている PDGF-BB および血清刺激により DDAH の発現亢進を認めた。培養血管平滑筋細胞上清中の ADMA 濃度は、PDGF-BB 刺激により減少した。

これは、PDGF-BB 刺激による細胞内の DDAH I の増加による可能性がある

<考察> 肥厚した新生内膜の血管平滑筋細胞において、DDAH I および DDAH II の発現の上昇を示した。さらに、本研究では、脱分化の程度を modulate する系として、IGF-I、PDGF-BB および血清を培養血管平滑筋細胞に添加し、脱分化にともなう血管平滑筋細胞の DDAH I および DDAH II の発現増加を認めた。これらの DDAH の増加は、病変部位における ADMA 濃度を低下させ、局所の NO の量を増加させ、内膜肥厚に拮抗的に作用する可能性がある。

研究 3

<背景・目的>

研究 1 で述べたように、血管病変進展と深く関わる加齢、高血圧、糖尿病などの動脈硬化危険因子を有する患者では、ADMA の血中濃度が上昇していることが報告されている。各種病態における ADMA の血中濃度上昇の機序の解明のみならず、危険因子の治療（一次予防）が血中 ADMA 濃度にどのように影響するかをモデル動物を用いて検討した。

<方法>

雄性 SHR ラットに Hydralazine、Candesartan (TCV-116) を投与した降圧モデルラットおよび雄性 WKY ラットに DOCA+1%食塩水、Angiotensin II を投与し

た昇圧モデルラットにおいて、血中 ADMA 濃度を測定した。また、血管壁における DDAH の発現に関しても検討した。

<結果> 降圧モデルラットにおいて、血中 ADMA 濃度に有意差を認めなかった。昇圧モデルラットにおいて、血中 ADMA 濃度は、Angiotensin II で有意に上昇し、DOCA salt では上昇傾向を認めたものの有意ではなかった。

WKY と SHR における血中 ADMA 濃度は、血圧上昇前の 4W と上昇後の 15W のいずれにおいても、両者に全く差を認めなかった。また、WKY と SHR ともに、4W に比して 15W で血中 ADMA 濃度の有意の低下を認めた。

DDAH の血管壁での発現の検討では、5W と 14W の両方で、SHR では WKY に比して DDAH I mRNA の発現が亢進していたが、DDAH II mRNA 発現は WKY と SHR に差を認めなかった。一方、蛋白レベルでの検討では、WKY と SHR の 4W および 12W の両方で、両者に差は認められず、mRNA レベルの結果と異なる結果が得られた。

<考察>

体液貯留性高血圧において、血中 ADMA 濃度が上昇する機序は不明であるが、ADMA 血中濃度の上昇の機序として、産生の増加、分解の減少、排泄の低下などが考えられる。また、血管組織において ADMA を加水分解する酵素 DDAH は、mRNA レベル、蛋白レベルなどの各段階にわたって、その機能と発現が調節されている可能性がある。