

令和 2 年 5 月 21 日現在

機関番号：33303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K15579

研究課題名(和文)冠動脈狭窄と可溶性グアニル酸シクラーゼヘム鉄の酸化還元状態

研究課題名(英文)Coronary artery stenosis and the redox state of soluble guanylate cyclase

研究代表者

田和 正志(TAWA, Masashi)

金沢医科大学・医学部・講師

研究者番号：10510274

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：冠動脈における可溶性グアニル酸シクラーゼ(sGC)ヘム鉄の酸化還元状態が狭窄の進行に伴い変化するのかについて、病理学的、生化学的ならびに生理学的手法を駆使して評価した。その結果、sGCヘム鉄の酸化還元状態は狭窄が生じる以前に変化することが明らかとなった。したがって、狭窄を起こす危険性がある冠動脈では、還元型sGCを刺激する一酸化窒素(NO)供与剤よりも酸化型/アポsGCを刺激するsGC活性化剤の方が有用であると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究より得られた知見は冠動脈狭窄の病態生理解明の一助となるのみならず、新たな薬物治療法確立に貢献するものである。冠動脈疾患の治療薬としてはNO供与剤が汎用されているが、耐性などの面から使用には制限があり、作用機序の異なる新規薬剤の開発が望まれている。sGC活性化剤がNO供与剤に代わる選択肢になり得ることを示した点は新規性が高く、かつ臨床的な意義も大きい。

研究成果の概要(英文)：This study investigated whether soluble guanylate cyclase (sGC) redox state in coronary arteries changes with the progress of stenosis, using pathological, biochemical and physiological methods. The results showed that sGC redox state changes before the formation of atherosclerotic stenosis. This finding suggests that sGC activators, which stimulate the oxidized/apo sGC, are superior to nitric oxide (NO) donors, which stimulate the reduced sGC, as cGMP-generating drugs in coronary arteries at risk of stenosis.

研究分野：循環薬理学

キーワード：可溶性グアニル酸シクラーゼ 一酸化窒素 冠動脈狭窄 酸化還元状態

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

冠動脈狭窄により心筋へ十分な血流を供給できなくなる冠動脈疾患は主要な死亡原因の一つであり、高齢化や生活習慣の変化に伴いその患者数は年々増加している。この冠動脈疾患の特徴として挙げられるのが冠動脈における一酸化窒素 (NO) の生物学的利用能低下である。NO は可溶性グアニル酸シクラーゼ (sGC) を活性化することで cGMP を産生し、血管拡張、血小板凝集抑制、細胞増殖抑制など生体維持にとって重要な作用を惹起するが、NO による sGC 活性化には 2 価状態のヘム鉄 (還元型 sGC) が必須であり、それが 3 価の状態 (酸化型 sGC) へ変化したり、あるいはヘムが脱離 (アポ sGC) してしまうと NO は活性化できなくなる。

研究代表者らはこれまでに、血管壁における sGC がある種の活性酸素種 (ROS) によって還元型から酸化型 / アポへと移行することを明らかにしてきた [ ]。また、海外では病態との関連に着目した研究も進められており、動脈硬化の危険因子である高血圧、高脂血症、糖尿病、肥満などで sGC ヘム鉄の酸化還元状態が破綻することが報告されている [ ]。しかし、sGC ヘム鉄の酸化還元状態が器質的な病変を有する冠動脈で変化しているのかについての知見はなく、この破綻が NO の生物学的利用能低下の一因を担うのかは不明であった。

### 2. 研究の目的

狭窄を起こした病的な冠動脈における sGC ヘム鉄の酸化還元状態を明らかにし、冠動脈狭窄の病態生理解明、新たな薬物治療法の提案を目的とする。

### 3. 研究の方法

ヒトの冠動脈疾患との類似性が高い高コレステロール食給餌ウサギをモデル動物として利用し、経時的な変化についても確認するために長短の異なる給餌期間を設けて検討した。つまり、雄性日本白色ウサギに 1% 高コレステロール食を 14 週齢から 4 週間 (S-HC 群) あるいは 6 週齢から 12 週間 (L-HC 群) 与え、正常食を 6 週齢から 12 週間 (N 群) 与えた対照のウサギと比較した。給餌期間終了後、深麻酔下で血液を採取し、その後、心臓を摘出、冠動脈を単離した。得られた生体試料は以下の解析に供した。

- (1) 血液中の脂質が増減しているのかを確認するために、得られた血液から血漿を分離し、LDL-コレステロールおよび中性脂肪を測定した。
- (2) 冠動脈に器質的な変化が生じているのかを確認するために、単離した冠動脈からパラフィン切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色を実施した。
- (3) sGC 刺激を介する血管弛緩反応が増減しているのかを確認するために、単離した冠動脈かららせん状標本作製し、一般的な摘出臓器実験法であるオーガンチャンバー法に準じて、sodium nitroprusside (SNP、NO 供与剤：還元型 sGC を刺激) あるいは BAY 60-2770 (sGC 活性化剤：酸化型 / アポ sGC を刺激) 添加による等尺性張力変化を観察した。
- (4) sGC 刺激を介する cGMP 産生が増減しているのかを確認するために、単離した冠動脈を生理的溶液中で SNP あるいは BAY 60-2770 に曝露させ、その cGMP 含量を酵素免疫測定法によって測定した。
- (5) sGC の発現が増減しているのかを確認するために、単離した冠動脈からパラフィン切片を作製し、sGC B1 抗体による免疫染色を実施した。

### 4. 研究成果

- (1) N 群の LDL-コレステロール値と比較して、S-HC 群および L-HC 群の値は有意に高く、それぞれ 135 倍および 163 倍に上昇した。また、中性脂肪は N 群と S-HC 群間には有意な差は認められなかったが、L-HC 群では有意に高値を示した。
- (2) S-HC 群の冠動脈には粥腫やそれに伴う内腔狭窄はなかったが、内膜へのコレステロール沈着は認められた。一方、L-HC 群では著明な粥腫ならびに重度の狭窄が生じていた (図 1)。

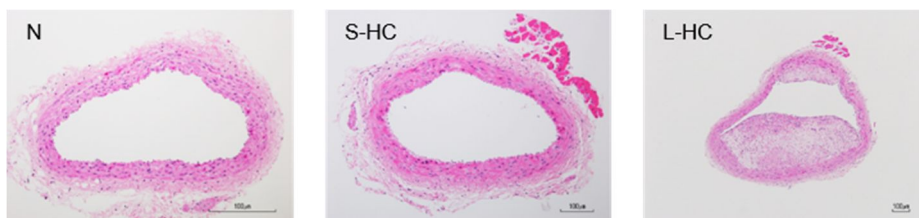


図 1 冠動脈のヘマトキシリン・エオジン染色像

(3) SNP (10 nM) による冠動脈の弛緩反応は N 群と S-HC 群間には有意差はなかったが、L-HC 群では有意に減弱していた。また、BAY 60-2770 (1 nM) による弛緩反応は S-HC 群では有意差には至らなかったものの増強傾向にあり、L-HC 群では有意に減弱していた (図 2)。

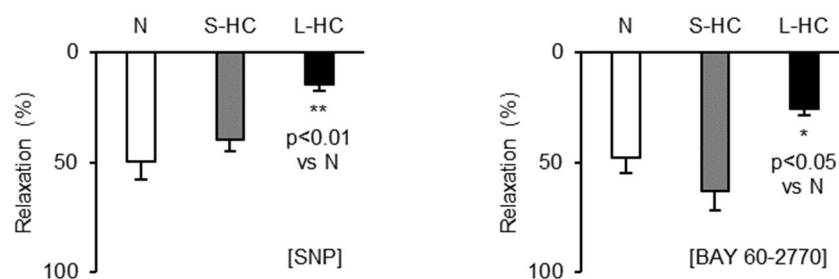


図 2 冠動脈の弛緩反応

(4) SNP (10 nM) に曝露した際の S-HC 群における冠動脈 cGMP 産生量は N 群における産生量と大差なかったが、L-HC 群における産生量は N 群より減少する傾向にあった。また、BAY 60-2770 (1 nM) に曝露した際の cGMP 産生量は N 群と比較して、S-HC 群および L-HC 群では増加する傾向にあった。

(5) 冠動脈の平滑筋における sGC 発現は N 群と S-HC 群間では差は認められなかったが、L-HC 群ではわずかに減少する傾向がみられた。また、L-HC 群では平滑筋と並んで粥腫にも強い発現を認めた。

S-HC 群の冠動脈には器質的な変化は起こっておらず、また、平滑筋の sGC 発現も変わっていないかったものの、BAY 60-2770 の血管弛緩効力および cGMP 産生能は増強した。したがって、高脂血症の状態にある冠動脈平滑筋では、その内膜面に粥腫が形成される以前に sGC が還元型から酸化型 / アポへと変化すると考えられる。また、L-HC 群では SNP による血管弛緩作用および cGMP 産生作用は共に減弱したのに対して、BAY 60-2770 による作用は血管弛緩は減弱、cGMP 産生は増強と作用間で乖離する結果となった。L-HC 群の冠動脈は平滑筋に加えて粥腫にも sGC を発現していたことから、BAY 60-2770 は粥腫で多くの cGMP を産生し、平滑筋では十分に産生できていなかった可能性が考えられる。cGMP には粥腫の安定化・退縮作用があるため、もしこの仮説が正しければ、たとえ血管拡張作用を十分に発揮できないとしても sGC 活性化剤には有用な治療薬になり得る潜在能力があることになる。つまり、狭窄が発生する以前、以後にかかわらず、sGC 活性化剤は NO 供与剤に勝る冠動脈疾患治療薬であるといえる。

本研究では、sGC ヘム鉄の酸化還元状態の破綻は粥状動脈硬化に特異的な現象であるのかを確かめるため、ウサギ高コレステロール食負荷モデルと同じく血管内腔狭窄をきたすラット頸動脈内膜肥厚モデルを用いた研究も実施した (詳細は J Vasc Res. 2019; 56: 109–116. に発表)。その結果、バルーン傷害による新生内膜形成が認められない早期の段階において、平滑筋の sGC は還元型から酸化型 / アポへと変化することが確認された。したがって、血管の器質的な変化と sGC ヘム鉄酸化還元状態の破綻は密接に関係していると考えられる。

以上をまとめると、狭窄を起こすような病的な血管では sGC ヘム鉄の酸化還元状態が変化しており、そのような血管の治療には sGC 活性化剤が著効する可能性が高い。

#### < 引用文献 >

- Tawa et al. J Vasc Res. 2014; 51: 439–446.
- Tawa et al. J Cardiovasc Pharmacol. 2015; 65: 160–167.
- Stasch et al. J Clin Invest. 2006; 116: 2552–2561.
- Alexandre et al. J Pharmacol Exp Ther. 2014; 349: 2–9.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Masashi Tawa, Takashi Shimosato, Hiroshi Sakonjo, Takayoshi Masuoka, Matomo Nishio, Takaharu Ishibashi, Tomio Okamura	4. 巻 56
2. 論文標題 Chronological Change of Vascular Reactivity to cGMP Generators in the Balloon-Injured Rat Carotid Artery	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Vascular Research	6. 最初と最後の頁 109-116
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1159/000498896	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Masashi Tawa, Tomio Okamura, Takayoshi Masuoka, Matomo Nishio, Takaharu Ishibashi
2. 発表標題 Differences in the response to BAY 60-2770 among various isolated monkey arteries
3. 学会等名 9th International Conference on cGMP: Generators, Effectors and Therapeutic Implications（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田和 正志、益岡 尚由、山下 優香、中野 克哉、西尾 眞友、岡村 富夫、石橋 隆治
2. 発表標題 高コレステロール食負荷ウサギの冠動脈における可溶性グアニル酸シクラーゼ酸化還元状態
3. 学会等名 第 29 回日本循環薬理学会・第 55 回高血圧関連疾患モデル学会 合同学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田和 正志、下里 貴、左近上 博司、益岡 尚由、西尾 眞友、岡村 富夫、石橋 隆治
2. 発表標題 内皮傷害後の血管における可溶性グアニル酸シクラーゼ酸化還元状態は経時的に変化する
3. 学会等名 第 48 回日本心脈管作動物質学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田和 正志、下里 貴、左近上 博司、益岡 尚由、西尾 眞友、石橋 隆治、岡村 富夫
2. 発表標題 バルーン傷害血管における可溶性グアニル酸シクラーゼの酸化還元状態
3. 学会等名 第 28 回日本循環薬理学会
4. 発表年 2018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
--	---------------------------	-----------------------	----