

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月11日現在

機関番号：34417

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2011

課題番号：20590847

研究課題名（和文） 虚血性心疾患における酸化ストレスの2面性と抗酸化療法ジレンマに関する研究

研究課題名（英文） The role of oxidative stress and antioxidant dilemma in ischemic heart disease

研究代表者

岩坂 壽二（IWASAKA TOSHIJI）

関西医科大学・医学部・教授

研究者番号：00098120

研究成果の概要（和文）：糖尿病心筋において誘導型一酸化窒素合成酵素の脱共役が心機能障害に重要な役割を果たし、誘導型一酸化窒素合成酵素の脱共役を抑制することによって心機能が回復し虚血耐性を獲得させることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：We have demonstrated that uncoupling of inducible nitric oxide synthase (iNOS) plays a pivotal role in cardiac dysfunction in the diabetic hearts and inhibition of iNOS uncoupling alleviate cardiac function and unmasks tolerance to ischemia/reperfusion injury in these hearts.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009年度	600,000	180,000	780,000
2010年度	400,000	120,000	520,000
2011年度	400,000	120,000	520,000
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学、循環器内科学

キーワード：臨床心血管病態学

## 1. 研究開始当初の背景

本研究の目的は高血圧、糖尿病（DM）、高脂血症、心筋症といった酸化ストレス亢進状態において施行される抗酸化療法の有用性と危険性を酸化ストレスの二面性の観点から検討することである。酸化ストレスは多くの病態において中心的な役割を果たしている。種々の病的状態に際して過剰産生される活性酸素は心筋障害や動脈硬化の主たる原因であると考えられてきた。しかし、

活性酸素の分子生物学に関する最近の知見は酸化ストレスが細胞に対して単に障害的に作用するのみでなく、非致命的な酸化ストレスが種々の致命的なストレスに対する防御機構を獲得させるうえで必須な生命現象であることを明らかにしている。短時間の非致命的虚血はその後の致命的虚血に対して強力な細胞保護効果をもたらすことが知られている。これは ischemic

preconditioning (IPC) と呼ばれ臓器や種を超えて広く観察される現象である。IPC は急性期に生じる早期 IPC と慢性期に生じる晚期 IPC に分類される。最近の研究からスーパーオキシドと一酸化窒素の反応によって生成されたパーオキシナイトライトが引き金となった細胞内情報伝達系の活性化が IPC の機序として重要であることが明らかになった。早期 IPC にはアデノシンやブラジキニンが関与する。これらの G プロテインに共役したレセプター刺激物質はプロテインキナーゼ C を活性化し、ミトコンドリア KATP チャンネルを開放する。これに伴い電子伝達系で産生されたスーパーオキシドと内皮型一酸化窒素合成酵素 (eNOS) を介して産生された一酸化窒素が反応してパーオキシナイトライトが合成される。一方、晚期 IPC における酸化ストレスの役割は明らかにされていない。我々は早期 IPC によって惹起された酸化ストレスにより発現誘導された一酸化窒素合成酵素 (iNOS)、cyclo-oxygenase II や NADPH oxidase を介して産生されたスーパーオキシドが晚期 IPC における酸化ストレスの発生源であると考えている。酸化ストレスは複数の機序でプロテインキナーゼ C やフォスファチジルイノシトール 3-キナーゼをさらに活性化し、心筋保護の情報伝達系の positive-feedback loop を形成する。それらは最終的にミトコンドリアの保護に帰結する。ミトコンドリアの保護は致死性ストレスに伴うアポトーシス、ネクローシス両方の細胞死を回避する上で最も重要である。近年種々の抗酸化療法が導入され民間療法としても定着しているが、酸化ストレスの排除は動脈硬化や心不全の進行を抑える反面、心筋梗塞のような致死性ストレスに対する耐性を減弱させている可能性があ

る。特に、DM は本邦で増加しつつある心筋梗塞の危険因子であり、かかる症例に対する抗酸化療法の是非は検討を要する課題である。

## 2. 研究の目的

心血管病における一酸化窒素合成酵素 (NOS) に関するこれまでの研究では主として内皮型 NOS (eNOS) の脱共役の役割について検討されてきた。しかし、酸化ストレスによって発現が亢進する誘導型 NOS (iNOS) や神経型 NOS 脱共役の役割は明らかではない。特に iNOS 由来の NO は心筋梗塞における虚血、再灌流障害に際して保護的に作用することが明らかにされており、糖尿病においても iNOS の脱共役を予防することは虚血、再灌流障害を予防するために重要な治療戦略になりうる事が予想される。糖尿病は心筋虚血、再灌流障害の増悪因子であることが知られている。高血糖は心筋細胞や内皮細胞に酸化ストレスをもたらし、誘導型糖一酸化窒素合成酵素 (iNOS) を過剰発現させる。酸化ストレスは一方では iNOS の共役に不可欠な BH4 を減少させ、iNOS は脱共役して大量のスーパーオキシドを産生し、さらなる酸化ストレスの増悪をもたらす。したがって、糖尿病心における iNOS の過剰発現は虚血、再灌流障害増悪に関わるひとつの機序として考えられてきた。しかし、iNOS 由来の NO は遅延型 ischemic preconditioning や resveratrol を用いた薬理的 preconditioning における心筋保護の仲介役であることが知られており、虚血、再灌流心における iNOS の役割はその共役状態に依存することが示唆される。そこで、DM ラットの摘出心を用いて虚血前に BH4 を投与し、iNOS の脱共役を抑制することによって iNOS 由来 NO が虚血、再灌流障害に対する耐性獲得に関与しているか否か

を検討した。

### 3. 研究の方法

#### 実験 1

##### (1) DM ラットの作成

250-300g 雄性 S-D ラットに 50 mg/kg の streptozotocin または生理食塩水 0.5 ml を 5 日間腹腔内投与した。28 日後に血糖を測定し、350 mg/kg 以上を示すラットを DM ラットとして実験に使用した。

##### (2) 摘出灌流心モデルの作成

ラットに 100 mg/kg のペンバルビタールナトリウムを腹腔内投与して全身麻酔し、直ちに心臓を摘出した。摘出心を 95% O<sub>2</sub>-5% CO<sub>2</sub> で平衡させた 37°C の Krebs-Henseleit 重炭酸緩衝 (KHB) 液を用いて 75 mmHg の定圧で灌流した。左心房から左室内にラテックスマルーンを挿入し、左室拡張末期圧が 5-10 mmHg となるようにバルーン容量を調節した。

##### (3) 実験群

以下の薬剤を KHB 液に添加して 30 分間灌流した。

- ① コントロール群：非 DM ラットの摘出心に溶解液 (0.01% の dimethyl sulfoxide) を投与した群
- ② DM 群：DM ラットの摘出心に溶解液を投与した群
- ③ BH4 群：非 DM ラットの摘出心に BH4 を投与した群
- ④ DM+BH4：DM ラットの摘出心に BH4 を投与した群
- ⑤ 1400W 群：非 DM ラットの摘出心に選択的 iNOS 阻害薬 1400W を投与した群
- ⑥ DM+1400W 群：DM ラットの摘出心に 1400W を投与した群
- ⑦ MPG 群：非 DM ラットの摘出心に抗酸化剤 Mercaptopropionyl glycine (MPG) を投与した群

⑧ DM+MPG 群：DM ラットの摘出心に MPG を投与した群

⑨ DM+BH4+ODQ 群：DM ラットの摘出心に BH4 と ODQ を投与した群

⑩ DTT 群：非 DM ラットの摘出心にチオール還元薬 dithiothreitol (DTT) を投与した群

⑪ DM+BH4+DTT 群：DM ラットの摘出心に BH4 と DTT を投与した群

以上の摘出灌流心を 30 分間の常温虚血に置いた後 2 時間再灌流した。

##### (4) 梗塞サイズの測定

再灌流 2 時間後に心臓を Triphenyltetrazolium chloride で染色して梗塞サイズを測定した。

##### (5) NOS の発現と活性の測定

免疫組織染色法と免疫電気泳動法を用いて内皮型 NOS、神経型 NOS および iNOS の発現を観察し、心筋における L-arginine から L-citrulline への合成速度を測定して NOS 活性を評価した。

##### (6) スーパーオキシドの測定

摘出心を dihydroethidium (DHE) を用いて灌流し、免疫組織学的にスーパーオキシドの産生を評価した。

##### (7) 窒素酸化物 (NO<sub>x</sub>; nitrite+nitrate) の測定

心筋における NO<sub>x</sub> 濃度を HPLC 法で定量し、一酸化窒素生物学的利用度の指標とした。

##### (8) タンパク S-ニトロシル化の測定

心筋タンパク S-ニトロシル化はビオチン変換法にて測定した。

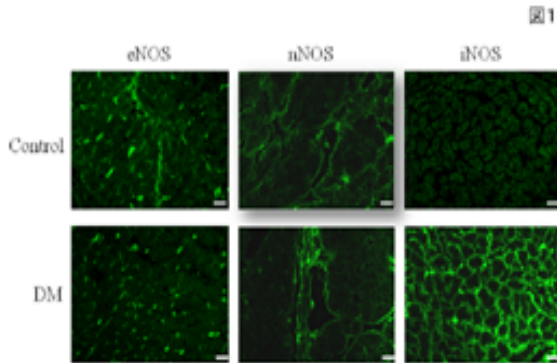
##### (9) 統計学的検討

各群間の差は ANOVA を用いて検討し、post-hoc テストには Turkey-Kramer 法を用いた。経時的変化は反復測定 2 元配置分散分析法を用いて検討し、p<0.05 で有意差と

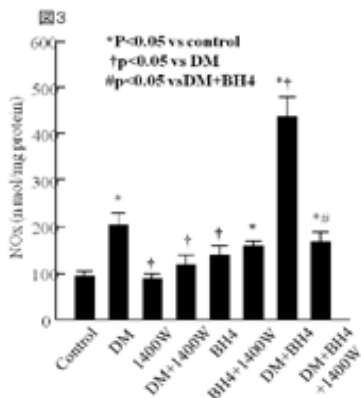
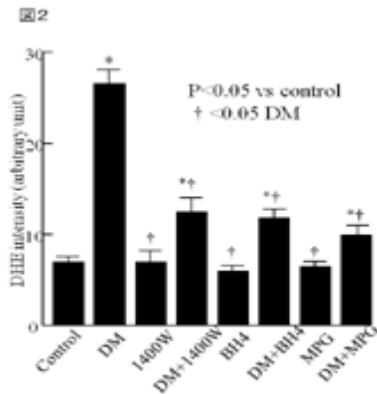
した。

#### 4. 研究成果

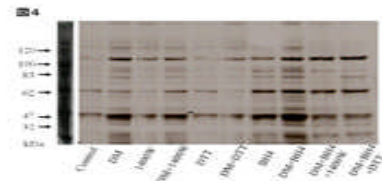
DM心筋ではeNOSやnNOSの発現には変化を認めなかったが、iNOSの過剰発現がみられた(図1)。



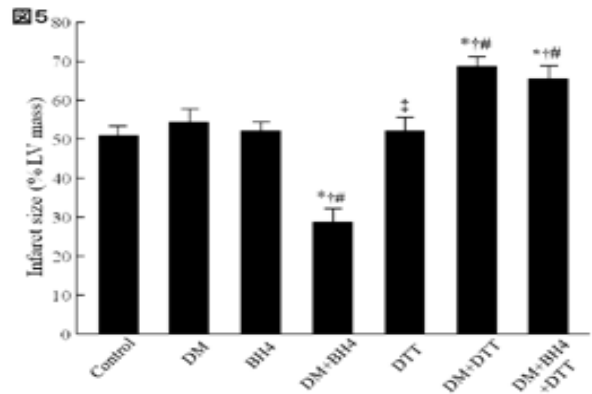
スーパーオキシドの産生は増加した。BH4とMPGはDM心筋においてスーパーオキシドの産生を抑制したが、BH4のみがNOxの産生を増加させた(図2, 3)。1400WはDM心筋においてスーパーオキシドとNOxの産生を抑制した。



BH4はDM心筋においてタンパクS-ニトロシル化を増加させ、1400WまたはDTTはその増加を抑制した。



MPGはDM心において梗塞サイズを縮小させなかったが、BH4はコントロール群と比較しても有意に心筋梗塞サイズが縮小させ、心機能を改善させた。DM心におけるBH4の心筋保護効果はDTTによって抑制された(図5)。



以上の成績からDM心筋においてiNOSの脱共役を抑制することは、NOを増加させ、タンパクS-ニトロシル化を介して虚血、再灌流障害に対する耐性を獲得させることが示唆された。

#### 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2件)

- Okazaki T, Otani H, Shimazu T, Yoshioka K, Fujita M, Katano T, Ito S, Iwasaka T. Reversal of inducible nitric oxide synthase uncoupling unmasks tolerance to ischemia/reperfusion injury in the diabetic rat heart. *J Mol Cell Cardiol.* 50: 534-544, 2011.
- Jo H, Otani H, Jo F, Shimazu T, Okazaki

T, Yoshioka K, Fujita M, Kosaki A, Iwasaka T. Inhibition of nitric oxide synthase uncoupling by sepiapterin improves left ventricular function in streptozotocin-induced diabetic mice. Clin Exp Pharmacol Physiol. 38: 485-493, 2011.

[学会発表] (計 2 件)

1. Inhibition of nitric oxide synthase uncoupling by sepiapterin improves left ventricular function in streptozotocin-induced diabetic mice. Joh H, Otani H, Okazaki T, Shimazu T, Fujita M, Yoshioka K, Satoh D, Iwasaka T. 第 74 回日本循環器学会学術集会. 2010 年 3 月 7 日.
2. Inhibition of iNOS uncoupling by tetrahydrobiopterin confers cardioprotection through protein S-nitrosylation. Okazaki T, Otani H, Yamashita K, Jo H, Yoshioka K, Moriguchi A, Iwasaka T. American Heart Association Scientific Sessions 2008. 2008 年 11 月 12 日.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

岩坂 壽二 (IWASAKA TOSHIJI)  
関西医科大学・医学部・教授  
研究者番号：00098120

### (2) 研究分担者

大谷 肇 (OTANI HAJIME)  
関西医科大学・医学部・准教授  
研究者番号：60168979

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：