

論文内容の要旨

論文題目 カリウム欠乏による酸化ストレス増大の分子
機序解明

指導教官 藤田 敏郎 教授
東京大学医学部大学院医学系研究科
平成 13 年 4 月入学
医学博士課程
内科学専攻
氏名 本清雅子

【目的】

カリウム(K)はナトリウム(Na)に次いで生体内に多く分布する陽イオンであるにも関わらず、ヒトは進化の過程で腎尿細管を発達させ、Na 貯留能を獲得する一方で、K に関しては容易に排泄する機構を備わった。現代では文明の変化により Na 摂取量は増大し K 摂取量は減少するという食生活の変化が起こり、古来にはなかった K 欠乏という問題にさらされることとなった。

K の生体への影響として K 摂取増大には降圧効果や血管内皮機能の保護、バルーン血管形成術後再狭窄の抑制という利点があり、逆に K 欠乏では催不整脈作用、脳卒中発症リスクの増大などの欠点があると報告されている。特にこれまで K 欠乏による脳卒中などの心血管事故発症リスク増大に関しては、K 欠乏の直接作用によるものか、また血圧変化を介した作用によるものかは議論の余地ある問題とされてきた。しかし近年 SHEP (Systolic Hypertension in the Elderly Program)研究のサブ解析により、K 欠乏が血圧値とは独立した心血管事故のリスクとなることが指摘された。我々は K 欠乏による心血管事故リスクの増大原因として、血管障害の一因である酸化ストレス(ROS)量が増大し血管を直接障害する可能性があるかと仮定し、K 欠乏による ROS 量増大とその機序について検討を行った。

血管 ROS の産生系の中心である NAD(P)H oxidase 活性と消去/保護系の中心である superoxide dismutase (SOD)について検討を行った。特に血管特異的に多く存在する

SOD family に着目し、各々の活性及び蛋白量の検討から Extracellular-superoxide dismutase (EC-SOD)が重要であることが示唆された。EC-SOD は SOD family 中で最も血管に多く、内皮依存性の血管拡張能や ROS 量を規定すると報告があるため、K 欠乏による ROS 量増大と EC-SOD の関係を明らかにすることを目的とした。

【方法】

ラット

雄性 Sprague-Dawley (SD)ラット(350-400g)を 14 日間 K 欠乏食(0.002% K, 0.53% Na)、対照食(1.89% K, 0.53% Na)で飼育し、胸部大動脈および血漿を使用。なお経時の変化を検討した実験では上記食にて 5 日間飼育したものを使用した。

細胞

SD ラットの胸部大動脈より単離した vascular smooth muscle cell (VSMC)を使用し、透析済み fetal calf serum (FCS)20%を含む DMEM(細胞外 K 濃度 : $[K]_o=0, 0.2, 1, 3, 5\text{mEq/L}$)で 6-24 時間培養したものを使用した。

組織含有 K 濃度の測定

ラットの胸部大動脈および心臓を 0.75N nitric acid で消化分解した後、原子吸光分析法にて測定した。

ROS 量の測定

血漿 8-isoprostane (8-epi PGF 2α)量(EIA 法)、血管標本および VSMC 破砕抽出液の ROS 量(lucigenin 化学蛍光法)、胸部大動脈中の 3-nitrotyrosine 量(免疫組織染色法)を測定。

また機序の検討として NAD(P)H oxidase 依存の ROS 阻害剤の 4,5-dihydroxy-1,3-benzene-disulfonic acid (tiron)、diphenyleneiodonium (DPI)や NOS 由来の ROS 阻害剤の L-NNA、xanthin oxidase 由来の ROS 阻害剤の allopurinol、銅(Cu)をキレートする SOD 活性阻害剤の N,N'-diethyldithiocarbamate (DDC)、D-penicillamine、potassium cyanide (KCN)、tetraethylenepentamine pentahydrochloride (TEPA)、triethylenetetramine (TRIEEN)で前処理後の血管および VSMC の ROS 量を lucigenin 化学蛍光法で測定した。

NADPH oxidase 活性

胸部大動脈の破砕抽出液を lucigenin 化学蛍光法で測定した。

SOD 活性

NBT 法で測定。Mn-SOD 活性には 3mM KCN を使用した。

SOD 蛋白量

ウェスタン解析で測定し、定量解析には NIH image を用いた。

EC-SOD mRNA 量

ノザン解析で測定し、定量解析には phosphorImager SI を用いた。

EC-SOD タンパク合成量

[³⁵S]-Met/Cys を用いた metabolic labelling 法で VSMC を標識後、EC-SOD 抗体で免疫沈降を行い検討。定量解析には phosphorImager SI を用いた。

EC-SOD の分解(degradation)

[³⁵S]-Met/Cys を用い、Pulse and Chase 法により標識したタンパクを経時的に追跡後、EC-SOD 抗体で免疫沈降を行い検討。定量解析には phosphorImager SI を用いた。

【結果】

1)K 欠乏による血管への影響～動物個体での検討

1-1)K 欠乏による生体への影響

K 欠乏群では血清K値および血管含有 K 量のみが有意に低下し(p<0.001, p<0.05)、腎機能、糖代謝および脂質代謝異常の指標には差がなかった。また血圧、心拍数にも差はなかった。体重は早期では差がなかったが 14 日目には差を認めた。

1-2)K 欠乏による血管酸化ストレス(ROS)の増大

さらに lucigenin 化学蛍光法によって測定した血管 ROS 量は、14 日間飼育の K 欠乏群では有意に増大したが(p=0.039)、5 日間飼育では差を認めなかった。また様々な生体パラメーターのうち血管 ROS 量と最も強い相関が認められたのは血清K値であり、有意な負の相関が認められた(R²=0.33)。胸部大動脈の 3-nitrotyrosine 抗体による免疫組織染色でも、K 欠乏群では血管内皮に増加を認め、血漿中の 8-isoprostane 濃度も、K 欠乏群で増加した。

この K 欠乏による ROS 量増大の機序検討として、薬理学的手法を加え lucigenin 化学蛍光法で検討した。L-NNA や allopurinol では K 欠乏による ROS 量増大は抑制されなかったが、tiron や DPI により抑制された。また DDC や D-penicillamine、KCN、catechol、TEPA、TRIEN などの EC- & Cu/Zn-SOD inhibitor により対照群の ROS 量が増大し上述の ROS 量差が消失した。

1-3)K 欠乏による血管 NAD(P)H oxidase 活性への影響

K 欠乏群では血管の NAD(P)H oxidase 活性の増加は認められなかった。

1-4)K 欠乏による血管 SOD への影響

K 欠乏群では血管の総 SOD 活性が 39.8%低下し、SOD family のうち Mn-SOD はむしろ増加したが、EC-SOD および Cu/Zn-SOD 活性も 39.9%低下した。

血管の SOD family のうち、K 欠乏群では EC-SOD 蛋白量のみが特異的に減少し(p=0.007)、Cu/Zn-SOD は両群間で差はなく、Mn-SOD はむしろ増加した(p=0.043)。なお、K 欠乏群では心臓の EC-SOD および Cu/Zn-SOD 活性は減少せず、臓器特異性が認められた。

2)K 欠乏下による VSMC への影響～培養細胞での検討

2-1)K 欠乏による VSMC ROS の増大

in vivo 同様に VSMC の酸化ストレス量を lucigenin 化学蛍光法によって測定した。K 欠乏([K]_o=1mEq/L で 24 時間培養)により VSMC では PKC activator の PDBu 刺激時に ROS 量が増大した(p=0.01)。また DDC や D-penicillamine、KCN、catechol、TEPA、TRIEN などの EC-&Cu/Zn-SOD 阻害剤によって両群の ROS 量差が消失した。

2-2)K 欠乏による VSMC SOD への影響

K 欠乏([K]_o=1mEq/L で 24 時間培養)では VSMC の総 SOD 活性(p=0.04)、EC-SOD & Cu/Zn-SOD 活性(p=0.04)が低下し、Mn-SOD 活性には差はなかった。また PDBu 刺激を行っても総 SOD 活性および EC-&Cu/Zn-SOD 活性の低下を認めた(p=0.002)。

また蛋白発現レベルでは EC-SOD 蛋白のみが特異的に[K]_o 濃度依存性に減少し、Cu/Zn-SOD 蛋白は影響を受けなかった。

3)K 欠乏による EC-SOD 抑制の機序

3-1) EC-SOD は翻訳レベルで制御される

VSMC において K 欠乏は EC-SOD mRNA を低下させず、EC-SOD 蛋白の分解亢進も来さなかった。一方 K 欠乏は VSMC の EC-SOD 蛋白新生を[K]_o 濃度依存性に低下させることが明らかとなった。従って K 欠乏による EC-SOD 低下は少なくとも翻訳レベルで制御されることが示唆された。

3-2)ROS 増大による EC-SOD 発現への影響

K 欠乏による EC-SOD 低下が ROS 自体によるかどうかを検討する目的で、抗酸化剤による効果を検討したが、抗酸化剤は EC-SOD 発現に全く影響を及ぼさず、ROS 自体は影響を及ぼさないことが分かった。

【考察】

今回我々は K 欠乏が血管 ROS 量を増大させることを動物個体および細胞レベルで確認し、かつその機序を初めて明らかにした。我々の結果は、ROS 産生系ではなく、ROS 消去/防御系の鍵となる EC-SOD が K 欠乏による ROS 量増大に少なくとも一部関与することを示した。さらに K 欠乏により EC-SOD が翻訳レベルで制御されることがその機序と考えられた。既に遺伝子改変動物においては、ROS 消去/防御系の低下で血管 ROS 量の増大や血管障害を来しうる分子として、EC-SOD、glutathione peroxidase、Cu/Zn-SOD、Mn-SOD が明らかにされている。また、血管障害の原因の一つとなる homocysteine により防御系の glutathione peroxidase や EC-SOD の発現低下とそれに起因する nitric oxide(NO)系の減弱が示されている。これまで翻訳レベルで EC-SOD 発現量に影響を及ぼすものとして報告されているのは homocysteine のみであり、我々が観察した K 欠乏はこれに次ぐものである。今回 K 欠乏による翻訳レベルでの EC-SOD 低下の機序は明らかにしえなかったが、今後その分子機構を明らかにすることにより K 欠乏による生体応答反応の一端が明らかになり、K 欠乏により心血管リスクが増大する機序の理解が進むものと考えている。