

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 6 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790712

研究課題名（和文）eNOS アンカップリングによる血管内皮機能障害の機序と病態への関与についての研究

研究課題名（英文）The pivotal role of eNOS uncoupling-induced vascular endothelial dysfunction in cardiovascular diseases

研究代表者

山本 英一郎（YAMAMOTO EIICHIRO）

熊本大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：50573614

研究成果の概要（和文）：

我々はこれまでの基礎的知見から、心拡張不全における血管 eNOS アンカップリングによる血管内皮機能障害の関与メカニズムと臨床病態への関与の有無を検討した。結果、アンジオテンシン II が ASK1 の活性化による BH4 産生酵素：GTPCH-I 産生低下を介して eNOS アンカップリングの発症にかかわること、ヒト心拡張不全患者では有意に血管内皮機能障害が起こっており、ここにも BH4 低下が関わる可能性を見出した。

研究成果の概要（英文）：

We previously reported that eNOS uncoupling-induced vascular endothelial dysfunction is closely associated with diastolic heart failure (DHF) in salt-sensitive hypertensive rats. In this study, first, we found that angiotensin II induced eNOS uncoupling via ASK-1 activation and downregulation of GTPCH-I (BH4 producing enzyme) in vitro. Second, in clinical study, we found that peripheral endothelial dysfunction assessed by digital peripheral arterial tonometry, was significantly impaired in human DHF patients. Furthermore, blood BH4 levels tended to be decreased in DHF patients, indicating the involvement of eNOS uncoupling by BH4 downregulation also in human DHF.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：循環器内科学

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：循環器学・血管内皮機能

1. 研究開始当初の背景

eNOSの機能異常であるeNOSアンカップリングは、eNOSの補酵素であるtetrahydrobiopterin (BH4)の欠乏により酸化ストレスが産生される現象で、血管内皮機能障害の一因として様々な心血管疾患との関わりが注目されている。

我々は高血圧性臓器障害モデルであるDahlラットを用い、アンジオテンシンII (Ang II)が酸化ストレス増加と、それによって誘導されるシグナル分子 apoptosis signal-regulating kinase (ASK)1活性化、ならびにeNOSアンカップリングを介して血管内皮機能障害に関与し、心拡張不全進展に関わることを、ASK1欠損マウスを用いASK1が直接的に血管eNOSアンカップリングを惹起することを初めて証明した。また、心拡張不全Dahlラットにおいて血中BH4の低下と、その酸化物BH2の増加を認め、BH4代謝経路の異常(ビオプテリン代謝異常)がeNOSアンカップリングを惹起することも確認している。

血管内皮機能障害によって惹起される動脈硬化は本邦の死因の上位を占める心筋梗塞の原因病態であることから、その発症機序や病態への関与を明らかにすることは我が国の医療費問題上も重要である。したがってeNOSアンカップリングと血管内皮機能障害との関わりを明らかにすることは臨床上も極めて重要な課題であると考えられる。

本研究はこのような背景のもと、基礎研究ならびに臨床研究の両側面からeNOSアンカップリング発症機序を明らかにし、心不全病態への関与機序を解明することを目的とする。

2. 研究の目的

我々は、eNOSアンカップリングが、血管内皮機能障害の発症に深く関与していることと、高血圧性心拡張不全の一因となることを動物実験で証明した。本研究は、eNOSアンカップリングの発症機序を分子生物学的手法を用い検討するとともに、実際の心拡張不全への関与のメカニズムを明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

- (1) 血管内皮細胞におけるASK1によるeNOSアンカップリングの発症機序を、ASK1欠損マウス(ASK1^{-/-})から単離した血管内皮細胞を用いて、in vitro実験を中心に検討する。具体的には、ヒト臍帯静脈血管内皮細胞(HUVEC)にAng IIを添加しビオプテリン代謝に関わる種々の酵素の発現量を、real time RT-PCRやwestern blot法を用いて検討する。
- (2) ヒト臨床検体(血液)を用いて、心拡張不全患者におけるeNOSアンカップリングの指標としてビオプテリン代謝(BH4/BH2濃度)、および血管内皮機能との相関を検討する。具体的には、HPLC法を用い血中BH4/BH2の濃度を測定し、血管内皮機能検査に関しては、当科で以前より行っている新しい非侵襲的な生理的血管内皮障害測定装置であるEndo-PAT2000を用いて客観的・定量的に測定する。

4. 研究成果

- (1) Ang II注入による血圧の上昇は、野生型マウス(WT)およびASK1^{-/-}では4週間通して、同程度で有意差はなかったが、アセチルコリン(ACh)に対する血管内皮依存性弛緩反応は、WTにAng II注入すると血管内皮依存性弛緩反応が有意に低下するのに対し(p<0.01)、ASK1^{-/-}にAII注入しても血管内皮依存性弛緩反応は正常のまま保持されていることが分かった。また、Ang II注入によりWTでは、血管内皮細胞のアポトーシスが惹起されるが(p<0.01)、ASK1^{-/-}では血管内皮アポトーシスは惹起されなかった。さらに、AII注入によりWTでは、血管eNOSのダイマー/モノマー比が有意に低下し、eNOSアンカップリングが惹起されるが(p<0.01)、ASK1^{-/-}ではAng II注入によってもダイマー/モノマー比に変化はみられなかった。

さらに、in vitro 研究では、WT マウスと ASK1^{-/-}マウスの大動脈より初代培養した血管内皮細胞に Ang II を添加したところ、やはり Ang II 添加により WT では、血管 eNOS のダイマー/モノマー比が有意に低下し eNOS アンカップリングが惹起されるが、ASK1^{-/-}の内皮細胞では AII 添加によってもダイマー/モノマー比に変化はみられなかった。また、野生型の血管内皮細胞では、ウェスタンブロッティングで測定した DHFR タンパク量も減少しており、この変化は ASK1^{-/-}マウスからの内皮細胞ではみられなかった。

- (2) 心拡張不全患者（収縮機能は正常範囲）においては、非侵襲的血管内皮障害測定装置：Endo-PAT2000 を用いて測定した血管内皮機能が有意に低下しており、血管内皮機能が心拡張不全の重症度と有意に相関しており、さらに高度内皮機能低下患者は、その後の予後が有意にわるいことが明らかになった。

さらに、これら心不全患者に Ang II 受容体拮抗薬 (ARB) を投与した効果を検討したところ、ARB は心拡張不全を改善させ、Endo-PAT 値および PWV 値、ならびに以前われわれが、血管内皮機能障害と有意に相関することを証明した新しいマーカーであるマイクロパーティクル (EMP) 値も改善させることを見出した。

さらに、eNOS アンカップリングのマーカーである血中 BH4 濃度は心拡張不全患者において低下しており、Endo-PAT2000 により測定した血管内皮機能障害の程度とも有意に相関していることを同時に見出している。

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 15 件)

- ① Congrains A., Yamamoto E., Rakugi H., et al. (20 人中 6 番目) Genetic Variants at the 9p21 Locus Contribute

to Atherosclerosis through Modulation of ANRIL and CDKN2A/B. **Atherosclerosis**. 2012 (印刷中) 査読有

- ② Yamamoto E., Kim-Mitsuyama S., et al. (10 人中 1 番目) Calcium channel blockers, more than diuretics, enhance vascular protective effects of angiotensin receptor blockers in salt-loaded hypertensive rats. **PLoS One**. 2012 (印刷中) 査読有
- ③ Sueta D., Yamamoto E., Kim-Mitsuyama S., et al. (10 人中 6 番目) Amlodipine enhances amelioration of vascular insulin resistance, oxidative stress, and metabolic disorders by candesartan in metabolic syndrome rats. **Am J Hypertens**. 2012 (印刷中) 査読有
- ④ Nako H., Yamamoto E., Kim-Mitsuyama S., et al. (10 人中 6 番目) Novel mechanism of angiotensin II-induced cardiac injury by in hypertensive rats: the critical role of ASK1 and VEGF. **Hypertens Res**. 35(2): 194-200, 2012 査読有
- ⑤ Dong YF., Yamamoto E., Kim-Mitsuyama S., et al. (10 人中 6 番目) Attenuation of brain damage and cognitive impairment by direct renin inhibition in mice with chronic cerebral hypoperfusion. **Hypertension**. 58(4):635-42, 2011 査読有
- ⑥ Dong YF., Yamamoto E., Kim-Mitsuyama S., et al. (11 人中 9 番目) Beneficial effects of combination of valsartan and amlodipine on salt-induced brain injury in hypertensive rats. **J Pharmacol Exp Ther**. 339(2):358-66, 2011 査読有
- ⑦ Nakamura T., Yamamoto E., Kim-Mitsuyama S., et al. (11 人中 8 番目) Novel mechanism of salt-induced glomerular injury: critical role of eNOS and angiotensin II. **J Hypertens**. 29(8):1528-35, 2011. 査読有
- ⑧ Dong YF., Yamamoto E., Kim-Mitsuyama S., et al. (11 人中 9 番目) Perindopril, a centrally-active ACE inhibitor, prevents cognitive impairment in mouse models of Alzheimer's disease. **FASEB J**. 25(9):2911-20, 2011. 査読有
- ⑨ Nakamura T., Yamamoto E., Kim-Mitsuyama S., et al. (10 人中 7 番目) Eplerenone potentiates

protective effects of amlodipine against cardiovascular injury in salt-sensitive hypertensive rats. *Hypertens Res.* 34(7):817-24, 2011. 査読有

- ⑩ Matsubara J., Yamamoto E., Ogawa H., et al. (15人中9番目) Pentraxin 3 is a new inflammatory marker correlated with left ventricular diastolic dysfunction and heart failure with normal ejection fraction. *J Am Coll Cardiol.* 57(7):861-9, 2011. 査読有
- ⑪ Tokutomi Y., Yamamoto E., Kim-Mitsuyama S., et al. (12人中3番目) Vascular responses to 8-nitro-cyclic GMP in nondiabetic and diabetic mice. *Br J Pharmacol.* 162(8):1884-93, 2011. 査読有
- ⑫ Yamamoto E., Kim-Mitsuyama S., et al. (10人中1番目) Nifedipine prevents vascular endothelial dysfunction in a mouse model of obesity and type 2 diabetes, by improving eNOS dysfunction and dephosphorylation. *Biochem Biophys Res Commun.* 403(3-4):258-63, 2010. 査読有
- ⑬ Kataoka K., Yamamoto E., Kim-Mitsuyama S., et al. (9人中3番目) Apoptosis signal-regulating kinase 1 deficiency eliminates cardiovascular injuries induced by high-salt diet. *J Hypertens.* 29(1):76-84, 2010. 査読有
- ⑭ Dong YF., Yamamoto E., Kim-Mitsuyama S., et al. (11人中4番目) Aliskiren enhances protective effects of valsartan against type 2 diabetic nephropathy in mice. *J Hypertens.* 28(7):1554-65, 2010. 査読有
- ⑮ Yamamoto E., Kim-Mitsuyama S., et al. (8人中1番目) Benidipine, a dihydropyridine L-type/T-type calcium channel blocker, affords additive benefits for prevention of cardiorenal injury in hypertensive rats. *J Hypertens.* 28(6):1321-9, 2010. 査読有

[学会発表] (計 3 件)

- ① 山本英一郎、光山勝慶、小川久雄 Combination of Angiotensin Receptor Blocker with Calcium Channel Blocker, than with Diuretic, Exerts More Beneficial Vascular Protective Effects 第 76 回日本循環器学会学術集会、2012. 3. 16、福岡国際会議場(福岡県)
- ② 山本英一郎、光山勝慶、小川久雄 Direct

Renin Inhibition with Aliskiren Enhances Beneficial Effects of Angiotensin II Receptor Blocker on Cardiovascular and Renal Injury in eNOS Deficient Mice 第 83 回 米国心臓協会 学術集会、2010. 11. 17、アメリカ合衆国 シカゴ市

- ③ 山本英一郎、光山勝慶、小川久雄 Novel Mechanism of the Beneficial Effects of Dihydropyridine Calcium Channel Blocker on Vascular Endothelial Dysfunction in Obesity and Type 2 Diabetes 第 23 回 国際高血圧学会 学術集会、2010. 9. 30、カナダ バンクーバー市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本 英一郎 (YAMAMOTO EIICHIRO)
熊本大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：50573614

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：