

主論文の要約

## Midkine Regulates BP through Cytochrome P450-Derived Eicosanoids

ミッドカインはチトクローム P450 由来エイコサノイドを介して  
血圧を制御している

名古屋大学大学院医学系研究科 分子総合医学専攻  
病態内科学講座 腎臓内科学分野

(指導：松尾 清一 教授)

佐藤 由香

## 【緒言】

高血圧症は慢性腎臓病(CKD)や心血管疾患の重大なリスクファクターである。さらに近年これらの疾患の発症・進展に血管内皮障害が関与していることがわかってきた。しかしそのメカニズムについては不明な部分が多い。血管内皮細胞は一酸化窒素(NO)などの血管作動性物質を放出し、血管壁の収縮・弛緩、炎症細胞の接着や透過性、凝固・線溶系の調節を行っている。内皮細胞の分泌する因子のうち血管拡張作用のあるものには NO、プロスタグランジン I<sub>2</sub>、内皮由来過分極因子(Endothelium-derived hyperpolarizing factor: EDHF)が知られている。このなかで最も研究が進んでいるのは NO であり、NO 合成酵素(NOS) 阻害薬である NG-nitro-L-arginine-methyl-ester (L-NAME)を動物に投与すると内皮障害から起因する臓器障害や血圧上昇をもたらす。一方、EDHF はその正体も完全には明らかになっていない。EDHF の候補としてチトクローム P450 由来エポキシエイコサノイド(EETs)があり特に NO 阻害下における血管拡張作用により臓器血流を増加させるという特徴がある。

ミッドカイン(MK)は腫瘍発生や炎症進展に関与する成長因子で、心筋梗塞・脳梗塞の進展や 5/6 腎摘モデルで肺 ACE を介した高血圧症の発症にも寄与する。本研究では MK が内皮細胞に発現していることに注目し NO 阻害モデルを用いて MK による EETs の活性制御と血圧および臓器障害を検討した。

## 【方法】

野生型マウスと MK 欠損型マウスを無作為に①無治療群、②片腎摘群、③片腎摘+L-NAME 投与群、④片腎摘+L-NAME+ヒドララジン投与群に分け血圧を 4 ヶ月まで測定した。血圧測定は Tail-cuff 法とラジオテレメトリーシステムを用いた観血的動脈圧測定で行った。4 ヶ月後にサクリファイスし血液、各種臓器を採取した。

野生型マウスに片腎摘+L-NAME を投与し高血圧にさせた後、抗 MK 抗体または IgG を入れた浸透圧ポンプを埋め込み血圧を比較した。

野生型/MK 欠損型マウスの腎臓から血管内皮細胞のプライマリカルチャを行った。

野生型/MK 欠損型マウスに麻酔下で観血的動脈圧測定を行いながら、カリブドトキシシン、14,15-EE-5(Z)-E(14,15-EEZE)、ZM241385、ヘキサメトニウムを投与し血圧の変化率を観察した。また野生型マウスに抗 MK 抗体を、MK 欠損型マウスにリコンビナント-ヒト MK タンパク(rh-MK)を投与後に 14,15-EEZE を投与し血圧の推移を観察した。

多光子レーザー顕微鏡でマウス生体の腎臓表面を観察しながら蛍光標識した 70kDa デキストランをマウスに投与することで腎毛細血管を識別したうえで、14,15-EEZE を投与し血管の収縮度を観察し血管容積を算出した。

## 【結果】

片腎摘出後に NOS 阻害薬 L-NAME を投与すると野生型マウスでは血圧上昇、糸球体硬化、蛋白尿を認めたが MK 欠損型マウスでは抑制された (Figure1, 3)。片腎的お

よび L-NAME 投与で高血圧を発症させた野生型マウスに、抗 MK 抗体を投与すると血圧上昇を優位に抑制できた (Figure2)。

NO 産生量および NO シグナルの下流にある cGMP や、NO 活性に関与する活性酸素を評価したが両群に差は認めなかった(Figure4)。つまり MK による血圧制御は NO 阻害下で優位に表れるが、MK が直接 NO 系路を制御はしていないと考えられた。

EETs の代謝産物である 14,15-DHET が MK 欠損型マウスで野生型に比べ増加していた(Figure5A)。マウス腎臓からプライマリカルチャした血管内皮細胞の上清でも MK 欠損型マウスの方が 14,15-DHET が増加していた(Figure5B)。EETs は血管内皮細胞の  $K_{Ca}$  チャネルを介し血管拡張作用をもたらす。そこで  $K_{Ca}$  チャネルの阻害薬であるカリブドトキシンをマウスに投与したところ、MK 欠損型マウスで血圧の上昇率が有意に大きかった(Figure5C, D)。同様に EETs の特異的阻害薬である 14,15-EEZE を投与したところ MK 欠損型マウスでは、野生型に比べ有意に血圧が上昇した(Figure5E)。さらに MK 欠損型マウスに rhMK を投与後に 14,15-EEZE を投与したところ、野生型マウスと同様に血圧上昇が抑制されることを確かめた(Figure6B)。逆に野生型マウスに MK 抗体を投与後に 14,15-EEZE を投与したところ、MK 欠損型マウスと同様に血圧が有意に上昇した(Figure6C)。以上から MK 欠損型マウスでは EETs が亢進していると結論付けた。

次にアデノシンがアデノシン  $A_{2A}$  受容体を介して EETs 産生を亢進するという報告に注目し、 $A_{2A}$  受容体拮抗薬である ZM241385 を投与したところ、MK 欠損型マウスで野生型に比べ有意な血圧上昇を認めた(Figure6D)。

腎臓内の血流を評価するため、マウス腎表面の傍尿細管毛細血管を生体顕微鏡で観察しながら 14,15-EEZE を投与した。投与 15 分経過後、野生型では血管が速やかに再拡張し血管容積が戻ったのに対し MK 欠損型では減少したままだった(Figure7)。

MK 欠損型マウスでは EETs 産生が亢進しているにも関わらず低血圧にならない理由として EETs の血管拡張作用と相反するメカニズムが補完していると予想した。血漿ノルアドレナリンが MK 欠損型マウスで有意に上昇していた(Figure8A)。さらにアセチルコリンのニコチン受容体阻害薬であるヘキサメトニウムを投与すると MK 欠損型マウスで血圧がより低下した(Figure8D)。以上から MK 欠損型マウスでは EETs 亢進による血圧低下を補完するために交感神経系が亢進していると考えられた。

## 【考察】

MK が EETs 産生を血管内皮細胞において抑制することで、血圧および臓器血流を制御していることを示した。この作用は NO 阻害をすることで優位に表れることがわかった。EDHF は NO に対し相補的に働くと考えられており、MK の EETs を介した血圧制御システムが NO 阻害下で優位に表れた理由と考えられる。さらに MK がアデノシン  $A_{2A}$  受容体-EETs 経路を制御していること示したが、その作用点についてはまだ明らかにできておらず今後の課題である。

血管内皮障害は NO や EETs などの内皮細胞が分泌する因子のバランスが崩れるこ

とにより血管拡張作用が障害されることが特徴である。本研究では生体顕微鏡で腎臓の毛細血管を直接観察して、MK が EETs を介した血管拡張作用つまり内皮障害に関与することを示した。

血管内皮障害は CKD、心血管疾患、脳血管疾患、糖尿病などに関与している。降圧治療だけでは血管内皮障害を十分に抑制できないこともわかってきているが内皮障害を直接治療する方法はまだ開発されていない。本研究で抗 MK 抗体投与により NOS 阻害薬誘発性高血圧を改善することができた。今後 MK をターゲットとして、新たな降圧薬や内皮障害治療薬を開発できる可能性がある。

#### **【結語】**

MK が血管内皮細胞においてチトクローム P450 由来エイコサノイドである EETs の産生を抑制することで、血圧および腎血流を制御していることを示した。