

氏 名	田和 正志
学位の種類	博士 (医学)
学位記番号	博士乙第412号
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位授与年月日	平成27年 3月10日
学位論文題目	Different Influences of Extracellular and Intracellular Superoxide on Relaxation Through the NO/sGC/cGMP Pathway in Isolated Rat Iliac Arteries. (摘出ラット腸骨動脈における NO/sGC/cGMP 経路を介する弛緩に及ぼす細胞内外スーパーオキシドの異なる影響)
審査委員	主査 教授 安藤 朗 副査 教授 杉原 洋行 副査 教授 西村 正樹

論文内容要旨

*整理番号	416	氏名 (ふりがな)	たわお まさし 田和 正志
学位論文題目	Different Influences of Extracellular and Intracellular Superoxide on Relaxation Through the NO/sGC/cGMP Pathway in Isolated Rat Iliac Arteries (摘出ラット腸骨動脈における NO/sGC/cGMP 経路を介する弛緩に及ぼす細胞内外スーパーオキシドの異なる影響)		
<p>【目的】病的な血管ではスーパーオキシドの産生が亢進しており、一酸化窒素 (NO)/可溶性グアニル酸シクラーゼ (sGC)/cGMP 経路に異常をきたすことが広く知られている。その機序としては、スーパーオキシドが NO を捕捉することにより NO 自身の生体利用効率を低下させることが挙げられる。これに加えて、近年、スーパーオキシドには sGC のヘム鉄を酸化する、あるいは脱離させる作用があり、NO による sGC 活性化を抑制する可能性が示唆されている。なお、NO は sGC の 2 価 (2+) の状態 (還元型 sGC) のヘム鉄に結合することにより酵素活性を惹起し、ヘム鉄が 3 価 (3+) の状態になる (酸化型 sGC)、あるいは脱離する (ヘム欠失型 sGC) と結合できないため活性化できなくなる。現に我々も、サルの前大動脈を用いた研究において、低酸素およびそれに引き続く再酸素に曝露すると血管壁スーパーオキシド産生が亢進し、上記の現象が生じることを明らかにした (Tawa et al., doi: 10.1254/jphs.11031FP; doi: 10.1254/jphs.14046FP)。しかし、スーパーオキシドの膜透過性は低いため、細胞内で産生されたスーパーオキシドと細胞外のそれが同じ作用を示すとは限らない。本研究では、細胞内外それぞれのスーパーオキシドが NO/sGC/cGMP 経路を介する血管弛緩反応に及ぼす影響を調べた。</p> <p>【方法】ペントバルビタール (50 mg/kg, i.p.) 麻酔下で脱血死させた雄性 Sprague-Dawley 系ラット (300~400 g) から摘出した腸骨動脈より条片標本を作製し、ピロガロール (10 μM: 細胞外スーパーオキシド産生薬)、メナジオン (1 μM: 細胞内スーパーオキシド産生薬)、あるいはそれらの溶媒処置 (1 時間) 下における各種薬物により生じる等尺性張力変化を観察した。なお、今回使用したアゴニストは、酸性化亜硝酸ナトリウム (外因性 NO)、ニトログリセリン (細胞内で NO へと変換)、BAY 41-2272 (還元型 sGC を NO 非依存的に活性化)、BAY 60-2770 (酸化型およびヘム欠失型 sGC を NO 非依存的に活性化)、8-Br-cGMP (cGMP アナログ) の 5 種である。また、標本を懸垂していた溶液中における、およびその標本自身の血管壁におけるスーパーオキシド産生量をルシゲニン化学発光法により測定した。さらに、スーパーオキシド産生薬の影響がスーパーオキシドディスムターゼ (SOD; 200 U/mL) あるいはテンポール (3 mM: 膜透過性 SOD 模倣薬) の存在下でどのように変化するのかについても同時に確認した。</p>			

- (備考) 1. 論文内容要旨は、研究の目的・方法・結果・考察・結論の順に記載し、2千字程度でタイプ等で印字すること。
2. ※印の欄には記入しないこと。

【結果】

1) ピロガロール曝露の影響

酸化亜硝酸ナトリウムによる血管弛緩反応は顕著に減弱したが、ニトログリセリン、BAY 41-2272, BAY 60-2770, 8-Br-cGMP による反応は影響を受けなかった。この酸化亜硝酸ナトリウムの反応性減弱は SOD あるいはテンポール前処置により消失した。また、血管におけるスーパーオキシド産生量は変わらなかったが、標本を懸垂していた栄養液中の産生量は有意に増大しており、SOD あるいはテンポール処置下ではその増大は観察されなかった。

2) メナジオン曝露の影響

酸化亜硝酸ナトリウム、ニトログリセリン、BAY 41-2272 による弛緩反応は顕著に減弱したのに対して、BAY 60-2770 の反応は増強した。これらの各アゴニストに対する影響はテンポール処置により消失したが、SOD 処置ではしなかった。なお、8-Br-cGMP による弛緩反応は明らかな影響を受けなかった。また、栄養液中のスーパーオキシド産生量に差は認められなかったが、血管における産生量は有意に増大していた。この増大はテンポール前処置下でのみ消失した。

【考察】本研究では、2 種類の薬物を用いて細胞内外それぞれのスーパーオキシドの影響を調べた。ピロガロールは細胞膜を透過することができず、それ自身が自動酸化されることによりスーパーオキシドを産生することが知られている。一方、メナジオンは自由に細胞膜を透過でき、細胞内で酸化還元酵素によりセミキノンあるいはヒドロキノンに還元され、それらが自動酸化されることにより細胞内でスーパーオキシドが産生する。実際、ピロガロール曝露は栄養液中でのみ、メナジオン曝露は血管においてスーパーオキシド産生を亢進したことから、それぞれ細胞外および内のスーパーオキシド産生薬として機能していたと言える。次に、ピロガロール処置下の血管では酸化亜硝酸ナトリウムによる弛緩作用のみ抑制され、それが膜透過性を有さない SOD 存在下で消失したことから、細胞外のスーパーオキシドは細胞内には移行できず、細胞外では NO を捕捉するものの細胞内の NO/sGC/cGMP 経路には影響を与えないことが考えられる。一方、メナジオン処置下では酸化亜硝酸ナトリウムおよびニトログリセリン誘発血管弛緩反応はともに減弱したことに加え、これらの減弱がテンポール存在下では消失したが SOD ではしなかったことから、細胞内スーパーオキシドは主に細胞内で NO を捕捉することが推察される。また、BAY 41-2272 による反応の減弱、BAY 60-2770 による反応の増強、およびこれらがテンポール前処置下では認められなかったことは、細胞内のスーパーオキシドが sGC ヘム鉄のレドックス状態を NO 非感受性のタイプへとシフトさせたことを示唆している。

【結論】細胞外のスーパーオキシドは細胞外においてのみ NO を捕捉するのに対して、細胞内スーパーオキシドは NO を捕捉するのみならず、還元型 sGC を酸化型あるいはヘム欠失型 sGC へと変化させることが明らかになった。本成果は、病的血管において NO/sGC/cGMP 経路がどのように機能しているのかを理解する上で重要な知見である。

学位論文審査の結果の要旨

整理番号	416	氏名	田和 正志
論文審査委員			
<p>(学位論文審査の結果の要旨) (明朝体 11 ポイント、600 字以内で作成のこと。)</p> <p>本論文は、摘出ラット腸骨動脈における NO(nitric oxide)/sGC(soluble guanylate cyclase)/cGMP 経路を介した弛緩現象に対する細胞内外スーパーオキシドの効果について細胞内・外スーパーオキシド誘導薬を用いて検討し以下の点を明らかにした。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. ピロガロール (細胞外スーパーオキシド誘導薬) は、酸化亜硝酸 Na (細胞外 NO 誘導薬) 誘導性の弛緩現象を抑制したが、ニトログリセリン (内因性 NO 誘導薬)、BAY41-2272 (還元型 sGC 活性化薬)、BAY60-2770 (酸化型とヘム欠失型 sGC 活性化薬)、8-Br-cGMP (cGMP アナログ) 誘導性の弛緩現象には影響しなかった。 2. ピロガロールの弛緩抑制作用は、膜非透過性 SOD (superoxide dismutase) やテンポール (膜透過性 SOD) により回復した。 3. ピロガロールは緩衝液中のスーパーオキシド濃度の上昇を誘導したが、血管組織内濃度には影響しなかった。これらは SOD, テンポールの添加により抑制された。 4. メナジオン (細胞内スーパーオキシド誘導薬) は、酸化亜硝酸 Na、ニトログリセリン、BAY41-2272 誘導性の弛緩現象を抑制したが、BAY60-2770 の作用を増強した。8-Br-cGMP の作用には影響しなかった。 5. メナジオンの弛緩抑制作用は、テンポールにより回復した。 6. メナジオンは、血管組織のスーパーオキシド濃度の上昇を誘導し、この現象はテンポールの添加により抑制された。 <p>本論文は、NO の血管弛緩作用に対する細胞内外スーパーオキシドの効果について新しい知見を与えたものであり、最終試験として論文内容に関連した試問を受け合格したので博士 (医学) の学位論文に値するものと認められた。</p> <p style="text-align: right;">(総字数 597 字)</p>			
(平成 27 年 1 月 26 日)			