

動物種による human urotensin II の血管収縮作用の相違

田崎 勝成・若林 一郎*・鷺野 嘉映・和田 節子・三井 淳藏

Difference in potency of human urotensin II-induced contraction in arteries of various animal species

Katsunari Tasaki, Ichiro Wakabayashi*, Kaei Washino,
Setsuko Wada, Junzo Mitsui

*Department of Environmental and Preventive Medicine, Hyogo College of Medicine,
Mukogawa-cho 1-1, Nishinomiya, Hyogo 663-8501, Japan

Summary

We investigated contractile responses to human urotensin II, a new receptor-mediated vasoconstrictive peptide, in arteries of various species. Isolated vascular strips were incubated in Tyrode solution aerated by a mixed gas of 95% O₂ + 5% CO₂ and were stimulated with human urotensin II. Human urotensin II induced potent vasoconstriction in rat aortas. In porcine coronary arteries, only a detectable contractile response was induced by human urotensin II at its high concentration (100 nM). Moreover, neither guinea pig aortas nor bovine carotid arteries responded to this peptide. These results suggest that there are marked differences in contractile reactivity to human urotensin II in arteries isolated from various animal species.

Received Oct. 31, 2007

Key words : human urotensin II, vessel, rat, guinea pig, porcine, bovine

緒 言

Urotensin II は、最初、魚類の神経分泌系で産生され、尾部下垂体に貯留放出されることが報告されたペプチドである¹⁾⁻³⁾。Human urotensin II (hU-II) は、血管収縮ペプチドとして知られているエンドセリン-1 と同様に強力な血管収縮作用を有し、その作用は 7 回膜貫通型受容体である GPR14 受容体を介することが報告されている⁴⁾。その他の受容体との関連について、田崎らは、ラット大動脈において、hU-II による血管収縮作用は、P₂受容体、ET_A受容体、Y₁受容体を介していないということを明らかにした⁵⁾。さらに田崎らは、ラット大動脈における hU-II による血管収縮作用について、細胞内カルシウムイオン濃度の上昇、ミオシン軽鎖のリン酸化が関与していること、protein kinase C、mitogen-activated protein kinase (MAPK) p38、extracellular signal regulated

*兵庫医科大学医学部環境予防医学講座

kinase (ERK) 1/2 の活性化が関与することを報告した⁶⁾。また、ラット大動脈における hU-II による血管収縮作用について、tyrosine kinase⁷⁾、rho-kinase^{7), 8)} の活性化が関与していることが報告されている。

このように、ラット大動脈を用いた hU-II による血管収縮作用に関するメカニズム解析については、詳細な検討がなされている。その一方で、ラット以外の他の動物種での hU-II による血管収縮作用のメカニズム解析についての報告は少ない。そこで、本研究では、hU-II による血管収縮について、動物種による反応性の差異が認められるかどうかを検討した。

材料と方法

血管収縮張力の測定

実験には、Wistar ラット (雄、体重250–300 g)、ハートレイ系モルモット (雄、体重350–400 g) を使用した。また、ブタとウシについては、屠殺場で屠殺された当日に血管組織 (ブタ冠動脈、ウシ頸動脈) を入手し、実験に使用した。ラットおよびモルモットを放血致死させた後、速やかに開胸し、胸部大動脈を摘出した。それぞれの動物について、摘出した動脈を冷却した Tyrode 液に浸し、血液を十分に洗い流した後、血管に付着した雑組織等を除去し、内皮細胞をピンセットを用いて取り除いた長さ約 2 mm のリング標本作製し、混合ガス (95% O₂ + 5% CO₂) を通気した Tyrode 液 (37±0.1°C) を満たした 2 ml の organ bath に懸垂し、その収縮張力を等尺性張力トランスデューサーを用いて測定した。灌流液の組成 (mM) は、NaCl 136.9、KCl 5.4、NaHCO₃ 23.8、MgCl₂ 1.0、Glucose 5.5、CaCl₂ 1.5、EDTA 0.1 (pH 7.4) であった。標本を organ bath に懸垂した後、約 10 mN の静止張力を負荷し、この状態で標本を約 1 時間保ち安定化させた。この間 15 分間隔で灌流液を新鮮なものと交換した。標本が安定した後、72.7 mM KCl (高濃度 K⁺) に対する収縮の大きさが一定となることを確認してから本実験を開始した。KCl による血管収縮反応の濃度反応曲線を求めたところ、72.7 mM はほぼ最大収縮反応が得られる濃度であった。なお、高濃度 K⁺ の投与は次のように行った。あらかじめ NaCl を KCl と置換した 37°C の灌流液、即ち NaCl 69.6 mM、KCl 72.7 mM を含む Tyrode 液に混合ガスを通気しておき、通常の灌流液とすみやかに交換した。本実験では、全て血管内面をピンセットで軽く擦過し内皮細胞を除去した標本を用いた。hU-II (0.01 nM–100 nM) の累積投与により血管収縮反応を計測した。高濃度 K⁺ による血管収縮反応を 100% (KCl_{max}) とし、それぞれの血管標本における hU-II による血管収縮反応の大きさを標準化した。

使用薬物

hU-II (Peptide Institute, Osaka, Japan) は蒸留水で溶解した後、生理食塩水を用いて希釈し、使用した。

統計処理法

得られたデータは、一元配置分散分析法を用いて検定を行った。それぞれの値はすべて平均値 ± 標準誤差で表示した。危険率 P < 0.05 をもって有意とした。また Prism 4 (Graph Pad Institute for Scientific Information, San Diego, CA, USA) を用いて、 $-\log EC_{50}$ の値 (pD₂ 値) を算出した。

結 果

1. ラット大動脈における hU-II の血管収縮作用

大動脈平滑筋に対して、hU-II の累積投与 (0.01 nM–100 nM) を行った。1 nM の hU-II 投与から収縮が惹起され、100 nM で収縮反応は最大に達し、その反応の大きさは KCl_{max} の $105.9 \pm 1.2\%$ ($n=4$) であった (図1)。 pD_2 値は 8.80 ± 0.03 であった (表1)。

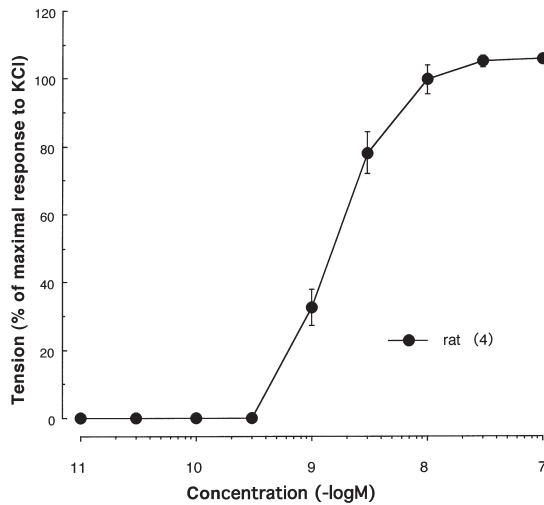


図1. ラット大動脈における human urotensin II の血管収縮作用

グラフの値は、72.7 mM KCl によるラット大動脈平滑筋の最大収縮張力を100%とし、hU-II 累積投与により生じた収縮張力を%で示した。括弧内の数字は実験に用いた動物数を示し、値は平均値±標準誤差で表した。

2. モルモット大動脈における hU-II の血管収縮作用

大動脈平滑筋に対して、hU-II の累積投与 (0.01 nM–100 nM) を行った。その結果、最大濃度である 100 nM を投与しても、収縮は惹起されなかった ($n=4$) (図2)。したがって、 pD_2 値は算出できなかった (表1)。

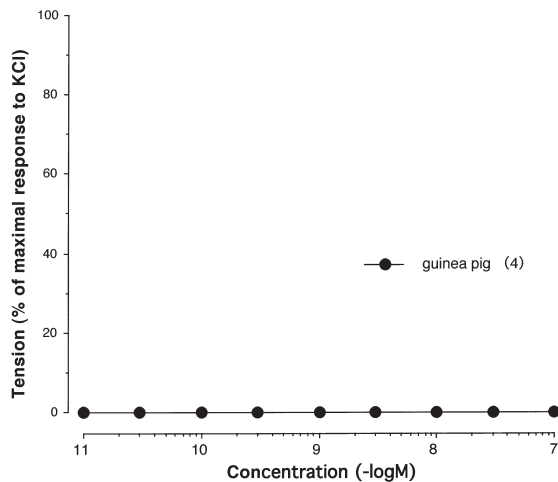


図2. モルモット大動脈における human urotensin II の血管収縮作用

グラフの値は、72.7 mM KCl によるモルモット大動脈平滑筋の最大収縮張力を100%とし、hU-II の累積投与により生じた収縮張力を%で示した。括弧内の数字は実験に用いた動物数を示し、値は平均値±標準誤差で表した。

3. ブタ冠動脈における hU-II の血管収縮作用

冠動脈平滑筋に対して、hU-II の累積投与（0.01 nM–100 nM）を行った。今回使用した最大濃度である100 nM 投与時のみ収縮が惹起され、その反応の大きさは KCl_{max} の $2.8 \pm 2.2\%$ （ $n=4$ ）であった（図3）。また、実験に用いた4例中2例では、100 nM 投与時にも収縮は惹起されなかった。そのため今回の実験結果からは、 pD_2 値は算出不可能であった（表1）。

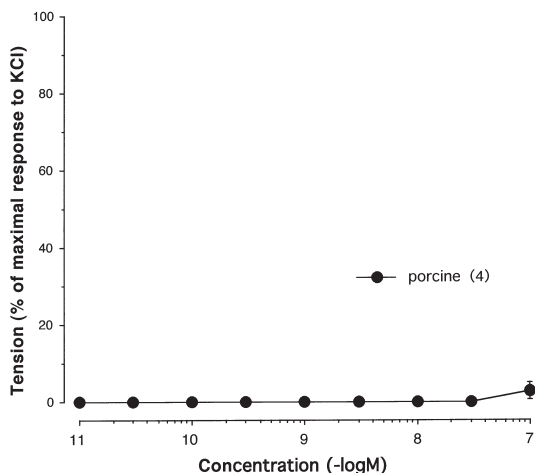


図3. ブタ冠動脈における human urotensin II の血管収縮作用

グラフの値は、72.7mM KCl によるブタ冠動脈平滑筋の最大収縮張力を100%とし、hU-II の累積投与により生じた収縮張力を%で示した。括弧内の数字は実験に用いた動物数を示し、値は平均値±標準誤差で表した。

4. ウシ頸動脈における hU-II の血管収縮作用

頸動脈平滑筋に対して、hU-II の累積投与（0.01 nM–100 nM）を行った。その結果、最大濃度である100 nM を投与しても、収縮は惹起されなかった（ $n=4$ ）（図4）。したがって、 pD_2 値は算出できなかった（表1）。

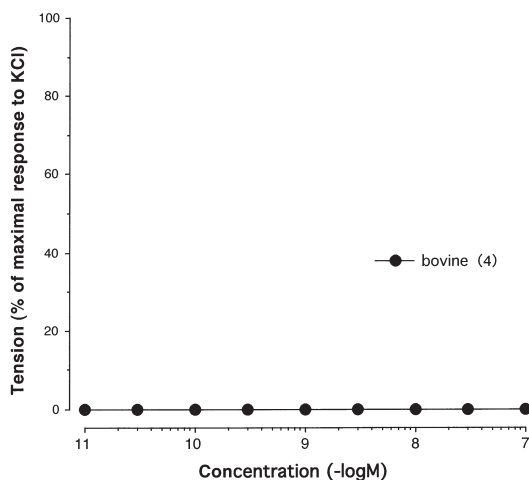


図4. ウシ頸動脈における human urotensin II の血管収縮作用

グラフの値は、72.7mM KCl によるウシ頸動脈平滑筋の最大収縮張力を100%とし、hU-II の累積投与により生じた収縮張力を%で示した。括弧内の数字は実験に用いた動物数を示し、値は平均値±標準誤差で表した。

表 1. 各動物種における human urotensin II による血管収縮の pD_2 値

動物種	血管部位	PD_2 ($-\log EC_{50}$)
ラット	大動脈	8.80 ± 0.03
モルモット	大動脈	最大濃度 100 nM で無反応
ブタ	冠動脈	算出不可能
ウシ	頸動脈	最大濃度 100 nM で無反応

pD_2 値は、各動物種における hU-II によって惹起される血管収縮の EC_{50} の対数値と -1 との積である。値は平均値 ± 標準誤差で表した。

考 察

本研究では、動物種による hU-II による血管収縮の反応性について検討した。先の報告と同様にラット大動脈においては、hU-II は強力な血管収縮作用を惹起した。その一方で、モルモットの動脈は、今回用いた最大濃度である 100 nM の濃度でも反応しなかった。これは、1 μ M の濃度でも反応しなかった Camarda らの報告と一致する⁹⁾。また、Camarda らによれば、モルモットの肺動脈も 1 μ M の濃度まで反応しないということである⁹⁾。しかしながら、モルモットの動脈において hU-II による血管収縮が惹起しない理由として、hU-II 受容体が存在しないのか、あるいは hU-II 受容体が存在していても、受容体に対する親和性が低いのか、あるいは細胞内の情報伝達経路がラット大動脈とは異なっているのか否かという点に関しては検討されていない。

次にブタの冠動脈について、本研究では、今回用いた hU-II の最大濃度 100 nM でのみ微弱な反応を認めた。しかしながら、今回の実験例数 4 例中反応したのは 2 例のみであった。過去の報告によれば、Douglas らは、最大濃度 30 nM を用いて反応しなかったと報告しているが¹⁰⁾、その一方で Camarda らは反応したと報告している⁹⁾。なお、Douglas らの報告では雄性の体重 40 kg のブタを使用し¹⁰⁾、Camarda らは 160 kg のブタを使用したと報告している⁹⁾。しかし、Douglas らの報告では、血管組織を農場から入手したため実験動物の月齢は明らかになっていない¹⁰⁾。また、本研究や Camarda らの報告では、血管組織を屠殺場から入手したため実験動物の月齢や性別は明らかになっていない⁹⁾。これらのブタの冠動脈に対する反応性の相違は、使用するブタの性差や年齢差により、血管収縮の反応性が変化することに起因することも考えられるが、詳細は今後の検討課題である。

またウシの頸動脈については、本研究では、今回用いた最大濃度である 100 nM の濃度でも反応しなかった。なおウシについては、hU-II による血管収縮に関する報告は皆無である。したがって、ウシの頸動脈において、hU-II による血管収縮が惹起しない理由として、hU-II 受容体が存在しないのか、あるいは hU-II 受容体が存在していても、受容体に対する親和性が低いのか、あるいは細胞内の情報伝達経路がラット大動脈とは異なっているのか否かという点に関しては検討されていない。

本研究により、hU-II による血管収縮の反応性は、動物種により異なっていることが明らかとなった。しかし、この理由および意義についての詳細は今後の検討課題である。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、研究環境を提供して下さった東京大学大学院農学生命科学研究科獣医薬理学教室の唐木英明名誉教授、尾崎博教授、堀正敏准教授に深謝する。

文 献

1. Bern HA, Lederis. A reference preparation for the study of active substances in the caudal neurosecretory system of teleosts. *J Endocrinol.* 1969; 45:xi-xii.
2. Berlind A. Teleost caudal neurosecretory system: release of urotensin II from isolated urophyses. *Gen Comp Endocrinol.* 1972; 18:557-560.
3. Pearson D, Shively JE, Clark BR, Geschwind II, Barkley M, Nishioka RS, Bern HA. Urotensin II: a somatostatin-like peptide in the caudal neurosecretory system of fishes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1980; 77:5021-5024.
4. Ames RS, Sarau HM, Chambers JK, Willette RN, Aiyar NV, Romanic AM, Loudon CS, Foley JJ, Sauermech CF, Coatney RW, Ao Z, Disa J, Holmes SD, Stadel JM, Martin JD, Liu WS, Glover GI, Wilson S, McNulty DE, Ellis CE, Elshourbagy NA, Shabon U, Trill JJ, Hay DWP, Ohlstein EH, Beresma DJ, Douglas SA. Human urotensin-II is a potent vasoconstrictor and agonist for the orphan receptor GPR14. *Nature.* 1999; 401:282-286.
5. 田崎勝成, 若林一郎. 摘出ラット大動脈における human urotensin II による血管収縮のメカニズム 岐阜聖徳学園大学短期大学部紀要 2005; 37:93-103.
6. Tasaki K, Hori M, Ozaki H, Karaki H, Wakabayashi I. Mechanism of human urotensin II-induced contraction in rat aorta. *J Pharmacol Sci.* 2004; 94:376-383.
7. Rossowski WJ, Cheng BL, Taylor JE, Datta R, Coy DH: Human urotensin II-induced aorta ring contractions are mediated by protein kinase C, tyrosine kinases and Rho-kinase: inhibition by somatostatin receptor antagonists. *Eur J Pharmacol.* 2002; 438:159-170.
8. Sauzeau V, Le Mellionec E, Bertoglio J, Scalbert E, Pacaud P, Loirand G. Human urotensin II-induced contraction and arterial smooth muscle cell proliferation are mediated by RhoA and Rho-kinase. *Circ Res.* 2001; 88:1102-1104.
9. Camarda V, Rizzi A, Calo G, Gendron G, Perron SI, Kostenis E, Zamboni P, Mascoli F, Regoli D. Effects of human urotensin II in isolated vessels of various species; comparison with other vasoactive agents. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2002; 365:141-149.
10. Douglas SA, Sulpizio AC, Piercy V, Sarau HM, Ames RS, Aiyar NV, Ohlstein EH, Willette RN. Differential vasoconstrictor activity of human urotensin-II in vascular tissue isolated from the rat, mouse, dog, pig, marmoset and cynomolgus monkey. *Br J Pharmacol.* 2000; 131:1262-1274.