

学位論文題名

L-アルギニン由来Nitric Oxideの冠動脈・心筋間質構築の恒常性維持
および交感神経活動制御への関与に関する研究

学位論文内容の要旨

【目的】 Nitric oxide (NO) は、現在まで3種類の存在が知られている NO 合成酵素 (NOS) により L-アルギニンと酸素から生成され、血管弛緩をはじめ種々の作用を有する。NOS 阻害薬を動物に急性投与すると、NOS-3 の阻害により血圧が上昇するとともに交感神経活性が亢進することから、中枢で NOS-1 により生成される NO は交感神経活性低下作用を有するとされている。本研究では、まず慢性的に NOS を阻害した際にも交感神経活性亢進が認められるか否かを検索した。さらにその際の心臓組織所見を検索することより、種々の NOS から生成される NO が冠動脈および心筋間質の恒常性維持に果たす役割を検討した。

【方法】 12 週齢の雄性 Wistar ラットを用い、麻酔下に腹腔内に浸透圧ポンプを埋め込んだ。充填液としては、生理食塩水 (saline 群: n=16)、非選択的 NOS 阻害薬である L-N^o-nitroarginine methylester (LNAME) 0.2 mol/L 溶液 (low NAME 群: n=28)、もしくは LNAME 1 mol/L 溶液 (high NAME 群: n=32) を用いた。高血圧の対照として同週齢の雄性脳卒中易発症高血圧自然発症ラット (stroke-prone spontaneous hypertensive rat; SHRSP: n=8) を加えた 4 群のラットを 4 週間飼育し、収縮期血圧および心拍数の推移をカフ法により観察した。4 週間後一部のラットは実験に供し (saline(1M)群: n=8、low NAME(1M)群: n=12、high NAME(1M)群: n=12、および SHRSP 群: n=8)、他は浸透圧ポンプを交換し、同じもの (saline(2M)群: n=8、low NAME(2M)群: n=8、high NAME(2M)群: n=7)、もしくは生理食塩水を充填した浸透圧ポンプを再び埋め込み (low NAME-saline 群: n=8、high NAME-saline 群: n=7)、さらに 4 週間 (計 8 週間) 飼育・観察した。4 および 8 週間の飼育・観察後採血し、血清カテコラミン濃度 (HPLC 法) および血漿活性レニン濃度を測定した。次いで心臓を摘出し、HE 染色標本より冠動脈の壁厚および内腔径を計測して壁厚/内腔径比を算出し、Masson Trichrome 染色標本より心筋間質線維化の程度に対し 0-3 のスコアをつけて定量化した。また腎臓組織所見を検索した。

【結果】 high NAME 群では最初の 4 週間で 5 匹が死亡し、後半の 4 週間でさらに 5 匹が死亡したため、high NAME(2M)群は以後の解析から除外した。

4 週間の LNAME 投与により、収縮期血圧は low NAME 群で 112 から 137 mmHg、high NAME 群では 113 から 179 mmHg へと上昇した。4 週間後 LNAME に変えて生理食塩水を投与した群では、low NAME-saline 群で血圧が 116 mmHg へと正常化した。high NAME-saline 群では 8 週目の血圧が 122mmHg と完全には正常化しなかった。low NAME(2M)群では 140 mmHg 前後の血圧上昇が 8 週目まで持続した。心拍数は low NAME 群では 416 から 354 と低下し、この低下は 8 週目まで持続した。一方 high NAME 群では、心拍数は 411 から 322 まで低下したが、その後徐々に増加し、4 週間後には 428 と saline 群と同程度まで上昇した。low NAME-saline 群では、生理食塩水投与に変更後、心拍数は直ちに saline(2M)群と同レベルまで回復した。

血清ノルエピネフリン (NE) 濃度は、4 週間の処置で saline(1M)群 132 ± 17 (SE) pg/ml、low NAME(1M)群 149 ± 14 pg/ml、high NAME(1M)群 246 ± 44 pg/ml、SHRSP 群 150 ± 33 pg/ml と

high NAME(1M)群のみで有意 ($p < 0.05$) に高値となった。8週間後の NE 値は、saline(2M)群、low NAME(2M)群で有意な変化を認めなかったが、high NAME(1M)群で認められた高値は high NAME-saline 群 (114 ± 13 pg/ml) で有意 ($p < 0.05$) に減少し、他群と同等となった。血清ドーパミン (DA) 濃度は、4週目で low NAME(1M)群 (70 ± 15 pg/ml) および high NAME(1M)群 (58 ± 9 pg/ml) が、saline(1M)群 (126 ± 28 pg/ml) に比し有意 ($p < 0.05$) に低値となった。この LNAME 投与群の DA 低値は、8週目には生理食塩水投与への変更により saline(2M)群と同レベルまで回復したが (low NAME-saline 群: 167 ± 57 pg/ml、high NAME-saline 群: 111 ± 45 pg/ml)、LNAME の継続投与ではさらに低下した (low NAME(2M)群: 21 ± 7 pg/ml)。血漿活性レニン濃度は各群で有意差を認めなかった。

組織学的所見では、LNAME 投与は冠動脈壁の肥厚および心筋間質の線維化をもたらし、血管および線維化の周囲には心臓組織球を主体とする細胞浸潤が認められた。これらの変化は high NAME 群で顕著であり、4週間の生理食塩水追加投与によっても 8週目で回復しなかった。また、血圧上昇がより著しい SHRSP 群と比べ、high NAME(1M)群で冠動脈壁厚・内腔比がより大きく、なかでも内腔 $100 \mu\text{m}$ 未満の細動脈壁の肥厚が強かった。心筋間質の線維化も high NAME(1M)群で SHRSP 群より有意に高度であった。腎臓には有意な変化は確認されなかった。

【考察】LNAME 等の NOS 阻害薬による血圧上昇は、主に抵抗血管で血管内皮細胞の NOS-3 により持続的に放出される NO の生成低下によるとされている。本研究で high NAME-saline 群において、4週目以降 NOS 阻害薬投与中止にもかかわらず血圧が正常化しなかった理由は、1M NAME の 4週間投与により、非可逆性の細動脈病変が生じた可能性、内皮傷害により NO 生成が完全には回復しなかった可能性などが考えられる。

LNAME 投与群での心拍数低下は、血圧上昇に対する圧受容器反射を介したものと考えられる。しかし high NAME 群では、一旦減少した心拍数は徐々に増加し、4週目にはほぼ saline 群と同等にまで回復した。血圧の持続的上昇にもかかわらず、high NAME 群で心拍数が上昇した理由として、同群で NE 濃度が高かったことが挙げられる。以前より、NOS 阻害薬急性投与では中枢の NOS-1 が阻害され、交感神経活性が亢進するとされている。本研究における心拍数および NE 濃度の推移は、NOS 慢性阻害でも交感神経活性亢進が存在することを示唆する。

本研究で認められた組織学的所見は、NOS 慢性阻害モデルにおける細動脈壁の肥厚や心筋間質の線維化に、NOS-3 阻害による血圧上昇以外の要素が重要な意味を持つことを示唆している。以前より、同モデルの著しい組織変化にはレニン・アンジオテンシン系の関与が示唆されていたが、本研究で明らかとなった交感神経活性亢進を介した NE 濃度上昇により、 $\alpha 1$ -受容体刺激が亢進し、血管平滑筋細胞や線維芽細胞の増殖が促進された可能性が考えられる。また、NO は血管内皮細胞の表面への接着因子の発現を抑制することが知られている。本研究では、LNAME 投与群の冠小・細動脈肥厚部位の周囲に心臓組織球による細胞浸潤が認められたが、NOS-3 阻害による NO 生成減少の結果、接着因子の発現が亢進し、免疫担当細胞が血管壁に接着・侵入して各種サイトカインの産生を亢進させ、血管平滑筋細胞や線維芽細胞の増殖が促進した可能性がある。さらに細胞浸潤の存在する部位では、浸潤細胞自身やその周囲の細胞に NOS-2 が誘導されることが知られている。この NOS-2 から生成される NO は、血管平滑筋細胞や線維芽細胞の増殖を抑制するとされており、NOS 阻害により NOS-2 からの NO 生成が減少すれば、さらに冠動脈壁肥厚や心筋間質線維化を進行させ得ると思われる。以上より、本研究で認められた LNAME 投与による冠動脈壁での肥厚と心筋間質の線維化には、内皮由来の NOS-3 阻害のみならず中枢性の NOS-1 阻害、さらに NOS-2 阻害が関与した可能性が考えられる。

【結論】浸透圧ポンプ腹腔内留置による LNAME 慢性投与で NOS を阻害した場合、血圧の上昇にもかかわらず心拍数が増加し、さらに血清 NE 濃度の上昇が認められることから、慢性的な NOS 阻害によっても交感神経活性が上昇することが示された。慢性的な NOS 阻害による NO 生成低下は、特に内腔 $100 \mu\text{m}$ 未満の細動脈の肥厚と著しい心筋間質の線維化をもたらした。その機序として NOS-3 阻害による NO 生成低下以外に、NOS-1 や NOS-2 由来 NO の生成阻害が関与する可能性が示唆された。以上より、L-アルギニン-NO 系は、NOS-3 のみならず NOS-1 や NOS-2 から生成される NO を介して、心・循環系の恒常性維持に重要な役割を担うことが示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 北 畠 顯
副 査 教 授 齋 藤 秀 哉
副 査 教 授 菅 野 盛 夫

学位論文題名

L-アルギニン由来Nitric Oxideの冠動脈・心筋間質構築の恒常性維持 および交感神経活動制御への関与に関する研究

Nitric oxide (NO) は3種のNO合成酵素 (NOS) によりL-アルギニンから生成され、種々の作用を有する。NOS阻害薬を動物に急性投与すると、血管内皮細胞のNOS-3阻害により血圧が上昇するとともに交感神経活性が増加することから、中枢性NOS-1由来のNOは交感神経活性低下作用を有するとされている。本研究では、まず慢性的にNOSを阻害した際にも交感神経活性増加が認められるか否かを検索し、さらにその際の心臓病理所見を検索することより、種々のNOSから生成されるNOが冠動脈および心筋間質の恒常性維持に果たす役割を検討した。

方法として12週齢雄性Wistarラットに腹腔内に浸透圧ポンプを埋め込み、生理食塩水 (saline群)、NOS阻害薬L-N^G-nitroargininemethylester (LNAME) 0.2 mol/L溶液 (low NAME群)、もしくは1 mol/L溶液 (high NAME群) を慢性投与した。高血圧対照として同週齢の雄性脳卒中易発症高血圧自然発症ラット (SHRSP) を用いた。4週間後一部のラットは実験に供し、他は浸透圧ポンプの充填液を交換してさらに4週間飼育した。4および8週間後採血し、心臓を摘出してHE染色およびMasson Trichrome染色により、冠動脈の壁厚/内腔径比を算出し、さらに心筋間質線維化の程度を定量化した。

LNAME慢性投与により、収縮期血圧は濃度依存性に上昇した。4週間後LNAMEを生理食塩水に交換した群では、血圧が低下した。心拍数はLNAME投与群で低下し、low NAME群では8週目まで低下が持続したが、high NAME群では心拍数は一旦低下後徐々に増加し、4週間後にはsaline群と同程度まで上昇した。血清ノルエピネフリン濃度は、4週間後のhigh NAME群のみ有意に高値となった。血清ドーパミン濃度は、4週目でLNAME投与群でsaline群に比し有意に低値となり、このDA低値は生理食塩水への交換により8週目にはsaline群と同レベルまで回復したが、LNAMEの追加投与ではさらに低下した。以上より、NOS慢性阻害でも、NOS-3阻害により血圧が上昇するのみならず、NOS-1阻害により交感神経活性が亢進することが示唆された。

心臓の組織学的所見では、NOS慢性阻害により冠動脈壁の肥厚および心筋間質の線維化と、心臓組織球を主体とする細胞浸潤を認めた。とくにhigh NAME群では、血圧上昇がより激しいSHRSP群に比べ、特に内腔100 μm未満の細動脈の動脈壁厚・内腔比が有意に大きく、心筋間質の線維化も有意に高度であった。これらの結果は、冠動脈壁肥厚および心筋間質線維化に、高

血圧以外の因子の存在を示唆した。本モデルの著しい組織変化にはレニン・アンギオテンシン系の関与が想定されているが、本研究ではさらに交感神経活性増加を介したNE濃度上昇により $\alpha 1$ -交感神経受容体刺激が亢進し、血管平滑筋細胞や線維芽細胞の増殖が促進された可能性がある。また、NOS-3阻害により血管内皮での接着因子発現が亢進し、免疫細胞の血管壁への接着・侵入、さらにサイトカイン産生が惹起され、細胞増殖性変化が増大したと考えられる。また、浸潤細胞自身やその周囲の細胞にはNOS-2が誘導され、それから生成されるNOは細胞増殖を抑制するが、本モデルではNOS阻害によりNOS-2由来NOの生成が減少し、さらに冠動脈壁肥厚や心筋間質線維化を進行させた可能性がある。

以上より、本研究で認められたLNAME投与による冠動脈壁での肥厚と心筋間質の線維化には、内皮由来のNOS-3阻害のみならず中枢性のNOS-1阻害、さらにNOS-2阻害が関与する可能性があり、L-アルギニン-NO系は、NOS-3のみならずNOS-1やNOS-2から生成されるNOを介して、心・循環系の恒常性維持に重要な役割を担うことが示唆された。

公開発表は約25名の聴衆の前で行われ、副査の齋藤秀哉教授よりNOS慢性阻害モデルにおけるレニン・アンギオテンシン系の関与について、心筋構築変化の持続性および血圧との関係について、さらに臨床における類似の病変に関する質問がなされた。また、副査の菅野教授よりLNAMEの薬理学的作用、本モデルにおける圧反射の状態、組織所見検討の客観性、NOの線維化抑制の機序に関して、さらに各種臨床的病態におけるNOS活性についての質問がなされた。主査の北島教授からは、NOS-1を介する非アドレナリン・非コリン性神経の関与について、および冠動脈径とNOS阻害の効果に関して質問があった。申請者はこれらの質問に対して、実験状況の説明を的確に行い、実験結果や臨床的意義に関しては他の論文や自己の臨床経験を引用し、豊富な知識に基づいてほぼ妥当に回答した。

本研究は、心・循環系の恒常性維持にL-アルギニン-NO系が種々のNOSを介して関与することを明らかとした。臨床的にも、本研究で認められたと同様な冠細動脈の選択的肥厚が認められる病態として、微小血管性狭心症があり、本研究は同疾患の原因究明にも貢献すると思われる。審査担当者一同は、これらの成果を高く評価し、申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判断した。