

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 20 日現在

機関番号：18001

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590305

研究課題名(和文)一酸化窒素合成酵素系の臓器連関における役割に関する基盤的研究

研究課題名(英文)Basic research on the role of the nitric oxide synthase system in organ connection

研究代表者

筒井 正人(TSUTSUI, Masato)

琉球大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：70309962

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：私達は、生体内における一酸化窒素合成酵素(NOSs)系の役割を検討するために、3つのNOSs遺伝子(nNOS, iNOS, eNOS)をすべて欠損させたNOSs系完全欠損マウス(triple n/i/eNOSs-KOマウス)を作製した。本研究では、このマウスを用いて臓器連関の機序を検討し、骨髄由来血管平滑筋前駆細胞に発現するNOSs系が頸動脈結紮後の血管病変形成に抑制的に作用していること、および腎心連関の機序にNOSs系が関与していることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In order to examine the role of the nitric oxide synthases (NOSs) system in vivo, we generated mice in which all three NOS genes are completely disrupted. In this study, we examined the role of the NOSs system in organ connection by using our triple NOSs-KO mice, and clarified that the NOSs system expressed in bone-marrow-derived vascular smooth muscle progenitor cells exerts an inhibitory effect on vascular lesion formation after carotid artery ligation, and that the NOS system plays a role in renocardiac connection.

研究分野：一酸化窒素

科研費の分科・細目：基礎医学・薬理学一般

キーワード：一酸化窒素合成酵素 臓器連関 ノックアウトマウス

1. 研究開始当初の背景

一酸化窒素 (NO) 合成酵素 (NOSs) 系は、神経型 (nNOS)・誘導型 (iNOS)・内皮型 (eNOS) の3種類のアイソフォームで構成されている。私達は、NOSs 系に由来する NO の役割を解明するために、3つの NOSs をすべて欠損させた NOSs 系完全欠損マウス (トリプル n/i/eNOSs-KO マウス) を創出した。

NOS 完全欠損マウスは幸運にも胎生致死ではなく誕生したが、生存率は野生型マウスに比して著明に低下していた。このマウスには、急性心筋梗塞やメタボリックシンドロームを含めた多彩な循環器・代謝性疾患が認められた。

近年、循環器疾患の成因における臓器連関の関与が注目されている。しかし、その機序は十分に解明されていない。

2. 研究の目的

本研究では、臓器連関における NOSs 系の役割を NOSs 系完全欠損マウスを用いて検討した。

3. 研究の方法

野生型マウスおよび NOSs 系完全欠損マウスを実験に使用した。

(1) 骨髄 - 血管連関における NOSs 系の役割の解明

骨髄 - 血管連関における NOSs 系の役割を、骨髄移植実験および頸動脈結紮動脈硬化モデルにおいて検討した。

(2) 腎心連関における NOSs 系の役割の解明

腎臓を 2/3 摘出し慢性腎臓病モデルを作製した。手術後の生存率および急性心筋梗塞罹患率を検討した。

4. 研究成果

(1) 骨髄 - 血管連関における NOSs 系の役割の解明

野生型マウスの骨髄を移植した野生型マウスに比し、NOSs 系完全欠損マウスの骨髄を移植した野生型マウスでは、頸動脈結紮後の血管病変形成が著明に増悪した。逆に、NOSs 系完全欠損マウスの骨髄を移植した

NOSs 系完全欠損マウスに比し、野生型マウスの骨髄を移植した NOSs 系完全欠損マウスでは、頸動脈結紮後の血管病変形成が著明に軽減した。以上より、骨髄由来血管前駆細胞に発現する NOSs 系が血管病変形成において抑制的に作用することが示唆された。

(2) 腎心連関における NOSs 系の役割の解明

野生型マウスでは、2/3 腎臓摘出術は偽手術と比較して生存率に影響を与えなかった。しかし、NOSs 系完全欠損マウスでは、2/3 腎臓摘出術は偽手術に比して生存率を著明に悪化させ、ほぼすべてのマウスが術後 4 ヶ月以内に突然死した。死因の病理学的検索では、84.6%のマウスが急性心筋梗塞で死亡していた。この 2/3 腎摘 NOSs 系完全欠損マウスは、創薬に有用な世界初の急性心筋梗塞モデルである。この結果から、腎心連関の機序に NOSs 系が重要な役割を果たしていることが示唆された。

本研究は、臓器連関の機序における NOSs 系の役割を初めて明らかにした点に学術的な意義がある。

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 14 件)

1. Kamezaki F, Tsutsui M, Takahashi M, Sonoda S, Kubo T, Fujino Y, Adachi T, Abe H, Takeuchi M, Mayumi T, Otsuji Y. Plasma levels of nitric oxide metabolites are markedly reduced in normotensive males with electrocardiographically determined left ventricular hypertrophy. *Hypertension*. 2014; in press, 査読有り
2. Inagaki H, Toyohira Y, Takahashi K, Ueno S, Obara G, Kawagoe T, Tsutsui M, Hachisuga T, Yanagihara N. Effects of selective estrogen receptor modulators on plasma membrane estrogen receptors and catecholamine synthesis and secretion in cultured bovine adrenal medullary cells. *J Pharmacol Sci*. 2014; 124: 66-75,

<http://dx.doi.org/10.1254/jphs.13155FP>, 査読有り

3. Zhang H, Yanagihara N, Toyohira Y, Takahashi K, Inagaki H, Satoh N, Li X, Goa X, Tsutsui M, Takahaishi K. Stimulatory effect of nobiletin, a citrus polymethoxy flavone, on catecholamine synthesis through Ser19 and Ser40 phosphorylation of tyrosine hydroxylase in cultured bovine adrenal medullary cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2014; 387: 15-22, doi: 10.1007/s00210-013-0916-6, 査読有り
4. Obukuro K, Nobunaga M, Takigawa M, Morioka H, Hisatsune A, Isohama Y, Shimokawa H, Tsutsui M, Katsuki H. Nitric oxide mediates selective degeneration of hypothalamic orexin neurons through dysfunction of protein disulfide isomerase. *J Neurosci*. 2013; 33: 12557-12568, doi: 10.1523/JNEUROSCI.0595-13.2013., 査読有り
5. Sakanashi M, Matsuzaki T, Noguchi K, Nakasone J, Sakanashi M, Uchida T, Tanada M, Kubota H, Arakaki K, Tanimoto A, Yanagihara N, Sakanashi M, Ohya Y, Masuzaki H, Ishiuchi S, Sugahara K, Tsutsui M. Long-Term Treatment with San' o-shashin-to, a Kampo Medicine, Markedly Ameliorates Cardiac Ischemia/Reperfusion Injury in Ovariectomized Rats via the Redox-Dependent Mechanism. *Circ J*. 2013; 77:1827-1837, doi: <http://dx.doi.org/10.1253/circj.CJ-12-1434>, 査読有り
6. Sasahara T, Yayama K, Matsuzaki T, Tsutsui M, Okamoto H. Na⁺/H⁺ exchanger inhibitor induces vasorelaxation through nitric oxide production in endothelial cells via intracellular acidification-associated Ca²⁺ mobilization. *Vascular Pharmacology*. 2013; 58:319-325, doi: 10.1016/j.vph.2012.11.004, 査読有り
7. Obara G, Toyohira Y, Inagaki H, Takahashi K, Horishita T, Kawasaki T, Ueno S, Tsutsui M, Sata T, Yanagihara N. Pentazocine inhibits norepinephrine transporter function by reducing its surface expression in bovine adrenal medullary cells. *J Pharmacol Sci*. 2013; 121:138-147, <http://dx.doi.org/10.1254/jphs.12164FP>, 査読有り
8. Satoh N, Toyohira Y, Itoh H, Zhang H, Ueno S, Tsutsui M, Takahashi K, Yanagihara N. Stimulation of norepinephrine transporter function by fasudil, a Rho kinase inhibitor, in cultured bovine adrenal medullary cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2012; 385:921-931, doi: 10.1007/s00210-012-0773-8., 査読有り
9. Tsutsui M, Ohya Y, Sugahara K. Latest Evidence in Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor Research. *Circ J*. 2012; 76:1599-1600. doi: <http://dx.doi.org/10.1253/circj.CJ-12-0654>
10. Furuno Y, Morishita T, Toyohira Y, Yamada S, Ueno S, Morisada N, Sugita K, Noguchi K, Sakanashi M, Miyata H, Tanimoto A, Sasaguri Y, Shimokawa H, Otsuji Y, Yanagihara N, Tamura M, Tsutsui M. Crucial vasculoprotective role of the whole nitric oxide synthase system in vascular lesion formation in mice: involvement of bone marrow-derived cells. *Nitric Oxide*. 2011; 25:350-359, doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.niox.2>

011.06.007, 査読有り

11. Noguchi K, Hamadate N, Matsuzaki T, Sakanashi M, Nakasone J, Uchida T, Arakaki K, Kubota H, Ishiuchi S, Masuzaki H, Sugahara K, Ohya Y, Sakanashi M, Tsutsui M. Increasing dihydrobiopterin causes dysfunction of endothelial nitric oxide synthase in rats in vivo. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2011; 301:H721-H729, doi: 10.1152/ajpheart.01089.2010. , 査読有り
12. Kubota T, Kubota N, Kumagai H, Yamaguchi S, Kozono H, Takahashi T, Inoue M, Itoh S, Takamoto I, Sasako T, Kumagai K, Kawai T, Hashimoto S, Kobayashi T, Sato M, Tokuyama K, Nishimura S, Tsunoda M, Ide T, Murakami K, Yamazaki T, Ezaki O, Kawamura K, Masuda H, Moroi M, Sugi K, Oike Y, Shimokawa H, Yanagihara N, Tsutsui M, Terauchi Y, Tobe K, Nagai R, Kamata K, Inoue K, Kodama T, Ueki K, Kadowaki T. Impaired insulin signaling in endothelial cells reduces insulin-induced glucose uptake by skeletal muscle. *Cell Metabolism*. 2011; 13:294-307, doi: 10.1016/j.cmet.2011.01.018. , 査読有り
13. Wang KY, Tanimoto A, Guo X, Yamada S, Shimajiri S, Murata Y, Ding Y, Tsutsui M, Kato S, Watanabe T, Ohtsu H, Hirano K, Kohno K, Sasaguri Y. Histamine deficiency decreases atherosclerosis and inflammatory response in apolipoprotein e knockout mice independently of serum cholesterol level. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2011; 31:800-807, doi: 10.1161/ATVBAHA.110.215228 , 査読有り
14. Kuboyama K, Tsuda M, Tsutsui M, Toyohira Y, Tozaki-Saitoh H, Shimokawa H, Yanagihara N, Inoue K. Reduced spinal microglial

activation and neuropathic pain after nerve injury in mice lacking all three nitric oxide synthases. *Molecular Pain*. 2011; 7:50-61, doi: 10.1186/1744-8069-7-50. , 査読有り

[学会発表](計7件)

1. Uchida T, Furuno Y, Tanimoto H, Arakaki K, Kina M, Kubota H, Sakanashi M, Matsuzaki T, Noguchi K, Nakasone J, Ohya Y, Yanagihara N, Shimokawa H, Tamura M, Otsuji Y, Tsutsui M. Development of an Experimentally Useful Model of Spontaneous Myocardial Infarction: 2/3 Nephrectomized Triple Nitric Oxide Synthases-Deficient Mouse. The 78th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society. Tokyo International Forum, Tokyo, Japan. 2014年3月22日
2. Tsutsui M. Significance of nitric oxide synthases in the cardiovascular system. OIST - Ryukyu University Joint Seminar. Okinawa Institute of Science and Technology, Okinawa, Japan. 2013年12月4日
3. Tsutsui M, Furuno Y, Morishita T, Yanagihara N, Tamura M, Shimokawa H, Otsuji Y. A novel vasculoprotective role of nitric oxide synthases in bone marrow-derived vascular progenitor cells. American Heart Association, Scientific Sessions 2013. Dallas Convention Center, Dallas, Texas, USA. 2013年11月18日
4. Uchida T, Furuno Y, Tanimoto A, Toyohira Y, Sakanashi M, Matsuzaki T, Noguchi K, Nakasone J, Ohya Y, Yanagihara N, Shimokawa H, Tamura M, Otsuji Y, Tsutsui M. Development of an experimentally useful animal model of spontaneous myocardial

infarction. The 77th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society. Pacifico Yokohama, Yokohama, Japan. 2013年3月15日

5. Furuno Y, Tsutsui M, Morishita T, Shimokawa H, Otsuji Y, Yanagihara N, Kabashima N, Serino R, Kanegae K, Miyamoto T, Nakamata J, Ishimatsu N, Tamura M. Novel vasculoprotective role of nitric oxide synthase (NOS) in Mice: Involvement of Bone-Marrow-Derived Vascular Progenitor Cells. The 49th European Renal Association-European Dialysis and Transplant Association Congress. Palais des Congres, Paris, France. 2012年5月24日
6. Tsutsui M, Furuno Y, Morishita T, Yanagihara N, Tamura M, Shimokawa H, Otsuji Y. Novel vasculoprotective role of nitric oxide synthases in bone-marrow-derived vascular progenitor cells. The 76th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society. Fukuoka Kokusai Center, Fukuoka, Japan. 2012年3月18日
7. Furuno Y, Morishita T, Yanagihara N, Shimokawa H, Otsuji Y, Tamura M, Tsutsui M. Accelerated Vascular Lesion Formation in Mice Lacking All Nitric Oxide Synthases: Contribution of Bone Marrow Cells. The 75th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society. Pacifico Yokohama, Yokohama, Japan. 2011年8月3日

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：

種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホ - ム ペ - ジ URL:
http://w3.u-ryukyu.ac.jp/pharmacology/youkoso_yao_lihe.html

6. 研究組織

(1)研究代表者

筒井 正人 (TSUTSUI, Masato)
琉球大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：70309962

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

野口 克彦 (NOGUCHI, Katsuhiko)
琉球大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号：70156181

松崎 俊博 (MATSUZAKI, Toshihiro)
琉球大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号：50244330

坂梨 まゆ子 (SAKANASHI, Mayuko)
琉球大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号：80363662