

機関番号：18001  
 研究種目：基盤研究(B)  
 研究期間：2008～2010  
 課題番号：20390074  
 研究課題名（和文） NO 合成酵素完全欠損マウスを用いた生体内 NO 合成酵素系の意義の  
 解明  
 研究課題名（英文） Elucidation of the significance of the nitric oxide synthase system  
 in vivo by the use of mice lacking all nitric oxide synthases  
 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

## 研究成果の概要（和文）：

我々は、生体内における一酸化窒素合成酵素（NOS）系の役割を検討するために、3 つの NOS 遺伝子（nNOS, iNOS, eNOS）をすべて欠損させた NOS 系完全欠損マウス（triple n/i/eNOS-KO マウス）を世界に先駆けて作製した。本研究では、このマウスに、自然発症心筋梗塞、骨代謝異常、高脂血症、拡張期心不全、および腎病変形成が認められることを明らかにした。以上より、NOS 系が、心血管系、代謝系、および骨系の恒常性の維持に重要な役割を果たしていることが示唆された。

## 研究成果の概要（英文）：

In order to examine the role of the nitric oxide synthase (NOS) system in vivo, we generated mice in which all three NOS genes are completely disrupted. In this study, we have clarified that this knockout mouse manifests spontaneous myocardial infarction, abnormality of bone metabolism, hyperlipidemia, diastolic heart failure, and accelerated renal lesion formation. These results suggest that the whole NOS system plays an important role in maintaining homeostasis in the cardiovascular, metabolic, and bone systems.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	5,300,000	1,590,000	6,890,000
2009年度	4,900,000	1,470,000	6,370,000
2010年度	4,900,000	1,470,000	6,370,000
年度			
年度			
総計	15,100,000	4,530,000	19,630,000

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、ノックアウトマウス、心筋梗塞

## 1. 研究開始当初の背景

一酸化窒素 (NO) 合成酵素 (NOS) 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。研究代表者の筒井は、NOS 系に由来する NO の役割を解明するために、3 つの NOS をすべて欠損させた NOS 系完全欠損マウス(ト

リプル n/i/eNOS-KO マウス) を世界に先駆けて創出した。

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。興味深いことに、予備的検討では、このマウスに、心血管系、代謝系、骨系を含めた様々なシステムの異常が見出された。

## 2. 研究の目的

本研究では、上記の予備的知見を踏まえて、下記の5つの点を解明することを目的とした。

- (1) 心筋梗塞の成因における NOS 系の意義の解明
- (2) 骨代謝における NOS 系の意義の解明
- (3) 脂質代謝における NOS 系の意義の解明
- (4) 拡張期心不全における NOS 系の意義の解明
- (5) 腎病変形成における NOS 系の意義の解明

## 3. 研究の方法

- (1) 心筋梗塞の成因における NOS 系の意義の解明

野生型マウスおよび single, double, triple NOS 欠損マウスを実験に使用した。実験期間中に死亡したマウスの死因を、病理学的に解析した。

- (2) 骨代謝における NOS 系の意義の解明  
骨密度を DXA 法で評価した。また、骨代謝の動態を、形態学および生化学的に解析した。

- (3) 脂質代謝における NOS 系の意義の解明  
高脂肪食を3ヶ月間投与し、血清脂質値、粥状硬化病変形成、生存率、および死因を検討した。

- (4) 拡張期心不全における NOS 系の意義の解明  
心肥大を病理学的に解析した。さらに、心機能を心エコー法および心内圧測定により評価した。

- (5) 腎病変形成における NOS 系の意義の解明  
一側尿管結紮後の腎病変形成を病理学的に評価した。さらに、腎病変形成に対する NO 供与体およびアンギオテンシン 1 型 (AT1) 受容体拮抗薬の作用を検討した。

## 4. 研究成果

- (1) 心筋梗塞の成因における NOS 系の意義の解明

NOS 系完全欠損マウスの生存率は、野生型マウスと比較して、著明に低下していた。死因の病理学的検索では、死亡した NOS 系完全欠損マウスの約半数は自然発症の急性心筋梗塞で死亡していることを突き止めた。このマウスに AT1 受容体拮抗薬 olmesartan を長期に投与すると、心筋梗塞の発症が有意に抑制された。以上より、NOS 系が心筋梗塞の成因に重要な役割を果たしていることが示唆された。さらに、この機序には、AT1 受容体経路が重要な役割を果たしていることが考えられた。

- (2) 骨代謝における NOS 系の意義の解明

骨密度は、野生型マウスに比して NOS 系完全欠損で有意に増加していた。さらに、形態学的指標及び生化学的指標で評価した骨形成および骨吸収の動態も、野生型マウスに比して NOS 系完全欠損マウスで有意に亢進していた。以上より、生体内の NOS 遺伝子を完全に欠損させると、骨密度の増加と骨代謝回転の亢進が引き起こされることが示唆された。

- (3) 脂質代謝における NOS 系の意義の解明

高コレステロール食を3ヶ月間負荷した NOS 系完全欠損マウスでは、著明な高 low density lipoprotein (LDL) コレステロール血症、粥状硬化病変形成、および心臓突然死が認められた。この高コレステロール食惹起性高脂血症の機序には、LDL 受容体遺伝子発現調節因子 SREBP-2 の発現低下による肝臓 LDL 受容体のダウンレギュレーションが関与していることが示唆された。

- (4) 拡張期心不全における NOS 系の意義の解明

心エコーおよび心行動態の解析において、NOS 完全欠損マウスが加齢とともに拡張期心不全の病態を呈することを見出した。我々の NOS 完全欠損マウスは、世界初の拡張期心不全マウスモデルである。

- (5) 腎病変形成における NOS 系の意義の解明

一側尿管結紮後の腎尿細管アポトーシス、間質線維化、および糸球体硬化の程度はいずれも、野生型マウスに比して NOS 系完全欠損マウスで著明に増悪していた。この機序には、炎症、TGF- $\beta$ 、および上皮間葉移行の機序が関与していることが示唆された。

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)

[雑誌論文] (計 25 件)

1. 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
2. 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
3. Tsutsui M, Shimokawa H, Otsuji Y, Yanagihara N. Pathophysiological relevance of NO signaling in cardiovascular system: novel insight from mice lacking all NO synthases. *Pharmacology & Therapeutics* (Review). 2010; 128: 499-508
4. Shimokawa H, Tsutsui M. Nitric oxide synthases in the pathogenesis of cardiovascular disease -Lessons from genetically modified mice- *Pflugers Arch* (Review). 2010; 459: 959-967
5. Morisada N, Nomura M, Nishii H, Furuno Y, Sakanashi M, Sabanai K, Toyohira Y, Ueno S, Watanabe S, Tamura M, Matsumoto T, Tanimoto A, Sasaguri Y, Shimokawa H, Kusahara K, Yanagihara N, Shirahata A, Tsutsui M. Complete disruption of all nitric oxide synthase genes causes markedly accelerated renal lesion formation following unilateral ureteral obstruction in mice in vivo. *J Pharmacol Sci.* 2010; 114: 379-389
6. Shibata K, Yatera Y, Furuno Y, Sabanai K, Morisada N, Nakata S, Morishita T, Yamazaki F, Tanimoto A, Sasaguri Y, Tasaki H, Nakashima Y, Shimokawa H, Yanagihara N, Otsuji Y, Tsutsui M. Spontaneous development of left ventricular hypertrophy and diastolic dysfunction in mice lacking all nitric oxide synthases. *Circ J.* 2010; 74: 2681-2692
7. Itoh H, Toyohira Y, Ueno S, Tsutsui M, Takahashi K, Yanagihara N. Upregulation of norepinephrine transporter function by prolonged exposure to nicotine in cultured bovine adrenal medullary cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2010; 382: 235-243
8. Zhang H, Toyohira Y, Ueno S, Shinohara Y, Itoh H, Furuno Y, Yamakuni T, Tsutsui M, Takahashi K, Yanagihara N. Dual effects of nobiletin, a citrus polymethoxy flavone, on catecholamine secretion in cultured bovine adrenal medullary cells. *J Neurochem.* 2010; 114: 1030-1038
9. Yatera Y, Shibata K, Furuno Y, Sabanai K, Morisada N, Nakata S, Morishita T, Toyohira Y, Wang KY, Tanimoto A, Sasaguri Y, Tasaki H, Nakashima Y, Shimokawa H, Yanagihara N, Otsuji Y, Tsutsui M. Severe dyslipidemia, atherosclerosis, and sudden cardiac death in mice lacking all NO synthases fed a high-fat diet. *Cardiovasc Res.* 2010; 87, 675-682
10. Noguchi K, Hamadate N, Matsuzaki T, Sakanashi M, Nakasone J, Sakanashi M, Tsutsui M, Sakanashi M. Improvement of impaired endothelial function by tetrahydrobiopterin in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Eur*

11. Toyohira Y, Ueno S, Tsutsui M, Ito H, Sakai N, Saito N, Takahashi K, Yanagihara N. Stimulatory effects of the soy phytoestrogen genistein on noradrenalin transporter and serotonin transporter activity. *Mol Nutr Food Res* 2010; 54: 516-524
12. Sugita K, Kabashima K, Yoshiki R, Ikenouchi-Sugita A, Tsutsui M, Nakamura J, Yanagihara N, Tokura Y. Inducible nitric oxide synthase downmodulates contact hypersensitivity by suppressing dendritic cell migration and survival. *J Invest Dermatol.* 2010; 130: 464-471
13. Tsutsui M, Shimokawa H, Otsuji Y, Ueta Y, Sasaguri Y, Yanagihara N. Nitric oxide synthases and cardiovascular diseases -Insights from genetically modified mice- *Circ J* (Review). 2009; 73: 986-993
14. Ikenouchi-Sugita A, Toyohira Y, Yoshimura R, Ueno S, Tsutsui M, Nakamura J, Yanagihara N. Opposite effect of milnacipran, a serotonin norepinephrine reuptake inhibitor, on the levels of nitric oxide and brain-derived neurotrophic factor in mouse brain cortex. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2009; 380: 479-486
15. Tsutsui M, Nakata S, Shimokawa H, Otsuji Y, Yanagihara N. Spontaneous myocardial infarction and nitric oxide synthase. *Trends Cardiovasc Med* (Review). 2008; 18: 275-279
16. Ulrich M, Petre A, Youhnovski N, Promm F, Schirle M, Schumm M, Pero R, Doyle A, Checkel J, Kita H, Thiyagarajan N, Ravi Acharya K, Schmid-Grendelmeier P, Simon HU, Schwarz H, Tsutsui M, Shimokawa H, Bellon G, Lee JJ, Przybylski M, Doering G. Post-translational tyrosine nitration of eosinophil granule toxins mediated by eosinophil peroxidase. *J Biol Chem.* 2008; 283(42): 28629-28640
17. Matsuda T, Toyohira Y, Ueno S, Tsutsui M, Yanagihara N. Simvastatin inhibits catecholamine secretion and synthesis induced by acetylcholine via blocking Na<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup> influx in bovine adrenal medullary cells. *J Pharmacol Exp Ther.* 2008; 327: 1-7
18. Takaki A, Morikawa K, Tsutsui M, Murayama Y, Tekes E, Yamagishi H, Yanagihara N, Shimokawa H. Crucial role of nitric oxide synthases system in endothelium-dependent hyperpolarization in mice. *J Exp Med.* 2008; 205: 2053-2063
19. Nakata S, Tsutsui M, Shimokawa H, Suda O, Morishita T, Shibata K, Yatera Y, Sabanai K, Tanimoto A, Nagasaki M, Tasaki H, Sasaguri Y, Nakashima Y, Otsuji Y, Yanagihara N. Spontaneous myocardial infarction in mice lacking all nitric oxide synthase isoforms. *Circulation.* 2008; 117: 2211-2223
20. Sabanai K, Tsutsui M, Sakai A, Hirasawa H, Tanaka S, Nakamura E, Tanimoto A, Sasaguri Y, Ito M, Shimokawa H, Nakamura T, Yanagihara N. Genetic disruption of all nitric oxide synthase isoforms enhances bone mineral density and bone turnover in mice in vivo: Involvement of the renin-angiotensin system. *J Bone Miner Res.* 2008; 23(5): 633-643
21. Kamezaki F, Tasaki H, Yamashita K, Tsutsui M, Koide S, Nakata S, Tanimoto A, Okazaki M, Sasaguri Y, Adachi T, Otsuji Y. Gene transfer of extracellular superoxide dismutase ameliorates pulmonary hypertension in rats. *Am J Respir Crit Care Med.* 2008; 177: 219-226
22. Tanimoto A, Murata Y, Wang KY, Tsutsui M, Kohno K, Sasaguri Y. Monocyte chemoattractant protein-1 expression is enhanced by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor via Jak2-Stat5 signaling and inhibited by

atorvastatin in human monocytic U937 cells. *J Biol Chem.* 2008; 283(8): 4643-4651

23. Yamada S, Wang KY, Tanimoto A, Fan J, Shimajiri S, Kitajima S, Tsutsui M, Watanabe T, Yasumoto K, Sasaguri Y. Matrix metalloproteinase 12 is a factor that accelerates the initiation of atherosclerosis and stimulates the progression of fatty streaks to fibrous plaques in transgenic rabbits. *Am J Pathol.* 2008; 172: 1419-1429
24. Nagata T, Ueno S, Morita H, Kubota T, Toyohira Y, Tsutsui M, Tawara A, Yanagihara N. Direct inhibition of *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor function by antiglaucomatous beta-antagonists. *J Pharmacol Sci.* 2008; 106: 423-434
25. Nii H, Tsutsui M, Kondo J, Toyohira Y, Ueno S, Yanagihara N. Copper, zinc superoxide dismutase enhances the mutagenicity in *Salmonella typhimurium* induced by 2-amino-6-methyldipyrido[1,2-a:3',2'-d]imidazole. *Mutat Res (Genet Toxicol Environ Mutagen).* 2008; 653: 14-22

[学会発表] (計 28 件)

1. Tsutsui M. Lesson from genetically engineered mice lacking all NO synthases. The XXth Congress of the International Society for Heart Research 2010 (Symposium). Kyoto International Conference Center, Kyoto, Japan. 2010年5月12日

他 27 件

[その他]

ホームページ:

<http://w3.u-ryukyu.ac.jp/pharmaco>

## 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: 7 0 3 0 9 9 6 2

### (2) 研究分担者

笹栗 靖之 (SASAGURI YASUYUKI)  
産業医科大学・医学部・教授  
研究者番号: 6 0 1 4 0 6 4 6

上田 陽一 (UETA YOUICHI)  
産業医科大学・医学部・教授  
研究者番号: 1 0 2 3 2 7 4 5

柳原 延章 (YANAGIHARA NOBUYUKI)  
産業医科大学・医学部・教授  
研究者番号: 8 0 1 4 0 8 9 6

### (3) 連携研究者

下川 宏明 (SHIMOKAWA HIROAKI)  
東北大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号: 0 0 2 3 5 6 8 1