

# 琉球大学学術リポジトリ

## [総説] 生体内における一酸化窒素合成酵素システムの意義の解明

メタデータ	言語: 出版者: 琉球医学会 公開日: 2010-09-28 キーワード (Ja): キーワード (En): nitric oxide synthase, knockout mouse, cardiovascular disease, myocardial infarction, metabolic syndrome 作成者: 筒井, 正人, Tsutsui, Masato メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/20.500.12000/0002016223">http://hdl.handle.net/20.500.12000/0002016223</a>

## 生体内における一酸化窒素合成酵素システムの意義の解明

筒井正人

琉球大学医学部薬理学

## New Insight into the Significance of Nitric Oxide Synthase System

Masato Tsutsui

Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, University of the Ryukyus

### ABSTRACT

The nitric oxide (NO) synthases (NOSs) system consists of three different isoforms, including neuronal (nNOS), inducible (iNOS), and endothelial NOSs (eNOS). The roles of NO in vivo have been extensively investigated in pharmacological studies with NOS inhibitors. However, the NOS inhibitors possess multiple non-specific actions. Indeed, we clarified that vascular lesion formation caused by long-term treatment with the NOS inhibitors is not solely mediated by simple inhibition of vascular NO synthesis. Thus, the authentic roles of endogenous NO in our body still remain to be fully elucidated. To address this important issue, we have successfully developed mice in which all three NOS isoforms are completely disrupted. While the triply n/i/eNOS<sup>-/-</sup> mice were unexpectedly viable and appeared normal, their survival and fertility rates were markedly reduced as compared with wild-type mice. Intriguingly, the triply n/i/eNOS<sup>-/-</sup> mice, but not singly eNOS<sup>-/-</sup> mice, spontaneously developed myocardial infarction accompanied by severe coronary arteriosclerotic lesions. Furthermore, the triply n/i/eNOS<sup>-/-</sup> mice manifested abnormalities in a variety of systems, including the central nervous system, metabolic system, and bone system. These results provide the first evidence that genetic disruption of all three NOS genes causes a variety of disorders in mice in vivo, demonstrating a critical role of the endogenous NOS system in maintaining body homeostasis. *Ryukyu Med. J.*, 28(3,4)7~11, 2009

Key words: nitric oxide synthase, knockout mouse, cardiovascular disease, myocardial infarction, metabolic syndrome

一酸化窒素 (nitric oxide: NO) は、ほとんどすべての組織・臓器において生成・遊離され、生体の恒常性の維持に重要な役割を果たしている<sup>1-4)</sup>。NO合成酵素 (NOS) システムは、神経型 (nNOS)・誘導型 (iNOS)・内皮型 (eNOS) の3種類のアイソフォームで構成されている (Fig. 1)<sup>1-4)</sup>。私は、長年一貫して、循環器領域におけるNO研究を行ってきた。

1995~1997年の米国メイヨークリニック留学時には、脳動脈への内皮型NO合成酵素 (eNOS) の遺伝子治療に世界で初めて成功した<sup>5-12)</sup>。本研究では、血管内皮機

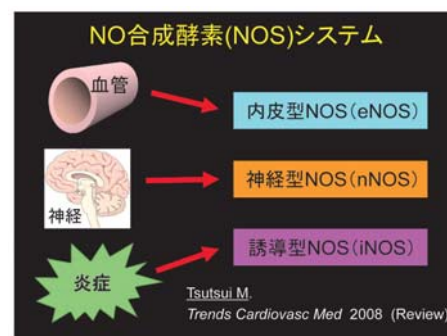


Fig. 1 一酸化窒素 (NO) 合成酵素 (NOS) システム

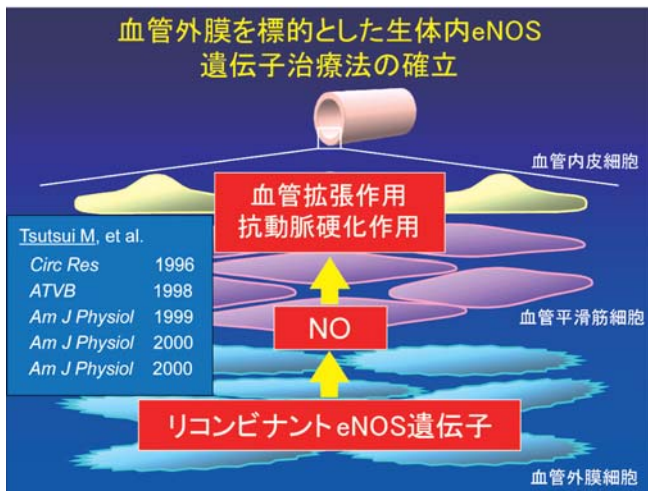


Fig. 2 血管外膜を標的とした生体内内皮型NOS (eNOS) 遺伝子治療法の確立

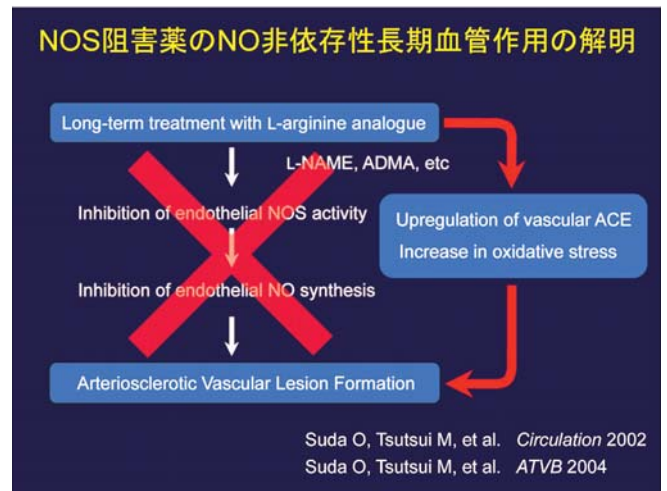


Fig. 4 NOS阻害薬のNO非依存性長期血管作用の解明

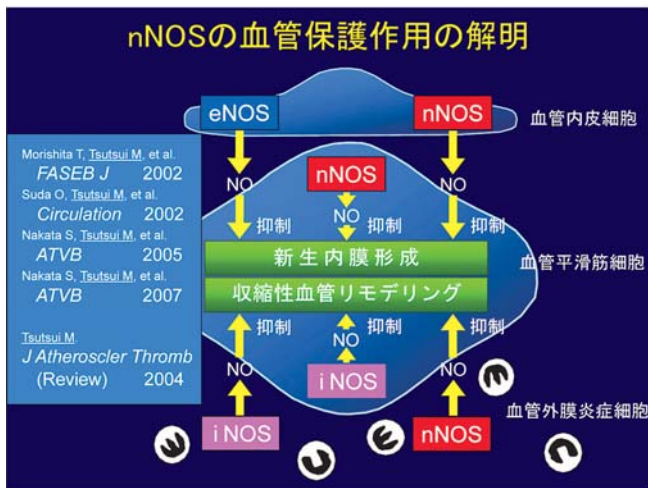


Fig. 3 神経型NOS (nNOS) の血管保護作用の解明

能不全を遺伝子工学的技術により治療しうること、及び、recombinant eNOS 遺伝子を血管外膜に強制発現させると「外膜依存性弛緩反応」という全く新しい血管弛緩機構が見出されることを報告した (Fig. 2)。

留学から帰国後は、産業医大第二内科および薬理学において、神経型NO合成酵素 (nNOS) の血管保護作用の研究を行った。動脈硬化において、eNOSやiNOSが役割を果たすことは広く知られていたが、nNOSの役割は不明であった。私は、この点を、nNOS欠損マウスを用いて検討し、nNOSも重要な血管保護作用を有することを世界に先駆けて見出した (Fig. 3)<sup>1,13-15</sup>。

このように、eNOSやiNOSに加えて、nNOSも動脈硬化において役割を果たしていることを明らかにすることが出来たので、私は、次の展開として、NOSシステム全体の意義を解明したいと考えた。

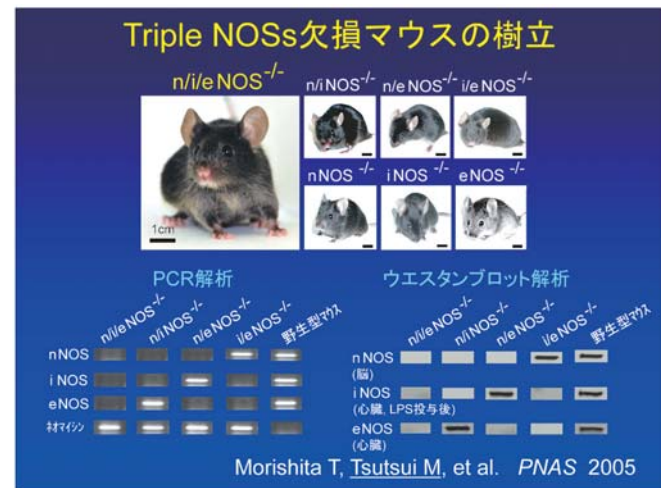


Fig. 5 Triple NOSs欠損マウスの樹立

これまで、生体内におけるNOSシステムの役割が、L-NAMEやL-NMMAなどのNOS阻害薬を用いて薬理的に広く研究されてきた。しかし、これらのNOS阻害薬には、様々な非特異的作用が報告されている。事実、私達も、NOS阻害薬の長期投与により引き起こされる血管病変形成が、実はNOS阻害を介さない機序で惹起されるという、従来のNO研究の定説を覆す意外な事実を見出した (Fig. 4)<sup>16,17</sup>。このように、NO研究が飛躍的に発展した現在においても、生体内におけるNOSシステムの真の役割は、未だ十分に解明されてない。この点を検討するために、私は、3年の歳月を費やして、3つのNOSsをすべて欠失させたNOSシステム完全欠損マウス (トリプルnNOS/iNOS/eNOS欠損マウス) を世界に先駆けて開発した (Fig. 5)<sup>3,18</sup>。

このマウスは幸運にも胎生致死ではなく誕生したが、生存率は野生型マウスに比して著明に低下していた

(Fig. 6). 興味深いことに、死因の病理学的検索では、このマウスの実に半数以上が、高度の冠動脈硬化を伴う自然発症の心筋梗塞で死亡していた (Fig. 7). 私が知る限り、このマウスは、実験に有用な世界初の自然発症心筋梗塞マウスモデルである<sup>2,19)</sup>.

重要なことに、eNOSが強力な抗動脈硬化作用を有するにもかかわらず、eNOS欠損マウスに動脈硬化は認められない。この矛盾は、ロックアウトされていない他のNOSによる代償機構によって説明されている。従って、私のNOSシステム完全欠損マウスは、この問題点を解決し、生体内におけるNOSシステムの役割を解明する唯一無二の強力な研究ツールである<sup>20,21)</sup>.

このマウスの冠危険因子の検索では、最近話題のメタボリックシンドロームの病態が認められた<sup>2,19)</sup>。加えて、このマウスには、神経系、内分泌代謝系、免疫系、骨系など、様々なシステムの異常も見出されている (Fig. 8)<sup>22)</sup>.

NOはヒトの広汎な生命現象に深く関与していることが明らかにされ、NO研究は幅広い研究分野において目覚ましい発展を遂げている。注目すべきことに、NO関連論文の出版数は未だピークには達しておらず、現在も増加し続けており、昨年のNO関連論文数は実に年間7000報に及んでいる<sup>4)</sup>。私のNOSシステム完全欠損マウスを用いれば、数多くの全く新しいNO研究を、全く新しい切り口で、広く展開することが出来る。このように本研究は、NO研究の新たなbreakthroughになりうる点で、学術的に大きな意義がある。私は、今後、この世界初のマウスを用いて、生体内におけるNOSシステムの真の役割を、詳細に解明して行きたい。

## 文 献

- 1) Tsutsui M.: Neuronal nitric oxide synthase as a novel anti-atherogenic factor. *J Atheroscler Thromb.* 11: 41-48, 2004.
- 2) Tsutsui M., Nakata S., Shimokawa H., Otsuji Y. and Yanagihara N.: Spontaneous myocardial infarction and nitric oxide synthase. *Trends Cardiovasc Med.* 18: 275-279, 2008.
- 3) Tsutsui M., Shimokawa H., Morishita T., Nakashima Y. and Yanagihara N.: Development of genetically engineered mice lacking all three nitric oxide synthases. *J Pharmacol Sci.* 102: 147-154, 2006.
- 4) Tsutsui M., Shimokawa H., Otsuji Y., Ueta Y., Sasaguri Y. and Yanagihara N.: Nitric oxide synthases and cardiovascular diseases:

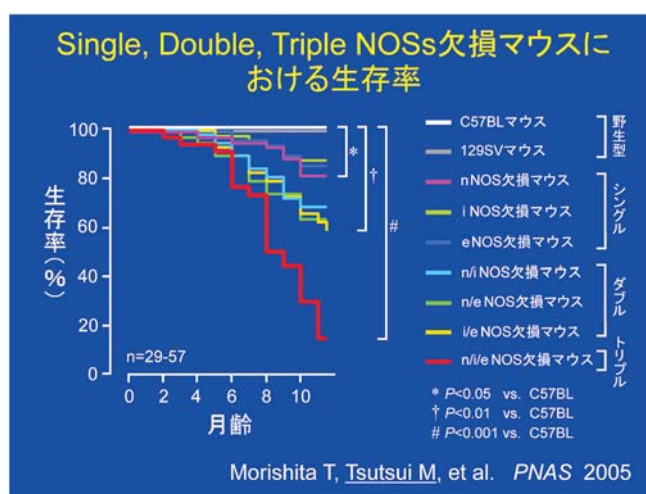


Fig. 6 Single, Double, Triple NOSs 欠損マウスにおける生存率

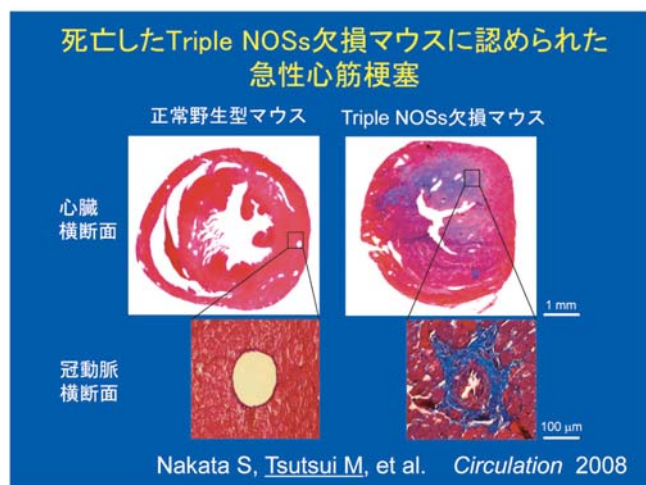


Fig. 7 死亡した Triple NOSs 欠損マウスに認められた急性心筋梗塞

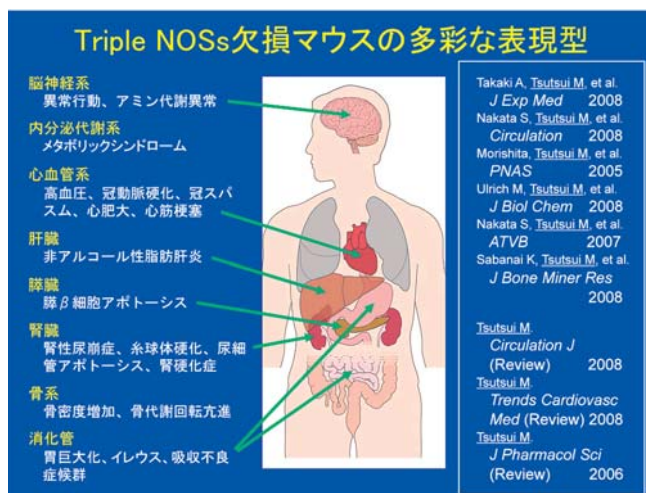


Fig. 8 Triple NOSs 欠損マウスの多彩な表現型

- insights from genetically modified mice. *Circ J.* 73: 986-993, 2009.
- 5) Chen A.F.Y., Jiang S.W., Crotty T.B., Tsutsui M., Smith L.A., O'Brien T. and Katusic Z.S.: Effects of in vivo adventitial expression of recombinant endothelial nitric oxide synthase gene in cerebral arteries. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94(23): 12568-12573, 1997.
  - 6) Tsutsui M., Chen A.F., O'Brien T., Crotty T.B. and Katusic Z.S.: Adventitial expression of recombinant eNOS gene restores NO production in arteries without endothelium. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 18: 1231-1241, 1998.
  - 7) Tsutsui M., Milstien S. and Katusic Z.S.: Effect of tetrahydrobiopterin on endothelial function in canine middle cerebral arteries. *Circ. Res.* 79: 336-342, 1996.
  - 8) Chen A.F.Y., O'Brien T., Tsutsui M., Kinoshita H., Pompili V.J., Crotty T.B., Spector D.J. and Katusic Z.S.: Expression and function of recombinant endothelial nitric oxide synthase gene in canine basilar artery. *Circ. Res.* 80: 327-335, 1997.
  - 9) The World Health Report. 2002. Reducing Risks, Promoting Healthy Life.. World Health Organization, 2002.
  - 10) Tsutsui M., Onoue H., Iida Y., Smith L., O'Brien T. and Katusic Z.S.: Adventitia-dependent relaxations of canine basilar arteries transduced with recombinant eNOS gene. *Am J Physiol.* 276: H1846-1852, 1999.
  - 11) Tsutsui M., Onoue H., Iida Y., Smith L., O'Brien T. and Katusic Z.S.: Effects of recombinant eNOS gene expression on reactivity of small cerebral arteries. *Am J Physiol.* 278: H420-427, 2000.
  - 12) Tsutsui M., Onoue H., Iida Y., Smith L., O'Brien T. and Katusic Z.S.: B1 and B2 bradykinin receptors on adventitial fibroblasts of cerebral arteries are coupled to recombinant eNOS. *Am J Physiol.* 278: H367-372, 2000.
  - 13) Morishita T., Tsutsui M., Shimokawa H., Horiuchi M., Tanimoto A., Suda O., Tasaki H., Huang P.L., Sasaguri Y., Yanagihara N. and Nakashima Y.: Vasculoprotective roles of neuronal nitric oxide synthase. *FASEB J.* 16: 1994-1996, 2002.
  - 14) Nakata S., Tsutsui M., Shimokawa H., Tamura M., Tasaki H., Morishita T., Suda O., Ueno S., Toyohira Y., Nakashima Y. and Yanagihara N.: Vascular neuronal NO synthase is selectively upregulated by platelet-derived growth factor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005.
  - 15) Nakata S., Tsutsui M., Shimokawa H., Yamashita T., Tanimoto A., Tasaki H., Ozumi K., Sabanai K., Morishita T., Suda O., Hirano H., Sasaguri Y., Nakashima Y. and Yanagihara N.: Statin treatment upregulates vascular neuronal nitric oxide synthase through Akt/NF-kappaB pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 27: 92-98, 2007.
  - 16) Suda O., Tsutsui M., Morishita T., Tanimoto A., Horiuchi M., Tasaki H., Huang P.L., Sasaguri Y., Yanagihara N. and Nakashima Y.: Long-term treatment with N(omega)-nitro-L-arginine methyl ester causes arteriosclerotic coronary lesions in endothelial nitric oxide synthase-deficient mice. *Circulation.* 106: 1729-1735, 2002.
  - 17) Suda O., Tsutsui M., Morishita T., Tasaki H., Ueno S., Nakata S., Tsujimoto T., Toyohira Y., Hayashida Y., Sasaguri Y., Ueta Y., Nakashima Y. and Yanagihara N.: Asymmetric dimethylarginine produces vascular lesions in endothelial nitric oxide synthase-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 24: 1682-1688, 2004.
  - 18) Morishita T., Tsutsui M., Shimokawa H., Sabanai K., Tasaki H., Suda O., Nakata S., Tanimoto A., Wang K.Y., Ueta Y., Sasaguri Y., Nakashima Y. and Yanagihara N.: Nephrogenic diabetes insipidus in mice lacking all nitric oxide synthase isoforms. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102: 10616-10621, 2005.
  - 19) Nakata S., Tsutsui M., Shimokawa H., Suda O., Morishita T., Shibata K., Yatera Y., Sabanai K., Tanimoto A., Nagasaki M., Tasaki H., Sasaguri Y., Nakashima Y., Otsuji Y. and Yanagihara N.: Spontaneous myocardial infarction in mice lacking all nitric oxide synthase isoforms. *Circulation.* 117: 2211-2223, 2008.
  - 20) Takaki A., Morikawa K., Tsutsui M., Murayama Y., Tekes E., Yamagishi H., Ohashi J., Yada T., Yanagihara N. and Shimokawa H.: Crucial role of nitric oxide synthases system in endothelium-dependent hyperpolarization in mice. *J Exp Med.* 205: 2053-2063, 2008.
  - 21) Ulrich M., Petre A., Youhnovski N., Promm F., Schirle M., Schumm M., Pero R.S., Doyle

- A., Checkel J., Kita H., Thiyagarajan N., Acharya K.R., Schmid-Grendelmeier P., Simon H.U., Schwarz H., Tsutsui M., Shimokawa H., Bellon G., Lee J.J., Przybylski M. and Doring G.: Post-translational tyrosine nitration of eosinophil granule toxins mediated by eosinophil peroxidase. *J Biol Chem.* 283: 28629-28640, 2008.
- 22) Sabanai K., Tsutsui M., Sakai A., Hirasawa H., Tanaka S., Nakamura E., Tanimoto A., Sasaguri Y., Ito M., Shimokawa H., Nakamura T. and Yanagihara N.: Genetic disruption of all NO synthase isoforms enhances BMD and bone turnover in mice in vivo: involvement of the renin-angiotensin system. *J Bone Miner Res.* 23: 633-643, 2008.