



Beneficial effects of exogenous
tetrahydrobiopterin on left ventricular
remodeling after myocardial infarction in rats.
-The possible role of oxidative stress caused...

政野, 智也

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2009-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲4471

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1004471>

※ 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	政野 智也
博士の専攻分野の名称	博士（医学）
学 位 記 番 号	博い第 4471 号
学位授与の 要 件	学位規則第 5 条第 1 項該当
学位授与の 日 付	平成 21 年 3 月 25 日

【 学位論文題目 】

Beneficial effects of exogenous tetrahydrobiopterin on left ventricular remodeling after myocardial infarction in rats. -The possible role of oxidative stress caused by uncoupled endothelial nitric oxide synthase-（ラット心筋梗塞モデルにおける左室リモデリングに対する外因性テトラヒドロビオプテリン

審 査 委 員

主 査	教 授	横野 浩一
	教 授	秋田 穂束
	教 授	平井 みどり

(背景)

スーパーオキシドを始めとした反応性酸化物 (ROS) は心筋梗塞 (MI) 後、心機能低下の原因となる心臓の病的リモデリングに深く関与するとされるが、その発生機序は十分には解明されていない。ROS の発生源の一つとして考えられているものに一酸化窒素合成酵素 (NOS) がある。そのアイソフォームの一つである内皮型 NOS (eNOS) により産生される一酸化窒素 (NO) は抗動脈硬化作用や心保護作用を有する。eNOS は二量体を形成することで活性型となり、主として NO を産生する酵素として作用する。一方、さまざまな病的条件下では eNOS がその活性型である二量体を十分に形成し得ず、その結果 eNOS のドメイン間の電子伝達が障害されるという、いわゆるアンカップリングにより、eNOS 自身がスーパーオキシドの発生源となりうるということが知られている。eNOS の二量体形成にはその補酵素であるテトラヒドロビオプテリン (BH4) の存在が必須であるが、その相対的不足により eNOS アンカップリングが惹起され、結果として ROS であるスーパーオキシド産生をもたらすことが多くの実験で示されている。

eNOS 由来の NO は心保護的に作用することが示されており、eNOS 過剰発現マウスでは MI 後の心臓リモデリングが軽減され、逆に eNOS 欠損マウスでは MI 後や圧負荷モデルにおいて心臓リモデリングが増悪したとの報告がある。しかし一方で、圧負荷モデルにおける左室リモデリングが eNOS 欠損マウスにおいて著明に抑制されたとの報告が最近なされ、その機序は eNOS アンカップリング由来のスーパーオキシドが心室リモデリングや心機能の悪化に大きく寄与しているというものであった。このように、心室リモデリングと eNOS アンカップリングの関係については未だ一定の見解は得られていない。今回我々は、ラット MI モデルを用い、BH4 を投与することにより MI 後の左室リモデリング進展が抑制されるか、またその機序として eNOS アンカップリングが関与するかについて検討した。

(方法)

オスの SD ラット (8 週齢) を用い、左冠動脈前下行枝 (LAD) を結紮して MI モデルを作成し、4 週後に屠殺した (MI 群)。LAD を結紮せず、他は MI 群と同様の処置を行ったモデルを sham 群とした。BH4 投与群は MI 作成 3 日前より 10mg/kg/日 で経口投与を開始し、MI 作成 4 週間後まで投与した (MI+BH4 群)。BH4 自身の抗酸化作用の影響を除外するため、BH4 と同様の抗酸化作用を有するが NOS の二量体形成には関与しないテトラヒドロネオプテリン (H4N) を BH4 と同様に投与し、H4N 投与群とした (MI+H4N 群)。

MI 作成 4 週後、心臓超音波検査にて左室拡張末期径 (LVEDD)、左室収縮末

期径 (LVESD)、左室内径短縮率 (%FS)、左室後壁壁厚 (PWT) を計測し、心機能を評価した。また、圧トランスデューサーに接続した 18G 針を用い、経横隔膜的に左室内圧を測定した。

摘出した心臓は液体窒素にて凍結保存した。HE 染色後、非梗塞部心筋における短軸での断面積 (MCSA) を計測した。また、非梗塞部心筋におけるジヒドロビオプテリン (BH2) 及び BH4 を高速液体クロマトグラフィー (HPLC) にて測定し、BH4/BH2 比を測定した (BH2 は BH4 が酸化されて生じ、BH4/BH2 比は eNOS アンカップリングの指標になるとされる)。また、非梗塞部心筋のホモジネートを用いて低温でのウエスタンブロット法を施行し、抗 eNOS 抗体により eNOS の二量体と単量体を検出した。デンシトメトリー法にて eNOS の二量体/単量体比を計測した。さらに、心筋におけるスーパーオキシドを定量するためジハイドロエチジウム (DHE) による染色を施行し、かつそのスーパーオキシドが eNOS アンカップリングに由来するかどうかを調べるため NOS 阻害剤である L-NAME の有無でスーパーオキシド産生量に変化するかを解析した。

(結果)

MI 作成 3 日後に TTC 染色にて梗塞サイズを定量したところ、BH4 投与群 (MI+BH4 群) と非投与群 (MI 群) では有意差は認めなかった。MI 作成 4 週後では、血圧、脈拍については全 4 群で有意差は認めなかったが、心重量、肺重量については MI+BH4 群で MI 群と比べ有意に小さく、心肥大、肺うっ血が有意に抑制されていることが示唆された。一方 H4N 投与群 (MI+H4N 群) では MI 群と比べ有意差は認めなかった。

MI 作成 4 週後の心臓超音波検査では、MI+BH4 群では LVEDD、LVESD とも MI 群より有意に小さく、%FS は有意に大きかった。また、PWT も MI+BH4 群で有意に小さく、心肥大が抑制されていると考えられた。MI+H4N 群では MI 群と比べいずれも有意差は認めなかった。また、左室内圧の測定では、MI+BH4 群において左室内圧曲線の傾きの最大値 (dp/dt max) 及び最小値 (dp/dt min) の絶対値は MI 群に比べ有意に大きく、左室拡張末期圧 (LVEDP) は有意に小さかった。以上より、BH4 投与により、左室収縮能、拡張能ともに、MI 群より改善していると考えられた。MI+H4N 群では MI 群と比べ有意差は認めなかった。以上の結果より H4N 投与は MI 後の左室リモデリング抑制に寄与しないと考えられたため、以後はこれを除く 3 群で解析を行った。

MI 作成 4 週後の MCSA は、MI 群に比べ MI+BH4 群で有意に小さく、BH4 投与により非梗塞部の心肥大が抑制されていることが示唆された。また非梗塞部心筋ホモジネートを用いた HPLC により測定された BH4 値は 3 群間で有意差はみられなかったが、BH2 値については MI 群において MI+BH4 群より高い

傾向がみられた。BH4/BH2 比については MI 群に比べ MI+BH4 群で有意に小さかった。低温ウエスタンブロット法では、eNOS 蛋白の二量体/単量体比は sham 群と比べ MI 群で有意に低下し、MI+BH4 群で MI 群に比べ有意に大きかった。BH4 投与により eNOS の二量体形成が保たれている可能性が示唆された。DHE による非梗塞部心筋におけるスーパーオキシド定量では、MI+BH4 群では MI 群に比べ有意に活性酸素量は低かった。一方、eNOS 阻害剤である L-NAME を加えてインキュベートした場合のスーパーオキシド産生量は、L-NAME 非使用時に比べ MI 群では有意に低下し、MI+BH4 群では有意に増加した。sham 群では L-NAME 投与による有意な変化は認めなかった。以上の結果より、MI 後の左室リモデリング進展には eNOS アンカップリングに由来する ROS が関与する可能性が示唆された。

(考察)

酸化ストレスによる心臓リモデリング増悪はこれまでに数多く報告されているが、今回の我々の実験でも心筋梗塞による心筋酸化ストレスの増大と左室リモデリングの増悪が認められた。BH4 投与による心室リモデリング抑制と心機能改善は、主に酸化ストレスの抑制に起因するものと考えられた。特に NOS 阻害剤である L-NAME を用いることにより MI 群で心筋酸化ストレスの減少を認め、逆に MI+BH4 群では L-NAME により心筋酸化ストレスが増大したことにより、この酸化ストレスの産生には eNOS アンカップリングが深く関わっているものと思われる。また eNOS 蛋白の定量で、二量体/単量体比が MI 群では sham 群に比べ有意に減少するも MI+BH4 群では減少を認めなかったことから、BH4 投与により eNOS アンカップリングが緩和されたと考えられた。BH4 投与による心臓リモデリング抑制がその抗酸化作用によらないことは、H4N 投与群でリモデリングの改善がみられなかったことから明らかと考えられる。

eNOS からのスーパーオキシド産生は、eNOS による NO 合成に必須の補酵素である BH4 がどの程度有効に作用しているかによって制御されている。BH4 の酸化は病的条件化における eNOS 機能不全の主な原因であることが報告されている。酸化された BH4 は BH2 代謝産物となり、BH4 と eNOS の結合に競合し、その結果 eNOS 二量体形成並びに NO 産生が阻害される。我々の実験でも MI 群では著明に心筋 BH2 値が増加したが MI+BH4 群ではその増加は軽度であった。eNOS の酵素活性が規定される上で、最近 BH4/BH2 比が eNOS アンカップリングの程度の指標となるとの報告がなされており、我々の実験結果からも BH4/BH2 比の減少が eNOS アンカップリングによる活性酸素増加に寄与すると考えられた。

今回の実験において我々は、BH4 の経口投与により eNOS アンカップリング

由来のスーパーオキシドを減少させることで、MI 後の病的左室リモデリング進展が抑制され、心機能低下が軽減されることを証明した。さらに eNOS 機能の改善が NO 産生増加をもたらし、NO の心保護作用が心室リモデリング抑制に一部寄与した可能性も考慮される。eNOS 由来のスーパーオキシドと NO のバランスが心室リモデリング進展に大きく影響すると考えられるが、BH4 投与はこのバランスを NO 産生の方向へシフトするものと考えられた。このような eNOS 機能の改善は、心筋梗塞後の病的心臓リモデリングに対し今後有用な治療戦略になりうると考えられる。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第 1964 号	氏 名	政野 智也
論文題目 Title of Dissertation	Beneficial effects of exogenous tetrahydrobiopterin on left ventricular remodeling after myocardial infarction in rats. The possible role of oxidative stress caused by uncoupled endothelial nitric oxide synthase ラット心筋梗塞モデルにおける左室リモデリングに対する外因性テトラヒドロビオプテリンの有用性・特に内皮型一酸化窒素合成酵素のアンカップリングにより惹起される酸化ストレスの関与について		
審査委員 Examiner	主 査 横野 浩一 Chief Examiner 副 査 秋田 穂平 Vice-examiner 副 査 平井 美穂 Vice-examiner		
審査修了日	平成 20 年 11 月 19 日		

（要旨は 1,000 字～2,000 字程度）

スーパーオキシドを始めとした反応性酸化物（ROS）は心筋梗塞（MI）後、心機能低下の原因となる心臓の病的リモデリングに深く関与するとされるが、その発生機序は十分には解明されていない。ROS の発生源の一つとして考えられているものに一酸化窒素合成酵素（NOS）があり、そのアイソフォームの一つである内皮型 NOS（eNOS）により産生される一酸化窒素（NO）は抗動脈硬化作用や心保護作用を有する。eNOS は二量体を形成することで活性型となり、主として NO を産生する酵素として作用する。一方、さまざまな病的条件下では eNOS がその活性型である二量体を十分に形成し得ず、その結果 eNOS のドメイン間の電子伝達が障害されるという、いわゆるアンカップリングにより、eNOS 自身がスーパーオキシドの産生源となりうるということが知られている。eNOS の二量体形成にはその補酵素であるテトラヒドロビオプテリン（BH4）の存在が必須であるが、その相対的不足により eNOS アンカップリングが惹起され、結果として ROS であるスーパーオキシド産生をもたらすことが多くの実験で示されている。
eNOS 由来の NO は心保護的に作用することが示されており、eNOS 過剰発現マウスでは MI 後の心臓リモデリングが軽減され、逆に eNOS 欠損マウスでは MI 後や圧負荷モデルにおいて心臓リモデリングが増悪したとの報告がある。しかし一方で、圧負荷モデルにおける左室リモデリングが eNOS 欠損マウスにおいて著明に抑制されたとの報告が最近なされ、その機序は eNOS アンカップリング由来のスーパーオキシドが心室リモデリングや心機能の悪化に大きく寄与しているというものであった。このように、心室リモデリングと eNOS アンカップリングの関係については未だ一定の見解は得られていない。そこで本研究者はラット MI モデルを用い、BH4 を投与することにより MI 後の左室リモデリング進展が抑制されるか、またその機序として eNOS アンカップリングが関与するかについて検討した。
オスの SD ラット（8 週齢）を用い、左冠動脈前下行枝（LAD）を結紮して MI モデルを作成し、4 週後に屠殺した（MI 群）。LAD を結紮せず、他は MI 群と同様の処置を行ったモデルを sham 群とした。BH4 投与群は MI 作成 3 日前より 10mg/kg/日で経口投与を開始し、MI 作成 4 週間後まで投与した（MI+BH4 群）。BH4 自身の抗酸化作用の影響

を除外するため、BH4 と同様の抗酸化作用を有するが NOS の二量体形成には関与しないテトラヒドロネオプテリン（H4N）を BH4 と同様に投与し、H4N 投与群とした（MI+H4N 群）。
MI 作成 3 日後に TTC 染色にて梗塞サイズを定量したところ、BH4 投与群（MI+BH4 群）と非投与群（MI 群）では有意差は認めなかった。MI 作成 4 週後では、血圧、脈拍については全 4 群で有意差は認めなかったが、心重量、肺重量については MI+BH4 群で MI 群と比べ有意に小さく、心肥大、肺うっ血が有意に抑制されていることが示唆された。一方 H4N 投与群（MI+H4N 群）では MI 群と比べ有意差は認めなかった。
MI 作成 4 週後の心臓超音波検査では、MI+BH4 群では左室拡張末期径（LVEDD）、左室収縮末期径（LVESD）とも MI 群より有意に小さく、左室内径短縮率（%FS）は有意に大きかった。また、左室後壁壁厚（PWT）も MI+BH4 群で有意に小さく、心肥大が抑制されていると考えられた。MI+H4N 群では MI 群と比べいずれも有意差は認めなかった。また、左室内圧の測定では、MI+BH4 群において左室内圧曲線の傾きの最大値（dp/dt max）及び最小値（dp/dt min）の絶対値は MI 群に比べ有意に大きく、左室拡張末期圧（LVEDP）は有意に小さかった。MI 作成 4 週後の MCSA は、MI 群に比べ MI+BH4 群で有意に小さく、BH4 投与により非梗塞部の心肥大が抑制されていることが示唆された。また非梗塞部心筋ホモジネートを用いた HPLC により測定された BH4 値は 3 群間で有意差はみられなかったが、BH4 の酸化にて生じる BH2 値については MI 群において MI+BH4 群より高い傾向がみられた。BH4/BH2 比については MI 群に比べ MI+BH4 群で有意に小さかった。eNOS 蛋白の二量体/単量体比は sham 群と比べ MI 群で有意に低下し、MI+BH4 群で MI 群に比べ有意に大きかった。BH4 投与により eNOS の二量体形成が保たれている可能性が示唆された。DHE による非梗塞部心筋におけるスーパーオキシド定量では、MI+BH4 群では MI 群に比べ有意に活性酸素量は低かった。一方、eNOS 阻害剤である L-NAME を加えてインキュベートした場合のスーパーオキシド産生量は、L-NAME 非使用時に比べ MI 群では有意に低下し、MI+BH4 群では有意に増加した。sham 群では L-NAME 投与による有意な変化は認めなかった。

酸化ストレスによる心臓リモデリング増悪はこれまでに数多く報告されているが、今回の研究者の実験でも心筋梗塞による心筋酸化ストレスの増大と左室リモデリングの増悪が認められた。BH4 投与による心室リモデリング抑制と心機能改善は、主に酸化ストレスの抑制に起因するものと考えられた。特に NOS 阻害剤である L-NAME を用いることにより MI 群で心筋酸化ストレスの減少を認め、逆に MI+BH4 群では L-NAME により心筋酸化ストレスが増大したことにより、この酸化ストレスの産生には eNOS アンカッピングが深く関わっているものと思われる。また eNOS 蛋白の定量で、二量体/単量体比が MI 群では sham 群に比べ有意に減少するも MI+BH4 群では減少を認めなかったことから、BH4 投与により eNOS アンカッピングが緩和されたと考えられた。BH4 投与による心臓リモデリング抑制がその抗酸化作用によらないことは、H4N 投与群でリモデリングの改善がみられなかったことから明らかと考えられる。
eNOS からのスーパーオキシド産生は、eNOS による NO 合成に必須の補酵素である BH4 がどの程度有効に作用しているかによって制御されている。BH4 の酸化は病的条件化における eNOS 機能不全の主な原因であることが報告されている。酸化された BH4 は BH2 代謝産物となり、BH4 と eNOS の結合に競合し、その結果 eNOS 二量体形成並びに NO 産生が阻害される。今回の実験でも MI 群では著明に心筋 BH2 値が増加したが MI+BH4 群ではその増加は軽度であった。eNOS の酵素活性が規定される上で、最近 BH4/BH2 比が eNOS アンカッピングの程度の指標となるとの報告がなされており、今回の実験結果からも BH4/BH2 比の減少が eNOS アンカッピングによる活性酸素増加に寄与すると推察している。
本研究は心筋梗塞後の心機能低下を導く左室リモデリング進展の機序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 eNOS アンカッピングによる活性酸素の病的影響を明らかにし、そのアンカッピングを是正する BH4 の治療的効果について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と認める。