

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 25 日現在

機関番号：34413

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590314

研究課題名(和文)一酸化窒素産生を絶対的に支配するエンドセリン-1およびその受容体の意義

研究課題名(英文)The significance of endothelin-1 and its receptors on nitric oxide production

研究代表者

大喜多 守(OHKITA, MAMORU)

大阪薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：60449824

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：ETB受容体遺伝子欠損ラットホモ接合体及びその野生型のbasalレベルにおけるNO産生能に差は認められない。L-アルギニン静脈内投与下ではホモ接合体の腎組織中NO産生は有意に低下し、この低下は選択的ETA受容体拮抗薬により回復した。したがって、ETB受容体機能阻害時に生じる腎NO産生の低下にET-1/ETA受容体系亢進の関与が示唆される。一方、L-アルギニン投与によりホモ接合体の血中NOx含量は野生型に比して有意に増大し、血管組織中のNO産生に関わる因子の発現も有意な増加を示したことから、ホモ接合体の腎臓及び血管組織においては異なるメカニズムによりNO産生が制御されている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：There was no difference in NO production under basal condition between homozygous ETB deficient and wild-type rats. However, NOx output in the renal tissue by continuous infusion of L-arginine was significantly lower in homozygous than wild-type rats. This reduced converting activity of L-arginine to NO in homozygous rats was completely recovered by the acute administration of a selective ETA receptor antagonist. These results suggest that the augmentation of ET-1/ETA receptor-mediated actions involves in the decline of renal NO production under ETB receptor dysfunction. On the other hand, serum NOx levels in L-arginine treated homozygous rats were significantly increased compared to that of wild type rats, and that the expression of relative factors in NO production also significantly increased in the aortic tissue, suggesting that different mechanisms would control NO production in kidney and vasculature of homozygous rats, respectively.

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：エンドセリン 一酸化窒素

1. 研究開始当初の背景

エンドセリン-1(ET-1)の発見以来二十数年が経つが、これまでの数多くの研究成果の蓄積によって、肺動脈性肺高血圧症の治療にET受容体拮抗薬(非選択的ET_A/ET_B受容体拮抗薬・選択的ET_A受容体拮抗薬)が臨床応用されている。

ET受容体を介するET-1の作用としては、血管平滑筋細胞上のET_A受容体を介した血管収縮作用、血管内皮細胞上のET_{B1}受容体による一酸化窒素(NO)やプロスタサイクリン(PGI₂)産生増大に基づく血管弛緩作用、尿細管細胞上のET_{B1}受容体を介した水およびナトリウム利尿作用など、生体の循環調節においてはET-1とその受容体を介する作用は極めて重要である。また、血管平滑筋細胞上に発現するET_{B2}受容体が血管収縮性に機能することから、非選択的ET_A/ET_B受容体拮抗薬と選択的ET_A受容体拮抗薬のいずれが病態治療により効果的かという問題に関しては明確な結論が得られておらず、現在もお議論が交わされている。

我々はこれまでに、虚血性急性腎障害、慢性腎障害、頸動脈バルーン傷害、食塩感受性高血圧などの各種疾患モデル動物を作成し、薬理的なET_B受容体機能阻害によって、あるいはET_B受容体遺伝子欠損ラットホモ接合体(ET_B^{sl/sl})を用いて、ET_B受容体の生理学的・病態生理学的役割について検討を行ってきた。これらの実験結果により、ET-1/ET_B受容体系を介する作用、特にNO産生増強作用は、病態の発症・進展に対して抑制的に作用し、保護的な一面を担うことを明らかにした。

2. 研究の目的

NOは血管内皮細胞に対する物理的あるいは種々の生理活性物質の刺激により産生が促進される。また、ET-1は、ET_B受容体を介してNO産生を亢進させることも知られている。

一方最近我々は、ET_B受容体が血管内皮細胞におけるNO産生を絶対的に支配していること、またET_A受容体はET_B受容体のNO産生経路とは異なる機序を介してNO産生を抑制的に制御している可能性を見出した。本研究は、ET-1/ET_A/ET_BによるNO産生制御機構の詳細な解析とその全貌解明を目的としたものである。

3. 研究の方法

(1) 実験動物

実験動物として雄性10~15週齢のET_B受容体遺伝子欠損(ET_B^{sl/sl})ラット並びにその野生型(ET_B^{+/+})ラットを用いた。

(2) 初代培養血管内皮細胞

一部の実験では(1)の動物より胸部大動脈を摘出し、血管内皮細胞を初代培養した。すなわち、麻酔下において摘出した胸部大動脈の脂肪・外膜を剥離切除後、コラゲナーゼタイプで37℃、1時間加温処理した(酵素分散法)。得られた細胞は、遠心分離後、ダルベッコ改変イーグル培地(DMEM; 10%ウシ胎児血清、100 U/mlペニシリン、100 µg/mlストレプトマイシンを含有)中に分散し、細胞懸濁液をゼラチンコーティングしたディッシュ上に播き、CO₂インキュベーター(37℃, 5% CO₂-95% air)内で培養した。なお、内皮細胞の同定は形態学的に行い、コンフルエントに達した細胞を実験に用いた。

(3) 遺伝子及びタンパク発現解析

NO産生関連因子の発現量の変化はreal-time RTPCRによる遺伝子発現解析、もしくはウェスタンブロットにより評価した。なお、一次抗体として日本ベクトン・ディッキンソン株式会社から購入した抗内皮型NO合成酵素(eNOS)抗体、抗神経型NOS(nNOS)抗体、抗誘導型NOS(iNOS)抗体、抗actin抗体、Cell signaling technology社から購入した抗リン酸化eNOS(Ser1177)抗体、抗Akt抗体、抗リン酸化Akt抗体を用いた。

(4) 免疫組織染色

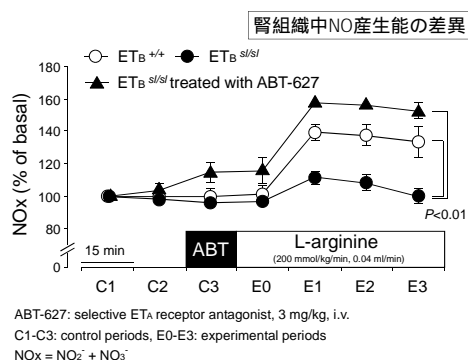
ホルマリン固定した胸部大動脈をパラフィン包埋し、4 µmの切片を作成した。免疫組織化学的検討を行うため、脱パラフィン処理し、マイクロウェーブによる抗原性の賦活化を行った。その後、一次抗体である抗eNOS抗体、二次抗体とそれぞれ反応させ、発色処理後、光学顕微鏡下でeNOS発現部位を観察した。

(5) 腎組織及び血漿中におけるNO代謝物濃度の測定

薬物投与時あるいは投与後の組織中もしくは血中のNO代謝産物(NO_x: NO₂⁻ + NO₃⁻)の測定は、エイコム社製の酸化窒素分析装置ENO-20を用いてマイクロダイアライシス法により行った。すなわち、ケタミン(4 mg/mL, 2 mL/kg)・キシラジン(2.5 mg/mL, 2 mL/kg)麻酔下において左側腹部切開を施し、左腎を露出させ、透析プローブを腎組織中に刺入した。このプローブをENO-20に接続し、2 µL/minの割合で透析液を断続的に通過させ、15分毎に得られる透析液に含まれるNO₂⁻及びNO₃⁻量をリアルタイムで測定し、その合計を腎組織中NO_x含量とした。また、一部の実験では実験終了時に全血を採取し、血中NO_x含量の測定に供した。

4. 研究成果

ET_B 受容体遺伝子欠損ラットホモ接合体においては、野生型と比較してL-アルギニン静脈内持続投与下（200 μmol/kg/min, 0.04 ml/min）における腎組織中 NO 産生能は有意に低下していた（下図）。一方この低下は、



選択的 ET_A 受容体拮抗薬である ABT-627（3 mg/kg/mL, i.v.）をあらかじめ投与しておくことにより顕著に回復することから、ET_B 受容体機能障害時に生じる NO 産生の低下には腎組織中の ET-1/ET_A 受容体系の亢進が一部関与している可能性が示唆された。また実験終了時に摘出した腎組織においては、構成型 NO 合成酵素（NOS）である nNOS 及び eNOS の遺伝子及びタンパク発現量が野生型と比較して有意に低下していた。

これまでの研究から ET_B 受容体遺伝子欠損ラットにおいては、腎組織中における NOS 活性は有意に低下していることが報告されている。我々の検討では、腎組織中 NO 代謝物濃度・eNOS 及びリン酸化 eNOS タンパク発現量に genotype 間の相違は認められず、L-アルギニンを静脈内持続投与した場合においてのみ NO 代謝物濃度の顕著な差が観察された。そこでL-アルギニン持続投与時および非投与時における ホモ接合体および野生型ラットの NO 産生調節因子がどのように変動しているか心臓・血管・腎臓の各組織について調べた。その結果、生理食塩水を連続投与したラットでは、投与 60 分後の血中 NO_x 含量に genotype 間での差は認められなかったが、L-アルギニンを投与した場合においては ET_B^{sl/sl} 群で有意な血中 NO_x 含量の増大を観察した。また生理食塩水を連続投与したラットでは、心臓、血管及び腎臓各組織中の eNOS あるいは Akt タンパク発現に genotype 間での差は認められなかった。一方、L-アルギニン投与時においては、ET_B^{sl/sl} ラットの血管組織においてのみ eNOS タンパク発現の増加が見られた。また、ET_B^{sl/sl} ラットの心臓、血管及び腎臓いずれの組織においても、リン酸化 eNOS 及びリン酸化 Akt タンパク発現の有意な増大もしくは増加傾向が観察された。これらのことから、ET_B 受容体/eNOS 経路は basal レベルの NO 産生とともに NO 産生増強時の主要な増幅経路として機能している可能性が示唆された。また、ET_B 受容体の機能障害時には PI3K/Akt/eNOS 経路の活性化を介して NO 産生を亢進させるメカニズムが存在するこ

とを確認した。

一方、野生型及びホモ接合体の胸部大動脈を抗 eNOS 抗体で免疫染色したところ、ホモ接合体の内膜における eNOS 発現量の低下が認められた。そこで胸部大動脈由来初代培養血管内皮細胞における eNOS 遺伝子発現量を調べたところ、ホモ接合体の発現量は野生型に比して極めて顕著に低下していた。なお、若齢の野生型及び ET_B 受容体遺伝子欠損ラットから摘出した胸部大動脈血管内皮細胞を初代培養し、eNOS 発現量及び PI3K/Akt/eNOS 経路で生じる差異を調べたところ、eNOS 発現量においては genotype 間に明らかな差は観察されなかった。これらの結果は加齢した ET_B 受容体遺伝子欠損ラットの胸部大動脈由来初代内皮細胞で得られた結果とは明らかに異なるものであり、加齢が ET_B 受容体/PI3K/Akt/eNOS 経路に及ぼす影響について更なる検討が必要と思われる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計3件)

Pathological Importance of the Endothelin-1/ET(B) Receptor System on Vascular Diseases. Kitada K, Ohkita M, Matsumura Y. *Cardiol. Res. Pract.*, 査読有, 2012, 731970.

Pathophysiological roles of endothelin receptors in cardiovascular diseases. Ohkita M, Tawa M, Kitada K, Matsumura Y. *J. Pharmacol. Sci.*, 査読有, 119, 2012, 302-313.

Reduced NO production rapidly aggravates renal function through the NF- B/ET-1/ETA receptor pathway in DOCA-salt-induced hypertensive rats. Kimura K, Ohkita M, Koyama M, Matsumura Y. *Life Sci.*, 査読有, 91, 2012, 644-650.

〔学会発表〕(計2件)

小山真季、鈴木理恵、大喜多守、松村靖夫 血管内皮細胞の NO 産生における ET_B 受容体の役割 日本薬学会第 132 年会 2012 年 3 月 29 日 北海道大学 Mamoru Ohkita, Kimihiro Kimura, Maki Koyama, Yasuo Matsumura. Reduced NO production rapidly aggravates renal function through the NF- B/ET-1/ET_A receptor pathway in DOCA-salt-induced hypertensive rats. The Twelfth International Conference on Endothelin, September 11-14, 2011, Cambridge, United Kingdom.

6. 研究組織

(1)研究代表者

大喜多 守 (OHKITA MAMORU)

大阪薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：60449824

(2)研究分担者

松村 靖夫 (MATSUMURA YASUO)

大阪薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：40140230