

—Reviews—

実験的循環器疾患モデルの病態発症と進展における エンドセリンの役割に関する研究

西田 昌広^{*,a}, 高岡 昌徳^b, 松村 靖夫^c

Roles of Endothelin in the Pathogenesis and Development of Experimental Cardiovascular Diseases

Masahiro NISHIDA^{*,a}, Masanori TAKAOKA^b, and Yasuo MATSUMURA^c^a *Safety & Exploratory Pharmacology, Merck & Co., Inc., West Point, PA 19486, USA*^{b,c} *Osaka University of Pharmaceutical Sciences, 4-20-1 Nasahara, Takatsuki, Osaka 569-1094, Japan*

(Received October 29, 2010; Accepted November 25, 2010)

Endothelin (ET)-1 has been implicated in the pathogenesis and development of several cardiovascular diseases. Biological effects of ET-1 are mediated through ET_A and ET_B receptors. Although the importance of blocking ET_A receptor has been unanimously accepted, it remains controversial whether additional ET_B blockade is beneficial. We summarized the results of studies on the roles of ET receptors in the pathogenesis and development of renal ischemia/reperfusion (I/R) injury and monocrotaline (MCT)-induced pulmonary hypertension (PH) in rats. In the renal I/R injury model, ET_A receptors seemed to play an exclusive and important role in I/R-induced renal dysfunction and tissue damages, while ET_B receptors were likely to be protective in the recovery from I/R-induced renal damages, suggesting that selective ET_A blockade is a preferred therapeutic strategy over dual ET_A/ET_B blockade. On the other hand, MCT-induced pathological changes were significantly suppressed by both selective ET_A- and dual ET_A/ET_B blockade almost equally. Moreover, either pharmacological blockade or genetic ET_B receptor deficiency tended to aggravated MCT-induced PH, which seemed to result from enhanced ET_A-mediated action rather than a loss of protective ET_B function. In isolated perfused lungs of MCT-induced PH rats, both ET_A- and ET_B-mediated vasoconstrictions were enhanced, whereas ET_B-mediated vasodilation was attenuated. These results demonstrated that dual ET_A/ET_B blockade may be more beneficial than selective ET_A blockade. Thus, specific information regarding the pathophysiological role of ET_B receptors is essential to determine whether selective ET_A or dual ET_A/ET_B blockade is preferable in disease states.

Key words—endothelin; ET_A receptor; ET_B receptor; renal ischemia/reperfusion; pulmonary hypertension; monocrotaline

* e-mail: masahiro_nishida@merck.com

^a Safety & Exploratory Pharmacology, Merck Research Laboratories, Merck & Co., Inc., WP45-109, PO Box 4, West Point, PA 19486-0004, USA^b 大阪薬科大学 生体機能解析学研究室^c 大阪薬科大学 病態分子薬理学研究室

本論考は、西田昌広の博士論文の一部をもとに再構成したものである。

1. はじめに

エンドセリン (ET)-1 は、血管内皮細胞由来の強力かつ持続的な血管平滑筋収縮活性を有する血管収縮ペプチドとして同定されたが¹⁾、その後の研究から ET-1 は血管以外にも種々の臓器に対して多様な生理活性を持ち、その産生も血管内皮細胞だけでなく腎尿細管細胞や心筋細胞など種々の細胞で行われることが明らかとなっている²⁾、ET-1 が作用する受容体として、現在少なくとも 2 種類の受容体サブタイプ (ET_A および ET_B 受容体) が同定されており、血管系において ET-1 は平滑筋細胞膜上の ET_A および ET_B 受容体を介して血管収縮作用を示す一方で、血管内皮細胞に存在する ET_B 受容体を介して内皮由来弛緩因子の産生を刺激し、血管弛緩作用を示す^{3,4)}。ET-1 は、様々な循環器疾患の病態発症と進展に密接に関与することが報告されており、その作用の多くは ET_A 受容体を介したものであると考えられている。一方、ET-1/ET_B 受容体系の病態生理学的役割については、その作用が多様でかつ 2 面性をもつことから一致した見解が得られておらず、しばしば議論される選択的 ET_A 受容体拮抗薬と非選択的 ET_A/ET_B 受容体拮抗薬のどちらがより効果的であるかといった問題に関しては明確な結論が出ていない。

これまでに我々は、選択的 ET_A および ET_B 受容体拮抗薬、並びに ET_B 受容体遺伝子欠損ラットを実験ツールとして、種々の実験的循環器疾患モデルの病態発症と進展における ET-1 とその受容体を介した作用の役割について検討を進めてきた。本稿では、腎虚血・再灌流障害モデルおよびモノクロタリン (MCT) 誘発性肺高血圧モデルに絞り、その研究内容について紹介する。

2. 実験的腎虚血・再灌流障害モデルの病態発症と進展における ET-1 の役割

腎虚血・再灌流障害は、出血、体液の喪失、循

環不全、心血管の外科的手術、ショック並びに移植手術等による糸球体濾過の急激な低下より生じた腎臓の排泄障害と定義される。本病態の発症と進展においては、活性酸素や細胞内 Ca²⁺ 濃度など、様々な因子が関与するとされるが、虚血・再灌流後の腎組織で ET-1 mRNA 発現および ET-1 ペプチド濃度の増加が観察されることや、本病態のモデル動物における腎機能低下や腎組織障害に対して、選択的 ET_A 受容体拮抗薬および非選択的 ET_A/ET_B 受容体拮抗薬の投与が有意な改善効果を示すことから、本病態の発症と進展において ET-1 が密接に関与すると考えられている⁵⁾。腎臓において、ET_A 受容体が主に血管系に存在し血管収縮および細胞増殖に関与する一方で、ET_B 受容体は血管系で収縮、弛緩の双方に働くほか、尿細管細胞膜上にも豊富に存在し、尿生成過程において重要な役割を果たすことが明らかとなっている⁶⁾。このように腎臓における ET_B 受容体の作用は多様であり、本病態における病態生理学的役割については明確な見解が得られていない。

本研究では、ラット腎虚血・再灌流障害モデルに対して、虚血 5 分前に選択的 ET_A 受容体拮抗薬である ABT-627 (1 mg/kg) または選択的 ET_B 受容体拮抗薬である A-192621 (3 mg/kg) の静脈内投与を行い、その影響について比較検討した。溶媒処置による対照群では、再灌流 1 日後に著明な腎機能低下と腎組織障害が認められたが、これらの変化は ABT-627 の投与によって有意に抑制された。一方、A-192621 の投与は本モデルの腎機能低下に何ら影響を与えず、むしろ腎組織障害を悪化させる傾向にあった。

次に、Garipey らによって開発された ET_B 受容体遺伝子欠損ラット⁷⁾と野生型ラットに腎虚血・再灌流処置を行い、再灌流 1, 2, および 7 日後に腎機能の測定と腎組織の病理評価を行った。再灌流 1 日後における腎機能低下および腎組織障害には、両動物間に有意な差は認められなかった。一方、再灌流 2 日後および 7 日後には、

野生型において腎機能および腎組織障害の回復が認められたが、ホモ接合体においてその回復過程に明らかな遅れが認められた (Fig. 1)。また、再灌流 1 日後に観察された尿細管タンパク円柱について、再灌流 7 日後のホモ接合体の腎組織では、野生型の 2 倍程度多く観察された (Fig. 2)。このように、ET_B 受容体の欠損が腎虚血・再灌流障害からの正常な回復過程を阻害することが示唆された。

腎虚血・再灌流処置を行った腎組織中の ET-1 濃度を経時的に測定したところ、再灌流処置 2 時間後から、6 時間後をピークとして増加し、その後経時的に減少するものの再灌流 1 日後および 7 日後においても正常動物と比較して有意に高値を示した。Wilhelm らは、腎臓の虚血により ET-1 遺伝子のアップレギュレーションを引き起こし、それに続く再灌流刺激がその発現継続に密接に関与することを観察し、さらに ET-1 の局在につい

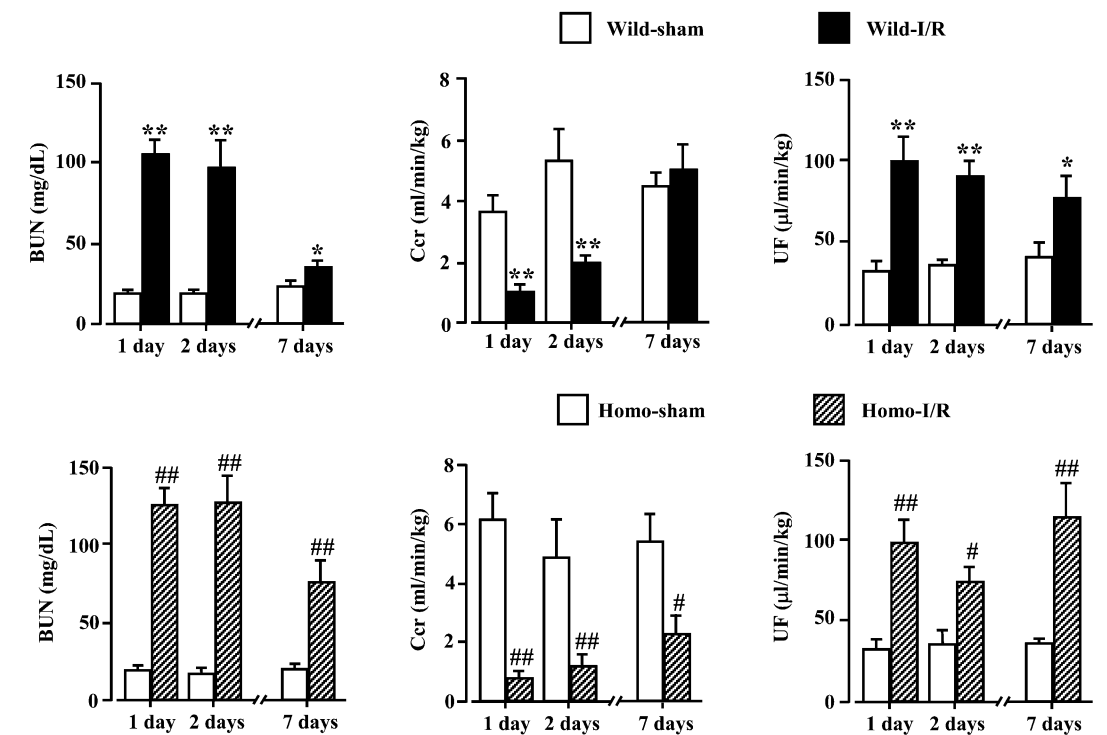


Figure 1. Comparative data on levels of blood urea nitrogen (BUN), creatinine clearance (Ccr) and urine flow (UF) of sham rats and ischemia/reperfusion (I/R) rats in wild-type (wild) and ET_B-deficient homozygous (homo) rats at 1, 2, and 7 days after the reperfusion. Each value is expressed as the mean \pm S.E.M. (n=6~8). **P*<0.05, ***P*<0.01, compared with wild-sham rats; #*P*<0.05, ##*P*<0.01, compared with homo-sham rats.

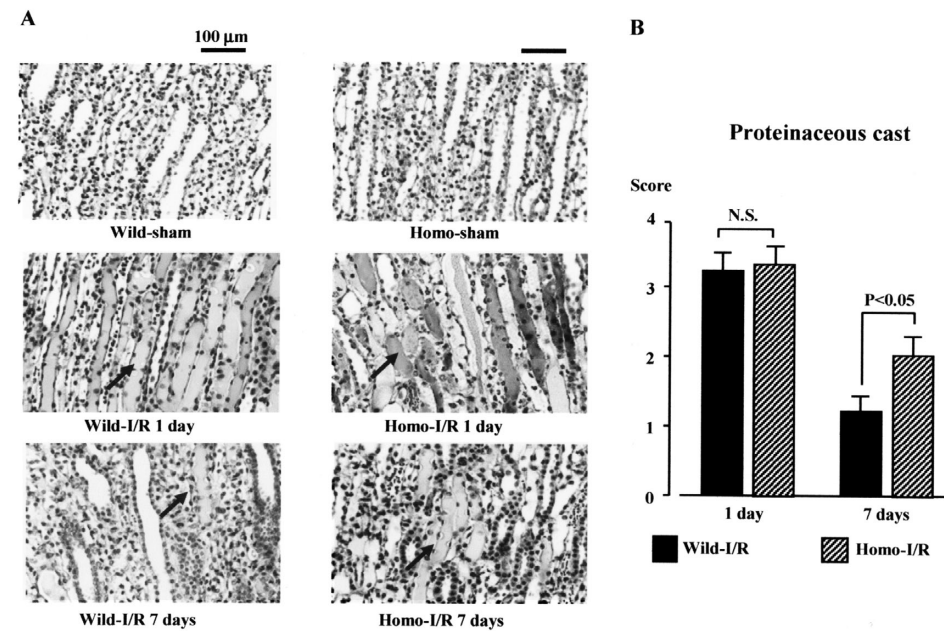


Figure 2. Light microscopy (A) and histopathologic scores (B) of the inner zone of medulla of wild-type (wild) ischemia/reperfusion (I/R) rats (n = 6) and ET_B-deficient homozygous (homo) I/R rats (n = 6). Each value is expressed as the mean ± S.E.M. Arrows indicate proteinaceous casts in tubuli (hematoxylin-eosin stain).

て、特に尿細管周囲血管の内皮細胞に集中することを確認した⁸⁾。したがって ET-1 は、本モデルの病態発症と進展において、尿細管周囲細動脈の過収縮により尿細管への酸素供給を低下させ、尿細管壊死に密接に関与するものと考えられる。ET-1 による腎血管収縮には ET_A、ET_B 両受容体が関与することが報告されている。しかしながら、本研究において ET_B 受容体の薬理的阻害および遺伝的欠損が腎虚血・再灌流後の腎機能低下および腎組織障害に明らかな影響を及ぼさなかったことから、上記メカニズムにおける ET_B 受容体の寄与は少なく、主に ET-1/ET_A 受容体系が関与するものと考えられた。

また本研究において興味深いことに、腎虚血・再灌流障害からの回復過程において、ET_B 受容体遺伝子欠損ラットの回復過程に遅れが見られたが、この知見は Forbes らの、選択的 ET_A 受容体拮

抗薬の投与が本病態モデルの腎障害に対して改善効果を示す一方で、非選択的 ET_A/ET_B 受容体拮抗薬の投与は長期予後をもっと悪化させたという報告⁹⁾と一致し、ET_B 受容体が回復過程において病態保護的に働く可能性が示唆された。腎髄質の ET_B 受容体刺激は一酸化窒素の分泌を介して腎髄質血流量を増大させることが知られている¹⁰⁾。また、尿細管において ET-1/ET_B 受容体系は Na⁺-K⁺-ATPase を阻害し、髄質内層集合管における酸素消費を抑制する¹¹⁾。さらに Ong らは、低酸素障害を受けた尿細管細胞の再生過程において、ET-1/ET_B 受容体系が密接に関与することを報告している¹²⁾。本病態における ET-1/ET_B 受容体系の保護作用の詳細については、今後のさらなる検討が必要である。

以上より、腎虚血・再灌流障害において ET-1/ET_B 受容体系は、病態因子というよりはむしろその回復過程において保護的に働くと考えられ、選

択的 ET_A 受容体拮抗薬がより効果的であることが示唆された。

3. 実験的肺高血圧モデル (MCT 誘発性) の病態発症と進展における ET-1 の役割

肺高血圧症は、肺動脈圧の上昇を認める病態の総称で、その原因は様々であるが、特に心臓や肺に疾患がなく、原因が不明であるものを肺動脈性肺高血圧症と呼ぶ。継続的な肺動脈圧の上昇は、右心拡張・肥大とそれに引き続く右心不全を引き起こすため、上昇した肺動脈圧を効果的に下げる治療薬が必要とされる。ET-1 が肺高血圧症における重要な病態因子であることはよく知られており、血漿中 ET-1 濃度は肺高血圧症患者で増加し、その程度は疾患の重症度とよく相関する¹³⁾。本邦では現在、選択的 ET_A 受容体拮抗薬であるアンブリセンタンと非選択的 ET_A/ET_B 受容体拮抗薬であるボセンタンが肺動脈性肺高血圧症の治療薬として承認されている。しか

しながら、肺高血圧症における ET_B 受容体の病態生理学的役割については、未だ一致した見解が得られておらず、どちらのタイプの拮抗薬がより効果的であるかといった議論に結論は出ていない¹⁵⁾。

本研究では、ラット MCT 誘発性肺高血圧モデルに対し、ABT-627 (10 mg/kg/day, p.o.) または A-192621 (30 mg/kg/day, p.o.) の単独投与、あるいは ABT-627 と A-192621 の併用投与を MCT 処置 (60 mg/kg) から 4 週間にわたって行い、その効果について比較検討した。MCT 処置 4 週間後において顕著に認められる右心室収縮期圧 (RVSP) および右心室と左心室 + 中隔の重量比 [RV/(LV+S)] の増加は肺高血圧とそれに伴う右心室肥大進行の指標となるが、これらパラメータの変化は A-192621 の慢性投与によりさらに増大した。一方 MCT 処置によるこれらの変化は、ABT-627 の投与により有意に抑制され、ABT-627/A-192621 の併用投与によっては正常動物とほぼ同程度にまで抑制された (Fig. 3)。また、MCT 処置により認められる肺小細動脈の中膜肥厚に、A-192621 の

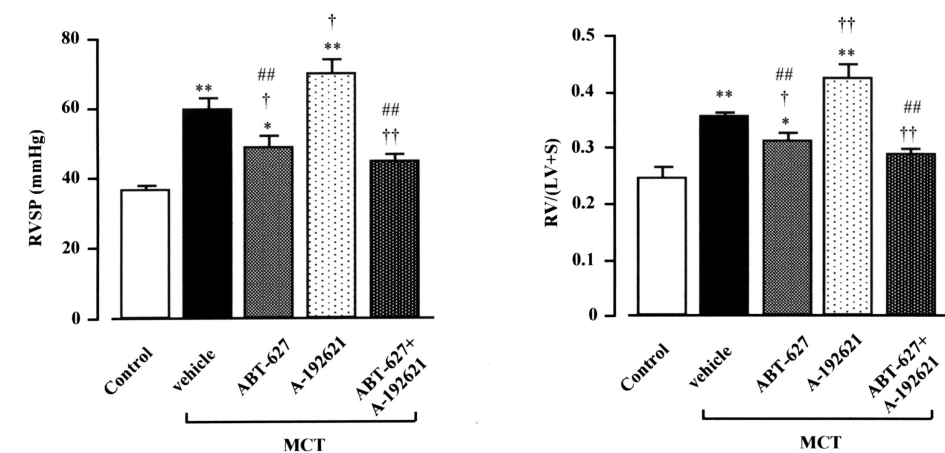


Figure 3. The effect of A-192621 and/or ABT-627 on right ventricular systolic pressure (RVSP) and the ratio of RV weight to left ventricular plus septal weight, RV/(LV+S), in monocrotaline (MCT)-treated rats 4 weeks after MCT injection. Each value is expressed as the mean ± S.E.M. (n=6~8). *P<0.05, **P<0.01, compared with the control group; †P<0.05, ††P<0.01, compared with the MCT + vehicle group; #P<0.05, ##P<0.01, compared with the MCT + A-192621 group.

投与は影響を与えなかったが、一方 ABT-627 の単独投与もしくは ABT-627/A-192621 の併用投与群においては正常コントロール群と同程度にまで抑制されていた。

次に、ET_B 受容体遺伝子欠損ラットホモ接合体とその野生型ラットに対し MCT 処置 (60 mg/kg) を行い、肺高血圧の進行について比較した。MCT 処置 3 週間後に認められた RVSP および RV/(LV+S) の上昇は、野生型動物に比べ、ホモ接合体でより顕著であった。また、MCT 処置から 3 週間にわたって ABT-627 (10 mg/kg/day, p.o.) を慢性投与したところ、これらの変化は両動物においてほぼ完全に抑制された (Fig. 4)。肺小細動脈の中膜肥厚についても、ほぼ同様の結果が得られた。

このように MCT 処置に伴う肺高血圧症の進展は、選択的 ET_B 受容体拮抗薬投与群および ET_B 受容体欠損ラットにおいて明らかに悪化したが、これらの変化は ET_A 受容体の同時阻害によりほぼ完全に抑制された。同様の現象は、食塩感受性¹⁶⁾ 高血圧モデル¹⁷⁾ やカニクイザル¹⁷⁾ などを用いた研究

でも確認されており、ET_B 受容体の薬理的阻害または遺伝的欠損による高血圧には、ET_B 受容体の保護的作用の消失というよりもむしろ、ET-1/ET_A 受容体系の亢進が関与しているものと考えられる。また本研究では、ABT-627 単独投与および ABT-627/A-192621 の併用投与は、どちらも肺高血圧の進行および右心室肥大を同程度に抑制した。Jasmin らは、非選択的 ET 受容体阻害薬である BSF420627 と選択的 ET_A 受容体阻害薬である LU135252 を用いた実験で、両化合物は本モデルの肺高血圧を改善したが、BSF420627 のみが右心室肥大を有意に抑制したと報告している。¹⁵⁾ 併せて考えると、本病態において ET-1/ET_B 受容体系が積極的に保護作用を示しているとは考えにくい。

次に、MCT 処置 4 週間後の動物から摘出肺灌流標本作製し、ET 受容体を介する血管収縮および弛緩作用について調べた。トロンボキサン A₂ 受容体アゴニストである U-46619 による前収縮下に、選択的 ET_B 受容体作動薬である Sarafotoxin

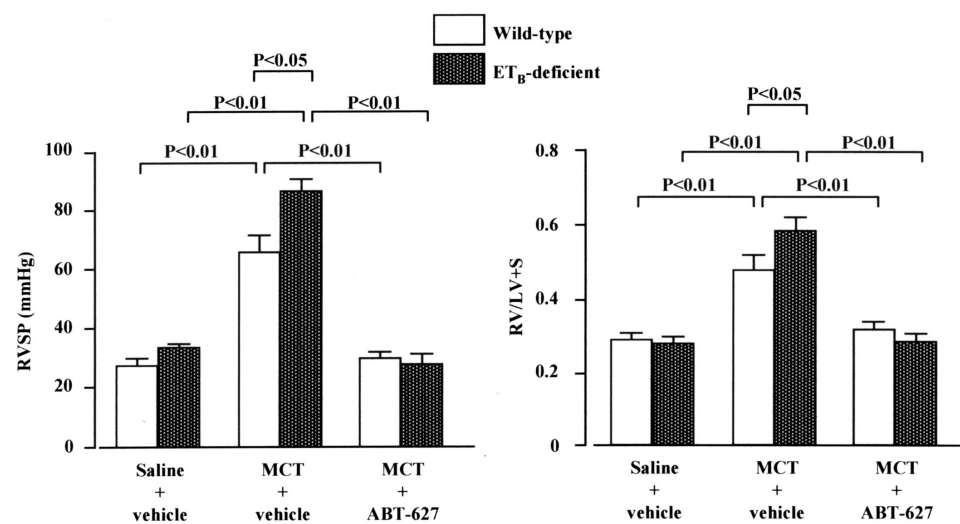


Figure 4. The effect of ABT-627 on right ventricular systolic pressure (RVSP) and the ratio of RV weight to left ventricular plus septal weight, RV/(LV+S), in monocrotaline (MCT)-treated wild-type and ET_B-deficient homozygous rats 3 weeks after MCT injection. Each value is expressed as the mean \pm S.E.M. (without ABT-627, n=10; with ABT-627, n=6).

6c を添加すると速やかな弛緩反応が確認されるが、MCT 処置動物の肺標本においてその反応は正常動物の肺と比べ 40% 程度減弱していた (Fig. 5)。一方、Sarafotoxin 6c 添加による濃度依存的な収

縮反応は、正常動物に比べ MCT 処置ラットの肺においてより顕著であった (Fig. 6-A)。ET-1 は ET_A, ET_B 両受容体に作用するが、その反応性も同様に MCT 処置動物で著しく、これらの変化は

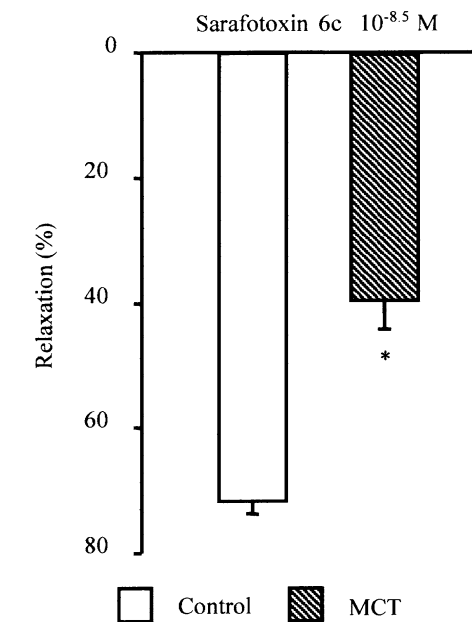


Figure 5. Vasodilator effect of sarafotoxin 6c (10^{-8.5} M) in isolated perfused lung preparations of monocrotaline (MCT)-treated rats 4 weeks after MCT injection. Each value is expressed as the mean \pm S.E.M. (n=9). *P<0.05, compared with the sham-treated group (control).

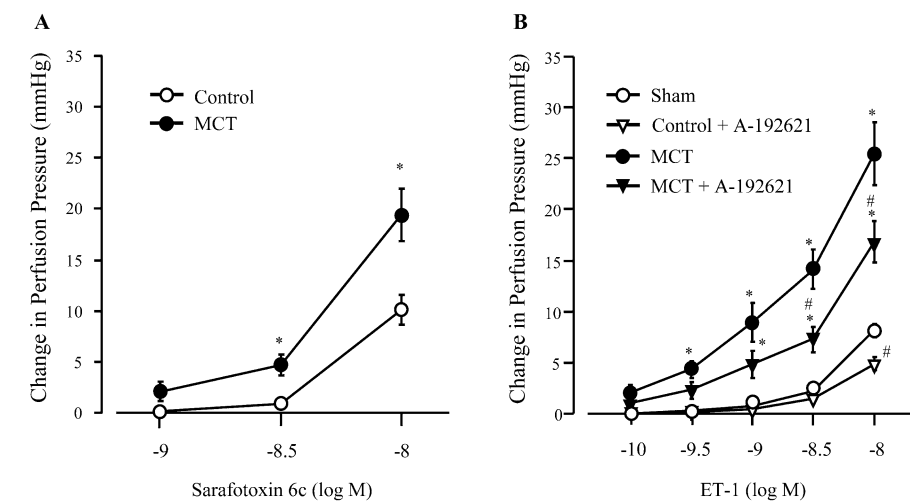


Figure 6. Concentration-response curve of sarafotoxin 6c (A) and ET-1 (B) in isolated perfused lung preparations of monocrotaline (MCT)-treated rats 4 weeks after MCT injection. Each value is expressed as the mean \pm S.E.M. (n=9). *P<0.05, compared with the sham-treated group (control); #P<0.05, compared with the MCT-treated group.

A-192621 の添加により有意に抑制された。また A-192621 存在下における ET-1 の収縮作用は ET_A 受容体を介したものと考えられるが、この反応も MCT 処置ラットの肺でより大きなものであった (Fig. 6-B)。このように、MCT 処置 4 週間後の動物の肺血管床においては、ET_A および ET_B 受容体を介した血管収縮反応の増大と、ET_B 受容体を介した血管弛緩作用の減弱が認められ、病態の進行に伴って ET 受容体拮抗薬に対する効果に差が生じる可能性が示された。

以上より、MCT 誘発性肺高血圧モデルにおいて、ET-1/ET_B 受容体系は保護的というよりも ET_A 受容体とともに病態因子として作用する可能性が示唆され、非選択的 ET_A/ET_B 受容体拮抗薬の投与がより効果的であると考えられた。

4. おわりに

本稿では、実験的腎虚血・再灌流障害モデルと実験的肺高血圧モデルにおける ET-1 の ET_A および ET_B 受容体を介した作用の役割について紹介した。本研究より、両病態モデルにおいて ET-1/ET_A 受容体系が一貫して病態因子として重要な役割を果たす一方で、ET-1/ET_B 受容体系は、実験的腎虚血・再灌流障害モデルにおいては病態因子というよりはむしろ腎障害からの回復過程において病態保護的に働き、肺高血圧モデルにおいては ET_B 受容体の積極的な保護作用は認められず、ET_A 受容体とともに病態因子として作用する可能性が示された。つまり、腎虚血・再灌流障害に対しては選択的 ET_A 受容体拮抗薬が、肺高血圧症に対しては非選択的 ET_A/ET_B 受容体拮抗薬がより効果的であることが示唆された。このように、ET 受容体拮抗薬を効果的に使用するためには、ET_B 受容体の病態生理学的役割についての理解が極めて重要である。

REFERENCES

1) Yanagisawa M., Kurihara H., Kimura S., Tomobe Y., Kobayashi M., Mitsui Y., Yazaki Y., Goto K., Masaki T., *Nature*, **332**, 411-415 (1988).

2) Goto K., Hama H., Kasuya Y., *Jpn. J. Pharmacol.*, **72**, 261-290 (1996).

3) Arai H., Hori S., Aramori I., Ohkubo H., Nakanishi S., *Nature*, **348**, 730-732 (1990).

4) Sakurai T., Yanagisawa M., Takuwa T., Miyazaki H., Kimura S., Goto K., Masaki T., *Nature*, **348**, 732-735 (1990).

5) Bonventre J.V., Weinberg J.M., *J. Am. Soc. Nephrol.*, **14**, 2199-2210 (2003).

6) Kohan D.E., Fiedorek F.T., *J. Am. Soc. Nephrol.*, **2**, 150-155 (1991).

7) Gariepy C.E., Williams S.C., Richardson J.A., Hammer R.E., Yanagisawa M., *J. Clin. Invest.*, **102**, 1092-1101 (1998).

8) Wilhelm S.M., Simonson M.S., Robinson A.V., Stowe N.T., Schulak J.A., *Kidney Int.*, **55**, 1011-1018 (1999).

9) Forbes J.M., Hewitson T.D., Becker G.J., Jones C.L., *Kidney Int.*, **59**, 1333-1341 (2001).

10) Gurbanov K., Rubinstein I., Hoffman A., Abassi Z., Bette O.S., Winaver J., *Am. J. Physiol.*, **271**, F1166-F1172 (1996).

11) Zeidel M.L., Brady H.R., Kone B.C., Gullans S.R., Brenner B.M., *Am. J. Physiol.*, **257**, C1101-C1107 (1989).

12) Ong A.C.M., Jowett T.P., Firth J.D., Burton S., Karet F.E., Fine L.G., *Kidney Int.*, **48**, 390-401 (1995).

13) Miyauchi T., Yorikane R., Sakai S., Sakurai T., Okada M., Nishikibe M., Yano M., Yamaguchi I., Sugishita Y., Goto K., *Circ. Res.*, **73**, 887-897 (1993).

14) Stewart D.J., Levy R., Cernacek P., Langleben D., *Ann. Intern. Med.*, **114**, 464-469 (1991).

15) Jasmin J.F., Lucas M., Cernacek P., Dupuis J., *Circulation*, **103**, 314-318 (2001).

16) Matsumura Y., Kuro T., Kobayashi Y., Konishi F., Takaoka M., Wessale J.L., Oppenorth T.J., Gariepy C.E., Yanagisawa M., *Circulation*, **102**, 2765-2773 (2000).

17) Pollock D.M., Pollock J.S., *Am. J. Physiol.*, **281**, F144-F150 (2001).