

論文内容の要旨

論文題目 The Protective Effects of Melatonin on Vascular Endothelial Function

和訳 メラトニンの血管内皮保護作用に関する検討

指導教員 永井 良三 教授

東京大学大学院医科系研究科

平成 18 年 4 月入学

医学博士課程

内科学専攻

氏名 中尾 倫子

1. 背景

松果体から分泌されるメラトニンは血中濃度に日内変動があり、夜間高値となる。血中濃度は加齢に伴い徐々に低下する。また、加齢に伴い増加する心血管疾患患者ではメラトニンの血中濃度が低下している。

体内時計の調節作用、催眠作用などの中枢に対するメラトニンの作用が広く知られているが、近年、ラジカルスカベンジャー作用および抗酸化酵素誘導によるメラトニンの抗酸化作用が注目されている。メラトニンは親水性でもあり、親脂性でもあるために、細胞膜を容易に通過する。その結果、末梢組織にひろく行きわたり、抗酸化作用を発揮する可能性がある。また、中枢のみでなく心血管系を含む末梢組織にもメラトニン受容体が存在することが知られている。以上のことより、そもそも酸化ストレスによって惹起される心血管疾患に対し、メラトニンが直接末梢組織に抗酸化物質として作用し、その予防・治療に

貢献することが期待できる。

事実、心筋の虚血再灌流モデル動物で、メラトニン投与は虚血心筋を縮小させることが報告されており、急性心筋梗塞患者を対象とした臨床試験も現在進行中である。

血管機能に対するメラトニンの作用としては、高血圧モデルラット、健常成人、non-dipper 高血圧患者での自律神経を介した降圧効果が知られているが、血管細胞、特に血管内皮細胞に対する直接効果およびその機序は知られていない。

2. 目的

in vivo、*in vitro* の2つの系を用いて、メラトニンの抗酸化作用および血管内皮に対する保護作用に関して検討した。

3. 方法

活性酸素(ROS)発生、内皮型 NO 合成酵素 (eNOS)の活性化および NO 産生を指標にメラトニンと血管内皮機能との関連について検討した。

- 1) ヒト大動脈血管内皮培養細胞(HAEC)を用いた *in vitro* 実験で、a) メラトニン単独投与が eNOS 活性化および NO 産生にいかなる影響を与えるのか、b) アンギオテンシン II(Ang II 200 nmol/L)負荷で惹起される ROS 産生亢進および eNOS 不活性化をメラトニンが回復させるか、について検討した。
- 2) Ang II 持続負荷ラットを用いた *in vivo* 実験で Ang II 負荷で惹起される血管壁での ROS 産生亢進および血管内皮機能障害を、メラトニンが回復させるかを検討した。

4. 結果

最初に HAEC を用いた *in vitro* 実験で、mRNA レベルでメラトニン受容体の発現を確認

した (本文 Fig 6)。

次にメラトニン単独投与が血管内皮細胞に与える効果を検討した。NO 蛍光指示薬である DAF-FM DA を用いて、各濃度のメラトニンを単独投与した際の HAEC 内での NO 産生亢進を確認した。1 × 10⁻⁵ mo/L のメラトニン投与時に有意に NO 産生の亢進を認め (本文 Fig7,8)、以後この濃度のメラトニンの効果を検討することとした。また、メラトニン単独投与により eNOS のリン酸化が亢進することをウエスタンブロッティング法で確認した (本文 Fig 9)。以上より、メラトニン単独投与が、HAEC での eNOS 活性化を惹起し、NO 産生を亢進することが確認された。

以上のことをふまえ、血管内皮細胞での ROS 産生が亢進し、血管内皮機能が著しく障害されている病的状態においても、メラトニン投与が血管内皮機能を改善することができるか検討を加えた。

血管内皮細胞での主な ROS の発生源として、細胞膜上の NADPH オキシダーゼが知られている。Ang II は type1 レセプター(AT1R)と type2 レセプター(AT2R)の二種類のレセプターを介し、血管内皮細胞に作用する。成人の血管内皮細胞では、AT1R の発現が多いが、この AT1R を介したパスウェイは NADPH オキシダーゼを活性化し、ROS 産生を亢進、そして NO 産生を低下させることが知られている。一方、AT2R パスウェイは eNOS のリン酸化亢進を介して、NO を産生させることで、AT1R パスウェイに拮抗する作用を有し、血管内皮細胞に対して保護的に作用することが知られている。

ROS の蛍光指示薬である CM-H₂DCFDA を用いて Ang II 負荷による ROS 産生亢進をメラトニン同時投与が軽減できるか検討した。Ang II (200 nmol/L)を HAEC に添加すると ROS

産生が亢進し、メラトニン前投与で抑制された (本文 Fig 10)。次に、Ang II 負荷は ROS 発生の結果 eNOS の活性化を低下させるかどうかの検討を行った。Ang II 単独刺激による eNOS 活性化の低下は軽度であることも多く、場合によっては eNOS の活性亢進を引き起こすことさえ観察されたことから、メラトニンの効果を検討するには決して好ましい実験系ではないと思われた。Ang II の AT1R を介するパスウェイと、AT2R を介するパスウェイとのバランスが安定せず、eNOS リン酸化のレベルが一定しなかったことによると考えられた。

細胞膜にはコレステロールに富んだ膜ドメインがあり、Ang II が AT1R を介し、NADPH オキシダーゼを活性化するシグナル伝達にとって重要であることが知られている。このため、Ang II をコレステロールと併用して血管内皮細胞に負荷したところ、Ang II 単独投与よりもさらに安定した ROS 産生亢進および eNOS 活性低下を観察できた (本文 Fig 11)。そこで、この Ang II とコレステロールを併用した実験系を用いて、メラトニンの血管内皮保護効果を引き続き検討することとした。

ROS 検出色素 CM-H₂DCFDA を用い、Ang II およびコレステロールの併用負荷により、HAEC における ROS 発生が亢進することを確認し、この ROS 発生亢進はメラトニン前処置により抑制されることを観察した (本文 Fig 12)。さらに、Ang II およびコレステロール併用負荷により、eNOS のリン酸化は強く阻害されるが、メラトニン前処置により改善した (本文 Fig 13)。

また、p47^{phox} の細胞膜分画への移行は NADPH オキシダーゼを活性化し、それが ROS 発生亢進を招来すると報告されている。私は上述の事実が NADPH オキシダーゼ活性を介し

ている可能性を念頭に p47^{phox} の膜分画への移行を検討した。Ang II およびコレステロール刺激により、膜分画での p47^{phox} が増加したのを確認した。メラトニンを前処置することにより、Ang II およびコレステロール刺激による p47^{phox} の膜分画への移行は抑えられた (本文 Fig 14)。

以上のことから、培養血管内皮細胞において、メラトニンは NADPH オキシダーゼ活性化を抑えることにより、Ang II による ROS 産生亢進を抑え、さらに eNOS 活性化障害を抑制することが明らかになった。

次に *in vivo* の実験でメラトニンの血管内皮機能に対する効果を検討した。

Ang II を浸透圧ポンプにより 1 週間持続負荷し高血圧(収縮期血圧 200 mmHg 前後)を惹起したラットでは、血管壁の ROS 産生が亢進し、内皮依存性血管拡張反応が低下することが知られている。今回の実験でも、血管壁の ROS 産生亢進を確認できたが、メラトニンを同時投与したラットでは、血管壁の全層にわたり、Ang II により惹起される ROS 産生亢進が抑えられた(本文 Fig 16)。また、Ang II 持続投与により低下した内皮依存性血管拡張反応は、メラトニン同時投与で回復することが示された (本文 Fig 18)。

このように、*in vitro* 実験と、*in vivo* 実験において、Ang II により惹起される酸化ストレス亢進状態そして血管内皮に対する障害作用をメラトニンが改善するという事実を初めて明らかにした。

5. 結論

メラトニンは単独でも NO 合成酵素の活性化を引き起こし、NO を発生させることで血管内皮保護作用を示す可能性がある。さらにアンギオテンシン II およびコレステロール併用

負荷により NADPH オキシダーゼが活性化し活性酸素発生を介して血管内皮機能が障害された状態に対してでもメラトニンは治療効果を有する。アンギオテンシン II 持続負荷により惹起される高血圧ラットにおいても、血管壁での活性酸素亢進および内皮依存性血管拡張反応障害をメラトニンが回復させる。本研究は、生体へのアンギオテンシン負荷により惹起された血管内皮機能障害を、生体に投与したメラトニンが回復させることを示した最初の研究である。これまでも生体外に取り出したラットの大動脈標本を、高濃度グルコース処理し、惹起される血管内皮依存性拡張障害をメラトニン同時処理が改善したという報告はなされていたが、その機序に関しては明らかでなかった。本研究では、メラトニンが血管内皮細胞に直接作用し、eNOS のリン酸化、そして NO 産生を改善させることを示し、またメラトニンが血管内皮依存性拡張反応を改善する機序を解明した。メラトニンは、単に日内変動を調整する機能を有するだけではなく、血管への直接の保護作用を有することが明示された。既にメラトニンは睡眠導入剤として安全に使用されている。特に内因性のメラトニンが低い患者においては心血管疾患に対する予防・治療効果が期待され、そのメカニズムのひとつを明らかにした研究として、本研究はきわめて重要であると考えられる。