

平成 29 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：2015～2016

課題番号：15K21252

研究課題名(和文) 3MST knock out マウスを用いた血圧調整機序の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the blood pressure adjustment mechanism using 3MST knockout mouse

研究代表者

戸塚 裕一 (Totsuka, Yuichi)

琉球大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：30747704

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：硫化水素が血管拡張作用、細胞保護作用、虚血再灌流障害抑制作用、抗炎症作用など多岐にわたる生理活性をもつガスであることが知られるようになった。硫化水素合成酵素の一つである 3-Mercaptopyruvate(3MST)に注目し、3MST-KOマウスとWTマウスを使用してその作用を検証した。まず血圧測定にて3MST-KOマウスが高血圧であることを見出した。心拍出量に両群間に有意差はなく、3MST-KO群にて末梢血管抵抗の上昇を認めた。3MST-KO群で血漿PGI2低下および尿中8-isoprostane増加を認め、血管抵抗上昇の機序に酸化ストレス増大が一部に関与していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：It came to be known that hydrogen sulfide was gas with a wide variety of bioactivity including vasodilator action, cytoprotective property, inhibitory effect of ischemic reperfusion injury, anti-inflammatory action. We paid attention to one of the hydrogen sulfide synthase 3-Mercaptopyruvate(3MST) using 3MST-KO and WT mouse. We found that 3MST-KO mouse was hypertension. Cardiac output was comparable between both groups, whereas peripheral vascular resistance was increased in a group of 3MST-KO. There were plasma PGI2 decrease and urinary 8-isoprostane increase in 3MST-KO, and it was suggested that an oxidative stress increase was associated with a part for a mechanism of the vascular resistance increase.

研究分野：心臓血管外科

キーワード：3MST 高血圧 硫化水素

1. 研究開始当初の背景

近年、腐卵臭や皮膚粘膜刺激作用のため有害物質として広く認知されている硫化水素が生体内でも産生されることがわかり、その研究、医療応用に期待が高まっている。硫化水素は含硫アミノ酸である Cysteine から生成される。現在知られている硫化水素産生酵素は cystathionine beta-synthase (CBS)、cystathionine gamma-lyase (CSE)、3-mercaptopyruvate sulfurtransferase (3MST) の 3 つであるが、CBS は主に脳にその局在が知られており中枢神経系への関与が示唆されている。一方 CSE は脳内では発現しないとの報告があり、肝臓や腎臓、腸管や血管平滑筋に広く認められている。2008 年に R Wang らは CSE knockout マウスに関する研究で、EDRF 活性が抑制されることにより高血圧であることを報告した。3MST に関しては報告が少なく、ユビキタスな酵素と考えられているが、3MST の役割は未だ十分に解明されていない。

2. 研究の目的

3MST knock out マウスを用い、生理学的、生化学的、薬理的な手法を用いてその表現型を解明する。硫化水素の生体への影響および 3MST の役割を明らかにし、臨床応用につなげることを目的とし、3MST は血圧の調節に役割を果たしているという仮説を検証した。

3. 研究の方法

3MST 欠損マウスとその野生型 (WT) littermates を実験に使用した。マウスの尻尾より PCR でジェノタイピングを行い、3-MST の mRNA と蛋白質の欠損を RT-PCR 法とウエスタンブロット法にてそれぞれ確認した。血圧はテールカフ法とテレメトリー法で測定した。末梢血管抵抗を測定するため、マウスの頸動脈より圧トランスデューサーを挿入し、上行大動脈の血流を超音波血流計で測定することにより算出した。マウスの腸間膜動脈を採取し、マイクロオーガンチャンバー内に固定した腸間膜動脈の、フェニレフリン、KCL、アセチルコリン、Sodium Nitroprusside (SNP) に対する血管収縮および弛緩反応を測定した。テレメトリー法にて得られた心拍変動のゆらぎを周波数解析し、交感神経および副交感神経活動を評価した。血漿 NOx レベルを Griess HPLC 法により測定し、尿中 8-isoprostane レベル、血漿 6-keto PGF1 レベルを ELISA 法にて測定した。

4. 研究成果

WT マウスでは心臓、腎臓、脳、肺を含む様々

な臓器において 3MST の mRNA および蛋白質の発現が ubiquitous に認められたが、一方で 3MST-KO マウスでは上記臓器における発現の抑制がみられた (Fig1)。

Tail-cuff 法および telemetry 法で測定した収縮期血圧は、WT マウスに比して 3MST 欠損マウスで有意に高かった (Fig2, Fig3)。

イソフルラン吸入麻酔下で超音波血流計を用いて測定した心拍出量 (上行大動脈の血流量) は両マウス間で差がなかったが、心拍出量と圧トランスデューサーを用いて測定した大動脈の血圧値から算出した末梢血管抵抗は WT マウスに比して 3MST 欠損マウスで有意に増加していた (Fig4)。

単離した細い腸間膜動脈における血管反応性は両マウス間で差はなかった (Fig5)。

Telemetry 心電図法で評価した交感神経活性も両マウス間で差はなかった (Fig6)。

血漿中 NOx レベルは、低下しているのではなくむしろ増加していた (Fig7)。

一方、血漿 PGI₂ レベルは、WT マウスに比して 3MST 欠損マウスで有意に低下していた (Fig8)。

さらに、血漿 8-isoprostane レベル (酸化ストレスの指標) は WT マウスに比して 3MST 欠損マウスで有意に増加していた (Fig9)。

3MST-KO マウスが高血圧であることを明らかにした。この機序は PGI₂ 産生低下と酸化ストレス増大が一部に関与していることが示唆された。

Absence of 3MST mRNA and Protein Expressions in 3MST-KO Mice

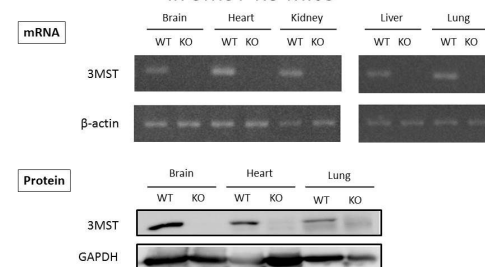


Figure 1. The absence of 3MST mRNA and protein expressions in each organs of 3MST-KO mice were confirmed by reverse transcription-PCR and Western blot analysis, respectively.

Elevated Systolic Blood Pressure in 3MST-KO Mice Measured by Tail-Cuff Method

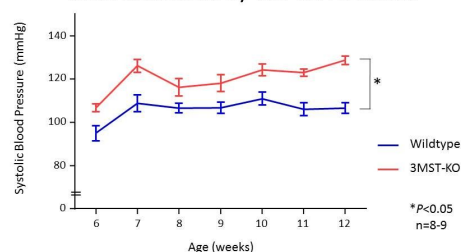


Figure 2. Systolic blood pressure levels, measured by the tail-cuff method, were significantly higher in the 3MST-KO than the WT mice at 6 to 12 weeks of age. *P<0.05 n=8-9

Systolic Blood Pressure by Telemetric measurement

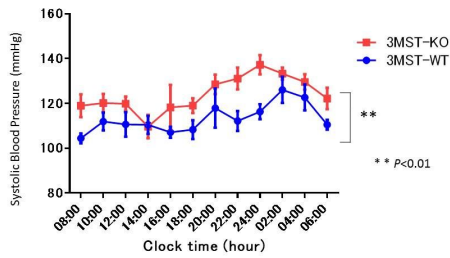


Figure 3. Systolic blood pressure levels, measured by the telemetry method, were also significantly higher in the 3MST-KO than the WT mice.

Increased Peripheral Vascular Resistance in 3MST-KO Mice

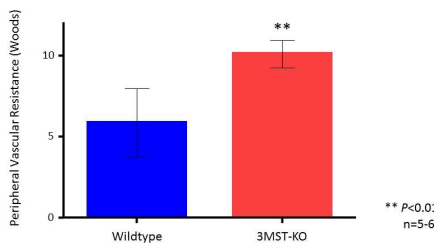


Figure 4. Peripheral vascular resistance was significantly more increased in the 3MST-KO than the WT mice.

Vascular Functions in Small Mesenteric Arteries of 3MST-KO Mice

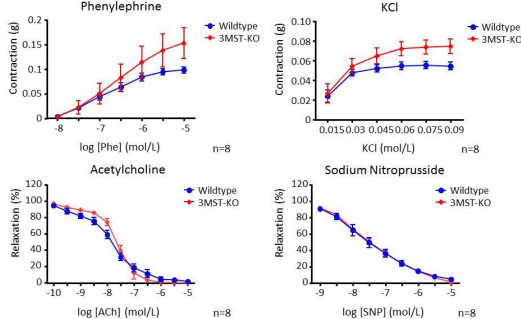


Figure 5. There were no significant differences in contractions to phenylephrine and KCl and relaxations to acetylcholine (ACh) and sodium nitroprusside (SNP) in isolated small mesenteric arteries between the 3MST-KO and the WT mice.

Sympathetic and Parasympathetic Nerve Activities in 3MST-KO Mice

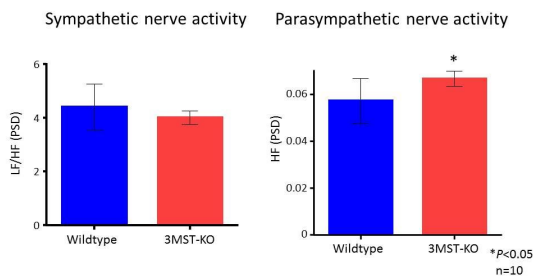


Figure 6. Sympathetic nerve activities, as assessed by the low frequency power (LF)/high frequency power (HF) ratio (LF/HF) of telemetry-electrocardiographic heart rate variability, were similar between the 3MST-KO and the WT mice. Parasympathetic nerve activities, as assessed by high frequency (HF), were not reduced, but rather significantly higher in the 3MST-KO mice.

Increased Plasma Nitrite and Nitrate (NOx) Levels in 3MST-KO Mice

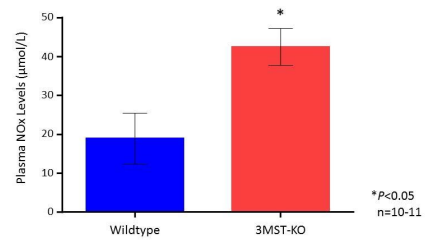


Figure 7. Plasma NOx levels, a marker of NO production, were not decreased, but rather significantly increased in the 3MST-KO mice as compared with the WT mice

Lower Plasma 6-Keto PGF_{1α} Levels in 3MST-KO Mice

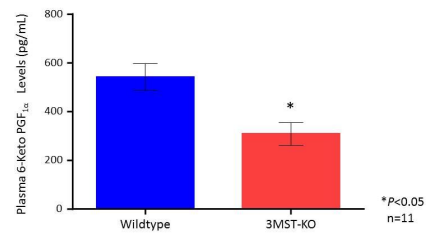


Figure 8. Plasma 6-keto PGF_{1α} levels, a marker of PGI₂ production, were significantly lower in the 3MST-KO than in the WT mice.

Higher Urinary 8-Isoprostane Levels in 3MST-KO Mice

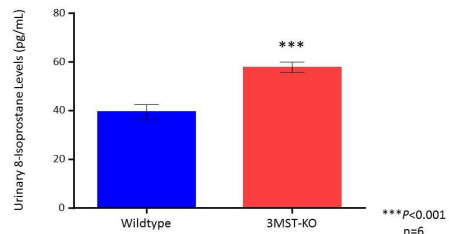


Figure 9. Urinary 8-isoprostane levels, a marker of oxidative stress, were significantly higher in the 3MST-KO than in the WT mice.

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)

〔学会発表〕(計 4 件)

1. 筒井正人、戸塚裕一、國吉幸男 他. 高血圧における 3-Mercaptopyruvate Sulfurtransferase(3MST)の役割. 第 90 回日本薬理学会年会 2017. 長崎ブリックホール. 長崎県長崎市. 2017 年 3 月 16 日

2. 戸塚裕一、國吉幸男、筒井正人 他. 3-Mercaptopyruvate sulfurtransferase 欠損マウスにおける高血圧. 第 46 回日本心臓血管動物物質学会 2017. 琉球大学. 沖縄県中頭郡西原町. 2017 年 2 月 10 日

3. Tsutsui M, Totsuka Y, Kuniyoshi Y et al.
Hypertension in mice lacking
3-mercaptopyruvate sulfurtransferase.
American Heart Association, Scientific
Sessions 2016. Ernest N. Morial Convention
Center, New Orleans, Louisiana, USA.
Nov.13,2016

4. Totsuka Y, Kuniyoshi Y, Tsutsui M et al.
Hypertension in mice lacking
3-mercaptopyruvate sulfurtransferase.
Mechanisms of vasodilation.12th
International Symposium.2016. Mayo Clinic,
Rochester, Minnesota, USA. Nov.7,2016

6 . 研究組織

(1)研究代表者

戸塚 裕一 (Totsuka, Yuichi)

琉球大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：30747704