

審査の結果の要旨

氏名 中 尾 倫 子

本研究は、松果体から分泌されるホルモンであるメラトニンの血管内皮に対する保護作用を明らかにするため、*in vitro* および *in vivo* 実験で、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ものであり、以下の結果を得ている。

1. ヒト大動脈血管内皮培養細胞 (HAEC) を用いた *in vitro* 実験
 - 1-1. メラトニン受容体の血管内皮細胞での発現を mRNA レベルで確認した。
 - 1-2. 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ところ、 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、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 のリン酸化が亢進していることをウエスタンブロッティング法で確認した。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。
 - 1-3. 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。ROS の蛍光指示薬である CM-H₂DCFDA を用いてアンギオテンシン II (Ang II) 200 nmol/L 負荷で惹起される ROS 産生亢進をメラトニンが抑制することが示された。
 - 1-4. 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 type1 レセプターを介し、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、コレステロールを血管内皮細胞に負荷した状態で、Ang II を負荷したところ、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 活性低下がおこることが示された。
 - 1-5. 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 を用いて、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。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がみられた。
 - 1-6. 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おり、本研究でも 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。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。

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。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。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。

以上、本論文はメラトニンが血管内皮細胞に直接作用し、アンギオテンシン II 単独負荷(*in vivo* 実験) またはコレステロール併用負荷(*in vitro* 実験)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機能障害を改善することを初めて明らかにした。内因性のメラトニンが低い患者においてメラトニンには心血管疾患に対する予防・治療効果が期待され、本研究はそのメカニズムの解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。