

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：37116

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26860620

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呼吸器疾患に伴う肺高血圧症の病態解明

研究課題名(英文)Role of Nitric Oxide Synthases in Hypoxic Pulmonary Hypertension in Mice

研究代表者

生越 貴明(Ogoshi, Takaaki)

産業医科大学・医学部・助教

研究者番号：60621232

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、合計5種類のマウス(野生型、n,i,eNOSノックアウトマウス、NOS完全欠損マウス：n/i/eNOSノックアウトマウス)を用いて、低酸素性肺高血圧における一酸化窒素(NO)や一酸化窒素合成酵素(NOS)の役割の解明を試みた。NOS完全欠損マウスでは、WTマウスやシングルノックアウトと比較して優位に肺高血圧が増悪していた。さらに、NO donorによるNO補充療法などを行うことにより、それが改善することが明らかとなった。さらに骨髄由来のNOS系に注目し、骨髄移植実験を行ったところ、骨髄NOS系のみ欠損でも肺高血圧は有意に増悪していた。

研究成果の概要(英文)：The role of nitric oxide synthases (NOSs) in the development of pulmonary hypertension (PH) has been examined in pharmacological studies with non-selective NOSs inhibitors. However, due to the non-specificity of the NOSs inhibitors, the authentic role of NOSs in PH still remains to be clarified. We show here that hypoxia-induced PH was markedly deteriorated in triply n/i/eNOSs^{-/-} genotype and, to a lesser extent, in eNOS^{-/-} genotype, but not in nNOS^{-/-} or iNOS^{-/-} genotype, as compared with WT genotype. In addition, transplantation of triply NOSs^{-/-} bone marrow results in the exacerbation of hypoxia-induced PH in mice, demonstrating the protective role of myelocytic NOSs in the pathogenesis of PH. Our findings provide novel insights into the cellular and molecular bases of PH.

研究分野：肺高血圧

キーワード：肺高血圧 一酸化窒素 Nitric oxide Pulmonary Hypertension Bone marrow Nitric oxide synthase

1. 研究開始当初の背景

呼吸器疾患に伴う肺高血圧（低酸素性肺高血圧）は、肺高血圧症の WHO の 5 つの臨床分類で Group3 カテゴリーに該当し、特発性間質性肺炎 (IPF)、慢性閉塞性肺疾患 (COPD)、高地在住などの疾患・病態が含まれる。これらの疾患において肺高血圧症を合併した症例はいづれの疾患も予後不良とされ、病態の解明や治療戦略が求められている。

一酸化窒素 (nitric oxide; NO) 及びその合成酵素 (NO synthase; NOS) は肺高血圧症において、重要な役割を果たしていることが考えられている。NOS には神経型 (neuronal NOS; nNOS)、誘導型 (inducible NOS; iNOS)、内皮型 (endothelial NOS; eNOS) の 3 種類のアイソザイムが存在する。しかしこれまでに、低酸素性肺高血圧における nNOS や iNOS の役割はほとんど解明されていない。また eNOS は eNOS^{-/-}マウスは低酸素曝露により野生型 (WT) と比べて肺高血圧が増悪する (Fagan KA, *et al.* Am J Physiol 1999, Steudel W, *et al.* J Clin Invest 1998) ことから保護的に作用していると考えられる。しかし一方では同じ eNOS^{-/-}マウスでも肺高血圧が増悪したという報告 (Quinlan TR, *et al.* AJP Lung 2000) もあり、必ずしも見解は一致していない。その原因としては、single NOS^{-/-}マウスにおいては、残った 2 つの NOS が代償的に NO の産生を補填するために、本来の NO や NOS の生体内における役割は非常に分かりづらいものと考えられる。

その中で共同協力者の筒井らは、NOS システムに由来する NO の役割の解明のため、これらの 3 つ全ての NOS アイソフォームをノックアウトした NOS 完全欠損マウス (triple n/i/eNOSs^{-/-}マウス) を 2005 年に世界に先駆けて創出し発表した (Morishita

T, *et al.*, PNAS 2005)。この NOS 完全欠損マウスの最も大きな意義としては、生体内の NO が 99% まで産生が抑制されることにより、NO 本来の生体内での働きが解明できる点である。NOS 完全欠損マウスはこれまでに心筋梗塞、脂質代謝異常等の主に循環器系における NO の役割の解析の研究に用いられ、心筋梗塞などを自然発症すること等が明らかにされている。

2. 研究の目的

本研究では、低酸素性肺高血圧症における NO 及び NOS の役割を明らかにするため、野生型 (WT)、nNOS^{-/-}、iNOS^{-/-}、eNOS^{-/-}マウス及び、この NOS 完全欠損マウス (triple NOSs^{-/-}マウス) を計 5 種類のマウスを用いて低酸素曝露を行い、肺高血圧症の評価と NO 及び NOS を介した低酸素性肺高血圧症の詳細な病態機序を解明することを目的とする。

さらに骨髄に注目し骨髄由来 NOS 系の低酸素性肺高血圧における役割についても解明も試みる。

3. 研究の方法

(1) 低酸素曝露による肺高血圧の評価

野生型 (C57/BL6) マウス、3 種類の single NOS^{-/-}マウス及び triple NOSs^{-/-}マウスを低酸素下 (O₂ 10%) で 21 日間曝露し右室収縮期圧、右室重量比、病理学的の肺内血管の肥厚度を評価をする。また、n/i/eNOSs^{-/-}マウスに NO 供与体 (NO donor) を補充することによる効果も併せて評価する。

(2) 低酸素性肺高血圧における骨髄細胞の評価

低酸素曝露後の野生型 (WT) マウス、triple NOSs^{-/-} マウスにおける血中の骨髄由来平滑筋細胞数を計測し、さらに緑色蛍光蛋白 (GFP) を過剰発現マウスの骨髄移植を行い、NOS 完全欠損下における骨髄細胞の役割を評価する。

(3) 低酸素性肺高血圧における骨髄由来 NOS 系の評価

NOS 完全欠損マウスと WT マウスを用いて骨髄置換実験を行い、キメラマウスを作成し、低酸素性肺高血圧における骨髄由来 NOS 系の役割を評価する。

4 . 研究成果

(1) 低酸素曝露による肺高血圧の評価

低酸素曝露は、全てのマウスにおいて、右室圧増加、右室肥大、及び肺血管リモデリングを引き起こしたが、その程度は全て、triple NOSs^{-/-} マウスにおいて際立って顕著であった。また triple NOSs^{-/-} マウスは NO donor の補充で肺高血圧が軽減された。

(2) 低酸素性肺高血圧における骨髄細胞の評価

血中の骨髄由来血管平滑筋前駆細胞数を調べたところ低酸素に曝露した triple NOSs^{-/-} マウスでは、著明に増加していた。さらに緑色蛍光蛋白質 (GFP) 過剰発現マウスの骨髄細胞を移植し、肺血管リモデリングにおける骨髄の寄与を検討したところ、WT マウスに比して triple NOSs^{-/-} マウスで肺血管リモデリング部における GFP 陽性細胞の著明な増加を認めており、以上からこの重度な肺高血圧発症機序に骨髄細胞が関

与していることが示唆された。

(3) 低酸素性肺高血圧における骨髄由来 NOS 系の評価

最後に NOS 完全欠損マウスと WT マウスを用いて骨髄置換実験を行ったところ、triple NOSs^{-/-} マウスの骨髄移植は WT マウスの骨髄移植に比して、WT マウスの肺高血圧の病態を有意に増悪させ、逆に、WT マウスの骨髄移植は、triple NOSs^{-/-} マウスの骨髄移植に比して、triple NOSs^{-/-} マウスの肺高血圧の病態を有意に改善させ、骨髄 NOSs 系のみ欠損でも、マウス低酸素性肺高血圧の病態を著明に悪化させることを明らかにした。以上より、肺高血圧における骨髄 NOSs 系の保護的役割が初めて示唆された。

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0件)

[学会発表](計7件)

生越 貴明, 城戸 貴志, 筒井 正人, 矢寺 和博, 石本 裕士, 山田 壮亮, 王 克鏞, 豊平 由美子, 和泉 弘人, 下川 宏明, 柳原 延章, 迎 寛, 次世代シーケンサーを用いた低酸素性肺高血圧症における骨髄由来一酸化窒素合成酵素 (NOS) の役割の検討. 第 57 回日本呼吸器学会学術講演会 (2017 年 4 月 17 日, 東京国際フォーラム, 東京都千代田区)

生越 貴明, 城戸 貴志, 筒井 正人, 矢寺 和博, 石本 裕士, 山田 壮亮, 王 克鏞, 豊平 由美子, 和泉 弘人, 下川 宏明, 柳原 延章, 迎 寛, 低酸素性肺高血圧症にお

る骨髄由来一酸化窒素合成酵素(NOS)の役割,第46回日本心脈管作動物質学会(2017年2月10-11日,琉球大学,沖縄県西原町)

Masato Tsutsui, Takaaki Ogoshi, Takashi Kido, Keisuke Naito, Keishi Oda, Hiroshi Ishimoto, Sohshuke Yamada, Ke-Yong Wang, Yumiko Toyohira, Hiroto Izumi, Hiroaki Shimokawa, Nobuyuki Yanagihara, Kazuhiro Yatera, Hiroshi Mukae. Protective Role of Myelocytic Nitric Oxide Synthases in Hypoxic Pulmonary Hypertension in Mice. American Heart Association Scientific Sessions, 2016. New Orleans Ernest N. Morial Convention Center (2016年11月12-16日, New Orleans, USA)

Takaaki Ogoshi, Masato Tsutsui, Takashi Kido, Keisuke Naito, Keishi Oda, Hiroshi Ishimoto, Sohshuke Yamada, Ke-Yong Wang, Yumiko Toyohira, Hiroto Izumi, Hiroaki Shimokawa, Nobuyuki Yanagihara, Kazuhiro Yatera, Hiroshi Mukae. Role of Myelocytic Nitric Oxide Synthases in Hypoxic Pulmonary Hypertension in Mice. The 9th International Conference on the Biology, Chemistry, and Therapeutic Applications of Nitric Oxide. 2016, Sendai International Center, (2016年5月20-22日, Sendai, Miyagi, Japan)

生越 貴明, 城戸 貴志, 筒井 正人, 西田 千夏, 山崎 啓, 石本 裕士, 下川 宏明, 矢寺 和博, 迎 寛. n/i/eNOS 合成酵素欠損マウスを用いた低酸素性肺高血圧症におけるNOの役割の検討. 第56回日本呼吸器学会学術講演会(2016年4月8-10日, 京都国際会議場, 京都府京都市)

生越 貴明, 城戸 貴志, 筒井 正人, 矢寺 和博, 石本 裕士, 山田 壮亮, 王 克鏞, 豊平 由美子, 和泉 弘人, 下川 宏明, 柳原 延章, 迎 寛, 低酸素性肺高血圧における骨髄NO合成酵素系の保護的役割, 第45回日本心脈管作動物質学会(2016年2月8日, 阿波観光ホテル, 徳島県徳島市)

生越 貴明, 城戸 貴志, 矢寺 和博, 野口 真吾, 石本 裕士, 山田 壮亮, 豊平 由美子, 柳原 延章, 筒井 正人, 迎 寛, NOS合成酵素完全欠損マウスを用いた低酸素性肺高血圧症におけるNOの役割の検討. 第55回日本呼吸器学会学術講演会(2015年4月17日, 東京国際フォーラム, 東京都千代田区)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

生越貴明(OGOSHI, Takaaki)
産業医科大学・医学部・助教
研究者番号: 60621232