エンドセリンの鼻粘膜血管作動性 (第1報)

市村 恵一・沖田 渉・田中 利善

Vasoactivity of Endothelin in Nasal Mucosa

Keiichi Ichimura, Wataru Okita and Toshiyoshi Tanaka
(Tokyo University Branch Hospital)

Using an in vitro bioassay technique, we examined the vasoactivity of endothelin-1 (ET), a new potent vasoconstrictor peptide released from endothelial cells, in nasal mucosa obtained from the canine septum and the human inferior turbinate. Cumulative addition of ET induced contractions in a concentration-dependent manner starting at a very low concentration. ET caused slow-onset and long-lasting contractions which were difficult to reverse even when the tissue was washed repeatedly. This contraction was not blocked by any of the known receptor antagonists tested, but was completely inhibited by pretreatment with the calcium channel blocker nifedipine. Removal of extracellular calcium ions abolished ET-induced contractions. ET enhanced exogenous noradrenaline (NA)-induced contractions, but did not affect endogenous NA-induced contractions produced by electric stimuli. It is postulated that since endothelium-derived substances, such as ET, show powerful vasoreactivity, endothelial cells may play an important role in the regulation of the vasomotor tone of nasal blood vessels, along with the autonomic neural mechanism.

Key words: endothelin, endothelial cell, peptides, nasal mucosa, vasoactivity

はじめに

血管が持続的に張力を維持したうえで、種々な刺激に対し反応し、収縮や弛緩を繰り返すことは周知の事実であるが、この張力維持、ならびに張力変化の本態は血管平滑筋の細胞内カルシウムイオン (Ca^{2+}) の上昇・下降とそれにとりもなう生化学的変化である。以前には生体における血管張力の維持は専ら神経性調節によりなされると考えられてきた。その主体は、交感神経終末から持続的に分泌されるノルアドレナリン (NA) による持続的収縮であり、副交感神経終末から分泌されるアセチルコリン (ACh) はこ

のNAの分泌量を抑制するとされた¹⁾。しかし、1980年以降に明らかにされた以下の事実からこの考え方は変更を強いられるようになった。

1980年Furchgottらは外因性AChの血管弛緩作用には内皮の存在が不可欠であること、AChに刺激されて内皮細胞から物質が分泌され、それが平滑筋を弛緩させることを見だし、この物質を内皮由来血管弛緩因子 (endothelium-derived relaxing factor, EDRF) と命名した²⁾。さらにTodaらはangiotensin IIによる弛緩作用も内皮細胞を介するもので、内皮細胞がプロスタサイクリン (prostaglandin I_2) を生成し、

これが平滑筋に作用することを見いだした³⁾. 一方, De Mey と Vanhoutte は低酸素状態にするトヌ冠動脈や大動脈で内皮を介する収縮作用が生じることを発見し, 内皮由来血管収縮因子 (endothelium-derived contracting factor, EDCF) と命名した⁴⁾. EDCF にはペプチドとプロスタノイドの少なくとも2種類があることが指摘され, ペプチドについては筑波大薬理グループがブタ大動脈培養内皮細胞から分離・同定・アミノ酸配列の決定を行い, エンドセリン (endothelin, ET) と命名した⁵⁾. それ以後の ET 研究の発展は目をみはるものとなっている.

また一方では, 自律神経終末に由来からのカテコールアミンのみならずペプチドが伝達物質として共存することが認められ, 交感神経におけるニューロペプチド Y (NPY), 副交感神経における血管作動性腸管ペプチド (vasoactive intestinal polypeptide, VIP) のそれぞれに, それ自体の血管作動性 (前者は持続性の収縮, 後者は拡張) に加え, 由来からの古典的伝達物質の作用に対する修飾作用もあることが知られるようになった⁶⁾. すなわち, 神経性調節もかなり複雑なメカニズムで働いているらしいのである.

神経性制御, 内皮由来物質による制御の両要素は互いに影響しあう可能性も高く, 複雑な生体内での平衡維持の解析にはまだほど遠い段階であるが, 事実を積み重ねていくことが解明への道であろう. 筆者らは既にイヌやヒトの摘出鼻粘膜を用い, 古典的伝達物質である NA^{7)~9)}, 内皮を介する ACh の反応¹⁰⁾, ペプチド¹¹⁾などに付いてその反応性を調べ考察しているが, 今回は新しい内皮由来のペプチドである ET の反応性を調べてみた.

方 法

屠殺後摘出したイヌの鼻中隔粘膜や, 鼻アレルギーや肥厚性鼻炎などの患者の下甲介切除を行った際に得られたヒトの下甲介の粘膜を Krebs 液 (NaCl 118 mM/l, KCl 4.7, CaCl₂ 2.5, MgSO₄·7H₂O 1.2, KH₂PO₄ 1.2, NaHCO₃ 25.0, glucose 10.0) に一旦保存した後, 0.5×

1.5 cm の大きさの切片を作り, 一片を同液を満たした容器にいれ, 一端を固定し, 他端を等尺性 transducer に接続する. すべての標本には 0.5 g の basal tension を加え, 安定した後, 予め NA 10⁻⁵M を投与し収縮力が十分であることを確認してから, 通電刺激あるいは, agonist の注入を行って, 惹起される粘膜内血管平滑筋の張力の変化を記録した.

検討項目は以下の通りである.

- ① basal tension を加えただけで安定した (resting) 状態における ET の作用
- ② ①で得られた反応に対する既知の様々なレセプターの拮抗剤の影響
- ③ ①で得られた反応の細胞外 Ca²⁺依存性
- ④ 予め組織を十分収縮させておいた場合での ET の作用
- ⑤ 通電刺激を行い得られる収縮反応への ET の影響
- ⑥ 外因性 NA による収縮力に対する ET の影響

通電刺激は日本光電 SEN-3301 を用い, 刺激条件は 40 V, 5 Hz, 5 秒間, 1.5 分間隔とした.

この実験で使用した薬剤は以下の通りである. norepinephrine bitartrate (NA, Sigma), methoxamine hydrochloride (MX, 日本新薬), phenoxylamine hydrochloride (POB, 東京化成), yohimbine hydrochloride (YOH, Sigma), pyrilamine maleate (PYR, Sigma), atropine sulfate (ATR, Sigma), nifedipine (NIF, バイエル), ascorbic acid (Sigma), dl-propranolol hydrochloride (Sigma), EGTA (Sigma), endothelin-1 (ET, ペプチド研究所).

結 果

- ① resting 状態における ET の効果

ET はイヌでは 10⁻⁹M から, ヒトでは 10⁻⁸M から濃度依存性に粘膜を収縮させた. この収縮はきわめて長時間 (6~24 時間) 持続し, 標本を洗浄しても張力は低下せず, レセプターとの結合力が強固であると思われた (図 1). ED₅₀ は 10⁻⁷M (イヌ) 3×10⁻⁷M (ヒト) であった.

②諸種レセプター拮抗薬の作用

従来血管収縮を引き起こすことが知られている α_1 adrenergic レセプター拮抗薬の POB, α_2 adrenergic レセプター拮抗薬の YOH, H_1 ヒスタミンレセプター拮抗薬の PYR, ムスカリンレセプター拮抗薬の ATR などを前投与しても ET の収縮作用は抑制されず, この収縮は既知のレセプターを介するものでないことがわかった。

③ Ca^{2+} の影響

容器内を満たす Krebs 液から Ca^{2+} を除去した上で EGTA を加えると, 先に示した濃度においては ET による収縮が起こらなくなった。ここに Ca^{2+} を加えると反応は回復した。

また Ca^{2+} チャンネル流入阻害剤の NIF を前投与した場合でも ET の収縮は起こらなかった (図 2)。

これらはイヌ, ヒト何れの標本でも認められ,

図1 エンドセリンの収縮反応

上2段はヒト, 下段はイヌの鼻粘膜の反応

(ET: エンドセリン NA: ノルアドレナリン R: 洗浄)

図2 エンドセリン(ET)収縮に及ぼすカルシウムイオン(Ca^{2+})の影響(イヌ鼻粘膜)

上段: Krebs 液内での反応 中段: 栄養液を Ca^{2+} のないものにした際の反応

下段: Ca^{2+} 流入阻害剤の nifedipine を投与しておいた際の反応

ETによる鼻粘膜血管の収縮には細胞外 Ca^{2+} の流入が必須と考えられた。

④持続的収縮時での ET の効果

α_1 レセプターに選択性の高い刺激剤の MX ($10^{-5}\text{M} \sim 10^{-4}\text{M}$) で予め組織に submaximal で持続的な収縮を起こさせておいて、そこに ET を加えたところ、さらに強い収縮が起こった。

⑤通電刺激による収縮への作用

通電刺激を与えると交感神経終末から NA が放出され、それが α_1 レセプターに作用することによって組織に収縮が起こる。収縮の強さが一定になるのを待った後、ここに ET を加えると 10^{-7}M 以上ではその持つ収縮作用のために基線が上昇し、それとともない通電による収縮が減弱した。それ以下の濃度では特に収縮力に変化を与えなかった (図 3)。

⑥NA収縮への影響

ヒト鼻粘膜に NA の 10^{-5}M を投与すると組織は submaximal に収縮を起こす。これを洗浄、再投与していくと、収縮力は次第に一定に落ちついてくる。この状態のところに ET 10^{-9}M を投与してさらに NA 収縮を起こさせると、その大きさはそれまでの一定のレベルより増大した。同様の結果はイヌでも認められた (平均 22%, $N=5$)。

以上から ET は内因性の NA 収縮には影響を与えないが、外因性のそれには増感作用を有すると推定された。

考 按

以上の結果からみて、①ET には鼻粘膜血管に対して、細胞外 Ca^{2+} 依存性の、立ち上がりが遅く、持続性の血管収縮作用があること、②この反応は従来知られているレセプターとは別な ET 固有のレセプターを介する反応であること、③その反応域値は極めて低く、従来検討した物質中では最も低いものであること、がわかった。

細胞外 Ca^{2+} 依存性については、Yanagisawara が当初報告した際に ET が電位依存性 Ca^{2+} チャンネルを活性化すると考察していた⁵⁾ が、その後の研究で種差、血管の種類や部位により差がみられ、標本により、 Ca^{2+} 拮抗剤が競合的に拮抗するもの、非競合的に拮抗するもの、拮抗されないものの 3 つに分かれることがわかった¹²⁾。しかし一部を除けば大多数は外液 Ca^{2+} に大きく依存しており、今回の ET による鼻粘膜血管の収縮は、ブタ冠動脈のそれなどと並び、外液 Ca^{2+} 依存性の極めて大きいものといえる。

血管収縮の域値は NA のおよそ 1000 倍も低かったが、ラットの細動脈、細静脈の in situ 実験でも同じ結果が得られている¹³⁾ ことから、ET は全身的にみても極めて低濃度で作用している強力な物質であると考えられる。

NA 収縮の増強作用については目下検討中で、次報にて報告したいが、通電刺激による収縮に及ぼす影響として、Wiklund らがモルモット大

図 3 通電刺激による収縮に対するエンドセリン (ET) の影響
ET の濃度を上げていくと基線が上昇してくる。収縮力自体は変化しない。

腿動脈を通電刺激し、 $^3\text{[H]}\text{-NA}$ の分泌量を測定したところでは、 $10^{-10}\text{M}\sim 10^{-8}\text{M}$ の ET が分泌を40~80%阻害しているという結果を出している¹⁴⁾。我々は直接 $^3\text{[H]}\text{-NA}$ の分泌量を測定したのではなく、その結果として起こる収縮力をみたが、Wiklund らとは異なる結果を得た。

ET はアミノ酸21残基からなるペプチドで、遺伝子的解析から類似した構造を持つ $\text{ET}_1\sim\text{ET}_3$ の3種類があることが知られている¹⁵⁾。 ET_1 は血管内皮を中心とし、脳、腎髄質、子宮、脾、甲状腺などにも存在し、 ET_2 は腎髄質、空腸など、 ET_3 は副腎、空腸、脾、脳などにあることがわかっている¹⁶⁾。血管内皮に存在するのは ET_1 のみであり、血管作動性も他に比較し10倍強い。

ET_1 は NA、トロンビンなど PI 代謝回転を促進する物質の刺激により内皮細胞で産生されるが、血中にも $1\sim 1.5\text{ pM}$ 程度存在し¹²⁾、これがホルモン様作用をするのか興味深い。心筋梗塞や、妊娠時高血圧の際に ET が上昇することが知られるようになり、臨床的意味についての解明が待たれる。ET を内膜側から作用させるより外膜側から作用させた方が収縮力は格段に強い¹⁷⁾¹⁸⁾、また内皮を除去すると ET 収縮は増強する¹⁹⁾²⁰⁾ ことから、内皮は ET に対するバリアーとなっているらしい。このことと、autoradiography で確認された平滑筋内の ET レセプターは外膜側に存在する²⁰⁾ ことを考えると、今回のような *in vitro* での実験では ET は外膜側から作用しているものと思われる。

鼻の血管内での ET 濃度の測定が待たれるが、ET が *in vitro* の条件で強力な収縮作用を見せたことから、鼻粘膜血管での重要な役割が推定される。鼻粘膜でも血管平滑筋が神経支配による調節以外にも内皮による収縮・弛緩の二重調節を受けていることはほぼ確実であろう。もし内皮が傷害された場合は、ET や血液中に存在するホルモン、オータコイドに対するバリアーを欠くので血管作動性が増強し、また EDRF の産生を減らすために神経性調節による収縮に

対する制御も不十分になることが予想される。

ま と め

イヌおよびヒトの摘出鼻粘膜を用い、*in vitro* 条件下での ET の血管作動性を検討した。ET は何れの標本でも、きわめて低濃度から、立ち上がりの遅い、持続性の収縮を起こした。この収縮は既存のレセプター拮抗薬では阻害されなかったが、 Ca^{2+} 流入阻害剤や外液 Ca^{2+} の除去により消失した。また ET は内因性 NA 収縮には影響を与えなかったが、外因性 NA 収縮増強作用をみせた。

内皮由来の物質である ET が強い血管作動性を見せたことから、鼻粘膜血管の張力維持に神経性調節と並び内皮細胞が関与することが推定された。

本論文の要旨は第28回日本鼻科学会学術講演会において講演した。

文 献

- 1) Jackson RT : Evidence for presynaptic parasympathetic receptors on nasal blood vessels. *Ann Otol Rhinol Laryngol* **91** : 216~219, 1982.
- 2) Furchgott RF and Zawadzki JV : The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* **288** : 373~376, 1980.
- 3) Toda N and Miyazaki M : Angiotensin-induced relaxation in isolated dog renal and cerebral arteries. *Am J Physiol* **240** : H 247~H 254, 1981.
- 4) De Mey JG and Vanhoutte PM : Anoxia and endothelium-dependent reactivity of the canine femoral artery. *J Physiol* **335** : 65~74, 1983.
- 5) Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, et al : A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* **332** : 411~415, 1988.
- 6) Lundberg JM, Hokfelt T, Änggård A, et al : Neuropeptides with vascular activity; VIP, PHI, NPY and substance P. *Bibliotheca Cardiol* **38** : 60~69, 1984.
- 7) Ichimura K and Jackson RT : Evidence of α -2 adrenoceptors in the nasal blood vessels of the

- dog. Arch Otolaryngol **110** : 647~651, 1984.
- 8) Ichimura K and Chow MJ : Postjunctional α_2 -adrenoceptors in blood vessels of human nasal mucosa. Arch Otorhinolaryngol **245** : 127~131, 1988.
- 9) 市村恵一, 周 明仁, 関 敦郎 : 鼻粘膜血管における α -アドレナリン作動性レセプター. 耳鼻臨床 **81** : 273~289, 1988.
- 10) 関 敦郎, 市村恵一, 荻原哲史, 他 : イヌ鼻粘膜血管とアセチルコリン受容体. 耳鼻臨床 **79** : 479~483, 1986.
- 11) Ichimura K, Minoda H and Seki A : Vascular effects of neuropeptides on nasal mucosa. Ann Otol Rhinol Laryngol **97** : 289~293, 1988.
- 12) 石川智久, 柳沢正史, 後藤勝年, 他 : エンドセリン. 臨床科学 **25** : 1003~1011, 1989.
- 13) Fortes ZB, de Nucci G and Garcia-Leme J : Effect of endothelin-1 on arterioles and venules in vivo. J Cardiovasc Pharmacol **13** Suppl 5 : s 200~s 201, 1989.
- 14) Wiklund NP, Ohlen A and Cederqvist B : Inhibition of adrenergic neuroeffector transmission by endothelin in the guinea-pig femoral artery. Acta Physiol Scand **134** : 311~312, 1988.
- 15) Inoue A, Yanagisawa M, Kimura S, et al : The human endothelin family; three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. Proc Natl Acad Sci USA **86** : 2863~2867, 1989.
- 16) 後藤勝年 : エンドセリン研究の最近の動向. 第19回日本脈管作動物質学会講演, 1990. 2. 9.
- 17) Shigeno T, Mima T, Takakura K, et al : Endothelin-1 acts in cerebral arteries from the adventitial but not from the luminal side. J Cardiovasc Pharmacol **13** Suppl 5 : s 174~s 176, 1989.
- 18) Pohl U and Busse R : Differential vascular sensitivity to luminally and adventitially applied endothelin-1. J Cardiovasc Pharmacol **13** Suppl 5 : s 188~s 190, 1989.
- 19) Godfraind T, Mennig D, Morel N, et al : Effect of endothelin-1 in isolated vessels; effect of nifedipine, methylene blue, hemoglobin, and gossypol. J Cardiovasc Pharmacol **13** Suppl 5 : s 19~s 22, 1989.
- 20) Dashwood M, Turner M and Jacobs M : Endothelin-1; contractile responses and autoradiographic localization of receptors in rabbit blood vessels. J Cardiovasc Pharmacol **13** Suppl 5 : s 183~s 185, 1989.

〔原稿受付：平成2年3月1日
原稿採択：平成2年4月5日
別刷請求先：市村恵一
〒113 東京都文京区目白台3-28-6
東京大学医学部附属病院分院
耳鼻咽喉科〕