

機関番号：37404
 研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20590255
 研究課題名 (和文) 心血管系におけるニトロ化環状グアノシンリン酸の機能解析と創薬への応用
 研究課題名 (英文) Studies on the roles for 8-nitroguanosine 3',5'-cyclic monophosphate in the cardiovascular system and the applications to drug discovery.
 研究代表者
 徳富 芳子 (TOKUTOMI YOSHIKO)
 尚綱大学・生活科学部・教授
 研究者番号：90253723

研究成果の概要 (和文)：

生体内で一酸化窒素 (NO) 産生に依存して生成されるニトロ化環状グアノシンリン酸 (8-ニトロ cGMP) の心血管系における機能を検討した。フェニレフリン収縮血管に対し、8-ニトロ cGMP は濃度依存性に弛緩反応と収縮増強を起こした。この収縮増強に対し、血管内皮由来の NO 合成酵素アンカッピングで生じる活性酸素種の関与が示唆された。2型糖尿病マウス由来大動脈でのフェニレフリン収縮に対し、8-ニトロ cGMP は濃度依存性弛緩のみを示した。以上より、内皮機能障害の改善に 8-ニトロ cGMP が寄与する可能性が示され、糖尿病合併症進展機構と 8-ニトロ cGMP との関連性が示唆された。

研究成果の概要 (英文)：

8-Nitroguanosine 3',5'-cyclic monophosphate (8-nitro-cGMP), formed nitric oxide (NO)-dependently, is a novel physiological second messenger. To study the physiological activity of 8-nitro-cGMP in the cardiovascular system, we studied its effects on vascular reactivity of mouse aortas. 8-Nitro-cGMP induced enhancement of contraction to phenylephrine and relaxation concentration-dependently in aortas from non-diabetic mice, but only relaxation in aortas from diabetic mice. It was suggested that 8-nitro-cGMP-induced superoxide production via eNOS uncoupling may mediate the enhancement of the phenylephrine contraction. The vasodilator effect of 8-nitro-cGMP may contribute to amelioration of the vascular endothelial dysfunction in diabetic mice, representing a novel pharmacological approach to prevent the complications associated with diabetes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
20年度	1,300,000	390,000	1,690,000
21年度	1,200,000	360,000	1,560,000
22年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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：cGMP、eNOS、心血管系、NO

1. 研究開始当初の背景

生体内で一酸化窒素(NO)産生に依存して生成されるニトロ化環状グアノシンーリン酸(8-ニトロ cGMP)は、cGMP様の生理機能(プロテインキナーゼG(PKG)活性化)に加え、タンパク質の翻訳後修飾(S-グアニル化)など独自の機能を有する、NOの新たなセカンドメッセンジャーとして発見された(Sawa, et al. *Nature Chemical Biology*, 2007)。我々は、*in vitro*で、8-ニトロ cGMPによる血管平滑筋弛緩作用がPKG活性化を介していること、ホスホジエステラーゼ(PDE)阻害薬に耐性であること、さらに、グルタチオン或いはシステインのS-グアニル化体でも血管が弛緩することを見出した。

NO合成酵素(NOS)により産生されるNOは、可溶性グアニル酸シクラーゼ(sGC)の活性化を介してcGMP(環状グアノシンーリン酸)を生成する。このcGMPは、PKGを活性化することにより、血管平滑筋弛緩をはじめ、神経系、免疫系などで様々なシグナル伝達に寄与する。一方、フリーラジカルであるNOが活性酸素や遷移金属イオンと反応して活性窒素酸化物に変わること、核酸、タンパク質、脂質を化学修飾(ニトロ化、酸化、ニトロソ化など)し、多様な生物活性を制御することも示唆されているが、詳細なメカニズムは未だ不明である。

2. 研究の目的

本研究では、心血管系での炎症、酸化ストレス、細胞分化・増殖、細胞死などにおけるニトロ化修飾分子、8-ニトロ cGMPの機能を調べることで、心血管病の発症・進展に対するニトロ化シグナルの役割を明らかにし、新たな治療戦略探索の糸口を見出す。

そこで今回、8-ニトロ cGMPによる血管調節作用についてメタボリック症候群モデル動物を用いて、血管調節、炎症制御、レドックス調節などにおける8-ニトロ cGMPの役割を調べることにより、8-ニトロ cGMPと心血管病との関連を調べる。

3. 研究の方法

(1) 8-ニトロ cGMPの化学合成

まず、cGMPのグアニン骨格の8位をプロモ化した後、ニトロ基との置換反応を行い、8-ニトロ cGMPを得る。各工程での溶媒交換、脱塩、分離精製には逆相HPLCを用いる。精製した8-ニトロ cGMPの定量には、吸光度測定法を用いる。

(2) 8-ニトロ cGMPの血管調節作用の解析

血管内皮型NOS遺伝子欠損マウスを用いて、8-ニトロ cGMPを2週間、日か投与による持続静注を行い、血圧、心拍数の変動を測定する。

(3) 8-ニトロ cGMPの血管収縮張力調節作用の解析

血管内皮型NOS遺伝子欠損マウスおよび2型糖尿病モデルのdb/dbマウス(レプチン受容体異常)を用いて、マグヌス法により、大動脈リング標本の等尺性張力に対する8-ニトロ cGMPの作用を検討する。

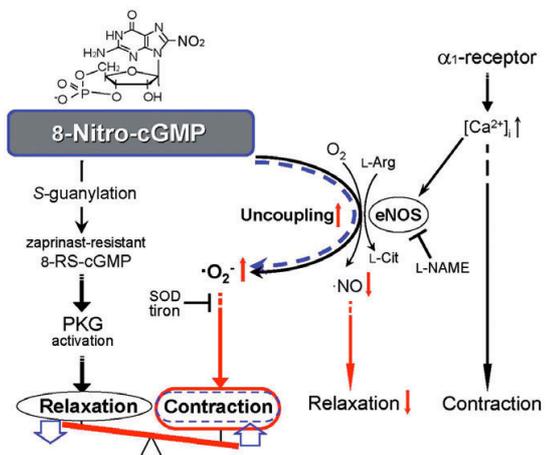
(4) 8-ニトロ cGMPの血管内皮型NOSアンカップリングに対する作用

イムノブロットング法及びジヒドロエチジウム染色法を用いて、血管内皮型NOSのdimer/monomer比、及び活性酸素種(スーパーオキシド)産生に対する8-ニトロ cGMPの影響を、病態モデルマウスを用いて検討する。

4. 研究成果

マウス大動脈を用いたマグヌス実験により、フェニレフリン収縮血管標本に対し、8-ニトロ cGMPは濃度依存性に弛緩反応のみならず収縮増強も示した。この収縮増強には、血管内皮由来のNO合成酵素(eNOS)アンカップリングによって生じたスーパーオキシドが関与しており、8-ニトロ cGMPがレドックス活性を有することが示唆された。さらに、eNOS欠損マウスに8-ニトロ cGMPを皮下から2週間投与することで、収縮期血圧が低下していたことから、*in vitro*の結果と同様に、eNOSに依存する収縮増強が欠損マウスでは起こらなくなり、血管の弛緩が優位になっていることが示された。

また、2型糖尿病モデルマウス(db/dbマウス)由来の大動脈を用いたマグヌス実験により、フェニレフリン収縮に対し、8-ニトロ cGMPは濃度依存性に弛緩反応のみ示し、収縮増強は認められなかった。以上の結果より、血管内皮機能障害の改善に8-ニトロ cGMPが寄与する可能性を示し、糖尿病における合併症進展機構と8-ニトロ cGMPとの新たな関連性の解明の糸口を見出した。



8-ニトロcGMPによる血管収縮張力調節機構.
(Figure 7, *British Journal of Pharmacology*
2011; 162(8):1884-1893)

フェニレフリンによる α_1 受容体刺激で血管平滑筋細胞内のカルシウム濃度が増加し、平滑筋が収縮する。同時に血管内皮細胞でも α_1 受容体刺激で細胞内カルシウム濃度が増加し、NOSが活性化されNO産生を介したPKG活性化による血管弛緩が誘導される。野生型マウス大動脈において、8-ニトロcGMPは10 μ M以下でフェニレフリンによる収縮の増強を、10 μ M以上では弛緩応答を顕著に示す。8-ニトロcGMPは、 α_1 受容体刺激で活性化された内皮型NOSのアンカップリング(実線)、スーパーオキシド産生を誘導する結果、フェニレフリン収縮を増強する。また、8-ニトロcGMPのPKGを直接活性化する作用だけでなく、グアニル化体(8-RS-cGMP)の強力なPKG活性化作用(ホスホジエステラーゼ5に耐性)により、血管弛緩が惹起される。糖尿病モデルマウス大動脈では、内皮型NOSアンカップリング(赤矢印)により、NO産生を介する弛緩の低下とスーパーオキシド産生が惹起されており、フェニレフリン収縮が増強している(赤長円、赤シーソーバランス)。その糖尿病モデルマウス大動脈に対し8-ニトロcGMPは、内皮型NOSアンカップリングを誘導せず(青点線)、フェニレフリン収縮の増強を起こさず(青長円)、弛緩応答のみであった。このような8-ニトロcGMPによる弛緩効果が、糖尿病モデルマウスの血管内皮機能障害による酸化ストレスの改善および異常収縮の改善に寄与することが示唆される。

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 12 件)

1. Vascular responses to 8-nitro-cyclic GMP in non-diabetic and diabetic mice. Tokutomi Y, et al. (12人中1番目) *British Journal of Pharmacology* 2011; 162(8):1884-1893. 査読有
2. Apoptosis signal-regulating kinase 1 deficiency eliminates cardiovascular injuries induced by high-salt diet. Kataoka K, Tokutomi Y, et al. (9人中2番目) *Journal of Hypertension* 2010; 29(1):76-84. 査読有
3. Ezetimibe ameliorates cardiovascular complications and hepatic steatosis in obese and type 2 diabetic db/db mice. Fukuda M, Nakamura T, et al. (9人中5番目) *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 2010; 335:70-75. 査読有
4. Aliskiren enhances protective effects of valsartan against type 2 diabetic nephropathy in mice. Dong YF, Liu L, et al. (11人中8番目) *Journal of Hypertension* 2010; 28:1554-1565. 査読有
5. Vascular responses to 8-nitroguanosine 3',5'-cyclic monophosphate in non-diabetic and diabetic mice. Tokutomi Y, Kataoka K, et al. (6人中1番目) *The 6th International Conference on the Biology, Chemistry and Therapeutic Applications of Nitric Oxide*. 2010; 92P
6. Aliskiren prevents cardiovascular complications and pancreatic injury in a mouse model of obesity and type 2 diabetes. Dong YF, et al. (9人中6番目) *Diabetologia* 2010; 53:180-191. 査読有
7. Potentiation by candesartan of protective effects of pioglitazone against type 2 diabetic cardiovascular and renal complications in obese mice. Fukuda M, et al. (8人中5番目) *Journal of Hypertension* 2010; 28:340-352. 査読有
8. Aliskiren enhances the protective effects of valsartan against cardiovascular and renal injury in endothelial nitric oxide synthase-deficient mice. Yamamoto E, Kataoka K, et al. (12人中6番目) *Hypertension* 2009; 54:633-638. 査読有
9. Critical role of apoptosis signal-regulating kinase 1 in aldosterone/salt-induced cardiac inflammation and fibrosis. Nakamura T, Kataoka K, et al. (9人中5番目)

Hypertension 2009; 54:544-551. 査読有

10. Effects of 8-nitro-cGMP on vascular responsiveness. Tokutomi Y, et al. (8人中1番目) *Journal of Pharmacological Sciences* 2009; 109(Suppl):105P
11. Excess salt causes cerebral neuronal apoptosis and inflammation in stroke-prone hypertensive rats through angiotensin II-induced NADPH oxidase activation. Yamamoto E, Tamamaki N, et al. (10人中5番目) *Stroke* 2008; 39:3049-3056. 査読有
12. Olmesartan prevents cardiovascular injury and hepatic steatosis in obesity and diabetes, accompanied by apoptosis signal regulating kinase-1 inhibition. Yamamoto E, Dong YF, et al. (9人中5番目) *Hypertension* 2008; 52:573-580. 査読有

[学会発表] (計3件)

1. Vascular responses to 8-nitroguanosine 3',5'-cyclic monophosphate in non-diabetic and diabetic mice. Tokutomi Y, et al. The 6th International Conference on the Biology, Chemistry, and Therapeutic Applications of Nitric Oxide. 平成22年6月14-18日、国立京都国際会館
2. 培養ミニ心臓のリモデリングと収縮特性、徳富直史、内田友二、徳富芳子、第63回日本薬理学会西南部会、平成22年11月26日、かごしま県民交流センター
3. 8-Nitro-cGMPの血管系への作用、徳富芳子 et al.、第82回日本薬理学会年会、平成21年3月16-18日、パシフィコ横浜

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他] なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

徳富 芳子 (TOKUTOMI YOSHIKO)

尚絅大学・生活科学部・教授

研究者番号：90253723

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者
なし