

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：18001

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23790300

研究課題名(和文)一酸化窒素合成酵素完全欠損マウスを用いた大動脈瘤/大動脈解離発症の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the pathogenesis of aortic aneurysm and dissection by the use of mice lacking all nitric oxide synthases.

研究代表者

新垣 久美子 (ARAKAKI, Kumiko)

琉球大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：10568687

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：大動脈瘤や大動脈解離の成因は、未だ十分に解明されていない。本研究では、大動脈瘤/大動脈解離の成因に一酸化窒素合成酵素(NOSs)が関与しているか否かを、NOSs完全欠損マウス(Triple n/i/eNOSs-KOマウス)を用いて検討した。NOSs完全欠損マウスに高脂肪食およびアンジオテンシンⅡを長期投与したが、大動脈瘤/大動脈解離は誘発されなかった。実験条件に検討の余地があることが考えられた。

研究成果の概要(英文)：The pathogenesis of aortic aneurysm and dissection still remains to be fully clarified. In this study, we examined whether or not the nitric oxide synthases(NOSs) system is involved in the pathogenesis of aortic aneurysm and dissection by using triple NOSs-KO mice. Long-term treatment with a high-fat diet and angiotensinⅡ did not induced aortic aneurysm or dissection in the triple NOSs-KO mice. There may be room for considering experimental conditions.

研究分野：一酸化窒素

科研費の分科・細目：基礎医学・薬理学一般

キーワード：一酸化窒素合成酵素 大動脈瘤 大動脈解離 マウス

1. 研究開始当初の背景

近年のメタボリックシンドロームの増加により、動脈硬化に関連するさまざまな疾患が問題となっているが、なかでも大動脈瘤や大動脈解離については近年の画像技術の進歩により発見されることも多い。大動脈瘤／大動脈解離の多くは無症状で経過するが、いったん破裂すると致死率の高い疾患であり、その征圧が我が国の医療における喫緊の課題となっている。しかし、大動脈瘤および大動脈解離の成因に関しては多くが不明で未だ十分に解明されていない。

一酸化窒素は、生体の恒常性の維持に重要な役割を担っている。一酸化窒素 (NO) 合成酵素 (NOSs) には、神経型 (nNOS)・誘導型 (iNOS)・内皮型 (eNOS) の3種類のアイソフォームが存在する。近年の多くの研究において、eNOS の uncoupling に代表される一酸化窒素合成酵素 (NOS) 系の破綻を基盤として動脈硬化が発症、進展し心血管病や臓器障害を発症すると広く考えられている。

さらに過去に、すべての NOS アイソフォームを欠損させた NOSs 完全欠損マウスがメタボリックシンドロームや急性心筋梗塞を自然発症することが報告されている。

2. 研究の目的

2000年に Daugherty らにより ApoE 欠損マウスにアンジオテンシン II を持続投与すると、炎症細胞の浸潤とともに大動脈瘤が形成されることが報告されている。この方法の特徴としては、他の大動脈瘤実験モデルとして知られているエラストーゼや塩化カルシウムを用いた大動脈瘤実験モデルとは異なり、アンジオテンシン II 持続投与により大動脈瘤形成が徐々に形成されるため、生理的条件により近いと考えられている。さらにアンジオテンシン II 持続投与の方法に関して、皮下に浸透圧ポンプを埋め込む方法であるため、より非侵襲的であり長期間の観察が可能である。

大動脈瘤および大動脈解離の成因における一酸化窒素合成酵素 (NOS) 系の役割については多くが不明であり、本研究においては、大動脈瘤／大動脈解離の成因を明らかにするために、3種類の一酸化窒素合成酵素 (NOS) のすべてが欠損した NOSs 完全欠損マウスに、浸透圧ポンプを用いてアンジオテンシン II を持続皮下投与し、生体内一酸化窒素

(NO) 産生障害により大動脈瘤／大動脈解離が惹起されるか否かを検討した。

3. 研究の方法

2ヶ月齢のオスの NOSs 完全欠損マウスを実験に使用した。NOSs 完全欠損マウスに1.25%高コレステロール高脂肪食を1ヶ月から6ヶ月間経口投与し、さらにアンジオテンシン II (1000 ng/kg/min) を、浸透圧ミニポンプを用いて高脂肪食投与の最後の1ヶ月間持続皮下投与した。

評価としては、大動脈瘤／大動脈解離の経時的変化、形態学的変化、心血管系の臓器障害の解析、生理代謝物質の解析を行った。

また、対照群として同月齢の各 NOS 1種類のみを欠損させたシングルノックアウトマウス、2種類の NOS を欠損させたダブルノックアウトマウス、それに野生型マウス (C57BL/6J) にも同様に高脂肪食を1ヶ月から6ヶ月間経口投与し、さらに、アンジオテンシン II (1000 ng/kg/min) を、浸透圧ミニポンプを用いて高脂肪食投与の最後の1ヶ月間持続皮下投与し、比較検討することを予定した。

4. 研究成果

3種類の一酸化窒素合成酵素 (NOS) のすべてが欠損した NOSs 完全欠損マウスに、高脂肪食およびアンジオテンシン II 負荷を行うと、半数前後のマウスが経過中に死亡した。しかし、死亡したマウスに大動脈瘤や大動脈解離は認められなかった。

経過中死亡しなかったマウスにおいては、負荷後、血圧、血中脂質濃度等の測定を行った。またアンジオテンシン II 負荷中については、定期的にエコーを施行し、体表面から胸部および腹部大動脈径を測定した。負荷終了後、ホルマリン還流固定した大動脈を単離し、実体顕微鏡を用いてマクロで観察し、大動脈径の測定を行った。

対照群のうち野生型マウス (C57BL/6J) との比較を行ったが、NOSs 完全欠損マウスのうち一部のマウスにおいて腹部大動脈径の拡大が認められたが有意差は認められず、大動脈瘤の定義である1.5倍に達したマウスはいなかった。

その他のマウスにおいては負荷中および負荷終了後のいずれも、大動脈径の拡大は認められなかった。また胸腹腔内への出血などの大動脈解離の所見も認められなかった。

対照群である同月齢の各 NOS 1種類のみを欠損させたシングルノックアウトマウス、2種類の NOS を欠損させたダブルノックアウト

マウスについては、同様に高脂肪食を1ヶ月から6ヶ月間経口投与を行ったが、前述のように野生型マウスでの結果を受け、アンジオテンシンII負荷を行わなかったため、対照群からは除外した。

考察として、高脂肪食の組成（コレステロール含有量、コール酸の有無）やアンジオテンシンIIの投与期間に検討の余地があると考えられた。

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）

1. Sakanashi M, Matsuzaki T, Noguchi K, Nakasone J, Sakanashi M, Uchida T, Tanada M, Kubota H, Arakaki K, Tanimoto A, Yanagihara N, Sakanashi M, Ohya Y, Masuzaki H, Ishiuchi S, Sugahara K, Tsutsui M. Long-Term Treatment with San' o-shashin-to, a Kampo Medicine, Markedly Ameliorates Cardiac Ischemia/Reperfusion Injury in Ovariectomized Rats via the Redox-Dependent Mechanism. *Circ J*. 2013; 77:1827-1837, doi: <http://dx.doi.org/10.1253/circj.CJ-12-1434>, 査読あり
2. Noguchi K, Hamadate N, Matsuzaki T, Sakanashi M, Nakasone J, Uchida T, Arakaki K, Kubota H, Ishiuchi S, Masuzaki H, Sugahara K, Ohya Y, Sakanashi M, Tsutsui M. Increasing dihydrobiopterin causes dysfunction of endothelial nitric oxide synthase in rats in vivo. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2011; 301:H721-H729, doi: 10.1152/ajpheart.01089.2010, 査読あり

〔学会発表〕（計10件）

1. Uchida T, Furuno Y, Tanimoto H, Arakaki K, Kina M, Kubota H, Sakanashi M, Matsuzaki T, Noguchi K, Nakasone J, Ohya Y, Yanagihara N, Shimokawa H, Tamura M, Otsuji Y, Tsutsui M. Development of an Experimentally Useful Model of Spontaneous Myocardial

Infarction: 2/3 Nephrectomized Triple Nitric Oxide Synthases-Deficient Mouse. The 78th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society. Tokyo International Forum, Tokyo, Japan. 2014年3月22日

2. 内田太郎、古野由美、新垣久美子、喜名美香、久保田陽秋、坂梨まゆ子、松崎俊博、野口克彦、仲宗根淳子、大屋祐輔、柳原延章、下川宏明、田村雅仁、尾辻豊、筒井正人。実験に有用な自然発症急性心筋梗塞モデルの開発。第87回日本薬理学会年会。仙台国際センター。仙台。2014年3月19日
3. Noguchi K, Matsuzaki T, Sakanashi M, Nakasone J, Arakaki K, Sakanashi M, Ohya Y, Tsutsui M. Dihydrobiopterin causes dysfunction of endothelial nitric oxide synthase in rats in vivo. The 76th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society. Fukuoka Kokusai Center, Fukuoka, Japan. 2012年3月18日
4. 坂梨まゆ子、野口克彦、松崎俊博、仲宗根淳子、新垣久美子、内田太郎、坂梨真木子、久保田陽秋、棚田美香、大屋祐輔、須加原一博、坂梨又郎、筒井正人。三黄瀉心湯はMn-SODの選択的な活性化を介して卵巣摘出ラットの虚血再灌流心機能障害を軽減する。第85回日本薬理学会年会。国立京都国際会館。京都。2012年3月15日
5. 野口克彦、松崎俊博、坂梨まゆ子、濱舘直史、仲宗根淳子、新垣久美子、坂梨又郎、筒井正人。血管内におけるジドロビオプテリン増加はeNOS機能障害を引き起こす。第85回日本薬理学会年会。国立京都国際会館。京都。2012年3月14日
6. 筒井正人、野口克彦、松崎俊博、坂梨まゆ子、仲宗根淳子、内田太郎、新垣久美子、久保田陽秋、須加原一博、大屋祐輔。内皮型NO合成酵素(eNOS)の新しい活性調節機構：ラット血管内Dihydrobiopterin (BH2)増加によるeNOS機能障害。第41回日本心脈管作動物質学会。秋田キャッスルホテル。秋田。2012年2月10日

7. 筒井正人、野口克彦、松崎俊博、坂梨まゆ子、仲宗根淳子、内田太郎、新垣久美子、久保田陽秋、須加原一博、大屋祐輔。内皮型 NO 合成酵素の新しい活性調節機構：ラット血管内 Dihydrobiopterin (BH2) 増加による eNOS uncoupling の惹起。第 64 回日本薬理学会西南部会。KKR ホテル博多。福岡。2011 年 11 月 20 日

(2) 研究分担者
()

研究者番号：

(3) 連携研究者
()

研究者番号：

8. Tsutsui M, Noguchi K, Matsuzaki T, Sakanashi M, Nakasone J, Uchida T, Arakaki K, Kubota H, Sugahara K, Ohya Y. Increasing dihydrobiopterin causes dysfunction of endothelial nitric oxide synthase in rats in vivo. American Heart Association, Scientific Sessions 2011. Orange County Convention Center, Orlando, USA. 2011 年 11 月 16 日

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等：

6. 研究組織

(1) 研究代表者

新垣 久美子 (ARAKAKI, Kumiko)
琉球大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：10568687