

学位論文内容の要旨

論文提出者氏名	論文審査担当者
松尾純子	主査 教授 林 秀行 副査 教授 朝 日 通 雄 副査 教授 花 房 俊 昭 副査 教授 石 坂 信 和
主論文題名 Involvement of NADPH oxidase and protein kinase C in endothelin-1-induced superoxide production in retinal microvessels (網膜微小血管におけるエンドセリン-1による活性酸素産生と、NADPH オキシダーゼおよびプロテインキナーゼ C の関与)	
学位論文内容の要旨	
《目的》 網膜血管は自律神経系による制御がないにもかかわらず、一定の血流量が維持される自動調節能が認められる。一つの機序として、血管内皮細胞が分泌する一酸化窒素 (nitric oxide、NO) やエンドセリン-1 (endothelin-1、ET-1) などの血管作動性物質を受け、網膜血管周皮細胞が血管径を調節する機構が考えられている。ET-1 は大動脈などの血管組織で活性酸素を産生させ、NO を不活化して、その血管拡張作用を阻害する可能性が示唆されている。糖尿病網膜症でも、活性酸素により血管内皮機能が障害され、循環障害が助長される可能性が考えられているが、その詳細は明らかになっていない。したがって ET-1 が網膜血管レベルで実際に活性酸素を産生させるかを明らかにし、その機序を理解することは、糖尿病網膜症の病態生理を解明するうえで不可欠であると考えられる。 我々は ET-1 曝露による網膜血管周皮細胞における活性酸素産生を経時的に定量し、さらにその分子基盤解明のため ET-1 による活性酸素産生に関わる受容体、細	

胞内シグナル伝達経路の解明を目的とした検討を行った。

《対象及び方法》

9～16 週齢ラットから、ティッシュプリント法により摘出した網膜血管を ET-1 に曝露し、周皮細胞で生じる活性酸素の変化を、ハイドロエチジンを蛍光プローブとして、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。ET-1 投与直後から 15 分間、周皮細胞内の活性酸素量を time lapse 測定した。また、投与 90 分後の活性酸素量を計測した。

ET-1 による活性酸素産生機序解明のため、以下の各種阻害薬を用いた。ET_A 受容体遮断薬として BQ-123、ET_B 受容体遮断薬として BQ-788 を用いた。さらに ET_B 受容体作動薬である IRL-1620 を用いた。活性酸素の主要な産生源として、NADPH オキシダーゼ、キサンチンオキシダーゼ、ミトコンドリア電子伝達系、一酸化窒素合成酵素 (nitric oxide synthase、NOS) が考えられることから、それぞれの阻害薬である apocynin、allopurinol、rotenone、L-NAME を用いた。さらに、糖尿病網膜症では ET-1 を介した protein kinase C (PKC) の活性化が知られていることから、PKC 阻害薬として myr-ΨPKC を、PKC 作動薬として PMA を用い、細胞内シグナル伝達分子として PKC の関与を検討した。

《結 果》

エチジウム蛍光強度を指標とした測定で、ET-1 は濃度依存的に網膜血管周皮細胞において活性酸素を産生させた。time lapse 測定 15 分後に、ET-1 (100nM) はエチジウム蛍光強度を曝露前の 211%と有意に増強させた。この増強効果は BQ-123 投与により有意に抑制され、一方、BQ-788 投与では抑制されなかった。以上より、ET-1 による周皮細胞内での活性酸素産生には ET_A 受容体を介していることが示された。

次に、周皮細胞内での活性酸素産生機序について検討した。ET-1によるエチジウム蛍光強度増強は apocynin の前投与により有意に抑制された。一方で、L-NAME、rotenone、allopurinol の投与では蛍光強度増強の有意な抑制は認められなかった。

ET-1 曝露後 90 分の測定でも、同様の結果が得られた。以上より、ET-1 は主に NADPH オキシダーゼに作用し、網膜血管周皮細胞で活性酸素を産生させると考えられた。

最後に、PKC の関与を検討した。myr- ψ PKC 投与で、15 分後、90 分後で ET-1 による蛍光強度増強が有意に抑制された。また、PKC の作動薬である PMA 投与は、ET-1 と同程度にエチジウム蛍光を増強させ、この効果は apocynin により有意に抑制された。以上より、ET-1 による周皮細胞内での活性酸素産生は、PKC を介した NADPH オキシダーゼの活性化が関与していると考えられた。

《考 察》

網膜微小血管周皮細胞において、ET-1 による刺激は ET_A 受容体を介して細胞内に伝達され、さらに PKC を介して NADPH オキシダーゼへ伝達され、活性酸素を産生させることが明らかとなった。活性酸素の増加は NO の弛緩作用を減弱させ、血管収縮作用機構の一つであると考えられている。臨床的には糖尿病網膜で ET-1 の発現が増加しており、また PKC の活性化が生じていることが知られている。今回の実験により、網膜血管周皮細胞における ET-1 による活性酸素産生機序を確認できたことで、糖尿病網膜症における微小循環障害に関与すると言われていた酸化ストレスの原因のひとつが特定されたと考えられる。また糖尿病網膜症の治療薬として現在開発中の PKC 阻害薬の有効性を示唆する結果であり、今後の治療法開発に結びつくものと期待できる。

審査結果の要旨および担当者

報告番号	甲第	号	氏名	松尾純子
論文審査担当者			主査教授 林 秀行	
			副査教授 朝日 通雄	
			副査教授 花房 俊昭	
			副査教授 石坂 信和	
主論文題名				
<p>Involvement of NADPH oxidase and protein kinase C in endothelin-1-induced superoxide production in retinal microvessels</p> <p>(網膜微小血管におけるエンドセリン-1による活性酸素産生と、NADPH オキシダーゼおよびプロテインキナーゼ C の関与)</p>				
論文審査結果の要旨				
<p>Endothelin-1 (ET-1) は大動脈などの血管組織で活性酸素を産生させ、血管拡張作用を阻害する可能性が示唆されている。糖尿病網膜症でも ET-1 の発現が増加していることが知られており、活性酸素による循環障害が助長される可能性が考えられているが、その詳細は明らかになっていない。したがって ET-1 による網膜血管レベルでの活性酸素産生機序を理解することは、糖尿病網膜症の病態生理を解明するうえで不可欠である。</p> <p>申請者はラット摘出網膜血管を ET-1 に曝露し、周皮細胞で生じる活性酸素量を測定、また活性酸素産生機序解明のため、各種薬剤を用い細胞内シグナル伝達経路を検討した。</p> <p>ET-1 投与により、網膜血管周皮細胞において活性酸素量の指標となるエチジウム蛍光強度は有意に増強した。この増強効果は ET_A 受容体遮断薬、NADPH オキシダーゼ阻害薬、PKC 阻害薬の前投与により有意に抑制された。また、PKC 作動薬の投与は、ET-1 と同程度にエチジウム蛍光強度を有意に増強し、この増強効果は</p>				

NADPH オキシダーゼ阻害薬により有意に抑制された。

今回の結果より、網膜微小血管周皮細胞において、ET-1 による刺激は ET_A 受容体を介して細胞内に伝達され、さらに PKC を介して NADPH オキシダーゼへ伝達され、活性酸素を産生させることが明らかとなった。本研究で網膜血管周皮細胞における ET-1 による活性酸素産生機序が明らかになり、糖尿病網膜症における微小循環障害に関与すると言われている酸化ストレスの原因のひとつが特定されたと考えられる。また糖尿病網膜症の治療薬として現在開発中の PKC 阻害薬の有効性を示唆する結果であり、今後の治療法開発に結びつくものと期待できる。

以上により、本論文は本学大学院学則第 11 条に定めるところの博士（医学）の学位を授与するに値するものと認める。

(主論文公表誌)

Experimental Eye Research 89(5): 693-699, 2009