

機関番号：34413

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20590266

研究課題名（和文） 虚血性臓器障害と交感神経：エンドセリン及びアンジオテンシン系の役割と性差

研究課題名（英文） Ischemic organ injury and sympathetic nervous system: Roles of endothelin and angiotensin, and sex difference

研究代表者

松村 靖夫 (MATSUMURA YASUO)

大阪薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：40140230

研究成果の概要（和文）：狭心症や心筋梗塞の原因である心筋虚血が生じた際には交感神経から神経伝達物質であるノルアドレナリン（NA）が過剰に放出され、病態の発症に関与することが知られているが、今回の研究により、そのNAの過剰放出機構の一端を明らかにすることができた。また、虚血後のNA放出には性差が存在し、雌ラットの虚血心筋では、雄の場合に比べてNA放出量は少なく、臓器障害も軽度であることが判明するとともに、この性差に女性ホルモンが関係することも明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：In cases of cardiac ischemia, which leads to the development of angina pectoris and cardiac infarction, noradrenaline (NA) release from sympathetic nerve endings is known to be enhanced and involved in the pathogenesis of the ischemic cardiac injury. In the present study, we elucidated the possible mechanisms of the above enhancement of NA overflow. We also clarified that there was a sex difference in the NA overflow from the post-ischemic heart, i.e., the amount of NA released from the heart of females was less than that of males, and the post-ischemic cardiac injury was attenuated in cases of females. Furthermore, it was found that estrogens are responsible for this sex difference.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2009年度	600,000	180,000	780,000
2010年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：心臓、虚血、再灌流、交感神経、ノルアドレナリン、性差、女性ホルモン

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 虚血心筋における交感神経からのノルアドレナリン（NA）過剰放出は心虚血再灌流後の不整脈を始めとした心機能障害と密接に関係するが、このNA過剰放出と心機能障害に対してアンジオテンシンⅡ（AngⅡ）、エンドセリン-1（ET-1）、一酸化窒素（NO）

などの生理活性物質がいかなる制御機構を有しているかに関しては不明な点が多い。

(2) 我々は、ラットのランゲンドルフ灌流心臓を用いた実験系においては、虚血再灌流後のNA過剰放出とそれに伴う心機能障害がエンドセリン ET<sub>A</sub>受容体拮抗薬により著明に改善されるのに対して、ET<sub>B</sub>拮抗薬やET<sub>B</sub>遺伝子

欠損動物ではさらなる悪化がみられることを見出し、ET-1が虚血心筋障害の発症過程に複雑に関わっていることを報告した。

(3) 虚血性心疾患を始めとした種々の循環器疾患において性差が認められ、性ホルモンがこれに関与することはよく知られているが、その作用メカニズムに交感神経系や生理活性物質がどのように関係しているかについては不明である。

## 2. 研究の目的

(1) 心臓の虚血障害時における交感神経系の関与、特に NA 過剰放出のしくみにフォーカスをあて、その調節に関わる Ang II、ET-1、NO などの生理活性物質の制御メカニズムを明らかにすることである。心交感神経からの NA 放出に対する Ang II の影響については、生理的並びに病態的条件下において  $AT_1$  受容体を介する促進的制御機構がよく知られているが、 $AT_2$  受容体を介する作用がいかなる影響をおよぼすかについては不明である。また NA 過剰放出における ET-1 の役割についても検討を始めており、ET 変換酵素阻害薬が心虚血再灌流障害を改善するとともに、NE 過剰放出に対しても抑制効果を有することを認めている。このような実験事実をもとに、今回の研究では、Ang II/ $AT_2$  受容体系や ET-1/ $ET_B$  受容体系が心筋虚血時の機能障害や NA 過剰放出にいかなるメカニズムを介して制御しているかについて研究を進める。

(2) すでに我々は、腎虚血再灌流障害に関して、雄に比べて雌では病態の進展がきわめて軽度であるという性差を認め、この性差にエストラジオールが関係すること、またその作用メカニズムに ET-1 や NO 系が深く関わっていることを見出した。今回、心筋虚血後の臓器障害における NA 過剰放出の役割やその制御機構に関する性差発現とそのしくみについて検討を加える。

(3) 腎臓における虚血再灌流障害についても、病態の発症と進展における NA 過剰放出の役割、並びに性差発現について検討を加える。

## 3. 研究の方法

### (1) ラングENDORF 心灌流標本の作製

①電気刺激実験：SD 系雄性ラット (250-350 g) にネンブタール麻酔を施した後、背位に固定し、気管カテーテルを挿入してこれを人工呼吸機に接続した。その後開胸し、顕微鏡を用いて交感神経節を注意深く剥離、結紮し、心臓とともに摘出した。大動脈にカテーテルを挿入し、ラングENDORF 灌流装置 (ラボサポート製：IPH-W2) に装着して直ちにカテーテルを介して逆行性に定圧 (80 mmHg) 灌流を開始した。灌流液には 95%  $O_2$ 、5%  $CO_2$  混合ガスを十分に通気した Krebs-Henseleit

液を使用した。肺静脈より左心房を経て左心室内にラテックス製バルーンを挿入し、圧トランスデューサーに接続した。圧測定用アンプを介して左心室圧および心拍数を測定した。排出される灌流液は冠灌流液として採取した。なお、電気刺激は交感神経節に双極白金電極を装着し、これを介して電気刺激装置により行った。

②虚血再灌流実験：虚血処置として灌流を 40 分間停止し、次いで再灌流を 30 分間行った。薬物処置として、虚血開始 15 分前から再灌流終了後にかけて灌流した。また再灌流開始 5 分後までの灌流液中の NA 濃度および  $NO_x$  濃度を測定した。各血行動態パラメーター

(LVDP、 $dp/dt_{max}$ 、LVEDP および CF) の測定は実験期間を通して行った。一部の実験には、雌ラットも使用した。

(2) 虚血性急性腎障害モデルラットの作製：実験動物として SD 系雄性および雌性ラット (8 週齢) を用いた。麻酔下で右腎を摘除して 2 週間後、再度ペントバルビタール麻酔下で、左側腹部切開を施し、非外傷性クリップを用いて左腎動静脈の血流を遮断し、腎臓を阻血状態にした。45 分後にクリップを除去し、血流を再開させた。虚血再灌流処置終了 24 時間後のラットを代謝ケージに入れ、5 時間の採尿を行った。採尿終了後、採血および腎臓の摘出を行った。血液および尿は腎機能パラメーターの測定に、摘出した腎臓の一部は病理組織標本の作製にそれぞれ供した。腎静脈血漿中の NA 濃度を測定する実験では、ペントバルビタール麻酔下でラットの腎静脈に 26 ゲージ注射針を刺入した後、2 分以内に採血を行った。

(3) 卵巣の摘除：雌性ラットにおいて、実験開始 1 週間前にペントバルビタール麻酔下で両側腹部に切開を施し、卵巣を露出、卵巣および子宮を結紮し、両側の卵巣を摘出した後、切開面を縫合した (OVX 処置)。

## 4. 研究成果

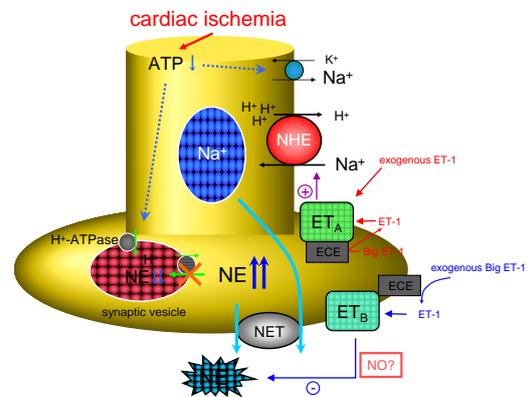
(1) 虚血再灌流後の心機能障害と心交感神経からの NA 過剰放出

①Ang II/ $AT_2$  受容体系の役割：心交感神経からの NA 放出に対する Ang II の影響については、生理的並びに病態的条件下において  $AT_1$  受容体を介する促進的制御機構がよく知られているが、 $AT_2$  受容体を介する作用がいかなる影響をおよぼすかについては不明である。最近  $AT_2$  受容体機能の重要性について、相次いで研究報告がなされており、特に心血管系では、心筋肥大、血管肥厚、並びに昇圧といった  $AT_1$  受容体機能に対して機能的拮抗作用を有する可能性が高い。まず、心交感神経の電気刺激による NA 放出について調べたところ、 $AT_2$  選択的作動薬の CGP-42112A は交感神経からの NA 放出を抑制することが明らかと

なった。そこで、虚血再灌流にともなう NA 過剰放出における  $AT_2$  受容体機能の役割について調べた。 $AT_1$  受容体拮抗薬であるロサルタン単独処置は、虚血による NA 遊離および心機能低下を顕著に抑制した。一方、 $AT_2$  受容体拮抗薬である PD-123319 単独処置は NA 遊離量および心機能変化にほとんど影響を与えなかったが、ロサルタン処置による変化は PD-123319 併用により完全に消失した。これらの結果は、内因性に産生された Ang II は  $AT_1$  受容体を介して NA 遊離を促進しているが、 $AT_1$  受容体が遮断された際には  $AT_2$  受容体へと作用し、NA 遊離を抑制し得ることを示している。次に、外因的に Ang II を処置した際の影響についても調べた。Ang II 単独処置では NA 遊離量および心機能変化に影響を与えなかったが、ロサルタンと併用することで顕著な NA 遊離量の減少が確認された。さらに選択的  $AT_2$  受容体作動薬である CGP-42112A を用いて検討を行ったところ、虚血再灌流による NA の過剰放出と心機能低下は CGP-42112A の濃度に依存して抑制されたが、この作用は  $AT_2$  受容体拮抗薬である PD-123319 を添加することで完全に消失した。次いで、 $AT_2$  受容体を介した NA 遊離抑制作用のメカニズムについて検討を加えた。キニノゲナーゼ阻害薬である PKSI-527、あるいは選択的  $B_2$  受容体拮抗薬である Hoe 140 を用いて検討した結果、CGP-42112A の NA 遊離抑制作用は、PKSI-527 あるいは Hoe 140 と併用することで著明に抑制された。したがって、本研究で確認された  $AT_2$  受容体を介する作用にブラジキニンによる  $B_2$  受容体の活性化が関与していることが示された。 $B_2$  受容体を介した作用に NO の関与が考えられるので、NO 合成酵素阻害薬の  $N^G$ -nitro-L-arginine (NOARG) を用いて検討したところ、ロサルタン単独処置、Ang II とロサルタン併用処置、並びに CGP-42112A 処置による  $AT_2$  受容体を介した NE 遊離抑制作用は NOARG と併用することで完全に消失した。よって、本研究で確認された  $AT_2$  受容体を介した NE 遊離抑制作用に NO の産生亢進が関与していることが示唆された。

②ET-1/ $ET_B$ 受容体系の役割：ET-1 の役割について詳細な検討を行った。まず、ET 変換酵素阻害薬 SM-19712 が心虚血再灌流障害を顕著に改善するとともに、NA 過剰放出に対しても抑制効果を発揮することを確認した。以前当研究室では、心虚血再灌流時において内因性の ET-1 が  $ET_A$  受容体/ $Na^+$ - $H^+$  交換体系を介して NA 放出に促進的に作用し、再灌流後の心機能を悪化させることを報告しているが、SM-19712 によって得られた事実は以前の結果を強く支持するものであった。次に ET-1 の前駆体である big ET-1 を用いて検討を行ったところ、予想に反して、big ET-1 は対照群でみられた虚血再灌流後の心機能低下を著明

に改善し、NA 放出量も有意に抑制した。big ET-1 を灌流することにより心虚血再灌流後の灌流流量が顕著に増大していたことから、big ET-1 による冠血管拡張作用の関与が考えられた。そこで、再灌流後の灌流液中 NOx 量を測定した結果、big ET-1 処置群では対照群と比較して NOx 放出量が有意に増大していた。なお、big ET-1 による作用は、エンドセリン変換酵素阻害薬 SM-19712、 $ET_B$  受容体拮抗薬 A-192621 並びに NO 合成酵素阻害薬 NOARG をそれぞれ前処置することにより消失した。したがって、心虚血再灌流時において外因的に加えた big ET-1 は ET-1 へと変換されるが、この ET-1 は  $ET_B$  受容体に優先的に作用し NO を放出させ、その結果 NA 過剰放出が抑制され、再灌流後の心機能が改善するものと考えられた(下図)。なお、虚血に伴う ET 受容体遺伝子の発現変動についても検討したが、明らかな変化は認められなかった



③心機能障害と NA 過剰放出における性差：雄の心臓では、虚血再灌流により、最大左心室圧と左心室圧一次微分値の低下並びに左心室拡張末期圧の上昇が観察された。また、再灌流後の灌流液に含まれる NA 量は顕著に増大した。これに対し雌の心臓では、雄の心臓と比較して障害は軽度であり、NA 量は低値を示した。次に卵巣摘除 (OVX) 処置を行った雌の心臓についても同様の検討を行った。その結果、OVX 処置を施した群では、無処置群と比較して虚血再灌流後の NE 放出量は増大し、心機能は有意に低下した。さらに女性ホルモンの一種である  $17\beta$ -estradiol ( $E_2$ - $\beta$ ) 投与の影響について検討を行った。雄の  $E_2$ - $\beta$  急性処置および慢性投与群並びに雌に OVX を施した後に  $E_2$ - $\beta$  を慢性投与した (OVX +  $E_2$ - $\beta$ ) 群では、NA 放出は抑制され、心機能は著しく改善した。この NA 放出量の低下に NO が関与しているかを調べるため、非選択的 NO 合成酵素阻害薬の NOARG を用いて検討した。 $E_2$ - $\beta$  急性処置および慢性投与群並びに OVX +  $E_2$ - $\beta$  群に NOARG を処置することで、各群で認められた心機能

障害改善効果は消失した。また、灌流液中に含まれる NOx 量を測定した結果、雄と比較して雌の心臓で NOx 量の増大が観察された。E<sub>2</sub>-β の急性処置や慢性投与によっても NOx 量は増大し、この増大は NOARG を処置することで消失した。以上のことから、虚血再灌流後の心機能、NA 放出量には雌雄差が存在し、その雌雄差には性ホルモンの一種であるエストロゲンが深く関与していることが明らかとなった。また、その性差発現のメカニズムには、エストロゲンによる NO 産生の亢進を介した NA 過剰放出抑制作用が関与していることが示唆された。

④腎虚血再灌流障害と性差：虚血再灌流処置を施すことにより雌雄ラットいずれにおいても腎障害がみられたが、その程度は雄性ラットに比べ、雌性ラットにおいて明らかに軽度であった。また再灌流後の腎静脈血漿中 NA 濃度を測定したところ、雄性ラットにおいて腎静脈血漿中 NA 濃度の顕著な上昇がみられた。雌性ラットにおいては NA 濃度の上昇がみられたものの、雄性ラットに比べて低値を示した。一方、OVX 処置あるいはタモキシフェンの投与を施した雌性ラットでは、雄性ラットと同程度の腎障害および腎静脈血漿中 NE 濃度の上昇がみられた。これら腎障害および腎静脈血漿中 NE 濃度の上昇はヘキサメトニウムの投与によって抑制された。したがって、本病態における性差発現には E<sub>2</sub>-β とともに腎交感神経系が密接に関与するものと考えられた。そこで雄性ラットを用いて、外因的に E<sub>2</sub>-β (100 μg/kg) 処置を行ったところ、虚血再灌流後の腎障害と腎静脈血漿中 NA 濃度の上昇はいずれも抑制され、その抑制効果はタモキシフェンの静脈内前投与によって消失した。以上の結果より、虚血性急性腎障害における性差発現には、E<sub>2</sub>-β のエストロゲン受容体を介した腎交感神経抑制作用が重要な役割を果たしているものと考えられる。

#### 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 5 件)

① Masashi Tawa, Taiki Fukumoto, Mamoru Ohkita, Naoto Yamashita, Ayman Geddawy, Takeshi Imamura, Kazuhide Ayajiki, Tomio Okamura, Yasuo Matsumura. Contribution of nitric oxide in big endothelin-1-induced cardioprotective effects on ischemia/reperfusion injury in rat hearts. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* (査読有) 57, 575-578 (2011).

② Masashi Tawa, Taiki Fukumoto, Mamoru Ohkita, Naoto Yamashita, Ayman Geddawy,

Takeshi Imamura, Kazuhide Ayajiki, Tomio Okamura, Yasuo Matsumura. Effects of exogenous big endothelin-1 on postischemic cardiac dysfunction and norepinephrine overflow in rat hearts. *Hypertens. Res.* (査読有) 34, 218-224 (2011).

③ Masashi Tawa, Taiki Fukumoto, Naoto Yamashita, Mamoru Ohkita, Kazuhide Ayajiki, Tomio Okamura, Yasuo Matsumura. Postconditioning improves postischemic cardiac dysfunction independently of norepinephrine overflow after reperfusion in rat hearts: Comparison with preconditioning. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* (査読有) 55, 6-13 (2010).

④ Masashi Tawa, Taiki Fukumoto, Mamoru Ohkita, Yasuo Matsumura. Role of endogenous endothelin-1 in post-ischemic cardiac dysfunction and norepinephrine overflow in rat hearts. *Eur. J. Pharmacol.* (査読有) 591, 182-188 (2008).

⑤ Tetsumasa Sasaoka, Yasuhiro Egi, Masashi Tawa, Ai Yamamoto, Mamoru Ohkita, Masanori Takaoka, Tomoyuki Maruyama, Toshiaki Akira, Yasuo Matsumura. Angiotensin II type 2 receptor-mediated inhibition of norepinephrine release in isolated rat hearts. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* (査読有) 52, 176-183 (2008).

[学会発表] (計 10 件)

① 筒居秀伸：腎虚血再灌流障害の性差における腎交感神経系の関与について。第 84 回日本薬理学会年会。2011 年 3 月 23 日。横浜 (震災のため、誌上発表)。

② 田中亮輔：虚血性急性腎障害に対する 17β-エストラジオールの腎交感神経系を介した保護効果について。第 84 回日本薬理学会年会。2011 年 3 月 22 日。横浜 (震災のため、誌上発表)。

③ 福本大起：短時間、長時間心虚血後の機能障害とノルエピネフリン過剰放出におけるエンドセリン-1 とアンジオテンシン-II の役割について。第 83 回日本薬理学会年会。2010 年 3 月 18 日。大阪。

④ 福本大起：心虚血再灌流後の機能障害とノルエピネフリン過剰放出における性差について。第 83 回日本薬理学会年会。2010 年 3 月 17 日。大阪。

⑤ 田中亮輔：腎虚血再灌流障害に対する虚血性プレコンディショニング処置の腎交感神経系を介した保護効果について。第 83 回日本薬理学会年会。2010 年 3 月 16 日。大阪。

⑥ 善田直樹：虚血性急性腎不全に対するポストコンディショニング処置の腎保護効果は NO 産生に依存する。第 83 回日本薬理学会

年会. 2010年3月16日. 大阪.

⑦ 田和正志 : Effect of exogenous big endothelin-1 on post-ischemic cardiac dysfunction and norepinephrine overflow in rat hearts: Involvement of  $ET_B$  receptor/NOS1 systems. 11<sup>th</sup> International Conference on Endothelin. 2009年9月11日. モントリオール.

⑧ 福本大起 : 心虚血再灌流後の機能障害とノルエピネフリン過剰放出における $\beta_1$ 受容体の役割. 第82回日本薬理学会年会. 2009年3月17日. 横浜.

⑨ 善田直樹 : 腎虚血再灌流障害の性差におけるeNOSの関与について. 第82回日本薬理学会年会. 2009年3月16日. 横浜.

⑩ 田和正志 : 心虚血再灌流後の機能障害とノルエピネフリン過剰放出における外因性ビッグエンドセリン-1の影響. 第18回日本循環薬理学会. 2008年11月21日. 千葉.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

松村 靖夫 (MATSUMURA YASUO)

大阪薬科大学・薬学部・教授

研究者番号 : 40140230

### (2) 研究分担者

大喜多 守 (OHKITA MAMORU)

大阪薬科大学・薬学部・講師

研究者番号 : 60449824