



Resistance to Endotoxin Shock in Transgenic Mice Overexpressing Endothelial Nitric Oxide Synthase

山下, 智也

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2000-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲2122

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1002122>

※ 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）	やま した とも や 山下智也	（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1265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12年3月31日	
学位論文題目	Resistance to Endotoxin Shock in Transgenic Mice Overexpressing Endothelial Nitric Oxide Synthase （内皮型一酸化窒素合成酵素過剰発現マウスはエンドトキシンショックに抵抗性を示す）	
審査委員	主査 教授 横山 光 宏 教授 久野 高 義 教授 尾 原 秀 史	

論文内容の要旨

[緒言]

エンドトキシンショックはグラム陰性桿菌の細胞壁由来のリポポリサッカライド（LPS）に起因し、致死的な血圧低下や多臓器不全を惹起する臨床的に非常に重要な病態である。この病態において、LPSによって様々な臓器に誘導型一酸化窒素合成酵素（iNOS）が誘導され、そのiNOSに由来する大量の一酸化窒素（NO）はエンドトキシンショックの血圧低下や組織・臓器障害の主たる原因であると考えられている。現にiNOSの選択的阻害薬をげっ歯類のエンドトキシンショックモデルに使用すると生存率が上昇することが報告されている。しかし、非選択的NOS阻害薬は人の敗血症性ショックに投与してもその予後を変化させず、また動物のエンドトキシンショックモデルでの投与でかえって死亡率を上昇させたという報告もある。したがって、エンドトキシンショックの病態において治療手段としてNOSを阻害することの是非はまだ議論されるべき点が多く、さらなる検討を要するというのが現状である。

一方、生理的状态で血管内皮細胞の内皮型一酸化窒素合成酵素（eNOS）によって産生されるNOは、少量ではあるが血圧調節や局所血流の維持に非常に重要な役割を果たしている。エンドトキシンショックの病態においても、このNO基礎産生の維持が臓器血流の維持に働き生命予後の改善につながると考えられており、iNOS由来のみではなくeNOS由来のNOも阻害することが、非選択的NOS阻害薬が必ずしも予後改善につながらない理由の1つであるのかもしれない。今回の研究の目的は、我々の開発したeNOSを血管内皮細胞に過剰発現させた遺伝子組換えマウスを用いて、エンドトキシンショックの病態でのeNOSの過剰発現の影響と生体内でのeNOSの役割を検討することである。

[方法]

エンドセリンのプロモーターを用いて、ウシeNOSを主に血管内皮細胞に過剰発現させたトランスジェニックマウス（Tg）のヘテロ接合体とコントロールとしてその同胞の野生型マウス（C）を使用し、LPS80mg/kgを腹腔内に投与した。LPS投与後のiNOSの発現は各臓器よりmRNAを抽出しノー

ザンブロッティング法で評価し、NO 産生の指標として血漿中窒素酸化物 (NOx) の濃度をグリース法で定量した。LPS 投与前後の血圧の変化は、大腿動脈より挿入したカテーテルより非麻酔下非拘束下で直接測定を行った。さらに、このエンドトキシンショックモデルでは肺への炎症細胞浸潤と組織障害が報告されているが、それらをそれぞれ気管支肺胞洗浄と病理組織学的方法にて比較した。さらに肺での各種接着因子 (ICAM-1, VCAM-1) の発現の差異をノーザンブロッティング法で評価した。また LPS 投与によるマウスの概観の変化と生存率を経時的に観察した。

[結果]

1. eNOS-Tg では NO-サイクリック GMP を介する血管弛緩反応が減弱している

Tg は C に比して血圧が約15~20mmHg 低い。しかし内皮依存性血管弛緩反応ならびに NO 供与体に対する反応性が低下していることが知られている (J Clin Invest.1998; vol.102:2061-2071.)。その機序の1つとして NO の情報伝達機構の下流に存在する可溶性グアニル酸シクラーゼの活性が低下し、その結果サイクリック GMP (cGMP) 産生量が減弱していることが明らかになっている。

実際、等尺性張力測定で評価したニトログリセリンに対する血管弛緩反応と生体内にニトログリセリンを静脈内投与した際の血圧低下反応は C に比して Tg で減弱していた。

2. LPS 投与による全身血圧の変化

LPS による iNOS の発現と血清 NOx レベルには両群で差がない。すなわちショックの原因と考えられる iNOS 由来の NO 産生量は両群で差がないことが示された。しかし、LPS 投与後の血圧低下は C では基礎レベルより40%低下し、約60mmHg 程度とショックの状態になったが、Tg では約15%の低下で、血圧は70mmHg 以上に維持されていた。

3. 血管壁のサイクリック GMP レベル

血管の cGMP 量は基礎レベルで Tg では C に比べて約1.5倍高値であった。しかし、LPS 投与によって誘導された iNOS より大量の NO が産生される状況下では C の方が Tg よりその上昇率が高く、cGMP 量は高値を示した。

4. LPS による肺への炎症細胞浸潤ならびに肺障害

ミエロペルオキシダーゼ活性は主に好中球の浸潤を示す指標として使用されるが、LPS 投与後の肺では C に比し Tg でその増加率は低下していた。同様に気管支肺胞洗浄を行ったが炎症性細胞は有意に Tg で少なかった。また、肺障害の組織学的変化も Tg で軽度であった。

5. LPS 投与による肺での接着因子発現

肺での ICAM-1 と VCAM-1 のメッセンジャー RNA レベルは、LPS 投与前では C と Tg で共にその発現が低い。LPS 投与により数時間で発現が著しく増強された。しかし、その発現レベルは C に比し Tg で約30%低く抑制されていた。

6. LPS 投与による死亡率

LPS 投与により両群とも様々な敗血症様の症状を呈するが、その程度は Tg で軽度であった。死亡率も C に比し Tg で有意に低値であった。さらに NOS 阻害剤の投与で両群共死亡率は増加し、eNOS 過剰発現による死亡率抑制効果は完全に消失した。

[考察]

本研究で、eNOS の発現が LPS によって引き起こされる敗血症生ショックにとって保護的に働くことが示された。Tg では eNOS の過剰発現により NO 産生が増加していたが、それに伴い NO の下流

の可溶性グアニル酸シクラーゼの活性が低下していた。それにより iNOS より産生された大量の NO に対しての血管弛緩反応が減弱し、結果的に血圧低下が抑えられた。このことがショックに対して抵抗性を示す 1 つの理由と考えられた。さらに、NO は様々な刺激により血管に誘導される接着因子の発現を抑制することが報告されているが、今回のモデルでも LPS により誘導される肺の血管における ICAM-1 の発現が Tg で抑制されることが示された。これにより、LPS 投与による炎症性細胞浸潤をはじめとする肺の障害が Tg において軽減されることが示された。主に以上の 2 つの理由により死亡率の減少につながったものと考えられる。

[まとめ]

eNOS の過剰発現は、エンドトキシンショックの病態で iNOS 由来の NO に対して血管の低反応性を生じ、さらに NO 自身の持つ接着因子の発現抑制を介しての抗炎症作用によって臓器障害を軽減させ、生存率を高めた。この結果は、非選択的 NOS 阻害薬の投与が必ずしもエンドトキシンショックの予後改善につながらない理由の解明に役立ち、エンドトキシンショックの病態における NO の二面的な役割を明らかにできたと思われる。

論文審査の結果の要旨

エンドトキシンショックはグラム陰性桿菌のリポポリサッカライド (LPS) に起因し、致死的な血圧低下や多臓器不全を惹起する臨床的に非常に重要な病態である。この病態において、LPS によって様々な臓器に誘導型一酸化窒素合成酵素 (iNOS) が誘導され、その iNOS に由来する大量の一酸化窒素 (NO) はエンドトキシンショックの血圧低下や組織・臓器障害の主たる原因であると考えられている。

一方、生理的状态で血管内皮細胞の内皮型一酸化窒素合成酵素 (eNOS) によって産生される NO は、少量ではあるが血圧調節や局所血流の維持に非常に重要な役割を果たしている。エンドトキシンショックの病態においても、この NO 基礎産生の維持が臓器血流の維持に働き生命予後の改善につながると推定される。今回の研究目的は、我々の開発した eNOS を血管内皮細胞に過剰発現させた遺伝子組換えマウスを用いて、エンドトキシンショックの病態での eNOS の過剰発現の影響と生体内での eNOS の役割を検討することである。

エンドセリンのプロモーターを用いて、ウシ eNOS を主に血管内皮細胞に過剰発現させたトランスジェニックマウス (Tg) のヘテロ接合体とコントロールとしてその同胞の野生型マウス (C) を使用し、LPS80mg/kg を腹腔内に投与した。

1. Tg は C に比して血圧が約 15~20mmHg 低かった。私達は Tg で内皮依存性血管弛緩反応ならびに NO 供与体に対しての反応性が低下していることとその機序の一つとして NO の情報伝達機構の下流に存在する可溶性グアニル酸シクラーゼの活性が低下し、その結果サイクリック GMP (cGMP) 産生量が減弱していることを既に報告している。

実際、等尺性張力測定で評価したニトログリセリンに対しての血管弛緩反応と生体内にニトログリセリンを静脈内投与した際の血圧低下反応は C に比して Tg で減弱していた。

2. LPS による iNOS mRNA の発現と血漿中窒素酸化物レベルには両群で差がなかった。すなわちショックの原因と考えられる iNOS 由来の NO 産生量は両群で差がないことを示された。しかし、LPS 投与後の血圧低下は C では基礎レベルより 40% 低下し、約 60mmHg 程度とショックの状態に陥った

が、Tg では約15%の低下で、血圧は70mmHg 以上に維持されていた。

3. 血管の cGMP 量は基礎レベルで Tg では C に比べて約1.5倍高値であった。しかし、LPS 投与後には C の方が Tg よりその上昇率が高く、cGMP 量は高値を示した。

4. ミエロペルオキシダーゼ活性は主に好中球の浸潤を示す指標として使用されるが、LPS 投与後の肺では C に比して Tg でその増加率は低下していた。同様に気管支肺胞洗浄を行ったが炎症性細胞は有意に Tg で少なかった。また、肺障害の組織学的変化も Tg で軽度であった。

5. 肺での ICAM-1 と VCAM-1 の mRNA レベルは、LPS 投与前で C と Tg で共にその発現が低かったが、LPS 投与により数時間で発現が著しく増強された。しかし、その発現レベルは C に比し Tg で約30%低く抑制されていた。

6. LPS 投与により両群とも様々な敗血症様症状を呈していたが、その程度は Tg で軽度であった。死亡率も C に比し Tg で有意に低値であった。さらに NOS 阻害剤の投与で両群共死亡率は増加し、eNOS 過剰発現による死亡率抑制効果は完全に消失した。

本研究は私達が作成した血管内皮細胞に eNOS を過剰発現させたトランスジェニックマウスとコントロールとして野生型マウスを用いて、eNOS の発現がリポポリサッカライドによるエンドトキシンショックの病態においてどのような働きをするかを検討したものである。eNOS の過剰発現によって iNOS 由来の NO に対する血管弛緩反応が減弱し、血圧低下が抑制され、リポポリサッカライドにより誘導される ICAM-1 と VCAM-1 の発現が抑制され、炎症性細胞浸潤をはじめとする肺障害が軽減された。以上の理由によって死亡率が減少したと考えられる。この結果はエンドトキシンショックの病態における NO の二面的な役割と選択的 NOS 阻害薬の開発の重要性を初めて明らかにした。よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があるとの結論に至りました。