

ラットおよびマウス腸間膜動脈血管床における血管機能調節機構の
血管薬理学的研究

藤原 弘喜

有限会社藤原薬局 〒712-8011 岡山県倉敷市連島町連島51-1

**Vascular pharmacological study on tone regulatory mechanisms of rat and mouse
mesenteric vascular beds.**

Hiroki Fujiwara

ujiwara pharmacy Inc. 2391 Urada Fukuda-cho, Kurashiki, Okayama, 712-8031, Japan

Abstract

The mesenteric vascular bed, which is located in abdominal lumen, contains much of resistance arteries and affects changes in total blood pressure. It is widely accepted that the tone of rat mesenteric arteries is maintained by neuronal function including adrenergic vasoconstrictor nerves and calcitonin gene-related peptide (CGRP) vasodilator nerves and endothelium function. The use of disease models developed genetically in mice is expected to clarify neural function of mesenteric perivascular nerves. Thus, in the first chapter, we investigated to prepare perfused mesenteric vascular beds of the mouse and analyze perivascular-mediated vascular responses to clarify perivascular neuronal function of mouse mesenteric arteries.

Mesenteric vascular beds isolated from male C57BL/6 mouse were perfused with Krebs solution and perfusion pressure was measured. Periarterial nerve stimulation (PNS, 8 – 24 Hz) induced frequency-dependent vasoconstriction, which increased flow rate-dependently. PNS-induced vasoconstriction was abolished by tetrodotoxin (neurotoxin) and guanethidine (adrenergic neuron blocker) and blunted by prazosin (α 1-adrenoceptor antagonist). Injection of norepinephrine caused vasoconstriction, which was abolished by prazosin. In preparations with active tone, PNS (1 – 8 Hz) induced frequency-dependent vasodilation, which was inhibited by tetrodotoxin, capsaicin (CGRP depletor), and CGRP8-37 (CGRP-receptor antagonist). Injections of CGRP, acetylcholine, and sodium nitroprusside induced vasodilations. Vasodilator response to CGRP was inhibited by CGRP8-37. Immunohistochemical study showed innervation of tyrosine hydroxylase- and CGRP-immunopositive fibers in mesenteric arteries and veins. In preparations with active tone in the presence of guanethidine, injections of acetylcholine, A23187, and sodium nitroprusside (SNP) caused a concentration-dependent decrease in perfusion pressure due to vasodilation. The vasodilator responses to acetylcholine and A23187, but not SNP, were abolished by endothelium dysfunction and significantly inhibited by and tetraethylammonium (K^+ -channel inhibitor). Indomethacin (cyclooxygenase inhibitor) significantly blunted only A23187-induced vasodilation, while 18 α -glycyrrhetic acid (gap-junction inhibitor) attenuated only acetylcholine-induced vasodilation. These results suggest that the preparation of male mouse mesenteric vascular beds is useful for studying neural regulation. Moreover, the endothelium in mouse mesenteric arteries regulates vascular tone by prostanoids, EDHF, and partially by nitric oxide, different from the endothelium of rat mesenteric arteries.

It is reported that chronic hyperinsulinemia included by drinking fructose elicited an abnormal neuronal regulation of vascular tone, which contributed to be development of hypertension. This study in the second chapter, to clarify the mechanism underlying the dysfunctional neuronal regulation of vascular tone in the chronic hyperinsulinemia and /or insulin resistance in Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) rats and compared with age-matched control Long-Evans Tokushima Otsuka (LETO) rats. Insulin, triglyceride, and total cholesterol levels in plasma, blood glucose concentrations, a glucose-insulin index, systolic blood pressure, and perivascular innervations were assessed using biochemical and immunohistochemical methods. Mesenteric vascular beds isolated from OLETF and LETO rats were perfused with a Krebs solution containing methoxamine, and changes in perfusion pressure in response to PNS and the perfusion of vasoactive agents were measured. OLETF rats (8 to 25 weeks old) showed age-related increases in insulin, triglycerides, total cholesterol, blood glucose, the glucose-insulin index (Homeostasis model assessment ratio (HOMA-R)) and systolic blood pressure compared with LETO rats. In perfused mesenteric vascular beds, the PNS-induced adrenergic nerve-mediated vasoconstrictor responses in OLETF rats were significantly greater than those in LETO rats, whereas the PNS-induced calcitonin gene-related peptide (CGRP) nerve-mediated vasodilator responses in OLETF rats were significantly smaller than those in LETO rats. In immunohistochemical experiments, the density of CGRP-immunopositive nerves in the mesenteric arteries of OLETF rats decreased significantly with age. These results suggest that the abnormal innervation of perivascular nerves in mesenteric resistance arteries induced by chronic hyperinsulinemia disturbs the neuronal regulation of vascular tone and may cause hypertension in OLETF rats.

At the end of chapter, I conclude that these studies are useful to analyze component of lifestyle-related disease including diabetes mellitus and hypertension, mechanisms of vascular tone, to develop new agents through applying the new method of perfusion with mouse mesenteric vascular beds to various pathological models of mouse.

Keywords: mesenteric vascular bed, calcitonin gene-related peptide, endothelium-dependent vasodilation, perivascular innervation, insulin resistance

【緒言】

腹腔に位置する腸間膜血管床は、抵抗血管を多く含む血管床であり、その血流の変化は全身血圧にも影響する。ラット腸間膜動脈の血管緊張度は、血管収縮性の交感神経だけでなく、非アドレナリン・非コリン作動性神経であるカルシトニン遺伝子関連ペプチド (calcitonin gene-related peptide; CGRP) 含有神経によっても調節されている¹。加えて、血管内皮細胞による緊張度調節も受けており、様々な機構によって血管緊張が維持されている²。

また、糖尿病や高血圧等の生活習慣病において、これらの血管緊張度調節機構に異常をきたし、高血圧の進展に寄与していることも報告されている^{3,4}。

著者は、生活習慣病の成因解明や血管緊張度調節機序の解析を目的とし、マウスおよびラット腸間膜動脈における血管周囲神経と血管内皮細胞について研究した。本論文は、その成果を二章に分けてまとめたものである。

【第一章】

マウス腸間膜動脈血管床を用いた灌流標本作製および血管周囲神経性血管反応、内皮依存性血管弛緩反応の検討

現在、マウスでは病態発現に関与する遺伝子を操作した病態モデルが確立され、それらの血管機能に

ついて病態生理学的な研究が行われているが、血圧維持に関与しない大動脈等の大血管を用いた研究のみであり、血圧の維持に重要な抵抗血管を用いた研究は少ない⁵。そこで、第一章では、マウスにおける抵抗血管緊張度調節機構の研究を可能にするために、マウス腸間膜動脈灌流標本を作製し、灌流実験の諸条件を検討した。加えて、ラットと同様に交感神経およびCGRP含有神経による神経支配が存在するか検討した。

1. 灌流速度および血管収縮反応に関する検討

最初に、灌流速度について検討した。灌流速度を1~5 mL/minに上昇させるに伴い、灌流圧が上昇し、経壁電気刺激 (PNS) による血管収縮反応が増大したが (Fig. 1B), 4 mL/min以上の流速では、灌流圧が上下に変動し不安定になった (Fig. 1A)。従って、マウス灌流実験の至適流速は3 mL/minであると判断した。また、PNSにより観察された血管収縮反応は、tetrodotoxin (神経伝達遮断薬) およびguanethidine (交感神経遮断薬), prazosin (アドレナリン α_1 受容体遮断薬) により消失したことから (Fig. 2), ラットと同様に交感神経およびアドレナリン α_1 受容体を介して発現していることが明らかとなった。

2. 血管弛緩反応に関する検討

血管弛緩反応は、あらかじめ灌流圧を上昇させた後でacetylcholine (ACh) およびsodium nitroprusside (SNP), PNS, CGRPによる弛緩反応を観察した。AChおよびSNPにより一過性の弛緩反応が、PNSおよびCGRPにより持続した弛緩反応が観察された。PNSによる弛緩反応は、tetrodotoxinおよびcapsaicin (CGRP枯渇薬), CGRP8-37 (CGRP₁受容体遮断薬) によりほぼ消失したことから (Fig. 3), 弛緩反応もラットと同様にCGRP含有神経およびCGRP₁受容体を介して発現していることが明らかとなった。

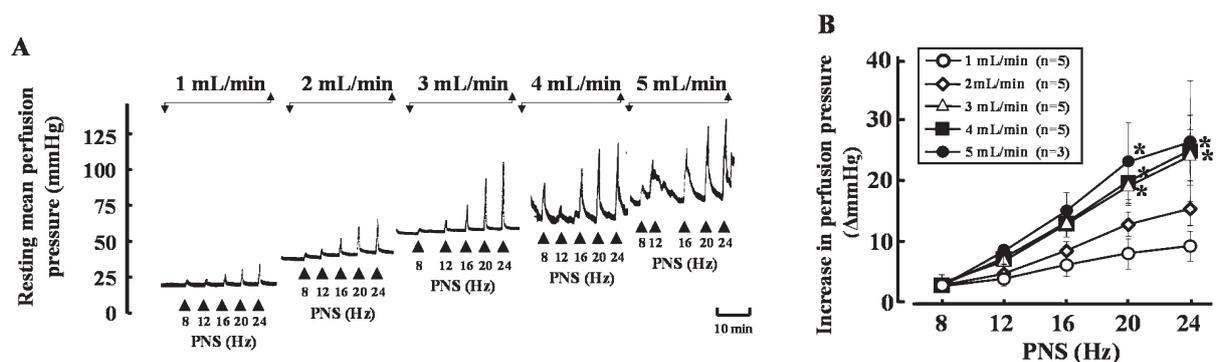


Fig. 1 Determination of optimal flow rate based on PNS-induced responses in male mouse perfused mesenteric vascular beds. A typical recording (A) showing PNS-induced vasoconstriction of a flow rate of 1 – 5 mL/min. A line graph (B) shows PNS-induced vasoconstrictor response. Each point indicates the mean \pm S.E.M. * $P < 0.05$ compared with 1 mL/min group using a two-way ANOVA and Bonferroni's multiple test.

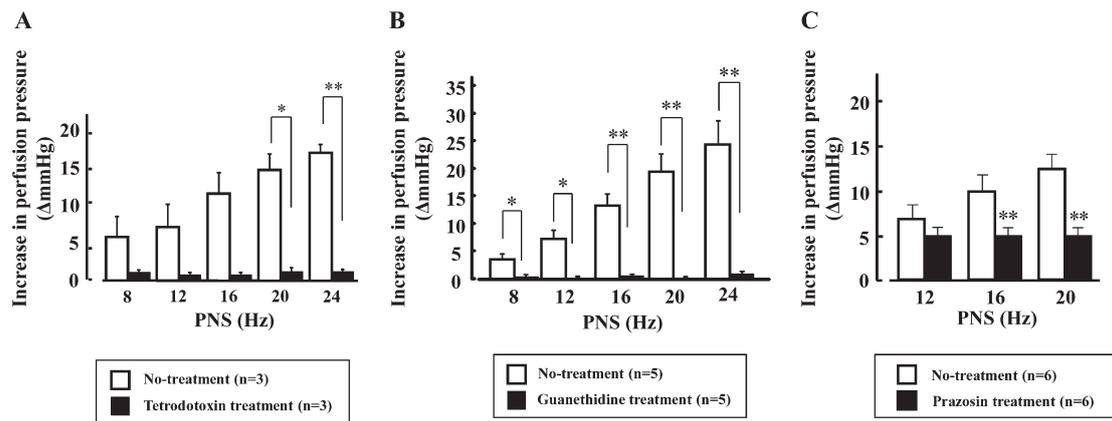


Fig. 2 Bar graphs showing the effect of tetrodotoxin ($0.5 \mu\text{M}$) (A), guanethidine ($5 \mu\text{M}$) (B) and prazosin ($5 \mu\text{M}$) (C) on vascular responses induced by periarterial nerve stimulation in male mouse perfused mesenteric vascular beds with resting tension. Each bar indicates the mean \pm S.E.M. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, compared with no treatment.

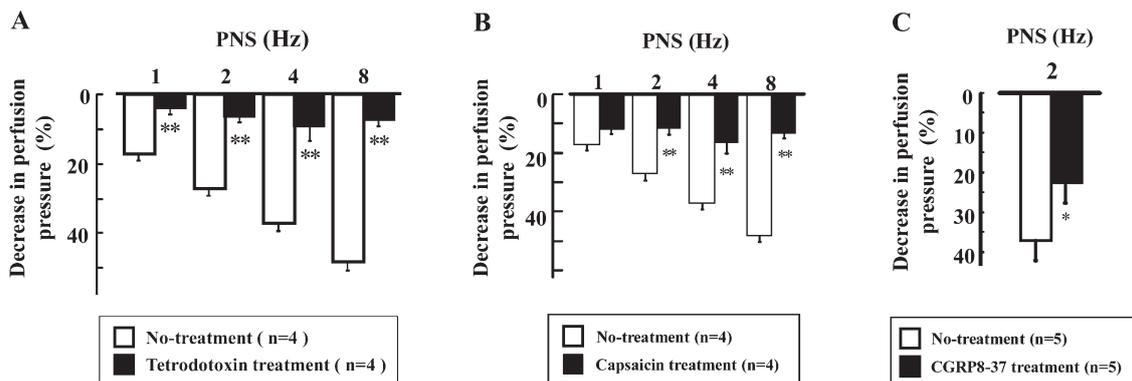


Fig. 3 Bar graphs showing effect of tetrodotoxin ($0.5 \mu\text{M}$) (A), capsaicin treatment ($10 \mu\text{M}$) (B), CGRP8-37 ($1 \mu\text{M}$) (C) on vascular responses to periarterial nerve stimulation in male mouse perfused mesenteric vascular beds with active tone. Each bar indicates the mean \pm S.E.M. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, compared with no-treatment.

3. 免疫組織化学的検討

これら両神経の分布を免疫組織化学的に検討した結果、ラット⁶と同様に交感神経に属するTH免疫陽性線維およびCGRP免疫陽性線維が血管周囲を網目状に取り巻くように外膜層に分布していることが観察された (Fig. 4)。

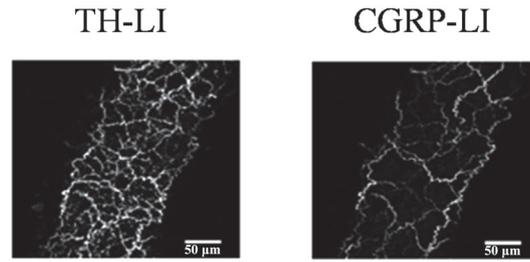


Fig. 4 Immunohistochemical images showing adrenergic tyrosine hydroxylase (TH)-like immunoreactive (LI)- and CGRPergic CGRP-LI-containing nerve fibers in male mouse mesenteric arteries. Horizontal bars indicate 50 μm .

4. 血管内皮細胞依存性弛緩反応に関する検討

一方、血管緊張度の調節はこれらの神経だけでなく、血管内皮細胞も関与しているため²、内皮依存性弛緩反応を惹起させる ACh および A23187 (Ca イオノフォア) を用いて検討した。ACh による弛緩反応は、tetraethylammonium (TEA) (K⁺チャネル阻害薬)、18 α -GA (18 α -glycyrrhetic acid) (gap-junction 阻害薬) により抑制されたことから (Fig. 5)、主に K⁺チャネルおよび gap-junction を介しており、A23187 による弛緩反応は、indomethacin および TEA により抑制されたことから (Fig. 5)、主に prostanoids および K⁺チャネルを介して生じていることが明らかとなった。

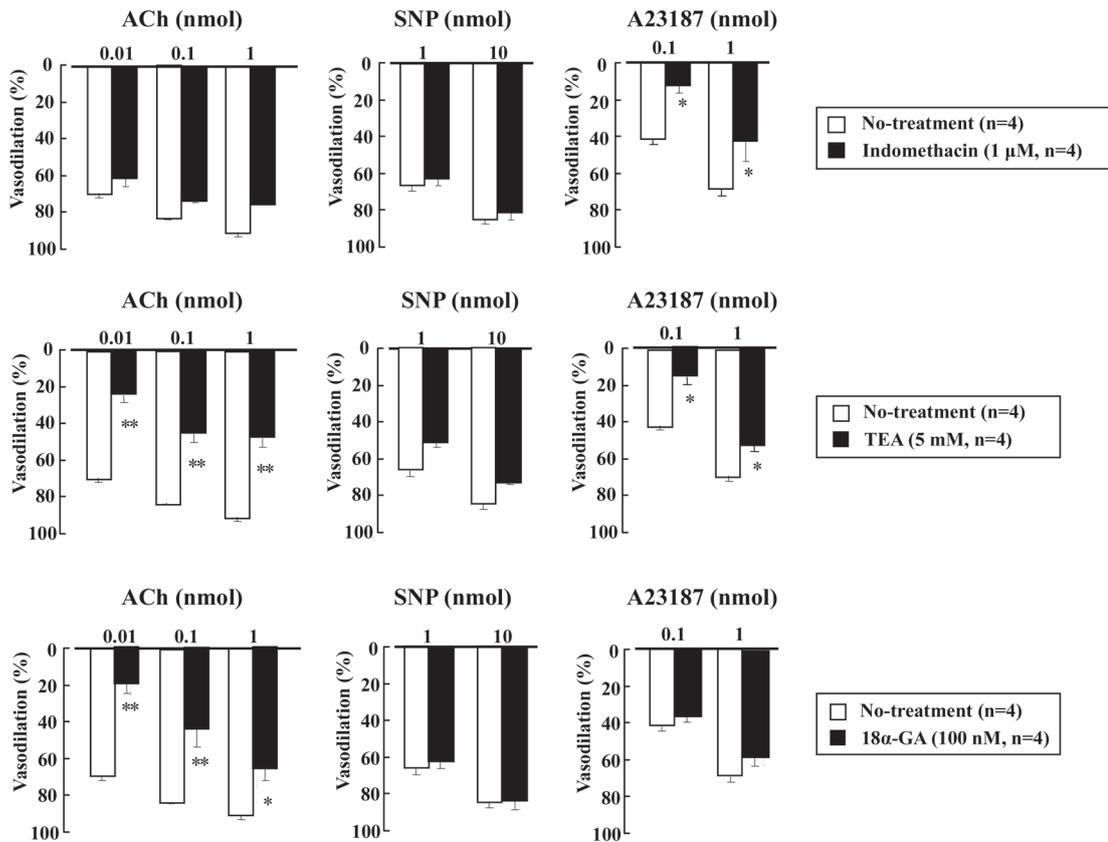


Fig. 5 Effect of the nitric oxide synthase inhibitor Indomethacin (1 μM), tetraethylammonium (TEA; 5 mM) and 18 α -glycyrrhetic acid (18 α -GA; 100 nM) on vasodilator responses to injections of acetylcholine (ACh), sodium nitroprusside (SNP) and Ca²⁺ ionophore (A23187) in mouse perfused mesenteric vascular beds with an intact endothelium and active tone. Each bar indicates the mean \pm S.E.M. * P < 0.05, ** P < 0.01, compared with the no-treatment group.

5. 小括

マウス腸間膜動脈においてもラットと同様に血管周囲神経および内皮細胞が血管緊張度調節に重要な役割を果たしていることが示唆された。

【第二章】

先天的インスリン抵抗性モデル Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) ラットの腸間膜動脈血管周囲神経と内皮細胞の機能変化

糖尿病では高血圧を併発する患者が多い事が知られている。人為的に作成した後天的インスリン抵抗性モデルであるフルクトース飲水負荷ラット (FDR) においてもインスリン抵抗性とともに高血圧を発症し、腸間膜動脈において交感神経機能の亢進, CGRP 含有神経機能の低下が起ることが報告されている^{3,4}。しかし、インスリン抵抗性 (高インスリン血症状態) に長期間暴露された場合の血管機能の変化については十分に明らかにされていない。そこで、先天的にインスリン抵抗性に続いて糖尿病を発症する Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) ラットを用いて血管周囲神経および血管内皮細胞の機能変化について検討した。

1. インスリン抵抗性および高血圧の病態進展について

OLETF ラットでは、FDR と同様にインスリン抵抗性の進展とともに高血圧が認められた (Fig. 6)。

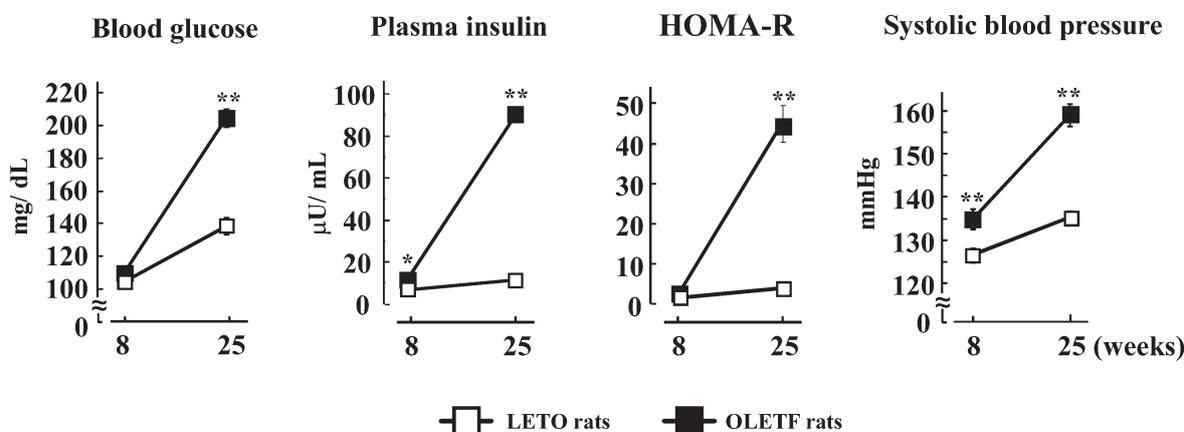


Fig. 6 Line graphs showing changes in blood glucose levels, plasma insulin levels, the glucose-insulin index, and systolic blood pressure in Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) and Long-Evans Tokushima (LETO) rats at 8 and 25 weeks of age. Each point indicates the mean \pm s.e.m. from five to seven rats. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. age-matched LETO rats.

2. 神経性および内皮依存性血管反応性の変化に関する検討

一方、腸間膜動脈灌流標本では、交感神経性血管収縮反応の増大 (Fig. 7), CGRP 含有神経性血管弛緩反応の低下 (Fig. 8), 血管内皮依存性弛緩反応の低下 (Fig. 9) が観察された。

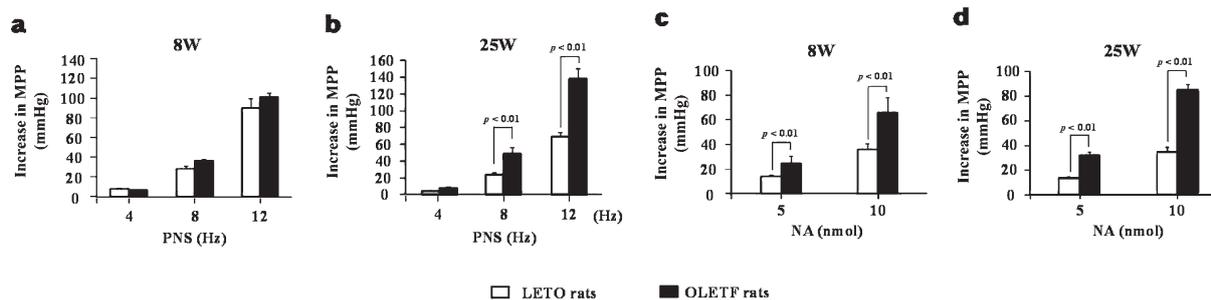


Fig. 7 Vasoconstrictor responses to perivascular nerve stimulation (PNS) (a and b; 4-12 Hz) and injections of noradrenaline (NA) (c and d; 5 and 10 nmol) in perfused mesenteric vascular beds isolated from Long-Evans Tokushima Otsuka (LETO) and Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) rats at 8 (8w; A and C) and 25 (25w; B and D) weeks of age. Open and closed bars indicate LETO rats and OLETF rats, respectively. Each bar indicates the mean \pm s.e.m. for four to five experiments. MPP, mean perfusion pressure.

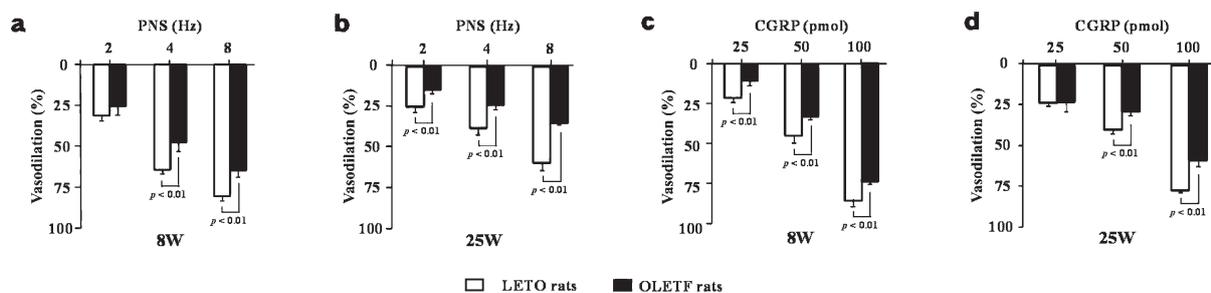


Fig. 8 Vasodilator responses to perivascular nerve stimulation (PNS) (a and b; 2-8 Hz) and injections of calcitonin gene-related peptide (CGRP) (c and d; 25-100 pmol) in perfused mesenteric vascular beds isolated from Long-Evans Tokushima Otsuka (LETO) and Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) rats at 8 (8w; A and C) and 25 (25w; B and D) weeks of age. Open and closed bars indicate LETO rats and OLETF rats, respectively. Each bar indicates the mean \pm s.e.m. for four to five experiments.

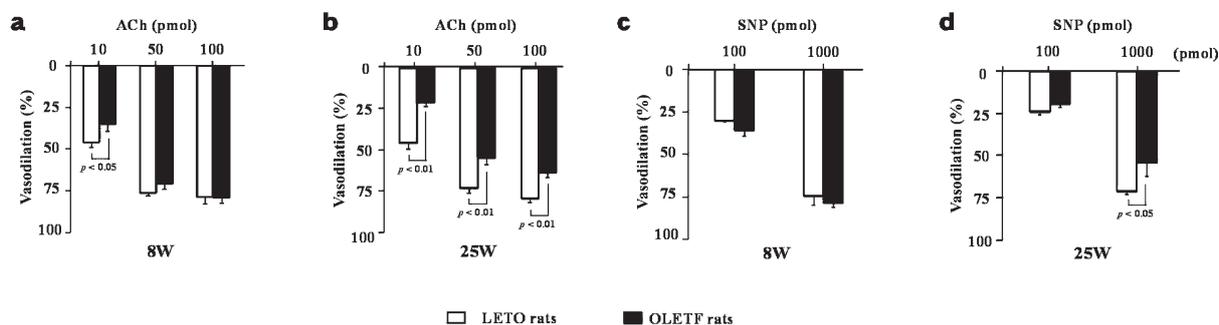


Fig. 9 Bar graphs showing vasodilator responses to injections of acetylcholine (ACh) (a and b; 10-100 pmol) and sodium nitroprusside (SNP) (c and d; 100 and 1000 pmol) in perfused mesenteric vascular beds isolated from Long-Evans Tokushima Otsuka (LETO) and Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) rats at 8 (8w) and 25 (25w) weeks of age. Open and closed bars indicate LETO rats and OLETF rats, respectively. Each bar indicates the mean \pm s.e.m. for four to five experiments.

3. 免疫組織化学的検討

血管周囲神経の免疫組織化学的検討では、交感神経の分布に変化はみられず (Fig. 10), CGRP含有神経の分布においてのみ減少が認められた (Fig. 11)。

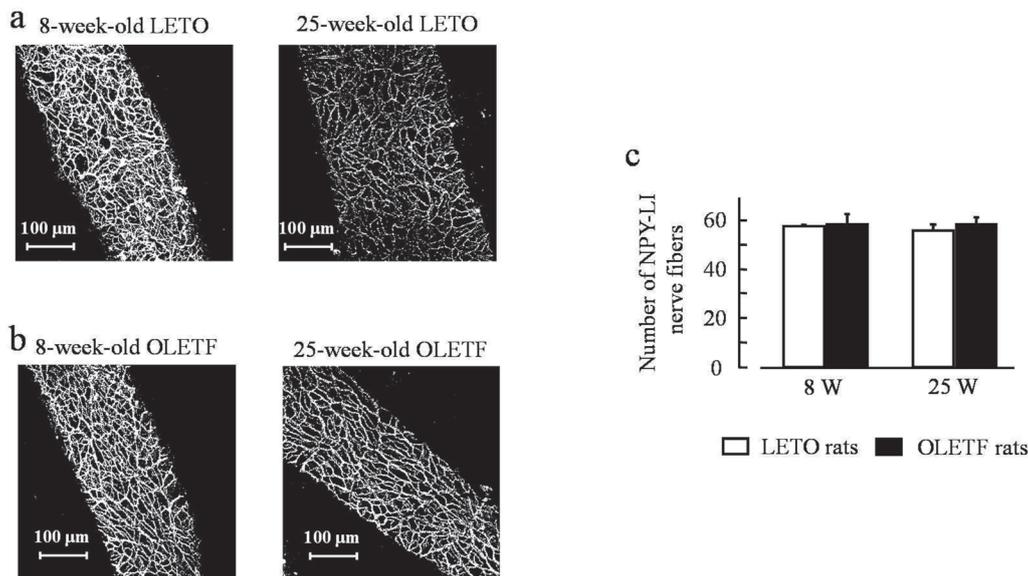


Fig. 10 Typical images (a and b) and bar graph showing number (c) of neuropeptide Y (NPY)-like immunoreactivity (LI)-containing nerve fibers in small mesenteric arteries isolated from Long-Evans Tokushima Otsuka (LETO) rats and Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) rats at 8 (8W) and 25 (25W) weeks of age. The scale bar = 100 μm in the left lower corner of each image. Each bar indicates the mean ± s.e.m. for five experiments.

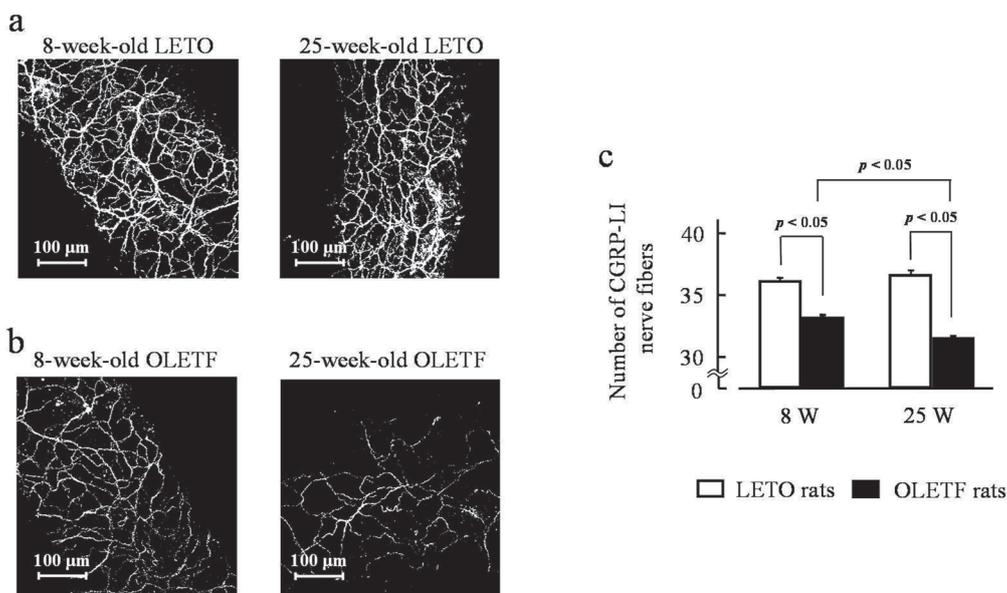


Fig. 11 Typical images (a and b) and bar graph showing number (c) of calcitonin gene-related peptide (CGRP)-like immunoreactivity (L)-containing nerve fibers in small mesenteric arteries isolated from Long-Evans Tokushima Otsuka (LETO) rats and Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) rats at 8 (8W) and 25 (25W) weeks of age. The scale bar = 100 μm in the left lower corner of each image. Each bar indicates the mean ± s.e.m. for five experiments.

4. 小括

これらの結果から、インスリン抵抗病態下では、CGRP含有神経機能が減弱するために、相対的に交感神経機能が亢進し、さらには血管内皮機能が減弱することで高血圧の進展に寄与しており、FDFと同様に血管緊張度調節機構に異常が生じていることが明らかとなった。

【総括】

本研究の成果は、生体内でも大きな血管床であり全身血圧にも影響を与える腸間膜動脈を用いて、遺伝子改変にて病態モデルを作成しやすいマウスでも同様な灌流標本を作成することが可能であることを明らかにした。さらに、血管周囲神経の機能を評価するにあたり最適な灌流速度および経壁電気刺激の諸条件を設定して、評価系の確立に貢献したものである。そして、マウス腸間膜動脈においても血管収縮性の交感神経と血管拡張性のCGRP含有神経が密に分布し、また、血管内皮細胞からNOやprostanoids、K⁺ channelやgap-junctionを介するEDHFが産生され、様々な因子が血管緊張度調節に重要な役割を果たしていることを明らかにした。さらに、インスリン抵抗性およびそれに伴う高インスリン血症では、高血圧が進展し、その背景には交感神経機能の亢進あるいはCGRP含有神経機能の低下、血管内皮機能の低下が生じることをラット腸間膜動脈灌流標本において示唆したものである。今後も様々な病態モデルマウスを用いることで、より多くの疾患の解析や血管緊張度調節のメカニズムの解析に役立つと考えられる。

【参考文献】

- 1 Kawasaki H, Takasaki K, Saito A, Goto K. Calcitonin gene-related peptide acts as a novel vasodilator neurotransmitter in mesenteric resistance vessels of the rat. *Nature*. 1988; 335: 164–167.
- 2 Jin X, Satoh-Otonashi Y, Zamami Y, Takatori S, Hashikawa-Hobara N, *et al*. New molecular mechanisms for cardiovascular disease: contribution of endothelium-derived hyperpolarizing factor in the regulation of vasoconstriction in peripheral resistance arteries. *J Pharmacol Sci*. 2011; 116: 332–336.
- 3 Takatori S, Zamami Y, Mio M, Kurosaki Y, Kawasaki H. Chronic hyperinsulinemia enhances adrenergic vasoconstriction and decreases calcitonin gene-related peptide-containing nerve-mediated vasodilation in pithed rats. *Hypertens Res*. 2006; 29: 361–368.
- 4 Takatori S, Zamami Y, Yabumae N, Hanafusa N, Mio M, *et al*. Pioglitazone opposes neurogenic vascular dysfunction associated with chronic hyperinsulinaemia. *Br J Pharmacol*. 2008; 153: 1388–1398.
- 5 Matoba T, Shimokawa H, Nakashima M, Hirakawa Y, Mukai Y, *et al*. Hydrogen peroxide is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in mice. *J Clin Invest*. 2000; 106: 1521–1530.
- 6 Hobara N, Goda M, Kitamura Y, Takayama F, Kawasaki H. Innervation and functional changes in mesenteric perivascular calcitonin gene-related peptide and neuropeptideY-containing nerves following topical phenol treatment. *Neuroscience*. 2006; 141: 1087–1099.