

[別 紙 2]

審 査 の 結 果 の 要 旨

氏名 本清 雅子

本研究は降圧利尿薬内服時にしばしば生じる K 欠乏が、血管機能に悪影響を及ぼす機序を酸化ストレス(ROS)の観点より検討したものである。K 欠乏が血管障害の一因となる ROS を増大させるか否かを検証し、さらにその分子機序の一部をはじめて明らかにした。以下に得られた結果を示す。

1. 雄性 Sprague-Dawley (SD)ラットを 14 日間 K 欠乏食(0.002% K, 0.53% Na 各含有)で飼育後、血清 K 値および血管組織 K 含量により K 欠乏を確認後、K 欠乏により ROS ($O_2^{\cdot -}$)が増大することを三つの手法(lucigenin 化学蛍光法、3-nitrotyrosine 免疫染色性、8-isoprostane 定量)により確認した。K 欠乏による血管 ROS 増大は PKC activator による ROS 産生の刺激下でより顕著となった。
2. SDラット大動脈より単離した培養平滑筋細胞細胞(VSMC)を用い、24時間の K 欠乏(培地中 K 濃度を 5 から 1 mEq/L に低下)により VSMC の ROS ($O_2^{\cdot -}$)増大を lucigenin 化学蛍光法で確認した。
3. 上記 *in vivo* および *in vitro* 実験系における K 欠乏による ROS 増大の機序を検討した。薬理学的手法により、K 欠乏による ROS 増大は Nitric oxide synthase や Xanthine oxidase ではなく、NAD(P)H oxidase に依存することが示唆されたが、K 欠乏により NAD(P)H oxidase 活性自体の亢進は認められなかった。そこで Superoxide dismutase (SOD)阻害薬を用いて同様に検討し、SOD、特に Cu を活性中心に有する Extracellular (EC)-SOD および Cu/Zn-SOD の関与が示唆された。また実際に *in vivo* および *in vitro* において、K 欠乏により EC-SOD および Cu/Zn-SOD 活性の和が低下していた。蛋白発現レベルでは、K 欠乏によ

り Cu/Zn-SOD は変化せず、EC-SOD が特異的に減少することが明らかとなった。

4. 以上の結果より、K 欠乏による血管 ROS 増大の機序として、EC-SOD 低下の関与が示唆されたため、さらに分子機序を検討した。転写レベルはノザン解析法で検討し、K 欠乏による EC-SOD mRNA 低下は認められなかった。翻訳レベルは ³⁵S-methionine/ cysteine による代謝ラベル法で検討し、K 欠乏により濃度依存性に EC-SOD 合成の抑制が認められた。蛋白分解レベルは ³⁵S-methionine/ cysteine による Pulse and Chase 法で検討し、K 欠乏による分解亢進は認められなかった。

以上、本論文は K 欠乏により血管 ROS が増大することを確認し、ROS 産生亢進下でこの現象が顕著となることを示した。さらに、この機序に EC-SOD 低下が関与する可能性を初めて明らかにした。これは ROS 制御における消去系の重要性を喚起した興味深いものである。また、本論文は K 欠乏により EC-SOD 低下が翻訳レベルで制御されうることが明らかになった。

近年翻訳レベルの制御が病態形成に関与する例がいくつか報告されており、これもそれに次ぐものと考えられる。今後この分子機構を解明することにより K 欠乏による生体応答反応の一端が明らかになり、心血管リスクの管理に新たな展望をもたらさうため、学位の授与に値するものと考えられる。