

令和 2 年 9 月 15 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K10968

研究課題名(和文) Arginase阻害による肺高血圧治療の検討

研究課題名(英文) Inhibitory effect of arginase on pulmonary hypertension

研究代表者

新堀 博展 (Shinbori, Nobuhiro)

横浜市立大学・医学研究科・客員准教授

研究者番号：60404993

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：肺血管内皮機能の低下が肺高血圧発症の原因の一つとされている。我々は肺動脈内皮機能依存性弛緩反応及び、eNOS活性がモノクロタリン誘発肺高血圧ラットにおいて減弱していることを観察した。一方でNOS発現は変化なく基質を競合するarginaseは亢進してした。以上からarginaseの発現亢進が内皮機能低下に関連していると可能性が示唆された。肺高血圧ラットにおいてarginase阻害剤NOHA単独では内皮依存性弛緩反応を変化なかったが、基質であるarginineを加えると改善が見られた。以上からarginase発現亢進とarginineの利用障害の可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肺高血圧症の併存は周術期の心血管合併症の発症率を有意に上昇させ、重症例では依然として管理は困難である。我々は肺高血圧ラットモデルを用い、肺高血圧症の原因の一つである肺血管内皮障害とそれに伴う一酸化窒素産生の低下を改善させる方法について、検討を行った。一酸化窒素合成酵素の活性低下の原因として、arginaseの発現亢進と一酸化窒素合成酵素の基質であるarginineの利用障害の可能性が示唆された。重症肺高血圧症の管理は依然困難であり、詳細な機序解明は新たな治療法の開発につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Impairments of endothelial nitric oxide synthesis (eNOS) activity and nitric oxide (NO) are well known to play a critical role in developing pulmonary hypertension (PH). In monocrotaline-induced rats, decreased eNOS activity and endothelium dependent relaxation (EDR) of PA ring were accompanied with increased arginase expression, which compete substrate with eNOS. Pretreatment of NOHA, arginase inhibitor, and arginine recovered EDR in PH rats. In PH rats, increased arginase expression and impaired availability of arginine could be associated with decreased EDR. Exploration of mechanism of arginase activity and arginine availability may be useful to develop novel treatment for PH.

研究分野：麻酔科学

キーワード：arginase 肺高血圧 eNOS arginine

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

内皮由来一酸化窒素合成酵素 (eNOS) の活性低下と一酸化窒素 (NO) 産生減少は多くの血管障害に関与している。Arginase は eNOS と基質の L-arginine を共有するが、その活性亢進は競合的に eNOS 活性を低下させ、心血管障害、炎症性疾患の発症に関与している証拠が近年蓄積されていた。動脈硬化、高血圧、喘息等の疾患モデルにおいて、亢進した arginase を抑制することで NO 産生が改善されたことから、arginase は心血管、炎症性疾患のあらたな標的として注目された。

肺高血圧症において eNOS 活性低下と NO 産生減少は、肺高血圧症の原因の一つであるが、その経路は様々な経路で修飾される。肺組織においても arginase の発現は知られていたが、肺血管、肺高血圧における役割は殆ど知られていなかった。

2. 研究の目的

Arginase の肺血管における役割の解明と、肺高血圧における病態とその抑制による肺高血圧治療の可能性を探求する。

3. 研究の方法

1) モノクロタリン MCT 誘発肺高血圧ラットモデルを用いた、肺血管リング標本の張力測定と arginase 阻害薬、arginine による影響の評価。

MCT 誘発肺高血圧モデルは 8 週齢ラットに 60mg/kg モノクロタリンを皮下注射し、4 週間後に血行動態、リング標本張力測定による内皮機能測定を行った。

2) MCT 肺高血圧および正常ラット肺組織における eNOS 活性の測定と arginase、eNOS と発現量の測定。

ラット肺組織をホモジナイズし、arginase, eNOS 活性は市販の測定 ELISA キットで行い、発現量は western blot1 で測定した。

4. 研究成果

我々は、肺高血圧における NO 低下への arginase の関与を調べるため、ラット肺血管リング標本を用いた等尺性張力測定によって肺動脈の内皮機能依存性弛緩反応 endothelium dependent relaxation (EDR) から eNOS 活性の一つの指標として測定した。モノクロタリン (MCT) 誘発肺高血圧ラットは正常ラットに比較して内皮依存弛緩反応 EDR の有意な減弱を認め (図 1)、また ELISA により肺組織における eNOS 活性の低下を観察した。

図 1 ラット肺動脈における内皮依存性弛緩反応(EDR)。
最大 EDR はモノクロタリン誘発肺高血圧 (MCT) は正常 (control) に比較し有意に低下していた。

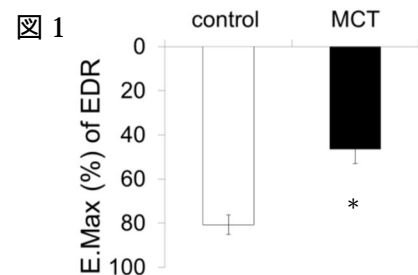
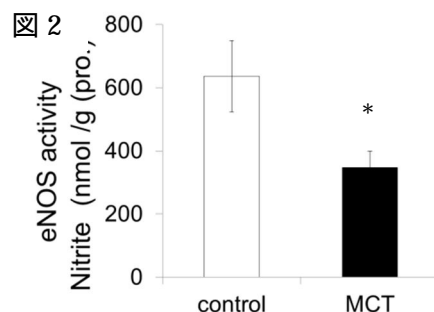


図 2 ラット肺組織 eNOS 活性
eNOS 活性はモノクロタリン誘発肺高血圧 (MCT) は正常 (control) に比較し有意に低下していた。



肺組織において western blot による eNOS の発現量測定では (図 3 A) 両群で変化はなかった一方、Arginase の発現は著明に亢進してした。(図 3 B)

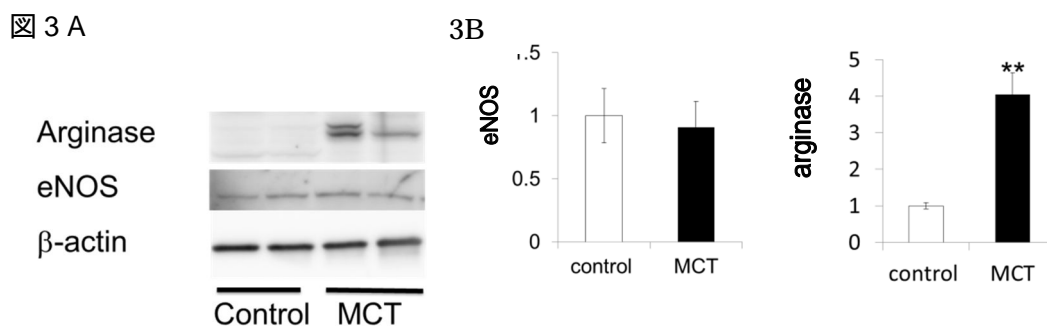
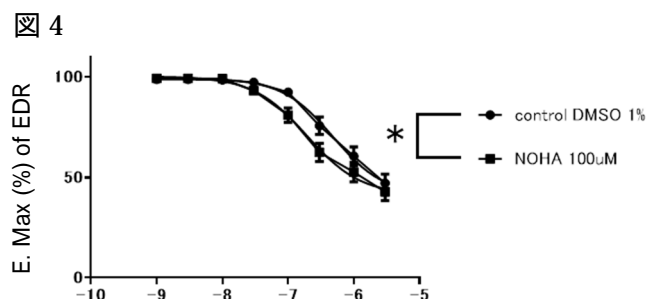


図 3 ラット肺組織における western blot analysis (A)による eNOS, arginase 発現測定 (B)。モノクロタリン誘発肺高血圧 (MCT) 正常(control) , β -actin は内因性コントロール

以上から、eNOS 活性の低下、EDR の減弱には eNOS と基質を競合する arginase の発現亢進が関与している可能性が示唆された。

そこで、arginase 阻害剤 NOHA の存在下に、肺血管内皮依存性弛緩反応を観察すると、正常ラットでは弛緩反応は左方移動したが (図 4) 肺高血圧ラットでは変化なかった。

図 4 正常ラット肺動脈の EDR。Arginase 阻害剤 NOHA 存在下で EDR は左方移動した。



高血圧ラットの肺動脈において、arginase 阻害薬 NOHA 単独の投与では肺高血圧血ラットの内皮由来弛緩反応は改善しなかったが (図 5) NOHA に更に arginine を加えると左方移動した (図 6)。

図 5、6 肺高血圧ラット肺動脈の EDR。Arginase 阻害剤 NOHA+ arginine 投与では NOHA 単独より左方移動した。

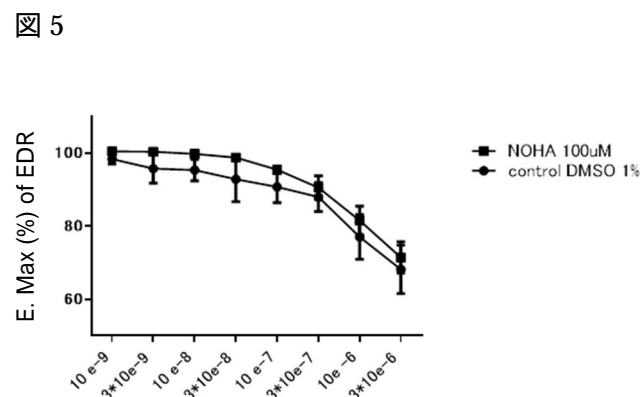
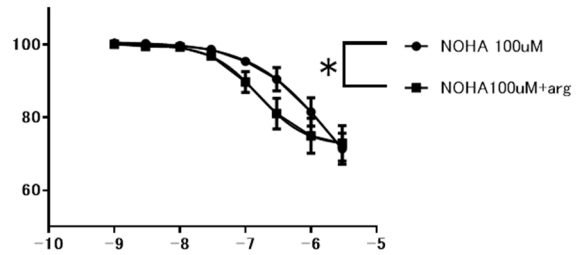


図 6



これらの結果から、正常ラットでは細胞内の arginine の availability が保たれており、arginine 阻害薬のみで eNOS 活性が上昇したが、肺高血圧ラットでは arginase 活性上昇に加え内因性の arginine の枯渇等、何等かの理由による arginine 利用障害が存在すると考えられた。

以上より、肺高血圧症に対し arginase 阻害と arginine の併用が有用である可能性が示唆された。モノクロタリン誘発肺高血圧ラットは中等度の肺高血圧を呈すとされ、異なる原因による肺高血圧症においても同様に arginase 亢進が関与しているかは不明である。

今後、様々な病因の肺高血圧患者や動物モデルにおける arginase の役割と内因性の arginine の利用障害の機序解明が、治療法開発に有益と思われる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Shinya Oku
2. 発表標題 Role of protein kinase D1 in pulmonary hypertension in rats
3. 学会等名 Experimental Biology 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	古賀 資和 (Koga Motokazu) (00637233)	横浜市立大学・医学部・助教 (22701)	
研究分担者	水野 祐介 (Mizuno Yusuke) (80433192)	横浜市立大学・附属病院・准教授 (22701)	