

平成21年 6月 3日現在

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19590263  
 研究課題名（和文）生活習慣病モデル動物においてATP・アデノシン系は虚血心の交感神経を保護するか？  
 研究課題名（英文）Does ATP / adenosine system protect sympathetic nerve of an ischemic heart in life-style related diseases model rat?  
 研究代表者  
 篠塚 和正（SHINOZUKA KAZUMASA）  
 武庫川女子大学・薬学部・教授  
 研究者番号：50117777

## 研究成果の概要：

自然発症高血圧ラット（SHR）や生活習慣病モデル動物（SHR.Cg-Leprcp/NDmcrats）において、交感神経終末部のATP・アデノシン受容体が機能不全を起こしていることを見いだした。一方、低酸素時には心臓から大量のアデノシンが放出され、酸素再通気後もその放出は増加し続けることを見いだした。本結果より、生活習慣病の進展とともに交感神経伝達の抑制性調節機構が破綻し、これがこの病態におけるプレコンディショニングの破綻の一部に関与している可能性が示唆された。

## 交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：中枢、末梢神経、虚血再灌流

## 1. 研究開始当初の背景

本研究代表者はこれまでの研究により、針血管系における「ATP とアデノシンを介した逆行性神経伝達抑制機構」の存在を報告しており、このような調節機構が心臓などの虚血疾患におけるプレコンディショニング効果（保護効果）の一端を担っている可能性が推察される。本研究によりこの点を明確化することは、生活習慣病の虚血性疾患時における神経保護機構の解明につながり、ひいてはその治療面での臨床研究にも貢献するものと期待される。

## 2. 研究の目的

生活習慣病動物の交感神経におけるATP・アデノシン系の抑制性調節機能の変化について明らかにするとともに、虚血時におけるATP・アデノシン系の神経保護機能との関連性とその変化の有無を明らかにする。

## 3. 研究の方法

交感神経から遊離されるノルアドレナリンはHPLC電気化学検出器で、心臓組織から放出されるATP, ADP, AMP, adenosine およ

び adenine などのプリン化合物は HPLC 蛍光検出器で微量定量を行なった。血管および心臓の張力変化は等尺性トランスデューサーを介してパワーラボに記録した。実験に供する動物は、雄性の自然発症高血圧ラット (SHR) や生活習慣病モデル動物 (SHR, Cg-Leprcp/NDmc rats) を主に使用し、対象動物としては同週齢の Wistar Kyoto ラットを使用した。

#### 4. 研究成果

最初に、病態動物の交感神経における ATP・アデノシン系の機能の変化について検討した。その結果、自然発症高血圧ラット (SHR) や生活習慣病モデル動物 (SHR, Cg-Leprcp/NDmc rats) などの病態動物の尾動脈において、神経刺激によるノルアドレナリン遊離に対し、ATP やアデノシンが全く抑制作用を示さないことを見だし、血管交感神経終末部の ATP・アデノシン受容体がともに機能不全を起こしていることを明らかにした。さらに、このような変化が血管平滑筋のアデノシン受容体でも発現していることを見いだした。

そこで、SHR におけるアデノシン受容体の変化の機序について、平滑筋弛緩反応を指標に詳細に検討した。その結果、(1)尾動脈、胸部大動脈、頸動脈において、アデノシン受容体刺激による弛緩反応は SHR で減弱していることを明らかにし、(2)アデノシン受容体刺激による血管弛緩反応の減弱は、アデニル酸シクラーゼや PKA など、cAMP 経路を含む細胞内シグナル伝達機構の機能低下ではないことを明らかにした。さらに(3)アデノシン受容体と同じ細胞内シグナル経路をもつ  $\beta_2$  受容体の刺激による弛緩反応には変化が認められないことを明らかにした。以上の結果より、アデノシン受容体の機能不全は、平滑筋細胞におけるアデノシン受容体自体の特異的な機能低下によるものであることが示された。このような変化は神経終末部のアデノシン受容体にも関連していることが推察される。

次に、他の神経伝達調節機構である KATP チャンルの機能変化と病態の関係を追求するとともに、虚血 (低酸素) 状態下でのアデノシン・ATP 系の保護的役割について検討した。

(1) 電氣的神経刺激によるラット摘出尾動脈交感神経からのノルアドレナリン遊離をニコランジルが抑制すること、この抑制作用はグリベンクラミドとトルブタミドによって拮抗され、平滑筋の KATP チャンル阻害薬の PNU-37883A では影響ないこと、さらにこの抑制作用は SHR や SHR, Cg-Leprcp/NDmc rats で著しく減弱していた事を明らかにし、交感神経に抑制性の KATP チャンルが存在す

ること、この KATP チャンルは平滑筋の KATP チャンルとは異なること、さらに上記病態動物において、このような神経性 KATP チャンル機能が低下していることを示唆した。

(2) ラット心房標本において、低酸素負荷はその心拍数および収縮力を有意に減弱させた。一方、アデノシン受容体拮抗薬の 8-sulphophenyl theophylline (8SPT) 前処理は、低酸素負荷による心拍数・収縮力の減少には影響しなかったが、酸素通気再開による収縮力の回復を有意に促進した (図 1)。

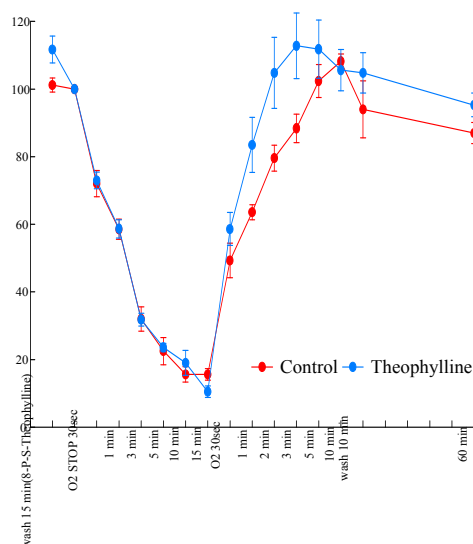


図 1 ラット心房における低酸素性陰性変力作用に対するテオフィリン処置の影響  
クレブス液交換 15 分後から測定を開始した。酸素通気中止直前の値を 100%として表示した。酸素通気中止時間は 30 分、酸素再通気 10 分後にクレブス液を交換し、60 分後の値も測定した。赤線：対照標本、青線：テオフィリン処置標本

(3) ラット心房標本において、低酸素負荷による大量のアデノシンの放出を観察し、この放出が酸素再通気によっても減少せず、その後も増加し続けることを見いだした (図 2)。このように、低酸素状態下で組織から大量に放出されたアデノシンが細胞外で機能している可能性が示された。酸素通気再開による収縮力の回復に対する 8SPT の増強作用は、このアデノシンによる心収縮抑制作用が 8SPT で拮抗されたために起こったものと推察された。また、このような持続的なアデノシンの放出はプレコンディショニング効果と関連している可能性が推察された。

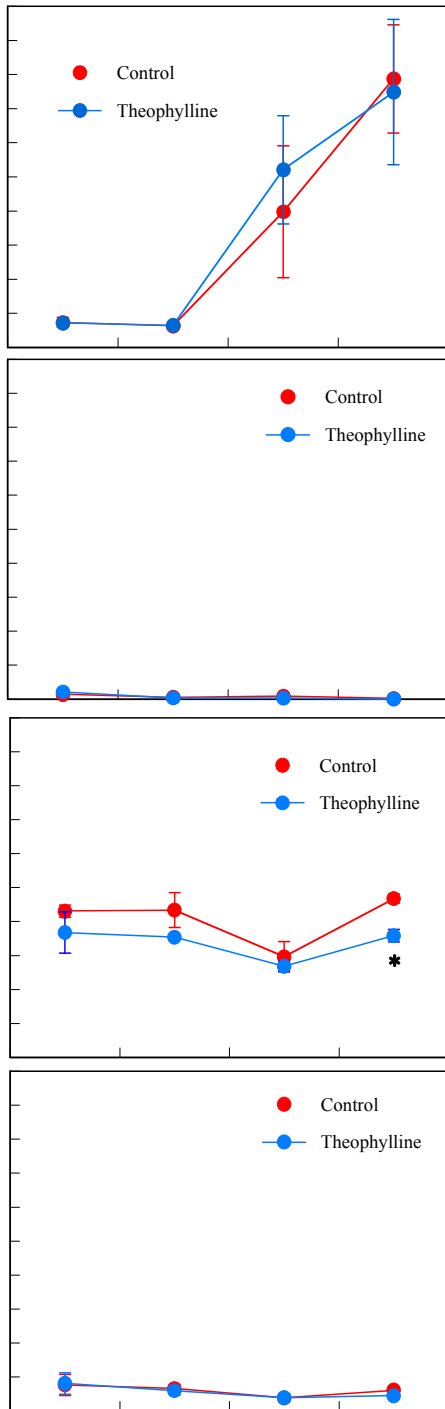


図2 ラット心房からのプリン遊離に対する低酸素（酸素通気停止）と酸素再通気の影響 赤線：対照 青線：テオフィリン処置

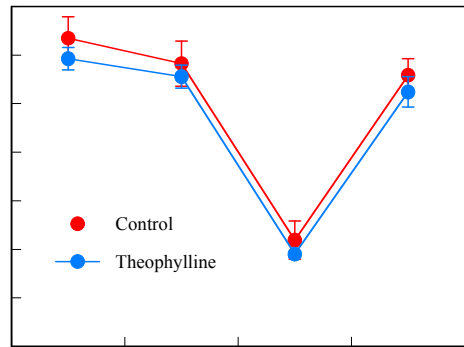


図3 クレブス液中の酸素濃度に対する低酸素（酸素通気停止）と酸素再通気の影響 赤線：対照 青線：テオフィリン処置

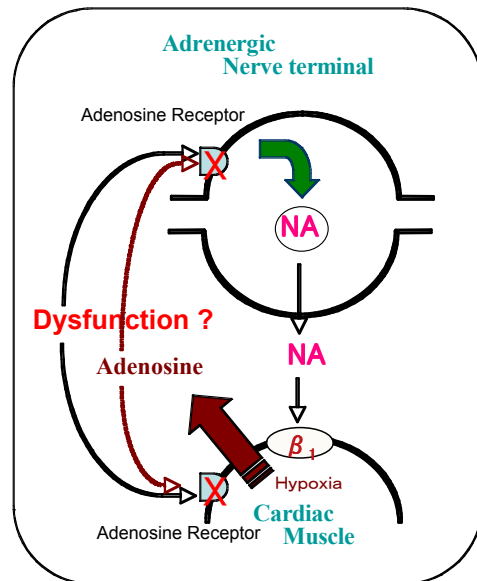


図4 生活習慣病モデル動物の心臓交感神経におけるATP・アデノシン系機能不全 心筋組織を低酸素状態にすることにより、大量のアデノシンが放出され、この放出は酸素再通気後も増加し続けた。ATPなどのヌクレオチドの放出も観察されたが、低酸素との関連性は認められなかった。一方、生活習慣病モデル動物の交感神経終末部アデノシンおよびATP受容体の遊離抑制機能は全く観察されなかった。

本研究より、高血圧や生活習慣病などの病態下の交感神経では、ATP・アデノシンシナプス前受容体に加え、KATPチャンネルによる抑制性調節機能も減弱していることが示された。また ATP・アデノシン系の調節機構は、酸素濃度が低酸素から正常レベルに戻る時期（虚血再灌流状態）に、心機能の回復に対して抑制的に影響していることが示された。これは過剰な機能回復の低減による組織保護に関連している可能性を示すもので、交感神経においても起こりうると思われる。しかしながら、生活習慣病モデル動物の交感神経終末部 ATP およびアデノシン受容体の機能は全く観察されなかったことから、これらの病態下ではアデノシン系の調節は機能していないことが示された。

生活習慣病の進展とともに起こる交感神経伝達の抑制性調節機構の破綻も、この病態におけるプレコンディショニングの破綻の一部に関与している可能性が示唆された。

#### 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 10 件）

1: Kagota S, Tada Y, Nejime N, Nakamura K, Kunitomo M, Shinozuka K. Chronic production of peroxynitrite in the vascular wall impairs vasorelaxation function in SHR/NDmcr-cp rats, an animal model of metabolic syndrome. J Pharmacol Sci. 査読あり 109(4): 556-564. (2009).

2: Nishii N, Nejime N, Yamauchi C, Yanai N, Shinozuka K, Nakabayashi T. Effects of ATP on the intracellular calcium level in the osteoblastic TBR31-2 cell line. Biol Pharm Bull. 査読あり 32(1):18-23 (2009).

3: Nejime N, Kagota S, Tada Y, Nakamura K, Hashimoto M, Kunitomo M, Shinozuka K. Possible participation of chloride ion channels in ATP release from cancer cells in suspension. Clin Exp Pharmacol Physiol. 査読あり 36(3): 278-282 (2009).

4: 橋本道男、鄭炯美、田邊洋子、禰占奈美江、多田有加里、籠田智美、篠塚和正 代謝症候群モデルラット尾動脈交感神経伝達に対するニコランジルの影響、Therapeutic Res. 査読あり 29: 7-11 (2008)

5: Nejime N, Tanaka N, Yoshihara R, Kagota S, Yoshikawa N, Nakamura K, Kunitomo M, Hashimoto M, Shinozuka K. Effect of P2 receptor on the intracellular calcium increase by cancer cells in human umbilical vein endothelial cells. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 査読あり 377(4-6): 429-436 (2008).

6: Kagota S, Tada Y, Kubota Y, Nejime N, Yamaguchi Y, Nakamura K, Kunitomo M, Shinozuka K. Peroxynitrite is involved in the dysfunction of vasorelaxation in SHR/NDmcr-cp rats, spontaneously hypertensive obese rats. J Cardiovasc Pharmacol. 査読あり 50(6): 677-685 (2007).

7: Kagota S, Kubota Y, Nejime N, Nakamura K, Kunitomo M, Shinozuka K. Impaired effect of salt loading on nitric oxide-mediated relaxation in aortas from stroke-prone spontaneously hypertensive rats. Clin Exp Pharmacol Physiol. 査読あり 34(1-2):48-54 (2007).

8: Morikawa T, Tanaka N, Kubota Y, Mizuno H, Nakamura K, Kunitomo M, Shinozuka K. ATP modulates the release of noradrenaline through two different prejunctional receptors on the adrenergic nerves of rat prostate. Clin Exp Pharmacol Physiol. 査読あり 34(7): 601-605 (2007)

9: Tei A, Tabuchi M, Nejime N, Kubota Y, Kagota S, Higashino H, Hashimoto M, Shinozuka K. Nicorandil may change the sympathetic nerve activity of SHR.Cg-*Lepr<sup>cp</sup>*/NDmcr (SHR-cp) rats. Clin Exp Pharmacol Physiol. 査読あり 34: S31-S32 (2007)

10: Nejime N, Kagota S, Yoshihara R, Tanaka N, Tei A, Kubota Y, Nakamura K, Kunitomo M, Shinozuka K. Influence of hypertension on dysfunction of regulation of adrenergic neurotransmission in SHR.Cg-*Lepr<sup>cp</sup>*/NDmcr (SHR-cp) rats. Clin Exp Pharmacol Physiol. 査読あり 34: S33-S34 (2007)

〔学会発表〕（計 6 件）

1: Nejime N, Cancer cells effect on intracellular calcium ion levels of vascular endothelial cells via P2Y receptors. 5<sup>th</sup> International Symposium on Receptor Mechanisms, Signal Transductions and Drug Effects, 2007,5,10-11 (静岡)

2: Tada Y, Changes in cardiac chronotropic and inotropic responses to beta and muscarinic

receptor agonists in SHR/NDmcr-cp rats, an animal model of metabolic syndrome. 5<sup>th</sup> International Symposium on Receptor Mechanisms, Signal Transductions and Drug Effects, 2007,5,10-11 (静岡)

3: 橋本道男、代謝症候群モデルラット尾動脈交感神経伝達に対するニコランジルの影響 第20回ニコランジル研究会、2007,10,20(東京)

4: Tei A, Effect of nicorandil on the release of noradrenaline from rat caudal artery ラット尾動脈からのノルアドレナリン遊離に対するニコランジルの影響 第81回日本薬理学会年会、2008,03,18(横浜)

5: Nejime N, Effect of cancer cells on the intracellular calcium ion levels in human umbilical vein endothelial cells via P2Y receptor 第81回日本薬理学会年会、2008,03,19(横浜)

6: Tada Y, Changes in cardiac function in SHRSP.Z-*Lepr<sup>fa</sup>*/IzmDmcr rats with metabolic syndrome 第81回日本薬理学会年会、2008,03,19(横浜)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

篠塚 和正 (SHINOZUKA KAZUMASA)  
武庫川女子大学・薬学部・教授  
研究者番号：50117777

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし