

平成 21年 5 月 27日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19590250

研究課題名 (和文) 心血管系組織における活性酸素依存性細胞内情報伝達に関わる一酸化窒素の役割

研究課題名 (英文) Role of nitric oxide in reactive oxygen species-dependent intracellular signal transduction in cardiovascular tissue

研究代表者

木村 正司 (KIMURA SHOJI)

香川大学・医学部・准教授

研究者番号：30253264

研究成果の概要：

神経型一酸化窒素合成酵素 (NOS) 由来NOは、平常時にはラジカルスカベンジャーとして心血管MAPキナーゼ活性化には抑制的に働いている。一方でアンジオテンシンII暴露時には、NADPHオキシダーゼが関わる活性酸素産生系を強力に誘導されることから、神経型NOS由来NOとの反応によりperoxynitriteの産生増強が起り、これが逆に心血管MAPキナーゼの酸化ストレス依存性の活性化を引き起こしていた。これら成果から、心血管系酸化ストレスに及ぼす神経型NOSの相反する2面性が判明した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：循環薬理学・高血圧

科研費の分科・細目：薬理学一般

キーワード：高血圧・酸化ストレス・一酸化窒素合成酵素・アンジオテンシン・活性酸素

1. 研究開始当初の背景

様々な疾病の発症・維持進展に関わる活性酸素の役割が益々重要視されている。心筋・血管組織のリモデリングや高血圧症などの病態発症進展には、組織での酸化ストレス状態が深く関わり、その評価は治療上の指標としても有用であることが示されている。報告者は、循環器領域において高血圧症・心不全など様々な疾患に関連するアンジオテンシン II (AngII) の血管・心臓へ

の作用で、その細胞内シグナリングで重要な位置を占める mitogen-activated protein kinase (MAPK) ファミリー (ERK, p38, JNK) の活性化機序に NAD(P)H オキシダーゼのみならず、ミトコンドリア由来の活性酸素が互いに連携して関係することを提唱してきた。さらに一方で、活性酸素依存性の細胞内シグナル伝達に一酸化窒素 (NO) の存在が大きく関わることが示されるようになった。

2. 研究の目的

循環不全病態では、交感神経系やレニン・アンジオテンシン系の亢進が組織リモデリング惹起する要因となり、これに対して NO 系は組織保護的に働くという構図が一般的に受け入れられている。しかしながら、MAPK 活性化についてはパーオキシナイトライド (ONOO⁻) が刺激するなど細胞・組織障害に関わるシグナル伝達機構には NO の相反する二面性が考えられる。本研究の目的は、急性あるいは慢性循環負荷時の心血管系組織における活性酸素依存性細胞内シグナル伝達機構に関わる NO (特に nNOS 由来) の働きを詳細に検討解明し、高血圧あるいは心不全病態に関わる NO の役割に新たな意義を与えることにある。

3. 研究の方法

(1) 培養血管平滑筋細胞 (VSMC)

VSMC は、雄性 Sprague-Dawley ラット、C57/BL マウス及び nNOS 遺伝子欠損 (nNOS^{-/-}) マウスの胸部大動脈からエクспラント法によって培養系を分離確立する。

① MAPK 活性化

得られた VSMC を用いて AngII 刺激による MAPK ファミリーの活性酸素依存性リン酸化に与える NO の影響を検討するために、L-NAME, L-NA, L-MMA の各種 NOS 阻害薬、nNOS 特異的阻害薬 (v-NIO)、あるいは活性酸素消去薬 (tempol) さらに peroxynitrite スカベンジャー (MnTBAP) などの前処置による効果を MAPK リン酸化体特異的抗体を用いたウェスタン法により評価する。

② 活性酸素産生

カバーガラス上に VSMC を接着させ、共焦点レーザー顕微鏡を以って DHE による活性酸素産生評価を加える。

(2) 生体胸部大動脈及び心筋

ラット及びマウスに浸透圧ポンプによって昇圧量の AngII を 2 週間持続皮下投与し、心臓および胸部血管の MAPK リン酸化および酸化ストレスを比較検討する。また急性実験系として、大腿動静脈にポリエチレンカテーテルを留置し、意識下で昇圧量の AngII を静脈内投与し、30 分後に胸部大動脈と左室心筋を摘出する。得られた血漿や臓器組織の活性酸素産生を DHE 染色あるいは TBARS 法によって比較評価する。

4. 研究成果

(1) ラット生体及び (2) ラット血管平滑筋細胞 (RVSMC) を対象として一酸化窒素 (NO)

合成阻害薬を用いることで、循環負荷時の心血管系組織における活性酸素依存性細胞内シグナル伝達機構に関わる NO の働きを検討した。

(1) ラット生体を用いた急性及び慢性実験

昇圧量の LNAME を急性静脈内投与すると、大動脈における ERK1/2、p38、JNK などの MAP キナーゼファミリーの活性化を認めた。またこれらは、AngII による急性投与による MAPK 活性化に見られるような活性酸素依存性は高度ではなかった。一方で、LNAME を 1 週間飲水させたラット大動脈では MAPK リン酸化は正常に復すが、AngII によって見られる活性化はほぼ完全に抑制されていた。これらのことから、NO は血管における活性酸素依存性 MAPK 活性化に対して二面性効果を有していることが分かった。重要な知見は、NO は活性酸素を消去することで活性酸素依存性の細胞内シグナル伝達を抑制的に調整するだけでなく、活性酸素依存性シグナル伝達そのものに組み込まれている可能性を示唆するものである。

(2) RVSMC を用いた AngII による MAPK 活性化経路

さらに詳細に NO の活性酸素依存性細胞内シグナル伝達への関わりを検討するために、RVSMC で異なる 3 種の一酸化窒素合成酵素 (NOS) 阻害薬 (LNAME, LNNA, LNA) の前処置によって、用量依存性に AngII により惹起される MAP キナーゼ活性化への影響を検討した。すべての NOS 阻害薬は AngII による MAPK 活性化を抑制するほか、AngII 誘発活性酸素産生も LNAME の前処置により激減することを確認した。この RVSMC を用いた検討を合わせて、NO は活性酸素産生系に重要な役割を担い、細胞内情報伝達系を構築していることが示唆された。

研究期間後半は、これらの結果を受け、細胞内活性酸素産生系を担う NOS サブタイプの検索をおこなうものとした。

神経型 NOS 欠失マウス、神経型 NOS 阻害薬 (L-VNIO)、peroxynitrite スカベンジャー (MnTBAP) などを用いて、血管における活性酸素依存性 MAPK 活性化に関わる神経型 NOS 由来 NO の役割を詳細に検討した。平常時には、神経型 NOS 由来 NO はラジカルスカベンジャーとして血管壁での活性酸素産生および血管 MAP キナーゼ活性化には抑制的に働いており、特に神経型 NOS 欠失マウスでは、血管 MAPK のリン酸化体量は有意に多いものであった。一方で AngII 暴露時には、NADPH オキシダーゼが関わる活性酸素産生系を

強力に誘導されることから、神経型NOS由来NOとの反応によりperoxynitriteの産生増強が起り、これが逆に血管MAPKの酸化ストレス依存性の活性化を引き起こしていることが判明した。

また、心筋虚血再灌流障害に与える虚血プレコンディショニング効果を、神経型NOS欠失マウスと野生型マウスとの比較、あるいはL-VNIO、MnTBAP処置により、本メカニズムに関わる神経型NOS由来NOの役割を併せて検討した。心筋虚血再灌流障害は神経型NOS欠失マウスあるいはMnTBAP前処置により軽減されたが、一方で虚血プレコンディショニング効果は神経型NOS欠失マウスで消失していた。

これらの研究成果は、活性酸素依存性の心血管MAPK活性化における平常時とAngII刺激時のNOの相反する2面性を明らかとし、そのNO産生を担うのは血管壁あるいは心筋での神経型NOSであることが判明した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 10 件)

- ① Lu XM, Zhang GX, Yu YQ, Kimura S, Nishiyama A, Matsuyoshi H, Shimizu J, Takaki M. The opposite roles of nNOS in cardiac ischemia-reperfusion-induced injury and in ischemia preconditioning-induced cardioprotection in mice., *J Physiol Sci.*, 2009
- ② Zhang GX, Kimura S, Murao K, Shimizu J, Matsuyoshi H, Takaki M. Role of neuronal NO synthase in regulating vascular superoxide levels and mitogen-activated protein kinase phosphorylation. *Cardiovasc Res.* 81:389-399, 2009. 査読有
- ③ Fujiwara M, Izuishi K, Sano T, Hossain MA, Kimura S, Masaki T, Suzuki Y. Modulating effect of the PI3-kinase inhibitor LY294002 on cisplatin in human pancreatic cancer cells. *J Exp Clin Cancer Res.* 27:76, 2008. 査読有
- ④ Diah S, Zhang GX, Nagai Y, Zhang W, Gang L, Kimura S, Hamid MRWA, Tamiya T, Nishiyama A, Hitomi H. Aldosterone induces myofibroblastic transdifferentiation and collagen gene expression through the Rho-kinase dependent signaling pathway in rat mesangial cells. *Exp Cell Res.* 314:3654-3662, 2008. 査読有
- ⑤ Miyata K, Sun GP, Guo P, Hitomi H, Kimura S, Kiyomoto H, Hosomi N, Kohno M and Nishiyama A. Possible involvement of Rho-kinase in aldosterone-induced vascular remodeling. *Hypertens Res.* 31:1407-1413, 2008. 査読有
- ⑥ Zhang GX, Nagai Y, Nakagawa T, Miyanaka H, Fujisawa Y, Nishiyama A, Izuishi K, Ohmori K, Kimura S. Involvement of endogenous nitric oxide in angiotensin II-induced activation of vascular mitogen-activated protein kinases. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 293:H2403-H2408, 2007. 査読有
- ⑦ Suna S, Yamaguchi F, Kimura S, Tokuda M, Jitsunari F. Preventive effect of D-psicose, one of rare ketohexoses, on di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP)-induced testicular injury in rat. *Toxicol Lett.* 173:107-117, 2007. 査読有
- ⑧ Zhang GX, Ohmori K, Nagai Y, Fujisawa Y, Nishiyama A, Abe Y, Kimura S. Role of AT1 receptor in isoproterenol-induced cardiac hypertrophy and oxidative stress in mice. *J Mol Cell Cardiol.* 42:804-811, 2007. 査読有
- ⑨ Fujisawa Y, Nagai Y, Miyatake A, Miura K, Nishiyama A, Kimura S, Abe Y. Effects of adrenomedullin 2 on regional hemodynamics in conscious rats. *Eur J Pharmacol.* 558:128-132, 2007. 査読有
- ⑩ Zhang GX, Lu XM, Kimura S, Nishiyama A. Role of mitochondria in angiotensin II-induced reactive oxygen species and mitogen-activated protein kinase activation. *Cardiovasc Res.* 76:204-212, 2007. 査読有

[学会発表] (計 18 件)

- ① Yu-yan Fan 等、アルドステロンは腎臓における老化を加速する、第 82 回日本薬理学会年会、2009 年 3 月 17 日、横浜
- ② 永井 由紀子 他、培養ラット平滑筋細胞では機械的伸展刺激によって 11 β -HSD2 発現が減少する、第 31 回日本高血圧学会総会、2008 年 10 月 9 日、札幌
- ③ Gang Liu et al., Mechanical stretch potentiates angiotensin II-induced proliferation in spontaneously hypertensive rat

- vascular smooth muscle cells.、第 31 回日本高血圧学会総会、2008 年 10 月 9 日、札幌
- ④ Kazi Rafiq et al.、Effects of Angiotensin II receptor blocker on tissue expression balance between Angiotensin II receptor and its inhibitory binding molecls.、第 31 回日本高血圧学会総会、2008 年 10 月 9 日、札幌
- ⑤ Yu-yan Fan et al.、Effects of cilnidipine on intrarenal rennin-angiotensin system, oxidative stress and renal injury in SHR/ND rats.、第 31 回日本高血圧学会総会、2008 年 10 月 9 日、札幌
- ⑥ Yu-yan Fan et al.、Effects of azelnidipine on oxidative stress and renal injury in aldosterone-induced hypertensive rats.、第 31 回日本高血圧学会総会、2008 年 10 月 9 日、札幌
- ⑦ Zhang GX et al.、Involvement of endogenous nitric oxide in angiotensin II-induced activation of vascular mitogen-activated protein kinases. 第 9 回日中高血圧シンポジウム、2007 Nov 11, Beijing, China
- ⑧ Fan Y-Y et al.、The role of chymase in angiotensin II formation and progression of fibrosis in obstructed kidneys. 9th International Symposium, 2007 Sep 4, Tucson, USA
- ⑨ 永井由紀子 他、培養ラット平滑筋細胞 f では機械的進展刺激により 11 β -HSD2 発現が減少する、第 81 回日本薬理学会年会、2008 年 3 月 17 日、横浜
- ⑩ ル シャオメイ 他、マウス虚血・プレコンディショニングにおける nNOS の役割、第 81 回日本薬理学会年会、2008 年 3 月 17 日、横浜
- ⑪ ディア スワニー 他、ラットメザンギウム細胞においてアルドステロンは Rho キナーゼ系を活性化してコラーゲン I 発現と形質転換を生じる、第 81 回日本薬理学会年会、2008 年 3 月 17 日、横浜
- ⑫ ハン ユウヤン 他、アルドステロン依存性高血圧ラットにおけるアゼルニピンの酸化ストレスと腎障害に対する効果、第 81 回日本薬理学会年会、2008 年 3 月 17 日、横浜
- ⑬ 藤澤 良秀 他、腎盂内圧上昇の循環血行動態への影響、第 81 回日本薬理学会年会、2008 年 3 月 17 日、横浜
- ⑭ 永井由紀子 他、フルクトース負荷ラットで生じるインスリン抵抗性におけるプロレニンの関与、第 30 回日本高血圧学会総会、2007 年 10 月、宜野湾

- ⑮ 伊原 玄英 他、2 型糖尿病ラットにおける腎症顕性期からのオルメサルタンの腎保護作用、第 30 回日本高血圧学会総会、2007 年 10 月 25 日、宜野湾
- ⑯ 汎 愈燕 他、ハムスター尿管閉塞モデルにおけるキマーゼを介したアンジオテンシン II 産生と腎間質線維化作用、第 30 回日本高血圧学会総会、2007 年 10 月 25 日、宜野湾
- ⑰ 人見 浩史 他、食塩負荷はアンジオテンシン II による血管平滑筋細胞の増殖作用を増強する、第 30 回日本高血圧学会総会、2007 年 10 月 25 日、宜野湾
- ⑱ Zhang GX et al.、Involvement of endogenous nitric oxide in Angiotensin II-induced activation of vascular mitogen-activated protein kinases.、第 30 回日本高血圧学会総会、2007 年 10 月 25 日、宜野湾

[図書] (計 2 件)

- ① Zhang GX, Nagai Y, Fujisawa Y, Nishiyama A, Kimura S. D-allose suppresses development of hypertension in salt-loaded spontaneously hypertensive rats. **RARE SUGARS II**, Edited by Asada Y, Kawanami Y, Tajima S, pp87-90, 2008, Art-Printing Co. Ltd.
- ② Suna S, Jistunari F, Tokuda M, Yamaguchi F, Kimura S. D-psicose, a rare sugar, prevents Di-(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP)-induced testicular injury by suppressing the generation of reactive oxygen species in rat testis. **RARE SUGARS II**, Edited by Asada Y, Kawanami Y, Tajima S, pp173-178, 2008, Art-Printing Co. Ltd.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木村 正司 (KIMURA SHOJI)
香川大学・医学部・准教授
研究者番号：30253264

(2) 研究分担者

「2007 年」
西山 成 (NISHIYAMA AKIRA)
香川大学・医学部・教授
研究者番号：10325334

大森 浩二 (OHMORI KOJI)
香川大学・医学部・准教授
研究者番号：00263913

張 國興 (ZHANG GUOXING)
香川大学・医学部・助教
研究者番号：90444728

宮武 明 (MIYATAKE AKIRA)
香川大学・総合生命科学研究センター・准教授
研究者番号：80211598

「2008年」
永井由紀子 (NAGAI YUKIKO)
香川大学・医学部・教務職員
研究者番号：30335864

(3) 連携研究者

「2008年」
西山 成 (NISHIYAMA AKIRA)
香川大学・医学部・教授
研究者番号：10325334

大森 浩二 (OHMORI KOJI)
香川大学・医学部・准教授
研究者番号：00263913