

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 5月15日現在

機関番号：34517

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：平成21年度～平成23年度

課題番号：21590296

研究課題名（和文）

ATP・アデノシン系は生活習慣病モデル動物の拡張機能障害心に保護作用を示すか？

研究課題名（英文）

Protective participation of ATP/adenosine axis on the dilated cardiomyopathy of the life-style related diseases model animal.

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（和文）：

摘出心室標本からのアデノシン・ATP遊離とノルアドレナリン遊離が、低酸素状態下で増加することを見出すとともに、このようなノルアドレナリン遊離に対して、アデノシン(10 μ M)が抑制作用を示すことを明らかにしたが、アデノシン受容体拮抗薬の8SPT(30 μ M)は低酸素状態下のノルアドレナリン遊離に影響しなかった。従って、低酸素状態下の心臓交感神経伝達に対する内因性アデノシンの病態生理学的役割については、さらに検討する必要がある。

研究成果の概要（英文）：

The release of adenosine / ATP from cardiac muscle and the release of noradrenaline from sympathetic nerves were increased by hypoxia. The release of noradrenaline in the condition of hypoxia was significantly inhibited by adenosine (10 μ M). Adenosine receptor antagonist, 8SPT (30 μ M) did not influence the release of noradrenaline under the condition of hypoxia. More study is necessary to clarify role of endogenous adenosine on the noradrenaline release under the hypoxic condition.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
21年度	1900,000	570,000	2470,000
22年度	800,000	240,000	1040,000
23年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3400,000	1020,000	4420,000

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・末梢神経系、虚血再灌流

1. 研究開始当初の背景

平成14年度科学研究費補助金研究「効果器細胞由来ATPによる逆行性神経伝達抑制とその効果器保護に関する研究」において、交感神経興奮に伴う血管効果器細胞の α 受容体刺激により大量のATPとその代謝産物（アデノシン）が遊離されること、これが交感神経に対して逆行性の抑制性調節因子として働くことを明らかにした(*Jpn. J. Pharmacol.*,

88:19-25, 2002)。さらに平成19年度科学研究費補助金研究「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？」の中で、生活習慣病の病態進展に伴って、アデノシン受容体機能が変化することを見出すとともに、それが膜下機能の変化ではなくアデノシン受容体レベルでの発現の変化である可能性を見いだしている。

2. 研究の目的

最近の臨床研究によれば、急性心不全における予後の改善に、心臓交感神経機能の保護が重要な因子であることが報告されている (J. Nuclear Med., 48:1676-1682, 2007)。さらに、ATP・アデノシン系の神経伝達抑制機能は心不全の進展に応じて保護作用を示すように変化し、それが心不全の予後を改善する要因の一端である可能性が推察されている。一方、拡張型心筋症の原因として最も多いのは、広範囲にわたる冠動脈疾患といわれており、これに基づく心筋への血液供給の不足（虚血）が注目されている。本研究では、拡張型心不全にかかわる重要な因子である交感神経機能に着目するとともに、心臓にこのような障害をもたらす虚血状態における ATP・アデノシン系の調節機能の変化との関連性について明らかにする。

本研究で得られた結果を総合的に解析し、拡張機能障害の発症・進行と ATP・アデノシン系の交感神経保護機能の関係を検討するとともに、ATP・アデノシン系の病態生理学的な意義を解明する。このように、拡張型心筋症の原因プロセスも視野に入れて研究することにより、本病態における ATP やアデノシン系の新たな生理的役割を詳らかにすることにより、不全心における予後と神経保護機構の関連性の解明、ひいてはその治療面での研究の一助となるような情報を得ることを最終目的とする。

3. 研究の方法

(1) 実験動物： SHRSF.Z-*Lepr^{fa}*/IzmDmcR ラット（雄性）を使用し、対象動物としては同週齢の Wistar Kyoto ラット（雄性）もしくは Wistar ラット（雄性）を使用した。週齢としては若齢（7 週齢）、壮齢（20 週齢）、老齢（1 年）などの世代を使用した。

(2) 実験標本： 心房標本、心室標本、を使用するとともに、尾動脈や腸間膜動脈等の摘出血管も適宜使用した。

(3) 定量項目： HPLC 蛍光検出器（現有機期）によるプリン物質（ATP・ADP・AMP・adenosine など）の定量を行なうとともに、HPLC 電気化学検出器（現有機期）によるカテコールアミン（ノルアドレナリン、アドレナリン、ドパミンなど）の定量を行った。なお、組織標本からのプリン物質もしくはカテコールアミンの遊離量の測定は、組織標本のインキュベーション液（酸素を通気・飽和させた生理的緩衝液）を 3 分間隔で交換採取し、採取した液中に含まれるそれぞれの量を測定した。

(4) 測定項目： 張力トランスデューサー

を用いて、心房標本の収縮反応を等尺性に記録した。

(5) 電気刺激：交感神経の刺激は白金電極を介して電気刺激装置により行った。刺激条件としては 0.5 msec、50V の矩形波を 1 Hz の頻度で 3 分間加えた。

4. 研究成果

(1) 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とアデノシンの影響：

電氣的神経刺激を加えた Wistar ラット摘出尾動脈の交感神経からのノルアドレナリン遊離に対して、不安定狭心症治療薬および急性心不全治療薬であるニコランジルは有意な抑制作用を示した。この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 チャネル阻害薬の PNU-37883A では影響されなかった。さらにこのようなニコランジルの作用は SHR や SHR. Cg-*Leprcp*/NDmc ラットで著しく減弱していた。

以上の結果から、ニコランジルのノルアドレナリン遊離抑制作用は KATP チャネルを介すること、この KATP チャネルは平滑筋の KATP チャネルとは異なることが明らかにされた。さらに Wistar ラット摘出尾動脈で観察されたアデノシンのノルアドレナリン遊離抑制機能も SHR. Cg-*Leprcp*/NDmc ラットでは著しく低下していると考えられる。従って、高血圧や生活習慣病などの病態下では交感神経に対する抑制性調節系機能は低下している可能性が考えられる。

(2) 低酸素状態下のラット心房標本の心拍数および収縮力に対する 8SPT の影響：

Wistar ラット心房標本において、その心拍数および収縮力は生理的緩衝液の通気ガスを酸素から窒素に交換することにより有意に減弱した。一方、アデノシン受容体拮抗薬である 8-sulphophenyl theophylline (8SPT) の前処理は、低酸素状態による心拍数・収縮力の減弱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。しかしながら、心拍数の回復には影響しなかった。

一般的に、低酸素環境下ではアデノシンが細胞外へ放出されることが知られている。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、酸素通気再開による収縮力の回復が SPT で増強された可能性が推察される。以上の結果より、アデノシン・ATP 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推察される。

(3) 低酸素状態下の心室標本におけるアデノシン・ATPの遊離：

Wistarラット心室標本からの自発的な総プリン物質遊離量は、生理的緩衝液の通気ガスを酸素から窒素に交換することにより著明に増加した。なお、酸素通気時と窒素通気時の緩衝液中の酸素濃度はそれぞれ、 251.5 ± 17.6 mmHgと 38.4 ± 4.5 mmHgであった。このような低酸素条件下における各プリン物質遊離量はアデノシン>ADP>AMP>ATPの順で多く、特にアデノシンとADPが有意に増加したが、ATPは逆にわずかではあるが有意に減少した。低酸素による同様の結果は、SHRSP. *Z-Lepr^{fa}*/IzmDmcr (SHRSPZF) ラットにおいても得られたが、その量はWistarラットのそれよりも増加する傾向が観察された。この低酸素によるアデノシンの遊離の増加はニコランジルでさらに増強される傾向が観察された。

一般的に、低酸素環境下ではアデノシンが細胞外へ放出されることが知られているが、本結果はそのような報告と一致する。そして、SHRSP. *Z-Lepr^{fa}*/IzmDmcrラットにおいて遊離量が増えているという傾向は、病態動物におけるアデノシン・ATP系の重要性を示しているのかもしれない。

(4) 低酸素状態下の心室標本におけるノルアドレナリン遊離：

Wistarラットの心室標本からの自発的なノルアドレナリン遊離量は、低酸素状態下において有意に増加した。このような低酸素条件下におけるノルアドレナリン遊離はアミンポンプ阻害薬のデシプラミンにより著しく抑制された。低酸素による同様の結果はSHRSP. *Z-Lepr^{fa}*/IzmDmcrラットにおいても得られたが、その量はWistarラットのそれよりも有意に低かった。さらに、このような低酸素で惹起されたノルアドレナリン遊離量の増加は、Wistarラットの標本にニコランジルを処置したことにより有意に抑制された。

以上の結果より、低酸素による交感神経由来ノルアドレナリンの非生理的大量遊離に対しニコランジルが抑制的影響を示すことが明らかにされたが、心臓の拡張機能障害を有していると考えられているSHRSPZFラットの心臓においても、このノルアドレナリン遊離の増加が観察された。一方、アデノシンの遊離は低酸素で増加し、この増加がニコランジルで増強される傾向が観察された。同様の増加傾向はSHRSPZFラットでも観察された。さらにこのような結果は、ラットの尾動脈において

も観察された。ニコランジルやアデノシンが虚血プレコンディショニングに重要であるという報告を考えあわせると、拡張機能障害を有する心臓においても、このような内因性のプレコンディショニング機構が機能している可能性が推察される。

(5) 心室標本からのノルアドレナリン自発遊離に対するアデノシンと8SPTの影響：

Wistarラットの心室筋標本からの自発的なノルアドレナリン遊離は、アデノシンによって有意に抑制されたが、アデノシン受容体拮抗薬の8SPTには影響されなかった(図1)。

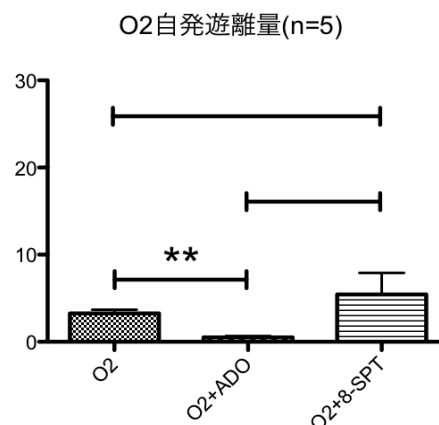


図1 Wistarラット心室標本からのノルアドレナリン自発遊離に対するアデノシン(ADO: 10 μ M)および8-sulphophenyltheophylline (8SPT: 30 μ M)の影響。縦軸はノルアドレナリンの自発遊離量 (fmol/mg) **:P<0.01

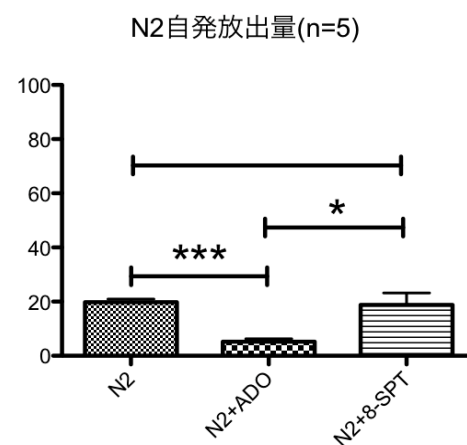


図2 Wistarラット心室標本からの低酸素状態におけるノルアドレナリン自発遊離に対するアデノシン(ADO: 10 μ M)および8-sulphophenyl theophylline (8SPT: 30 μ M)の影響。縦軸はノルアドレナリンの自発遊離量 (fmol/mg) **:P<0.01, *:P<0.05

一方低酸素状態下において有意に増加したノルアドレナリン自発遊離に対してもアデノシンは有意な抑制作用を示したが、8SPTは影響を示さなかった(図2)。

以上の結果より、酸素供給が維持されている所謂正常状態では、内因性のアデノシンがノルアドレナリンの自発遊離を抑制するように機能していることが示唆されたが、低酸素状態下では内因性アデノシンはそのような役割を果たしていない可能性が示唆された。低酸素状態では内因性のアデノシン遊離は正常状態より増加しており、より強力に機能していることが予想されたが、結果的には予想とは逆であった。

(6) 電気刺激された心室標本からのノルアドレナリン遊離に対するアデノシンと8SPTの影響:

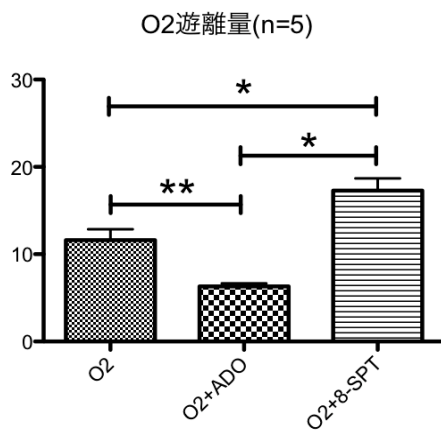


図3 電気刺激によるWistarラット心室標本からのノルアドレナリン遊離に対するアデノシン(ADO: 10 μ M)および8-sulphophenyl theophylline (8SPT: 30 μ M)の影響。縦軸は電気刺激によるノルアドレナリンの遊離量 (fmol/mg) **:P<0.01, *:P<0.05

電気刺激を加えたWistarラット心室標本からのノルアドレナリン遊離はアデノシンにより有意に抑制されると共に、8SPTにより有意に増加した(図3)。一方、電気刺激によるノルアドレナリン遊離量は低酸素状態下で有意に増加し、この遊離はアデノシンで抑制されたが、8SPTによる影響は観察されなかった(図4)。以上の結果より、所謂正常状態では内因性のアデノシンが神経興奮に伴うノルアドレナリンの遊離を抑制するように機能していることが示唆されたが、低酸素状態下では内因性アデノシンのそのような役割を示唆する結果は得られなかった。低酸素状態では

内因性のアデノシン遊離は正常状態より増加しており、より強力に機能していることが予想されたが、結果的には予想通りではなく逆であった。

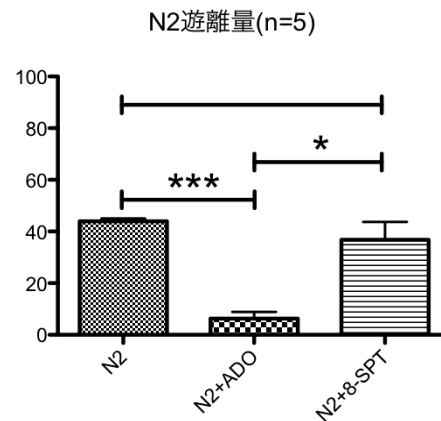


図4 電気刺激によるWistarラット心室標本からの低酸素状態におけるノルアドレナリン遊離に対するアデノシン(ADO: 10 μ M)および8-sulphophenyl theophylline (8SPT: 30 μ M)の影響。縦軸は電気刺激によるノルアドレナリンの遊離量 (fmol/mg) ***:P<0.001, *:P<0.05

(7) 総括:

本研究より、低酸素状態において、アデノシン・ATPの遊離が増加すること、低酸素状態における交感神経由来ノルアドレナリンの非生理的大量遊離に対しアデノシンが抑制作用を示すことが明らかにされた。さらに、アデノシン受容体拮抗薬である8-sulphophenyl theophylline (8SPT)は正常酸素状態下ではノルアドレナリンの遊離を増加させたが、低酸素状態下では影響しなかった。このことから、心筋組織から遊離された内因性アデノシンは、正常酸素状態下ではノルアドレナリン遊離を抑制的に調整しているが、低酸素状態下では影響していない可能性が示唆された。低酸素状態では内因性のアデノシン遊離は正常酸素状態より増加していることから、より強力な抑制性調節の関与が予想されたが、結果的には機能していない可能性を示す結果が得られた。SHRやSHR.Cg-Leprcp/NDmcラットの尾動脈においてアデノシン受容体が機能していないことが明らかにされているが、低酸素状態でもアデノシンの抑制作用が観察されているので、アデノシン受容体の機能に何らかの変化が起こっていることは考えにくい。ひとつの可能性として、低酸素により増加した内因性アデノシン遊離量に対し、8SPTの濃度が拮抗可能な量に達していなかったことも考えられる。

本研究ではすでに、アデノシンの遊離が低酸素で増加し、この増加がニコランジルによって増強されることを観察されている。さらにこのような結果と、ニコランジルやアデノシンが虚血プレコンディショニングに重要であるという報告を考えあわせると、低酸素の状態ではアデノシンが保護的に機能している可能性が推察されたが、本結果はアデノシンの関与を示唆するものではなかった。今後、上述した点も含めてさらに検討を加え、この可能性を明らかにすると共に、SHR や SHR. Cg-Leprcp/NDmc における検討を行う必要がある。

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 5 件)

(1) 低酸素による血管・心臓交感神経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 多田有加里、鄭炯美、籠田智美、和久田浩一、田邊洋子、橋本道男、篠塚和正 Therapeutic Research 32(2): 279-282 (2011)

(2) Tada Y, Kagota S, Matsumoto M, Naito Y, Shibata H, Nejime N, Tsujino T, Koshihara M, Masuyama T, Shinozuka K. Characterization of cardiac size and function in SHRSP.Z-Lepr^{fa}/IzmDmcr rats, a new animal model of metabolic syndrome. Biol Pharm Bull. 33(12):1971-1976 (2010).

(3) Kagota S, Fukushima K, Umetani K, Tada Y, Nejime N, Nakamura K, Mori H, Sugimura K, Kunitomo M, Shinozuka K. Coronary vascular dysfunction promoted by oxidative-nitrate stress in SHRSP.Z-Lepr^{fa}/IzmDmcr rats with metabolic syndrome. Clin Exp Pharmacol Physiol. 37(11):1035-1043 (2010)

(4) Tei A, Nejime N, Tada Y, Kagota S, Tanabe Y, Hashimoto M, Shinozuka K. Effects of nicorandil on sympathetic neurotransmission in rat caudal artery. Clin Exp Pharmacol Physiol. 37: 619-623 (2010)

(5) Nejime N, Tada Y, Kagota S, Tanabe Y, Hashimoto M, Shinozuka K. Effect of vanadate on ATP-induced increase in intracellular calcium ion levels in human umbilical vein endothelial cells. Biol Pharm Bull. 33(6): 1060-1062 (2010)

[学会発表] (計 5 件)

(1) 多田有加里、籠田智美、和久田浩一、中

村一基、國友勝、篠塚和正 メタボリックシンドロームモデル SHRSP. Z-Lepr^{fa}/IzmDmcr ラットに生じる心拍数減少には一酸化窒素が関与する 日本薬学会第 130 年会 2010 年

(2) 多田有加里、籠田智美、禰占奈美江、和久田浩一、中村一基、國友勝、篠塚和正 生活習慣病モデル SHRSP. Z-Lepr^{fa}/IzmDmcr に生じる心機能異常 第 83 回 日本薬理学会年会 2010 年

(3) Satomi Kagota, Yukari Tada, Kazuhito Fukushima, Keiji Umetani, Kazuki Namakumra, Masaru Kunitomo, Kazumasa Shinozuka. Involvement of oxidative stress in impaired vasodilation of coronary arteries in SHRSP.Z-Lepr^{fa}/IzmDmcr, an animal model of metabolic syndrome. Canadian Cardiovascular Congress 2009、2009.10.26 (Edmonton, Canada)

(4) 多田有加里、籠田智美、禰占奈美江、和久田浩一、中村一基、篠塚和正 メタボリックシンドロームモデルラット SHRSP. Z-Lepr^{fa}/IzmDmcr に生じる心拍数減少への NO の関与 第 11 回 応用薬理シンポジウム 2009 年

(5) 鄭炯美、多田有加里、和久田浩一、籠田智美、中村一基、田邊洋子、橋本道男、篠塚和正 低酸素下の血管におけるノルアドレナリン遊離に対するニコランジル前処置の影響 第 11 回 応用薬理シンポジウム 2009 年

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

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:

5 0 1 1 7 7 7 7

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし