

学 位 論 文 題 名

Long-term blockade of nitric oxide synthesis
in rats modulates coronary capillary
network remodeling

(ラット心筋内毛細血管再構築における
一酸化窒素合成酵素阻害の影響に関する研究)

学位論文内容の要旨

血管内皮細胞には内皮型の一酸化窒素合成酵素 (nitric oxide synthase, NOS) が存在し、NOSにより産生される一酸化窒素 (nitric oxide, NO) は、cGMPを増加させる事を介して、血管の弛緩、血小板凝集抑制、血管平滑筋の遊走や増殖の抑制などの作用を持ち、血管の恒常性維持に重要な役割を果たしている。NOS 阻害薬 *N* ω -nitro- L-arginine methyl ester (L-NAME) を慢性投与し NOS を阻害した rat ではNOが減少し、高血圧を発症することが知られており、さらに血管周囲の線維化を生じる。しかし、血管増殖に関連する成長因子発現や心筋内毛細血管の再構築に対する影響についてはよく知られていない。そこで本検討では、このモデルを用いて、NOS阻害による NO 産生障害時に於ける心筋内毛細血管の変化について、alkaline phosphatase を含む細動脈性毛細血管を青色に、またdipeptidylpeptidase IVを含む細静脈性毛細血管を赤色に染色するdouble staining technique を用いてその構造的変化を検討し、さらに、この血管の構築変化の機序についてbasic fibroblast growth factor (bFGF)、vascular endothelial growth factor (VEGF)、transforming growth factor- β (TGF- β) の発現を免疫染色とノーザンブロット法にて検討した。

Wister rat12週齢の雄を用い、0.01%L-NAME、0.1%L-NAMEの2種類の濃度で飲料水に混ぜ投与した。1日当りの平均L-NAME摂取量は、0.01%L-NAME投与群で約13mg/kg、0.1%L-NAME投与群で約135mg/kgであった。また週に1度、tail cuff methodにて血圧・心拍数を測定し、L-NAME投与後1週目並びに8週目に、ratをdecapitationし、心重量、左室重量を測定した後に左室をOCT compoundで包埋し液体窒素で凍結させ以下の検討に用いた。凍結標本を薄切し、double staining technique、免疫染色を行い、左室の一部は、そのまま液体窒素で凍結し、RNAを抽出しノーザンブロット法に用いた。

L-NAME投与ratの収縮期血圧は、投与2、3週目より、両群共にcontrolに比較して有意に上昇した。0.01%L-NAME投与群では、その後160mmHg前後で推移したが、

0.1%L-NAME投与群ではその後も上昇を続け、投与8週目では約210mmHgまで増加し、dose-dependentな収縮期血圧の上昇が認められた。心拍数は3群間で有意な変化は認められなかった。体重当りの心重量、左室重量は、0.1%L-NAME投与群で体重当りの左室重量が有意に増加していた。

Double staining techniqueによる心筋内毛細血管横断面の染色では、総毛細血管数は、L-NAME投与により、増加傾向を示していたが、統計上有為差はなかった。しかし、0.01%L-NAME投与群では、赤色に染色される細静脈性毛細血管の増加を、0.1%L-NAME投与群では、紫色に染色される中間性毛細血管の増加を認めた。心筋細胞の横断面積は3群間で違いはなかった。

Masson染色にて、0.01%L-NAME投与群、0.1%L-NAME投与群共に細動脈周囲の繊維化を認め、0.01%L-NAME投与群、0.1%L-NAME投与群共にwall to lumen ratio、fibrosis to lumen ratioの有意な増加を認めた。

免疫染色において、bFGFの発現はcontrolではわずかに細動脈壁並びに周囲に染色を認めているだけであるが、0.1%L-NAME投与群では、1週間後には強く心筋内細動脈壁の染色を認めた。8週間後に於いては0.01%L-NAME投与群、0.1%L-NAME投与群共に細動脈壁並びに広く周囲に染色が認められた。VEGFの発現はcontrol並びに1週間後ではわずかに血管周囲に染色を認めるだけであるが、8週間後に於いては0.01%L-NAME投与群、0.1%L-NAME投与群共に心筋内細動脈の外膜に染色が認められた。TGF- β の発現は0.01%L-NAME投与群、0.1%L-NAME投与群共に心筋内細動脈周囲の線維化を生じている部位に認められた。

ノーザンブロット法では、L-NAME投与後1週目の心筋のbFGF mRNAの発現の増加が認められた。VEGF mRNAとTGF- β mRNAはcontrol心筋においても発現が認められているが、L-NAME投与により軽度増強していた。

L-NAMEを経口投与し、長期間NO合成を阻害したratにおいて、L-NAME投与量に依存して血圧が上昇し、その心臓において、血管周囲の線維化と心筋内毛細血管構造の変化が認められた。また、これらの変化に伴い血管増殖因子であるbFGF、VEGFの発現の増強が認められた。しかし、TGF- β も発現が増強しておりbFGF、VEGFの血管増殖作用に対して拮抗的に働き、心筋内毛細血管再構築に対して抑制的に働いている事が推測された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 菅 野 盛 夫
副 査 教 授 北 畠 顕
副 査 教 授 川 口 秀 明

学 位 論 文 題 名

Long-term blockade of nitric oxide synthesis in rats modulates coronary capillary network remodeling

(ラット心筋内毛細血管再構築における
一酸化窒素合成酵素阻害の影響に関する研究)

一酸化窒素 (nitric oxide: NO) は、血管の弛緩、血小板凝集抑制、血管平滑筋の遊走や増殖の抑制など血管の恒常性維持に重要な役割を果たす活性分子であり、NO合成酵素 (NOS) によってL-arginineから生成される。NO合成を抑制したラットでは、高血圧とともに血管周囲の線維化を伴う冠動脈のリモデリングや過収縮反応を起こすことが報告されている。申請者は、虚血や運動による心負荷が惹起する心筋内毛細血管の構造変化には様々な増殖因子の発現が増強してくる知見をふまえ、NOS阻害薬 N^{ω} -nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) をラットに慢性投与してNO産生を阻害した場合の心筋内細動脈ならびに毛細血管構造の変化と増殖因子発現の関連について検討を加えた。実験にはL-NAMEを0.01%と0.1%の濃度で8週間経口投与したwisterラットを用い、心筋内細動脈ならびに毛細血管構造の変化と様々な増殖因子発現を、精緻な組織形態解析法および分子生物学的解析手法を用いて観察している。NO産生阻害を反映してL-NAME投与ラットの血圧は投与濃度に依存して上昇することを認めた。摘出した心臓から作製した組織標本について、double staining technique (alkaline phosphatase を含む細動脈性毛細血管を青色に、dipeptidylpeptidase IVを含む細静脈性毛細血管を赤色に染色する方法) を用いて心筋組織毛細血管の構造的変化を検討したところ、総毛細血管数には差は認めなかったものの、0.01%L-NAME投与群では、細静脈性毛細血管の増加を、0.1%

L-NAME投与群では、中間性毛細血管の増加が起こることを示した。また、Masson染色を行い、L-NAME投与の両群において細動脈壁の肥厚と周囲の線維化が生じことを確認している。一方、血管増殖因子である塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF) ならびに血管内皮増殖因子 (VEGF) の発現の増強を細動脈ないしはその周囲に認め、血管新生に対し

て抑制的に働く形質転換増殖因子 (TGF- β) の発現の増強も同時に生じていることを免疫染色にて明らかにしている。ノーザンブロット法においても、L-NAME投与後1週目の心筋のbFGF、VEGFならびにTGF- β mRNAの発現が増加していることを明らかにした。以上の実験成績から、申請者は、NOS阻害により生じるNOの減少が血圧上昇を生じるとともに、心筋内の細動脈ならびに毛細血管のリモデリングを惹起し、そのプロセスに対して増殖因子が関与している可能性を示唆した。学位論文の発表に際し、副査の川口教授より血圧上昇の毛細血管構造に対する影響について、NOのin vitroにおける増殖因子に対する効果ならびに生体にたいする影響について、副査の北畠教授から用いられた実験系の病態としての意味づけ、本検討における観察期間の妥当性ならびに毛細血管構築の変化に対する増殖因子の役割について、主査の菅野教授から内皮型NOSのノックアウトマウスにおける心筋内毛細血管構造の変化、NOS阻害の程度と増殖因子発現の関連、ならびに心肥大と心筋内毛細血管構造の関連についての質問があった。申請者は研究結果に基づいて、あるいは、豊富な文献的知識により適切に解答し得た。

本論文は、組織形態学的ならびに分子生物学的解析手法を用いて、一酸化窒素合成酵素阻害ラットの心筋内毛細血管構造変化と増殖因子発現を明確にし、今後の一酸化窒素の心筋内毛細血管リモデリングにたいする影響ならびに血管新生に対する増殖因子の役割についての検討に示唆と方向性を与えた点で高く評価される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。