

平成 30 年 6 月 29 日現在

機関番号：18001

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K20049

研究課題名(和文)一酸化窒素合成酵素系完全欠損下の脳梗塞縮小現象と次世代治療確立への応用

研究課題名(英文)An attempt to apply to new therapy the phenomenon that complete disruption of all nitric oxide synthase genes reduces cerebral infarct volume.

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) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：オスにおいて一酸化窒素合成酵素(NOS)完全欠損マウスが野生型マウスと比較し脳梗塞が小さくなる現象を報告した。性ホルモンの影響を考え、性腺除去手術の一週間後に同様の脳梗塞誘導実験を行ったところ、精巣摘除術によって有意に脳梗塞は大きくなった。精巣摘除の効果はテストステロンの補充によって打ち消された。NOSが欠損した状況では、脳梗塞病態についてテストステロンの保護効果があることが示唆された。脳梗塞組織でのRNA発現について、次世代シーケンサー解析で調べたところ、NOS完全欠損マウスでは野生型マウスと比較し酸化ストレスやミトコンドリア機能不全のシグナルを抑制するような遺伝子の動きを認めた。

研究成果の概要(英文)：We reported a phenomenon in which male nitric oxide synthase (NOS) deficient mice showed less cerebral infarction than wild type mice. A similar cerebral infarction induction experiment was carried out one week after gonadectomy surgery, considering the influence of sex hormone, and the cerebral infarction significantly increased by orchidectomy. The effect of orchidectomy was counteracted by supplementation with testosterone. In the situation where NOS was deficient, it was suggested that there is protective effect of testosterone on pathology of cerebral infarction.

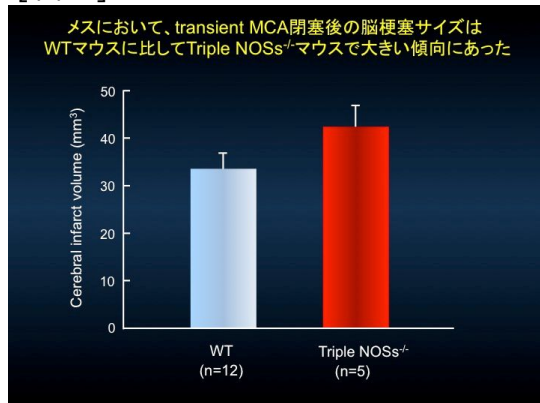
RNA expression in cerebral infarct tissue was examined by next generation sequencer analysis and it was confirmed that the NOS completely deficient mouse showed a gene movement that suppresses oxidative stress and mitochondrial dysfunction signals compared with wild type mouse.

研究分野：麻酔・集中治療

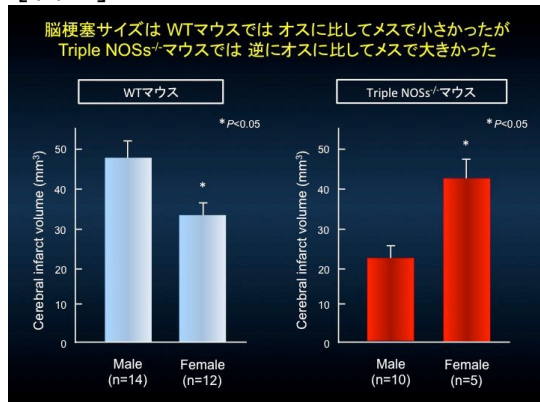
キーワード：脳虚血 再灌流 一酸化窒素合成酵素 テストステロン 酸化ストレス ミトコンドリア機能不全 性差 マウス

1. 研究開始当初の背景

われわれは以前に、生体内シグナル伝達分子である一酸化窒素(NO)の合成酵素(NOS)全てを欠損させたマウスを用いて中大脳動脈閉塞(MCAO)・再灌流の実験を行い、オスのNOS全欠損マウスは、オスの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ことを報告した。(若手研究B, 2012-4, 課題番号24791605)メスを用いて同様の実験をしたところ、逆にNOS全欠損マウスで野生型マウスと比較して脳梗塞のサイズが大きくなった。(図1、2) [図1]



[図2]



2. 研究の目的

上記の結果より、以下の計画を立てた。

- (1) 性ホルモンの関与の有無を確認するために性腺除去術や性ホルモンの補充の過程をMCAO実験の前に加え検討する。
- (2) 脳梗塞組織で発現する遺伝子にどのような種差があるのかを確認する。

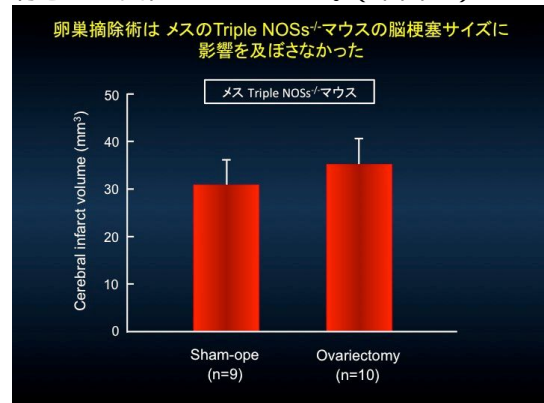
3. 研究の方法

- (1) NOS全欠損マウスに性腺(精巣または卵巣)除去手術または皮膚切開のみの偽手術を施行し、その1週間後にMCAO実験を行い、脳梗塞サイズの計測などを行う。
- (2) 性腺除去と同時に性ホルモン製剤(エストロゲンやテストステロン)を充填したチューブの埋込にて補充し、1週間後に同様の検討を行う。コントロール群には、空のチューブの埋込を行う。

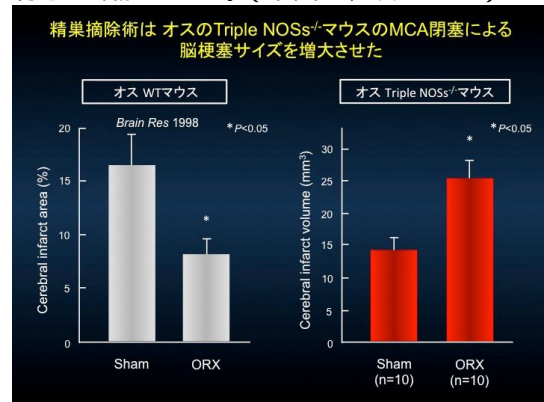
- (3) オスのNOS全欠損マウスと野生型マウスについて、中大脳動脈閉塞・再灌流による脳梗塞誘導実験直後に脳を取り出し、脳組織中の次世代シーケンサー解析を行う。得られた網羅的な遺伝子発現データを pathway 解析、TOX 解析にかける。

4. 研究成果

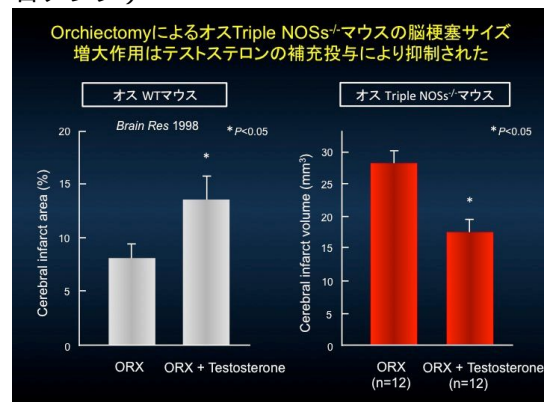
- (1) メスのNOS全欠損マウスについて、卵巣除去の前処置はMCAOによる脳梗塞サイズを有意には変化させなかった。(下図3)



- (2) オスのNOS全欠損マウスについて、精巣除去の前処置はMCAOによる脳梗塞サイズを有意に増加させた。(下図4、右グラフ)



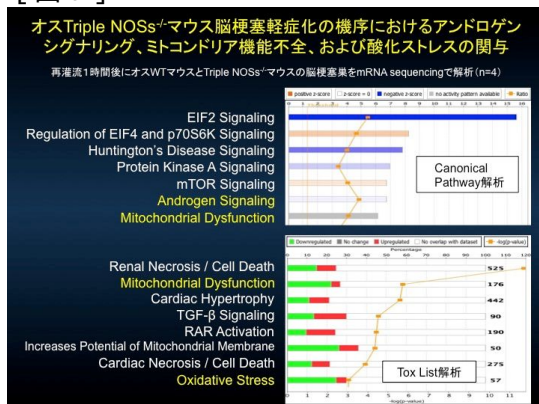
- (3) (2)で見られた精巣除去による脳梗塞サイズの増加は、テストステロンの補充によりうち消されることが確認された。(下図5、右グラフ)



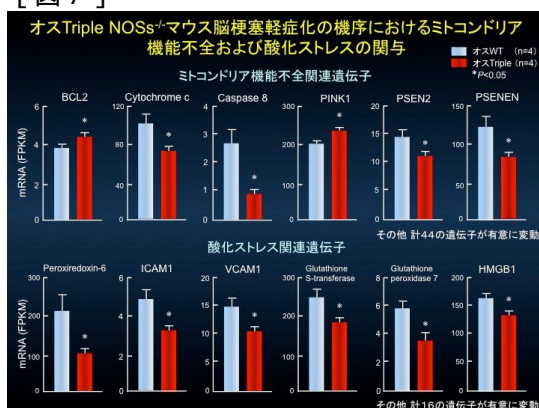
- (4) 次世代シーケンサー解析によって、オスのNOS全欠損マウスの脳梗塞組織では、オスの野生型マウスと比較し、「酸化ストレス」

や「ミトコンドリア機能不全」のシグナルが減弱しているような遺伝子発現の動きを認めた。(図6、7)

[図 6]



[図 7]



テストステロンの細胞修復と生存への作用は細胞傷害が軽度な場合は問題なく有益に機能するが、傷害が高度な場合は、細胞修復に大量のエネルギーを消費し枯渇させ、それが原因となる細胞死を誘導する。NOSs系完全欠損マウスのMCA閉塞処置後は、活性窒素種 peroxynitriteの産生が有意に少なくなることがわかっていて、細胞傷害が軽度であるためテストステロンによるエネルギー枯渇が生じにくい可能性を考える。

NOSs系完全欠損マウスは加齢性変化で生じる血管内皮機能低下を一部模倣し表現するモデルであると考えられる。加齢に伴い、血管内皮機能と男性ホルモン機能それぞれの低下の有り方は個人差があるだろう。近年、ヒトで行われている更年期障害への性ホルモンの補充が脳卒中や心筋梗塞のリスクを高める可能性があるという指摘があり、この2つの生理的機能の相補的な関係を理解する必要があるのではないかと考えさせられる結果を得た。

今後、NOSsと性ホルモンが脳梗塞の病態にどのように関与しているのか、さらなる分子機序を明らかにしていく予定である。

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 1 件)

(1) Kina M, Sakanashi M, Tanimoto A, Kaname T, Matsuzaki T, Noguchi K, Uchida T, Nakasone J, Kozuka C, Ishida M, Kubota H, Taira Y, Totsuka Y, Kina S, Sunakawa H, Omura J, Satoh K, Shimokawa H, Yanagihara N, Maeda S, Ohya Y, Matsushita M, Masuzaki H, Arasaki A, Tsutsui M. Long-term dietary nitrite and nitrate deficiency causes the metabolic syndrome, endothelial dysfunction and cardiovascular death in mice. Diabetologia. 査読有、60巻、2017年、1138-1151ページ

[学会発表] (計 1 件)

(1) 久保田陽秋、野口克彦、坂梨まゆ子、松崎俊博、仲宗根淳子、下川宏明、須加原一博、垣花学、筒井正人
脳梗塞における NO 合成酵素の有害な作用 - 性差およびテストステロンの関与 -
第 46 回 日本心脈管作動物質学会、2017 年

[図書] (計 件)

[産業財産権]

出願状況 (計 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 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

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

野口 克彦 (NOGUCHI Katsuhiko)

琉球大学・医学研究科・准教授

研究者番号：70156181

松崎 俊博 (MATSUZAKI Toshihiro)

琉球大学・医学研究科・助教

研究者番号：50244330

坂梨 まゆ子 (SAKANASHI Mayuko)

琉球大学・医学研究科・助教

研究者番号：80363662

筒井 正人 (TSUTSUI Masato)

琉球大学・医学研究科・教授

研究者番号：70309962