

生体内の機能を維持した血管の器官培養法確立：血管恒常性維持  
のメカニズムを探る

森田 知佳

平成 25 年度

Establishment of organ culture system of isolated blood vessel which  
preserves intact vascular functions: exploring the mechanisms of  
maintenance of vascular homeostasis

Tomoka Morita

2013



学位論文題目

生体内の機能を維持した血管の器官培養法確立：血管恒常性維持の  
メカニズムを探る

---

氏 名      森田 知佳

---

審 査 委 員

< 主 査 >

小山田 敏文  
(獣医病理学・教授)

< 副 査 >

佐々木 宣哉  
(実験動物学・教授)

< 副 査 >

佐藤 晃一  
(山口大学共同獣医学部，獣医学科生体機能学講座，獣医薬理学研究室・教授)

< 副 査 >

山脇 英之  
(獣医薬理学・准教授)

平成26年2月20日

---

北里大学大学院獣医学系研究科

## 目次

I. 緒論 .....	1
II. 第一章	
1. 緒論 .....	4
2. 材料および方法 .....	5
2-1 実験材料 .....	5
2-2 張力測定法 .....	5
2-3 組織形態学的検索 .....	6
2-4 使用薬物 .....	6
2-5 統計処理 .....	6
3. 実験成績 .....	
3-1 E (+)器官培養ラット前腸間膜動脈標本における NA に よる収縮張力の変化 .....	7
3-2 E (-)器官培養ラット前腸間膜動脈標本における NA に よる収縮張力の変化 .....	7
3-3 E (+)器官培養ラット前腸間膜動脈標本における ET-1 による収縮張力の変化 .....	7
3-4 E (-)器官培養ラット前腸間膜動脈標本における ET-1 に よる収縮張力の変化 .....	8
3-5 E (+)器官培養ラット前腸間膜動脈標本における 5-HT による収縮張力の変化 .....	8

3-6 E (-)器官培養ラット前腸間膜動脈標本における 5-HT による収縮張力の変化	8
3-7 器官培養ラット前腸間膜動脈標本の組織形態学的変化	9
4. 考察	17
4-1 まとめ	17
4-2 無血清培地での器官培養が血管収縮性に及ぼす影響	17
4-3 結論	19
III. 第二章	21
1. 緒論	21
2. 材料および方法	22
2-1 実験材料	22
2-2 張力測定法	22
2-3 組織形態学的検索	22
2-4 使用薬物	22
2-5 統計処理	22
3. 実験成績	
3-1 FBS長期処置の E (+)器官培養ラット前腸間膜動脈標本 における NA による収縮張力に及ぼす影響	23
3-2 FBS長期処置の E (-)器官培養ラット前腸間膜動脈標本 における NA による収縮張力に及ぼす影響	23
3-3 FBS長期処置の E (+)器官培養ラット前腸間膜動脈標本 における ET-1 による収縮張力に及ぼす影響	23

3-4	FBS 長期処置の E (-) 器官培養ラット前腸間膜動脈標本 における ET-1 による収縮張力に及ぼす影響	24
3-5	FBS 長期処置の E (+) 器官培養ラット前腸間膜動脈標本 における 5-HT による収縮張力に及ぼす影響	24
3-6	FBS 長期処置の E (-) 器官培養ラット前腸間膜動脈標本 における 5-HT による収縮張力に及ぼす影響	24
3-7	FBS 長期処置の器官培養ラット前腸間膜動脈標本にお ける組織形態に及ぼす影響	25
4.	考察	33
4-1	まとめ	33
4-2	FBS 長期処置の血管収縮性に及ぼす影響	33
4-3	結論	35
IV.	第三章	36
1.	緒論	36
2.	材料および方法	37
2-1	実験材料	37
2-2	張力測定法	37
2-3	組織形態学的検索	37
2-4	NO 産生量の測定	37
2-5	ウェスタンブロッティング	38
2-6	使用薬物	38
2-7	一次抗体	39
2-8	統計処理	39
3.	実験成績	40

3-1	FBS 長期処置の器官培養ラット前腸間膜動脈標本における ACh および BK による内皮依存性弛緩反応に及ぼす影響	40
3-2	FBS 長期処置の器官培養ラット前腸間膜動脈標本における SNP による内皮非依存性弛緩反応に及ぼす影響	40
3-3	FBS 長期処置の器官培養ラット前腸間膜動脈標本内皮細胞の形態に及ぼす影響	40
3-4	FBS 長期処置の ACh による NO 産生に及ぼす影響	40
3-5	FBS 長期処置の eNOS タンパク質発現に及ぼす影響	41
3-6	FBS 長期処置の器官培養ラット前腸間膜動脈標本における $\text{Ca}^{2+}$ イオノフォア A23187 による弛緩反応に及ぼす影響	41
3-7	FBS 長期処置の器官培養ラット前腸間膜動脈標本における phospholipase (PL) C 活性化薬 m-3M3FBS による弛緩反応に及ぼす影響	41
3-8	FBS 長期処置の TRPC-1、-4 および -5 タンパク質発現に及ぼす影響	42
4.	考察	52
4-1	まとめ	52
4-2	FBS 長期処置の内皮依存性弛緩反応に及ぼす影響	52
4-3	結論	54

V. 第四章	55
1. 緒論	55
2. 材料および方法	56
2-1 実験材料	56
2-2 張力測定法	56
2-3 組織形態学的検索	56
2-4 ミトコンドリア由来 $O_2\cdot$ の測定	57
2-5 ミトコンドリア膜電位の測定	57
2-6 使用薬物	57
2-7 統計処理	57
3. 実験成績	59
3-1 成熟ラット血清の器官培養ラット前腸間膜動脈標本に おける ACh による内皮依存性弛緩反応に及ぼす影響	59
3-2 成熟ラット血清の器官培養ラット前腸間膜動脈標本に おける SNP による内皮非依存性弛緩反応に及ぼす影響	59
3-3 成熟ラット血清の器官培養ラット前腸間膜動脈標本内 皮細胞の形態に及ぼす影響	59
3-4 抗酸化薬 NAC 急性処置の器官培養ラット前腸間膜動脈 標本における ACh による内皮依存性弛緩反応に及ぼす影響	60
3-5 各種 ROS 阻害薬急性処置の器官培養ラット前腸間膜動 脈標本における ACh による内皮依存性弛緩反応に及ぼす影 響	60
3-6 ミトコンドリア呼吸鎖複合体 I 阻害薬 rotenone 急性処	

置の器官培養ラット前腸間膜動脈標本における ACh による 内皮依存性弛緩反応に及ぼす影響	61
3-7 成熟ラット血清の器官培養ラット前腸間膜動脈標本内 皮細胞におけるミトコンドリア由来 ROS 産生に及ぼす影響	61
3-8 成熟ラット血清の器官培養ラット前腸間膜動脈標本内 皮細胞におけるミトコンドリア膜電位に及ぼす影響	61
4. 考察	74
4-1 まとめ	74
4-2 成熟ラット血清処置の器官培養ラット前腸間膜動脈標本 における内皮依存性弛緩反応に及ぼす影響	74
4-3 結論	77
VI. 第五章	79
1. 緒論	79
2. 材料および方法	81
2-1 実験材料	81
2-2 張力測定法	81
2-3 ウェスタンブロッティング	81
2-4 使用薬物	81
2-5 一次抗体	81
2-6 統計処理	82
3. 実験成績	83
3-1 ラパマイシン処置の器官培養ラット前腸間膜動脈標本 における KCl による収縮張力に及ぼす影響	83



3-2	ラパマイシン処置の器官培養ラット前腸間膜動脈標本 における mTOR タンパク質の発現およびリン酸化に及ぼす影 響	83
3-3	ラパマイシン処置の器官培養ラット前腸間膜動脈標本 における myocardin、 $\alpha$ -actin、SM22 $\alpha$ 、calponin タンパク 質発現に及ぼす影響	84
3-4	ラパマイシン処置の器官培養ラット前腸間膜動脈標本 における基底状態 CaMKII タンパク質の発現とリン酸化に及 ぼす影響	84
4.	考察	
4-1	まとめ	90
4-2	ラパマイシン処置の無血清器官培養ラット前腸間膜動脈 標本における KCl による収縮張力に及ぼす影響	90
4-3	結論	92
VII	総括	94
	(背景と目的)	94
	(方法と結果)	95
	(結論)	98
	引用文献	100



## I. 緒論

薬物の循環器系に対する長期作用に関する研究では、主として動物モデルが用いられる。しかし *in vivo* の動物実験では、薬物の複雑な生体内動態や個体差がデータや作用点の解釈を困難にしている。一方、*in vitro* の培養細胞系では、薬物の細胞に対する直接的な作用を検討でき実験条件のコントロールも容易である。しかし生体内でみられる組織構築が失われ、通常組織特異的な細胞の機能を完全には保持していない。さらに急性摘出血管では組織構築は維持されているが、通常長期作用の検討は困難である。血管組織の器官培養法は、*in vivo* の複雑な因子の関与を取り除くことが可能であり、血管の組織構築を維持したままで分化した細胞機能を保持していることから、種々の生理活性物質や薬物の長期作用を検討する上で有用な実験系である[53]。これまでに当研究室の山脇らは、ウサギ摘出前腸間膜動脈を7日間無血清培地で器官培養した後も血管組織は、薬物の長期作用を検討するのに十分な平滑筋収縮張力やインタクトな組織形態を保持すること、さらに内皮依存性弛緩機能も維持することを明らかにし、ウサギ摘出前腸間膜動脈標本を用いた器官培養法を確立した[68-70]。その後、本法を用いて種々の生理活性物質や薬物の長期作用が検討され現在も汎用されている[24, 25, 47, 48, 50, 58]。ラットは、その大きさから飼育管理や血管を含む小器官の取り扱いが容易であり、生理学や薬理学など幅広い分野で研究に用いられている。ラットのゲノムはおよそ90%以上がすでに解読されており、その遺伝子の大多数はヒトおよびマウスの遺伝子と対応している[17]。また遺伝的均一性を持つ近交系やミュータント系が確立されていることから、動物実験の信頼性や再現性を高めることが可能であり、ラット摘出血管組織の器官培養への利用は有用性が高いと考えられる。しかし、抵抗血管であるラット前腸間膜動脈を用いた長期間(3-5日)の器官培養による血管機能(収縮性)の変化を検討した報告はこれまでのところほとんどない[2, 13, 59]。そこで本研究では最初に、ラット前腸間膜動脈標本を無血清培地で3日間器官培養した後、血管収縮性と形態の変化を調べ、ラット前腸間膜動脈による器官培養法を確立するこ

とを第一の目的とした(第一章)。

器官培養法を利用して慢性血管疾患の病態機序を検討することが可能である。実際これまでに高血圧症や動脈硬化症といった慢性血管疾患の病態機序を検討する目的で牛胎児血清(fetal bovine serum: FBS)、platelet-derived growth factor (PDGF)-BB、endothelin (ET)-1 などを無血清培地に添加、又は血管組織を低酸素に曝露して器官培養した後、内皮依存性弛緩反応、平滑筋収縮張力および血管の構造的変化が検討されている。例えば FBS (10%)あるいは PDGF-BB (100 ng/ml)を無血清培地に添加し 7 日間器官培養したウサギ前腸間膜動脈では内皮細胞の endothelial nitric oxide synthetase (eNOS) mRNA 発現量が減少することにより内皮依存性弛緩反応が減弱することが明らかにになり、慢性血管疾患時における増殖因子の内皮機能に対する直接作用の機序が解明された[68, 69]。また FBS (10%)を添加し 7 日間器官培養したウサギ前腸間膜動脈では中膜平滑筋細胞の増殖、配列の不整、細胞死などの形態的变化により KCl や noradrenaline (NA)による収縮張力が減弱することが明らかにされた[70]。さらに PDGF-BB と ET-1 を共に添加し 4 日間器官培養したラット尾動脈において extracellular signal-regulated kinase (ERK)1/2、Akt および mammalian target of rapamycin (mTOR)の活性化を介して中膜平滑筋層が肥厚するとともに KCl や NA による収縮張力が減弱することが明らかにされた[24]。FBS (10%)又は PDGF-BB と ET-1 を共に添加して器官培養したウサギ前腸間膜動脈(7 日間)およびラット尾動脈(4-5 日間)では顕著な血管壁の肥厚が誘導されることから、本法を用いた血管肥厚モデルとしての有用性も示された[47, 58]。さらに低酸素(5% O<sub>2</sub>)下でウサギ肺内肺動脈を 7 日間器官培養することで、低酸素曝露下の血管内皮依存性弛緩反応障害の機序が明らかにされた[49]。増殖因子は高血圧症やアテローム性動脈硬化症などの慢性疾患時に血管壁から分泌され、血管内皮細胞や平滑筋細胞の脱分化・増殖を引き起こし血管壁の構造的変化(リモデリング)を引き起こす。しかしながらラット摘出前腸間膜動脈における増殖因子長期処置の血管機能および構造に及ぼす影響は検討されていない。したがって本研究では、様々な増

殖因子を含む FBS を無血清培地に添加して長期間(3 日間)器官培養したラット前腸間膜動脈における血管収縮性(第二章)と内皮依存性弛緩反応(第三章)の変化を検討することを第二の目的とした。

このように血管を生体外で長期間維持するためにはこれまでのところ無血清培地での器官培養法が最も適していると考えられている。しかしこれまでに無血清培地で器官培養(6 時間-2 日間)したラット前腸間膜動脈平滑筋において ERK1/2 あるいは protein kinase C (PKC)シグナル活性化を介して 5-hydroxytryptamine (HT)<sub>2A</sub> 受容体、エンドセリン ET<sub>B</sub> 受容体、 $\alpha_{1A}$  アドレナリン受容体発現が増加することが報告されている[1, 9, 31, 62, 63]。また無血清培地で 7 日間器官培養したウサギ前腸間膜動脈において KCl および NA による収縮張力の感受性が増加することも報告されている[70]。このように無血清培地における器官培養血管においても収縮張力や感受性の変化、受容体発現や細胞内情報伝達系などが変化することから、急性摘出血管とは異なる性質を保持している。そこでより生体内で見られる機能を維持した血管の器官培養法を確立するために無血清培地での器官培養後生じる機能変化の詳細メカニズムを検討することを第三の目的とした。具体的には、内皮依存性弛緩反応減弱の機序(第四章)および KCl による収縮張力減弱の機序(第五章)を検討した。

本研究ではラット摘出前腸間膜動脈の無血清培地での器官培養法を初めて確立するとともに(第一章)に、FBS 長期処置の血管平滑筋の収縮性(第二章)と血管内皮依存性弛緩反応(第三章)に及ぼす影響とその機序を明らかにした。更に無血清培地での長期間の器官培養が引き起こす血管内皮(第四章)および平滑筋(第五章)における機能変化の機序の一端を明らかにした。結論としてラット前腸間膜動脈の器官培養法は薬物の長期作用を検討できる有用な系と考えられるが、今後より生体内で見られる機能を維持した器官培養法を確立するためには、無血清培地での器官培養により引き起こされる血管の機能変化の機序を更に詳細に検討することが重要であると考えられる。



## II. 第一章

### 1. 緒論

血管組織の器官培養法は、*in vivo* の複雑な因子の関与を取り除くことが可能であり、また *in vitro* の培養細胞系とは異なり血管の組織構築を維持したまま細胞機能を保持していることから、種々の生理活性物質や薬物の長期作用を見る上で有用な実験系であると考えられ、これまでウサギ摘出前腸間膜動脈標本を用いた無血清培地での器官培養法が確立されている[25, 47-49, 68-70]。ラット摘出血管組織の器官培養への利用は有用性が高いと考えられるが抵抗血管であるラット前腸間膜動脈を用いた長期間(3-5 日)の器官培養による血管機能(収縮性)の変化を検討した報告はこれまでのところ限られている[2, 13, 59]。

そこで本研究は最初に、ラット前腸間膜動脈標本を無血清培地で培養した後、血管収縮性と形態の変化を調べ、ラット前腸間膜動脈における器官培養法を確立することを目的とした。

## 2. 材料および方法

### 2-1 実験材料

6-12 週齢の雄性ウィスターラット(205-385 g)にウレタン(1.5 g/kg)を腹腔内投与し深麻酔した後、放血により安楽死させた。前腸間膜動脈を無菌的に摘出し、滅菌した Tris-buffered saline (TBS)中で脂肪および結合組織を除去した。長さ 2 mm、直径 1 mm のリング状の内皮(Endothelium)保持(E (+))あるいは剥離(E (-))標本を作製し器官培養および等尺性収縮張力測定に用いた。E (-)標本は血管内腔をピンセットの平らな面で軽く擦る事により作製した。標本は 1% Penicillin-Streptomycin を添加した無血清の Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) 2 ml 中で、37 °C、5% CO<sub>2</sub>下で 3 日間器官培養した(0% serum)。摘出直後の標本(Fresh)は非無菌的条件下で作製した。動物の取り扱いについては‘北里大学における動物実験と動物の飼養および保管などに関する規定’に従い適切に行った。

### 2-2 張力測定法

標本の張力測定は正常栄養液中で行った。正常栄養液の組成を以下に示す (mM); 136.9 NaCl, 5.4 KCl, 1.5 CaCl<sub>2</sub>, 1.0 MgCl<sub>2</sub>, 23.8 NaHCO<sub>3</sub>, 5.5 glucose, 0.001 ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)。等張性高濃度 KCl 液(72.7 mM)は NaCl と同じ濃度の KCl を置換する事により作製した。これらの栄養液は 36.5 °C に保ち、95% O<sub>2</sub> と 5% CO<sub>2</sub> の混合ガスを通気して pH を 7.4 に保った。平滑筋の収縮張力は張力トランスデューサー(Nihon Kohden, Tokyo Japan)により等尺性に測定し、PowerLab システム(AD INSTRUMENTS, Della Vista, NSW, Australia)を用いてコンピューター内に記録した[44, 52]。それぞれの標本は正常栄養液を満たした容量 3 ml のマグヌス管内で静止張力 0.5 g を負荷し 30 分間静置した。実験は高濃度 KCl 液を繰り返し投与し、収縮張力が一定になった後(45-60 分後)に開始した。各アゴニストの濃度反応曲線は累積投与により求

めた。

### 2-3 組織形態学的検索

血管標本を 10%中性リン酸緩衝ホルマリン溶液で 12 時間固定した後パラフィンで包埋した。厚さ 4  $\mu\text{m}$  の薄切切片を作製しヘマトキシリン・エオジン (H&E)染色した後、光学顕微鏡 BX-51 (Olympus, Tokyo, Japan)下で観察した。

### 2-4 使用薬物

NA、ET-1、5-HT、DMEM (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)、Penicillin-Streptomycin (Invitrogen/GIBCO, Carlsbad, CA, USA)。5-HT は 0.1 N HCl を用いて溶かした。他の薬物は蒸留水で溶かした。

### 2-5 統計処理

実験成績は平均値 $\pm$ 標準誤差で示した。統計評価は分散分析(one-way analysis of variance (ANOVA))した後に、多重比較として全ての二群同士の比較(Bonferroni's test)を行って評価した。また、危険率( $p$  値)が 5%未満の場合に有意差ありとした。アゴニストの 50%有効濃度( $\text{EC}_{50}$ )は SigmaPlot software (Jandel Scientific, Richmond, CA, USA)を用いてシグモイドカーブフィッティングにより求めた。全ての  $\text{pD}_2$  値は  $-\log_{10}\text{EC}_{50}$  により求めた。

### 3. 実験成績

#### 3-1 E (+)器官培養ラット前腸間膜動脈標本における NA による収縮張力の変化

E (+) fresh において、NA (1 nM-1  $\mu$ M)の累積投与により濃度依存性の収縮反応が得られた。NA (1  $\mu$ M)による最大張力は  $1.61 \pm 0.18$  g/mg wet weight (w.w.) (n=28、図 1A)であった。E (+) 0% serum の NA (1  $\mu$ M)による最大張力は E (+) fresh と比較し減弱傾向を示したが有意な差はなかった( $0.93 \pm 0.18$  g/mg w.w., n=10、図 1A)。E (+) 0% serum の NA (1 nM-1  $\mu$ M)に対する濃度反応曲線は最大張力で補正した時、E (+) fresh と比較して有意に左方移動した( $pD_2=7.04$ 、E (+) fresh vs. 7.86、E (+) 0% serum、 $p<0.01$ 、図 1B)。

#### 3-2 E (-)器官培養ラット前腸間膜動脈標本における NA による収縮張力の変化

E (-) fresh において、NA (1 nM-1  $\mu$ M)の累積投与により濃度依存性の収縮反応が得られた。NA (1  $\mu$ M)による最大張力は  $1.59 \pm 0.17$  g/mg w.w. (n=26、図 2A)であった。E (-) 0% serum の NA (1  $\mu$ M)による最大張力は E (-) fresh と比較し有意に減弱した( $1.01 \pm 0.24$  g/mg w.w., n=18、 $p<0.05$ 、図 2A)。E (-) 0% serum の NA (1 nM-1  $\mu$ M)に対する濃度反応曲線は、E (-) fresh と比較して有意に左方移動した ( $pD_2=7.19$ 、E (-) fresh vs. 7.67、E (-) 0% serum、 $p<0.01$ 、図 2B)。

#### 3-3 E (+)器官培養ラット前腸間膜動脈標本における ET-1 による収縮張力の変化

E (+) fresh において、ET-1 (0.1-30 nM)の累積投与により濃度依存性の収縮反応が得られた。ET-1 (30 nM)による最大張力は  $2.46 \pm 0.31$  g/mg w.w. (n=11、図 3A)であった。E (+) 0% serum の ET-1 (30 nM)による最大張力は E (+) fresh と比較し減弱傾向を示したが有意な差はなかった( $1.78 \pm 0.27$  g/mg w.w., n=14、図 3A)。E (+) 0% serum の ET-1 (0.1-30 nM)に対する濃度反応曲線は E (+) fresh と比較し左方移動したものの有意



な差はなかった( $pD_2=8.07$ 、E (+) fresh vs. 8.26、E (+) 0% serum、図 3B)。

#### 3-4 E (-)器官培養ラット前腸間膜動脈標本における ET-1 による収縮張力の変化

E (-) fresh において、ET-1 (0.1-30 nM)の累積投与により濃度依存性の収縮反応が得られた。ET-1 (30 nM)による最大張力は  $2.98 \pm 0.33$  g/mg w.w. (n=18、図 4A)であった。E (-) 0% serum の ET-1 (30 nM)による最大張力は E (-) fresh と比較し減弱傾向を示したが有意な差はなかった( $2.23 \pm 0.47$  g/mg w.w.、n=10、図 4A)。E (-) 0% serum の ET-1 (0.1-30 nM)に対する濃度反応曲線は E (-) fresh と比較し左方移動したものの有意な差はなかった( $pD_2=8.17$ 、E (-) fresh vs. 8.36、E (-) 0% serum、図 4B)。

#### 3-5 E (+)器官培養ラット前腸間膜動脈標本における 5-HT による収縮張力の変化

E (+) fresh において、5-HT (30 nM-30  $\mu$ M)の累積投与により濃度依存性の収縮反応が得られた。5-HT (10  $\mu$ M)による最大張力は  $1.51 \pm 0.25$  g/mg w.w. (n=15、図 5A)であった。E (+) 0% serum の 5-HT (100  $\mu$ M)による最大張力は E (+) fresh と比較し減弱傾向を示したが有意な差はなかった( $1.19 \pm 0.15$  g/mg w.w.、n=8、図 5A)。E (+) 0% serum の 5-HT (30 nM-100  $\mu$ M)に対する濃度反応曲線は E (+) fresh と比較して有意に右方移動した( $pD_2=5.56$ 、E (+) fresh vs. 5.18、E (+) 0% serum、 $p<0.01$ 、図 5B)。

#### 3-6 E (-)器官培養ラット前腸間膜動脈標本における 5-HT による収縮張力の変化

E (-) fresh において、5-HT (30 nM-30  $\mu$ M)の累積投与により濃度依存性の収縮反応が得られた。5-HT (10  $\mu$ M)による最大張力は  $1.71 \pm 0.23$  g/mg w.w. (n=15、図 6A)であった。E (-) 0% serum の 5-HT (100  $\mu$ M)による最大張力は E (-) fresh と比較し減弱傾向を示したが有意な差ではなかった( $1.11 \pm 0.20$  g/mg w.w.、n=8、図 6A)。E (-) 0% serum の 5-HT (30 nM-100  $\mu$ M)に対する濃度反応曲線は E (-) fresh と比較して有意に右方移動した( $pD_2=6.10$ 、E (-) fresh vs. 5.09、E (-) 0% serum、 $p<0.01$ 、図 6B)。



### 3-7 器官培養ラット前腸間膜動脈標本の組織形態学的変化

ラット前腸間膜動脈標本における3日間の無血清培地での器官培養による形態学的変化をH&E染色により検討した。E(+), E(-) freshの中膜では平滑筋細胞が規則正しく配列しており、核の形状は概ね扁平であった(図7a、b、n=4)。E(+), E(-) 0% serumはfreshと比較し、中膜平滑筋層が軽度に粗鬆化した(図7c、d、n=4)。

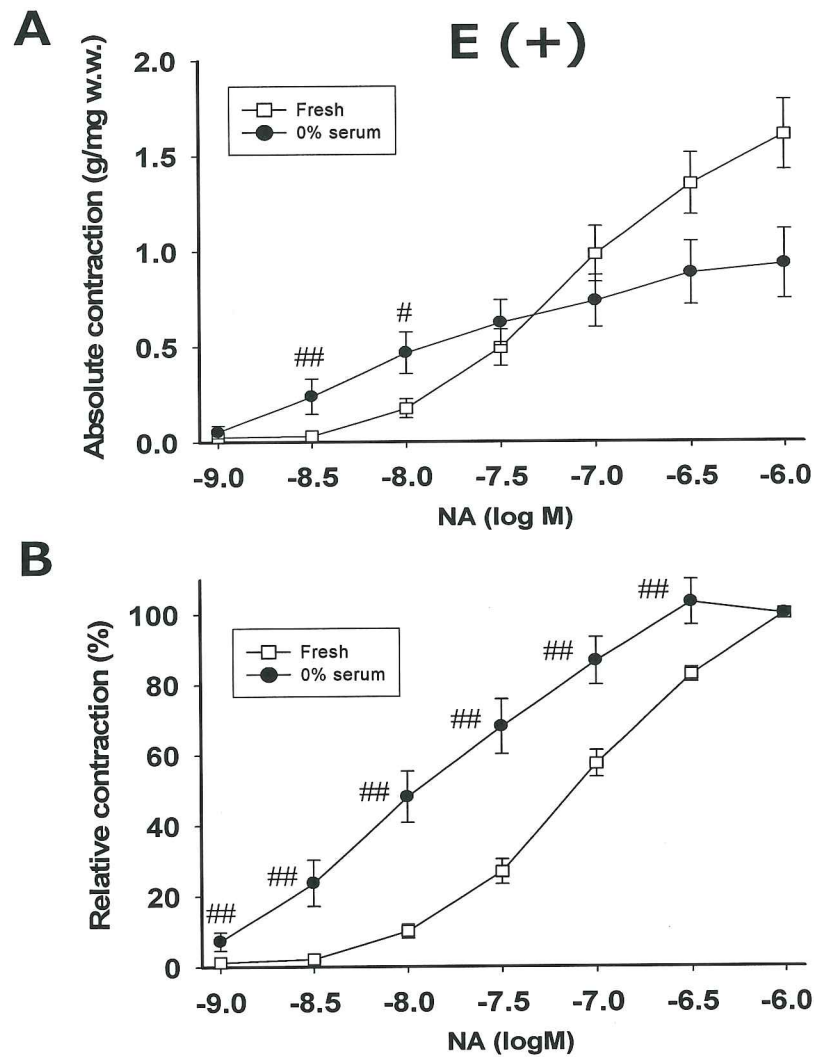


図1 内皮保持(E(+))ラット前腸間膜動脈標本における noradrenaline (NA)による絶対張力(A)と相対張力(B)に及ぼす無血清培地での器官培養の影響

摘出直後の標本を Fresh、3日間無血清培地で器官培養した標本を 0% serum とした。絶対張力は標本の湿重量で補正した(g/mg tissue wet weight (w.w.)) (A)。相対張力は、各標本における NA (1  $\mu$ M)による最大張力を 100%として標準化した(B)。NA (1 nM-1  $\mu$ M)は累積投与した。

#, ##:  $p < 0.05$  and  $0.01$  vs. Fresh.

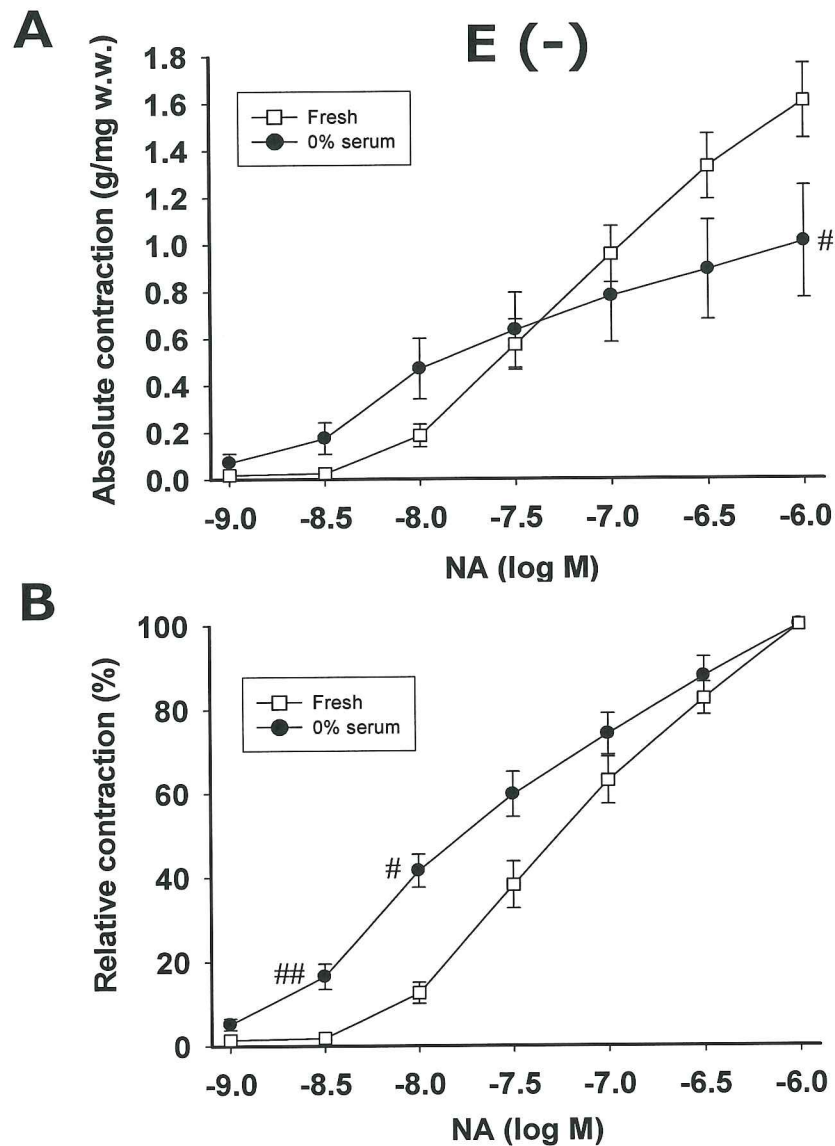


図2 内皮剥離(E (-))ラット前腸間膜動脈標本における NA による絶対張力(A)と相対張力(B)に及ぼす無血清培地での器官培養の影響

摘出直後の標本を Fresh、3 日間無血清培地で器官培養した標本を 0% serum とした。絶対張力は標本の湿重量で補正した(g/mg w. w.) (A)。相対張力は、各標本における NA (1  $\mu$ M) による最大張力を 100% として標準化した(B)。NA (1 nM-1  $\mu$ M) は累積投与した。  
#, ##:  $p < 0.05$  and  $0.01$  vs. Fresh.

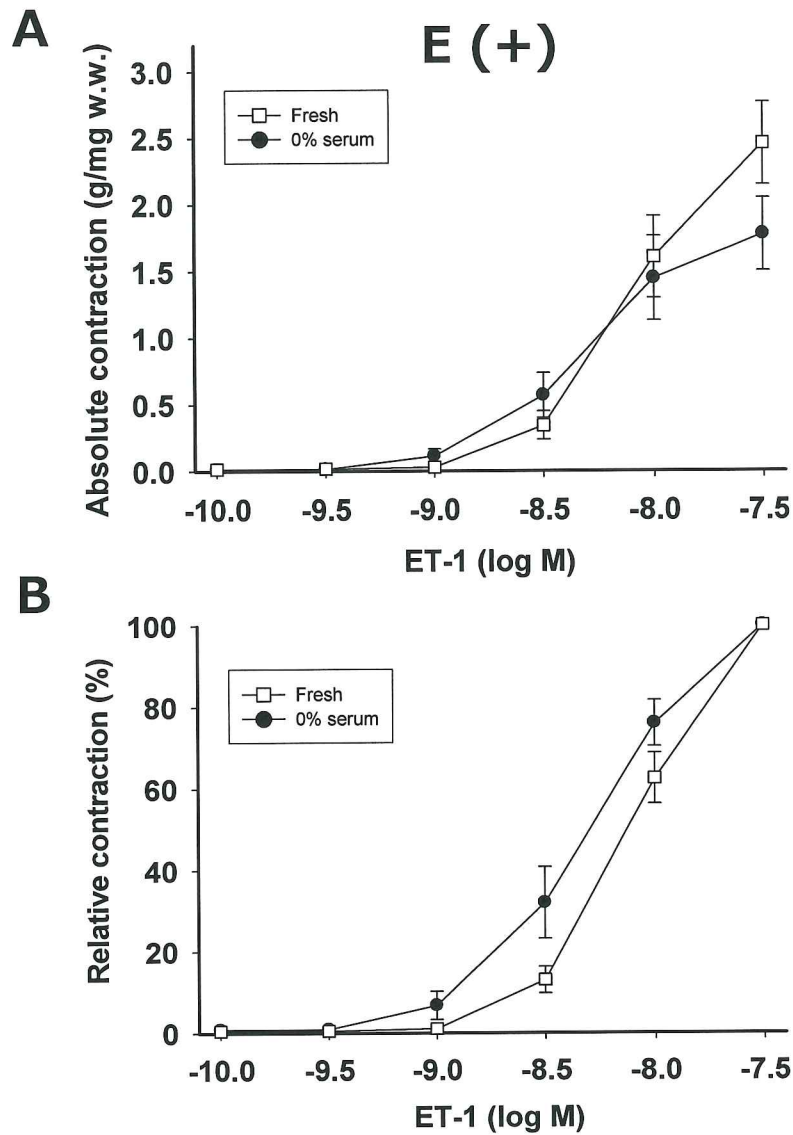


図3 E (+)ラット前腸間膜動脈標本における endothelin (ET)-1 による絶対張力(A)と相対張力(B)に及ぼす無血清培地での器官培養の影響

摘出直後の標本を Fresh、3 日間無血清培地で器官培養した標本を 0% serum とした。絶対張力は標本の湿重量で補正した (g/mg w. w.) (A)。相対張力は、各標本における ET-1 (30 nM)による最大張力を 100%として標準化した(B)。ET-1 (0.1-30 nM)は累積投与した。

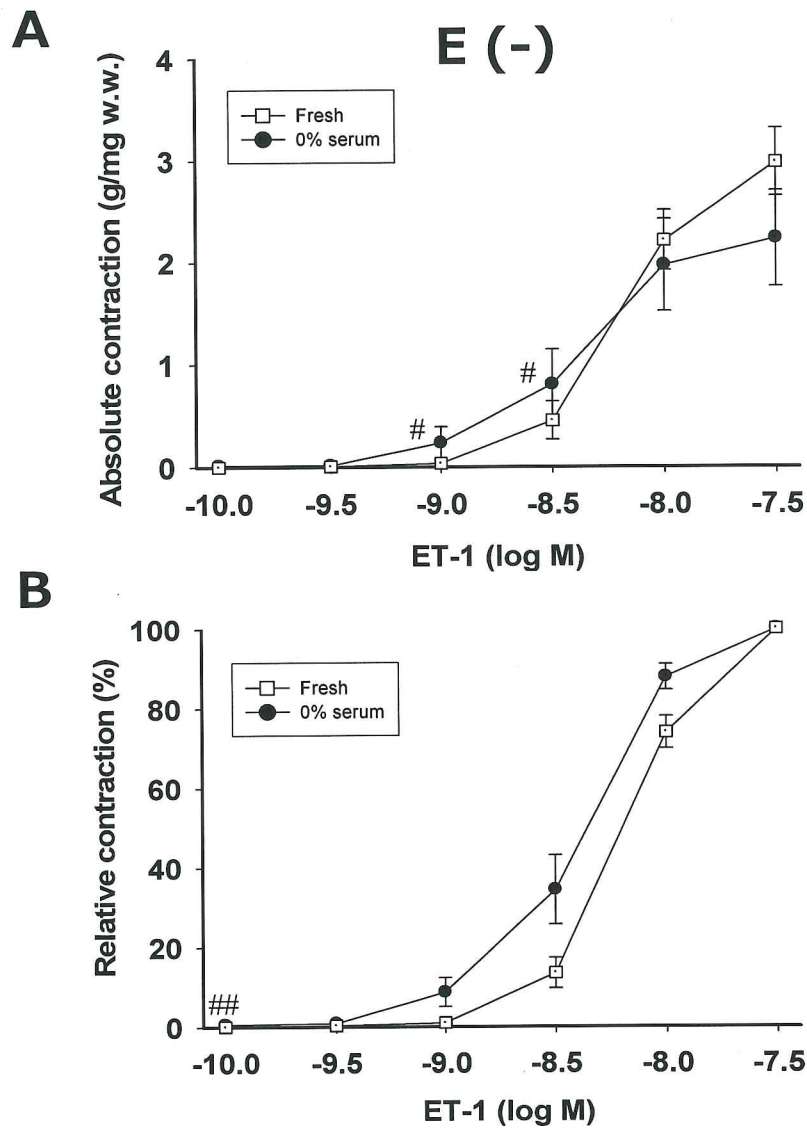


図4 E(-)ラット前腸間膜動脈標本における ET-1 による絶対張力(A)と相対張力(B)に及ぼす無血清培地での器官培養の影響

摘出直後の標本を Fresh、3 日間無血清培地で器官培養した標本を 0% serum とした。絶対張力は標本の湿重量で補正した(g/mg w. w.) (A)。相対張力は、各標本における ET-1 (30 nM)による最大張力を 100%として標準化した(B)。ET-1 (0.1-30 nM)は累積投与した。  
#, ##:  $p < 0.05$  and  $0.01$  vs. Fresh.

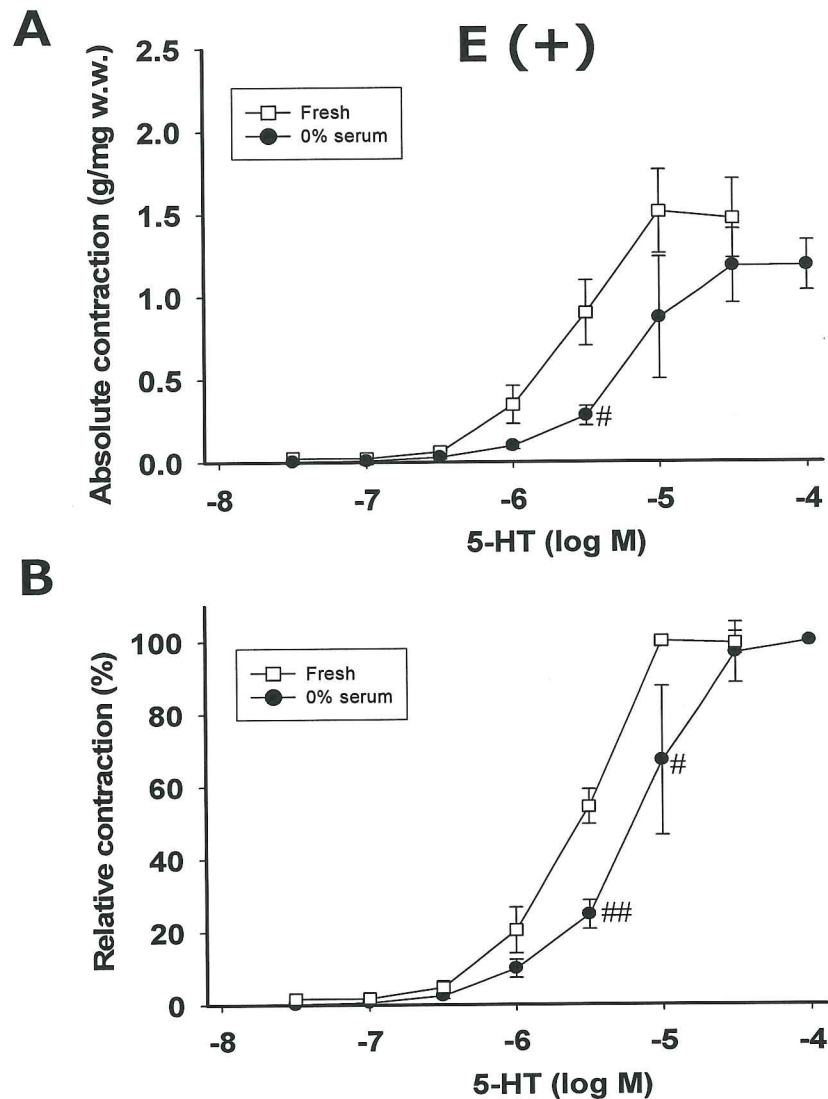


図5 E(+)ラット前腸間膜動脈標本における 5-hydroxytryptamine (5-HT)による絶対張力(A)と相対張力(B)に及ぼす無血清培地での器官培養の影響

摘出直後の標本を Fresh、3 日間無血清培地で器官培養した標本を 0% serum とした。絶対張力は標本の湿重量で補正した(g/mg w. w.) (A)。相対張力は、各標本における 5-HT (Fresh: 10  $\mu$ M、0% serum: 100  $\mu$ M) による最大張力を 100%として標準化した(B)。5-HT (30 nM-100  $\mu$ M)は累積投与した。#, ##:  $p < 0.05$  and  $0.01$  vs. Fresh.

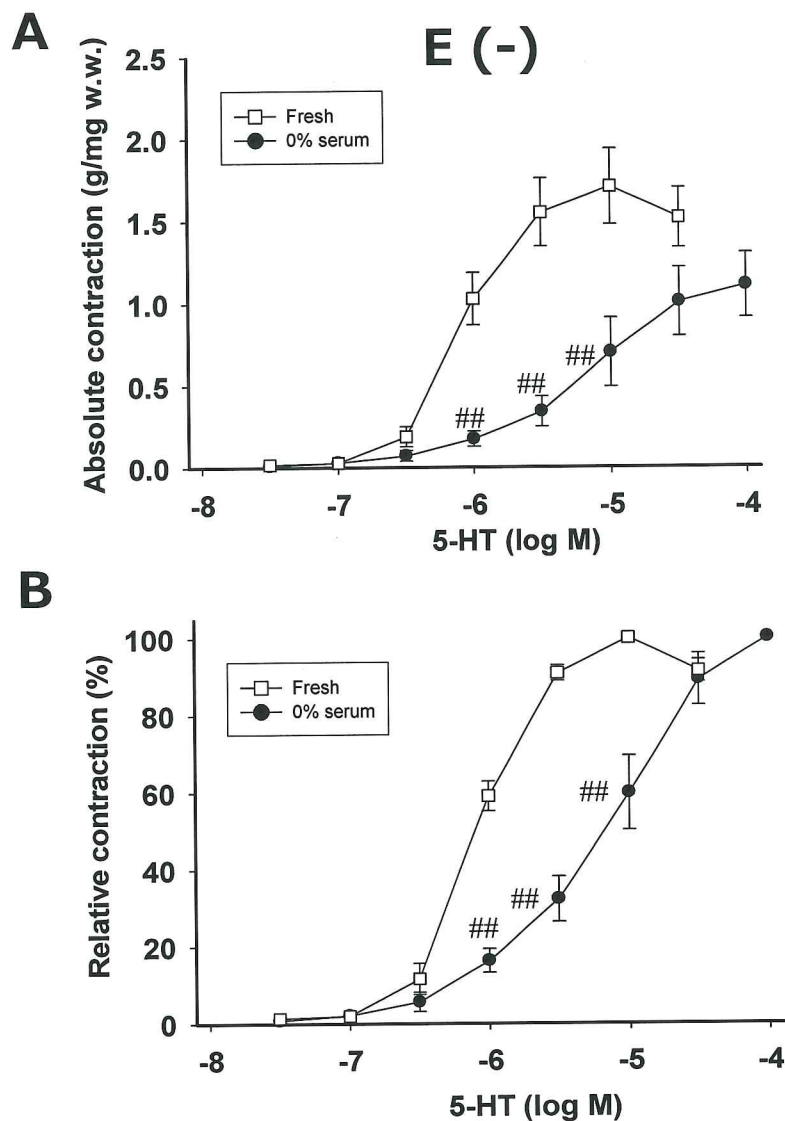


図6 E(-)ラット前腸間膜動脈標本における5-HTによる絶対張力(A)と相対張力(B)に及ぼす無血清培地での器官培養の影響

摘出直後の標本を Fresh、3 日間無血清培地で器官培養した標本を 0% serum とした。絶対張力は標本の湿重量で補正した(g/mg w. w.) (A)。相対張力は、各標本における 5-HT (Fresh: 10  $\mu$ M、0% serum: 100  $\mu$ M)による最大張力を 100%として標準化した(B)。5-HT (30 nM-100  $\mu$ M)は累積投与した。#, ##:  $p < 0.05$  and  $0.01$  vs. Fresh.



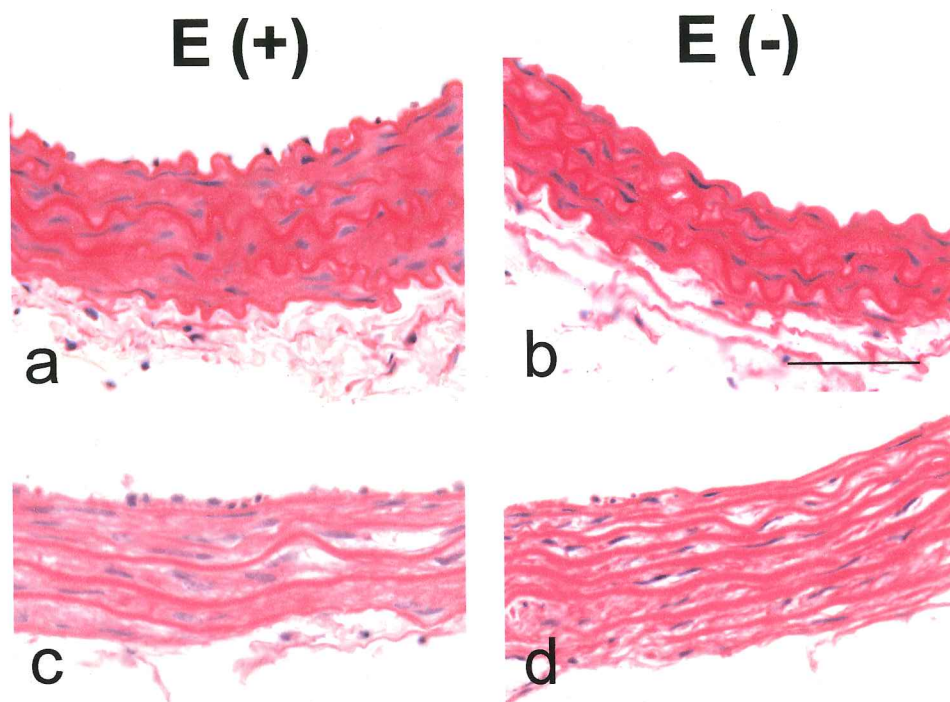


図7 E (+)、E (-)ラット前腸間膜動脈標本のヘマトキシリン・エオジン (H&E) 染色像

a, b; 摘出直後の標本(Fresh)、c, d; 無血清培地で3日間器官培養した標本(0% serum)、a, c; E (+)標本、b, d; E (-)標本。スケールバー=50  $\mu$ m.



## 4. 考察

### 4-1 まとめ

本章では、ラット前腸間膜動脈の3日間の無血清培地での器官培養による血管収縮性および組織形態の変化について検討し以下のことを明らかにした。1) E (+) 標本において 0% serum の NA、ET-1 および 5-HT による最大張力の大きさは fresh と比較して同程度であった、2) E (-) 標本において 0% serum の ET-1 および 5-HT による最大張力の大きさは fresh と比較して同程度であった。一方、E (-) 0% serum の NA による最大張力は fresh と比較し有意に減弱したものの、その減少率は 36 % と軽度にとどまった、3) E (+)、(-) 標本ともに、0% serum の NA および ET-1 に対する濃度反応曲線は fresh と比較し左方移動した、4) E (+)、(-) 標本ともに 0% serum の 5-HT に対する濃度反応曲線は fresh と比較し右方移動した、5) 組織形態学的検索から E (+)、(-) 標本ともに 0% serum は fresh と比較し中膜平滑筋層が軽度に粗鬆化したが組織形態は維持されていた。以上の結果をまとめると、無血清培地における3日間の器官培養ラット前腸間膜動脈標本は薬物の長期作用を検討するのに十分な収縮張力を保っていると言える。

### 4-2 無血清培地での器官培養が血管収縮性に及ぼす影響

本章では、0% serum の NA および ET-1 に対する収縮張力の感受性が fresh と比較し増強することを明らかにした。同様にウサギ摘出前腸間膜動脈の無血清培地での器官培養(7日)後に NA に対する収縮力の感受性が上昇することが報告されている [70]。またラット前腸間膜動脈の器官培養(1日)後にエンドセリン ET<sub>B</sub> 受容体アゴニストであるサラフトキシシン 6c に対する収縮力の感受性が fresh と比較し増強するという報告がある [30, 39] [62, 63]。これらの原因として、1) 各アゴニストに対する受容体数の増加、2) 細胞内情報伝達系の活性化(チロシンキナーゼや PKC など)、3) K<sup>+</sup>チャネル

の発現減少および機能低下、又は電位依存性  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルや transient receptor potential canonical channel (TRPC) 発現レベルの増加あるいは機能の活性化などによる静止膜電位の上昇、4) 活性酸素種 (reactive oxygen species (ROS)) 産生、などが考えられる。これまでに無血清培地での器官培養によるアゴニストに対する受容体発現レベルの増加については、 $\alpha_{1A}$  アドレナリン受容体 [9] や  $\text{ET}_B$  受容体 [30, 39, 62, 63] のアップレギュレーションが器官培養 (1 日) ラット前腸間膜動脈で報告されている。また細胞内情報伝達系の活性化に関しては、ラット前腸間膜動脈を 2-3 日間器官培養した後、非受容体型チロシンキナーゼの 1 つである src キナーゼ依存性に NA による収縮力が増強することが報告されている [59]。一方、イオンチャンネル発現の変化については、TRPC-6 の mRNA およびタンパク質発現レベルの増加が 2-3 日間器官培養したラット前腸間膜動脈において報告されている [59]。また血管種は異なるが 4 日間器官培養したラット肺内肺動脈において、遅延整流性  $\text{K}^+$  電流やバックグラウンド  $\text{K}^+$  電流の電流密度およびこれらの電流に関与すると考えられる電位依存性  $\text{K}^+$  チャンネルである  $\text{Kv}1.5$ 、 $\text{Kv}2.1$  や酸感受性バックグラウンド  $\text{K}^+$  チャンネルの mRNA 発現レベルが著しく減少することが報告されている [35]。30 mM KCl を DMEM 培地に添加して 2 日間器官培養したラット腎動脈では、L 型  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルの  $\alpha_{1C}$  サブユニットの発現増加、L 型  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネル電流の増加、そして  $\text{Ca}^{2+}$  依存性収縮張力の増加が報告されている [54]。データには示さなかったが、0% serum における KCl (10-72 mM) に対する濃度反応曲線は fresh と比較して左方移動したことから ( $n=2-3$ )、器官培養したラット前腸間膜動脈においても静止膜電位の上昇が示唆される。最後に、ROS 産生については、14 時間低濃度 (1%) FBS 存在下で器官培養したラット前腸間膜動脈において acetylcholine (ACh) や sodium nitroprusside (SNP) による弛緩反応が減弱し、スーパーオキシドアニオン除去薬、nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) 酸化酵素 (NOX) 阻害薬およびキサンチン酸化酵素阻害薬がこれを改善するという報告がある [22]。したがって器官培養により ROS が産生されることが示唆される。データには示さなかったが、ROS 除去

薬である tempol (0.1  $\mu$ M)は、0% serum の NA および ET-1 に対する収縮張力の感受性増加を抑制しなかった為(n=3)、本実験において ROS は収縮感受性増加の原因ではないと考えられる。一方で本研究において、0% serum の 5-HT に対する収縮張力の感受性が fresh と比較して低下することを明らかにした。ラット前腸間膜動脈において、無血清培地での器官培養(1 日)により 5-HT に対する収縮張力の感受性が増強し、これは 5-HT<sub>2A</sub> 受容体発現のアップレギュレーションにより起こることが示唆されている[8, 31]。しかし本研究の結果から、0% serum において、fresh で収縮に関与する受容体サブタイプがむしろダウンレギュレーションすることが推察される。

本研究では、0% serum の NA、ET-1 および 5-HT による最大張力は fresh と比較して十分に保持されているものの、やや減弱傾向であることが観察された。これまで同様に、7 日間無血清培地で器官培養したウサギ前腸間膜動脈 [70]および 4 日間無血清培地で器官培養したラット尾動脈 [28]において NA による最大張力が fresh と比較して減弱することが報告がされている。組織形態学的検索から 0% serum は fresh と比較して中膜平滑筋層の軽度の粗鬆化が観察されたことから、本研究(3 日間の器官培養)で見られた 0% serum における最大収縮力低下の原因の一部として、収縮蛋白質発現レベルが異化作用により経時的に減少したことが考えられる。

#### 4-3 結論

結論として、本章では無血清培地において 3 日間器官培養した後もラット前腸間膜動脈は薬物の長期作用を検討するのに十分な収縮張力を保持することを初めて明らかにした。組織形態学的検索から 0% serum は fresh に近い形態を保つものの、その中膜の軽度の粗鬆化により最大張力が fresh と比べ減弱傾向を示すと考えられた。本研究は、3 日間の器官培養ラット前腸間膜動脈の血管収縮性及び形態学的変化を調べた数少ない報告の 1 つであり、器官培養が血管収縮性に及ぼす影響とメカニズムの一端を明らかにした。本研究の成果により、収縮型平滑筋を維持した状態でのラット前

腸間膜動脈における薬物の長期作用の検討が可能となり、今後高血圧症や動脈硬化症で見られる血管病変の発症メカニズムを薬理的、病理学的に検討できるかもしれない。



### III. 第二章

#### 1. 緒論

高血圧症やアテローム性動脈硬化症などの血管壁リモデリングが生じる慢性疾患時には、血管壁から様々な増殖因子が分泌され、血管内皮細胞や平滑筋細胞の脱分化・増殖を引き起こすと考えられている。また、増殖因子が血管組織に慢性的に作用する結果、その構造を変化させるとともに機能障害を引き起こす[57]。急性摘出血管ではこのように慢性的に作用する増殖因子の血管組織構築や収縮機能に対する作用や機序の検討ができない。第一章では3日間の器官培養後もラット前腸間膜動脈は薬物の長期作用を検討するのに十分な収縮張力と組織形態を維持していることを明らかにし、無血清培地での器官培養法を確立した。そこで本章では、様々な増殖因子を含むFBSを無血清培地に添加して3日間器官培養したラット前腸間膜動脈の血管収縮性と組織形態の変化を検討した。

## 2. 材料および方法

### 2-1 実験材料

II. 2-1 実験材料に記した通り 6-12 週齢の雄性ウィスターラット(205-385 g)から前腸間膜動脈を無菌的に摘出し、E (+)あるいは E (-)標本を作成した。標本は 10% FBS 存在下(FBS)あるいは非存在下(0% serum)で、1% Penicillin-Streptomycine を添加した 2 ml の DMEM 中で、37°C、5% CO<sub>2</sub> 下で 3 日間器官培養した。動物の取り扱いについては‘北里大学における動物実験と動物の飼養および保管などに関する規定’に従い適切に行った。

### 2-2 張力測定法

II. 2-2 張力測定法の項を参照。

### 2-3 組織形態学的検索

II. 2-3 組織形態学的検索の項を参照。

### 2-4 使用薬物

NA、ET-1、5-HT、DMEM (Sigma-Aldrich、St. Louis、MO、USA)、Penicillin-Streptomycin、FBS (Invitrogen/GIBCO、Carlsbad、CA、USA)。5-HT は 0.1 N HCl を用いて溶かした。他の薬物は蒸留水で溶かした。

### 2-5 統計処理

II. 2-5 統計処理の項を参照。

### 3. 実験成績

#### 3-1 FBS 長期処置の E (+) 器官培養ラット前腸間膜動脈標本における NA による収縮張力に及ぼす影響

E (+) 0% serum において、NA (1 nM-1  $\mu$ M) の累積投与により濃度依存性の収縮反応が得られた。NA (1  $\mu$ M) による最大張力は  $0.93 \pm 0.18$  g/mg w.w. (n=10、図 8A) であった。E (+) FBS の NA (1  $\mu$ M) による最大張力は、E (+) 0% serum と比較し増強傾向を示したが有意な差ではなかった ( $1.23 \pm 0.28$  g/mg w.w., n= 8、図 8A)。E (+) FBS の NA (1 nM-1  $\mu$ M) に対する濃度反応曲線は最大張力で補正した時、E (+) 0% serum と比較して変化がなかった ( $pD_2=7.88$ 、E (+) FBS vs. 7.86、E (+) 0% serum、図 8B)。

#### 3-2 FBS 長期処置の E (-) 器官培養ラット前腸間膜動脈標本における NA による収縮張力に及ぼす影響

E (-) 0% serum において、NA (1 nM-1  $\mu$ M) の累積投与により濃度依存性の収縮反応が得られた。NA (1  $\mu$ M) による最大張力は  $1.01 \pm 0.24$  g/mg w.w. (n=18、図 9A) であった。E (-) FBS の NA (1  $\mu$ M) による最大張力は、E (-) 0% serum と比較し減弱傾向を示したが有意な差ではなかった ( $0.55 \pm 0.15$  g/mg w.w., n=18、図 9A)。E (-) FBS の NA (1 nM-1  $\mu$ M) に対する濃度反応曲線は E (-) 0% serum と比較して変化がなかった ( $pD_2=8.16$ 、E (-) FBS vs. 7.67、E (-) 0% serum、図 9B)。

#### 3-3 FBS 長期処置の E (+) 器官培養ラット前腸間膜動脈標本における ET-1 による収縮張力に及ぼす影響

E (+) 0% serum において、ET-1 (0.1-30 nM) の累積投与により濃度依存性の収縮反応が得られた。ET-1 (30 nM) による最大張力は  $1.78 \pm 0.27$  g/mg w.w. (n=14、図 10A) であった。E (+) FBS の ET-1 (30 nM) による最大張力は、E (+) 0% serum と比較し有意

に増強した( $2.83 \pm 0.33$  g/mg w.w.,  $n=12$ ,  $p<0.05$ , 図 10A)。E (+) FBS の ET-1 (0.1-30 nM) に対する濃度反応曲線は E (+) 0% serum と比較して変化がなかった ( $pD_2=8.17$ , E (+) FBS vs. 8.26, E (+) 0% serum, 図 10B)。

#### 3-4 FBS 長期処置の E (-) 器官培養ラット前腸間膜動脈標本における ET-1 による収縮張力に及ぼす影響

E (-) 0% serum において、ET-1 (0.1-30 nM) の累積投与により濃度依存性の収縮反応が得られた。ET-1 (30 nM) による最大張力は  $2.23 \pm 0.47$  g/mg w.w. ( $n=10$ , 図 11A) であった。E (-) FBS の ET-1 (30 nM) による最大張力は、E (-) 0% serum と比較し減弱傾向を示したが有意な差ではなかった( $1.71 \pm 0.44$  g/mg w.w.,  $n=13$ , 図 11A)。E (-) FBS の ET-1 (0.1-30 nM) に対する濃度反応曲線は E (-) 0% serum と比較して変化がなかった ( $pD_2=8.36$ , E (-) 0% serum vs. 8.28, E (-) FBS, 図 11B)。

#### 3-5 FBS 長期処置の E (+) 器官培養ラット前腸間膜動脈標本における 5-HT による収縮張力に及ぼす影響

E (+) 0% serum において、5-HT (30 nM-100  $\mu$ M) の累積投与により濃度依存性の収縮反応が得られた。5-HT (100  $\mu$ M) による最大張力は  $1.19 \pm 0.15$  g/mg w.w. ( $n=8$ , 図 12A) であった。E (+) FBS の 5-HT (100  $\mu$ M) による最大張力は、E (+) 0% serum と比較し有意に増強した( $2.21 \pm 0.44$  g/mg w.w.,  $n=8$ ,  $p<0.05$ , 図 12A)。E (+) FBS の 5-HT (30 nM-100  $\mu$ M) に対する濃度反応曲線は E (+) 0% serum と比較して有意に右方移動した ( $pD_2=4.66$ , E (+) FBS vs. 5.18, E (+) 0% serum,  $p<0.01$ , 図 12B)。

#### 3-6 FBS 長期処置の E (-) 器官培養ラット前腸間膜動脈標本における 5-HT による収縮張力に及ぼす影響

E (-) 0% serum において、5-HT (30 nM-100  $\mu$ M) の累積投与により濃度依存性の



収縮反応が得られた。5-HT (100  $\mu$ M)による最大張力は  $1.11 \pm 0.20$  g/mg w.w. (n=8、図 13A)であった。E (-) FBS の 5-HT (100  $\mu$ M)による最大張力は、E (-) 0% serum と比較し増強傾向を示したが有意な差ではなかった( $1.90 \pm 0.35$  g/mg w.w.、n=12、図 13A)。E (-) FBS の 5-HT (30 nM-100  $\mu$ M)に対する濃度反応曲線は E (-) 0% serum と比較して有意に右方移動した ( $pD_2=4.57$ 、E (-) FBS vs. 5.09、E (-) 0% serum、 $p<0.01$ 、図 13B)。

### 3-7 FBS 長期処置の器官培養ラット前腸間膜動脈標本における組織形態に及ぼす影響

器官培養ラット前腸間膜動脈標本における FBS 長期処置による組織形態学的変化を H&E 染色により検討した。FBS における中膜平滑筋層の粗鬆化は、E (+)で 0% serum と比べ増強し、E (-)ではさらに増強した。FBS において核の形状は円～紡錘形の多形性を示し、E (-)でその程度は増強した。E (-) FBS では、E (+) FBS と比較して明らかな平滑筋配列の不整が見られた (図 14a-d、n=4)。

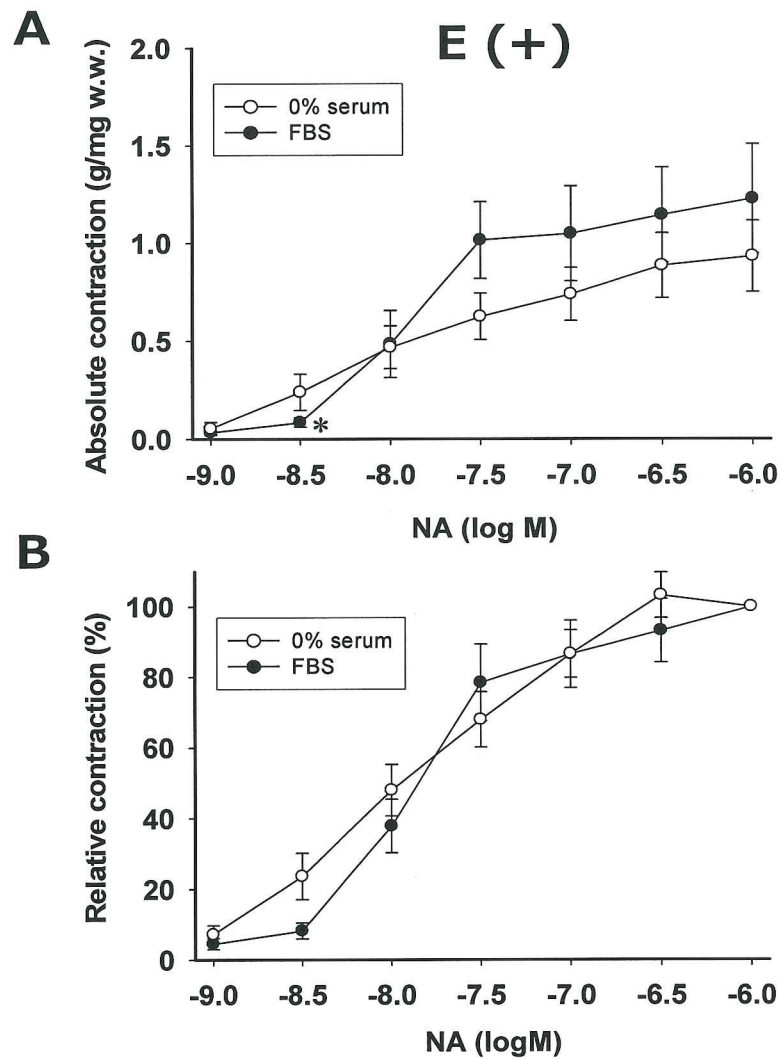


図8 E (+)器官培養ラット前腸間膜動脈標本におけるNAによる絶対張力(A)と相対張力(B)に及ぼすFBS長期処置の影響

3日間無血清培地で器官培養した標本を0% serum、10% FBSを添加して培養した標本をFBSとした。絶対張力は標本の湿重量で補正した(g/mg tissue w.w.) (A)。相対張力は、各標本におけるNA (1  $\mu$ M)による最大張力を100%として標準化した(B)。NA (1 nM-1  $\mu$ M)は累積投与した。

\*:  $p < 0.05$  vs. 0% serum.

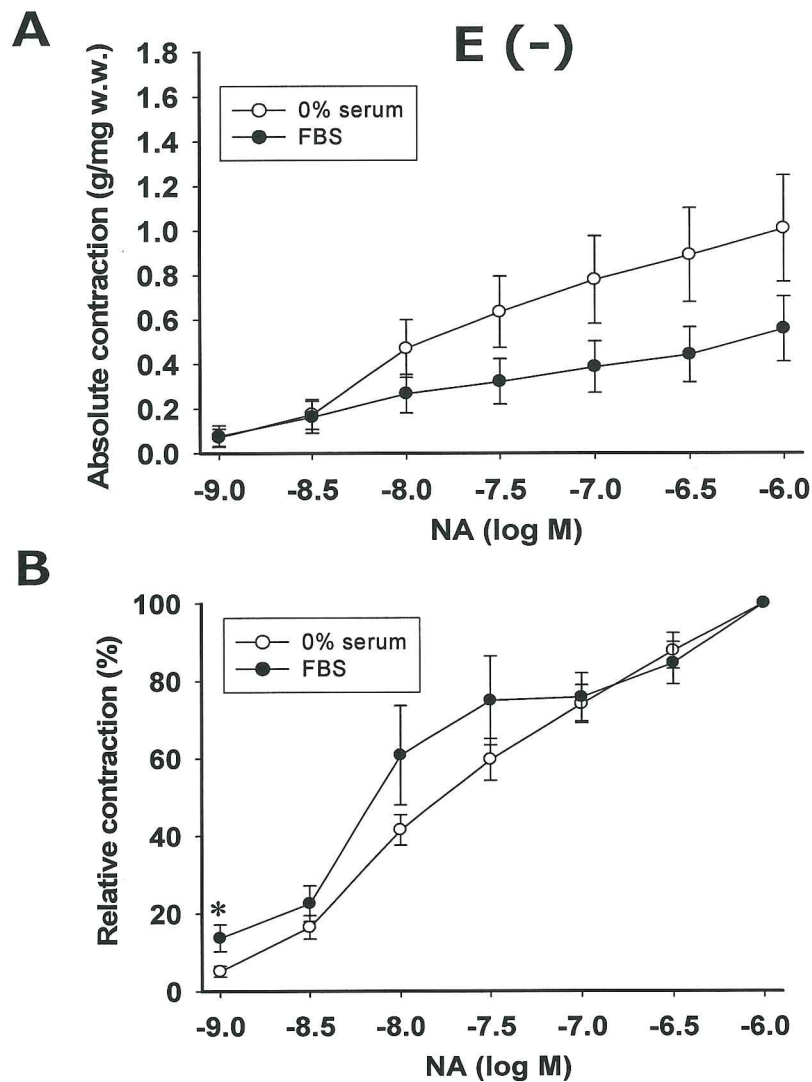


図9 E (-)器官培養ラット前腸間膜動脈標本における NA による絶対張力(A)と相対張力(B) に及ぼす FBS 長期処置の影響

3 日間無血清培地で器官培養した標本を 0% serum、10% FBS を添加して培養した標本を FBS とした。絶対張力は標本の湿重量で補正した(g/mg w. w.) (A)。相対張力は、各標本における NA (1  $\mu$ M)による最大張力を 100%として標準化した(B)。NA (1 nM-1  $\mu$ M)は累積投与した。\*:  $p < 0.05$  vs. 0% serum

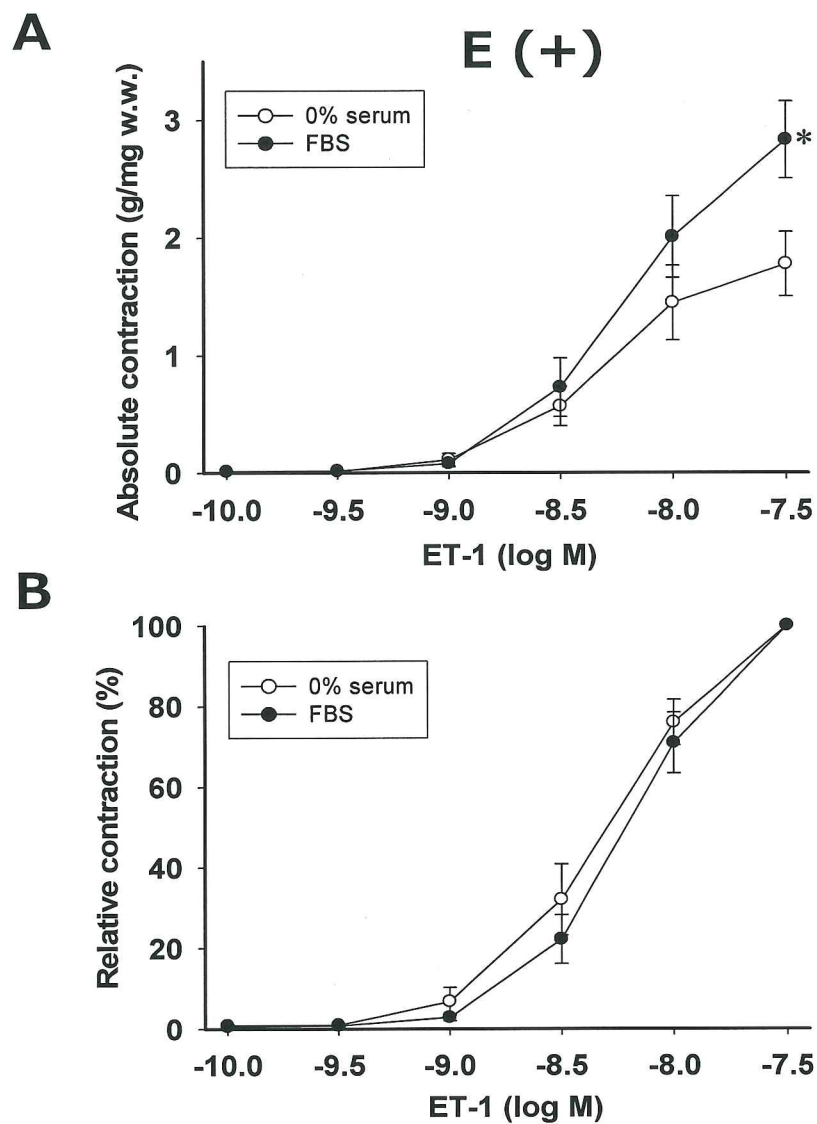


図10 E(+)器官培養ラット前腸間膜動脈標本におけるET-1による絶対張力(A)と相対張力(B)に及ぼすFBS長期処置の影響

3日間無血清培地で器官培養した標本を0% serum、10% FBSを添加して培養した標本をFBSとした。絶対張力は標本の湿重量で補正した(g/mg w. w.) (A)。相対張力は、各標本におけるET-1 (30 nM)による最大張力を100%として標準化した(B)。ET-1 (0.1-30 nM)は累積投与した。\*:  $p < 0.05$  vs. 0% serum.

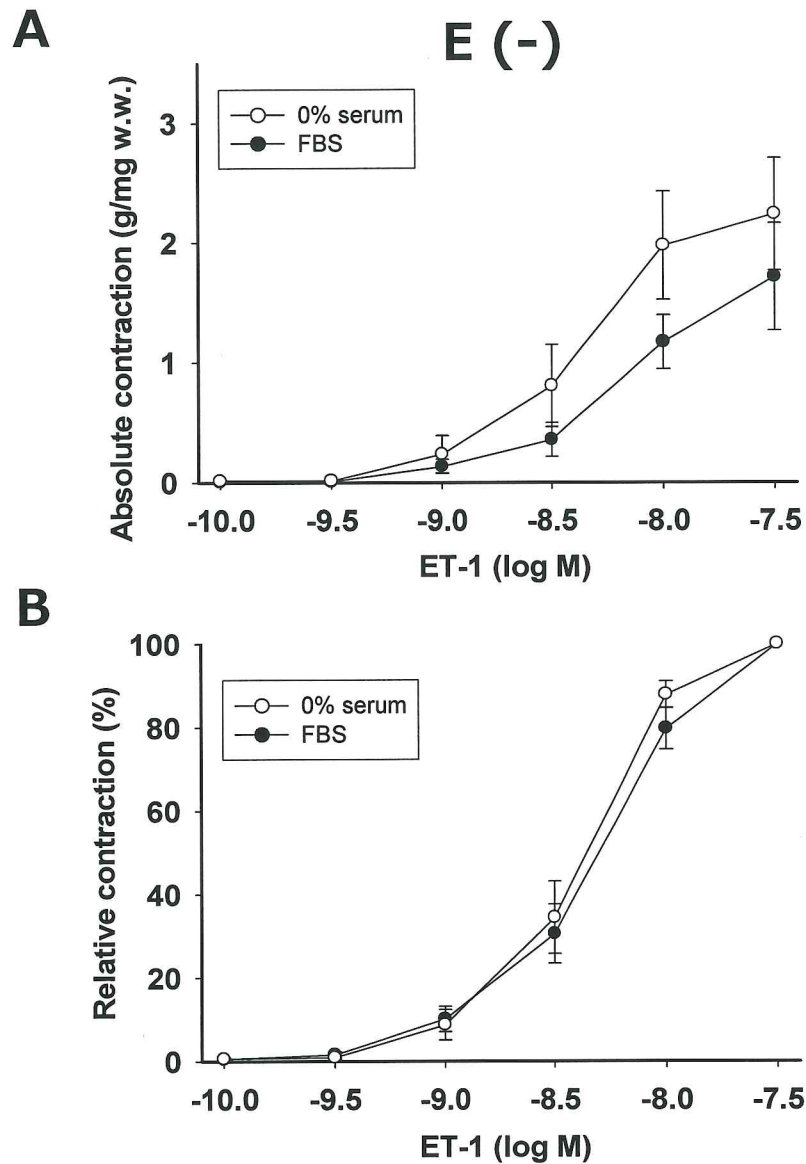


図 11 E(-)器官培養ラット前腸間膜動脈標本における ET-1 による絶対張力(A)と相対張力(B)に及ぼす FBS 長期処置の影響

3 日間無血清培地で器官培養した標本を 0% serum、10% FBS を添加して培養した標本を FBS とした。絶対張力は標本の湿重量で補正した(g/mg w. w.) (A)。相対張力は、各標本における ET-1 (30 nM)による最大張力を 100%として標準化した(B)。ET-1 (0.1-30 nM)は累積投与した。

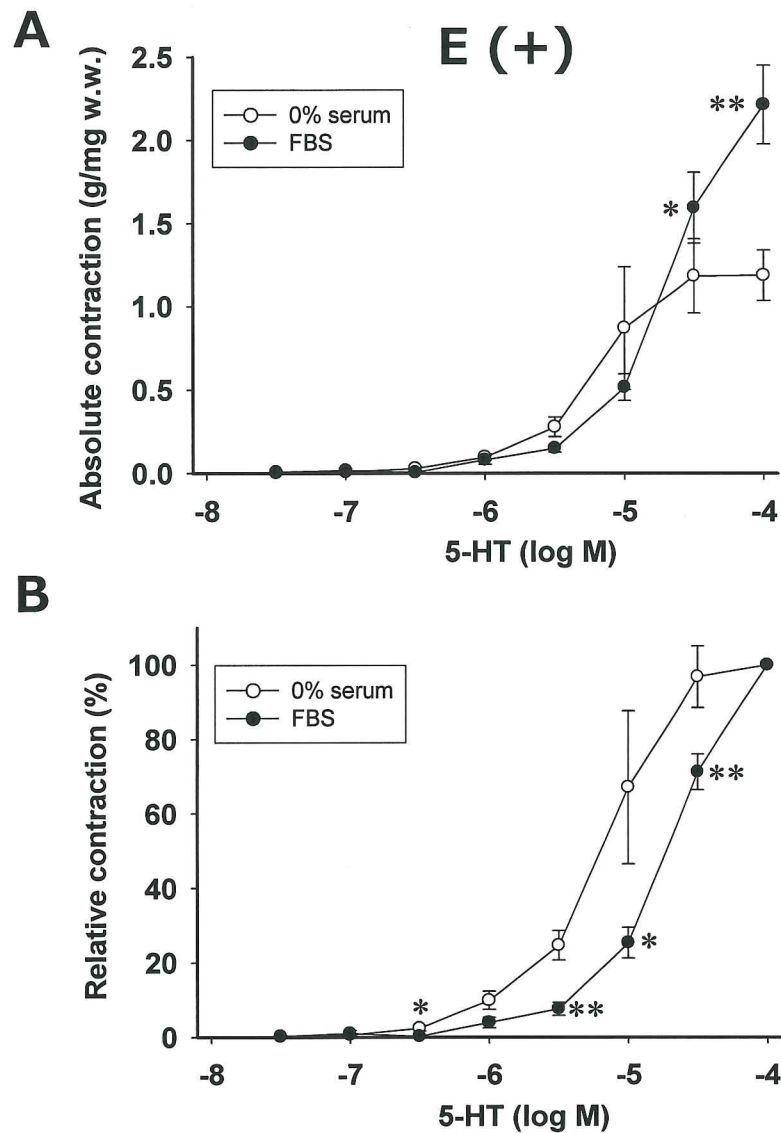


図 12 E(+)器官培養ラット前腸間膜動脈標本における 5-HT による絶対張力(A)と相対張力(B)に及ぼす FBS 長期処置の影響

3 日間無血清培地で器官培養した標本を 0% serum、10% FBS を添加して培養した標本を FBS とした。絶対張力は標本の湿重量で補正した(g/mg w. w.) (A)。相対張力は、各標本における 5-HT (100  $\mu$ M) による最大張力を 100% として標準化した(B)。5-HT (30 nM-100  $\mu$ M)は累積投与した。\*, \*\*:  $p < 0.05$  and  $0.01$  vs. 0% serum.

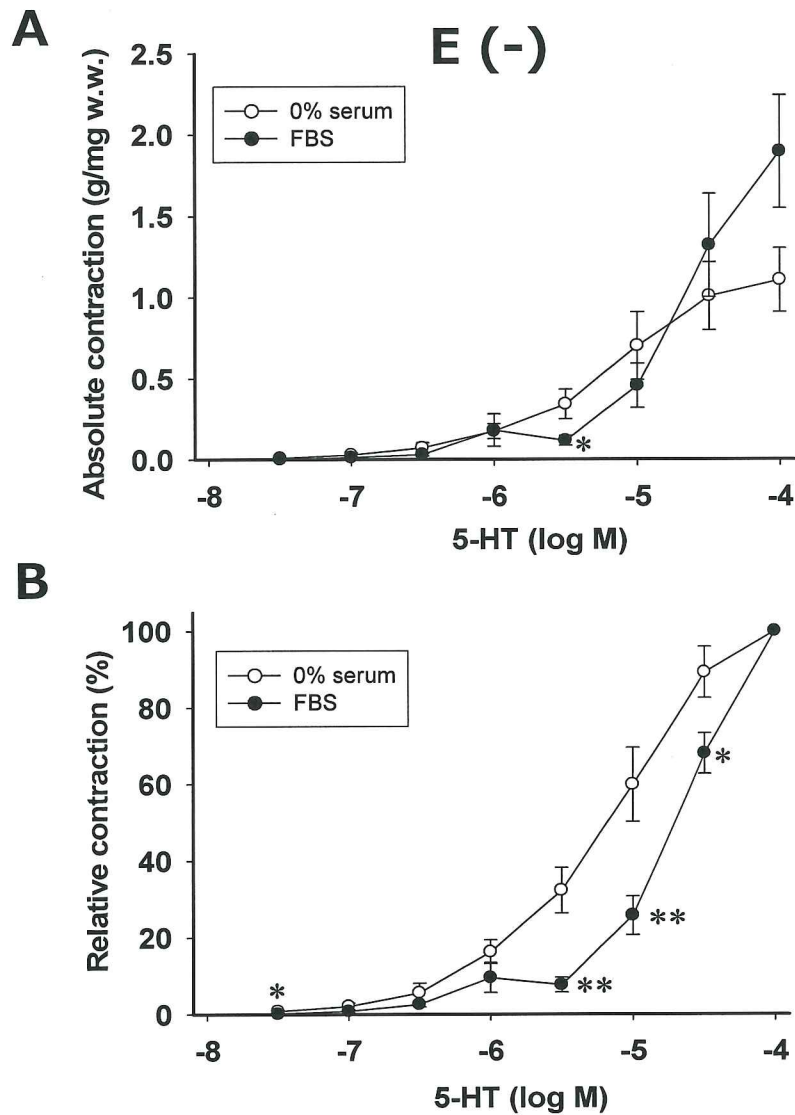


図 13 E (-)器官培養ラット前腸間膜動脈標本における 5-HT による絶対張力(A)と相対張力(B)に及ぼす FBS 長期処置の影響

3 日間無血清培地で器官培養した標本を 0% serum、10% FBS を添加して培養した標本を FBS とした。絶対張力は標本の湿重量で補正した(g/mg w. w.) (A)。相対張力は、各標本における 5-HT (100  $\mu$ M)による最大張力を 100%として標準化した(B)。5-HT (30 nM-100  $\mu$ M)は累積投与した。

\*, \*\*:  $p < 0.05$  and  $0.01$  vs. 0% serum.



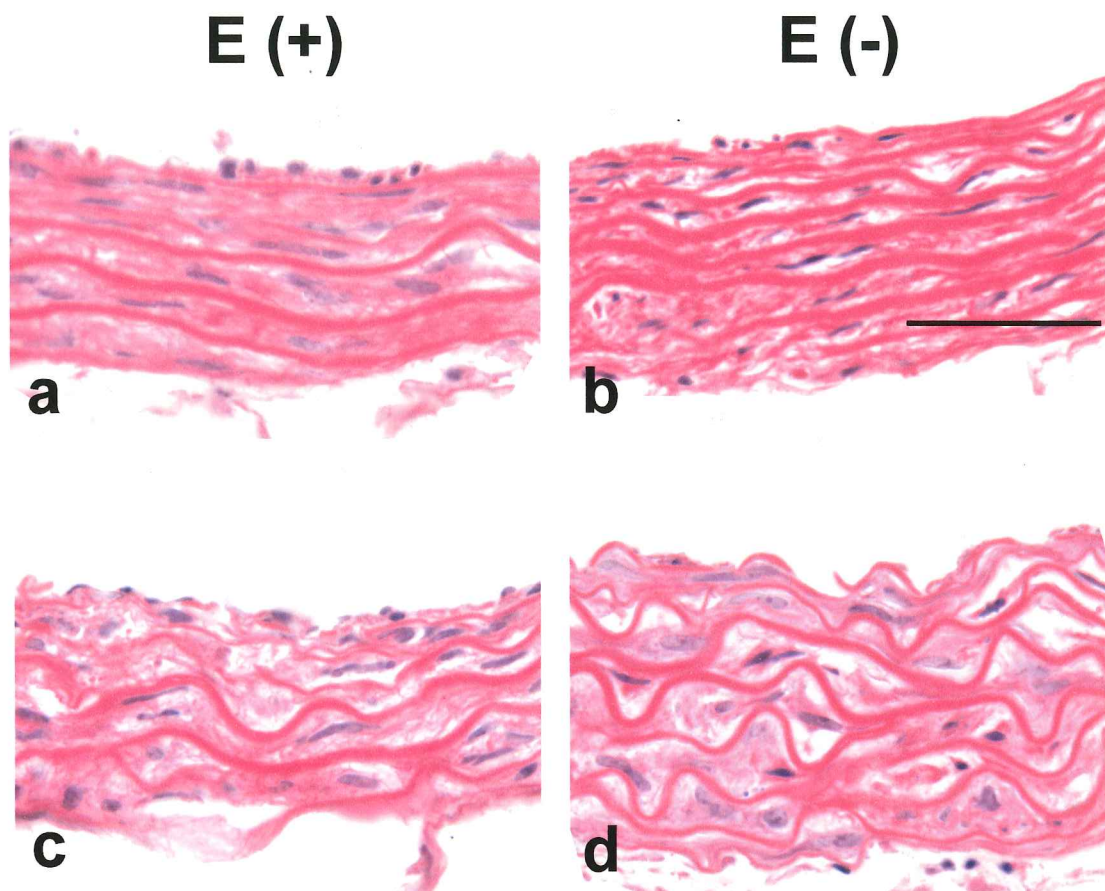


図 14 FBS 長期処置 E (+)、(-) 器官培養ラット前腸間膜動脈標本の H&E 染色像

a, b; 無血清培地で 3 日間器官培養した標本(0% serum)、c, d; 10% FBS を添加して培養した標本(FBS)、a, c; E (+) 標本、b, d; E (-) 標本。

スケールバー=50  $\mu\text{m}$ .



## 4. 考察

### 4-1 まとめ

本章では、FBS を長期処置し器官培養したラット前腸間膜動脈の血管収縮性と組織形態に及ぼす影響について検討し以下のことを明らかにした。1) FBS の NA および ET-1 による最大張力は 0% serum と比較し E (+) 標本において増強するが、E (-) 標本においては反対に減弱した、2) 内皮の有無に関わらず、FBS の 5-HT による最大張力は 0% serum と比較し増強した、3) E (+)、(-) 標本ともに、FBS の NA および ET-1 による濃度反応曲線は 0% serum と比較し変化なかった、4) E (+)、(-) 標本ともに FBS の 5-HT による濃度反応曲線は 0% serum と比較し右方移動した。以上の結果をまとめると、FBS 処置の血管収縮性に及ぼす影響は、内皮の有無やアゴニストによって異なることが示された。また組織学的検索から 1) FBS における中膜平滑筋層の粗鬆化は 0% serum と比較し増強し、その程度は E (-) 標本で大きかった、2) E (+)、(-) 標本ともに FBS の中膜平滑筋細胞の核の形は円～紡錘形の多形性を示し、その程度は E (-) 標本で大きかった、3) E (-) FBS は、E (+) FBS と比較し明らかな平滑筋細胞の配列の不整が見られた。E (-) FBS で見られたこれらの形態学的変化は最大張力が減弱する原因の 1 つであると考えられた。

### 4-2 FBS 長期処置の血管収縮性に及ぼす影響

本章では E (+) FBS において NA および ET-1 による最大張力が 0% serum と比較し増強することを明らかにした。これまでに 7 日間 FBS を処置して器官培養したウサギ前腸間膜動脈では eNOS の mRNA 発現量の低下により NO 産生が減少することが報告されている[68]。したがって、本研究で観察された FBS における NA および ET-1 による収縮の増強作用の原因として内皮由来弛緩因子(NO や prostaglandin I<sub>2</sub> (PGI<sub>2</sub>) など)の産生障害による相対的な平滑筋の収縮張力増加が考えられる。更に内皮細胞の機

能障害が起きると、NOではなく $O_2^-$ が産生される「eNOSのアンカップリング」の状態になる。 $O_2^-$ などのROSは血管組織の収縮を増強する作用がある[60, 66, 73]ことから、E (+) FBSにおける収縮増強作用には $O_2^-$ などの内皮由来収縮因子の産生が関与する可能性も考えられる。また生体内ではシーアストレス(ずり応力)により産生されるNOが常に血管壁に作用しており、血管平滑筋細胞の $Ca^{2+}$ 感受性 $K^+$ チャネルやATP感受性 $K^+$ チャネルの活性化を調節することが知られている[5, 38]。したがって内皮細胞によるNO産生の減少が平滑筋のイオンチャネル活性を変化させ、このことが間接的にFBSによる収縮力の増強につながる可能性が考えられる。

一方、本研究ではE (-) FBSにおいてNAおよびET-1による最大張力が0% serumと比較して減弱することを明らかにした。7日間FBSを処置して器官培養を行ったウサギ前腸間膜動脈では中膜における平滑筋細胞の増殖、配列の不整、細胞死などの形態学的変化によりNAによる収縮力が減弱することが報告されている[70]。ラット尾動脈においても同様にFBS長期処置による細胞間質の増生や平滑筋の細胞死が報告されている[28]。ラット前腸間膜動脈を用いた本実験でもFBSの中膜平滑筋層において同様の形態学的変化が観察され、その程度はE (-)標本でE (+)標本より激しかった。したがってこのような中膜平滑筋層で観察される形態学的変化が、FBSにおけるアゴニストによる最大張力の減弱を引き起こしていると考えられる。またデータには示さなかったがNOS阻害薬であるNomega-nitro-L-arginine methyl esterを処置して培養したE (+) FBSにおいてNAによる最大張力減弱が観察された(n=3)ことから、内皮による平滑筋に対する保護作用の消失が収縮力低下の一因とも考えられる。

最後に本研究ではNAやET-1とは対照的に、FBSの5-HTに対する収縮張力の感受性が0% serumと比較して低下することを明らかにした。この原因としてfreshで収縮に関与する受容体がFBS処置によりさらにダウンレギュレーションすると考えられる(II. 4-2 考察の項を参照)。一方、本研究では内皮の有無に関わらずFBSの5-HTによる最大張力が0% serumと比較して増強することを明らかにした。この原因とし

て fresh とは異なる受容体サブタイプのアップレギュレーションが考えられる。今後、器官培養によって 5-HT に対するどの受容体サブタイプ発現が変化するのかを詳細に検討する必要がある。

#### 4-3 結論

結論として、本章では FBS 長期処置の血管収縮性に及ぼす影響は、内皮の有無やアゴニストにより異なることを明らかにした。組織学的検索から E (-) FBS における中膜の明瞭な粗鬆化、配列の不整、増殖性所見は、最大張力が 0% serum と比較し減弱する一因と考えられた。本研究では摘出ラット前腸間膜動脈に対する FBS 長期処置の血管収縮性と形態に及ぼす影響とメカニズムを初めて明らかにした。

#### IV. 第三章

##### 1. 緒論

血管内皮細胞は血管の収縮性、炎症性反応、透過性、血管新生などを調節することから循環器系の恒常性維持において重要な役割を果たす。特に血管内皮細胞から放出される NO は循環器系の恒常性維持に重要な因子の 1 つであり、血管拡張作用と血管平滑筋細胞増殖[16]、血小板凝集及び白血球接着を抑制する作用[20]を有する。第二章の緒言でも記述した通り、慢性血管疾患時には血管壁から様々な増殖因子が分泌され、血管組織構造を変化させるとともに機能障害を引き起こす[57, 68]。そして実際に内皮機能障害は慢性血管疾患に共通する特徴である[4]。

第一章ではラット摘出前腸間膜動脈を用いた無血清培地における 3 日間の器官培養法を確立した[42]。また第二章では FBS3 日間処置の器官培養血管平滑筋収縮性に及ぼす影響は内皮の有無やアゴニストにより異なることや、特に E (-) 標本においては平滑筋層の配列の不整や増殖性変化によりアゴニストによる収縮力が減弱することを明らかにした[42]。本章では、様々な増殖因子を含む FBS を無血清培地に添加して 3 日間器官培養したラット前腸間膜動脈の内皮依存性弛緩反応に及ぼす影響を検討した。



## 2. 材料および方法

### 2-1 実験材料

II. および III. 2-1 実験材料の項を参照。6-9 週齢の雄性ウィスターラット (188-300 g) から前腸間膜動脈を無菌的に摘出し、E (+) 標本を作成し器官培養に用いた。標本は 10% FBS 存在下(FBS)あるいは非存在下(0% serum)で、1% Penicillin-Streptomycine を添加した 1 ml の DMEM 中で、37°C、5% CO<sub>2</sub> 下で 3 日間器官培養した。動物の取り扱いについては‘北里大学における動物実験と動物の飼養および保管などに関する規定’に従い適切に行った。

### 2-2 張力測定法

II. 2-2 張力測定法の項を参照。Ca<sup>2+</sup>-free 正常栄養液は CaCl<sub>2</sub> の代わりに 2 mM の ethylene glycol-bis (β-aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid (EGTA) を加えることにより作製した。各アゴニストによる弛緩の濃度反応曲線は 30 mM KCl あるいは 30-40 μM PGF<sub>2α</sub> により前収縮させた後、累積投与により求めた。実験結果は前収縮を 100% とした時の弛緩率で示した。

### 2-3 組織形態学的検索

II. 2-3 組織形態学的検索の項を参照。

### 2-4 NO 産生量の測定

蛍光指示薬 4, 5-diaminofluorescein (DAF)-2 は NO を選択的に捕捉し、およそ 490 nm で励起すると緑色の蛍光を産生する[26]。正常栄養液を満たした容量 3 ml のマグナス管内で 0% serum および FBS に静止張力 0.5 g を負荷し 30 分間静置した。高濃度 KCl 液を繰り返し投与し、収縮張力が一定になった後(60-90 分後)、30 mM KCl 液と



DAF-2 (100 nM)を同時に投与した。5 分後マグヌス管内の栄養液(200  $\mu$ l)を基底レベルの NO 産生量を計測するために回収し 96 穴マルチプレートに移した。DAF-2 を処置してから 20 分後に ACh (100  $\mu$ M)を投与した。その 5 分後に栄養液(200  $\mu$ l)を回収し 96 穴マルチプレートに移した。485 nm で励起した後、535 nm の蛍光を Tristar LB 941 fluorometer (Berthold technologies、Bad Wildbad、Germany)を用いて測定した。ACh による NO 産生量は基底レベルの NO 産生量に対する割合で示した。

## 2-5 ウェスタンブロッティング

0% serum と FBS を液体窒素で急速凍結後、タンパク質抽出液(組成; 1% Triton X-100、20 mM Tris-HCl (pH 7.4)、150 mM NaCl、1 mM EDTA、2.5 mM sodium pyrophosphate、1 mM  $\beta$ -glycerol phosphate、1 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ 、1  $\mu$ g/ml leupeptin、1% protease inhibitor mixture; Nacalai Tesque、Kyoto、Japan)と共にホモジナイズした。これを遠心分離した(13,000 rpm、4°C、10 分間)後、上清を回収してタンパク質サンプルを得た。サンプル中のタンパク質濃度は bicinchoninic acid (BCA)法(Pierce、Rockford、IL、USA)を用いて定量した。等量のタンパク質(8-15  $\mu$ g)を sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE; 7.5%)で分離した(80-120 V、1.5-2 時間)後、ニトロセルロース膜(Pall Corporation、Ann Arbor、MI、USA)に転写した(400 mA、1.5 時間)。転写膜を 0.5%のスキムミルクでブロッキングした後、一次抗体(1:200-1:500 希釈)を 4°Cで一晩反応させた。転写膜に結合した一次抗体はペルオキシダーゼ標識二次抗体(1:10,000 希釈、1 時間)と ECL-plus system (Amersham Biosciences、Buckinghamshire、UK)を用いて可視化した。タンパク質のイコールローディングは total actin 又は total eNOS 抗体で確認した。可視化したバンドは CS Analyzer 3.0 software (ATTO、Tokyo、Japan)を用いて定量・解析した[64, 65, 72]。

## 2-6 使用薬物

DMEM、bradykinin (BK)、SNP、A23187 (Sigma-Aldrich)、FBS、  
Penicillin-Streptomycin (Invitrogen/GIBCO)、ACh (Daiichi-Sankyo Pharmaceutical, Tokyo、  
Japan)、DAF-2 (Sekisui medical、Tokyo、Japan)、  
2,4,6-trimethyl-N-(meta-3-trifluoromethyl-phenyl)-benzenesulfonamide (m-3M3FBS)  
(Calbiochem、San Diego、CA、USA)、PGF<sub>2α</sub> (Cayman、Ann Arbor、MI、USA)。ACh  
と SNP は蒸留水に溶かした。A23187、m-3M3FBS、PGF<sub>2α</sub>は 100% DMSO に溶かした(マ  
グヌス管内の DMSO 最終濃度は 0.1%)。BK は 0.1 N 酢酸に溶かした。

## 2-7 一次抗体

eNOS (Santa Cruz Biotech、Santa Cruz、CA、USA)、TRPC-1、TRPC-4、TRPC-5  
(Alomone Labs、Jerusalem、Israel)、total actin (Sigma-Aldrich)。

## 2-8 統計処理

実験成績は平均値±標準誤差で示した。統計評価は Student's t-test (unpaired)  
を行って評価した。また、危険率( $p$  値)が 5%未満の場合に有意差ありとした。

### 3. 実験成績

#### 3-1 FBS 長期処置の器官培養ラット前腸間膜動脈標本における ACh および BK による内皮依存性弛緩反応に及ぼす影響

0% serum において、30mM KCl による前収縮後 ACh (30 nM-300  $\mu$ M) および BK (0.03 nM-3  $\mu$ M) の累積投与により濃度依存性の弛緩反応が得られた。FBS の ACh (n=7 for 0% serum、n=8 for FBS、 $p<0.05$ 、図 15A) および BK (n=9 for 0% serum、n=6 for FBS、 $p<0.05-0.01$ 、図 15B) による内皮依存性弛緩反応は 0% serum と比べ有意に減弱した。

#### 3-2 FBS 長期処置の器官培養ラット前腸間膜動脈標本における SNP による内皮非依存性弛緩反応に及ぼす影響

器官培養後内皮を剥離した 0% serum において SNP (0.1-1000 nM) の累積投与により濃度依存性の弛緩反応が得られた。器官培養後内皮を剥離した FBS の SNP による弛緩反応は 0% serum と比べ変化がなかった(n=9 for 0% serum、n=12 for FBS、図 16)。

#### 3-3 FBS 長期処置の器官培養ラット前腸間膜動脈標本内皮細胞の形態に及ぼす影響

次に FBS を 3 日間処置した前腸間膜動脈標本における内皮細胞の形態を H&E 染色により観察した。0% serum、FBS 共に内皮細胞は脱落・剥離することなくインタクトであった(n=7 for 0% serum、n=16 for FBS、図 17a、b)。

#### 3-4 FBS 長期処置の ACh による NO 産生に及ぼす影響

次に FBS 長期処置による内皮依存性弛緩反応の減弱が NO 産生量の低下によ

るものかどうか検討した。0% serum において 100  $\mu$ M ACh による NO 産生量は基底状態の NO 産生量と比較し  $5.2 \pm 1.1$  倍に増加した( $n=8$ 、図 18)。FBS において 100  $\mu$ M ACh による NO 産生量は 0% serum と比較し有意に低下した( $1.5 \pm 0.5$  倍、 $n=8$ 、 $p<0.01$ 、図 18)。

### 3-5 FBS 長期処置の eNOS タンパク質発現に及ぼす影響

次に FBS による NO 産生量の低下が eNOS タンパク質発現の減少によるものかをウェスタンブロッティングにより検討した。eNOS タンパク質発現は 0% serum と FBS の間で変化がなかった( $n=7$ 、図 19)。

### 3-6 FBS 長期処置の器官培養ラット前腸間膜動脈標本における $\text{Ca}^{2+}$ イオノフォア A23187 による弛緩反応に及ぼす影響

FBS による NO 産生量低下の原因を明らかにする為に、 $\text{Ca}^{2+}$ イオノフォア A23187 による弛緩反応を検討した。A23187 はアゴニストの受容体を介さず直接細胞内へ  $\text{Ca}^{2+}$ 流入を起こすイオノフォアである。0% serum において、30 mM KCl による前収縮後 A23187 (0.01 nM-3  $\mu$ M)の累積投与により濃度依存性の弛緩反応が得られた。FBS の A23187 による弛緩反応は 0% serum と比較し変化がなかった( $n=12$  for 0% serum、 $n=14$  for FBS、図 20)。

### 3-7 FBS 長期処置の器官培養ラット前腸間膜動脈標本における phospholipase (PL) C 活性化薬 m-3M3FBS による弛緩反応に及ぼす影響

次に PLC 活性化薬 m-3M3FBS による弛緩反応を検討した。m-3M3FBS はアゴニストの受容体を介さずに直接 PLC を活性化する薬物である[3]。0% serum において、30 mM KCl による前収縮後 m-3M3FBS (0.01 nM-10  $\mu$ M)の累積投与により濃度依存性の弛緩反応が得られた。FBS において、m-3M3FBS による弛緩反応は 0% serum と比

べ変化がなかった(n=4 for 0% serum、n=10 for FBS、図 21A)。次に  $\text{Ca}^{2+}$ -free (非存在下) 栄養液中における m-3M3FBS による弛緩反応を検討した。0% serum において、 $\text{PGF}_{2\alpha}$  による前収縮後 m-3M3FBS (0.01 nM-100  $\mu\text{M}$ ) の累積投与により濃度依存性の弛緩反応が得られた。 $\text{Ca}^{2+}$  非存在下においても FBS における m-3M3FBS による弛緩反応は 0% serum と比べ変化がなかった(n=6 for 0% serum、n=7 for FBS、図 21B)。

### 3-8 FBS 長期処置の TRPC-1、-4 および-5 タンパク質発現に及ぼす影響

血管内皮細胞においては TRPC-1、-4 と-5 がアゴニストによる  $\text{Ca}^{2+}$  の流入を調節することが示唆されている[14, 18, 21]。そこで、TRPC-1、-4 と-5 タンパク質発現をウエスタンブロッティングにより検討した。FBS の TRPC-1 タンパク質発現は 0% serum と比較し有意に低下した(n=4、 $p<0.01$ 、図 22)。一方、FBS の TRPC-4 タンパク質発現は 0% serum と比較し増加傾向を示した(n=4)。FBS の TRPC-5 タンパク質発現は 0% serum と比較し変化がなかった(n=4)。総じて FBS の TRPCs 総タンパク質発現は 0% serum と比べて大きな変化がなかった。



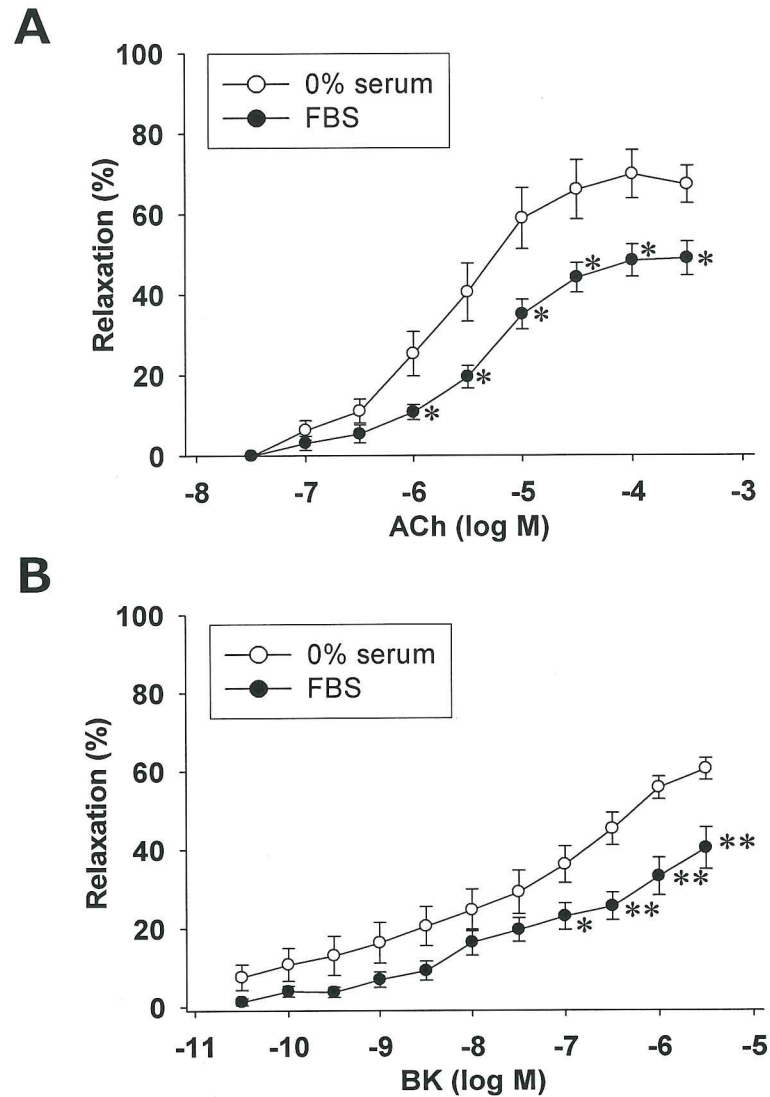


図 15 器官培養ラット前腸間膜動脈標本における acetylcholine (ACh)および bradykinin (BK)による内皮依存性弛緩反応に及ぼす FBS 長期処置の影響

3 日間無血清培地で器官培養した標本を 0% serum、10% FBS を添加して培養した標本を FBS とした。結果は、各標本における 30 mM KCl による前収縮を 100%とした時の弛緩率で示した。ACh (30 nM-300  $\mu$ M)、BK (0.03 nM-3  $\mu$ M)は累積投与した。\*\*\*:  $p < 0.05$  and 0.01 vs. 0% serum.

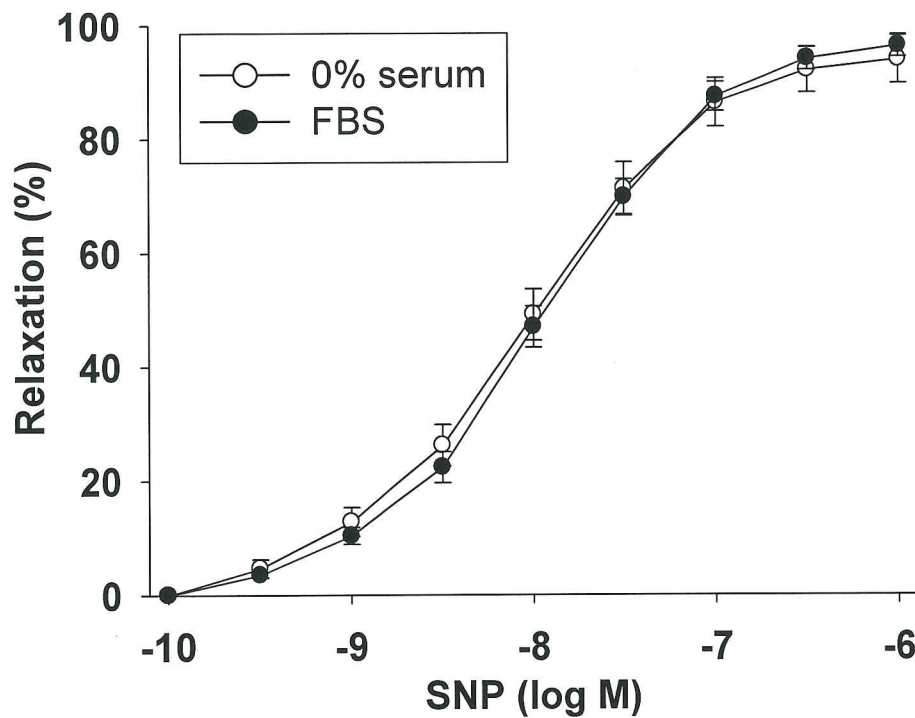


図 16 器官培養ラット前腸間膜動脈標本における sodium nitroprusside (SNP)による内皮非依存性弛緩反応に及ぼす FBS 長期処置の影響

3 日間無血清培地で器官培養した標本を 0% serum、10% FBS を添加して培養した標本を FBS とした。標本は器官培養後内皮を剥離し実験に用いた。結果は各標本における 30 mM KCl による前収縮を 100%とした時の弛緩率で示した。SNP (0.1-1000 nM)は累積投与した。

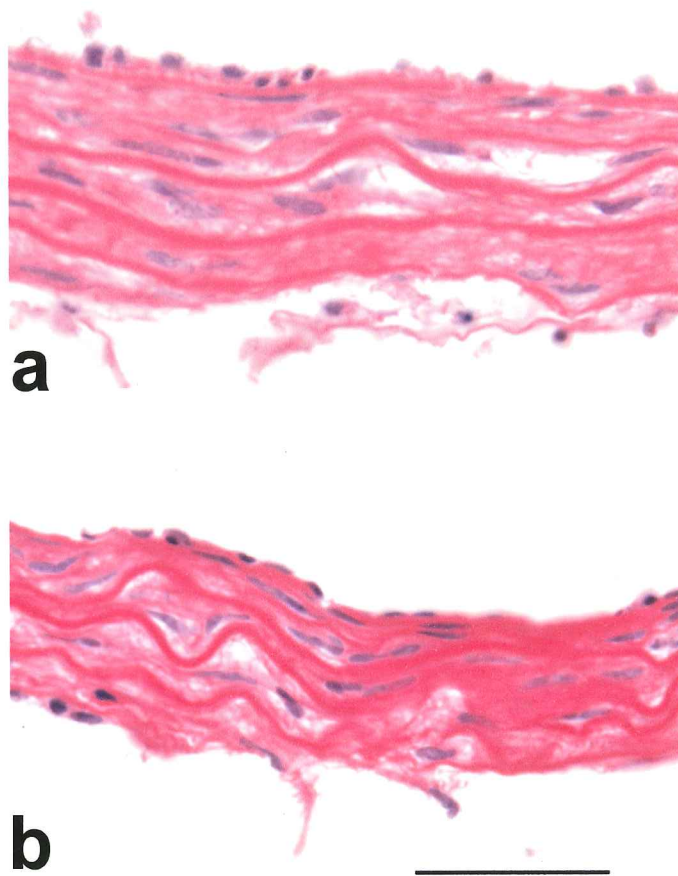


図 17 器官培養ラット前腸間膜動脈標本内皮細胞の形態に及ぼす FBS 長期処置の影響(H&E 染色像)

a; 無血清培地で 3 日間器官培養した標本(0% serum)、b; 10% FBS を添加して培養した標本(FBS)。スケールバー=50  $\mu\text{m}$ .

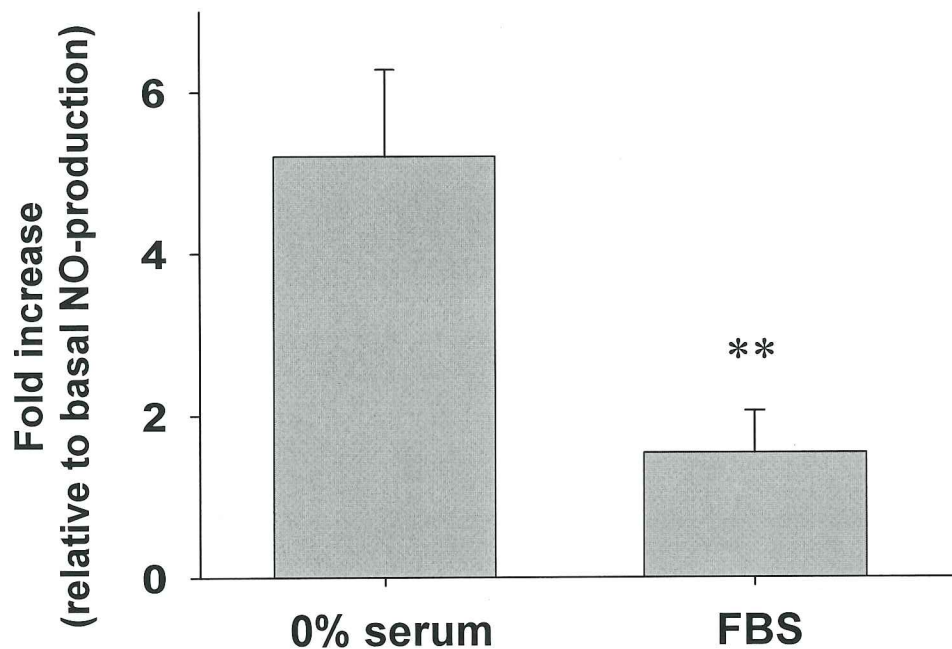


図 18 FBS 長期処置の ACh (100  $\mu$ M、5 分間)による nitric oxide (NO)産生に及ぼす影響

3 日間無血清培地で器官培養した標本を 0% serum、10% FBS を添加して培養した標本を FBS とした。栄養液中の NO 産生は NO 特異的蛍光指示薬 DAF-2 を用いて 485 nm で励起した後、蛍光光度計(535 nm)で測定した。DAF-2 (100 nM)をマグヌス管内に処置してから 5 分後の反応液を用いて測定した蛍光強度を基底レベルの NO 産生量とした。DAF-2 処置の 20 分後に ACh (100  $\mu$ M)を投与し、その 5 分後の反応液を用いて測定した蛍光強度を ACh による NO 産生量とした。ACh による NO 産生量は基底レベルの NO 産生量に対する割合で示した。\*\*:  $p < 0.01$  vs. 0% serum.

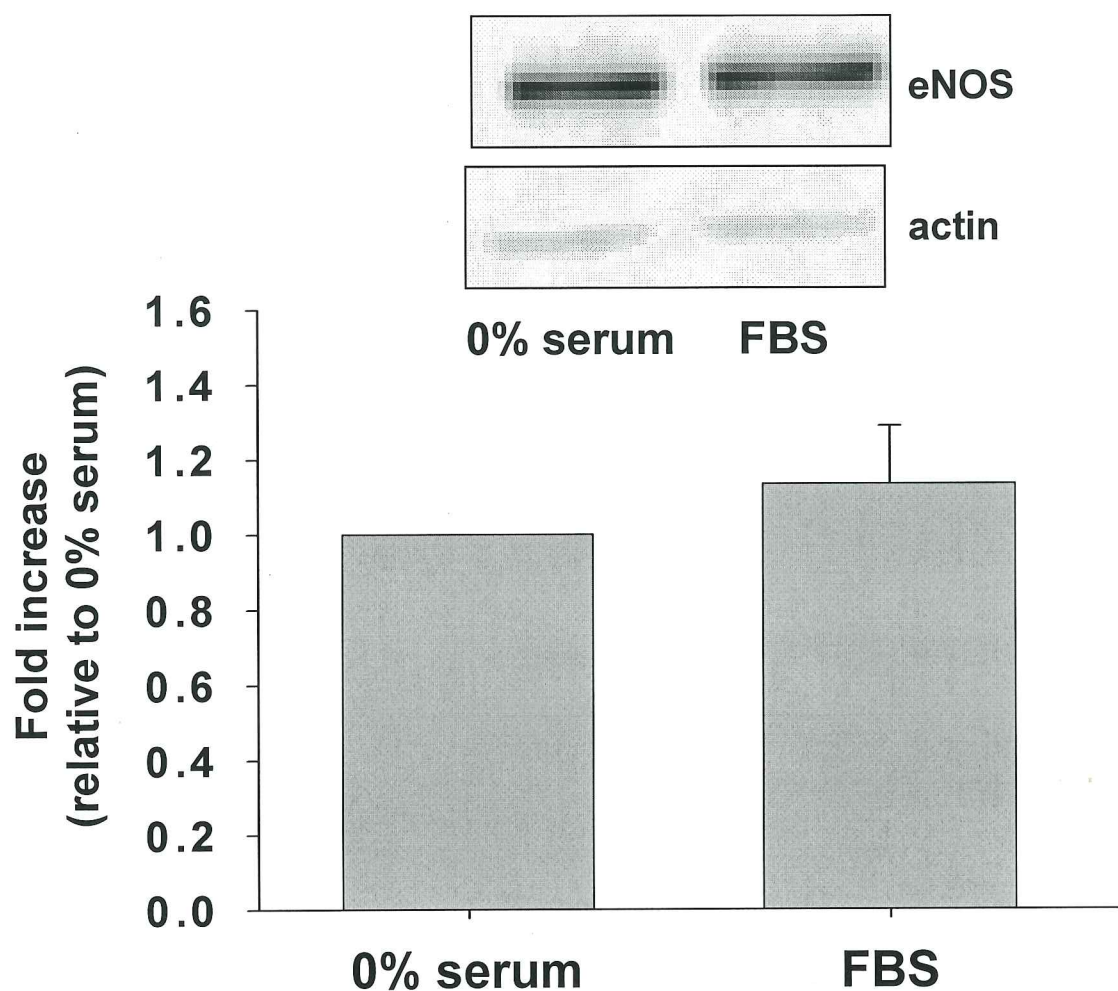


図 19 FBS 長期処置の eNOS タンパク質発現に及ぼす影響

3 日間無血清培地で器官培養した標本を 0% serum、10% FBS を添加して培養した標本を FBS とした。タンパク質を抽出した後、ウエスタンブロッティングにより、eNOS タンパク質発現を検討した。抗 total-actin 抗体を用いてタンパク質のイコールローディングを確認した。0% serum に対する比率を棒グラフで示した。



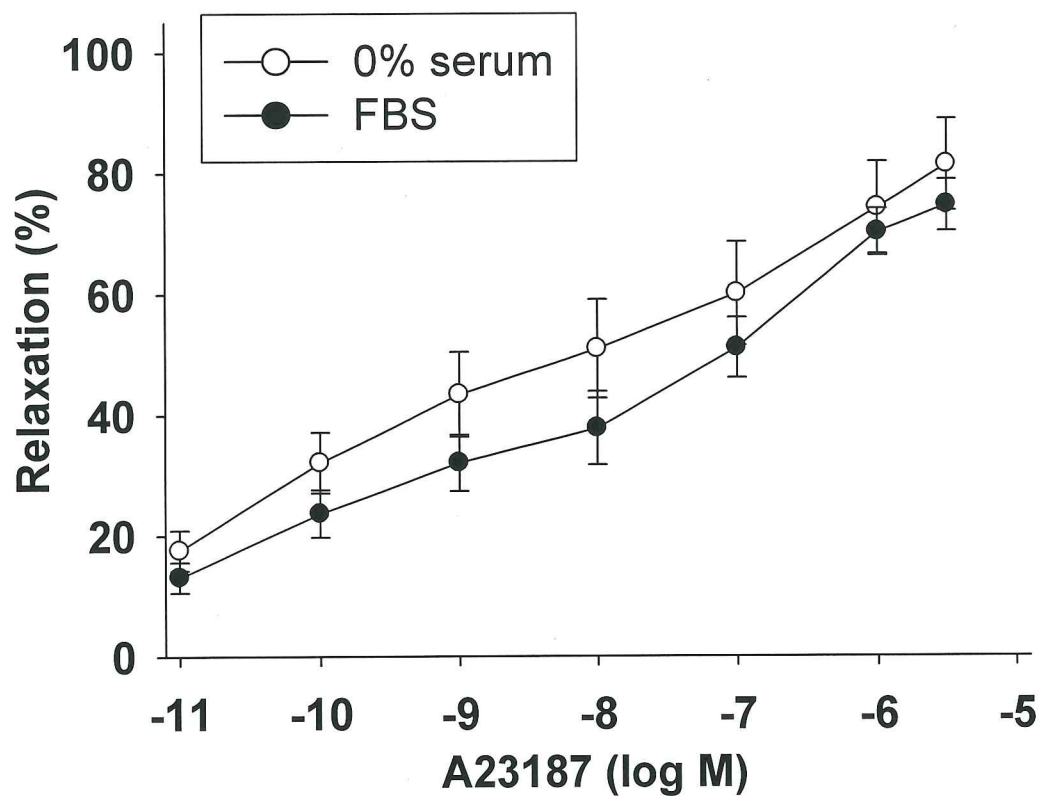


図 20 器官培養ラット前腸間膜動脈標本における  $\text{Ca}^{2+}$  イオノフォア A23187 による弛緩反応に及ぼす FBS 長期処置の影響

3 日間無血清培地で器官培養した標本を 0% serum、10% FBS を添加して培養した標本を FBS とした。結果は各標本における 30 mM KCl による前収縮を 100%とした時の弛緩率で示した。A23187 (0.01 nM-3  $\mu\text{M}$ )は累積投与した。

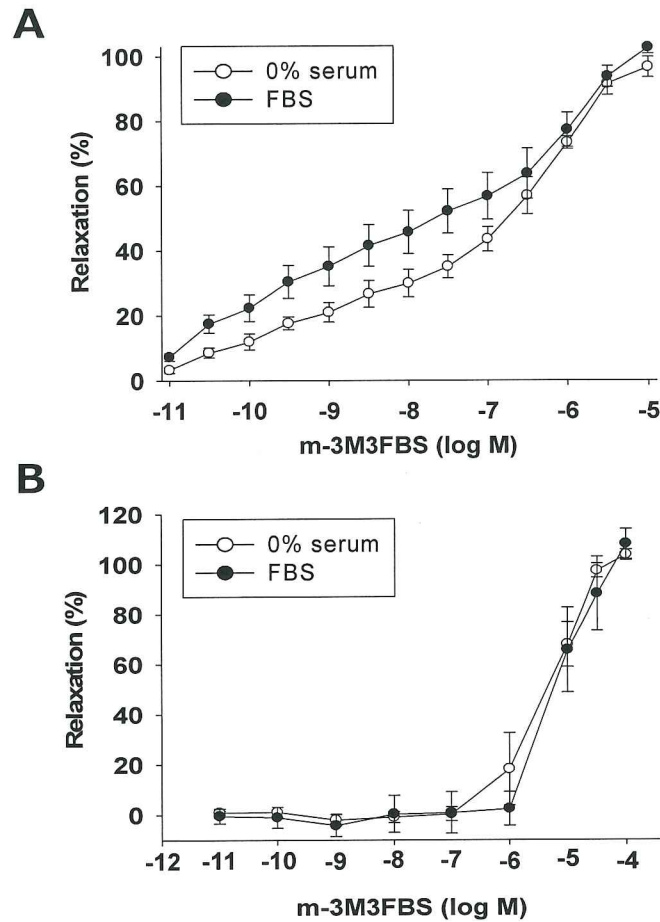


図 21 器官培養ラット前腸間膜動脈標本における PLC 活性化薬

2,4,6-trimethyl-N-(meta-3-trifluoromethyl-phenyl)-benzenesulfonamide (m-3M3FBS)による弛緩反応に及ぼす FBS 長期処置の影響

3 日間無血清培地で器官培養した標本を 0% serum、10% FBS を添加して培養した標本を FBS とした。正常栄養液中 ( $\text{Ca}^{2+}$ 存在下)で m-3M3FBS (0.01 nM-10  $\mu\text{M}$ )を累積投与した結果を(A)に示す。結果は各標本における 30 mM KCl による前収縮を 100%とした時の弛緩率で示した。 $\text{Ca}^{2+}$ 非存在下で m-3M3FBS (0.01 nM-100  $\mu\text{M}$ )を累積投与した結果を(B)に示す。結果は各標本における Prostaglandin  $\text{F}_{2\alpha}$  (30-40  $\mu\text{M}$ )による前収縮を 100%とした時の弛緩率で示した。

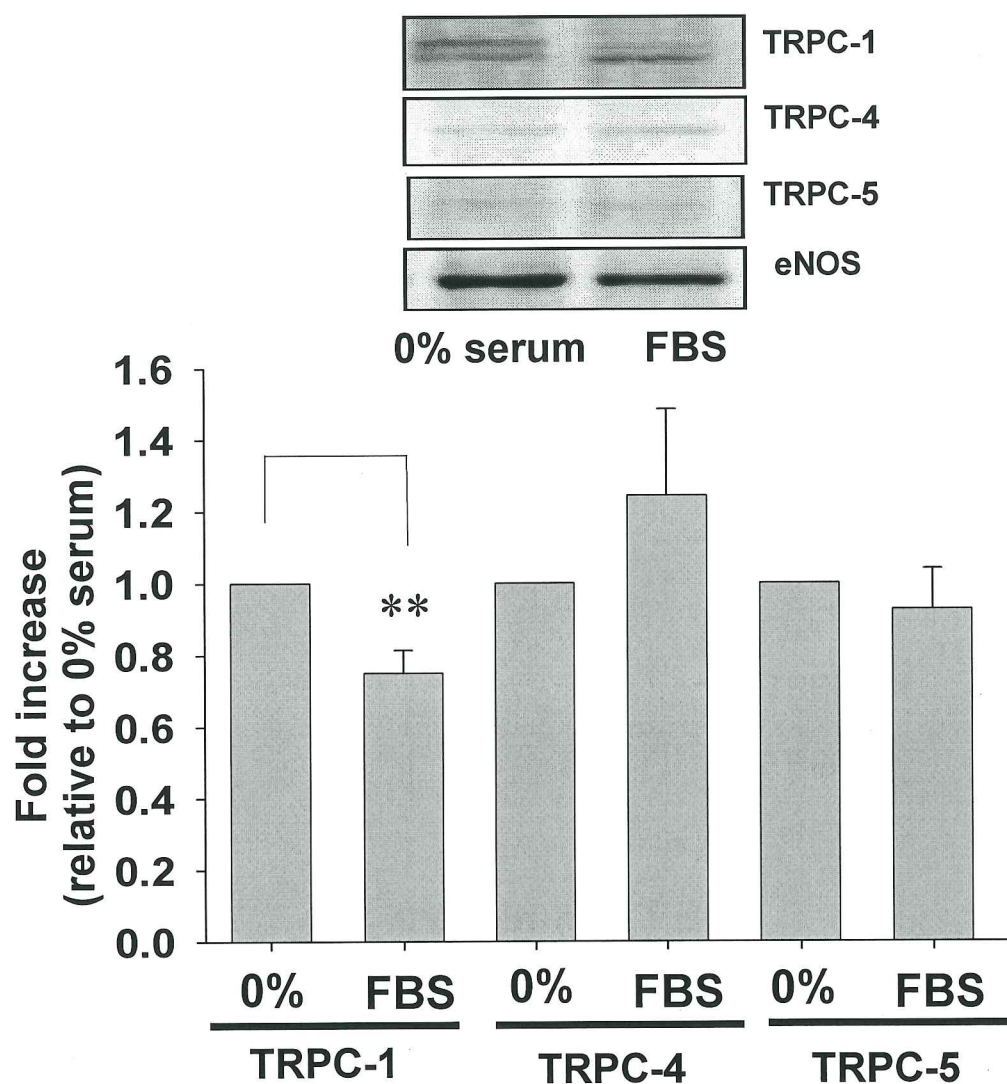


図 22 FBS 長期処置の TRPC-1、-4 および-5 タンパク質発現に及ぼす影響

3 日間無血清培地で器官培養した標本を 0% serum、10% FBS を添加して培養した標本を FBS とした。タンパク質を抽出した後、ウエスタンブロッティングにより、TRPC-1、-4 および-5 タンパク質発現を検討した。抗 total eNOS 抗体を用いて蛋白質のイコールドローディングを確認した。0% serum に対する比率を棒グラフで示した。\*\*:  $p < 0.01$  vs. 0% serum.

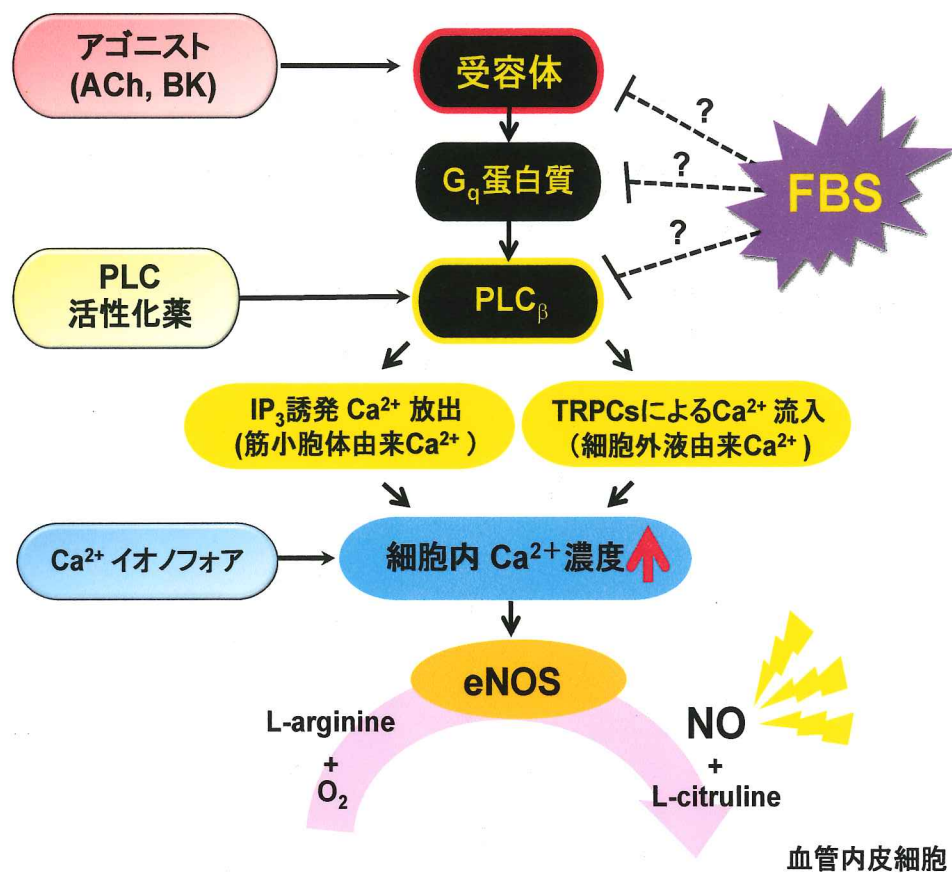


図 23 本章のまとめ

FBS 長期処置は器官培養ラット前腸間膜動脈内皮細胞において受容体、G<sub>q</sub> 蛋白質、PLC<sub>β</sub>経路を抑制することによりアゴニストによる NO 産生を抑制すると考えられる。

## 4. 考察

### 4-1 まとめ

本章では器官培養ラット前腸間膜動脈を用いて様々な増殖因子を含む FBS 長期処置の内皮依存性弛緩反応に及ぼす影響を検討し以下のことを明らかにした。1) FBS においてアゴニストの種類に関わらず内皮依存性弛緩反応は 0% serum と比較して減弱した、2) FBS において SNP による内皮非依存性弛緩反応は 0% serum と変化がなかった、3) FBS において ACh による NO 産生量は減少したものの、eNOS タンパク質発現は 0% serum と比較して変化がなかった、4)  $\text{Ca}^{2+}$ イオノフォア A23187 による弛緩反応は FBS と 0% serum の間で変化がなかった、5) PLC 活性化薬 m-3M3FBS 誘導性の細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度上昇によると考えられる弛緩反応は FBS と 0% serum の間で変化がなかった、6)細胞外からの  $\text{Ca}^{2+}$ 流入を促進することが知られている TRPCs タンパク質の内、TRPC-1 タンパク質発現は FBS で 0% serum と比較して減少したものの、TRPC-4 タンパク質発現は増加傾向を示し、TRPC-5 タンパク質発現は変化がなく、総じて TRPCs (-1+ -4+ -5)タンパク質発現は FBS と 0% serum の間で変化がないものと考えられた。以上の結果から FBS 長期処置は器官培養ラット前腸間膜動脈内皮細胞において受容体、 $\text{G}_q$ 蛋白質、 $\text{PLC}_\beta$ 経路を抑制することによりアゴニストによる NO 産生を抑制して内皮依存性弛緩反応障害を引き起こすことが示唆された (図 23)。

### 4-2 FBS 長期処置の内皮依存性弛緩反応に及ぼす影響

NO は平滑筋の可溶性グアニル酸シクラーゼを活性化し cGMP を生成し、cGMP 依存性プロテインキナーゼが平滑筋の細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度と収縮タンパク質の  $\text{Ca}^{2+}$ 感受性を低下させることで平滑筋を弛緩させる[23]。これまでに 7 日間 FBS を処置して器官培養をしたウサギ前腸間膜動脈においては平滑筋の NO 感受性が上昇することが報告されているが[68]、本研究において FBS の SNP による内皮非依存性弛緩反応は



0% serum と比べて変化がなかった。この違いは培養期間の差によるものと推察され、3 日間の FBS 処置では平滑筋の NO 感受性はまだ変化していないと考えられる。

血管内皮細胞においてアゴニストによる NO 産生の経路は次の通りである。アゴニストが受容体に結合後 Gq 蛋白質が PLC $\beta$  を活性化させ、内皮細胞膜の phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate から inositol-1, 4, 5 trisphosphate (IP $_3$ ) と diacylglycerol (DAG) を産生する。IP $_3$  は小胞体から Ca $^{2+}$  を放出させることで細胞内 Ca $^{2+}$  濃度を上昇させる。さらに DAG 刺激または小胞体内の貯蔵 Ca $^{2+}$  の枯渇信号によって活性化した TRPC を介して細胞外の Ca $^{2+}$  が細胞内に流入する。このような機序で細胞内 Ca $^{2+}$  濃度が上昇すると、カルモジュリン(calmodulin: CaM)に Ca $^{2+}$  が結合し Ca $^{2+}$ /CaM 複合体が eNOS を活性化させる。活性化した eNOS は L-アルギニンを基質として NO を産生する[6, 12] (図 23)。これまでに 7 日間 FBS を処置して器官培養をしたウサギ前腸間膜動脈の血管内皮細胞においては eNOS の mRNA 発現が減少するために NO 産生が低下することが報告されているが[68]、本研究においては FBS の eNOS タンパク質発現は 0% serum と比較して変化がなかった。このことから 3 日間の FBS 処置では eNOS 活性化経路が障害されることが考えられる。本研究において FBS の Ca $^{2+}$  イオノフォアによる弛緩反応は 0% serum と比較して変化がなかった。このことから FBS は内皮細胞の細胞内 Ca $^{2+}$  濃度上昇に至るまでのいずれかの経路に障害を起こすと考えられる。次に Ca $^{2+}$  を含む正常栄養液と Ca $^{2+}$  を含まない Ca $^{2+}$ -free 栄養液中で細胞膜透過性の PLC 活性化薬 m-3M3FBS による弛緩反応の検討をおこなった。Ca $^{2+}$  存在下および Ca $^{2+}$  非存在下の栄養液中いずれにおいても、FBS の m-3M3FBS による弛緩反応は 0% serum と比較し変化がなかった。このことから TRPC を介した細胞外からの Ca $^{2+}$  流入も IP $_3$  による小胞体からの Ca $^{2+}$  放出も FBS では障害を受けていないことが示唆された。

これまでに TRPC-4 遺伝子欠損マウスの血管内皮細胞では ACh による Ca $^{2+}$  流入が減少するために、NO による内皮依存性弛緩反応が減弱することが報告されている[14]。またウシ大動脈内皮細胞における TRPC-5 遺伝子の small interfering RNA によ

るノックダウンはNOによる $\text{Ca}^{2+}$ 流入を抑制するという報告がある[74]。また TRPC-1、-4、-5 は機能的なホモテトラマー及びヘテロテトラマーを形成することが報告されている[18, 21]。本研究では FBS の TRPCs タンパク質発現の総量(-1+-4+-5)は 0% serum と比較し変化がないことを示した。この結果は FBS の m-3M3FBS による弛緩反応が 0% serum と比較して変化がないことと相関しており、本研究においてこれらの TRPCs タンパク質発現の変化が FBS における NO 産生減少に果たす役割は小さいと考えられた。

#### 4-3 結論

結論として、本章では FBS 長期処置は器官培養ラット前腸間膜動脈内皮細胞において受容体、 $\text{G}_q$  蛋白質、 $\text{PLC}_\beta$  経路を障害することによりアゴニストによる NO 産生を抑制すると考えられた。本章では増殖因子長期処置のラット摘出前腸間膜動脈における内皮依存性弛緩反応に及ぼす影響とメカニズムの一端を明らかにした。増殖因子の引き起こす NO 産生障害は、血管拡張作用抑制と血管平滑筋細胞増殖、血小板凝集及び白血球接着を促進することにより高血圧症や動脈硬化症などの慢性血管疾患の進行と悪化を招くと考えられる。今後さらに詳細に増殖因子による NO 産生障害の機序を明らかにし、慢性血管疾患の発症メカニズムや病態生理を解明することが期待される。

## V. 第四章

### 1. 緒論

血管組織の器官培養法は組織構築を維持し組織特異的な細胞機能を保持している為、種々の生理活性物質や薬物の長期作用を検討する上で有用な実験系であると考えられている[53]。第一章では無血清培地における3日間の器官培養後もラット前腸間膜動脈は薬物の長期作用を検討するのに十分な収縮張力と組織形態を維持していることを明らかにした。さらに第二章、第三章では本法を用いて様々な増殖因子を含むFBS長期処置の影響を検討し、FBSの血管平滑筋の収縮性に及ぼす影響は内皮の有無やアゴニストにより異なること、特にE(-)標本では平滑筋層の配列の不整や血管平滑筋細胞の形態変化が原因で最大張力が減弱することを明らかにした[42]。FBS長期処置は血管内皮細胞においては受容体/G<sub>q</sub>蛋白質/PLC $\beta$ 経路を障害しNO産生を阻害することにより内皮依存性弛緩反応を抑制することを明らかにした[41]。

以上の結果やこれまでの報告から血管を生体外で長期間維持するためには無血清培地での器官培養法が最も適していると考えられる[24, 25, 43, 45-50, 58, 68-71]。しかし無血清培地における器官培養血管においても、急性摘出血管と比べると収縮張力の減弱や感受性の変化、受容体発現や細胞内シグナル伝達系などが変化することから、急性摘出血管とは異なる性質を保持することが明らかとなってきた[8, 9, 30, 31, 42, 59, 63, 70]。

生体における血管内皮細胞は常に血液にさらされている。血中に含まれる様々なタンパク質、ビタミン、脂質等が血管恒常性維持に重要であると考えられるが、無血清培地ではこれらの因子が不足している可能性がある。そこで本章では成熟ラット血清を培地に添加することでこれらの因子を補うことが可能であると考え、成熟ラット血清添加の器官培養ラット前腸間膜動脈における内皮依存性弛緩反応に及ぼす影響について検討した。

## 2. 材料および方法

### 2-1 実験材料

II. および III. 2-1 実験材料の項を参照。6-12 週齢の雄性ウイスターラットを深麻酔し頸静脈から血液を採取した後、安楽死させた。全血を遠心分離(4000 rpm、5 分間)後、上清を非働化(56°C、30 分間)し、0.45  $\mu\text{m}$  のフィルターで濾過滅菌して成熟ラット血清を得た。前腸間膜動脈を摘出し E (+) 標本を作成した(fresh)。また無菌的に摘出した標本は 3% 成熟ラット血清存在下(3% serum)あるいは非存在下(0% serum)で、1% Penicillin-Streptomycin を添加した 1 ml の DMEM 中で 37°C、5% CO<sub>2</sub> 下で 3 日間器官培養した。動物の取り扱いについては‘北里大学における動物実験と動物の飼養および保管などに関する規定’に従い適切に行った。

### 2-2 張力測定法

II. 2-2 張力測定法の項を参照。各アゴニストによる弛緩の濃度反応曲線は 30-45 mM KCl で前収縮させた後、累積投与により求めた。実験結果は前収縮を 100% とした時の弛緩率で示した。

### 2-3 組織形態学的検索

ラット摘出前腸間膜動脈標本を 2%パラホルムアルデヒド溶液で 30 分間固定した後、リン酸緩衝生理食塩水で希釈した 0.05% Triton X-100 を 30 分間室温で処置し脱膜化した。5%正常ヤギ血清で 60 分間ブロッキングした後、標本を抗 CD31 抗体 (1:300-1:500 希釈、BD Biosciences Pharmingen、San Jose、CA、USA)に 4°Cで一晩反応させた。続いて蛍光色素標識二次抗体(Alexa Fluor 488; 1:300-1:500 希釈、Molecular Probes、Eugene、OR、USA)を 3 時間反応させた後、4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; 1:1000 希釈、Dojindo、Kumamoto、Japan)を 5 分間反応させ核染色した。染色画像は血



管組織の内膜面を上にしてマウントした後蛍光顕微鏡(BX-51、Olympus)に冷却 CCD カメラを取り付けて(MicroPublisher 5.0 RTV、Roper)撮影した(200 倍)。

#### 2-4 ミトコンドリア由来 $O_2^-$ の測定

ラット前腸間膜動脈標本にミトコンドリア由来  $O_2^-$  特異的蛍光指示薬 MitoSOX Red (5  $\mu$ M、Molecular Probes)を 10 分間、37°C で反応させた。染色画像(en face)は蛍光顕微鏡に冷却 CCD カメラを取り付けて撮影した(200 倍)。

#### 2-5 ミトコンドリア膜電位の測定

MitoTracker Red CMXRos (Molecular Probes)はミトコンドリア膜電位依存性に蓄積する蛍光色素である。ラット前腸間膜動脈標本に MitoTracker Red CMXRos (100 nM)を 30 分間、37°C で反応させた。染色画像(en face)は蛍光顕微鏡に冷却 CCD カメラを取り付けて撮影した(200 倍)。

#### 2-6 使用薬物

DMEM、N-acetyl-L-cysteine (NAC)、SNP、L-arginine (Sigma-Aldrich)、Penicillin-Streptomycin (Invitrogen/GIBCO)、ACh (Daiichi-Sankyo Pharmaceutical)、apocynin (Calbiochem)、tetrahydrobiopterin ( $BH_4$ ) (Cayman Chemical)、allopurinol (LKT laboratories, St. Paul, MO, USA)、rotenone (Enzo, Plymouth Meeting, PA, USA)。Allopurinol と rotenone は 100% DMSO に溶かした。その他の薬物は蒸留水に溶かした。

#### 2-7 統計処理

実験成績は平均値±標準誤差で示した。3 群間統計は分散分析(ANOVA)した後、多重比較として全ての二群同士の比較(Bonferroni's test)を行って評価した。また 2 群間の統計は Student's t-test (unpaired)を行って評価した。危険率( $p$  値)が 5%未満の場合



合に有意差ありとした。

### 3. 実験成績

#### 3-1 成熟ラット血清の器官培養ラット前腸間膜動脈標本における ACh による内皮依存性弛緩反応に及ぼす影響

Fresh において、ACh (0.1 nM-100  $\mu$ M) 累積投与により濃度依存性の弛緩反応が得られた。0% serum の ACh による内皮依存性弛緩反応は fresh と比べ有意に減弱した(30  $\mu$ M ACh による弛緩率:  $97.7 \pm 0.5\%$ ,  $n=6$  for fresh vs.  $70.3 \pm 5.3\%$ ,  $n=5$  for 0% serum,  $p < 0.01$ , 図 24A)。3% serum の ACh による内皮依存性弛緩反応は 0% serum と比べ有意に改善した(30  $\mu$ M ACh による弛緩率:  $84.7 \pm 4.5\%$ ,  $n=6$  for 3% serum,  $p < 0.01$  vs. 0% serum, 図 24A)。10% 成熟ラット血清を添加し器官培養した標本の ACh による弛緩反応は 3% serum と比べ変化なかった(30  $\mu$ M ACh による弛緩率:  $81.4 \pm 3.2\%$ ,  $n=10$ , data not shown)。

#### 3-2 成熟ラット血清の器官培養ラット前腸間膜動脈標本における SNP による内皮非依存性弛緩反応に及ぼす影響

Fresh において SNP (0.1-1000 nM) の累積投与により濃度依存性の弛緩反応が得られた( $n=6$ , 図 24B)。0% serum の SNP による弛緩反応は fresh と比べ変化なかった( $n=6$ , 図 24B)。3% serum の SNP による弛緩反応は 0% serum と比べ変化なかった( $n=6$ , 図 24B)。

#### 3-3 成熟ラット血清の器官培養ラット前腸間膜動脈標本内皮細胞の形態に及ぼす影響

次に内皮細胞の形態について検討するために、内皮細胞特異的マーカー CD31 に対する抗体を用いて血管組織の en face 免疫染色を行った。Fresh において内皮細胞は敷石状に規則正しく配列していた( $n=12$ , 図 25a)。0% serum において内皮細胞は膜が傷害され辺縁が一部不明瞭になるとともに一部円形化した( $n=12$ , 図 25b)。3% serum

においては 0% serum で観察された膜傷害が改善される傾向であった(n=12、図 25c)。また内皮細胞の核を DAPI 染色により観察したが、すべての標本でアポトーシスに典型的な核染色像(濃縮や断片化)はほとんど観察されなかった(n=11-17、図 26a-c)

### 3-4 抗酸化薬 NAC 急性処置の器官培養ラット前腸間膜動脈標本における ACh による内皮依存性弛緩反応に及ぼす影響

次に ROS が 0% serum の内皮依存性弛緩反応減弱に関わるかを検討するために、抗酸化薬 NAC 急性処置の 0% serum における ACh による内皮依存性弛緩反応に及ぼす影響を検討した。NAC (0.7 mM、15 分間)急性処置によって 0% serum の ACh による内皮依存性弛緩反応は有意に改善した(30  $\mu$ M ACh による弛緩率:  $61.0 \pm 4.8\%$ 、n=6 for 0% serum vs.  $78.2 \pm 3.7\%$ 、n=7 for 0% serum+NAC、 $p < 0.05$ 、図 27A)。一方 NAC (0.7 mM、15 分間)急性処置は 3% serum における ACh による内皮依存性弛緩反応には影響を及ぼさなかった(n=6-7、図 27B)。さらに ROS が内皮依存性弛緩反応を減弱させるかを直接検討するために、 $H_2O_2$  急性処置の fresh における ACh による内皮依存性弛緩反応に及ぼす影響を検討した。 $H_2O_2$  (100  $\mu$ M、15 分間)急性処置は fresh の ACh による内皮依存性弛緩反応を有意に減弱させた(10  $\mu$ M ACh による弛緩率:  $90.3 \pm 0.9\%$ 、n=3 for fresh vs.  $85.0 \pm 1.4\%$ 、n=5 for fresh+ $H_2O_2$ 、 $p < 0.05$ 、data not shown)。

### 3-5 各種 ROS 阻害薬急性処置の器官培養ラット前腸間膜動脈標本における ACh による内皮依存性弛緩反応に及ぼす影響

0% serum における内皮依存性弛緩反応の減弱に関わる ROS 産生源を特定するために、各種 ROS 阻害薬急性処置の 0% serum における内皮依存性弛緩反応に及ぼす影響について検討した。NOX 阻害薬 apocynin (10  $\mu$ M、10 分間)急性処置は 0% serum の ACh による内皮依存性弛緩反応に影響を及ぼさなかった(n=4-5、図 28)。eNOS のアンカップリングを解除して ROS 産生を抑制する L-arginine (100  $\mu$ M)と  $BH_4$  (0.1  $\mu$ M)の

併用急性処置(10 分間)は 0% serum の ACh による内皮依存性弛緩反応に影響を及ぼさなかった( $n=4$ 、図 29)。また L-arginine (100  $\mu\text{M}$ 、 $n=3$ )および  $\text{BH}_4$  (100 nM、 $n=4$ )の急性単独処置(10 分間)は 0% serum の ACh による内皮依存性弛緩反応に影響を及ぼさなかった(data not shown)。さらにキサンチン酸化酵素阻害薬 allopurinol (100  $\mu\text{M}$ 、10 分間)急性処置は 0% serum の ACh による内皮依存性弛緩反応に影響を及ぼさなかった( $n=4$ 、図 30)。

### 3-6 ミトコンドリア呼吸鎖複合体 I 阻害薬 rotenone 急性処置の器官培養ラット前腸間膜動脈標本における ACh による内皮依存性弛緩反応に及ぼす影響

Rotenone 急性処置(30 nM、15 分間)は 0% serum の ACh による内皮依存性弛緩反応を有意に改善した(100  $\mu\text{M}$  ACh による弛緩率:  $83.1 \pm 3.0\%$ 、 $n=8$  for 0% serum+DMSO (vehicle for rotenone) vs.  $92.2 \pm 1.5\%$  vs.  $n=5$  for 0% serum+rotenone、 $p<0.05$ 、図 31A)。3% serum においては、rotenone 急性処置(30 nM、15 分間)は高濃度 ACh (0.3-100  $\mu\text{M}$ )による内皮依存性弛緩反応に影響を及ぼさなかったが( $n=5$ 、図 31B)、低濃度 ACh (0.1-100 nM)による内皮依存性弛緩反応を有意に増強した( $n=5$ 、 $p<0.01$ 、0.05)。

### 3-7 成熟ラット血清の器官培養ラット前腸間膜動脈標本内皮細胞におけるミトコンドリア由来 ROS 産生に及ぼす影響

次に MitoSOX Red 染色を用いて内皮細胞におけるミトコンドリア由来 ROS 産生を観察した。Fresh の内皮細胞は MitoSOX Red に陰性であった( $n=3$ 、図 32a)。0% serum の内皮細胞では内皮細胞核 MitoSOX Red 陽性細胞数が顕著に増加した( $n=3$ 、図 32b)。3% serum では MitoSOX Red 陽性細胞数は 0% serum と比較して明らかに減少した( $n=3$ 、図 32c)。

### 3-8 成熟ラット血清の器官培養ラット前腸間膜動脈標本内皮細胞におけるミトコン

ドリア膜電位に及ぼす影響

ミトコンドリア由来 ROS 産生を調節する因子の 1 つにミトコンドリア膜電位がある[75]。そこで次にミトコンドリア膜電位依存性に蓄積する色素 MitoTracker Red CMXRos を用いて内皮細胞の膜電位を観察した。Fresh の内皮細胞では MitoTracker Red CMXRos 陰性であった(n=6、図 33a)。0% serum の内皮細胞では核周囲 MitoTracker Red CMXRos 陽性細胞数が多数観察された(n=7、図 33b)。3% serum の内皮細胞では MitoTracker Red CMXRos 陽性細胞が 0% serum と同様に多数観察された(n=7、図 33c)。



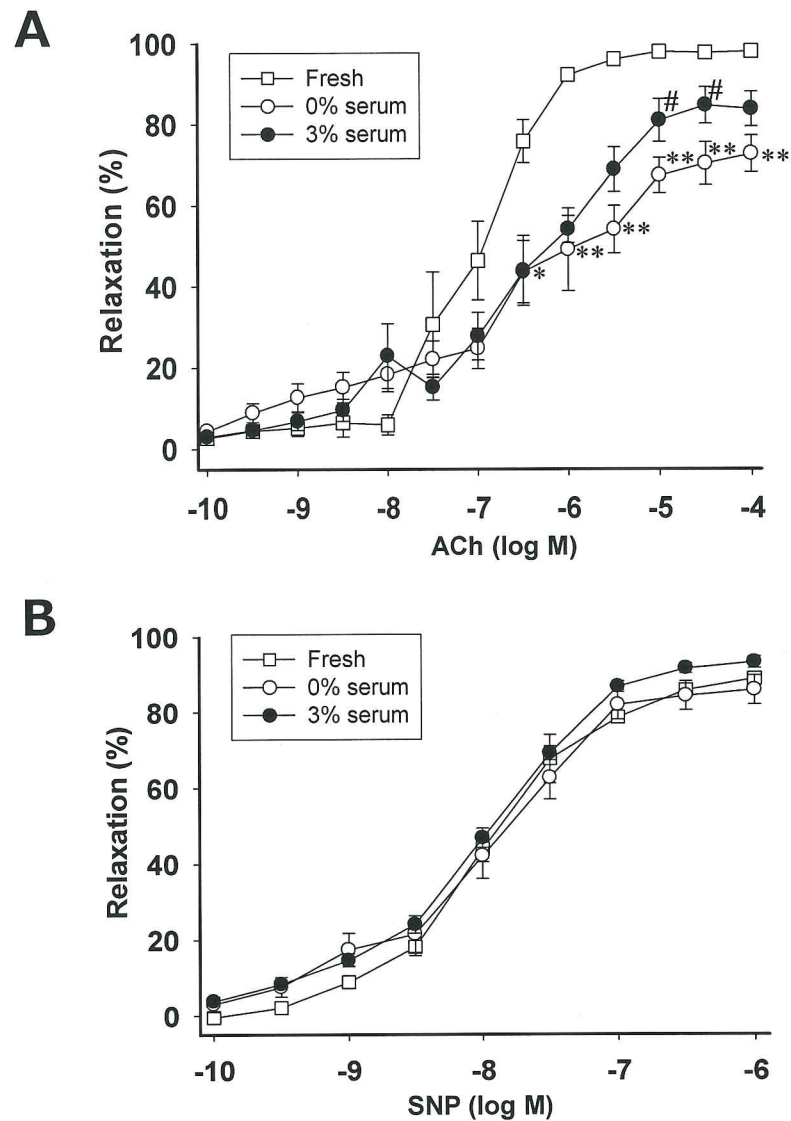
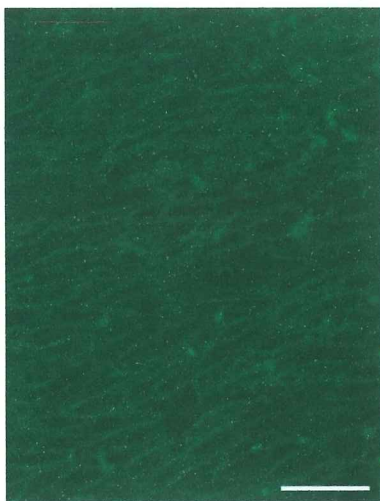


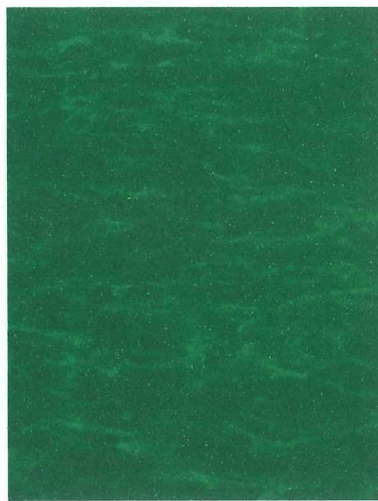
図 24 器官培養ラット前腸間膜動脈標本における ACh および SNP による弛緩反応に及ぼす成熟ラット血清処置の影響

摘出直後の標本を Fresh、3 日間無血清培地で器官培養した標本を 0% serum、3% 成熟ラット血清を添加して培養した標本を 3% serum とした。結果は、各標本における 30-45 mM KCl による前収縮を 100%とした時の弛緩率で示した。ACh (0.1 nM-100  $\mu$ M)、SNP (0.1-1000 nM)は累積投与した。\*, \*\*:  $p < 0.05$  and  $0.01$  vs. Fresh. #:  $p < 0.05$  vs. 0% serum.

**a. Fresh**



**b. 0% serum**



**c. 3% serum**

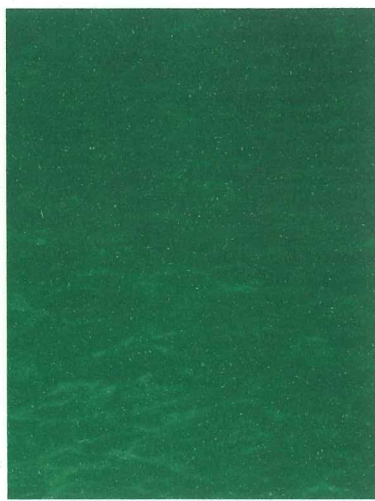
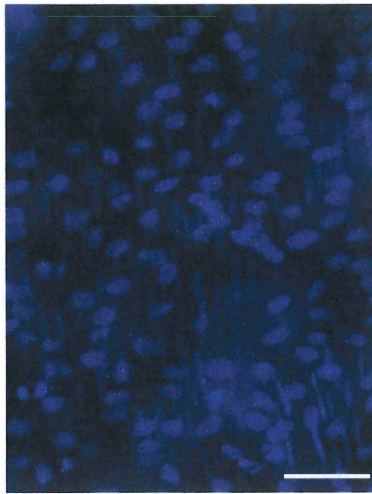


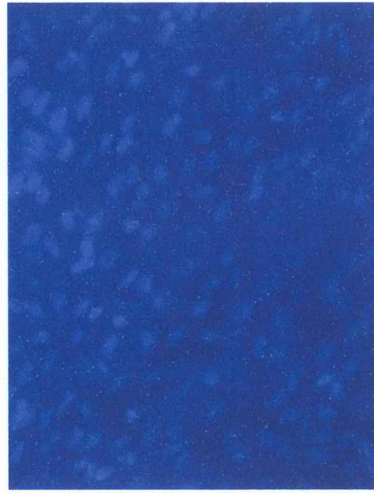
図 25 成熟ラット血清の器官培養ラット前腸間膜動脈標本の内皮細胞の形態に及ぼす影響(抗 CD31 抗体による免疫染色像(en face))

図は血管内皮細胞の抗 CD31 抗体(1:500 希釈)による免疫染色像(en face)を示している。  
a; 摘出直後の標本(Fresh)、b; 3 日間無血清培地で器官培養した標本(0% serum)、c; 3% 成熟ラット血清を添加して培養した標本(3% serum)。スケールバー=50  $\mu$ m.

**a. Fresh**



**b. 0% serum**



**c. 3% serum**

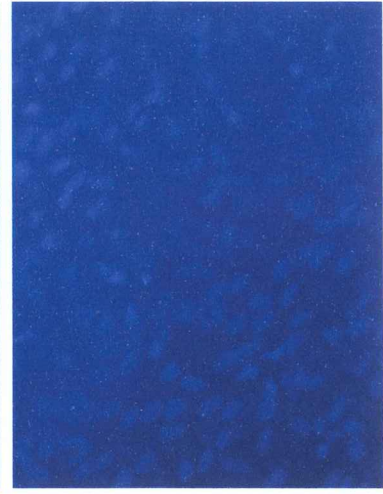


図 26 成熟ラット血清の器官培養ラット前腸間膜動脈標本の内皮細胞の核形態に及ぼす影響(4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)染色像(en face))

図は血管内皮細胞の DAPI (1:1000 希釈)染色像(en face)を示している。a;摘出直後の標本(Fresh)、b; 3 日間無血清培地で器官培養した標本(0% serum)、c; 3%成熟ラット血清を添加して培養した標本(3% serum)。

スケールバー=50  $\mu\text{m}$ .

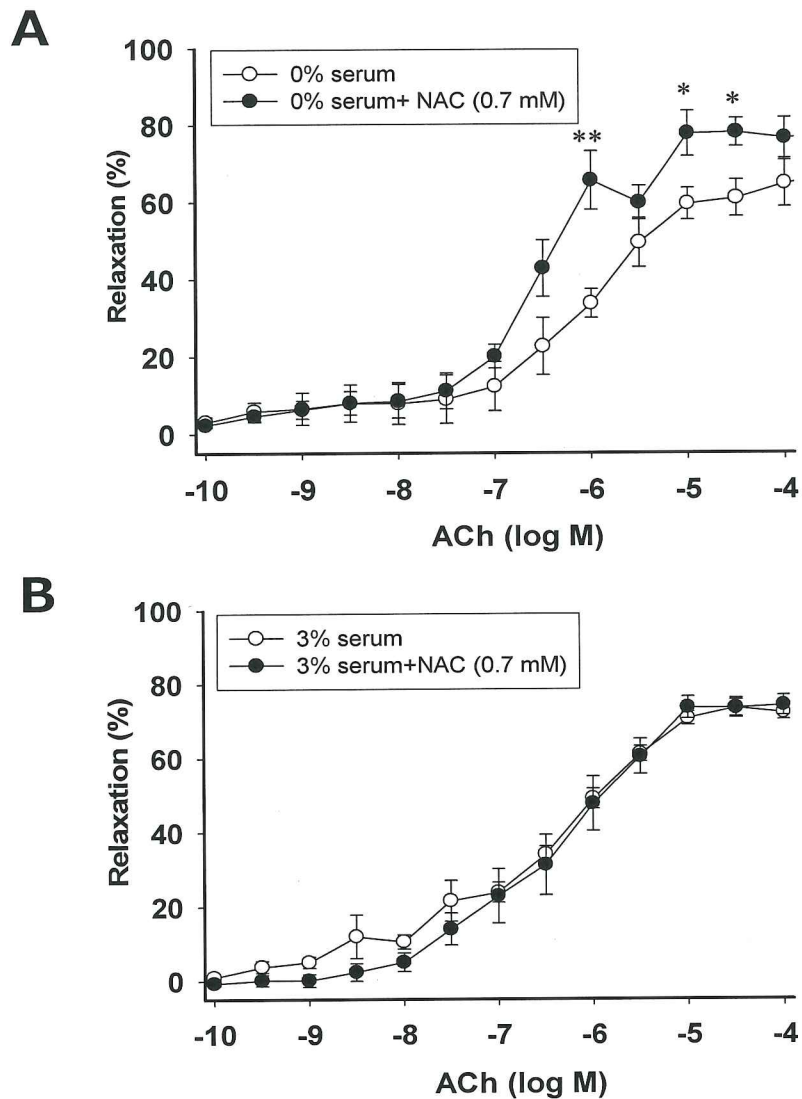


図 27 抗酸化薬 N-acetyl-L-cysteine (NAC)急性処置の器官培養ラット前腸間膜動脈標本における ACh による内皮依存性弛緩反応に及ぼす影響

3 日間無血清培地で器官培養した標本を 0% serum、3%成熟ラット血清を添加して培養した標本を 3% serum とした。NAC (0.7 mM)処置の 15 分後に ACh (0.1 nM-100  $\mu$ M)を累積投与した。結果は、各標本における 30 mM KCl による前収縮を 100%とした時の弛緩率で示した。

\*\*\*:  $p < 0.05$  and  $0.01$  vs. 0% serum.

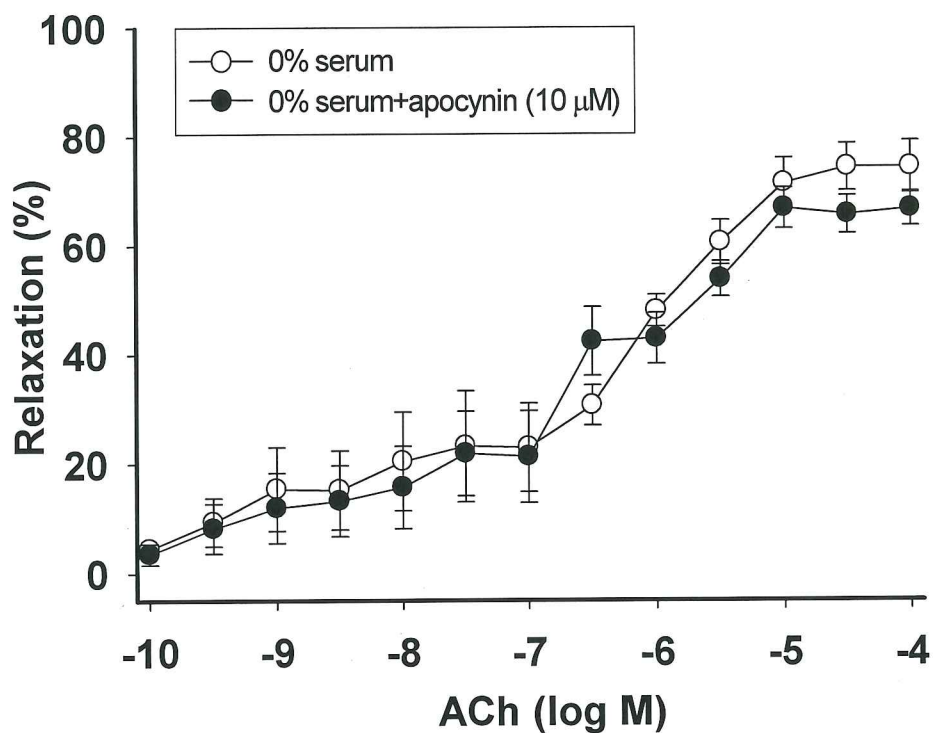


図 28 NADPH 酸化酵素阻害薬 apocynin 急性処置の器官培養ラット前腸間膜動脈標本における ACh による内皮依存性弛緩反応に及ぼす影響

3 日間無血清培地で器官培養した標本を 0% serum とした。Apocynin (10 μM) 処置の 10 分後に ACh (0.1 nM-100 μM) を累積投与した。結果は、各標本における 30 mM KCl による前収縮を 100% とした時の弛緩率で示した。



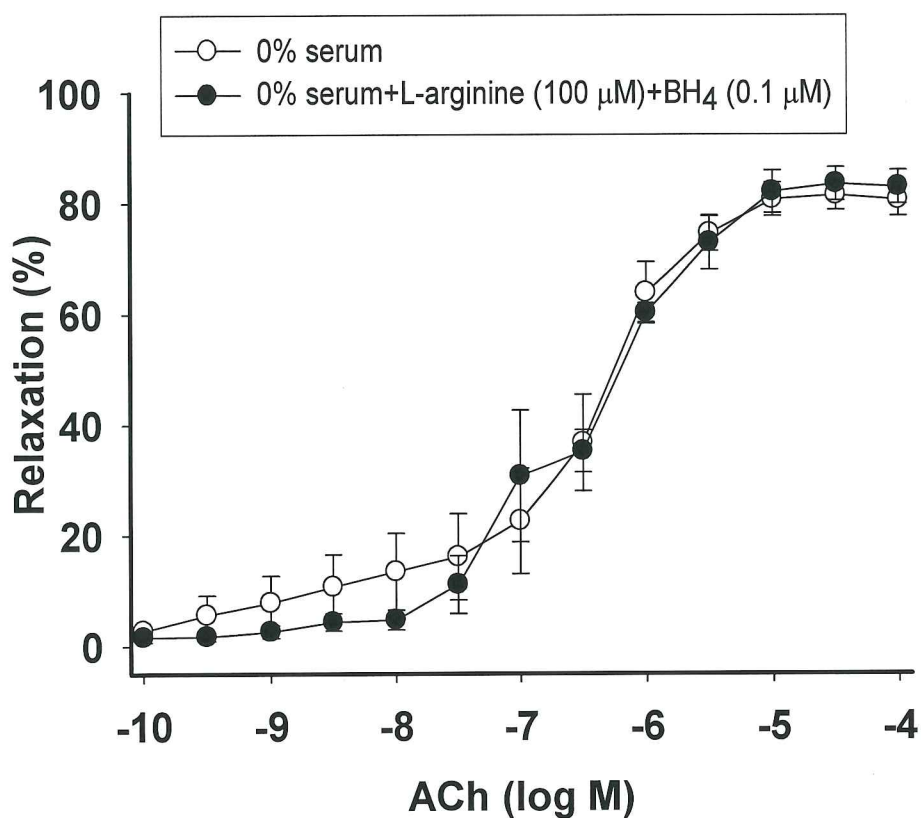


図29 L-arginine と tetrahydrobiopterin (BH<sub>4</sub>)の併用急性処置の器官培養ラット前腸間膜動脈標本における ACh による内皮依存性弛緩反応に及ぼす影響

3日間無血清培地で器官培養した標本を0% serumとした。L-arginine (100 μM)と BH<sub>4</sub> (0.1 μM)併用処置の10分後に ACh (0.1 nM-100 μM)を累積投与した。結果は、各標本における30 mM KClによる前収縮を100%とした時の弛緩率で示した。

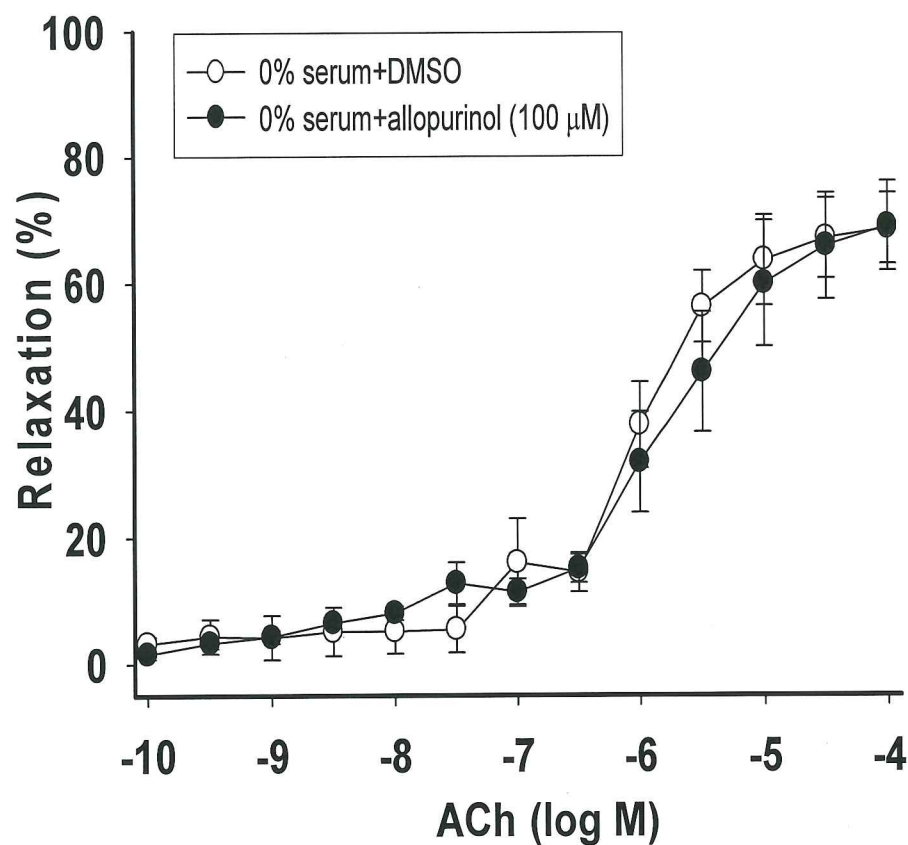


図 30 キサンチン酸化酵素阻害薬 allopurinol 急性処置の器官培養ラット前腸間膜動脈標本における ACh による内皮依存性弛緩反応に及ぼす影響

3 日間無血清培地で器官培養した標本を 0% serum とした。Allopurinol (100 μM) 又は溶媒の DMSO 処置の 10 分後に ACh (0.1 nM-100 μM) を累積投与した。結果は、各標本における 30 mM KCl による前収縮を 100% とした時の弛緩率で示した。

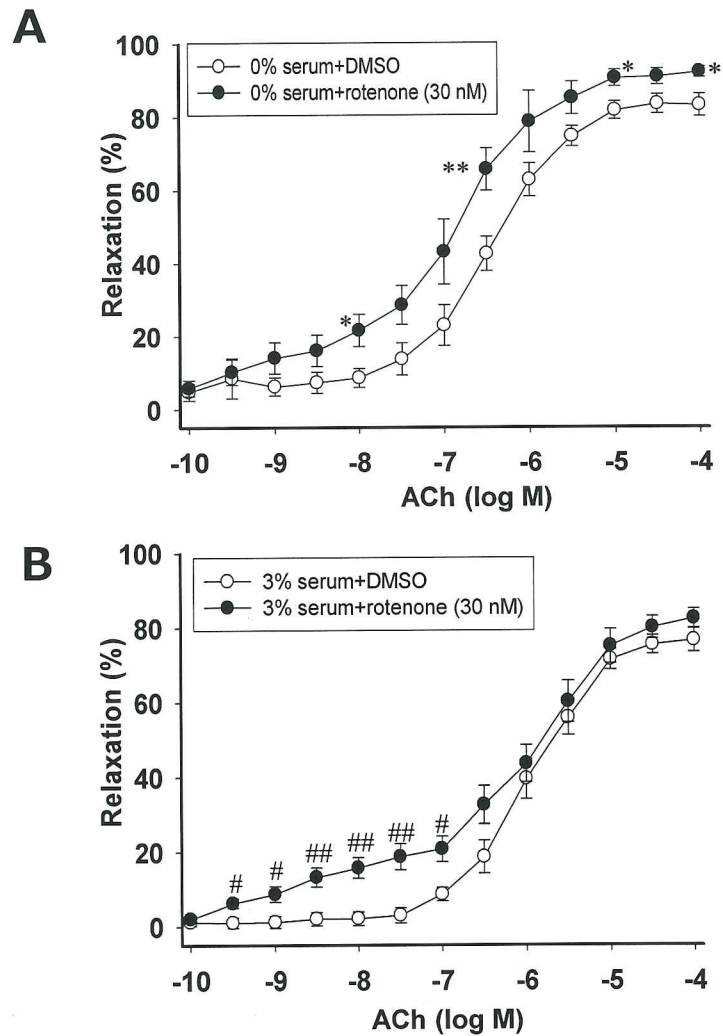


図31 ミトコンドリア呼吸鎖複合体I阻害薬 Rotenone 急性処置の器官培養ラット前腸間膜動脈標本における ACh による内皮依存性弛緩反応に及ぼす影響

3 日間無血清培地で器官培養した標本を 0% serum とした。rotenone (30 nM)又は溶媒の DMSO 処置の 10 分後に ACh (0.1 nM-100  $\mu$ M)を累積投与した。結果は、各標本における 30 mM KCl による前収縮を 100%とした時の弛緩率で示した。

\*\*\*:  $p < 0.05$  and  $0.01$  vs. 0% serum. #, ##:  $p < 0.05$  and  $0.01$  vs. 3% serum.

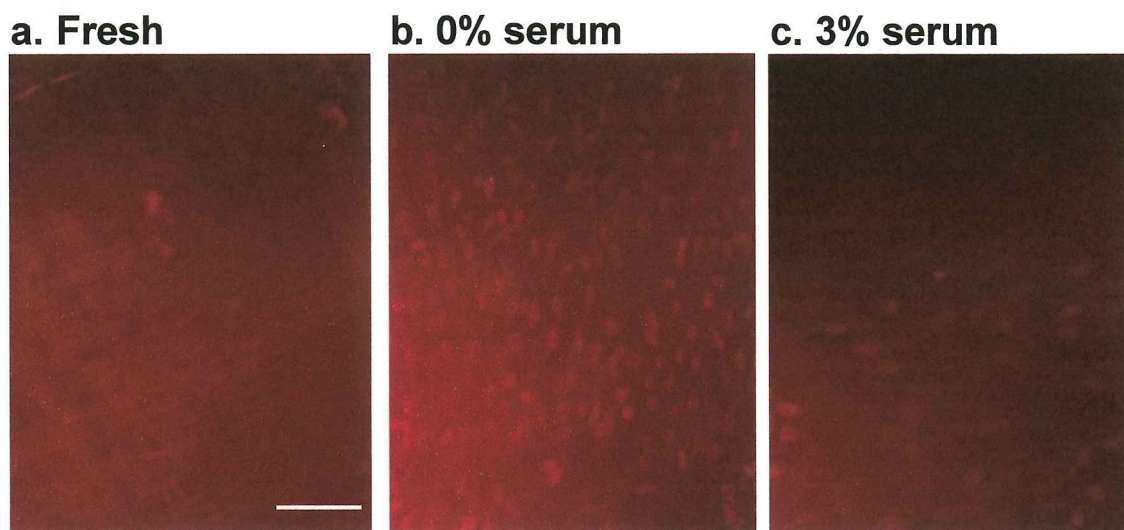


図 32 成熟ラット血清の器官培養ラット前腸間膜動脈標本の内皮細胞におけるミトコンドリア由来 ROS 産生に及ぼす影響(MitoSOX Red 染色像(en face))

図は血管内皮細胞の MitoSOX Red (5  $\mu$ M)染色像(en face)を示している。a;摘出直後の標本(Fresh)、b; 3 日間無血清培地で器官培養した標本(0% serum)、c; 3%成熟ラット血清を添加して培養した標本(3% serum)。スケールバー=50  $\mu$ m.

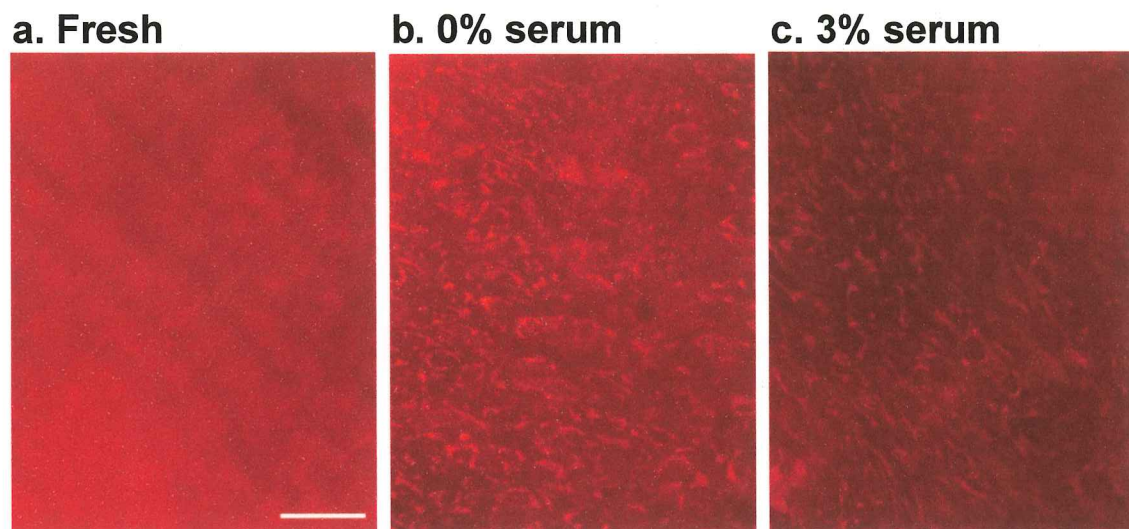


図 33 成熟ラット血清の器官培養ラット前腸間膜動脈標本の内皮細胞におけるミトコンドリア膜電位に及ぼす影響 (MitoTracker Red CMXRos 染色像(en face))

図は血管内皮細胞の MitoTracker Red CMXRos (100 nM)染色像(en face)を示している。  
a;摘出直後の標本(Fresh)、b; 3 日間無血清培地で器官培養した標本(0% serum)、c; 3%成熟ラット血清を添加して培養した標本(3% serum)。スケールバー=50  $\mu$ m.



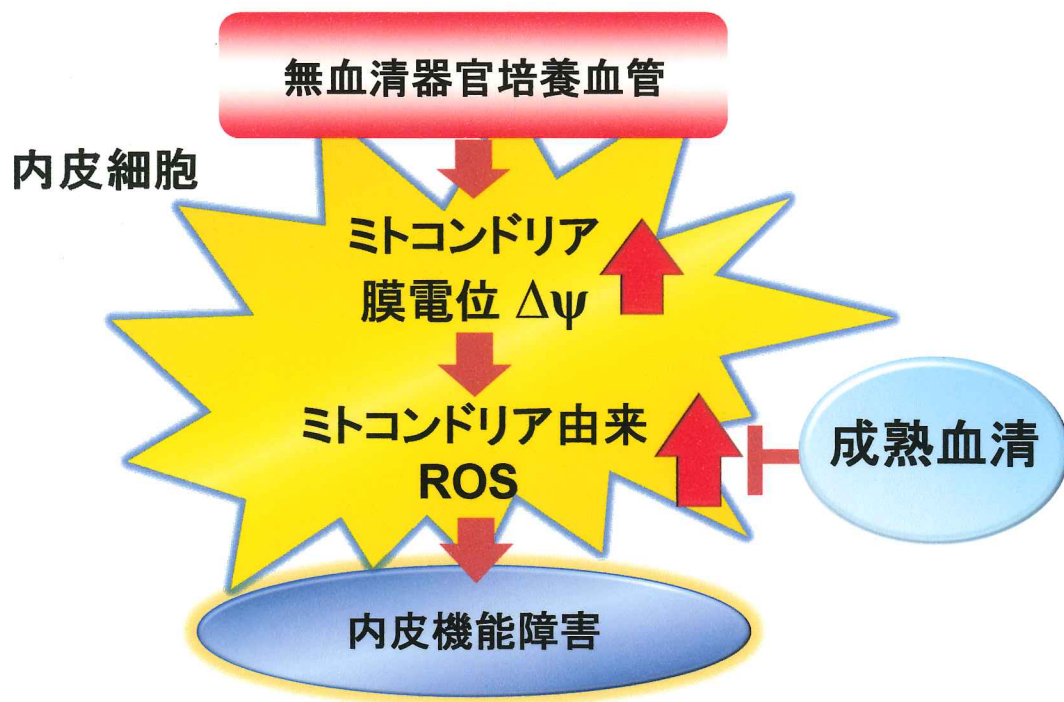


図 34 本章のまとめ

無血清培地での器官培養により血管内皮細胞ではミトコンドリア膜電位が上昇することによってミトコンドリア呼吸鎖複合体由来 ROS 産生が増加し、内皮依存性弛緩反応の障害が起こると考えられる。成熟ラット血清は、ミトコンドリア膜電位上昇を抑制しないがミトコンドリア由来 ROS 産生の抑制あるいは除去により内皮機能障害を改善すると考えられる。

## 4. 考察

### 4-1 まとめ

本章では器官培養ラット前腸間膜動脈を用いて成熟ラット血清処置の内皮依存性弛緩反応に及ぼす影響を検討し以下のことを明らかにした。1) 0% serum において内皮依存性弛緩反応は fresh と比較して有意に減弱した、2) NAC および rotenone 急性処置は 0% serum の内皮依存性弛緩反応の減弱を有意に改善した、3) 0% serum の内皮細胞では膜傷害が観察された、4) 0% serum の内皮細胞においてミトコンドリア由来  $O_2$  産生が fresh と比較して増加した、5) 0% serum の内皮細胞におけるミトコンドリア膜電位は fresh と比較して上昇した、6) 3% serum において内皮依存性弛緩反応は 0% serum と比較して有意に改善した、7) NAC および rotenone 急性処置は 3% serum の内皮依存性弛緩反応に影響を及ぼさなかった、8) 3% serum の内皮細胞形態は 0% serum と比較して改善した、9) 3% serum の内皮細胞におけるミトコンドリア由来  $O_2$  産生は 0% serum と比較して減少した、10) 3% serum の内皮細胞におけるミトコンドリア膜電位は 0% serum と比較して変化がなかった。以上の結果から 0% serum の内皮細胞ではミトコンドリア膜電位が上昇することによりミトコンドリア由来 ROS 産生が増加することで内皮依存性弛緩反応が減弱すると考えられた。成熟ラット血清の培地への添加はミトコンドリア膜電位には影響を及ぼさずに、ミトコンドリア由来 ROS 産生を抑制する、あるいは除去することによって内皮依存性弛緩反応の減弱と内皮細胞形態の傷害を改善すると考えられる(図 34)。

### 4-2 成熟ラット血清処置の器官培養ラット前腸間膜動脈標本における内皮依存性弛緩反応に及ぼす影響

血管内皮細胞における主要な ROS 産生源は、NOX、アンカップリング eNOS、キサンチン酸化酵素およびミトコンドリアである。本研究において NAC 急性処置は

0% serum の内皮依存性弛緩反応減弱を有意に改善したが、NOX、アンカップリング eNOS、キサンチン酸化酵素を阻害しても 0% serum の内皮依存性弛緩反応減弱に影響を及ぼさなかった。一方ミトコンドリア呼吸鎖複合体 I 阻害薬 rotenone 急性処置は 0% serum の内皮依存性弛緩反応減弱を有意に改善した。さらに MitoSOX Red を用いた実験から、ミトコンドリア由来  $O_2^-$  産生が 0% serum の内皮細胞で顕著に増加することが示された。以上の結果から 0% serum では血管内皮細胞においてミトコンドリア由来 ROS 産生の増加が ACh による内皮依存性弛緩反応を減弱させると考えられる。一方 3% serum においては NAC および rotenone の急性処置は内皮依存性弛緩反応に影響を及ぼさず、MitoSOX Red 陽性細胞数も 0% serum と比べて減少した。したがって 3% serum ではミトコンドリア由来 ROS 産生を抑制するか又は除去することが示唆された。ただし rotenone 急性処置は 3% serum における低濃度 ACh による弛緩反応を増強した。Rotenone は E (+) または E (-) ラット摘出大動脈を濃度依存的に弛緩させることが報告されている[67]。またウサギ摘出大動脈において好氣的代謝を阻害すると、 $IP_3$  や DAG の産生に関わるリン脂質代謝が減少し収縮力が減弱することが報告されている[10]。したがって rotenone による低濃度 ACh による弛緩作用の増強は、 $IP_3$  や DAG の産生低下を介した平滑筋収縮抑制作用によるものと考えられる。

本研究で示した成熟ラット血清によるミトコンドリア由来 ROS 産生の抑制又は除去の機序は依然不明である。スーパーオキシドジスムターゼ(SOD) 2 はミトコンドリアに存在し  $O_2^-$  を除去する酵素の 1 つである。結果には示さなかったが、3% serum において SOD2 のタンパク質発現は 0% serum と変化がなかったことから SOD2 の関与は低いと考えられる(n=4、data not shown)。ミトコンドリア由来 ROS 産生は電子伝達の遅延や複合体 III における QH・保持期間の延長が原因でおこる。呼吸鎖複合体 I から III への電子伝達には肝臓で合成される補酵素 CoQ が必要である。0% serum では CoQ 不足の為電子伝達が遅延し、ROS 産生が起こる可能性が考えられる。したがって血清に含まれる CoQ が ROS 産生を抑制する原因の 1 つであると推察される。



また血清中には様々な抗酸化物質（ビタミン、尿素、ビリルビン、アルブミン、SOD など）が含まれており、効率よく ROS を除去することができると考えられる。

抗 CD31 抗体を用いた免疫染色の結果から 0% serum の内皮細胞では膜傷害が生じ、3% serum においてそれが改善することが観察された。0% serum における内皮細胞の形態変化は ROS による傷害によるものではないかと考えられる。ヒドロキシラジカルが細胞膜脂質に作用し脂質ラジカル( $L\cdot$ :アルコキシルラジカル)が生成された後、酸素分子( $O_2$ )とすみやかに反応して、脂質ペルオキシラジカル( $LOO\cdot$ :アルキルペルオキシラジカル)が生成される。脂質ペルオキシラジカル( $LOO\cdot$ )は、他の脂質(LH)と反応して水素を引き抜き、自らは脂質ヒドロペルオキシド(過酸化脂質:  $LOOH$ )になると同時に、新たに脂質ラジカル( $L\cdot$ )が生成される[61]。この連鎖的脂質過酸化反応により ROS は細胞膜を傷害するものと考えられる。また遊離脂肪酸の界面活性作用により膜傷害が生じることも考えられる。3% serum においては、血清中に含まれるビタミン E などの抗酸化物質が膜の脂質過酸化を抑制するために、内皮細胞の形態が改善する可能性が考えられる。また 3% serum では血清中に含まれる L-カルニチンが遊離脂肪酸を捕捉するため膜傷害を抑制した可能性も考えられる。

これまで内皮細胞における ATP 産生は好氣的条件下においても解糖系に依存しており、ミトコンドリア由来 ROS による障害をまぬがれていることが報告されている[55]。本研究では fresh の血管内皮細胞には MitoSOX Red および MitoTracker Red CMXRos 染色に陰性であり、過去の報告と一致していた。一方、本研究において 0% serum、3% serum 共に内皮細胞のミトコンドリア膜電位は上昇していた。ミトコンドリア膜電位は酸化的リン酸化の過程において上昇する。またその過程で 1-4%の  $O_2$  のリークが起こり、ミトコンドリア由来 ROS 産生の原因となる[75]。ミトコンドリア膜電位は、ミトコンドリア呼吸鎖複合体 I、III、IV において nicotinamide adenine dinucleotide (NADH)や flavin adenine dinucleotide ( $FADH_2$ )由来電子の伝達を行うと同時にプロトンミトコンドリアマトリックスから膜間腔に送り込むことにより生じる。

したがって 0% serum や 3% serum で見られた内皮細胞のミトコンドリア膜電位の上昇機序として以下のことが考えられる。1)呼吸鎖に NADH や  $\text{FADH}_2$  が過剰に流入する、2)呼吸鎖複合体の発現が増加する、3)ミトコンドリア膜電位を脱共役させるタンパク質である uncoupling proteins (UCPs)発現が減少する。1)に関して、解糖系以外の NADH や  $\text{FADH}_2$  の供給源としては tricarboxylic acid (TCA)回路が考えられるため、器官培養ラット前腸間膜動脈内皮細胞において TCA 回路が作動しているのではないかと考えられる。これまでにヒト臍帯静脈内皮細胞において脂肪酸酸化が ATP の供給源となるという報告がある[11]。すなわち、脂肪酸酸化が起きアセチル CoA が TCA 回路に流入した結果 TCA 回路を作動させ、生じた NADH や  $\text{FADH}_2$  が呼吸鎖複合体へ流入し、ミトコンドリア膜電位の上昇を引き起こす可能性が考えられる。2)に関しては呼吸鎖複合体のタンパク質発現が増加することにより、より多くの電子伝達が可能となり、膜電位が上昇する可能性も考えられる。これまで nuclear factor (NF)- $\kappa\text{B}$  が呼吸鎖複合体の発現を増加させることが報告されている[37]。つまり器官培養により NF- $\kappa\text{B}$  の発現増加または活性化が起こることで、呼吸鎖複合体の発現が増加しミトコンドリア膜電位が上昇する可能性が考えられる。3)に関しては、L6 筋管細胞において甲状腺ホルモン、peroxisome proliferator-activated receptor ligands やレチノイン酸が UCP-3 発現を増加させることが報告されている[51]。したがって器官培養によりこれらの生理活性因子が欠如し、UCPs タンパク発現が減少するため膜電位が上昇する可能性も考えられる。

#### 4-3 結論

結論として、無血清培地での器官培養により血管内皮細胞ではミトコンドリア膜電位が上昇することによってミトコンドリア呼吸鎖複合体由来 ROS 産生が増加し、内皮依存性弛緩反応や細胞膜形態の障害が起こると考えられる。成熟ラット血清はミトコンドリア膜電位の上昇は抑制しないがミトコンドリア由来 ROS 産生の抑制



あるいは除去により内皮機能障害を改善すると考えられた。器官培養血管の機能をより fresh に近づけるには更なる検討が必要であるが、器官培養時にラット成熟血清を添加することは有用であることが示された。

## VI. 第五章

### 1. 緒論

第一章では3日間の無血清培地での器官培養によって有意な差はないもののラット摘出腸間膜動脈平滑筋の収縮張力が減弱する傾向を示すことを明らかにした[42]。第四章では無血清培地での器官培養(3日間)により血管内皮細胞においてはミトコンドリア膜電位が上昇することによってミトコンドリア呼吸鎖複合体由来 ROS 産生が増加し内皮機能障害が起こることを明らかにした[40]。このように無血清培地における器官培養血管は、急性摘出血管と比べると異なる性質を示し、培養期間にも限界がある。

mTORは細胞の分化を調節する非定型セリン/トレオニンプロテインキナーゼであり、ラパマイシンに対して異なる感受性を示す2つの複合体が存在する。mTOR complex (mTORC) 1はラパマイシンに対する感受性が高い。一方、mTORC2はほとんどの細胞でラパマイシン感受性が低いがラパマイシンの長期処置に対しては感受性を示すことがある[19]。ラパマイシンとインスリン様増殖因子(insulin-like growth factor (IGF)-1)を併用処置すると p70 S6 kinase/insulin receptor substrate (IRS)-1/Akt2 経路を介して血管平滑筋細胞の分化が促進することが報告されている[36]。さらに mTOR は平滑筋の筋小胞体を介した細胞質内における  $\text{Ca}^{2+}$  動態の調節にも関与することが報告されている[32, 34]。mTORC1 の上流には少なくとも5つのシグナル調節系(増殖因子、ストレス、エネルギー状態、アミノ酸、酸素レベル)があり mTORC1 の活性化を促進する[27]。一方 mTORC2 の活性調節機構は依然不明な点が多いが増殖因子やインスリンによって phosphoinositide 3-kinase (PI3K) 依存性に活性化されることが報告されている[19]。このように mTOR は血管平滑筋の分化や増殖、 $\text{Ca}^{2+}$  ホメオスタシスに関与することから、無血清培地での器官培養後に起こる血管平滑筋の機能変化(収縮力の減弱)に関わる因子の1つである可能性が考えられた。そこで本章では mTOR 阻害薬ラパマイシンを無血清培地に添加して5日間器官培養した時のラット前腸間膜動脈の収

縮張力に及ぼす影響について検討した。

## 2. 材料および方法

### 2-1 実験材料

II. および III. 2-1 実験材料の項を参照。6-14 週齢の雄性ウイスターラットから前腸間膜動脈を摘出し E (+) 標本を作成した(fresh)。また無菌的に摘出した標本は 50 nM のラパマイシン存在下(rapamycin)あるいは非存在下(0% serum)で、1% Penicillin-Streptomycin を添加した 1 ml の DMEM 中で 37°C、5% CO<sub>2</sub> 下で 5 日間器官培養した。培地は 1 日おきに交換した。動物の取り扱いについては‘北里大学における動物実験と動物の飼養および保管などに関する規定’に従い適切に行った。

### 2-2 張力測定法

II. 2-2 張力測定法の項を参照。KCl による収縮の濃度反応曲線は累積投与(5.4-75.4 mM)により求めた。

### 2-3 ウェスタンブロッティング

IV. 2-5 ウェスタンブロッティングの項を参照。

### 2-4 使用薬物

DMEM (Wako, Osaka, Japan)、Penicillin-Streptomycin (Invitrogen/GIBCO)、rapamycin (Cayman Chemical)、KCl (Kanto Chemical, Tokyo, Japan)。

### 2-5 一次抗体

mTOR (Eno Gene, Nanjing, China)、phospho-mTOR (Acris antibodies, San Diego, CA, USA)、 $\alpha$ -actin (Dako, Glostrup, Denmark)、myocardin (Bioss, Woburn, MA, USA)、calponin (Thermo Fisher Scientific, Kanagawa, Japan)、phospho-Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent

protein kinase (CaMK) II (Thr286) (Signalway Antibody、College Park、MD、USA)、total CaMKII $\delta$ 、SM22 $\alpha$ /transgelin (Genetex、Irvine、CA、USA)。

## 2-6 統計処理

実験成績は平均値 $\pm$ 標準誤差で示した。統計評価は分散分析(ANOVA)した後に、多重比較として全ての二群同士の比較(Bonferroni's test)を行って評価した。危険率( $p$  値)が 5%未満の場合に有意差があったとした。



### 3. 実験成績

#### 3-1 ラパマイシン処置の器官培養ラット前腸間膜動脈標本における KCl による収縮張力に及ぼす影響

第一章では3日間の無血清培地での器官培養後ラット前腸間膜動脈においてアゴニストによる収縮張力が fresh と比較して減弱する傾向を示すことを明らかにした。本章では器官培養期間を5日間まで延長した時の KCl による収縮張力とそれに及ぼすラパマイシン処置の影響を検討した。Fresh において KCl (5.4-75.4 mM) の累積投与により濃度依存性の収縮反応が得られた。0% serum の KCl による最大張力は fresh と比較し有意に減弱した(75.4 mM KCl による最大張力:  $2.38 \pm 0.14$  g/mg w.w.,  $n=21$  for fresh vs.  $1.05 \pm 0.16$  g/mg w.w.,  $n=7$  for 0% serum,  $p<0.01$ , 図 35A)。Rapamycin の KCl による最大張力は 0% serum と比較し有意に改善した(75.4 mM KCl による最大張力:  $1.91 \pm 0.29$  g/mg w.w.,  $n=7$ ,  $p<0.05$  vs. 0% serum, 図 35A)。0% serum の KCl に対する濃度反応曲線は fresh と比較して有意に左方移動した( $pD_2$ : 4.01 for fresh vs. 2.01 for 0% serum,  $p<0.01$ , 図 35B)。Rapamycin の KCl に対する濃度反応曲線は 0% serum と比較して変化なかった( $pD_2$ : 1.87, 図 35B)。

#### 3-2 ラパマイシン処置の器官培養ラット前腸間膜動脈標本における mTOR タンパク質の発現およびリン酸化に及ぼす影響

次にウエスタンブロットティングを用いて mTOR タンパク質の発現およびリン酸化について検討した。0% serum の mTOR タンパク質発現は fresh と比較して有意に増加した( $n=10$ ,  $p<0.01$  vs. fresh, 図 36A、B)。Rapamycin の mTOR タンパク質発現は 0% serum と比較して有意に減少した( $n=10$ ,  $p<0.01$  vs. 0% serum, 図 36A、B)。mTOR タンパク質のセリン 2448 残基のリン酸化レベルは mTOR タンパク質発現量で補正した時、fresh、0% serum、rapamycin 間で変化なかった(図 36A、C)。

### 3-3 ラパマイシン処置の器官培養ラット前腸間膜動脈標本における myocardin、 $\alpha$ -actin、SM22 $\alpha$ 、calponin タンパク質発現に及ぼす影響

0% serumでは平滑筋の収縮タンパク質発現が減少するためにKClによる収縮張力が減弱し、rapamycinではそれが増加するために収縮張力が改善する可能性が考えられた。そこで血管平滑筋の収縮タンパク質発現調節に重要な因子であるmyocardinと血管平滑筋の収縮タンパク質である $\alpha$ -actin、SM22 $\alpha$ およびcalponinのタンパク質発現をウェスタンブロットティングにより検討した。0% serumのmyocardin ( $n=9$ ,  $p<0.01$ 、図37A)、SM 22 $\alpha$  ( $n=9$ ,  $p<0.01$ 、図37C)およびcalponin ( $n=14$ ,  $p<0.01$ 、図37D)タンパク質発現はfreshと比較して有意に減少した。また0% serumの $\alpha$ -actinタンパク質発現はfreshと比較して減少傾向を示したが有意な差はなかった( $n=39$ 、図37B)。Rapamycinのmyocardinタンパク質発現は0% serumと比較して有意に改善した( $p<0.01$  vs. 0% serum、図37A)が、すべての収縮タンパク質の発現は0% serumと変化がなかった(図37B-D)。

### 3-4 ラパマイシン処置の器官培養ラット前腸間膜動脈標本における基底状態 CaMKII タンパク質の発現とリン酸化に及ぼす影響

収縮タンパク質発現の増加が rapamycin における KCl による収縮張力が改善する原因ではないと考えられたため、次に収縮タンパク質活性化経路に着目した。このために 0% serum と rapamycin における基底状態の CaMKII タンパク質の発現およびリン酸化に及ぼす影響について検討した。0% serum の CaMKII タンパク質発現は fresh と比較し有意に増加した( $n=6$ ,  $p<0.05$  vs. fresh、図 38A、B)。一方、rapamycin の CaMKII タンパク質発現は 0% serum と比較し変化なかった( $n=6$ 、図 38A、B)。0% serum の CaMKII トレオニン 286 残基のリン酸化レベルは fresh と比較し有意に上昇した( $n=6$ ,  $p<0.01$ 、図 38A、C)。Rapamycin の CaMKII リン酸化レベルは 0% serum と比較し有意に低下した( $n=6$ ,  $p<0.01$  vs. 0% serum、図 38A、C)。

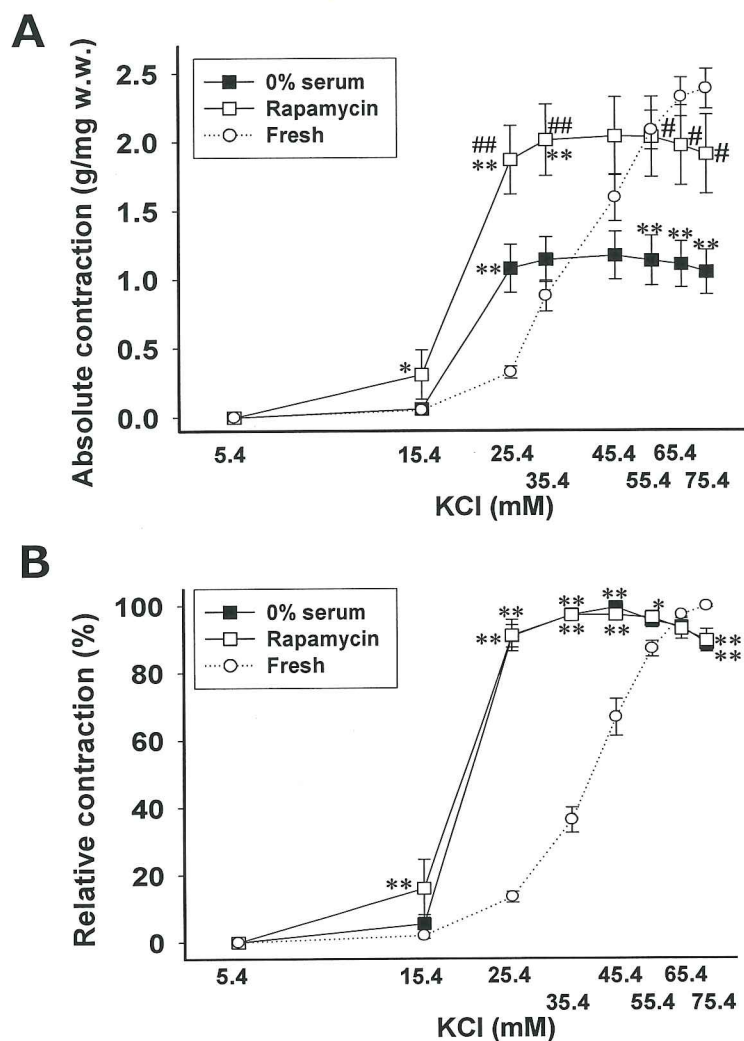


図 35 器官培養ラット前腸間膜動脈標本における KCl による収縮反応に及ぼすラパマイシン処置の影響

摘出直後の標本を Fresh、5 日間無血清培地で器官培養した標本を 0% serum、ラパマイシン(50 nM)を添加して培養した標本を Rapamycin とした。絶対張力は標本の湿重量で補正した(g/mg w. w.) (A)。相対張力は、各標本における KCl による最大張力を 100% として標準化した(B)。KCl (5.4-75.4 mM)は累積投与した。\*, \*\*:  $p < 0.05$  and  $0.01$  vs. Fresh. #, ##:  $p < 0.05$  and  $0.01$  vs. 0% serum.

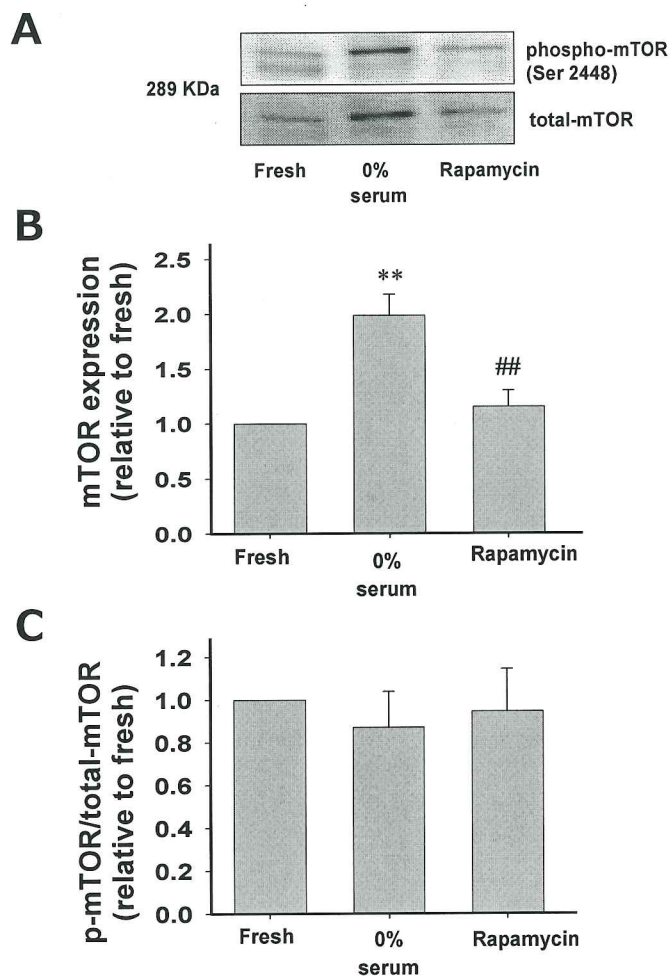


図 36 器官培養ラット前腸間膜動脈標本における mammalian target of rapamycin (mTOR)タンパク質の発現およびリン酸化に及ぼすラパマイシン処置の影響

摘出直後の標本を Fresh、5 日間無血清培地で器官培養した標本を 0% serum、ラパマイシン(50 nM)を添加して培養した標本を Rapamycin とした。タンパク質を抽出した後、ウエスタンブロッティングにより mTOR タンパク質発現およびリン酸化(Ser2448)レベルを検討した。Fresh に対する比率を棒グラフで示した。\*:  $p < 0.01$  vs. Fresh. #:  $p < 0.01$  vs. 0% serum.



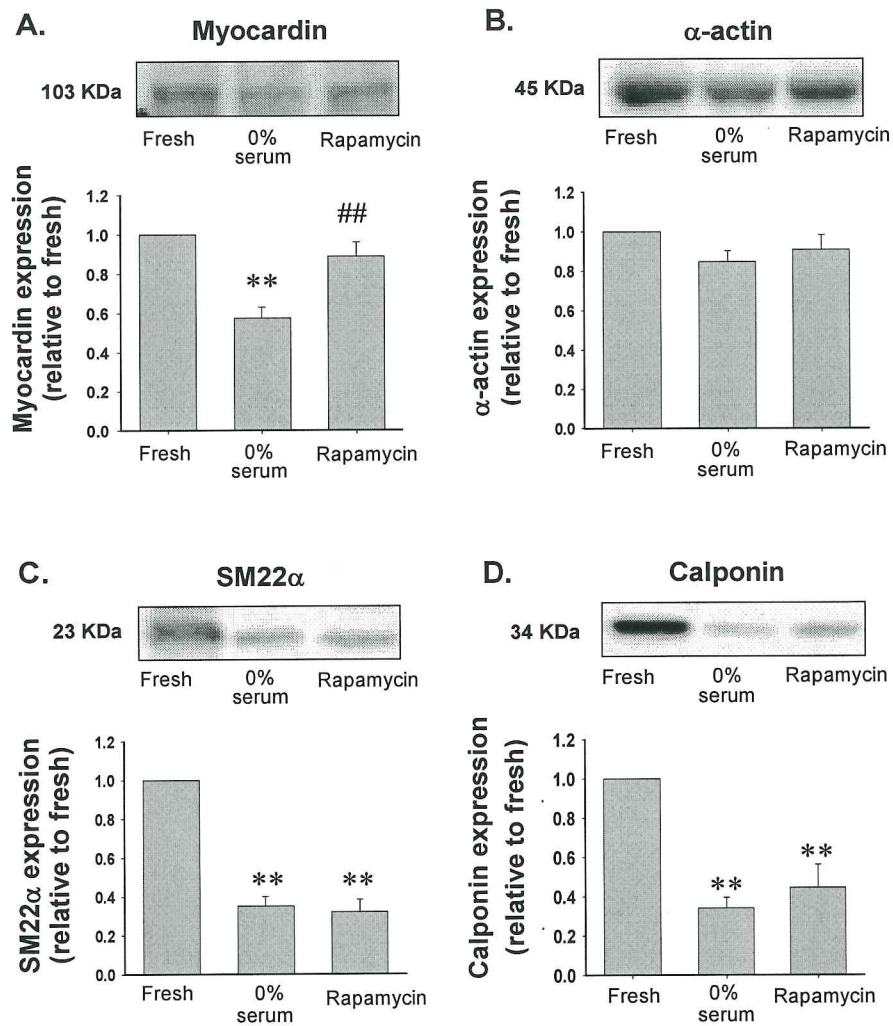


図 37 器官培養ラット前腸間膜動脈標本における myocardin、α-actin、SM22α、calponin タンパク質の発現に及ぼすラパマイシン処置の影響

摘出直後の標本を Fresh、5 日間無血清培地で器官培養した標本を 0% serum、ラパマイシン(50 nM)を添加して培養した標本を Rapamycin とした。タンパク質を抽出した後、ウエスタンブロッティングにより myocardin、α-actin、SM22α、calponin タンパク質発現を検討した。Fresh に対する比率を棒グラフで示した。

\*\*:  $p < 0.01$  vs. Fresh. #:  $p < 0.01$  vs. 0% serum.



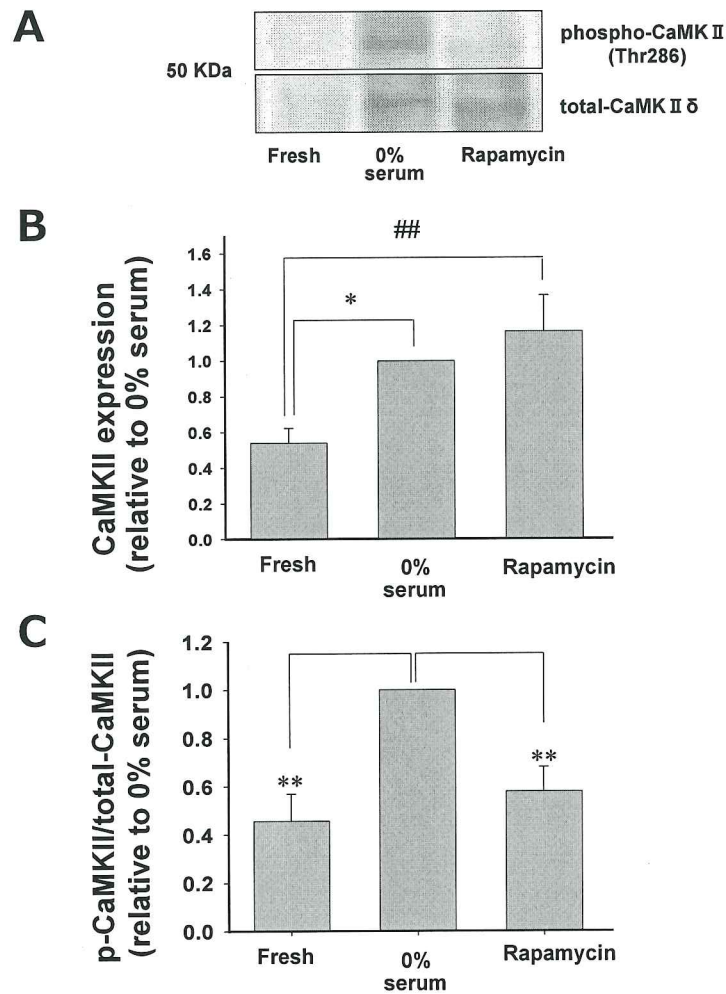


図 38 器官培養ラット前腸間膜動脈標本における  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase (CaMK) II タンパク質の発現および基底状態リン酸化レベルに及ぼすラパマイシン処置の影響

摘出直後の標本を Fresh、5 日間無血清培地で器官培養した標本を 0% serum、ラパマイシン(50 nM)を添加して培養した標本を Rapamycin とした。タンパク質を抽出した後、ウエスタンブロッティングにより CaMKII タンパク質発現およびリン酸化(Thr286)レベルを検討した。0% serum に対する比率を棒グラフで示した。

\*, \*\*:  $p < 0.05$  and  $0.01$  vs. 0% serum. #:  $p < 0.01$  vs. Fresh.

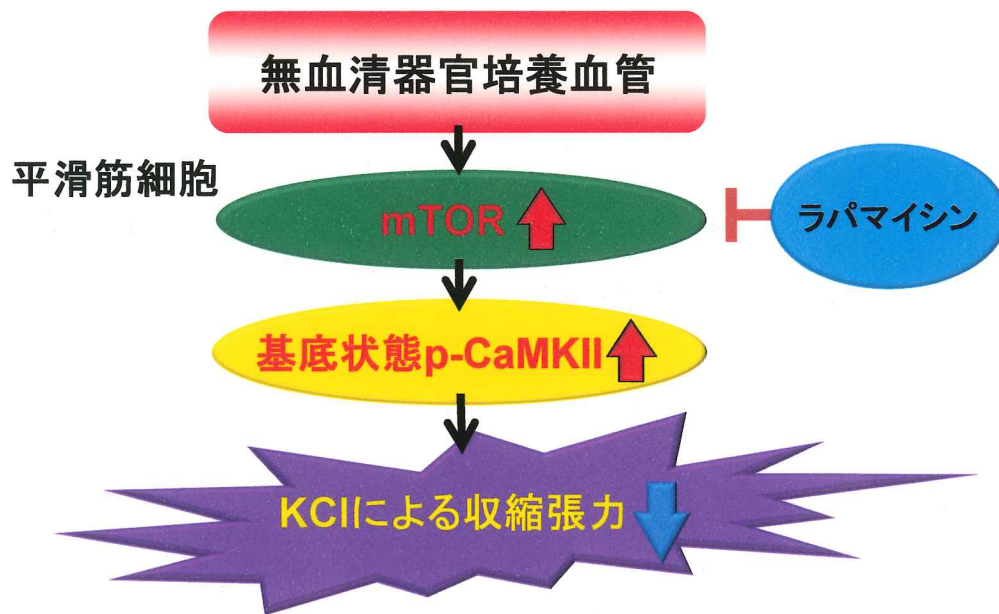


図 39 本章のまとめ

無血清培地での 5 日間の器官培養により血管平滑筋において mTOR タンパク質発現が増加することによって基底状態の CaMKII のリン酸化レベルが上昇して KCl による収縮張力が減弱することが示唆された。ラパマイシンは mTOR タンパク質発現の増加を抑制することにより基底状態 CaMKII リン酸化レベルが低下して KCl による収縮張力を改善すると考えられる。

## 4. 考察

### 4-1 まとめ

本章では無血清器官培養ラット前腸間膜動脈(5日間)においてラパマイシン処置の KCl による収縮張力に及ぼす影響について検討し以下のことを明らかにした。

1) 0% serum において KCl による最大張力は fresh と比較して有意に減弱した、2) 0% serum において KCl に対する濃度反応曲線は fresh と比較し左方移動した、3) 0% serum において mTOR タンパク質発現は fresh と比較して有意に増加した、4) 0% serum において myocardin、SM22 $\alpha$ および calponin タンパク質発現は fresh と比較し有意に減少した、5) 0% serum において基底状態 CaMKII トレオニン 286 残基のリン酸化レベルは fresh と比較して有意に上昇した、6) rapamycin において KCl による最大張力は 0% serum と比較し有意に増加したが KCl に対する感受性は 0% serum と変化なかった、7) rapamycin において mTOR タンパク質発現は 0% serum と比較し有意に低下した、8) rapamycin において myocardin タンパク質発現は 0% serum と比較し有意に増加したが  $\alpha$ -actin、SM22 $\alpha$ 、calponin タンパク質発現は 0% serum と比較し変化がなかった、9) rapamycin において基底状態の CaMKII リン酸化レベルは 0% serum と比較し有意に低下した。以上の結果から 0% serum では fresh と比較し mTOR タンパク質発現が増加し基底状態 CaMKII リン酸化レベルが上昇することによって KCl による収縮張力が減弱すると考えられた。ラパマイシン処置は mTOR タンパク質発現を減少させることによって基底状態 CaMKII リン酸化レベルを低下させることで 0% serum における KCl による収縮張力の減弱を改善すると考えられる(図 39)。

### 4-2 ラパマイシン処置の無血清器官培養ラット前腸間膜動脈標本における KCl による収縮張力に及ぼす影響

これまでに mTOR が細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  動態を調節するという報告がある[32, 34, 56]。mTOR は FK506-binding protein (FKBP)12-rapamycin complex-associated protein (1) とも呼ばれており、FKBP12 および  $\text{IP}_3$  receptor ( $\text{IP}_3\text{R}$ ) と複合体を形成する。これまでに門脈において  $\text{IP}_3\text{R}$  による  $\text{Ca}^{2+}$  放出は FKBP と mTOR が協調して行われることや、ラパマイシンは mTOR の阻害を介して  $\text{IP}_3\text{R}$  による  $\text{Ca}^{2+}$  放出を抑制することが報告されている[32, 34]。また膵臓の adenocarcinoma AR4-2J 細胞において、mTOR は  $\text{IP}_3\text{R}$  type 2 をリン酸化して  $\text{Ca}^{2+}$  放出活性を高めることも報告されている[56]。したがって 0% serum の mTOR タンパク質発現の増加により  $\text{IP}_3\text{R}$  を介した  $\text{Ca}^{2+}$  放出が増加することにより細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度が増加し、基底状態の CaMKII のリン酸化レベルが上昇したのではないかと考えられる。さらにこのことが原因で筋小胞体内の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度が低下(枯渇)する可能性が考えられ、これが 0% serum において KCl による収縮張力が減弱する一因ではないかと推察された。また、基底状態の CaMKII リン酸化レベルの上昇は KCl による収縮タンパク質の活性化の妨げとなる可能性も考えられる。

カルシニューリンもまた FKBP-ryanodine receptor (RyR)あるいは FKBP- $\text{IP}_3\text{R}$  複合体の形成に関わっており  $\text{Ca}^{2+}$  放出の調節を行っている[7, 33]。これまで  $\text{H}_2\text{O}_2$  によって活性化したカルシニューリンがミオシン軽鎖のリン酸化を抑制することにより KCl による収縮張力の減弱を引き起こすことや、ラパマイシンがそれを抑制することが報告されている[15]。図には示さなかったが、本研究においてはカルシニューリン阻害薬 FK506 (1-10  $\mu\text{M}$ 、5 日間)処置は 0% serum における KCl による収縮張力に影響を及ぼさなかった( $n=4$ )。このことから 0% serum で見られた KCl による収縮張力減弱機序にはカルシニューリンは関与しないことが示唆される。

これまでにマウス摘出大動脈を器官培養した後に収縮タンパク質の mRNA 発現レベルが減少することが報告されている[76]。また Akt 活性化による転写調節因子 forkhead box O4 (FoxO4)の核内から細胞質への移行が serum response factor (SRF)-myocardin 複合体による収縮タンパク質発現を促進することが報告されている[29]。さらに血管平滑



筋細胞においてラパマイシンは IGF-1 による Akt2 活性化を介して収縮タンパク質発現を促進するという報告もある[36]。そこで図には示さなかったが、本研究では Akt2 のリン酸化レベルおよびタンパク質発現について検討した。0% serum の Akt2 セリン 474 残基のリン酸化レベルは fresh と比較して有意に低下したが(n=6、p<0.01、data not shown)、rapamycin の Akt2 リン酸化レベルは 0% serum と比較して変化なかった。また Akt2 のタンパク質発現は fresh、0% serum、rapamycin の間で変化なかった(n=6、data not shown)。したがって rapamycin の KCl による収縮張力改善メカニズムには収縮タンパク質発現の変化は関与しないことが示唆された。また rapamycin において 0% serum と比較して myocardin 発現が増加するにも関わらず収縮タンパク質発現に変化がないのは myocardin の機能が抑制されていることが原因である可能性が考えられた。

mTOR は非定型セリン/トレオニンプロテインキナーゼであり様々なタイプの細胞の分化を調節するが、ラパマイシンに対して感受性の異なる 2 つの複合体が存在する。mTORC1 はラパマイシンに対する感受性が高い。一方、mTORC2 はほとんどの細胞でラパマイシン感受性が低いがラパマイシンの長期処置に対しては感受性を示すことがある [19]。本研究ではラパマイシンを長期処置(5 日間)していることから mTORC1 のみならず mTORC2 も抑制している可能性が考えられる。図には示さなかったが、mTORC2 の基質とされる Akt1 のセリン 473 残基のリン酸化レベルについて検討したところ、0% serum において Akt1 リン酸化は fresh と比較して有意に上昇し、rapamycin においては 0% serum と比較して有意に低下した(n=4、data not shown)。このことから本研究において、ラパマイシンのターゲットとして mTORC2 も含まれることが示唆される。

#### 4-3 結論

結論として無血清培地での 5 日間の器官培養により摘出腸間膜動脈血管平滑筋では mTOR タンパク質発現が増加し基底状態の CaMKII リン酸化レベルが上昇することによ



って KCl による収縮張力が減弱すると考えられる。ラパマイシンは mTOR タンパク質発現の増加を抑制し基底状態の CaMKII リン酸化レベルを低下させることにより KCl による収縮張力を改善することが示唆された。ラパマイシンを培地に添加することは有用であるが、より fresh に近い収縮機能を保持した血管の器官培養法を確立するためには更なる研究が必要である。

## VII 総括

### (背景と目的)

循環器系に対する薬物の長期作用を検討するためには、主として動物モデルが用いられる。しかし *in vivo* の動物実験では、複雑な生体内動態や個体差がデータや作用点の解釈を困難にしている。*In vitro* の培養細胞系では、薬物の細胞に対する直接的な作用を検討でき実験条件のコントロールも容易である。しかし生体内でみられる組織構築が失われ、通常組織特異的な細胞の機能を完全には保持していない。さらに培養細胞系では長期作用の検討は通常困難である。血管組織の器官培養法は、*in vivo* の複雑な因子の関与を取り除くことが可能であり、また培養細胞系とは異なり血管の組織構築を維持したまま細胞機能を保持していることから、種々の生理活性物質や薬物の長期作用を見る上で極めて有用な実験系であると考えられている。特にウサギ摘出前腸間膜動脈を用いた無血清培地での器官培養法はすでに確立されている。ラットは、飼育管理や血管を含む摘出臓器の取り扱いが容易であることから、生理学や薬理学など幅広い分野で研究に用いられている。ラットのゲノムはおよそ 90% 以上が解読されており、その遺伝子の大多数はヒトおよびマウスの遺伝子と対応している。また遺伝的均一性を持つ近交系やミュータント系が確立されていることから、動物実験の信頼性や再現性を高めることが可能であり、ラット血管組織の器官培養への応用は有用性が高いと考えられる。しかし、抵抗血管であるラット前腸間膜動脈を用いた長期間(3-5 日)の器官培養による血管収縮性の変化を検討した報告は限られている。したがって、ラット前腸間膜動脈標本を無血清培地で培養した後、血管収縮性と形態の変化を調べ、ラット前腸間膜動脈を用いた器官培養法を確立することを本研究の第一の目的とした(第一章)。

高血圧症や動脈硬化症などの血管壁構造変化が生じる慢性血管疾患時には、血管壁から様々な増殖因子が分泌され、血管内皮や平滑筋細胞の脱分化・増殖を引き起こすと考えられている。また、増殖因子が血管組織に慢性的に作用する結果、その構造を変化させるとともに機能変化(障害)を引き起こすと考えられている。さまざまな増殖因子を含む FBS を無血清培地に添加することにより増殖因子の血管機能(平滑筋収縮性や内皮依存性弛緩

反応)に及ぼす影響が検討できる。そこで FBS 長期処置の血管収縮性と内皮依存性弛緩反応に及ぼす影響を検討することを第二の目的とした(第二・三章)。

上述のとおり、これまでに無血清培地での器官培養法が体外で血管組織特異的な機能を維持する上で最善の方法であるとされてきた。しかし急性摘出血管(fresh)と比べると無血清培地で器官培養した血管は収縮張力の減弱やアゴニストに対する感受性が増加するなど fresh とは異なる性質を示す。そこでより生体内の機能を維持した血管の器官培養法を確立するために無血清培地での器官培養後生じる機能変化のメカニズムを詳しく検討することを第三の目的とした。具体的には、内皮依存性弛緩反応減弱の機序および KCl による収縮張力減弱の機序を検討した(第四・五章)。

#### (方法と結果)

雄性ウィスターラットから前腸間膜動脈を摘出後、内皮保持(E (+))および剥離(E (-))標本を作製した。摘出直後の血管標本(fresh)、無血清培地で 3 日間器官培養した標本(0% serum)および 10% FBS を添加し器官培養した標本(FBS)を作製した。

はじめに 0% serum のアゴニストによる収縮張力が fresh と比べどのように変化するか検討した。E (+) 0% serum において NA、ET-1 および 5-HT による最大張力は fresh と比較して減弱する傾向を示したが、統計的には有意な差ではなかった。E (-) 0% serum において NA による最大張力は有意に減弱したが、ET-1 および 5-HT による最大張力は fresh と比較し変化なかった。E (+)、E (-) 0% serum において、NA や ET-1 に対する感受性は fresh と比較し有意に上昇したが、5-HT に対する感受性は fresh と比較し有意に低下した。組織形態学的検索から 0% serum の中膜平滑筋層では fresh と比較し軽度の粗鬆化が観察されたものの大きな変化は認められなかった。このことから 3 日間の無血清培地での器官培養後もラット前腸間膜動脈は十分な収縮張力及びインタクトな形態を維持することが明らかとなった(第一章) [42]。

次に FBS 長期処置のアゴニストによる収縮張力に及ぼす影響を検討した。E (+) FBS において NA、ET-1 と 5-HT による最大張力は 0% serum と比較し増強した。E (-) FBS



において NA と ET-1 による最大張力は 0% serum と比較し減弱したが、対照的に 5-HT による最大張力は増強した。E (+)、E (-) FBS とともに、NA と ET-1 に対する収縮の感受性は 0% serum と比較し変化なかったが、5-HT に対する感受性は 0% serum と比較し低下した。組織形態学的検索から FBS において中膜平滑筋の配列の不整や血管平滑筋細胞の形態変化が観察され、その程度は E (+) より E (-) で強かった。以上のことから FBS 長期処置の血管収縮性に及ぼす影響はアゴニストや内皮の有無により異なることが明らかとなった。E (+) FBS では NA や ET-1 による最大張力は増強されるが、E (-) FBS では減弱する。また 5-HT による最大張力は E (+)、E (-) FBS でともに増加した。特に E (-) FBS で見られる形態学的変化は最大張力減弱の一因と考えられた。一方 5-HT による収縮に関しては、内皮の有無に関わらず、平滑筋において受容体サブタイプの変化が起こることにより最大張力が増強すると考えられた(第二章) [42]。

次に FBS 長期処置の内皮依存性弛緩反応に及ぼす影響について検討した。FBS では 0% serum と比べ ACh による内皮依存性弛緩反応が有意に減弱したが、SNP による内皮非依存性弛緩反応は変化なかった。FBS では 0% serum と比較し ACh による NO 産生は有意に減少したが、eNOS のタンパク質発現は変化なかった。Ca<sup>2+</sup>イオノフォアによる弛緩反応は FBS と 0% serum の間で変化なかった。PLC 活性化薬による弛緩反応は Ca<sup>2+</sup>を含む通常の栄養液中でも、Ca<sup>2+</sup>を含まない栄養液中においても FBS と 0% serum の間で変化なかった。TRPCs (TRPC-1、-4、-5)のタンパク質発現は総量として FBS と 0% serum の間で変化なかった。以上のことから FBS は血管内皮の受容体/G<sub>q</sub>蛋白質/PLC<sub>β</sub>経路の障害を介して内皮依存性弛緩反応を減弱させることが明らかとなった(第三章) [41]。

これまでの検討から無血清培地での器官培養血管は収縮機能や組織形態を十分に維持しているものの(第一章)、freshと比べると様々な機能的変化を示すことが明らかとなった。特に生体における血管内皮細胞は常に血液にさらされており、血中に含まれる様々なタンパク質、ビタミン、脂質が恒常性の維持に重要であると考えられる。したがって、これらの栄養素を補う目的で成熟ラット血清を無血清培地に添加し、内皮依存性弛緩反応に及ぼす影響を検

討した。Fresh、3%成熟ラット血清を無血清培地(0% serum)に添加し3日間器官培養した標本(3% serum)を作製した。0% serumのAChによる内皮依存性弛緩反応はfreshと比較し有意に減弱した。しかし、SNPによる内皮非依存性弛緩反応は変化なかった。3% serumでは0% serumにおける内皮依存性弛緩反応の減弱が有意に改善した。抗CD31抗体による免疫染色の結果、0% serumの内皮細胞において膜傷害が観察されるが、3% serumではそれが改善されることが分かった。抗酸化薬NACの急性処置は0% serumの内皮依存性弛緩反応の減弱を有意に改善した。NOX阻害薬apocynin、eNOSアンカップリングを解除するBH<sub>4</sub>とL-Arginine併用処置、キサンチン酸化酵素阻害薬allopurinolは0% serumの内皮依存性弛緩反応に影響を及ぼさなかった。一方ミトコンドリア呼吸鎖複合体I阻害薬rotenoneの急性処置は0% serumの内皮依存性弛緩反応の減弱を有意に改善した。0% serum内皮細胞のミトコンドリア由来O<sub>2</sub>産生は、freshと比較し有意に増加し、3% serumでは0% serumと比較し有意に減少した。一方、0% serumと3% serumのミトコンドリア膜電位は共にfreshと比較し上昇していた。以上のことから無血清培地で器官培養した血管内皮細胞ではミトコンドリア膜電位が上昇することにより、ミトコンドリア由来ROS産生が増加し、AChによる内皮依存性弛緩反応が減弱することが明らかとなった。成熟ラット血清の無血清培地への添加は、ミトコンドリア膜電位には影響を及ぼさないが、ミトコンドリア由来ROSを抑制することにより内皮依存性弛緩反応を改善することが示された(第四章) [40]。

非定型セリン/トレオニンプロテインキナーゼである mTOR は細胞の分化、細胞内 Ca<sup>2+</sup>動態や多様な細胞内シグナルを調節している。したがって、mTOR は 0% serum で見られる機能変化(収縮張力の減弱)を引き起こす原因となる可能性がある。そこで 0% serum の収縮張力が減弱するメカニズムを mTOR に注目して検討した。Fresh、mTOR 阻害薬ラパマイシンを無血清培地(0% serum)に添加し 5 日間器官培養した標本(rapamycin)を作製した。0% serum では fresh と比較し KCl による最大張力が有意に減弱したが、rapamycin では有意に改善した。0% serum、rapamycin 共に fresh と比較し KCl に対する収縮の感受性は有意に増加した。0% serum では fresh と比較し mTOR タンパク質発現が有意に増加した



が、rapamycin では 0% serum と比較して有意に減少した。0% serum では fresh と比べ平滑筋収縮タンパク質遺伝子発現のマスターレギュレーターである myocardin タンパク質発現が有意に減少したが、rapamycin では 0% serum と比較して有意に増加した。一方、0% serum では fresh と比較し SM22 $\alpha$ 、calponin タンパク質発現は減少したものの、rapamycin では 0% serum と比較して変化がなかった。収縮タンパク質発現の増加がラパマイシンによる収縮張力改善の原因ではないと考えられたため、収縮タンパク質活性化経路に着目し基底状態 CaMK II のリン酸化レベルを検討した。0% serum では CaMKII のリン酸化レベルが有意に上昇したが、rapamycin では有意に低下した。この結果は、0% serum において mTOR 発現増加が原因で細胞内カルシウム動態が障害されていること、その結果筋小胞体内の貯蔵カルシウムの枯渇などが起こることが推察される。また、基底状態の CaMKII リン酸化レベルの上昇は KCl による収縮タンパク質活性化の妨げとなる可能性も考えられる。以上の結果から 0% serum では mTOR 発現が増加し基底状態の CaMKII のリン酸化レベルが上昇することにより KCl による収縮張力が減弱すると考えられた。ラパマイシンは mTOR タンパク質発現を減少させることにより基底状態の CaMKII のリン酸化レベルを低下させて KCl による収縮張力を改善すると考えられた(第五章)。

#### (結論)

本研究ではラット摘出前腸間膜動脈の無血清培地での器官培養法を初めて確立するとともに(第一章)、FBS 長期処置の血管平滑筋の収縮性(第二章)および血管内皮依存性弛緩反応(第三章)に及ぼす影響とそのメカニズムを明らかにした。更に無血清培地での長期間の器官培養が引き起こす血管内皮(第四章)および平滑筋(第五章)における機能変化のメカニズムの一端を明らかにした。ラット前腸間膜動脈の器官培養法は薬物や生理活性物質の長期作用を検討できる有用な系であると考えられる。今後、より生体内で見られる機能を維持した器官培養法を確立するためには、無血清培地での器官培養により引き起こされる血管の機能変化のメカニズムをさらに詳細に検討することが必要である。

## 謝辞

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜りました北里大学獣医学系研究科獣医薬理学研究室、山脇英之准教授、岡田宗善講師、原幸男名誉教授に深く感謝の意を表します。本研究の計画から、論文作成まで終始丁寧に御指導・御教助賜り心から感謝を申し上げます。

また学部生より助力を頂きました向田昌司先生、臼井達哉先生、薬理学研究室の先輩の皆様に心から感謝申し上げます。

最後に、いつも激励してくれた私の家族、友人達に心から感謝を申し上げます。特に高橋美奈子さんには深く感謝を申し上げます。

## 引用文献

1. Adner, M., Geary, G. G. and Edvinsson, L. 1998. Appearance of contractile endothelin-B receptors in rat mesenteric arterial segments following organ culture. *Acta. Physiol. Scand.* **163**: 121-129.
2. Adner, M., Uddman, E., Cardell, L. O. and Edvinsson, L. 1998. Regional variation in appearance of vascular contractile endothelin-B receptors following organ culture. *Cardiovasc. Res.* **37**: 254-262.
3. Bae, Y. S., Lee, T. G., Park, J. C., Hur, J. H., Kim, Y., Heo, K., Kwak, J. Y., Suh, P. G. and Ryu, S. H. 2003. Identification of a compound that directly stimulates phospholipase C activity. *Mol. Pharmacol.* **63**: 1043-1050.
4. Bakris, G. L., Basile, J. N., Giles, T. D. and Taylor, A. A. 2010. The role of nitric oxide in improving endothelial function and cardiovascular health: focus on nebivolol. *Am. J. Med.* **123**: S2-8.
5. Bolotina, V. M., Najibi, S., Palacino, J. J., Pagano, P. J. and Cohen, R. A. 1994. Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. *Nature.* **368**: 850-853.
6. Braam, B. and Verhaar, M. C. 2007. Understanding eNOS for pharmacological modulation of endothelial function: a translational view. *Curr. Pharm. Des.* **13**: 1727-1740.
7. Bultynck, G., Vermassen, E., Szlufcik, K., De Smet, P., Fissore, R. A., Callewaert, G., Missiaen, L., De Smedt, H. and Parys, J. B. 2003. Calcineurin and intracellular  $\text{Ca}^{2+}$ -release channels: regulation or association? *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **311**: 1181-1193.
8. Cao, Y. X., He, L. C., Xu, C. B., Luo, G. G. and Edvinsson, L. 2005. Enhanced transcription of contractile 5-hydroxytryptamine 2A receptors via extracellular signal-regulated kinase 1/2 after organ culture of rat mesenteric artery. *Basic. Clin. Pharmacol. Toxicol.* **96**: 282-288.

9. Cao, Y. X., Xu, C. B., Luo, G. G. and Edvinsson, L. 2006. Up-regulation of  $\alpha_{1A}$ -adrenoceptors in rat mesenteric artery involves intracellular signal pathways. *Basic. Clin. Pharmacol. Toxicol.* **98**: 61-67.
10. Coburn, R. F., Baron, C. and Papadopoulos, M. T. 1988. Phosphoinositide metabolism and metabolism-contraction coupling in rabbit aorta. *Am. J. Physiol.* **255**: H1476-1483.
11. Dagher, Z., Ruderman, N., Tornheim, K. and Ido, Y. 2001. Acute regulation of fatty acid oxidation and amp-activated protein kinase in human umbilical vein endothelial cells. *Circ. Res.* **88**: 1276-1282.
12. Dietrich, A., Kalwa, H. and Gudermann, T. 2010. TRPC channels in vascular cell function. *Thromb. Haemost.* **103**: 262-270.
13. Dreja, K. and Hellstrand, P. 1999. Differential modulation of caffeine- and  $IP_3$ -induced calcium release in cultured arterial tissue. *Am. J. Physiol.* **276**: C1115-1120.
14. Freichel, M., Suh, S. H., Pfeifer, A., Schweig, U., Trost, C., Weissgerber, P., Biel, M., Philipp, S., Freise, D., Droogmans, G., Hofmann, F., Flockerzi, V. and Nilius, B. 2001. Lack of an endothelial store-operated  $Ca^{2+}$  current impairs agonist-dependent vasorelaxation in TRP4-/- mice. *Nat. Cell. Biol.* **3**: 121-127.
15. Gao, G., Li, J. J., Li, Y., Li, D., Wang, Y., Wang, L., Tang, X. D., Walsh, M. P., Gui, Y. and Zheng, X. L. 2011. Rapamycin inhibits hydrogen peroxide-induced loss of vascular contractility. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* **300**: H1583-1594.
16. Garg, U. C. and Hassid, A. 1989. Nitric oxide-generating vasodilators and 8-bromo-cyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells. *J. Clin. Invest.* **83**: 1774-1777.
17. Gibbs, R. A., Weinstock, G. M., Metzker, M. L., Muzny, D. M., Sodergren, E. J., Scherer, S., Scott, G., Steffen, D., Worley, K. C., Burch, P. E., Okwuonu, G., Hines, S., Lewis,



L., DeRamo, C., Delgado, O., Dugan-Rocha, S., Miner, G., Morgan, M., Hawes, A., Gill, R.,  
 Celera, Holt, R. A., Adams, M. D., Amanatides, P. G., Baden-Tillson, H., Barnstead, M., Chin,  
 S., Evans, C. A., Ferriera, S., Fosler, C., Glodek, A., Gu, Z., Jennings, D., Kraft, C. L., Nguyen,  
 T., Pfannkoch, C. M., Sitter, C., Sutton, G. G., Venter, J. C., Woodage, T., Smith, D., Lee, H.  
 M., Gustafson, E., Cahill, P., Kana, A., Doucette-Stamm, L., Weinstock, K., Fichtel, K., Weiss,  
 R. B., Dunn, D. M., Green, E. D., Blakesley, R. W., Bouffard, G. G., De Jong, P. J., Osoegawa,  
 K., Zhu, B., Marra, M., Schein, J., Bosdet, I., Fjell, C., Jones, S., Krzywinski, M., Mathewson,  
 C., Siddiqui, A., Wye, N., McPherson, J., Zhao, S., Fraser, C. M., Shetty, J., Shatsman, S.,  
 Geer, K., Chen, Y., Abramzon, S., Nierman, W. C., Havlak, P. H., Chen, R., Durbin, K. J.,  
 Egan, A., Ren, Y., Song, X. Z., Li, B., Liu, Y., Qin, X., Cawley, S., Cooney, A. J., D'Souza, L.  
 M., Martin, K., Wu, J. Q., Gonzalez-Garay, M. L., Jackson, A. R., Kalafus, K. J., McLeod, M.  
 P., Milosavljevic, A., Virk, D., Volkov, A., Wheeler, D. A., Zhang, Z., Bailey, J. A., Eichler, E.  
 E., Tuzun, E., Birney, E., Mongin, E., Ureta-Vidal, A., Woodwark, C., Zdobnov, E., Bork, P.,  
 Suyama, M., Torrents, D., Alexandersson, M., Trask, B. J., Young, J. M., Huang, H., Wang, H.,  
 Xing, H., Daniels, S., Gietzen, D., Schmidt, J., Stevens, K., Vitt, U., Wingrove, J., Camara, F.,  
 Mar Alba, M., Abril, J. F., Guigo, R., Smit, A., Dubchak, I., Rubin, E. M., Couronne, O.,  
 Poliakov, A., Hubner, N., Ganten, D., Goesle, C., Hummel, O., Kreitler, T., Lee, Y. A., Monti,  
 J., Schulz, H., Zimdahl, H., Himmelbauer, H., Lehrach, H., Jacob, H. J., Bromberg, S.,  
 Gullings-Handley, J., Jensen-Seaman, M. I., Kwitek, A. E., Lazar, J., Pasko, D., Tonellato, P. J.,  
 Twigger, S., Ponting, C. P., Duarte, J. M., Rice, S., Goodstadt, L., Beatson, S. A., Emes, R. D.,  
 Winter, E. E., Webber, C., Brandt, P., Nyakatura, G., Adetobi, M., Chiaromonte, F., Elnitski, L.,  
 Eswara, P., Hardison, R. C., Hou, M., Kolbe, D., Makova, K., Miller, W., Nekrutenko, A.,  
 Riemer, C., Schwartz, S., Taylor, J., Yang, S., Zhang, Y., Lindpaintner, K., Andrews, T. D.,  
 Caccamo, M., Clamp, M., Clarke, L., Curwen, V., Durbin, R., Eyraes, E., Searle, S. M., Cooper,  
 G. M., Batzoglou, S., Brudno, M., Sidow, A., Stone, E. A., Payseur, B. A., Bourque, G.,



- Lopez-Otin, C., Puente, X. S., Chakrabarti, K., Chatterji, S., Dewey, C., Pachter, L., Bray, N., Yap, V. B., Caspi, A., Tesler, G., Pevzner, P. A., Haussler, D., Roskin, K. M., Baertsch, R., Clawson, H., Furey, T. S., Hinrichs, A. S., Karolchik, D., Kent, W. J., Rosenbloom, K. R., Trumbower, H., Weirauch, M., Cooper, D. N., Stenson, P. D., Ma, B., Brent, M., Arumugam, M., Shteynberg, D., Copley, R. R., Taylor, M. S., Riethman, H., Mudunuri, U., Peterson, J., Guyer, M., Felsenfeld, A., Old, S., Mockrin, S. and Collins, F. 2004. Genome sequence of the Brown Norway rat yields insights into mammalian evolution. *Nature* **428**: 493-521.
18. Goel, M., Sinkins, W. G. and Schilling, W. P. 2002. Selective association of TRPC channel subunits in rat brain synaptosomes. *J. Biol. Chem.* **277**: 48303-48310.
  19. Goncharova, E. A. 2013. mTOR and vascular remodeling in lung diseases: current challenges and therapeutic prospects. *FASEB J* **27**: 1796-1807.
  20. Gryglewski, R. J., Botting, R. M. and Vane, J. R. 1988. Mediators produced by the endothelial cell. *Hypertension*. **12**: 530-548.
  21. Hofmann, T., Schaefer, M., Schultz, G. and Gudermann, T. 2002. Subunit composition of mammalian transient receptor potential channels in living cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**: 7461-7466.
  22. Jimenez-Altayo, F., Briones, A. M., Giraldo, J., Planas, A. M., Salaices, M. and Vila, E. 2006. Increased superoxide anion production by interleukin-1beta impairs nitric oxide-mediated relaxation in resistance arteries. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **316**: 42-52.
  23. Karaki, H., Sato, K., Ozaki, H. and Murakami, K. 1988. Effects of sodium nitroprusside on cytosolic calcium level in vascular smooth muscle. *Eur. J. Pharmacol.* **156**: 259-266.
  24. Kida, T., Chuma, H., Murata, T., Yamawaki, H., Matsumoto, S., Hori, M. and Ozaki, H. 2011. Chronic treatment with PDGF-BB and endothelin-1 synergistically induces vascular hyperplasia and loss of contractility in organ-cultured rat tail artery. *Atherosclerosis*. **214**:

288-294.

25. Kida, T., Murata, T., Hori, M. and Ozaki, H. 2009. Chronic stimulation of farnesoid X receptor impairs nitric oxide sensitivity of vascular smooth muscle. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* **296**: H195-201.
26. Kojima, H., Sakurai, K., Kikuchi, K., Kawahara, S., Kirino, Y., Nagoshi, H., Hirata, Y. and Nagano, T. 1998. Development of a fluorescent indicator for nitric oxide based on the fluorescein chromophore. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **46**: 373-375.
27. Laplante, M. and Sabatini, D. M. 2012. mTOR signaling in growth control and disease. *Cell*. **149**: 274-293.
28. Lindqvist, A., Nordstrom, I., Malmqvist, U., Nordenfelt, P. and Hellstrand, P. 1999. Long-term effects of  $\text{Ca}^{2+}$  on structure and contractility of vascular smooth muscle. *Am. J. Physiol.* **277**: C64-73.
29. Liu, Z. P., Wang, Z., Yanagisawa, H. and Olson, E. N. 2005. Phenotypic modulation of smooth muscle cells through interaction of Foxo4 and myocardin. *Dev. Cell*. **9**: 261-270.
30. Luo, G., Jamali, R., Cao, Y. X., Edvinsson, L. and Xu, C. B. 2006. Vascular endothelin  $\text{ET}_B$  receptor-mediated contraction requires phosphorylation of ERK1/2 proteins. *Eur. J. Pharmacol.* **538**: 124-131.
31. Luo, G., Xu, C. B., Cao, Y. X. and Edvinsson, L. 2004. Transcriptional up-regulation in expression of 5-hydroxytryptamine $_{2A}$  and transcriptional down-regulation of angiotensin II type 1 receptors during organ culture of rat mesenteric artery. *Basic. Clin. Pharmacol. Toxicol.* **95**: 280-287.
32. MacMillan, D., Currie, S., Bradley, K. N., Muir, T. C. and McCarron, J. G. 2005. In smooth muscle, FK506-binding protein modulates IP3 receptor-evoked  $\text{Ca}^{2+}$  release by mTOR and calcineurin. *J. Cell. Sci.* **118**: 5443-5451.
33. MacMillan, D., Currie, S. and McCarron, J. G. 2008. FK506-binding protein

(FKBP12) regulates ryanodine receptor-evoked  $\text{Ca}^{2+}$  release in colonic but not aortic smooth muscle. *Cell. Calcium*. **43**: 539-549.

34. MacMillan, D. and McCarron, J. G. 2009. Regulation by FK506 and rapamycin of  $\text{Ca}^{2+}$  release from the sarcoplasmic reticulum in vascular smooth muscle: the role of FK506 binding proteins and mTOR. *Br. J. Pharmacol.* **158**: 1112-1120.

35. Manoury, B., Etheridge, S. L., Reid, J. and Gurney, A. M. 2009. Organ culture mimics the effects of hypoxia on membrane potential,  $\text{K}^+$  channels and vessel tone in pulmonary artery. *Br J Pharmacol* **158**: 848-861.

36. Martin, K. A., Merenick, B. L., Ding, M., Fetalvero, K. M., Rzucidlo, E. M., Kozul, C. D., Brown, D. J., Chiu, H. Y., Shyu, M., Drapeau, B. L., Wagner, R. J. and Powell, R. J. 2007. Rapamycin promotes vascular smooth muscle cell differentiation through insulin receptor substrate-1/phosphatidylinositol 3-kinase/Akt2 feedback signaling. *J. Biol. Chem.* **282**: 36112-36120.

37. Mauro, C., Leow, S. C., Anso, E., Rocha, S., Thotakura, A. K., Tornatore, L., Moretti, M., De Smaele, E., Beg, A. A., Tergaonkar, V., Chandel, N. S. and Franzoso, G. 2011. NF-kappaB controls energy homeostasis and metabolic adaptation by upregulating mitochondrial respiration. *Nat. Cell. Biol.* **13**: 1272-1279.

38. Miyoshi, H., Nakaya, Y. and Moritoki, H. 1994. Nonendothelial-derived nitric oxide activates the ATP-sensitive  $\text{K}^+$  channel of vascular smooth muscle cells. *FEBS. Lett.* **345**: 47-49.

39. Moller, S., Uddman, E., Welsh, N., Edvinsson, L. and Adner, M. 2002. Analysis of the time course for organ culture-induced endothelin ET-B receptor upregulation in rat mesenteric arteries. *Eur. J. Pharmacol.* **454**: 209-215.

40. Morita, T., Okada, M., Hara, Y. and Yamawaki, H. 2013. Addition of adult serum improves endothelium-dependent relaxation of organ-cultured rat mesenteric artery via

inhibiting mitochondrial reactive oxygen species. *Vascul. Pharmacol.* **58**: 105-111.

41. Morita, T., Okada, M., Hara, Y. and Yamawaki, H. 2011. Mechanisms underlying impairment of endothelium-dependent relaxation by fetal bovine serum in organ-cultured rat mesenteric artery. *Eur. J. Pharmacol.* **668**: 401-406.
42. Morita, T., Yamawaki, H., Okada, M. and Hara, Y. 2010. Contractile characteristics of rat mesenteric artery after organ culture. *J. Vet. Med. Sci.* **72**: 1621-1627.
43. Mukohda, M., Morita, T., Okada, M., Hara, Y. and Yamawaki, H. 2012. Long-term methylglyoxal treatment impairs smooth muscle contractility in organ-cultured rat mesenteric artery. *Pharmacol. Res.* **65**: 91-99.
44. Mukohda, M., Yamawaki, H., Nomura, H., Okada, M. and Hara, Y. 2009. Methylglyoxal inhibits smooth muscle contraction in isolated blood vessels. *J. Pharmacol. Sci.* **109**: 305-310.
45. Murata, T., Hori, M., Lee, S., Nakamura, A., Kohama, K., Karaki, H. and Ozaki, H. 2005. Vascular endothelium has a local anti-adenovirus vector system and glucocorticoid optimizes its gene transduction. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **25**: 1796-1803.
46. Murata, T., Hori, M., Sakamoto, K., Karaki, H. and Ozaki, H. 2004. Dexamethasone blocks hypoxia-induced endothelial dysfunction in organ-cultured pulmonary arteries. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* **170**: 647-655.
47. Murata, T., Suzuki, N., Yamawaki, H., Sato, K., Hori, M., Karaki, H. and Ozaki, H. 2005. Dexamethasone prevents impairment of endothelium-dependent relaxation in arteries cultured with fetal bovine serum. *Eur. J. Pharmacol.* **515**: 134-141.
48. Murata, T., Yamawaki, H., Hori, M., Sato, K., Ozaki, H. and Karaki, H. 2001. Chronic vascular toxicity of doxorubicin in an organ-cultured artery. *Br. J. Pharmacol.* **132**: 1365-1373.
49. Murata, T., Yamawaki, H., Hori, M., Sato, K., Ozaki, H. and Karaki, H. 2001.



Hypoxia impairs endothelium-dependent relaxation in organ cultured pulmonary artery. *Eur. J. Pharmacol.* **421**: 45-53.

50. Murata, T., Yamawaki, H., Yoshimoto, R., Hori, M., Sato, K., Ozaki, H. and Karaki, H. 2001. Chronic effect of doxorubicin on vascular endothelium assessed by organ culture study. *Life. Sci.* **69**: 2685-2695.

51. Nagase, I., Yoshida, S., Canas, X., Irie, Y., Kimura, K., Yoshida, T. and Saito, M. 1999. Up-regulation of uncoupling protein 3 by thyroid hormone, peroxisome proliferator-activated receptor ligands and 9-cis retinoic acid in L6 myotubes. *FEBS. Lett.* **461**: 319-322.

52. Nomura, H., Yamawaki, H., Mukohda, M., Okada, M. and Hara, Y. 2008. Mechanisms underlying pioglitazone-mediated relaxation in isolated blood vessel. *J. Pharmacol. Sci.* **108**: 258-265.

53. Ozaki, H. and Karaki, H. 2002. Organ culture as a useful method for studying the biology of blood vessels and other smooth muscle tissues. *Jpn. J. Pharmacol.* **89**: 93-100.

54. Pesic, A., Madden, J. A., Pesic, M. and Rusch, N. J. 2004. High blood pressure upregulates arterial L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels: is membrane depolarization the signal? *Circ. Res.* **94**: e97-104.

55. Peters, K., Kamp, G., Berz, A., Unger, R. E., Barth, S., Salamon, A., Rychly, J. and Kirkpatrick, C. J. 2009. Changes in human endothelial cell energy metabolic capacities during in vitro cultivation. The role of "aerobic glycolysis" and proliferation. *Cell. Physiol. Biochem.* **24**: 483-492.

56. Regimbald-Dumas, Y., Fregeau, M. O. and Guillemette, G. 2011. Mammalian target of rapamycin (mTOR) phosphorylates inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 2 and increases its  $\text{Ca}^{2+}$  release activity. *Cell. Signal.* **23**: 71-79.

57. Ross, R. 1993. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s.



*Nature*. **362**: 801-809.

58. Sakamoto, K., Murata, T., Chuma, H., Hori, M. and Ozaki, H. 2005. Fluvastatin prevents vascular hyperplasia by inhibiting phenotype modulation and proliferation through extracellular signal-regulated kinase 1 and 2 and p38 mitogen-activated protein kinase inactivation in organ-cultured artery. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **25**: 327-333.
59. Tai, K., Vandenberg, G., Hamaide, M. C., Wibo, M. and Morel, N. 2009. Effect of organ culture on noradrenaline- evoked contraction, calcium signalling and TRPC expression in rat mesenteric artery. *J. Vasc. Res.* **46**: 353-364.
60. Touyz, R. M. 2005. Intracellular mechanisms involved in vascular remodelling of resistance arteries in hypertension: role of angiotensin II. *Exp. Physiol.* **90**: 449-455.
61. Traber, M. G. and Stevens, J. F. 2011. Vitamins C and E: beneficial effects from a mechanistic perspective. *Free. Radic. Biol. Med.* **51**: 1000-1013.
62. Uddman, E., Adner, M. and Edvinsson, L. 2002. Protein kinase C inhibitors decrease endothelin ET<sub>B</sub> receptor mRNA expression and contraction during organ culture of rat mesenteric artery. *Eur. J. Pharmacol.* **452**: 215-222.
63. Uddman, E., Henriksson, M., Eskesen, K. and Edvinsson, L. 2003. Role of mitogen-activated protein kinases in endothelin ET<sub>B</sub> receptor up-regulation after organ culture of rat mesenteric artery. *Eur. J. Pharmacol.* **482**: 39-47.
64. Usui, T., Yamawaki, H., Kamibayashi, M., Okada, M. and Hara, Y. 2010. CV-159, a unique dihydropyridine derivative, prevents TNF-induced inflammatory responses in human umbilical vein endothelial cells. *J. Pharmacol. Sci.* **113**: 182-191.
65. Usui, T., Yamawaki, H., Kamibayashi, M., Okada, M. and Hara, Y. 2010. Mechanisms underlying the anti-inflammatory effects of the Ca<sup>2+</sup>/calmodulin antagonist CV-159 in cultured vascular smooth muscle cells. *J. Pharmacol. Sci.* **113**: 214-223.
66. Wang, Y. X. and Zheng, Y. M. 2010. ROS-dependent signaling mechanisms for

- hypoxic  $\text{Ca}^{2+}$  responses in pulmonary artery myocytes. *Antioxid. Redox. Signal.* **12**: 611-623.
67. Weir, C. J., Gibson, I. F. and Martin, W. 1991. Effects of metabolic inhibitors on endothelium-dependent and endothelium-independent vasodilatation of rat and rabbit aorta. *Br. J. Pharmacol.* **102**: 162-166.
68. Yamawaki, H., Sato, K., Hori, M., Ozaki, H. and Karaki, H. 1999. Impairment of endothelium-dependent relaxation in the arteries cultured with fetal bovine serum. *Eur. J. Pharmacol.* **366**: 237-242.
69. Yamawaki, H., Sato, K., Hori, M., Ozaki, H., Nakamura, S., Nakayama, H., Doi, K. and Karaki, H. 1999. Impairment of EDR by a long-term PDGF treatment in organ-cultured rabbit mesenteric artery. *Am. J. Physiol.* **277**: H318-323.
70. Yamawaki, H., Sato, K., Hori, M., Ozaki, H., Nakamura, S., Nakayama, H., Doi, K. and Karaki, H. 2000. Morphological and functional changes of rabbit mesenteric artery cultured with fetal bovine serum. *Life. Sci.* **67**: 807-820.
71. Yamawaki, H., Takahashi, M., Mukohda, M., Morita, T., Okada, M. and Hara, Y. 2012. A novel adipocytokine, nesfatin-1 modulates peripheral arterial contractility and blood pressure in rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **418**: 676-681.
72. Yamawaki, H., Tsubaki, N., Mukohda, M., Okada, M. and Hara, Y. 2010. Omentin, a novel adipokine, induces vasodilation in rat isolated blood vessels. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **393**: 668-672.
73. Yang, D., Feletou, M., Boulanger, C. M., Wu, H. F., Levens, N., Zhang, J. N. and Vanhoutte, P. M. 2002. Oxygen-derived free radicals mediate endothelium-dependent contractions to acetylcholine in aortas from spontaneously hypertensive rats. *Br. J. Pharmacol.* **136**: 104-110.
74. Yoshida, T., Inoue, R., Morii, T., Takahashi, N., Yamamoto, S., Hara, Y., Tominaga, M., Shimizu, S., Sato, Y. and Mori, Y. 2006. Nitric oxide activates TRP channels by cysteine

S-nitrosylation. *Nat. Chem. Biol.* **2**: 596-607.

75. Zhang, D. X. and Gutterman, D. D. 2007. Mitochondrial reactive oxygen species-mediated signaling in endothelial cells. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* **292**: H2023-2031.

76. Zheng, J. P., Ju, D., Shen, J., Yang, M. and Li, L. 2010. Disruption of actin cytoskeleton mediates loss of tensile stress induced early phenotypic modulation of vascular smooth muscle cells in organ culture. *Exp. Mol. Pathol.* **88**: 52-57.