

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 13 日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390055

研究課題名(和文)生活習慣病における一酸化窒素(NO)作動性神経の関与

研究課題名(英文)Nitrgic function in life style-related diseases

研究代表者

岡村 富夫(Okamura, Tomio)

滋賀医科大学・医学部・教授

研究者番号：70152337

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,300,000円、(間接経費) 4,290,000円

研究成果の概要(和文)：血管や陰茎海綿体などの平滑筋を拡張するNO作動性神経は、それぞれ脳循環や勃起機能の維持に重要な役割を果たしている。高血圧や糖尿病などの生活習慣病におけるNO作動性神経機能について、各々のモデル動物より摘出した陰茎海綿体を用いて検討した。病態モデルでは神経刺激による平滑筋拡張能が低下しており、収縮神経の機能亢進、拡張神経の機能低下あるいはその両方が混在していることが明らかになった。少なくとも肥満を伴う型糖尿病モデルラットでは勃起機能の低下に神経型NO合成酵素の発現低下の関与が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Nitrgic nerves dilating smooth muscles of blood vessels and corpus cavernosum penis play an important role in the physiological regulation of cerebral circulation and erection, respectively. In the present study, change in nitrgic nerve function was examined in the corpus cavernosum isolated from experimental model rats of life style-related diseases such as SHR for hypertension and ZDF rats for diabetes with obese. In the experimental model rats, neurogenic dilating activity of smooth muscles was decreased due to hyperfunction of constricting nerves, hypofunction of dilating nerves, or both. Decrease d expression of nNOS in the corpus cavernosum is suggested to cause erectile dysfunction in ZDF rats.

研究分野：医歯薬学

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 NO作動性神経 陰茎海綿体 平滑筋支配神経 生活習慣病 活性酸素 末梢神経 血管内皮細胞

1. 研究開始当初の背景

(1) 糖尿病、高血圧、高脂血症などの生活習慣病は臨床疫学的な観点から独立した動脈硬化の危険因子として認識されてきた。それぞれ固有の病態モデル動物を用いた実験的研究から、血管内皮機能異常と血管壁における酸化ストレスの亢進が共通の現象として観察された。我々はその原因について病態モデル動物を用いて検討した結果、プテリジン代謝異常によるBH₄の産生低下が、血管内皮に局在する一酸化窒素(NO)合成酵素の機能異常を生じ、血管内皮機能異常と血管壁における酸化ストレスの亢進を同時に惹起していることを明らかにした。

(2) 他方、我々はNOを神経伝達物質とする神経(NO作動性神経)が血管(特に脳動脈)や陰茎海綿体に分布し、生理的な脳循環の維持や勃起機能に主要な役割を果たしていることを報告してきた。生活習慣病患者に脳循環障害や勃起不全が発症することは臨床的にも周知であるが、生活習慣病状態におけるNO作動性神経機能については報告がほとんどみられない。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、種々の生活習慣病モデル動物を用いて、NO作動性神経機能を観察し、各々の対照動物の同機能と比較検討することにより、機能低下の有無を評価する。もし、機能異常が観察されれば、神経側にその原因が有るのか効果器側の機能異常なのかを検討する。

(2) 多くの平滑筋拡張神経は、同収縮神経と生理的拮抗状態に有るので、平滑筋の神経性拡張反応の低下の原因は、必ずしも拡張神経の機能低下だけではないことに留意し、検討する。

3. 研究の方法

(1) 摘出平滑筋組織におけるNO作動性神経機能の評価方法

雄性の病態モデル動物[本態性高血圧モデルとして自然発症高血圧ラット(SHR)および易脳卒中発症性SHR(SHRSP)、食塩感受性高血圧モデルとしてDahl-Sラット、インスリン抵抗性モデルとして高フラクトース食飼育ラット、肥満を伴うII型糖尿病モデルとしてZucker-fattyラット]およびそれぞれの対照動物[Wistar-Kyoto(WKY)ラット、通常水および食飼育ラット、Zucker-leanラット]より内皮を除去した脳底動脈および陰茎海綿体を摘出し、好氣的条件下でマグヌス法にて経壁電気刺激(10V, 2-20 Hz)またはニコチン(100 μM)を適用することにより、神経終末から遊離される神経伝達物質の平滑筋作用を等尺性張力変化として記録した。これらの神経刺激方法は非特異的であるため、得られる張力変化は、平滑筋収縮神経と

拡張神経の代数和と考えられる。したがって、拡張反応が低下している場合には拡張神経機能が低下している場合だけでなく、収縮神経機能が亢進している場合あるいはその両方で有る可能性がある。

効果器側の機能異常については、収縮神経の伝達物質であるノルアドレナリンによる収縮作用を選択的α₁作動薬であるフェニレフリンによる張力変化で検討し、拡張神経の伝達物質であるNOによる弛緩作用をニトログリセリンなどのNOドナーによる張力変化で検討した。

(2) 平滑筋標本で産生されるスーパーオキシドの定量には、ニコチンによる神経刺激を適用し、ルシゲニン化学発光法を用いて測定した。

NO合成酵素活性は、³H-L-アルギニンを基質として適用し、産生されるL-シトルリン量を測定した。

NO合成酵素mRNAの発現は、CCA ACA AAG GGA ATC TCA GG ならびに CAC TCG GAA GTC ATG TTT GC をそれぞれ Primer-F および Primer-R として RT-PCR 装置にて定量した。

(3) 病態モデルが成立していることを評価するために体重、血圧、血糖、血中インスリン値、血中脂質などは常法に従って測定した。

4. 研究成果

(1) 自然発症高血圧ラットでの検討

SHR(収縮血圧226 mmHg)およびWKYラット(同128 mmHg)より脳動脈および陰茎海綿体を摘出し、神経性弛緩反応を検討した。これまでイヌおよびサル脳動脈に用いてきたマグヌス装置と同様にラット脳動脈の機能分析を試みたが、標本サイズの違いにより実験効率が予想以上に悪かったため、張力測定装置を改変あるいは変更する必要が生じた。他方、陰茎海綿体標本は、これまでイヌおよびサル陰茎海綿体での実験に用いてきた装置でラット海綿体標本の実験が可能であった。したがって、以後の実験は陰茎海綿体を対象として実験を実施した。

WKYより摘出した陰茎海綿体標本に経壁電気刺激を適用すると頻度依存性の弛緩反応が観察された。ニコチンの適用によっても同様に弛緩反応が観察された。両反応は共に充分量のNO合成酵素阻害薬ならびにナトリウムチャンネル阻害薬であるテトロドトキシンで消失したことから、同海綿体標本にはNO作動性神経が分布し、収縮神経よりも優位に機能していると考えられた。他方、SHRより摘出した陰茎海綿体標本では、経壁電気刺激およびニコチンの適用により収縮あるいは軽度の弛緩反応が観察された。収縮反応はα₁遮断薬のプラゾシンで抑制されたことから、SHRの陰茎海綿体では、WKYで優位に機能して

いるNO作動性の海綿体拡張神経が著明に抑制され、生理的に拮抗するノルアドレナリン作動性の収縮神経が優位に機能していたと考えられる。NOドナーによる海綿体弛緩反応や α_1 作動薬による収縮反応にはWKYとSHRの間で差が無かったことから、SHRでは海綿体平滑筋に分布するNO作動性神経とノルアドレナリン作動性神経のバランスに異常が生じ、神経性弛緩反応が減弱していると考えられた。これらのことが、慢性高血圧状態における勃起障害の一因と示唆された。

(2) インスリン抵抗性ラットおよび食塩感受性高血圧ラットでの検討

8週間の飲水により高フルクトースを摂取させて作成した雄性インスリン抵抗性モデルラット (EX) および同週齢で通常の水を飲水させた対照ラット (C) より陰茎海綿体を摘出し、マグヌス法を用いて経壁電気刺激あるいはニコチンにより神経刺激を行い、標本の等尺性張力変化を測定した。フェニレフリンで前収縮させた海綿体標本に経壁電気刺激を適用すると、EXおよびCラット共に頻度依存性の弛緩反応が観察された。ニコチンの適用によっても同様に弛緩反応が観察された。両反応は共に充分量のNO合成酵素阻害薬ならびにテトロドトキシンで消失したことから、同海綿体標本にはNO作動性神経が分布し、優位に機能していると考えられた。拡張神経性の弛緩反応を定量的に比較すると、EXラットおよびCラットの間統計的な有意差はなかった。したがって、軽度の高血圧ならびに高脂血症を呈するインスリン抵抗性状態では、陰茎海綿体のNO作動性神経機能ならびに勃起機能は低下しているとは考えにくい。

同様の実験を食塩感受性高血圧のモデルラットであるDahl S ラット (収縮期血圧 212 mmHg) を用いて、食塩負荷の有無で検討した。同様にフェニレフリンで前収縮させた海綿体標本において、経壁電気刺激ならびにニコチンの適用によって弛緩反応が観察され、両反応は充分量のNO合成酵素阻害薬で消失した。同拡張神経性の弛緩反応を両群間で比較すると、統計的な有意差は観察されなかった。SHRでは拡張神経機能の低下傾向がみられたので、高血圧の成り立ちによってもNO作動性神経機能に与える影響が異なることが示唆された。

(3) 易脳卒中発症性高血圧ラットおよび肥満を伴うII型糖尿病ラットでの検討

高血圧が高度に進展したSHRSP (易脳卒中発症性SHR) ならびに肥満を伴うII型糖尿病モデルラットである Zucker-fatty ラットを

用いて同様の実験を行った。すなわち各々のモデルラットおよびその対照群 (WKYおよび Zucker-leanラット) より陰茎海綿体を摘出し、マグヌス法を用いて経壁電気刺激により神経刺激を行い、標本の等尺性張力変化を測定した。前収縮させた海綿体標本に経壁電気刺激を適用すると、多くの標本で頻度依存性の弛緩反応が観察された。ただし、一部のモデルラットの海綿体では同条件で収縮反応が観察された。同弛緩反応は充分量のNO合成酵素阻害薬ならびにテトロドトキシンで消失したことから、同海綿体標本に分布するNO作動性神経の機能を観察していると考えられる。拡張神経性による弛緩反応を定量的に比較すると、モデルラットの方が対照群よりも低下傾向にあった。また、観察された収縮反応は α_1 ブロッカーで有意に抑制されたが、NO合成酵素阻害薬による増強は観察されなかった。したがって、高度の高血圧状態あるいは糖尿病+肥満状態では、陰茎海綿体のNO作動性神経機能ならびに勃起機能が低下していると考えられる。そこでZucker-fatty ラットの陰茎海綿体における神経型NO合成酵素 (nNOS) mRNAの発現を測定すると対照である Zucker-leanラットの約8分の1程度に低下していた。したがって、少なくとも肥満を伴うII型糖尿病における勃起機能の低下には陰茎海綿体におけるnNOSの発現低下が関与していると考えられる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計8件)

- ①Okamura T, Tawa M, Geddawy A, Shimosato T, Iwasaki H, Shintaku H, Yoshida Y, Masada M, Shinozaki K, Imamura T. : Effects of atorvastatin, amlodipine, and their combination on vascular dysfunction in insulin-resistant rats. J Pharmacol Sci, 査読有 124, 2014, 76-85,
- ②Toda N, Okamura T. : Obesity impairs vasodilatation and blood flow increase mediated by endothelial nitric oxide: An overview. J Clin Pharmacol., 査読有, 53, 2013, 1228-1239,
- ③Toda N, Toda H, Okamura T. : Regulation of myometrial circulation and uterine vascular tone by constitutive nitric

oxide. Eur J Pharmacol. 査読有, 714, 2013, 414-423.

- ④ Tawa M, Shimosato T, Gedday A, Imamura T, Okamura T. : Influence of hypoxia on endothelium-derived NO-mediated relaxation in rat carotid, mesenteric and iliac arteries. Pharmacology. 査読有, 91, 2013, 322-330,
- ⑤ Toda N, Okamura T. : Cerebral blood flow regulation by nitric oxide in Alzheimer's disease. J Alzheimers Dis. 査読有, 32 2012 569-578,
- ⑥ Toda N, Ayajiki K, Okamura T. : Neurogenic and endothelial nitric oxide regulates blood circulation in lingual and other oral tissues. J Cardiovasc Pharmacol., 査読有, 60 2012 100-108,
- ⑦ Shimosato T, Gedday A, Tawa M, Imamura T, Okamura T. : Chronic administration of nicotine-free cigarette smoke extract impaired endothelium-dependent vascular relaxation in rats via increased vascular oxidative stress. J Pharmacol Sci.. 査読有, 118, 2012, 206-214,
- ⑧ Ayajiki K, Kobuchi S, Tawa M, Okamura T : Nitroergic nerves derived from the pterygopalatine ganglion innervate arteries irrigating the cerebrum but not the cerebellum and brain stem in monkeys. Hypertens Res. , 査読有, 35, 2012, 88-92,

[学会発表] (計1件)

- ① 田和正志、下里貴、Gedday Ayman、新宅治夫、政田正広、今村武史、岡村富夫、インスリン抵抗性ラットにおける血管機能障害に及ぼすアトロバスタチンおよびアムロジピンの併用効果、第13回日本N〇学会、2013年6月28~29日、沖縄県医師会館

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡村 富夫 (OKAMURA, Tomio)
滋賀医科大学・医学部・教授
研究者番号：70152337

(2) 研究分担者

今村 武史 (IMAMURA, Takeshi)
滋賀医科大学・医学部・准教授
研究者番号：00552093

田和 正志 (TAWA, Masashi)
滋賀医科大学・医学部・助教
研究者番号：10510274

(3) 連携研究者

政田 正広 (MASADA, Masahiro)
千葉大学・大学院園芸学研究科・教授
研究者番号：00229353