

平成 21 年 3 月 23 日現在

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2006～2008  
 課題番号：18590250  
 研究課題名（和文）内皮由来過分極因子（EDHF）の負の制御因子は一酸化窒素（NO）である  
 研究課題名（英文）Nitric oxide (NO) negatively regulates endothelium-derived hyperporizing factor (EDHF)  
 研究代表者  
 籠田 智美 (KAGOTA SATOMI)  
 武庫川女子大学・薬学部・講師  
 研究者番号：00291807

研究成果の概要：酸素や栄養を運搬する血液が流れている導管「動脈」のしなやかな動きは、からだを正常に保つために重要です。このような動脈の動きは、動脈を構成する細胞である「内皮細胞」が作り出す様々な物質によって調節されています。この研究では、そのような物質の中から2種類（一酸化窒素 NO および内皮由来過分極因子 EDHF）に着目し、お互いどのように調節しあっているのかについて調べました。その結果、NO が大量に存在する時には EDHF を抑制する機構が存在することをみいだしました。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,000,000	0	1,000,000
2007年度	700,000	210,000	910,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	2,700,000	510,000	3,210,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・薬理学一般

キーワード：内皮由来過分極因子，一酸化窒素，内皮依存性弛緩反応

## 1. 研究開始当初の背景

内皮由来過分極因子(EDHF)は、一酸化窒素(NO)と同様に、血管内皮細胞より産生され平滑筋細胞を拡張させる因子として発見された(Nagao & Vanhoutte, Am J Respir Cell Mol Biol, 1993, 8, 1-6)。現在までに以下の2点については大筋で賛同が得ら

れている。

(1) 細い動脈ほどNOよりもEDHFが血管拡張機能に深く寄与している(Garland et al., Trends Pharmacol Sci, 1995, 16, 23-30)

(2) EDHFは血管平滑筋細胞膜の過分極を起し血管を拡張させる、過分極の発生には

Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup>チャネルの開口が関与する (Busse et al., Trends Pharmacol Sci, 2002, 23, 374-80)

しかし、いまだ、EDHFの本体やその血管拡張作用機序、EDHFの産生調節機構について一定した見解は得られていない。従来、EDHFを研究するために用いられてきた方法は、EDHFによる平滑筋細胞膜の電位変化と拡張反応を個々に観察するものであった。しかし我々は、共焦点蛍光顕微鏡を用いることにより、血管平滑筋細胞の膜電位変化をリアルタイムに検出・可視化することに成功し、「膜電位変化を測定すると同時に血管平滑筋の弛緩反応を測定する」という新しい方法を確立している(平成16-17年度科学研究補助金、基盤C一般16590210)。

## 2. 研究の目的

上記研究背景より、全体構想を「我々が確立した新しい手法を用いて、EDHFの本体、血管拡張作用機構の詳細、EDHFの産生調節機構について明らかにする」こととし、本研究ではこのうち「EDHF産生調節機構」を明らかにすることを第一の目標とした。さらに、近年、インスリン抵抗性を基盤としたメタボリックシンドロームが注目されており、この病態は動脈硬化性疾患を高頻度に発症することから、有効な薬物治療の開発が急務とされている。現在我々は、2種のメタボリックシンドロームモデルラットを保持しており、その血管拡張機能変化について検討を開始している。本研究において、この貴重なモデル動物を用いて、EDHF産生の変化、それに対する薬物治療の効果を検討することを第二の目標とした。細動脈の緊張性調節におけるEDHFの役割はNOに比べより重要であるとされていることから、末梢循環機能障害を特徴とする動脈硬化性

疾患を知るうえで、EDHFの存在意義についての研究は重要であると考える。

本研究の具体的な目的は以下の点である。

(1) 血管拡張機能が正常な状態では、EDHF産生はNOによりnegative regulationを受けているのではないかと受けているのであればその機構はどのようなものか？

(2) 動脈硬化の発症率が著しく高いメタボリックシンドローム病態時には、血管拡張機能障害が生じていることが予想される。このような状態では、NOによるEDHF産生調節機構は破綻しているか否か？どのような薬物が血管拡張障害に対し有効であるか？

## 3. 研究の方法

### (1) 動脈標本の作成

Wistar系雄性ラット、メタボリックシンドロームモデルラット (SHR. Cg-*Lepr*<sup>cp</sup>/NDmcr ラットおよび SHRSP. Z-*Lepr*<sup>fa</sup>/IzmDmcr ラット) またはその正常対象動物(WKY/Izm)より、腸間膜動脈を摘出し、周辺組織を取り除く。各動脈より観察用窓を開けた輪切り標本作製し、各標本をチャンバーに固定する。

### (2) 膜電位変化および血管弛緩反応の測定

標本を膜電位感受性色素 DiBAC<sub>4</sub>(3)でロードする(温度による影響をうけやすいので注意する)。標本を倒立顕微鏡にセットする。標本をあらかじめフェニレフリンを添加することにより収縮させた後、アセチルコリンを添加しEDHFを産生させる。アセチルコリン添加前後の平滑筋細胞の膜電位変化を共焦点レーザー顕微鏡により検出し、画像解析ソフトを用いて解析する。また、アセチルコリン添加前後の共焦点顕微鏡像または微分干渉顕微鏡により標本像を検出し、画像解析ソフトにより血管径を測定する。NOのEDHFに対する効果を検討するため、NOの産生・作用を抑制する目的でNO産生酵素阻害薬や可溶性グアニル酸シクラーゼ阻害薬を前処置、

また、NOを過剰に作用させる目的でニトロプルシドナトリウムを前処置した後、アセチルコリン添加し、NOを増加または低下させたことにより生じる影響を検討した。

#### 4. 研究成果

(1) 血管拡張機能が正常な状態では、EDHF産生はNOによりnegative regulationを受けているのではないか？ 受けているのであればその機構はどのようなものか？（平成20年度）

実験には、Wistar系雄性ラットを用い、麻酔下に腸間膜動脈第3枝を摘出し、観察用窓を開けたリング状標本作製した。動脈に過剰のNOを作用させる目的でニトロプルシドナトリウム(SNP)を、また、NOの産生または作用を抑制する目的で、NO合成酵素阻害薬であるL-ニトロアルギニンメチルエステル(LNAME)または可溶性グアニル酸シクラーゼ阻害薬であるODQを、それぞれ標本に前処置し、正常動脈におけるEDHFにより生じる膜電位変化に及ぼすNOの影響を検討した。その結果、アセチルコリンにより生じる過分極反応の程度は、SNPを前処置した標本においては抑制されるが、LNAMEおよびODQの前処置によっては影響をされないことをみいだした。このことは、過剰のNOはEDHFの産生または作用を抑制的に調節するが、その抑制機構にcGMPは関与していないことを示唆するものである。一方、NOの産生やその作用が低下した場合は、NOによるEDHFの促進的調節機構が存在する可能性は低いと思われる。

(2) メタボリックシンドローム病態時には、NOによるEDHF産生調節機構は破綻しているか否か？ どのような薬物が血管拡張障害に対し有効であるか？（平成18年度および19年度）

実験にはSHR.Cg-*Lep<sup>cp</sup>*/NDmcr (SHR-cp)お

よびSHRSP.Z-*Lep<sup>fa</sup>*/IzmDmcrラット(SHRSPZF)を用いた。これらの動物は、自然発症高血圧ラットに肥満遺伝子*cp*または*fa*が発現したラットで、高血圧と肥満を自然発症するのに加え、高トリグリセリド血症、高コレステロール血症、高インスリン血症などを併発する、メタボリックシンドロームのモデルラットである。このような病態モデルを用いて、メタボリックシンドローム発症時における腸間膜動脈における内皮依存性弛緩反応の変化、すなわち、NOおよびEDHFを介した弛緩反応の変化を、マグヌス法および本研究で新たに用いる膜電位感受性色素を用いたEDHF依存性過分極反応測定法により測定し、正常動物のそれと比較検討した。その結果、SHR-cpおよびSHRSPZFともに、メタボリックシンドローム発症時には、腸間膜動脈における内皮依存性弛緩反応が減弱すること、その機序として、平滑筋におけるNOに対する反応性の低下と、EDHFを介した弛緩反応の減弱（弛緩反応性の低下および膜電位変化の低下）が関与することが明らかとなった。すなわち、メタボリックシンドロームのような重篤な病態時には、NOおよびEDHFともにその機能が低下しており、お互いを補足しあうための調節機構が破綻していると考えられた（平成18年度）。

そこで次に、薬物治療を行うことによりこのような調節機構の破綻が改善されるか否かを検討した。治療薬として、臨床で汎用される治療効果の異なる3種の薬剤を選択した。すなわち、カルシウム拮抗薬、アンジオテンシンII受容体拮抗薬およびインスリン抵抗性改善薬を、SHR-cpラットまたはSHRSPZFラットに1日1回2ヶ月間経口投与した。薬物処置後、各動物より腸間膜動脈を摘出し、NOおよびEDHFを介する内皮依存性弛緩反応性を検討した。その結果、SHR-cpラッ

トおよびSHRSPZFラットのいずれのメタボリックシンドロームモデルラットを用いた場合においても、アンギオテンシII受容体拮抗薬の処置によってのみ、血管弛緩反応の減弱が改善された。また、内皮依存性血管拡張反応に寄与するNOおよびEDHFの割合においては、アンギオテンシII受容体拮抗薬投与により正常動物WKYに匹敵する程度にまで改善されることが明らかとなり、補足調節機構の回復が認められた。以上の結果、メタボリックシンドローム発症時に生じる血管拡張機能障害の予防・改善に対し、アンギオテンシII受容体拮抗薬の処置が効果的であることが示された（平成19年度）。

#### 5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計 10 件）

1. Kagota S, Tada Y, Nejime N, Nakamura N, Kunitomo M, Shinozuka K. Chronic production of peroxynitrite in the vascular wall impairs vasorelaxation function in SHR/NDmcr-cp rats, an animal model of metabolic syndrome. *J Pharmacol Sci*, in press(査読あり)
2. Kunitomo M, Yamaguchi Y, Kagota S, Otsubo K. Beneficial effect of coenzyme Q10 on increased oxidative and nitrative stress and inflammation and individual metabolic components developing in a rat model of metabolic syndrome. *J Pharmacol Sci*, 107: 128-137 (2008) (査読あり)
3. Kagota S, Tada Y, Kubota Y, Nejime N, Yamaguchi Y, Nakamura K, Kunitomo M, Shinozuka K. Peroxynitrite is involved in the dysfunction of vasorelaxation in SHR/NDmcr-cp rats, spontaneously hypertensive obese rats. *J Cardiovasc Pharmacol*, 50: 677-685 (2007) (査読あり)
4. Yamaguchi Y, Yoshikawa N, Nagase M, Kagota S, Haginaka J, Nakamura K, Kunitomo M. Increased systemic oxidative and nitrative stress in a new congenic model of metabolic syndrome derived from stroke-prone spontaneously hypertensive rats and Zucker fatty rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 34: S26-8 (2007) (査読あり)
5. Kagota S, Tada Y, Yamaguchi Y, Kubota Y, Nejime N, Nakamura K, Kunitomo M, Shinozuka K. Abnormalities of nitric oxide-mediated vasorelaxations in a rat model of metabolic syndrome: Involvement of peroxynitrite formation. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 34: S23-5 (2007) (査読あり)
6. Kagota S, Kubota Y, Nejime N, Nakamura K, Kunitomo M, Shinozuka K. Impaired effect of salt loading on nitric oxide-mediated relaxation in aortas from stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 34: 48-54 (2007) (査読あり)
7. Yamaguchi Y, Kagota S, Nakamura K, Haginaka J, Kunitomo M. Elevated circulating levels of markers of oxidative-nitrative stress and inflammation in a genetic rat model of metabolic syndrome. *Nitric Oxide*, 15: 380-6 (2006) (査読あり)
8. Kagota S, Yamaguchi Y, Tanaka N, Kubota Y, Kobayashi K, Nejime N, Nakamura K, Kunitomo M, Shinozuka K. Disturbances in nitric oxide/cyclic guanosine monophosphate system in SHR/NDmcr-cp rats, a model of metabolic syndrome. *Life Sci*,

78: 1187-96 (2006) (査読あり)

9. Kubota Y, Tanaka N, Kagota S, Nakamura K, Kunitomo M, Umegaki K, Shinozuka K. Effects of Ginkgo biloba Extract Feeding on Salt-Induced Hypertensive Dahl Rats. Biol Pharm Bull, 29: 266-9 (2006) (査読あり)

10. Kubota Y, Tanaka N, Kagota S, Nakamura K, Kunitomo M, Umegaki K, Shinozuka K. Effects of Ginkgo biloba extract on blood pressure and vascular endothelial response by acetylcholine in spontaneously hypertensive rats. J Pharm Pharmacol, 58: 243-9 (2006) (査読あり)

[学会発表] (計 18 件)

1. 籠田智美ら. 血管壁で慢性的に産生されるパーオキシナイトライトがメタボリックシンドロームラットの血管拡張機能障害に関与する, 第 82 回日本薬理学会年会 (2009. 3. 17, 横浜)

2. 籠田智美ら. メタボリックシンドロームラット SHRSP. *Z-Lepr<sup>fa</sup>/IzmDmcr* の冠状動脈および腸間膜動脈の拡張機能とアンジオテンシン II 受容体拮抗薬の効果, 第 44 回高血圧関連疾患モデル学会 (2008. 11. 21-22, 島根)

3. Kagota S, et al. Angiotensin II is critical in the development of abnormal vasorelaxation in SHRSP. ZF rats, an animal model of metabolic syndrome. 13<sup>th</sup> International SHR symposium (2008. 6. 20-22, Prague)

4. Tada Y, et al. Depressed cardiac function in SHR/NDmcr-cp rats, an animal model of metabolic syndrome. Hypertension 2008 (2008. 6. 18, Berlin)

5. Kagota S, et al. Angiotensin II type 1 receptor and antagonist ameliorates

abnormal vasorelaxation in SHRSP. ZF rats, a new animal model of metabolic syndrome. Hypertension 2008 (2008. 6. 17, Berlin)

6. 籠田智美ら. AT1 受容体拮抗薬は新規メタボリックシンドロームラット SHRSP. *Z-Lepr<sup>fa</sup>/IzmDmcr* の血管弛緩機能障害を予防する. 第 81 回日本薬理学会年会 (2008. 3. 18, 横浜)

7. Kunitomo M, et al. Coenzyme Q10 attenuates increases in oxidative stress, inflammation, insulin resistance, and blood pressure developing in metabolic syndrome model rats. 第 5 回国際コエンザイム Q10 カンファレンス (2007. 11. 9-12, 神戸)

8. 國友勝ら. メタボリックシンドロームの抗酸化ストレス治療戦略 (2007. 9. 13, 金沢)

9. 籠田智美ら. メタボリックシンドロームラット SHRSP. *Z-Lepr<sup>fa</sup>/IzmDmcr* の血管弛緩反応の減弱とアンジオテンシン II 受容体拮抗薬による改善効果, 生理機能と創薬シンポジウム (2007. 9. 13, 金沢)

10. Tada Y, et al. Changes in cardiac chronotropic and inotropic responses to beta and muscarinic receptor agonists in SHR/NDmcr-cp rats, an animal model of metabolic syndrome. 第 5 回国際受容体・シグナリング・薬物作用シンポジウム (2007. 5. 10-11, 静岡)

11. 籠田智美ら. 生活習慣病モデルラット腸間膜動脈における血管弛緩反応の減弱とテルミサルタンによる改善効果, 第 80 回日本薬理学会年会 (2007. 3. 14, 名古屋)

12. 籠田智美ら. 新規メタボリックシンドロームモデルラットの腸間膜動脈における血管弛緩反応性, 第 36 回心血管作動物質学会 (2007 年 2 月 9 日, 徳島)

13. Kagota S, et al. Vascular endothelial

dysfunction in metabolic syndrome. 2<sup>nd</sup> International Symposium on Lifestyle Related Diseases (2006. 10. 22, Nishinomiya)

14. Yamaguchi Y, et al. Changes in oxidative-nitrative stress in a new animal model of metabolic syndrome, SHR/SPZF rats. 2<sup>nd</sup> International Symposium on Lifestyle Related Diseases (2006. 10. 22, Nishinomiya)

15. Kagota S, et al. Abnormalities of nitric oxide-mediated vasorelaxations in a rat model of metabolic syndrome: Involvement of peroxynitrite formation. 2<sup>nd</sup> International Symposium on Lifestyle Related Diseases (2006. 10. 22, Nishinomiya)

16. Kagota S, et al. Peroxynitrite formation is involved in vascular endothelial dysfunction in a rat model of metabolic syndrome. 21<sup>st</sup> Scientific meeting of the international society of hypertension. (2006.10.19, Fukuoka)

17. Kagota S, et al. Mechanisms for abnormalities of nitric oxide-mediated vasorelaxations in SHR/NDmcr-cp (cp/cp) rats, an animal model of metabolic syndrome. 15<sup>th</sup> World Congress of Pharmacology (2006.7.2, Beijing, China)

18. 籠田智美ら. テルミサルタンはメタボリックシンドロームモデルラット腸間膜動脈の弛緩反応低下を改善する, 第6回日本NO学会 (2006.5.25, 東京)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

籠田 智美 (KAGOTA SATOMI)  
武庫川女子大学・薬学部・講師  
研究者番号: 00291807

(2) 研究分担者  
なし

(3) 連携研究者  
なし