

## 9343 食塩による肥厚性血管病変の修飾機構

助成研究者:東 洋(東京医科歯科大学 医用器材研究所)

共同研究者:平川 公義, 新見 康成(東京医科歯科大学)

麻生 武志, 尾林 聡(東京医科歯科大学)

濱寄 秀久(東京医科歯科大学)

研究初年度にあたり、強力なmitogenとして知られているendothelin-1 (ET-1)が、内皮細胞剥離後の内膜肥厚発症、進展過程において如何なる役割を演じているかを検討した。実験には日本白色在来種の10週齢雄性ウサギを用いた。Sodium pentobarbital麻酔下に右頸動脈を露出し、動脈塞栓除去用バル-カテ-テルを用いて総頸動脈全域にわたって内皮細胞を除去した。左頸動脈には偽手術を施し、対照とした。内皮細胞の再生は経時的に進行し、剥離4週間後にはほぼ完了していた。また、著明な内膜肥厚が観察された。内皮除去後の血管壁に分布するimmunoreactive ET-1 (ir-ET-1)量は剥離24時間後にすでに明らかに増加しており、72時間後にはその増加は更に顕著になった。4週間後には対照群の9.3倍となった。同様の時間経過でproliferating cell nuclear antigen (PCNA) 陽性細胞が出現した。 $[^{125}\text{I}]$ -ET-1 (ligand for  $\text{ET}_A$  and  $\text{ET}_B$  receptors) ならびに $[^{125}\text{I}]$ -IRL1620 ( $\text{ET}_B$  receptor selective ligand) 結合のBmax値はいずれも肥厚血管において明らかな高値を示したが、Kd値には差はなかった。 $[^{125}\text{I}]$ -ET-1結合の一部は、 $\text{ET}_A$  receptor selective antagonist, BQ123によって抑制されたが、高濃度BQ123によっても抑制されない結合部位の存在することが示された。BQ123非感受性結合部位は肥厚血管において明らかに増加していた。組織化学的検討の結果、肥厚内膜には専ら $\text{ET}_B$  receptorが分布していた。BQ123は、in vivoで $\text{ET}_A$  receptor拮抗作用を発現するのに十分な濃度においても、内皮剥離後に惹起される内膜肥厚に対して影響しなかった。以上の事実から、ET-1は、内皮細胞剥離後の内膜肥厚の発症/進展過程において重要な役割を演じるが、ET-1の生理作用発現に際して、 $\text{ET}_A$  receptorは関与しないものと考えられた。



## 9343 食塩による肥厚性血管病変の修飾機構

助成研究者:東 洋(東京医科歯科大学 医用器材研究所)

共同研究者:平川 公義, 新見 康成(東京医科歯科大学)

麻生 武志, 尾林 聡(東京医科歯科大学)

濱寄 秀久(東京医科歯科大学)

## 1. 研究目的

食塩が高血圧発症のリスクファクターの一つであることは、すでに良く知られた事実であるが、動脈硬化の発症、進展、防御過程における食塩の果たす役割については不明の部分が多い。本研究の最終目的はこの点を明らかにするとともに、食塩誘発の血管壁の機能的、器質的变化が減塩すること無しに制御可能か否かを検討することにある。

私達は、血管内膜肥厚を動脈硬化の初期病変として捉え、ウサギ頸動脈内皮細胞を剥離することによって生じる内膜肥厚モデルを作製し、内膜肥厚過程における内皮細胞の果たす役割、とりわけ内皮細胞由来血管拡張因子(EDRF/NO)による平滑筋細胞増殖抑制機構について検討して来た。その結果、内皮剥離後に再生してくる内皮細胞の機能異常、とくにEDRF/NO産生/遊離能の著明な低下が、内膜肥厚を惹起する重要な要因の一つであることを明らかにした(1-4)。

研究初年度に当たり、強力なmitogenとして知られているendothelin-1(ET-1)(5)が内皮剥離後の内膜肥厚発症、進展にどのように関わっているかについて検討した。

## 2. 研究方法

## 2.1. 実験動物

実験には10週齢の日本白色在来種雄性ウサギを用いた。ウサギを8週齢にて購入し、2週間の予備飼育の後実験に供した。飼育室は、温度 $23 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $50 \pm 20\%$ に制御し、実験期間中を通じて普通食(RC-4、オリエンタル酵母)を与えた。内皮細胞剥離前後ならびにBQ123[cyclo(D-Sal-L-Pro-D-Val-L-Leu-D-Trp-)]の投与期間中の体重増加、一般症状は対照群のそれと差はなかった。

## 2.2. 頸動脈内皮細胞の剥離

内皮細胞の剥離は既報(1-4)の方法に従って行った。すなわち、Pentobarbital-Na(25mg/kg, i.v.)麻酔下に、頸部を正中切開し、右総頸動脈を露出した。内外頸動脈分岐部より約5mm心臓寄り小切開(長さ約0.5mm)した。切開部より動脈塞栓除去用バルンカテテル(12-40-3F, American Edward Laboratories, Santa Ana)を挿入し、総頸動脈全域に互って内皮細胞を剥離した。バルンには約0.15mlの空気を充満し(直径:約2.5mm)、内皮下組織に対する損傷を可及的少なくするよう注意した。バルンカテテル抜去後、切開部を10-0ナイロン糸を用いて縫合した。その際、血管の狭窄を避けるよう十分な注意を払った。この操作によって内皮細胞のみが完全に剥離されたか否かは、剥離術施行直後の総頸動脈内腔表面を走査型電子顕微鏡を用いて観察し、確認した。左頸動脈には偽手術を施し、対照とした。

## 2.3. 電子顕微鏡による観察

走査型電子顕微鏡用標本は既報(1-4)の方法に準拠して作製した。血管内腔表面の

微細構造は、走査型電子顕微鏡(ESM-3200, Elionics)を用いて観察した。

#### 2.4. 光学顕微鏡による観察

左右頸動脈を摘出し、10%中性緩衝ホルマリン溶液にて固定した。エタノール系列で脱水した後、パラフィン包埋した。薄切切片を常法に従ってhematoxylin-eosinまたはelastica Van Gieson染色し、鏡検した。Image analyzerを用いて内膜ならびに中膜の面積を測定し、内膜肥厚の程度を内膜/内膜+中膜(%)として表わした。

#### 2.5. 組織化学的検討

内皮細胞剥離後の時間経過と内膜での細胞増殖との関係を検討するために、パラフィン包埋し薄切した切片を、抗ヒトproliferating cell nuclear antigen (PCNA)マウスモノクローン抗体を用いてstreptavidin-biotin染色法(Dako LSAB kit)により染色した。また、von Willebrand Factor陽性反応を指標に内皮細胞を確認した(抗ヒトvon Willebrand Factor ウサギ抗体)。肥厚内膜ならびに中膜におけるET-1受容体の分布を調べるために、凍結頸動脈標本から薄切切片を作製し(cryostat; Kryostat 1720, Leitz)、ET-1、BQ123またはIRL1620(Tyr<sup>13</sup>-Suc-[Glu<sup>9</sup>,Ala<sup>11,15</sup>]ET-1; ET<sub>B</sub>受容体の特異的agonist)の存在ないし非存在下に、9位のリジン残基をビオチン化したET-1(ET-1[Biotin-Lys<sup>9</sup>])と室温にて1時間incubateした。Horse radish peroxidaseにて標識したstreptavidinと反応させた後、diaminobenzidineによって発色させ、受容体の局在を鏡検した。

#### 2.6. 受容体結合実験

[<sup>125</sup>I]-ET-1ならびに[<sup>125</sup>I]-IRL1620と、既報(6)の方法に準拠して調製した頸動脈膜画分を用いて受容体の分布密度ならびに親和性を比較検討した。

#### 2.7. Immunoreactive ET-1 (ir-ET-1) 含量の測定

内皮細胞剥離、24、72時間および4週間後に頸動脈を摘出し、Kitamura et al. (7,8)の方法に準拠してir-ET-1含量を定量した。

#### 2.8. BQ123 の投与と血中濃度の測定

内膜肥厚に及ぼすET<sub>A</sub>受容体拮抗剤、BQ123の影響を検討する為に、頸動脈内皮細胞剥離3日前に、140mM BQ123溶液の充満したosmotic pump (2ML4, Alza Corp., Palo Alto)を大腿静脈に装着し、その後、屠殺迄の4週間そのままにした。BQ123の注入量は5.31mg/body/dayとなった。対照群には生理食塩水のみを同様に投与した。4週間経過後、ウサギを屠殺し、内膜肥厚の程度を両群間で比較した。

内皮細胞剥離術施行後、1、2ならびに4週に耳介動脈より採血し、血漿中のBQ123濃度を測定した。BQ123の血漿中濃度は、フタ大動脈から調製した膜画分での[<sup>125</sup>I]-ET-1結合に対する抑制作用を指標として定量した。

### 3 研究結果

#### 3.1. 内皮細胞剥離後の内膜肥厚

偽手術を施したウサギ頸動脈では組織学的になんらの変化も認められなかった(Fig. 1A)。一方、内皮細胞剥離4週間経過後には、内膜から中膜へと遊走し、増殖した平滑筋細胞と結合組織の増殖のために著しい内膜肥厚が観察された(Fig. 1B)。

内皮細胞剥離後、24、72時間および4週間における細胞増殖の程度を免疫組織化学的方法を用いて検討した。内皮細胞剥離後24時間で既にPCNA陽性細胞が検出され、72時間後には著明に増加した。その後4週間目にかけて徐々に減少した。代表例をFig. 2に示した。



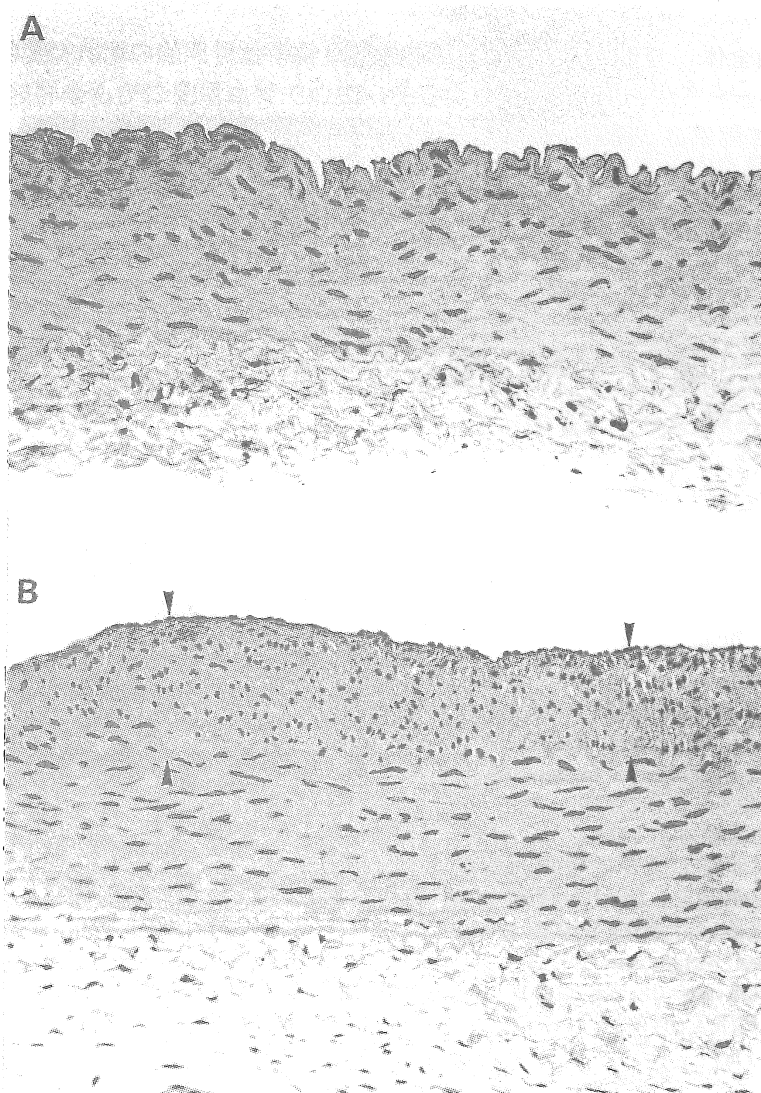


Fig. 1 Light microscopic findings of rabbit carotid arteries. A : Normal control showing an endothelial cell monolayer covering luminal surface of artery (HE x200). B : Specimen examined 4 weeks after endothelial removal showing intimal thickening that is covered with regenerated endothelial cells. Arrows indicate thickened intima (HE x200).

### 3.2. 内皮細胞の再生

走査型電子顕微鏡による観察の結果、偽手術群の頸動脈内腔表面は正常内皮細胞によって完全に覆われており、内皮細胞は血流方向に並列に、敷石状に配列していた。内皮細胞剥離4週間後には、頸動脈内腔表面の $96.2 \pm 2.0\%$  ( $n=6$ )が再生内皮細胞によって覆われていた。形態は正常細胞とは異なって伸張型を呈し、異常配列していた。これら内腔表面を覆う細胞が、内皮細胞であることは、von Willebrand Factorを免疫染色することによって確認した。

内皮細胞剥離4週後の内腔表面に分布する再生内皮細胞数( $9,783 \pm 355$  cells/mm<sup>2</sup>,  $n=6$ )は偽手術対照群のそれ( $6,618 \pm 238$  cells/mm<sup>2</sup>,  $n=6$ )に比較して有意に増加していた。これらの結果は、内皮細胞剥離4週後に内皮細胞の再生は完了していないもの

の内腔表面全体に分布する再生内皮細胞総数は偽手術対照群のそれに比較して多くなっていることを示している。

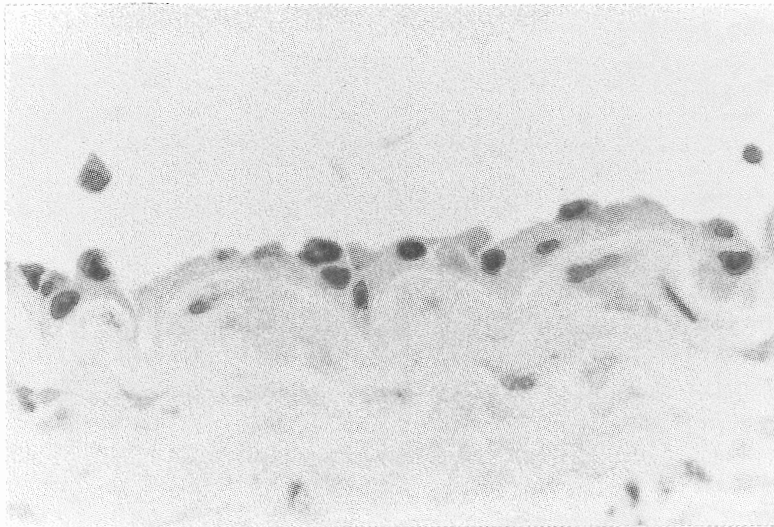


Fig. 2 Representative finding on the appearance of PCNA-positive cells 72 hrs after the endothelial removal of the rabbit carotid artery. Among the PCNA-positive cells, cells lining the innermost surface of the vessel wall were of endothelial origin, since they were positively stained for von Willebrand Factor. PCNA-positive cells other than the regenerated endothelial cells could be observed in the neointima (x500)

### 3.3. 頸動脈標本における ir-ET-1 含量

偽手術対照群および内皮細胞剥離4週間後の頸動脈標本におけるir-ET-1含量をRIA法によって測定し、その結果を比較した。なお、homogenateの調製に先立って両標本に分布する内皮細胞を除去しておいた。偽手術対照群でのir-ET-1含量は $182.7 \pm 34.0$  pg/g wet weight (n=3)であるのに対して、内皮剥離術後の頸動脈標本では著明に増加しており(p<0.05, p<0.01)、24、72時間および4週間でのir-ET-1含量はそれぞれ $425.6 \pm 73.3$  (n=3),  $656.0 \pm 68.1$  (n=3)および $1,697 \pm 176.9$  (n=3) pg/g wet weightであった(Table 1)。

Table 1 Content of ir-ET-1 in the control and the hyperplastic right carotid arteries

Exp. No.	Control	Content of ir-ET-1 (pg/g wet weight)		
		Time after endothelial removal		
		24hrs	72hrs	4 weeks
1	172.2	469.8	722.5	1731.0
2	246.2	524.9	725.7	1375.0
3	129.7	282.4	519.8	1985.0
Mean ± S.E.	$182.7 \pm 34.0$	$425.6 \pm 73.4^*$	$656.0 \pm 68.1^{**}$	$1697.0 \pm 176.9^{***}$

Assays were performed in duplicate and each result was given as the mean value. Endothelial cells were removed prior to preparing the homogenate. \*, \*\* and \*\*\* : Significant difference vs. control at p<0.05, p<0.01 and p<0.005, respectively. ir-ET-1 : Immunoreactive endothelin-1. S.E. : Standard error of the mean.

### 3.4. 結合実験による ET-1 受容体の測定

偽手術対照群ならびに肥厚血管でのET-1受容体の分布を比較するために、 $[^{125}\text{I}]$ -ET-1ならびに $[^{125}\text{I}]$ -IRL1620をligandsとし、両血管標本から調製した粗膜画分を用いた。なお、粗膜画分を調製するに先立って、両血管標本に分布する内皮細胞を除去しておいた。両ligandsの膜標本への結合はsaturableであり、また高い親和性を示した。Scatchard解析の結果、対照ならびに肥厚血管のいずれにおいても両ligandsはともに単一の結合点と結合していることが示唆された。両標本での結果をTable 2に示した。いずれのligandsの場合にも対照ならびに肥厚血管での解離定数(Kd)には差は無かったが、これに対して、最大結合点数 (Bmax)は両ligandsともに肥厚血管において有意に大きい値を示した。すなわち、肥厚血管ではET受容体の分布密度が明らかに増加していることを示唆する。IRL1620はET受容体の内、ET<sub>B</sub>受容体のみを特異的に認識するligandである。従って、肥厚血管においては総ET受容体の増加と共に、ET<sub>B</sub>受容体も明らかに増加していることを示している。

Table 2  $[^{125}\text{I}]$ -Endothelin-1 and  $[^{125}\text{I}]$ -IRL1620 bindings in the control left and the hyperplastic right carotid arteries

Preparation	$[^{125}\text{I}]$ -Endothelin-1			$[^{125}\text{I}]$ -IRL1620		
	n	Kd	Bmax	n	Kd	Bmax
Control left carotid artery	4	24.5 ± 5.5	1364.3 ± 68.4	6	21.4 ± 4.4	70.6 ± 9.4
Hyperplastic right carotid artery	4	28.2 ± 5.6	1851.3 ± 48.8**	6	30.8 ± 6.2	132.2 ± 2.7**

Results are given as mean ± standard error of the mean. Kd and Bmax are expressed as pM and fmoles/mg protein, respectively. \*\*: Significant difference vs. corresponding controls at  $p < 0.005$ . Endothelial cells were removed prior to preparing the membrane fraction. The membrane fractions from control left and hyperplastic right carotid arteries were incubated with eight different concentrations of  $[^{125}\text{I}]$ -endothelin-1 (3.32~350.0 pM) or  $[^{125}\text{I}]$ -IRL1620 (2.53~302. pM) in duplicate under the conditions described in the text. Specific binding was defined as total binding minus non-specific binding measured in the presence of 125 nM unlabeled endothelin-1.

$[^{125}\text{I}]$ -ET-1結合に対するET<sub>A</sub>受容体拮抗剤、BQ123の影響について比較検討し、その結果をFig. 3に示した。 $[^{125}\text{I}]$ -ET-1結合は、対照ならびに肥厚血管のいずれにおいてもBQ123の濃度に依存して抑制されたが、 $3 \times 10^{-7}\text{M}$ と言う高濃度においても完全には抑制されなかった。対照群において $[^{125}\text{I}]$ -ET-1結合の $32.4 \pm 0.8\%$  (n=4)がBQ123によって抑制されなかったのに対して、肥厚血管ではその割合が有意( $p < 0.005$ )に増加していた( $39.0 \pm 1.1\%$  (n=4))。

### 3.5. 組織化学による ET-1 受容体の測定

前述のように内皮細胞剥離4週後には 著明な内膜肥厚が観察される。肥厚血管の内膜ならびに中膜のいずれにおいても明らかなET-1[Biotin-Lys<sup>9</sup>] 特異的結合が認められたが、ET-1

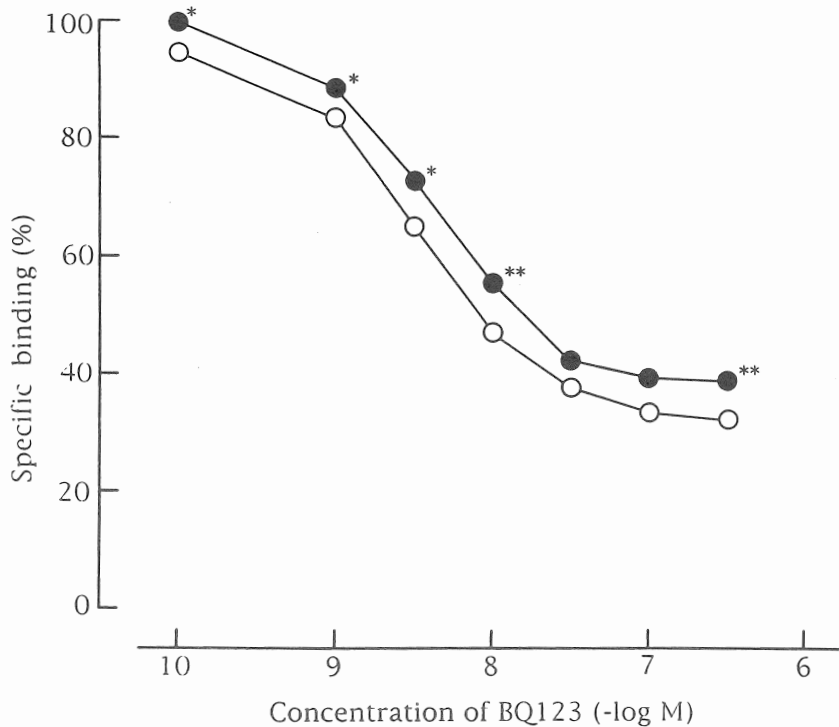


Fig. 3 Comparison of the inhibitory effect of BQ123 on the specific binding of [<sup>125</sup>I]-ET-1 between the control (○) and the hyperplastic (●) carotid arteries. Symbols represent the mean of 4 observations. \* and \*\*: Significant difference vs. corresponding controls at p<0.05 and p<0.01, respectively.

( $5 \times 10^{-5} \text{M}$ ) 共存下にはほぼ消失した。すなわち、ET-1[Biotin-Lys<sup>9</sup>]の非特異的結合は殆ど無視できる程度であることを示唆する。一方、ET<sub>A</sub>受容体の特異的拮抗剤、BQ123 ( $5 \times 10^{-5} \text{M}$ ) 共存下でのET-1[Biotin-Lys<sup>9</sup>]の結合は肥厚内膜のみにおいて、また、ET<sub>B</sub>受容体の特異的作動剤、IRL1620 ( $3 \times 10^{-6} \text{M}$ )共存下には中膜のみにおいて軽度の結合がそれぞれ観察された。すなわち、ET<sub>B</sub>受容体は主として肥厚内膜に、一方、ET<sub>A</sub>受容体は主として中膜に分布していることを示唆する。

### 3.6. 内膜肥厚に及ぼす BQ123 の影響

生理食塩水またはBQ123を投与した偽手術群での内膜の面積比 [(Intima/Intima+Media)×100 (%)]は $4.9 \pm 0.6$  (n=6)および $4.4 \pm 0.6$  (n=6)であった。これに対して、内皮細胞剥離4週間後には内膜は著しく肥厚し、生理食塩水投与群での肥厚は $24.0 \pm 2.7\%$  (n=6)であった。剥離術前3日から術後4週間にわたって連続的にBQ123を投与しても肥厚が抑制されることはなかった( $28.2 \pm 2.6\%$ , n=6)。いずれの群においても中膜の面積に差はなかった(Table 3)。

内皮細胞剥離後1、2および4週にBQ123の血漿中濃度を測定した結果、それぞれ、 $201.1 \pm 36.8$  (n=6)、 $256.4 \pm 44.8$  (n=6)および $204.6 \pm 19.3$  nM (n=6)であった。

Table 3 Influence of BQ123 on the intimal hyperplasia in response to endothelial removal of the rabbit carotid artery

Treatment	n	Media (mm <sup>2</sup> )	Intima/Intima+Media (%)
Sham operated left carotid artery + vehicle	6	965.7 ± 48.6	4.9 ± 0.6
Sham operated left carotid artery + BQ123	6	994.1 ± 44.3	4.4 ± 0.6
Denuded right carotid artery + vehicle	6	1032.8 ± 94.3	24.0 ± 2.7**
Denuded right carotid artery + BQ123	6	1105.7 ± 90.0	28.2 ± 2.6**

Results are given as mean ± standard error of the mean. Intimal hyperplasia was estimated 4 weeks after the endothelial removal. BQ123 was chronically administered with the aid of an osmotic pump. The pump was implanted 3 days before the endothelial removal and remained the following 4 week-experimental period. \*\*: Significant difference vs. corresponding controls at  $p < 0.005$ .

#### 4. 考察

Endothelinの発見後、膨大な研究成果が報告されており、様々な疾病とのかかわりについても知られるようになって来た。しかしながら、動脈硬化の発症、進展過程においてET-1がどのような役割を演じているのか詳細は未だ不明である。私達は、ウサギ頸動脈内皮細胞剥離後に生じる内膜肥厚を動脈硬化の初期病変として捉え、内膜肥厚の発症、進展過程においてET-1が担う役割について検討した。

内皮細胞剥離4週間後、内皮細胞の再生はほぼ完了しており、剥離面の96.2 ± 2.0%が再生内皮細胞によって覆われていた。また、著明な内膜肥厚が観察された。内皮細胞剥離後24時間ですでに、血管壁でのir-ET-1含量は著明に増加しており、72時間後には更に顕著になるとともに、4週間後には偽手術群の9.3倍に達した。ir-ET-1測定用サンプル調製に先立って、摘出血管標本から内皮細胞を除去してあるので、この増加は血管壁を構成する恐らくは平滑筋細胞でのET-1産生能の増加を反映しているのであろうが、直接ET-1 mRNAを定量する必要がある。Winkles et al.(9)によれば、ヒト動脈硬化巣においてET-1 mRNA量が著明に増加していると言う。初期の研究によるとヒトの正常血管では、ET-1は専ら内皮細胞のみに分布すると報告されているが(10-12)、動脈硬化血管の場合には、内皮細胞のみならず、血管壁にも分布することが知られている(13)。Resink et al. (14)は培養血管平滑筋細胞を用いて、ET-1が血管平滑筋細胞によっても産生されることを証明した。

Proliferating cell nuclear antigen (PCNA)特異抗体は、in vivoでの細胞増殖の状態を調べるための有用なtoolとして良く知られている。Cell cycleのG1期にPCNA signalは増加し、S期に最大に達した後、G2/M期には減少する(15)。本研究において、内皮細胞剥離24時間後にすでにPCNA陽性細胞が出現し、72時間後には著明に増加した。以後4週に向かって徐々に減少していった。PCNA陽性細胞の内、血管壁最内腔に分布する細胞は、抗von Willebrand Factor抗体によって陽性に染色されるので、再生内皮細胞と考えられる。内皮剥離後、24、72時間および4週間の内膜には再生内皮細胞以外に多くのPCNA陽性細胞が観察された。培養血管平滑筋細胞において、ET-1はDNA合成を促進し(5)、また、この合成促進作用が抗ET抗体によって抑制されることが知られている(16)。従って、内皮剥離後短時間でのET-1レベルの増加とPCNA陽性細胞の出現とは密接に関連しているものと考えられる。

ET-1がその生理作用を発現するには対応する受容体と結合する必要がある。血管平滑筋細胞には専らET<sub>A</sub>受容体が分布しており、血管の収縮や細胞増殖を媒介し(17,18)、一方、ET<sub>B</sub>受容体は専ら内皮細胞に分布し、EDRF/NOやPGI<sub>2</sub>の産生/放出を介して血管拡張作用をもたらすと報告されている(19,20)。しかしながら、どのタイプのET受容体が肥厚性血管病変を媒介しているかについては現在のところ不明である。本研究において、<sup>125</sup>I]-ET-1ならびに<sup>125</sup>I]-IRL1620をligandsとし、受容体結合実験を行った。前者のligandはET<sub>A</sub>ならびにET<sub>B</sub>受容体の両者を、一方、後者のligandはET<sub>B</sub>受容体のみを認識することが知られている(21,22)。両ligandsのBmax値は肥厚血管において有意に増加していたが、Kd値には何らの変化もなかった。前述のように粗膜画分の調製に先立って血管標本に分布する内皮細胞を除去してあるので、Bmax値の増加は血管平滑筋細胞におけるET受容体の増加を反映しているものと考えられた。さらに、<sup>125</sup>I]-ET-1特異結合は、ET<sub>A</sub>受容体の選択的拮抗剤、BQ123によって完全には抑制されず、また、BQ123によって抑制されない受容体の数も肥厚血管において増加していた。今回の受容体結合実験の結果から、以下のように考えることができる。すなわち、[1]:特異的<sup>125</sup>I]-ET-1結合はET-1受容体総数を、[2]:特異的<sup>125</sup>I]-IRL1620結合はET<sub>B</sub>受容体数を、[3]:特異的<sup>125</sup>I]-ET-1結合の内BQ123によって抑制される部分はET<sub>A</sub>受容体数を、また、[4]:[1]-[2]-[3]はnon-ET<sub>A</sub>およびnon-ET<sub>B</sub>受容体数をそれぞれ現わすものと考えられる(Table 5)。

各受容体の増加率を見ると、[2]>[4]>[1]>[3]の順となり、ET<sub>B</sub>受容体が最も高く、これに対してET<sub>A</sub>受容体が最も低かった。

Table 5 Comparison of the putative ET-1 receptor densities between the control and the hyperplastic carotid arteries

Receptors	Control artery (A)	Hyperplastic artery (B)	B/A
[1] [ <sup>125</sup> I]-ET-1 binding (Total ET-1 receptors)	1364.3±68.4	1851.3±48.8 <sup>**a)</sup>	1.36
[2] [ <sup>125</sup> I]-IRL1620 binding (ET <sub>B</sub> receptors)	70.6±9.4	130.2±2.7 <sup>**a)</sup>	1.84
[3] Displaced with BQ123 (ET <sub>A</sub> receptors)	922.3 (67.6% of the total)	1129.3 (61.6% of the total)	1.22
[4] [1]-[2]-[3] (non-ET <sub>A</sub> /non-ET <sub>B</sub> )	371.4	589.8	1.56

Results are given as fmoles/mg protein. a) : Results shown in Table 2. \*\* : Significant difference vs. corresponding control at p<0.005).

ET<sub>A</sub>受容体に対する選択的拮抗剤、BQ123を慢性的に投与しても、予期に反して内膜肥厚形成は影響されなかった。BQ123の血中濃度が低すぎた為ではないかと考えられるが、剥離術施行1、2および4週間後の血中濃度は、201.1±36.8、256.4±44.8および204.6±19.3 nMであり、この濃度は、肥厚血管から調製した粗膜画分における<sup>125</sup>I]-ET-1特異的結合に対するBQ123の

IC<sub>50</sub>値(19.7±3.1 nM)の10～13倍に相当した。また、麻酔下のウサギにBQ123 (1mg/kg)を静注すると1時間後に血中濃度が97.3±7.5 nM (n=3)になるが、この濃度において1 nmole/kg ET-1静注によって惹起される昇圧反応(22.0±2.3 mmHg, n=3)は著明に抑制された(6.7±1.2 mmHg, n=3) (東：未発表データ)。従って、今回測定されたBQ123の血中濃度は、in vivoにおいてもET<sub>A</sub>受容体を阻害するのに十分な濃度であると考えられる。すなわち、ET<sub>A</sub>受容体は、内皮細胞剥離後の内膜肥厚発現には関与しないのではないかと考えられる。組織化学的検討の結果、ET<sub>B</sub>受容体は専ら肥厚内膜に分布していた。この事実はBQ123の無効性を裏付けているかも知れない。一方、ET<sub>A</sub>にもET<sub>B</sub>にも分類されない受容体の存在することが本研究の結果推測され、仮にnon-ET<sub>A</sub>/non-ET<sub>B</sub>としたが、これらの受容体が内膜肥厚の発現においていかなる役割を演じるかについては今後の検討結果を待たねばならない。

以上のように、ET-1は、内皮細胞剥離後の内膜肥厚発現の際に重要な役割を演じるが、その際ET<sub>A</sub>受容体はこの過程には関わらないものと考えられる。更なる詳細については今後の検討を要する。

#### 5. 今後の課題

- (1) 高食塩食の慢性投与によって、内皮細胞剥離後の内膜肥厚がどのように修飾されるかを明らかにする。
- (2) 含硫アミノ酸などの併用によって減塩することなし、高食塩による内膜肥厚の修飾を制御出来るか否かを明らかにする。

#### 6. 引用文献

- (1) Azuma, H., Funayama, N., Kubota, T. & Ishikawa, M. : Regeneration of endothelial cells after balloon denudation of the rabbit carotid artery and changes in responsiveness. *Jpn. J. Pharmacol.*, 52, 541-552, 1990.
- (2) Azuma, H., Funayama, N., Kubota, T. & Ishikawa, M. : Endothelial regrowth after balloon denudation and changes in responsiveness. *Eur. J. Pharmacol.*, 183, 1281, 1990.
- (3) Azuma, H., Niimi, Y. & Hamasaki, H. : Prevention of intimal thickening after endothelial removal by a nonpeptide angiotensin II receptor antagonist, losartan. *Br. J. Pharmacol.*, 106, 665-671, 1992.
- (4) Niimi, Y., Azuma, H. & Hirakawa, K. : Repeated endothelial removal augments intimal thickening and attenuates EDRF release. *Am. J. Physiol.* 266 (Heart Circ. Physiol. 35), H1348-H1356, 1994).
- (5) Hirata, Y., Takagi, Y., Fukuda, Y. & Marumo, F. : Endothelin is a potent mitogen for rat vascular smooth muscle cells. *Arteriosclerosis*, 78, 225-228, 1989.
- (6) Azuma, H., Hamasaki, H., Niimi, Y., Terada, T. & Matsubara, O. : Role of endothelin-1 in the neointima formation after endothelial removal of the rabbit carotid artery. *Am. J. Physiol.* (Heart Circ. Physiol.), in press.
- (7) Kitamura, K., Tanaka, T., Kato, J., Ogawa, T., Eto, T. & Tanaka, K. : Immunoreactive endothelin in rat kidney inner medulla : marked decrease in spontaneously hypertensive rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 162, 38-44, 1989.
- (8) Kitamura, K., Yukawa, T., Morita, S., Ishiki, Y., Eto, T. & Tanaka, K. : Distribution and molecular form of immunoreactive endothelin-1 in porcine tissue. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 170, 497-503, 1990.
- (9) Winkles, J.A., Alberts, G.F., Brogi, E. & Libby, P. : Endothelin-1 and endothelin

- receptor mRNA expression in normal and atherosclerotic human arteries. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 191, 1081-1088, 1993.
- (10) Hiroe, M., Hirata, Y., Marumo, F., Nagata, M., Toyozaki, T., Hasumi, M., Ohta, Y., Horie, T. & Sekiguchi, M. : Immunohistochemical localization of endothelin in human vascular endothelial cells. *Peptides*, 10, 1281-1282, 1989.
- (11) Howard, P.G., Plumpton, C. & Davenport, A.P. : Anatomical localization and pharmacological activity of mature endothelins and their precursors in human vascular tissues. *J. Hypertension*, 10, 1379-1386, 1992.
- (12) Miyauchi, T., Tomobe, Y., Shiba, R., Ishikawa, T., Yanagisawa, M., Kimura, S., Sugishita, Y., Ito, I., Goto, K. & Masaki, T. : Involvement of endothelin in the regulation of human vascular tone : Potent vasoconstrictor effect and existence in endothelial cells. *Circulation*, 81, 1874-1880, 1990.
- (13) Lerman, A., Edwards, B., Hallet, J.W., Heublein, D.M., Sandberg, S.M. & Burnett, J.C.Jr. : Circulating and tissue endothelin immunoreactivity in advanced atherosclerosis. *N. Engl. J. Med.*, 325, 997-1001, 1991.
- (14) Resink, T.J., Hahn, A.W.A., Scott-Burden, T., Powell, J., Weber, E. & Buhler, R. : Inducible endothelin mRNA expression and peptide secretion in cultured human vascular smooth muscle cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 168, 1303-1310, 1990.
- (15) Kurki, P., Ogata, K. & Tan, E.M. : Monoclonal antibodies to proliferating cell nuclear antigen (PCNA)/cyclin as a probes for proliferating cells by immunofluorescence microscopy and flow cytometry. *J. Immunol. Methods*, 109, 49-59, 1988.
- (16) Takagi, Y., Fukase, M., Tanaka, S., Yoshimi, H., Tokunaga, O. & Fujita, T. : Autocrine effect of endothelin on DNA synthesis in human vascular endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 168, 537-543, 1990.
- (17) Eguchi, S., Hirata, Y., Ihara, M., Yano, M. & Marumo, F. : A novel ETA antagonist (BQ123) inhibits endothelin-1-induced phosphoinositide breakdown and DNA synthesis in rat vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett.*, 302, 243-246, 1992.
- (18) Ihara, M., Noguchi, K., Saeki, T., Fukuda, T., Tsuchida, S., Kimura, S., Fukami, T., Ishikawa, K., Nishikibe, M. & Yano, M. : Biological profiles of highly potent novel endothelin antagonists selective for the ETA receptor. *Life Sci.*, 50, 247-255, 1992.
- (19) Emori, S., Hirata, Y., Kanno, K., Ohta, K., Eguchi, S., Imai, T., Shichiri, M. & Marumo, F. : Endothelin-1 stimulates production of endothelium-derived nitric oxide via phosphodiesterase breakdown. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 174, 228-235, 1991.
- (20) Takayanagi, R., Kitazumi, K., Takasaki, C., Ohnaka, K., Aimoto, S., Tasaka, K., Ohashi, M. & Nawata, H. : Presence of non-selective type of endothelin receptor on vascular endothelium and its linkage to vasodilation. *FEBS Lett.*, 282, 103-106, 1991.
- (21) Takai, M., Umemura, I., Yamasaki, K., Watakabe, T., Fujitani, Y., Oda, K., Urade, Y., Inui, T., Yamamura, T. & Okada, T. : A potent and specific agonist, Suc-[Glu<sup>9</sup>, Ala<sup>11, 15</sup>]-endothelin-1 (8-21), IRL1620, for ETB receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 184, 953-959, 1992.
- (22) Watakabe, T., Urade, Y., Takai, M., Umemura, I. & Okada, T. : A reversible radioligand specific for the ETB receptor : [<sup>125</sup>I]Tyr<sup>13</sup>-Suc-[Glu<sup>9</sup>, Ala<sup>11, 15</sup>]-endothelin-1 (8-21), [<sup>125</sup>I]IRL1620. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 185, 867-873, 1992.



REGULATORY MECHANISM BY SALT OF THE HYPERPLASTIC  
VASCULAR DISEASE FOLLOWING ENDOTHELIAL REMOVAL

Hiroshi Azuma, \*Kimiyoishi Hirakawa, \*Yasunari Niimi, \*\*Takeshi Aso, \*\*Satoshi Obayashi  
and Hidehisa Hamasaki

Institute for Medical and Dental Engineering, Departments of \*Neurosurgery, and  
\*\*Gynecology and Obstetrics, Tokyo Medical and Dental University  
2-3-10 Surugadai, Kanda, Chiyoda-ku, Tokyo 101, Japan.

Summary

To investigate the role of local endothelin-1 (ET-1) in the neointima formation, we performed a balloon denudation on the rabbit carotid artery. Four weeks after the denudation, regeneration of endothelial cells almost completed and a marked intimal hyperplasia was observed. The tissue level of ET-1-like-immunoreactivity was significantly increased even at 24 and 72 hrs after the denudation, and 9.3 times higher than in the control in 4 weeks. On the same time course, the proliferating cell nuclear antigen-positive cells clearly appeared. Bmax values for [<sup>125</sup>I]-ET-1 (ligand for ET<sub>A</sub> and ET<sub>B</sub> receptors) and [<sup>125</sup>I]-IRL1620 (ET<sub>B</sub> receptor selective ligand) bindings were significantly greater in the hyperplastic artery without changes in Kd values. The [<sup>125</sup>I]-ET-1 binding sites not inhibited with BQ123 (ET<sub>A</sub> receptor selective antagonist) were significantly increased in the hyperplastic artery. ET<sub>B</sub> receptors were more densely localized in the neointima. The chronic administration of BQ123 at plasma concentrations being sufficient to antagonize the ET<sub>A</sub> receptors had no effect on the neointima formation. We concluded from all results that ET-1 would be involved in the neointima formation after the endothelial removal and the ET<sub>A</sub> receptors would not play a role in this process.