

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 3 月 31 日現在

機関番号：12601
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22500403
 研究課題名（和文）新規ガストランスミッターデリバリーによる末梢循環改善方法の開発的研究
 研究課題名（英文）Improvement of peripheral microcirculation by a new gas transmitter delivery
 研究代表者
 水野 理介（MIZUNO RISUKE）
 東京大学・医学部附属病院・特任助教
 研究者番号：30273080

研究成果の概要（和文）：生体の機能調節機構に関わる新しいガス分子 Hydrogen sulfide (H_2S) の微小循環系に対する作用を検討した。L-システイン (H_2S の基質) は、抵抗血管平滑筋の Cystathionine γ -lyase (CSE) 活性化を介して、抵抗血管に対して内皮細胞非依存性拡張反応を惹起した。L-システインは、集合リンパ管の自発性収縮頻度を有意に減少させ、この L-システインによる負の変時作用は、DL-propargylglycine (PAG; 選択的 CSE 阻害薬) 処置によって正の変時作用へと転じた。抵抗血管や集合リンパ管における内因性 L-システイン-CSE- H_2S 経路は、微小循環調節機構に重要な働きを果たしていることが判明した。

研究成果の概要（英文）：We investigated roles of hydrogen sulfide (H_2S) in the regulation of the microcirculatory system. L-cysteine (a substrate of H_2S) caused endothelium-independent dilations of the arterioles through an activation of cystathionine γ -lyase (CSE) located on the arteriolar smooth muscles. L-cysteine reduced frequency of pumping activity in isolated rat collecting lymphatics. The L-cysteine-mediated negative chronotropic effects of the lymphatics were converted into positive chronotropism in the presence of DL-propargylglycine (PAG; a selective inhibitor of CSE). These results indicate that L-cysteine-CSE- H_2S pathway plays significant roles in the regulation of the microcirculatory system including arterioles and collecting lymphatics.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・医用生体工学・生体材料学

キーワード：生体システム・フィジオーム

1. 研究開始当初の背景

(1) 血管内皮細胞は、血管平滑筋の緊張性制御に関与する様々な生理活性物質を局所産生・分泌している。内皮細胞由来生理活性

物質のうち血管拡張に作用する分子として一酸化窒素 (NO)、プロスタグランジン I_2 (PGI_2) および内皮由来過分極因子 (EDHF; H_2O_2 や CYP450 代謝産物等) が生理学的に重要

であることが知られている。また、内皮細胞機能障害は、これら血管拡張性物質の産生・反応性の低下によって様々な循環器疾患を引き起こす。近年、内皮細胞からは新規のEDHFである Hydrogen sulfide (H₂S) が産生されることが報告されてきている。

(2) 血管内皮細胞は、生理活性物質や機械的刺激によって L-アルギニンから NO、L-システインから H₂S そしてアラキドン酸から PGI₂ を産生する。これらの生理活性物質は、血管平滑筋内のセカンドメッセンジャー (cAMP, cGMP) やイオンチャネル (K_{ca}, K_{ATP}) を活性化することによって血管平滑筋弛緩反応を誘起する。NO と H₂S は、以下の相同性を有する。アミノ酸を基質とするガス分子である、合成酵素活性にカルシウム・カルモジュリン複合体が関与する。

(3) 全身の血圧や各臓器における局所血流は、実質臓器内を走行する血管径 300 μm 以下の抵抗血管-細動脈の収縮・拡張によって調節されている。すなわち、各臓器内の微小循環系の入り口である抵抗血管-細動脈が、形態学・機能学的に極めて重要な調節制御部位である。2008 年 Science 誌に H₂S 合成酵素ノックアウトマウスは野生型と比べて高血圧を示し、循環調節機構における L-システイン-Cystathionine γ-lyase (CSE)-H₂S 経路の意義と重要性が報告された (Science, 322: 587-590, 2008)。しかしながら H₂S による循環調節機構は、主に大血管を中心とした解析であり、微小循環に対する直接的詳細な検討は、国内外において十分に行われていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、新規のガストランスミッターである H₂S の微小循環系に対する作用とその機序解析を行い、さらに得られた知見からエビデンスに基づいて設計デザインされた末梢循環改善方法を開発することである。そのために、大血管 (大動脈)、抵抗血管 (腹壁骨格筋細動脈) そして集合リンパ管における L-システイン-CSE-H₂S 経路を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) C57BL/6J マウス (雄、9-10 週令) を屠殺後、胸部大動脈を摘出し実験に用いた。摘出した大動脈 (幅 2mm) をリング状標本とし、大動脈内腔に直径 100 μm のタングステンワイヤーフックを 2 本通し臓器槽内に懸垂固定した。臓器内を 5%CO₂-95%O₂ で通気した Krebs 液 (37°C、pH7.4) で満たした。標本の発生張力をトランスデューサー-アンプレコーダーを介して記録した。L-システインや

H₂S ドナーを投与して反応性を検討し、種々の阻害薬を用いてその作用機序を解明した。

(2) C57BL/6J マウス (雄、9-10 週令) の腹壁筋層内に走行する抵抗血管 (~180 μm、図 1) および SD ラット (雄、7 週令) の腸骨リンパ節輸入リンパ管 (~300 μm) をマイクロサージェリーの手法を用いて摘出し実験に用いた。臓器槽内において細動脈および集合リンパ管の両端をガラスピペットにカニューレーションし、摘出微小脈管還流標本を作製した。臓器内 5%CO₂-10%O₂-85%N₂ で通気した Krebs 液 (37°C、pH7.4) を持続的に還流した。標本の流入路のガラスピペットにチューブ-圧カラムを接続し標本内腔に内圧を負荷し流出路は閉鎖した。標本の内径変化をビデオマイクロスコープとビデオキャリパーを用いて測定した。L-システインや H₂S ドナーを投与して反応性を検討し、種々の阻害薬を用いてその作用機序を解明した。

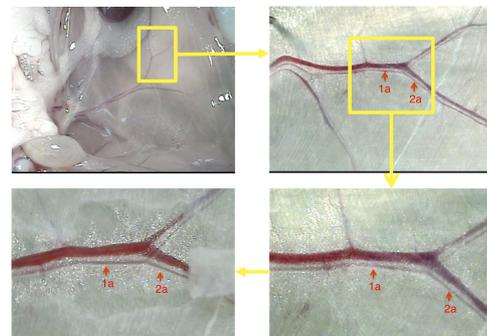


図 1: 腹壁筋層内に走行する抵抗血管 (1a および 2a) を摘出し実験に用いた。

4. 研究成果

(1) マウス大動脈

① H₂S の基質である L-システインによって、大動脈は、収縮反応を示した。この L-システインによる収縮反応は、内皮細胞剥離処置、PAG (選択的 CSE 阻害薬) 処置、L-NAME (NO 合成阻害薬) 処置、TEMPOL (活性酸素種除去剤) 処置によって有意に抑制した。

② 大動脈は、H₂S のドナーである NaHS によって二相性の反応 (低濃度における収縮と高濃度における弛緩反応) を示した。H₂S による収縮反応は、内皮細胞剥離処置、L-NAME 処置、TEMPOL 処置によって有意に抑制した。H₂S による弛緩反応は、ODQ (グアニレートシクラーゼ阻害薬) 処置によって有意に抑制したが、TEA (非選択的 K⁺チャネル阻害薬) 処置およびグリベンクラミド (選択的 ATP 感受性 K⁺チャネル阻害薬) 処置の影響を受けなかった。

③ 大動脈の L-システインによる収縮反応は、内皮細胞における CSE-NOS-活性酸素種 (O₂⁻) のクロストークを介して発現し、高濃度の H₂S

による大動脈弛緩反応は、大動脈平滑筋のグアニレートシクラーゼ (GC) 活性化に依存する事が判明した (図2)。

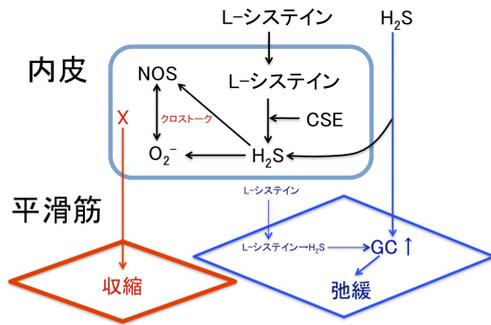


図2: 大動脈における CSE-NOS-O₂⁻ のクロストーク。

(2) マウス腹壁骨格筋細動脈

①腹壁骨格筋細動脈 (最大径~180 μm) は、外液 Ca²⁺ 依存性の筋原性収縮を有する事が判明した。

②腹壁骨格筋細動脈は、L-システインによって拡張反応を示した。このL-システインによる拡張反応は、内皮細胞剥離処置の影響を受けなかったが、PAG 処置によって有意に抑制した。また、Tempol 処置は、L-システインの拡張反応を有意に増強した (図3)。

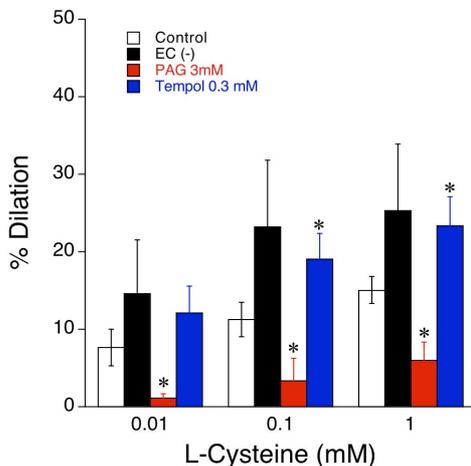


図3: L-システインの抵抗血管拡張反応 (Control) に対する、内皮剥離 [EC (-)]、PAG (3mM) および Tempol (0.3mM) の影響 (n=4-7) *: p < 0.05 from Control.

③腹壁骨格筋細動脈は、NaHS によって用量依存的な拡張反応を示した。
 ④腹壁骨格筋細動脈の L-システインによる拡張反応は、内皮細胞非依存性すなわち平滑筋 CSE 活性化を介する事が判明した。
 ⑦これら大動脈と抵抗血管の結果から、L-シ

STEIN-CSE-H₂S 経路を介する血管反応性は、血管の形態学・機能学的特性に対応して著しい相違の存在することが明らかとなった。また、これらの基盤研究結果はアミノ酸を応用した循環器疾患治療の橋渡し研究に重要な知見を提示できた。

(3) 腸骨リンパ節輸入リンパ管 (集合リンパ管)

①PAG (選択的 CSE 阻害薬) は、集合リンパ管の自発性収縮頻度を有意に増加した。従って、集合リンパ管からの H₂S の基礎的分泌は、集合リンパ管の自発性収縮の周期性を有意に調節していることが判明した。

②H₂S の基質である L-システインは、集合リンパ管の自発性収縮頻度を有意に減少させた (負の変時作用)。この L-システインによる集合リンパ管の負の変時作用は、PAG 処置によって正の変時作用へと転じた。

③H₂S のドナーである Na₂S は、集合リンパ管自発性収縮に対して負の変時作用を惹起した。特に、高濃度の Na₂S (10 μM) は、リンパ管の自発性収縮を完全に停止させた (図3)。グリベンクラミド (選択的 ATP 感受性 K⁺チャネル阻害薬) は、この Na₂S による負の変時作用を有意に解除した。



図3: 集合リンパ管自発性収縮に対する Na₂S の反応。

④SD ラットのリンパ系組織 (腸骨リンパ節とその輸入リンパ管) における CSE の発現とその分布を免疫組織科学によって検討した。CSE は、集合リンパ管壁に (平滑筋や細胞外マトリックス) 分布していることが判明した。さらに興味深いことに、CSE はリンパ節辺縁洞床面の内皮細胞に局限して強発現していることが判明した。これらの結果は、リンパ系組織における CSE 分布の多様性を示す。

⑤集合リンパ管の L-システインによる負の変時作用は、集合リンパ管壁に存在する CSE による内因性 H₂S 産生を介して発現し、その反応性の一部に ATP 感受性 K⁺チャネルの関与する事が判明した。

⑥H₂S や含硫アミノ酸による集合リンパ管の生理学および病態生理学のメカニズムの解明やその関連するリンパ管系疾患の治療に対する橋渡し研究として重要な知見を提示できた。

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)

[学会発表] (計7件)

- ①水野理介、一色政志、藤田敏郎 微小-リンパ循環学の基礎と臨床獣医学への橋渡し パネルディスカッション「リンパ節廓清(切除)は必要か」第85回獣医麻酔外科学会 2013年01月12日～2013年01月13日 福岡市
- ②水野理介、一色政志、西本光宏、藤田敏郎 High salt inhibits lymphatic transport function through regulation of $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ activity American Heart Association Scientific Sessions 2012 2012年11月03日～2012年11月07日 ロスアンゼルス アメリカ合衆国
- ③水野理介、一色政志、西本光宏、藤田敏郎 高濃度 NaCl はリンパ管のポンプ機能を阻害する： $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ の関与 第35回日本高血圧学会総会 2012年09月21日 名古屋市
- ④水野理介、一色政志、西本光宏、藤田敏郎 High concentration of salt dysfunctions lymphatic activity through $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ -dependent mechanisms Gordon Research Conferences Molecular Mechanisms in Lymphatic Function & Disease 2012年3月6日 Ventura Beach Marriott サンフランシスコ アメリカ合衆国
- ⑤水野理介、一色政志、藤田敏郎 リンパ系は輸送管と交換管として機能する微小循環系である 第153回日本獣医学会学術集会 2012年3月27日 大宮市
- ⑥水野理介、一色政志、高良洋平、西本光宏、藤田敏郎 摘出マウス腹壁抵抗血管における L-システイン- H_2S 経路による緊張性制御機構の解析 第34回日本高血圧学会総会 2011年10月20日 宇都宮市
- ⑦水野理介、一色政志、藤田敏郎 L-システインは内因性活性酸素種依存的に内皮依存性血管収縮を惹起する 第33回日本高血圧学会総会 2010年10月15日 福岡市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

水野 理介 (MIZUNO RISUKE)

東京大学・医学部附属病院 (大学院医学系研究科分子血管内分泌学講座)・特任助教
研究者番号：30273080

(2) 研究分担者

一色 政志 (ISSHIKI MASASHI)

東京大学・医学部附属病院 (大学院医学系研究科分子血管内分泌学講座)・特任准教授
研究者番号：70302734