氏名	政次 健（まさつぐ けん）
学位の種類	博士（医学）
学位記番号	論医博第1850号
学位授与の日付	平成16年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文題目	Shear stress attenuates endothelin and endothelin-converting enzyme expression through oxidative stressに関する研究 （ずり応力は酸化ストレスを介してエンドセリン及びエンドセリン変換酵素の発現を抑制する）
論文調査委員	（主査）教授 横出正之　教授 淀井淳司　教授 中尾一和

論文内容の要旨

ずり応力（shear stress）は血流の接線方向に血流及び血液粘性によって生ずる物理機械的力である。血管の分岐部や湾曲部など低ずり応力の部位に動脈硬化病変が多発することが認められ，ずり応力の変化が内皮機能低下を招来し動脈硬化の原因となっている可能性が示されている。

申請者らは既にずり応力により，内皮由来血管拡張ペプチドであるC型ナトリウム利尿ペプチド（CNP）及びアドレノメジュリンの分泌増加を報告した。本研究は内皮細胞由来血管収縮ペプチドであるエンドセリン産生に対するずり応力の影響を明らかにする目的で生理的範囲のずり応力を培養内皮細胞に負荷しエンドセリン-1（ET-1）とエンドセリン変換酵素-1（ECE-1）発現を検討し，更にずり応力によるエンドセリン産生制御に於ける酸化ストレスの関与を検討した。

Ⅰ.ずり応力の培養内皮細胞に於けるエンドセリン及びエンドセリン変換酵素発現に対する作用

培養ウシ頚動脈内皮細胞及びヒト臍帯静脈内皮細胞に於けるET-1及びECE-1 mRNA発現に対するずり応力の関与について平行平板型ずり応力負荷装置を用いて検討した。ウシ内皮細胞に，1.5dyne/cm^2，15dyne/cm^{2}のずり応力をそれぞれ24時間負荷したところ，ET-1及びECE-1 mRNAは強度依存性に減少し，15dyne/cm^{2}の負荷にてECE-1mRNAの発現量はコントロールと比較して15%まで減少した。

ヒト内皮細胞についても5～25dyne/cm^{2}のずり応力（4時間負荷）により強度依存性にECE-1とそのサブタイプであるECE-1a mRNAが減少した。更にウシ内皮細胞に15dyne/cm^{2}のずり応力を1，12，24時間負荷すると，ET-1及びECE-1mRNAは時間依存性に減少した。また培養液中のET-1及びその前駆体ペプチドであるbigET-1濃度を1.5dyne/cm^2，15dyne/cm^{2}のずり応力負荷後それぞれ4，8，12時間後にELISAにて測定したところ，4時間後のET-1及びbigET-1濃度には差は認められなかったが8，12時間後には1.5dyne/cm^{2}に比べ15dyne/cm^{2}のずり応力負荷後のET-1，bigET-1濃度の有意な低下が認められた。

Ⅱ.ずり応力によるエンドセリン及びエンドセリン変換酵素発現制御に於ける酸化ストレスの関与

ずり応力による内皮細胞での酸化ストレス産生を検討するためdichlorofluorescin diacetateを用いフローサイトメトリーにてウシ内皮細胞内ペルオキサイドを測定した。15dyne/cm^{2}のずり応力を30分負荷した際の細胞内ペルオキサイド濃度は0.2mMの過酸化水素に30分暴露させた際と同様の上昇を認めた。この変化は抗酸化剤であるN-acetyl cysteine（NAC）20mMにより抑制された。

15dyne/cm^{2}のずり応力によるET-1，ECE-1mRNA発現低下はNAC20mMの添加により有意に抑制された。更に0.2mM～2mMの過酸化水素の添加によりET-1，ECE-1mRNAの発現量は用量依存性に減少しNAC20mMの添加により

発現量の低下は抑制された。

以上によりずり応力は酸化ストレスの上昇を介し内皮由来血管収縮因子であるET-1とその産生酵素であるECE-1の発現量を低下させることが明らかになった。ずり応力はCNPなどの内皮由来血管拡張因子分泌を促進させるとともにエンドセリン等の内皮由来収縮因子分泌を抑制させることで血管拡張，血管保護的に作用することが示唆された。

論文審査の結果の要旨

ずり応力（shear stress）は血流の接線方向に血流及び血液粘性によって生ずる物理機械的力である。低ずり応力の部位に動脈硬化病変が多発することが認められ，ずり応力の変化が内皮機能低下を招来し動脈硬化の原因となる可能性が示されている。

今回申請者らは血管内皮細胞由来血管収縮ペプチドであるエンドセリン産生に対するずり応力の影響とそれに対する酸化ストレスの関与を検討した。

ウシ及びヒト内皮細胞に，生理的範囲のずり応力を負荷したところ，エンドセリン-1（ET-1）とその産生酵素であるエンドセリン変換酵素-1（ECE-1）mRNAは強度依存性，時間依存性に減少した。培養液中のET-1及びその前駆体であるbigET-1濃度もずり応力の強度依存性に有意な低下が認められた。

一方ずり応力負荷により内皮細胞内ペルオキサイド濃度は上昇を認め，ずり応力によるET-1，ECE-1mRNA発現低下は抗酸化剤添加により有意に抑制された。更に過酸化水素の添加によりET-1，ECE-1mRNAの発現量は用量依存性に減少した。

以上によりずり応力は酸化ストレスの上昇を介し内皮由来血管収縮因子であるET-1とその産生酵素であるECE-1の発現量を低下させ血管拡張，血管保護的に作用することが示唆された。

以上の研究はずり応力による内皮由来血管作動ペプタイド産生制御の解明に貢献し，動脈硬化症の成因の理解とその抑制に寄与することが多い。

したがって，本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお，本学位授与申請者は，平成16年2月9日実施の論文内容とそれに関連した研究分野並びに学識確認のための試問を受け，合格とみとめられたものである。