

学 位 論 文 の 要 旨

学位の種類	博 士	氏 名	金 井 麻 子
<p>学 位 論 文 題 目</p> <p>Role of nitric oxide in the development of inflammatory tachycardia (炎症性頻脈発現における一酸化窒素の役割)</p> <p>共 著 者 名 結城幸一、鈴木康博、柏木 仁、川辺淳一、高畑 治、 千石一雄、牛首文隆</p> <p>未 公 表</p> <p>研 究 目 的</p> <p>炎症性頻脈は、発熱および頻呼吸と共に全身性炎症の存在を示す三主徴を形成する。以前我々は、プロスタノイドであるプロスタグランジン(PG)F₂αとトロンボキサン(TX)A₂が、炎症性頻脈の発現において重要な役割を果たすことを示した。また従来、一酸化窒素(NO)の心拍調節への関与が示唆されている。しかし、炎症性頻脈におけるNOの役割あるいは炎症性頻脈におけるNOとプロスタノイドとの関係については不明である。そこで本研究は、NOの炎症性頻脈発現における役割をプロスタノイドとの関連を含めて解明することを目的とした。</p> <p>材 料 ・ 方 法</p> <p>1. マウス摘出右心房を用いた拍動数の解析</p> <p>実験には、C57BL/6マウスの遺伝背景を持つ雌性野生型マウスと、同遺伝背景を持つPGF₂α受容体(FP)およびTXA₂受容体(TP)の両受容体を欠損する雌性マウス(FP^{-/-}/TP^{-/-}マウス)を用いた。また、内皮型一酸化窒素合成酵素(eNOS)と誘導型一酸化窒素合成酵素(iNOS)を各々欠損するマウス(eNOS^{-/-}とiNOS^{-/-}マウス)および両者の交配で作出されたマウス(eNOS^{-/-}/iNOS^{-/-}マウス)を用いた。eNOS^{-/-}とiNOS^{-/-}マウスの遺伝背景は、C57BL/6と129sv マウスの混合である。</p> <p>マウス腹腔内に pentobarbital(10 mg/kg)を投与後、心臓を摘出して右心房を分離展</p>			

開し、Krebs-Henseleit Buffer (3 ml) を満たしたオルガンバス内に保持した。この時、Buffer を95% O₂、5% CO₂ で通気し、36 ± 0.5°C に維持した。摘出右心房の拍動数は、針電極からの心電図を用いて測定した。緩衝時間(1時間)の後、sodium nitroprusside (SNP) または炎症性サイトカイン (IL-1β 20 ng/ml、TNF-α 20 ng/ml、IFN-γ 10 ng/ml の混合) で右心房を刺激し、拍動数の変化を解析した。SNP 刺激の際には、内因性プロスタノイドの産生を抑制するため、インドメタシン (5 μM) を buffer に加えた。また、自律神経系の働きを抑制するため、buffer には atropine (1 μM)、propranolol (1 μM)、phenoxybenzamine (1 μM) を含めた。さらに、炎症性サイトカインの拍動数への影響に対する NO の効果を解析するため、数種類の一酸化窒素合成酵素 (NOS) 阻害薬を各々 buffer に加えた。

2. 右心房におけるシクロオキシゲナーゼ-2 (COX-2) の発現

SNP あるいは炎症性サイトカインで摘出右心房を刺激後、各表示時点で右心房を取り出しホモジェナイズした。ついで、蛋白質を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) により展開した後、ウェスタンブロットリング法により COX-2 蛋白質を同定・定量し、COX-2 発現の時間経過を解析した。

3. Biotin switch assay

COX-2 の S-ニトロソ化を Biotin switch 法にて解析した。実際には、摘出右心房をホモジェナイズした後、S-Nitrosylated Protein Detection Assay Kit を用いて S-ニトロソ化を解析した。

成 績

外因性 NO 発生薬である SNP は、野生型マウス摘出右心房の拍動数を有意に且つ持続的(〜3時間)に上昇させた。この SNP の作用は、インドメタシン前処置により部分的ではあるが有意に抑制された。また、SNP の作用は FP^{-/-}/TP^{-/-} マウス摘出右心房で野生型右心房に比し有意に減弱していたが、その程度はインドメタシン前処置した野生型マウス右心房と同程度であった。一方、野生型右心房において I-BOP (TPアゴニスト) あるいは PGF_{2α} で誘発される頻拍は、非選択的 NOS 阻害薬である L-NAME による影響を受けなかった。

内因性 NO の炎症性頻脈発現における役割を解析するため、炎症性頻脈を惹起する炎症性サイトカインで摘出右心房を刺激し拍動数を上昇させた。L-NAME 前処置は、炎症性サイトカインによる拍動数上昇を完全に抑制した。ついで、2種の NOS サブタイプ (eNOS、iNOS) 各々に特異的な阻害薬の効果を解析した。その結果、eNOS 阻害薬では拍動数上昇が全般的に有意に抑制された。一方、iNOS 阻害薬前処置では、拍動数上昇の後半部分が有意に抑制された。さらに、炎症性サイトカインによる拍動数上昇は、eNOS^{-/-} と iNOS^{-/-} マウス摘出右心房において有意に減弱し、eNOS^{-/-}/iNOS^{-/-} マウス摘出右心房では完全に消失した。

炎症性サイトカイン刺激にともなう摘出右心房での COX-2 の発現変化をウェスタンブロットティング法にて解析した。その結果、COX-2 発現は時間依存的に増強したが、対照群では COX-2 発現に変化は認められなかった。また L-NAME 前処置は、炎症性サイトカインにより誘導される COX-2 発現を有意に抑制した。

炎症性サイトカイン刺激により産生された内因性の NO が、COX-2 を S-ニトロソ化して活性を上昇させている可能性を検討した。その結果、COX-2 は時間依存的に S-ニトロソ化されていた。また、L-NAME 前処置により、COX-2 の S-ニトロソ化は有意に抑制された。

考 案

外因性の NO は、摘出右心房の拍動数を有意に上昇させた。その作用は、プロスタノイド生成の律速酵素である COX の阻害薬であるインドメタシンにより有意に抑制され、FP^{-/-}/TP^{-/-} マウス摘出右心房において同程度に減弱していた。この結果、外因性 NO による拍動数上昇には一部プロスタノイドが下流の情報伝達系として働いていることが示された。一方、インドメタシンは外因性 NO の効果を完全には抑制できないことから、外因性 NO はプロスタノイドとは独立した拍動数上昇作用を示すと考えられた。

炎症性サイトカイン刺激による野生型マウス摘出右心房の拍動数上昇は、インドメタシンと同様に非選択的 NOS 阻害薬である L-NAME により完全に抑制され、また eNOS^{-/-}/iNOS^{-/-} マウス摘出右心房で完全に消失したことから、炎症性サイトカインによる拍動数上昇にプロスタノイドとともに NO が重要な役割を果たすことが示された。

炎症性サイトカインによる拍動数上昇は、eNOS^{-/-} と iNOS^{-/-} マウス摘出右心房においては部分的に減弱したことから、eNOS^{-/-} と iNOS^{-/-} の両者が拍動数上昇に関与すると考えられた。特に、iNOS 阻害薬は拍動数上昇の後半部分を抑制することから、拍動数上昇の後半部分に iNOS により産生された NO の関与が示唆された。以前我々は、炎症性頻脈の後半部分は COX-2 選択的阻害薬で抑制されることを報告しているが、この結果は本研究で明らかにされた炎症性サイトカイン刺激による COX-2 蛋白の発現誘導と一致している。

PGF₂α と トロンボキサン (TX) A₂ は、直接ペースメーカー細胞に働いて陽性変時作用を示すことから、炎症性サイトカインによる拍動数上昇においては NO がプロスタノイドの上流に位置する情報伝達系と考えられる。この機構を解析するため、特に炎症性サイトカインによる拍動数上昇の後半部位に着目して NO の COX-2 に対する作用を検討した。この結果、L-NAME は COX-2 発現量を有意に抑制した。さらに、炎症性サイトカイン刺激による COX-2 S-ニトロソ化の増強は L-NAME によって有意に抑制されたことから、iNOS 由来の NO が COX-2 を S-ニトロソ化して活性化していることが示唆された。

結 論

炎症性頻脈の発現において NOS-NO 系がプロスタノイド系の上流に位置して、重要な役割を果たすことが解明された。また、その作用機構の一部として、COX-2 の発現誘導や COX-2 の S-ニトロソ化によるプロスタノイド産生の増強が示唆された。

引 用 文 献

Takayama, K. *et al.* Thromboxane A₂ and prostaglandin F₂α mediate inflammatory tachycardia. *Nat. Med.* **11**: 562-566, 2005.

Kim, S. F. *et al.* Inducible nitric oxide synthase binds, S-nitrosylates, and activates cyclooxygenase-2. *Science* **310**: 1066-1070, 2001.

Atar, S. *et al.* Atorvastatin-induced cardioprotection is mediated by increasing inducible nitric oxide synthase and consequent S-nitrosylation of cyclooxygenase-2. *Am. J. Physiol.* **290**: H1960-H1968, 2005.

学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第 号		
学位の種類	博士 (医学)	氏 名	金 井 麻 子
<u>審査委員長 長谷部 直 幸</u>			
<u>審査委員 谷 口 隆 信</u>			
<u>審査委員 牛 首 文 隆</u>			
<u>審査委員 千 石 一 雄</u>			
学 位 論 文 題 目			
Roles of nitric oxide in the development of inflammatory tachycardia (炎症性頻脈発現における一酸化窒素の役割)			
<p>頻脈は、発熱・頻呼吸とともに炎症反応を特徴付ける重要な症候のひとつである。炎症に伴い産生される一酸化窒素 (NO) は、頻脈を誘発することが知られている。また、以前申請者らのグループは、プロスタノイドの中で PGF2α および TXA2 が炎症性頻脈を誘発することを明らかにしている。しかし、炎症性頻脈における内因性の NO とプロスタノイドの相互関連は十分に明らかにされていない。論文提出者は、マウス摘出心房標本を用いて、両者の関わりを明らかにした。</p> <p>外因性 NO により心房標本の拍動数は増加したが、この作用はインドメサシン前処置によりブロックされ、プロスタノイド受容体欠損マウスではこの作用が有意に減弱していた。逆に、プロスタノイドにより誘発される頻拍は、NO 合成阻害薬の前処置によっても有意な変化を示さず、NO がプロスタノイド系の上流に位置する関連の有ることが明らかにされた。</p>			

サイトカイン前処置による頻拍は、NOS 阻害薬の前処置ないし NOS 欠損マウスからの心房摘出標本を用いることで抑制された。同時に、サイトカイン前処置により COX-2 が誘導されるが、NO が抑制された環境では COX-2 の誘導・活性化はともに抑制されることを確認した。

すなわち、炎症に伴い放出されるサイトカインが、心房の NOS を刺激して NO 濃度を上昇させ、これが COX 系を介してプロスタノイドの産生亢進を生じ、最終的に頻拍がもたらされるという一連の過程が明らかにされた。本研究で明らかにされた機序は、臨床的に炎症性頻脈を制御する上でも貴重な知見である。

また、試問審査においても適切かつ論理的な回答が得られ、提出者は関連領域において十分な知識を有することが示された。

以上の審査結果から、本審査委員会は、本論文が医学博士の学位に値するものであると判定した。

— 以上 —