様　式　C－１９、F－１９、Z－１９　（共通）

科研費
KAKENHI

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 ２７ 年　 ６ 月 ２６ 日現在

機関番号：１８００１
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2012～2014
課題番号：２４７９１６０５

研究課題名（和文）脳梗塞におけるＮＯ合成酵素系の役割の解明と次世代治療戦略の確立

研究課題名（英文）A role of nitric oxide synthase in cerebral infarction and a new therapeutic strategy of stroke

研究代表者
久保田　陽秋（KUBOTA, Haruaki）

琉球大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：１０６００４２１

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,300,000円

研究成果の概要（和文）：生体内シグナル伝達ガス分子である一酸化窒素の合成酵素は３種類存在する。その３種類を全て欠損すると多くの臓器において様々な病的表現型が出現あるいは増強することが知られていて、今回われわれは脳梗塞の病態における一酸化窒素の役割を解明するために、一酸化窒素合成酵素全欠損マウスと野生型マウスを使用して脳虚血・再灌流の実験を行った。一酸化窒素合成酵素全欠損マウスは、野生型マウスと比較して脳梗塞のサイズが縮小し神経学的機能や生存率が改善する結果が得られた。この機序は未だ不明であるが、分子生物学的および生化学的な機序の解明を今後進めていく予定である。

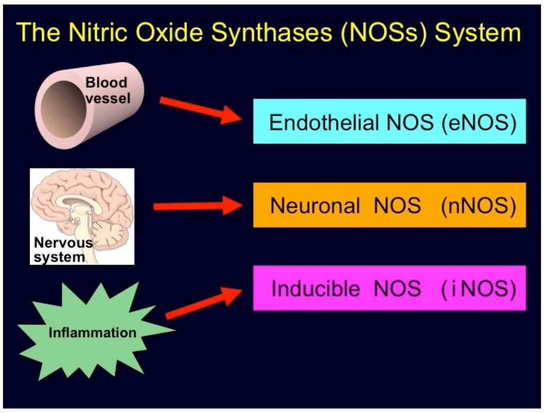
研究成果の概要（英文）：Nitric oxide (NO) is signaling gas molecule in vivo and there are three types of NO synthase (NOS). When animal lacking all three NOS, various pathological phenotype appears in many organ.
This time, in order to elucidate the role of nitric oxide in the pathogenesis of cerebral infarction, we perform the cerebral transient ischemia and reperfusion experiments with all three NOS deficient (mutant) mice and wild-type mice. Cerebral infarct size was smaller in mutant mice as compared with wild-type mice. Neurological deficit score was significantly reduced in mutant mice as compared with wild-type mice. Moreover, survival rate 24 hour after transient ischemia-reperfusion was significantly higher in mutant mice as compared with wild-type mice.
Although the mechanism of these phenomena is unknown, we are scheduled to clarify molecular biological and biochemical mechanism from now on.

研究分野：麻酔・集中治療

キーワード：マウス　中大脳動脈閉塞　脳虚血　再灌流　一酸化窒素合成酵素　nNOS　NOS　硫化水素

１．研究開始当初の背景

一酸化窒素（NO）は生体内で生成され、様々な生理的現象を調節するシグナル伝達物質として作用する。一酸化窒素合成酵素（NOS）には、内皮型 NOS（eNOS）と神経型 NOS（nNOS）および誘導型 NOS（iNOS）がある。eNOS は血管内皮細胞、nNOS は神経細胞に恒常的に発現し、iNOS は炎症などの刺激によりマクロファージなどの炎症細胞や平滑筋細胞などに発現が誘導される（下図 1)。



生体内におけるこれら３つの NOS 遺伝子の機能を研究するために、NOS 遺伝子を単独に欠損させた動物が作製されている。野生型マウスと比較し nNOS 欠損マウスでは脳虚血に強く、eNOS 欠損マウスでは脳虚血に弱くなるとの報告がある。一方、iNOS 欠損マウスで脳虚血に有意な変化があったとする報告は認められない。このように、脳虚血の病態における各 NOS アイソフォームの個々の役割はこれまで活発に研究されてきた。しかし、各 NOS 間には代償機構が働くために、NO の包括的な役割を解明する障害となっていることが考えられる。さらに、これまで NOS 系全体に由来する NO の脳虚血再灌流の病態における役割についての報告はない。

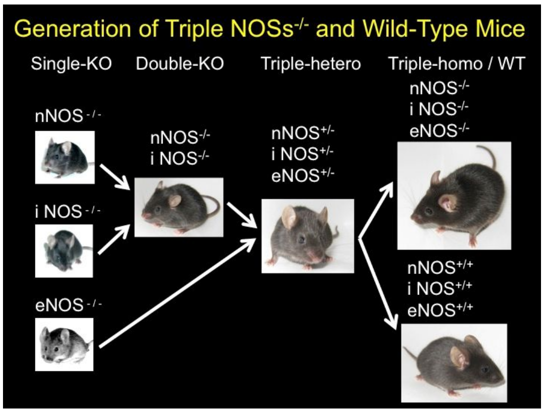
硫化水素について：2009 年、Minamishima らによって、心停止したマウスの胸部圧迫と機械的換気による心肺蘇生実施の際に同時に硫化ナトリウム（Na_2S）を投与することで、活気や食欲および寿命といった蘇生後の予後が大きく改善することが報告された。Na_2S は生体内で硫化水素（H_2S）を誘導する前駆物質である。この蘇生に与える改善効果は eNOS 活性を介した機序によると考えられている。現在、H_2S は NO と並ぶガス性シグナル伝達物質として注目されている。本邦では自殺に使用され話題となった毒性を有する物質であるが、低濃度の吸入で医療へ応用できる可能性が指摘され、盛んに研究されるようになった。

２．研究の目的

脳虚血再灌流ストレスが生じた際の、一酸化窒素合成酵素（NOS）系全体が生体に果たす役割を検討する目的で、３つの一酸化窒素合成酵素すべてを欠損させたマウスを用いて脳梗塞モデルを作成し、脳梗塞の発症および進展の機序と新しい治療法を模索する。また、この脳梗塞モデルにおいて、臓器保護や蘇生に重要な役割を持つ可能性が示唆されている、「硫化水素ガス吸入」が与える効果を調査する。

３．研究の方法

われわれの研究グループは、各種シングル NOS 欠損マウスをかけ合わせ、NOS 全欠損マウスと NOS を全て正常に保持する野生型マウスを作成し、この２種類のマウスのオスを実験に使用した（下図 2)。週齢 8-16 週、体重



20-30g のオスマウスをイソフルラン吸入、人工呼吸管理下に右頭蓋骨（右中大脳動脈灌流域の表面）にレーザードップラー血流計を設置し、背部表面温度 37.0 度に維持する条件下に中大脳動脈（MCA）閉塞・再灌流の実験を行った。腹側頸部を正中切開し、右頸部血管を剥離露出した。総頸動脈の内・外頸動脈分岐の近位部を半切開し、シリコンコーティング 8-0 ナイロン糸（塞栓糸）を約 10㎜ 挿入し、血流低下を確認したところで、60 分間留置後に抜去した。（右総頸動脈近位部で永久結紮処理とした。）血流計測は塞栓糸抜去後 60 分まで計測し、その後閉創しイソフルラン吸入を終了し、覚醒および自発呼吸確認後に抜管し人工呼吸処置終了とした。マウスは MCA 閉塞開始から 24 時間後に犠殺し脳を取り出し、フェザーメスを用いて前大脳の前端から 2㎜ の厚さに冠状断し、トリフェニルテトラゾリウムクロライド（TTC）染色を行い、脳梗塞領域（赤く染まらずに白く抜ける領域）の面積測定および、各断面の脳梗塞面積から体積を概算し、定量評価した。この脳梗塞サイズに加え、MCA 閉塞から 24 時間後までの生存率および神経学的所見を評価し、マウス種間の比較を行った。

４．研究成果

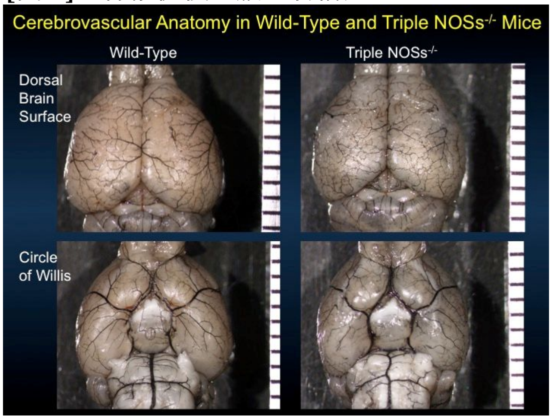
本研究と並行して行った、脳血管墨汁灌流による評価で、２種のマウスの間の脳血管構造に明らかな違いは認めなかった。（図 3)

MCA 閉塞前の血流値を 100％とし、閉塞中・再灌流時の血流変化を調査したところ、MCA 閉塞中の血流の推移は２種のマウス間で差はなかったものの、再灌流時の血流は野生型マウスにおいて NOS 全欠損マウスと比較して有意に血流値が大きかった。（図 4)

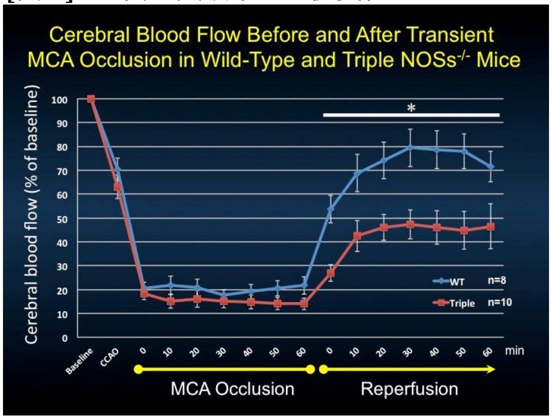
この一過性脳虚血再灌流実験で、野生型マ

ウスにおける脳梗塞巣サイズは NOS 全欠損マウスと比較して有意に大きかった。(図 5,6)同様の結果が、先行して行った中大脳動脈永久閉塞実験においても認められた。(図 7)
　MCA 閉塞から 24 時間後の神経学的評価で、野生型マウスで有意に重症な状態を示し、また、有意に生存率が低下した。(図 8,9)

[図 3]墨汁灌流後の脳血管構造

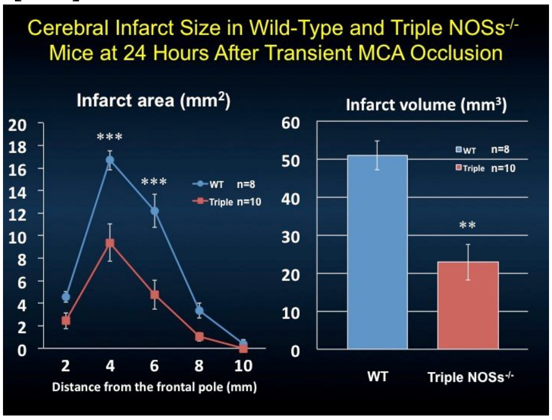


[図 4]MCA 閉塞実験中の血流変化

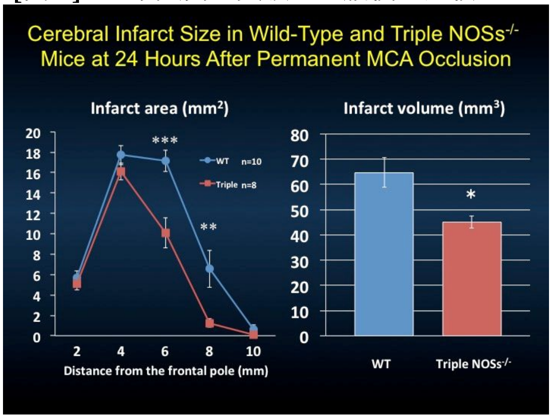


[図 5]脳冠状断における脳梗塞巣（TTC 染色）

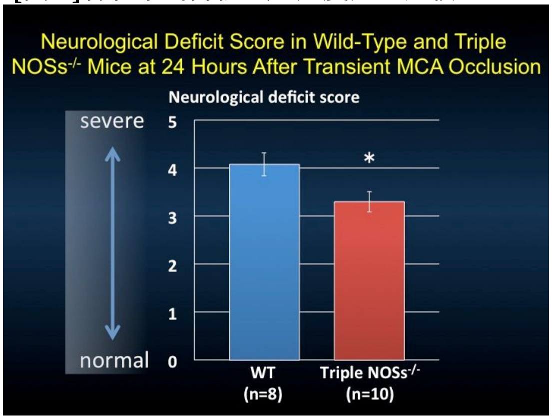
[図 6]MCA 一過性虚血実験での脳梗塞比較



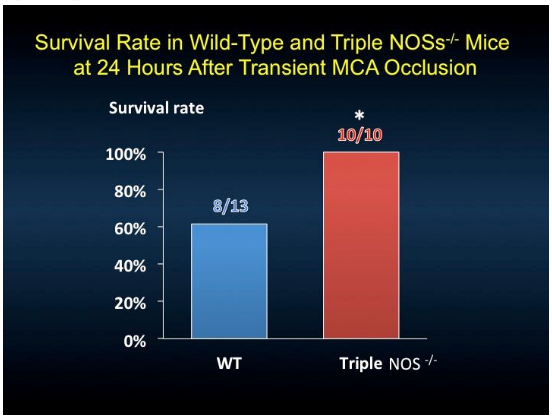
[図 7]MCA 永久閉塞実験での脳梗塞比較



[図 8]神経学的評価（重症度）の比較



[図 9]生存率の比較



　以上の結果から、脳虚血再灌流の病態において、NOS 全体が悪い作用を示すという直接的なエビデンスが初めて得られた。NOS は全体としては多くの臓器で保護的に機能するこ

とが知られているため、脳虚血再灌流の病態で逆に病態を促進する方向に機能することが本研究で示され、興味深い。今後、この現象の機序についての解析を進めていく予定である。治療介入としての硫化水素ガス吸入や一酸化窒素ガス吸入の可能性を検討する予定である。

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　4 件）

① Noguchi K, Matsuzaki T, Sakanashi M, Hamadate N, Uchida T, Kina-Tanada M, Kubota H, Nakasone J, Sakanashi M, Ueda S, Masuzaki H, Ishiuchi S, Ohya Y, Tsutsui M.
Effect of caffeine contained in a cup of coffee on microvascular function in healthy subjects.
J Pharmacol Sci. 査読有、2015；127：217-22.
doi: 10.1016/j.jphs.2015.01.003.

② Uchida T, Furuno Y, Tanimoto A, Toyohira Y, Arakaki K, Kina-Tanada M, Kubota H, Sakanashi M, Matsuzaki T, Noguchi K, Nakasone J, Igarashi T, Ueno S, Matsushita M, Ishiuchi S, Masuzaki H, Ohya Y, Yanagihara N, Shimokawa H, Otsuji Y, Tamura M, Tsutsui M.
Development of an experimentally useful model of acute myocardial infarction: 2/3 nephrectomized triple nitric oxide synthases-deficient mouse.
J Mol Cell Cardiol. 査読有、2014；77：29-41.
doi: 10.1016/j.yjmcc.2014.09.021.

③ Sakanashi M, Matsuzaki T, Noguchi K, Nakasone J, Sakanashi M, Uchida T, Kina-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. 査読有、2013 ; 77 : 1827-37.

〔学会発表〕（計　1 件）
① Kubota H, Hattori F, Noguchi K, Matsuzaki T, Sakanashi M, Kina M, Uchida T, Nakasone J, Shimokawa H, Ohya Y, Kakinohana M, Sugahara K, Tsutsui M.
Complete disruption of all nitric oxide synthase genes markedly reduces cerebral infarct size after middle cerebral artery occlusion in mice.
第 78 回日本循環器学会、2014 年 3 月 22 日、JP タワー（東京都）

〔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：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

６．研究組織
(1)研究代表者
久保田　陽秋（KUBOTA，Haruaki）
琉球大学・医学部附属病院・助教
　研究者番号：10600421
(2)研究分担者

(3)連携研究者