



Nitric Oxide Synthase Isoform Activities in Kidney of Dahl Salt-sensitive Rats

池田, 嘉弘

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1996-12-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲1591

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1001591>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏名・（本籍）	いけ だ よし ひろ 池 田 嘉 弘	（兵庫県）
博士の専攻分野の名称	博 士（医 学）	
学位記番号	博い第1054号	
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当	
学位授与の日付	平成8年8月31日	
学位論文題目	Nitric Oxide Synthase Isoform Activities in Kidney of Dahl Salt-sensitive Rats（ダール食塩感受性ラット腎での一酸化窒素合成酵素アイソフォーム活性）	
審 査 委 員	主査 教授 横 山 光 宏 教授 前 田 盛 教授 丸 尾 猛	

論 文 内 容 の 要 旨

1. 緒言

腎臓での水電解質代謝異常は、食塩感受性高血圧の発症に関与することが知られ、遺伝性食塩感受性ラットでは、圧利尿曲線の異常が高血圧の発症前から存在することが知られている。最近、一酸化窒素(NO)は食塩摂取量が増加した際にその産生が増え、血管拡張やナトリウム利尿を来することが報告された。一方、NO合成酵素(NOS)を阻害すると圧利尿曲線の異常を来し、さらに食塩摂取量を増加させると高血圧を発症することが示され、NOの産生障害が食塩感受性高血圧症の原因である可能性が示されている。特にダール食塩感受性ラットでは、尿中NO排泄が低下していることや、NOの前駆物質のL-アルギニンを投与することにより高血圧の発症が防がれる事が報告されている。これらより、ダール食塩感受性ラットにおいて、L-アルギニン-NO系の異常が高血圧の発症に関連する可能性が考えられるが、今のところNOSに異常があるのか否か、また、どのNOSのアイソフォームに異常があるのかは明らかでない。

NOは、L-アルギニンのグアジニノ窒素からNOSによって産生されるが、NOSには3種類のアイソフォームすなわち神経型、誘導型及び内皮型があることが知られ、遺伝子がクローニングされ、また細胞内の分布や活性化へのカルシウム(Ca)要求性の違いも明らかとなっている。内皮型NOSは細胞膜に存在しているが、神経型と誘導型NOSは細胞質に存在している。また、内皮型と神経型NOSはその活性化にCaが必要であるが、誘導型NOSはこれを要しないと報告されている。

今回、私達はダール食塩感受性ラットの腎臓において、NOS各アイソフォームの活性を測定し、その異常を明らかにしようとした。

2. 方法

動物と処置

5週齢の雄性ダール食塩感受性(Dahl S)、ダール食塩抵抗性(Dahl R)ラットを高食塩食(4% NaCl)摂取下で4週間飼育した。血圧、脈拍、体重を毎日測定し、4週間後に血清ナトリウム(Na)、カリウム(K)、クレアチニン(Cr)濃度と尿中Na、Cr排泄量を自動分析装置で測定した。

NOS活性とノルエピネフリン含量の測定

腎臓を摘出後、蛋白分解酵素阻害剤を含むTris/Cl緩衝液を用い4℃でホモジネートした。ホモジネートを4℃、100,000gで60分間超遠心し、細胞質分画及び細胞膜分画に分けた。NOS活性はPollockらの方法に準じてL-[³H]arginineからL-[³H]citrullineへの変換量で測定した。腎臓の各分画はL-[³H]arginineを含む反応液中で25℃、30分間反応させた。反応液からDowexAG 50W-X8 column(Na⁺form)を用いて抽出したL-[³H]citrullineの放射線量を測定した。Ca依存性と非依存性のNOS活性はCaCl₂とcalmodulinを含む反応液あるいは含まない反応液と、それらにNOS合成阻害剤を加えた反応液で得られたL-[³H]citrullineの放射線量の差として求めた。また、腎臓のノルエピネフリン含量は高速液体クロマトグラフィーで測定した。

蛋白の定量は牛血清アルブミンを標準蛋白質としてBradfordの方法で行い、腎臓の各NOSアイソフォーム活性とノルエピネフリン含量は蛋白量で補正した。

3. 結果

検査結果

実験開始前の血圧には両群間に差を認めなかったが、食塩負荷4週間後の血圧はDahl SでDahl Rよりも有意に高値($p<.001$)であった。体重と脈拍には両群間で差異を認めなかった。血清NaはDahl Sで高値であったが、血清Kには差がなく、尿量、尿中Na排泄量、fractional excretion of sodium、クレアチニンクリアランスにも差異を認めなかった。

各NOSアイソフォーム活性及び腎ノルエピネフリン含量との関係

内皮型NOS活性及び誘導型NOS活性は両群間に差異を認めなかったが、神経型NOS活性は、Dahl SでDahl Rよりも有意に低値($p<.01$)であった。また各アイソフォーム活性の総和もDahl SでDahl Rよりも有意に低値($p<.05$)であった。また、腎ノルエピネフリン含量はDahl Sで有意に低値($p<.05$)であり、神経型NOS活性との間には有意な正の相関関係($r=0.63$, $p<.01$)を認めた。

4. 考案

以上の成績より、Dahl Sの腎臓では、Dahl Rに比し、神経型NOS活性が有意に低下していることが明らかとなった。神経型NOSは脳、脊髄、交感神経節、副腎など様々な組織に存在することが知られているが、腎臓の内髄質集合管やthin limb、外髄質集合管、皮質集合管、糸球体、macula densa、直血管や弓状動脈にも認められている。NOは尿細管や血管系に作用して水、Na利尿を促進するが、腎臓の神経型NOSの局在は腎臓の血行動態や水、Na代謝への関与を推察させる。

近年、NOS阻害による高血圧の発症に、中枢や末梢の交感神経活動の変化が関与することが示唆されている。佐久間らはNOS合成阻害剤を静注した際に交感神経活動の亢進と血圧の上昇を観察した。この血圧上昇は脊髄切断により抑制されたが、迷走神経や洞動脈神経遮断では抑制されなかったことより、NOが中枢性に交感神経活動を調節していることが示された。さらに、NOS合成阻害剤を直接孤束核や延髄吻側腹外側核に投与した際に、血圧上昇と腎交感神経活動の亢進が認められている。また、NO作動性神経が末梢血管系に存在することが明らかになり、戸田らは血管内皮除去後も電気刺激時に血管拡張とNOの放出を観察しており、NO作動性神経が血管拡張作用を有することを明らかにした。彼らは生体において、節遮断薬であるヘキサメトニウムの前投与でNOS合成阻害剤の昇圧作用が抑制されるが、フェントラミンでは抑制されないことを示し、NOS合成阻害剤による高血圧は血管内皮からのNO産生障害よりもむしろNO作動性神経の障害が原因である可能性を示した。

今回の結果において内皮型NOS活性はDahl SとDahl Rの腎臓で差異を認めないが、神経型NOS活性はDahl Sで有意に低下し、内皮型よりも神経型NOS活性の低下が交感神経やNO作動性神経を介して高血圧発症に関係している可能性が示された。

今回Dahl SではDahl Rに比し腎臓のノルエピネフリン含量の減少が顕著に認められたが、これはDahl Sでは交感神経活動が亢進し、組織のノルエピネフリン含量の減少をきたすとしたこれまでの報告と一致している。さらに、腎臓のノルエピネフリン含量と神経型NOS活性の間には正相関関係が認められたが、近年、NO投与は交感神経終末のカテコラミン含量を増やし、カテコラミンの放出を抑制することが報告されており、神経型NOS活性の低下は腎交感神経活動のNOによる抑制を解除し、食塩感受性高血圧の発症に関与する可能性が示唆された。

また、NOは直接ネフロンに作用し、Naの再吸収を抑制することが報告されているが、Dahl Sでは、神経型NOSが多く存在している内髄質集合管でのNaの再吸収が亢進している。それゆえ、Dahl Sにおける腎神経型NOSの低下は直接水、Na排泄を抑制している可能性も考えられる。また、NOS合成阻害剤による遠位尿細管のNa輸送の抑制は圧利尿を弱めることが知られており、Dahl Sの神経型NOSの低下が食塩負荷時のNa排泄を障害している可能性が考えられるが、実際PatelらはL-アルギニン投与がDahl Sの高血圧の発症を圧利尿の促進を介して抑制することを報告している。

誘導型NOSも構成的に腎臓の尿細管に存在し、サイトカインでメサンギウム細胞、髄質間質細胞及び腎乳頭上皮に誘導される。Chenらは、L-アルギニン投与によるDahl Sの高血圧の発症抑制作用がデキサメサゾン投与で抑制されたことより、動脈壁の誘導型NOSが食塩感受性高血圧の原因遺伝子である可能性を示した。また、Dahl Sにおいて誘導型NOSの遺伝子座と血圧が遺伝的に関連するとの報告がなされた。しかし、今回の実験では2群間の誘導型NOS活性に差異を認めなかった。この理由として、使用した動物の系の違いや、酵素活性の測定法の違いなどが考えられるが、詳細は不明である。

5. まとめ

本研究では、Dahl Sの腎臓において神経型NOS活性が低下していること、及びノルエピネフリン含量が低下していることを示した。この神経型NOS活性の低下は交感神経活動を亢進させることや水電解質代謝に影響を与えることにより、Dahl Sの食塩感受性高血圧の発症に関与する可能性が考えられる。

論文審査の結果の要旨

腎臓での水電解質代謝異常は、食塩感受性高血圧の発症に関与することが知られ、遺伝性食塩感受性ラットでは、圧利尿曲線の異常が高血圧の発症前から存在することが知られている。最近、一酸化窒素(NO)は食塩摂取量が増加した際にその産生が増え、血管拡張やナトリウム利尿を来すことが報告された。ダール食塩感受性ラットでは、尿中NO排泄が低下していることや、NOの前駆物質のL-アルギニンを投与することにより高血圧の発症が防がれる事が報告されている。これらより、ダール食塩感受性ラットにおいてL-アルギニン-NO系の異常が高血圧の発症に関連する可能性が考えられるが、今のところNOSに異常があるのか否か、また、どのNOSのアイソフォームに異常があるのかは明らかでない。NOは、L-アルギニンのグアジニノ窒素からNOSによって産生されるが、NOSには3種類のアイソフォームすなわち神経型、誘導型及び内皮型があることが知られ、遺伝子がクロ-

ニングされ、また細胞内の分布や活性化へのカルシウム(Ca)要求性の違いも明らかになっている。今回私達はダール食塩感受性ラットの腎臓において、NOS各アイソフォームの活性を測定し、その異常を明らかにしようとした。

5 週齢の雄性ダール食塩感受性(Dahl S)、ダール食塩抵抗性(Dahl R)ラットを高食塩食(4%NaCl)摂取下で4週間飼育した。血圧、脈拍、体重を毎日測定し、4週間後に血清ナトリウム(Na)、カリウム(K)、クレアチニン(Cr)濃度と尿中Na、Cr排出量及び腎臓のノルエピネフリン含量を測定した。NO合成酵素活性は腎臓を摘出し、細胞質分画および細胞膜分画に分けた後に、Pollockらの方法に準じてL-[3H]arginineからL-[3H]citrullineへの変換量で測定した。Ca依存性と非依存性のNOS活性はCaCl₂とcalmodulinを含む反応液あるいは含まない反応液と、それらにNOS合成阻害剤を加えた反応液で得られたL-[3H]citrullineの放射量の差として求め以下の結果を得た。

実験開始前の血圧には両群間に差を認めなかったが、食塩負荷4週間後の血圧はDahl SでDahl Rよりも有意に高値であった。体重と脈拍には両群間で差異を認めなかった。血清NaはDahl Sで高値であったが、血清Kには差がなく、尿量、尿中Na排泄量、fractional excretion of sodium、クレアチニークリアランスにも差異を認めなかった。内皮型NOS活性及び誘導型NOS活性は両群間に差異を認めなかったが、神経型NOS活性は、Dahl SでDahl Rよりも有意に低値であった。また各アイソフォーム活性の総和もDahl SでDahl Rよりも有意に低値であった。また、腎ノルエピネフリン含量はDahl Sで有意に低値であり、神経型NOS活性との間には有意な正の相関関係($r=0.63$)を認めた。

以上の成績より、Dahl Sの腎臓では、Dahl Rに比し、神経型NOS活性が有意に低下していることが明らかとなった。神経型NOSは脳、脊椎、交感神経節、副腎以外にも腎臓の内髄質集合管やthin limb、外髄質集合管、皮質集合管、糸球体、macula densaや弓状動脈にも認められている。近年、NOS阻害による高血圧の発症に、中枢や末梢の交感神経活動の変化が関与することが示されている。今回の結果において内皮型NOS活性はDahl SとDahl Rの腎臓で差異を認めないが、神経型NOS活性はDahl Sで有意に低下し、内皮型よりも神経型NOS活性の低下が交感神経やNO作動性神経を介して高血圧発症に関係している可能性が示された。今回Dahl SではDahl Rに比し腎臓のノルエピネフリン含量の減少が著者に認められたが、これはDahl Sでは交感神経活動が亢進し、組織のノルエピネフリン含量の減少を来たすとしたこれまでの報告と一致している。さらに、腎臓のノルエピネフリン含量と神経型NOS活性の間には正相関関係が認められたが、近年、NO投与は交感神経終末のカテコラミン含量を増やし、カテコラミンの放出を抑制することが報告されており、神経型NOS活性の低下は腎交感神経活性のNOによる抑制を解除し、食塩感受性高血圧の発症に関与する可能性が示唆された。また、NOは直接ネフロンに作用し、Naの再吸収を抑制することが報告されているが、Dahl Sでは、神経型NOSが多く存在している内髄質集合管でのNaの再吸収が亢進している。それゆえ、Dahl Sにおける腎神経型NOSの低下は直接水、Na排泄を抑制している可能性も考えられる。また、NOS合成阻害剤による遠位尿細管のNa輸送の抑制は圧利尿を弱めることが知られており、Dahl Sの神経型NOSの低下が食塩負荷時のNa排泄を障害している可能性が考えられる。

本研究では、Dahl Sの腎臓において神経型NOS活性とノルエピネフリン含量の関連性について研究したものであるが、従来ほとんど行われなかった。神経型NOS活性の低下が交感神経活動を亢進させ、水電解質代謝に影響を与えることにより、Dahl Sの食塩感受性高血圧の発症に関与するといふ。

以上の結果は新しい重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究者は博士(医学)の学位を得る資格があるものと認める。