

200500567A

平成 17 年度 厚生労働科学研究費補助金
(循環器疾患等総合研究事業)
総括研究報告書

各種高脂血症治療薬の糖尿病性心血管病進展予防効果の総合的検討
(臨床研究実施チームの整備)
(若手医師・協力者活用に要する研究)

平成 18 年 4 月

主任研究者 川嶋成乃亮
神戸大学大学院医学系研究科 助教授

はじめに

厚生省労働科学研究費補助金『臨床研究基盤整備推進研究事業』、課題名『各種高脂血症治療薬の糖尿病性心血管病進展予防効果の総合的検討（若手医師・協力者活用に要する研究）』に関して、平成17年度に行いました研究の研究成果をとりまとめ、研究成果報告書を作成いたしました。

専門分野の関係者各位のご参考に供すると共に、さらに当該研究領域での今後の研究に寄与するものと期待しております。

研究組織

研究代表者 川嶋成乃亮（神戸大学大学院医学系研究科・助教授）

若手医師及び臨床研究協力者に対する指導者

志手淳也

若手医師 白木里織

臨床研究協力者 小嶋稔子

平成17年度厚生労働科学研究費補助金（循環器等総合研究事業）

主任研究報告書

各種高脂血症治療薬の糖尿病性血管病予防効果の総合的研究（臨床研究実施チームの整備）

主任研究者 川嶋成乃亮 神戸大学大学院医学系研究科 助教授

研究要旨：糖尿病、耐糖能異常の有無が薬剤溶出ステントの挿入後のステント上の新生内膜形成、よび冠動脈以外の血管での動脈硬化の進展に及ぼす影響を検討した。糖尿病の存在は再狭窄には到らないものの新生内膜肥厚を増強することが判明した。今後、頸動脈の動脈硬化の進展、血清バイオマーカーとの関係を高脂血症治療薬影響との関連で検討する予定である

A. 研究目的

薬剤用出性ステントの出現により、PCI後の再狭窄は著明に減少した。一方においてステント挿入後のステント上の新生内膜形成、内皮修復が障害され、血栓形成を増加させる懸念がなされている。そして糖尿病、脂質代謝障害は、血管の修復過程を障害することが考えられる。本研究では、薬剤溶出ステント挿入後のステント上の新生内膜形成に及ぼす、糖尿病の影響を検討する。そして、各種高脂血症治療薬の及ぼす影響、さらには冠動脈以外の血管での動脈硬化病変の進展といかに関係するか、さらに種々の血清バイオマーカーの修復過程への関与を検討する。

B. 研究方法

神戸大学医学部附属病院に入院した、85歳以下の冠動脈疾患患者において、シロリムス溶出ステント挿入6ヶ月後にCAGを行い、その際に光干渉波断層(OCT)カテーテルを用いステントストラップ上の薄い新生内膜形成の程度を評価する。また、ステント挿入時、並びに6ヶ月後の時点で頸動脈エコーを記録し、内膜肥厚の進展を評価する。さらにこれらの血管病変と各種バイオマーカーとの間の関係を検討する。測定バイオマーカーとして、CRPIL-6、TLR-4などを測定する。

（倫理面への配慮）

すべての対象患者からインフォームドコンセントを得てから研究を行う。

C. 研究成果

（倫理面への配慮）

研究開始当初は、冠動脈造影による再狭窄の有無を主たる研究目的としていたが、糖尿病患者(DM群; n=15)、非糖尿病患者(非DM群, n=24)においては、再狭窄症

例数が2例と再狭窄が極めて少く比較検討は困難であった。一方OCTカテーテルによるステントストラップ上の新生内膜肥厚の検討では、平均新生内膜厚が、DM群では、78 μ mであったが、DM群では123 μ mであり、糖尿病の存在は再狭窄に到らないものの、新生内膜肥厚を増強することが判明した。スタチンの投与の有無による影響、さらには種々のバイオマーカーとの関係を検討する予定である。

D&E. 考察および結論

薬剤用出性ステント挿入後の冠動脈病変に関し、糖尿の存在は再狭窄に到らないまでも、ストラップ上の新生内膜増生を増強させる。

G. 研究発表

論文発表

1. Shinohara M, Kawashima S, et al. Xenogenic smooth muscle cell immunization reduces neointimal formation balloon-injured rabbit carotid artery. Cardiovasc Res 68:249, 2005

学会発表

1. Mtasumoto D, Shite J, et al. OCT visualize tin neointima on Shirolimus-eluting stent more precisely than IVUS at 6 month follow up
第70回日本循環器病学会総会

H. 知的財産権の出願・登録状況。

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

作成上の留意事項

1. 「A. 研究目的」について
厚生労働行政の課題との関連性を含めて記入すること。
2. 「B. 研究方法」について
 - (1) 実施経過がわかるように具体的に記入すること。
 - (2) 「(倫理面への配慮)」には、研究対象者に対する人権擁護上の配慮、研究方法による研究対象者に対する不利益、危険性の排除や説明と理解(インフォームドコンセント)に関わる状況、実験動物に対する動物愛護上の配慮など、当該研究を行った際に実施した倫理面への配慮の内容及び方法について、具体的に記入すること。倫理面の問題がないと判断した場合には、その旨を記入するとともに必ず理由を明記すること。
なお、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針(平成13年文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第1号)、遺伝子治療臨床研究に関する指針(平成14年文部科学省・厚生労働省告示第1号)、疫学研究に関する倫理指針(平成14年文部科学省・厚生労働省告示第2号)、臨床研究に関する倫理指針(平成15年厚生労働省告示第255号)及び申請者が所属する研究機関で定めた倫理規定等を遵守するとともに、あらかじめ当該研究機関の長等の承認、届出、確認等が必要な研究については、研究開始前に所定の手続きを行うこと。
3. 「C. 研究結果」について
全体の研究成果が明らかになるように具体的に記入すること。
4. その他
 - (1) 日本工業規格A列4番の用紙を用いること。
 - (2) 文字の大きさは、10～12ポイント程度とする。

【学会発表】

学 会 発 表 (国内)

Seimi Satomi-Kobayashi, Tomomi Ueyama, Miki Kawai, Ryuji Toh, Tomoya Masano, Mitsuhiro Yokoyama, and Seinosuke Kawashima : Myocardin Inhibits β -Adrenergic Stimulation-Induced Cardiac Myocyte Apoptosis by Enhancing Bcl-2 Expression

第 9 回日本心不全学会学術集会 2005.10

Ryuji Toh, Naoto Yagi, Masakazu Shinohara, Tomofumi Takaya, Tomoya Yamashita, Seinosuke Kawashima, Mitsuhiro Yokoyama: An X-ray Diffraction Study on Mouse Cardiac Cross-Bridge Function in vivo: Effects of Adrenergic beta-stimulation

第 9 回日本心不全学会学術集会 2005.10

Angiographical Analysis of Small Pulmonary Arteries in Pulmonary Hypertension by Synchrotron Radiation Microangiography

第 7 0 回 日本循環器学会学術総会 2006

Shinohara M, Kawashima S, Sasaki N, Takaya T, Toh R, Umetani K, Yokoyama M

Local Overexpression of Toll-like Receptors at the Vessel Wall Induces Formation of Atherosclerotic Lesion : Synergism of Toll-like Receptor 2 and Toll-like Receptor 4

第 7 0 回 日本循環器学会学術総会 2006

Shinohara M, Kawashima S, Sasaki N, Takaya T, Shiraki R, Yokoyama M

The Possible Role of Oxidative Stress Caused by Uncoupled eNOS in Left Ventricular Remodeling after Myocardial Infarction in Rats

第 7 0 回 日本循環器学会学術総会 2006

Masano T, Kawashima S, Toh R, Satomi-Kobayashi S, Kawai M, Shinohara M, Takaya T, Yokoyama M

Myocardin Inhibits Beta-Adrenergic Agonist-Induced Cardiac Myocyte Apoptosis by Enhancing Bcl-2 Expression

第 7 0 回 日本循環器学会学術総会 2006

Satomi-Kobayashi S Ueyama T, Kawai M, Toh R, Masano T, Yokoyama M, Kawashima S

Mouse Cardiac Cross-Bridge Function Assessed in vivo by An X-ray Diffraction: Effects of Adrenergic beta-stimulation

第 7 0 回 日本循環器学会学術総会 2006

Toh R, Yagi N, Shinohara M, Takaya T, Yamashita T, Sasaki N, Masano T, Kawashima S, Yokoyama M

血管内皮機能の新たな血中マーカーとしての血中バイオプテリン濃度

第46回 日本脈管学会

武田匡史・川嶋成乃亮・篠原正和・山下智也・横山光宏

高血糖下では eNOS アンカッピングにより血管リモデリングは悪化する

第46回 日本脈管学会

佐々木直人・川嶋成乃亮・篠原正和・山下智也・横山光宏

学 会 発 表 (国 外)

In Vivo Evaluation of X-ray Diffraction from the Left Ventricular Wall of Mouse Hearts

54th Annual Scientific Session of the American College of Cardiology 2005

Toh R, Yagi N, Shinohara M, Takaya T, Masuda S, Kawashima S, Yokoyama M

Xenogenic Smooth Muscle Cell Immunization Reduces Neointimal Formation in Balloon-Injured Rabbit Carotid Arteries

78th The Scientific Sessions of the American Heart Association 2005

Shinohara M, Kawashima S, Yamashita T, Takaya T, Toh R, Ishida T, Ueyama T, Inoue N, Hirata K, Yokoyama M

Myocardin Inhibits beta-Adrenergic Agonist-Induced Cardiac Myocyte Apoptosis by Enhancing Bcl-2 Expression

78th The Scientific Sessions of the American Heart Association 2005

Satomi-Kobayashi S, Ueyama T, Kawai N, Toh R, Masano T, Yokoyama M, Kawashima S

An X-ray Diffraction Study on Mouse Cardiac Cross-Bridge Function in Vivo: Effects of Adrenergic Beta-stimulation

78th The Scientific Sessions of the American Heart Association 2005

Toh R, Yagi N, Shinohara M, Takaya T, Masuda S, Yamashita T, Kawashima S, Yokoyama M

Dual Role of Myocardin on Hypertrophy and Apoptosis in Cardiac Myocytes

International Session of Heart Reserch (ISHR) The 22nd Annual Meeting of The Japanese Section 2005

Satomi-Kobayashi S, Ueyama T, Kawai M, Toh R, Masano T, Yokoyama M, Kawashima S

The possible role of oxidative stress caused by uncoupled eNOS in left ventricular remodeling after myocardial infarction in rat

ヨーロッパ心臓病学会 (ESC)

政野智也・川嶋成乃亮・杜隆嗣・小林成美・河合美樹・篠原正和・山下智也・横山光宏

【総説論文】

○川嶋成乃亮

特集—動脈硬化研究の最前線を探る：一酸化窒素の抗動脈硬化作用を探る

Vascular Medicine 2 巻、26-32 頁、2006

○川嶋成乃亮

メタボリックシンドロームにおける血管内皮機能、
内分泌・糖尿病科 21 巻 427-433 頁、2005

○川嶋成乃亮

特集：アテローム血栓症の一次予防：内皮機能と血栓
血栓と循環 13 巻、14-18, 2005

○川嶋成乃亮

特集心筋症：内分泌、代謝疾患に合併する心筋症、 内科 95 巻、672-676
頁、2005

○川嶋成乃亮

心臓を守れ！麻酔科医：NO の心臓防御作用
LISA、12 巻：134-139 頁、2005

○川嶋成乃亮

高齢者・糖尿病患者の無症候性心筋虚血
日本医事新報 4262 巻 87-88 頁 2005

【原著論文】

1. Ejiri J, Inoue N, Kobayashi S, Shiraki R, Otsui K, Honjo T, Takahashi M, Ohashi Y, Ichikawa S, Terashima M, Mori T, Awano K, Shinke T, Shite J, Hirata K, Yokozaki H,

Kawashima S, Yokoyama M. Possible role of brain-derived neurotrophic factor in the pathogenesis of coronary artery disease. *Circulation*. 2005 ;112:2114-2120.

2. Bendall JK, Alp NJ, Warrick N, Cai S, Adlam D, Rockett K, Yokoyama M, Kawashima S, Channon KM.

Stoichiometric relationships between endothelial tetrahydrobiopterin, endothelial NO synthase (eNOS) activity, and eNOS coupling in vivo: insights from transgenic mice with endothelial-targeted GTP cyclohydrolase 1 and eNOS overexpression.

Circ Res. 2005 ;97:864-871.

3. Shinohara M, Kawashima S, Yamashita T, Takaya T, Toh R, Ishida T, Ueyama T, Inoue N, Hirata K, Yokoyama M.

Xenogenic smooth muscle cell immunization reduces neointimal formation in balloon-injured rabbit carotid arteries. *Cardiovasc Res*. 2005;68:249-258.

4. Tor R, Shinohara M, Takaya T, Yamashita T, Masuda M, Kawashima S, Yokoyama M, Yagi N. An X-Ray diffraction study on mouse cardiac cross-bridge function in vivo: effects of adrenergic {beta}-stimulation. *Biophys J*. 2006;90:1723-1728

5. Honjo T, Inoue N, Shiraki R, Kobayashi S, Otsui K, Takahashi M, Hirata K, Yokoyama M, Kawashima S. Endothelial urocortin has potent antioxidative properties and is upregulated by inflammatory cytokines and pitavastatin.

J Vasc Res. 2006;43:131-138

6. Takaya T, Kawashima S, Shinohara M, Yamashita T, Toh R, Sasaki N, Inoue N, Hirata K, Yokoyama M. Angiotensin II type 1 receptor blocker telmisartan suppresses superoxide production and reduces atherosclerotic lesion formation in apolipoprotein E-deficient mice. *Atherosclerosis*. 2006;186:402-410.

一酸化窒素の抗動脈硬化作用を探る

川嶋 成乃亮

Kawashima Seinosuke

神戸大学大学院医学系研究科循環呼吸器病態学

生体において、一酸化窒素 (NO) は 3 種の NO 合成酵素 (NOS) により産生され、そのなかで動脈硬化をはじめとした血管病と最も関係するのは、内皮型 NOS (eNOS) により産生される NO である。NO はその多彩な作用により、抗動脈硬化分子として作用すると *in vitro* の研究結果より考えられてきたが、近年、種々の NOS 遺伝子操作マウスの研究からも明らかになってきた。また、ヒトにおいても NO が抗動脈硬化にはたらくことは、eNOS 由来 NO によりもたらされる内皮依存性血管弛緩・拡張反応 (EDR) の減弱の程度が、その後の心血管イベントの予知因子となることから推察される。しかしながら高脂血症・動脈硬化においては、NOS の補酵素テトラヒドロbiopterin (BH₄) の血管壁での含量の低下が生じるため、eNOS が効率的に NO を産生せず、スーパーオキシド (O₂⁻) を産生する。その結果、NO の作用が減弱する。eNOS と BH₄ をともに増加させるような治療法が、動脈硬化の進展防止には有効と考えられる。

KEY WORDS

- * 一酸化窒素
- * 動脈硬化
- * 一酸化窒素合成酵素
- * テトラヒドロbiopterin (BH₄)
- * 遺伝子操作マウス

はじめに

血管内皮は多様な分子を産生・分泌し血管機能を調整しており、それ自身が重要な一種の臓器であると考えられる。内皮の作用には、血管トーンスの調節、血液の凝固線溶の制御、平滑筋細胞の増殖の制御などさまざまなものがあるが、全体として血管内皮は血管構築の維持、血管傷害からの防御にはたらいっているものである。そし

て内皮機能がさまざまな疾患で障害され、それが各疾患の病態形成に深く関与していることが明らかになってきた。

内皮が産生・分泌する物質の代表が一酸化窒素 (NO) である。NO は多彩な機能を有すガス状分子であるが、心血管領域において NO 研究が急速に広がったのは、内皮由来血管弛緩因子 (endothelium-derived relaxing factor: EDRF) の本体が NO であり、内皮依存性血管弛緩・拡張反応 (endothelium-dependent relaxation: EDR) が

NO によってもたらされることが解明されたことによる。高脂血症・動脈硬化との関連において、はじめに NO の役割が注目されたのは、これらの病態における EDR の減弱であり、その後、NO の多彩な生物作用が明らかになるにしたがい、NO は EDRF として作用する以外に、動脈硬化の発症・進展にも深く関与していると考えられるようになってきた。

本稿では動脈硬化における NO の役割、関与について、まず EDRF としての NO の作用、さらに重要な動脈硬化修飾分子としての NO の作用を述べる。

● 多彩な機能分子 NO は抗動脈硬化分子である

NO は L-アルギニンと酸素を基質として、NO 合成酵素 (NOS) により産生される。NOS には内皮型 NOS (eNOS)、誘導型 NOS (iNOS)、脳神経型 NOS (nNOS) の 3 種のアイソフォームがあり、血管においては内皮細胞に eNOS が、おもに外膜の神経末端に nNOS が存在し、血管への傷害や炎症が生じた場合には浸潤炎症細胞や平滑筋細胞に iNOS が誘導される。なかでも、内皮細胞に存在する eNOS は、血流のずり応力や、血中のブラジキニン、血管内皮細胞増殖因子 (vascular endothelial growth factor: VEGF)、インスリン、アセチルコリンなどにより、常に活性化され NO を恒常的に産生しており、血管トーンスの調整、血管構築の維持に重要な役割を果たしている¹⁾。

NO には EDRF として血管の弛緩・拡張を調整する作用以外に、表①に示すような多彩な機能があり、とくに内皮細胞-白血球接着の抑制、平滑筋細胞の増殖・遊走の抑制、血小板凝集の抑制作用は、それぞれ動脈硬化の発症・進展の重要な過程にはたらく²⁾³⁾。なかでも内皮細胞への単球・白血球の接着は、その後これらの細胞が内皮下に侵入し粥腫を形成するうえでの必須なステップであるが、NO は内皮細胞ならびに白血球における接着分子の発現を抑制し、この接着を抑制する。これは高脂血症家兎において、NOS 遺伝子の血管壁への導入が内皮での接着分子発現ならびに血管壁への白血球浸潤

表① NO の多彩な作用のうち血管病 (とくに動脈硬化) と関係するもの

- | |
|--|
| <ol style="list-style-type: none"> 1. 内皮由来血管弛緩因子 (EDRF) として血管トーンスの調整 2. 内皮細胞-白血球接着の抑制 3. 平滑筋細胞の増殖・遊走の抑制 4. 種々の遺伝子発現の調節 5. 血小板の凝集抑制 6. LDL の酸化抑制 7. アポトーシスへの作用 (内皮由来の比較的少量の NO は抑制, 大量の NO では誘導) |
|--|

(筆者作成)

を抑制したことからも明らかである⁴⁾。

また、種々の血管リモデリングの発症機序は動脈硬化の発症機序と類似しており、とくに新生内膜形成においては平滑筋細胞の増殖・遊走が中心的役割を果たす。この新生内膜形成を、種々の NOS 遺伝子の血管壁への導入が抑制すること、さらには後述の eNOS 遺伝子操作マウスにおいて、eNOS 遺伝子欠損、ならびに過剰発現が新生内膜をそれぞれ増強、抑制することも、生体において NO が抗動脈硬化分子として作用することを示唆するものである⁵⁾。また、動脈硬化の進展には LDL が酸化変性を受けることが必須と考えられるが、この LDL 酸化を NO が抑制することも考えられる⁶⁾。このような機能により、NO は抗動脈硬化分子としてはたらくと想定されている。

● 動脈硬化血管では eNOS/NO 系はどうなっているのか?

高脂血症・動脈硬化において EDR が減弱していることはよく知られている⁷⁾。この機序にはさまざまなことが考えられているが、主たるものは eNOS の酵素活性の低下、ならびに産生された NO がスーパーオキシド (O_2^-) により不活性化されることであり、その結果、血管壁からの NO 量が減少している⁸⁾。また最近の報告では、動脈硬化血管では平滑筋細胞での NO の標的分子である可溶性グアニル酸シクラーゼ (sGC) の活性が低下し、さらには sGC により産生された cyclic GMP (cGMP) が作用する cGMP 依存性キナーゼ (cGK) の発現も低下し

ていることが報告されている。すなわち、動脈硬化血管では NO ばかりでなく、eNOS/NO 系の細胞内シグナルそのものも低下している可能性がある⁹⁾。

一方、内皮における eNOS 発現に関しては諸説があるが、動脈硬化の初期においては、EDR の減弱にもかかわらず eNOS 発現は増加しており、動脈硬化病変が進行すると eNOS 発現は減弱するとの考えが一般的であると考えられる¹⁰⁾。これに対し、iNOS は動脈硬化の初期では血管壁での発現はほとんど認められない。そして動脈硬化病変が進展するにしたがい、主として粥腫に浸潤した炎症細胞・マクロファージを中心として発現する。また、iNOS 発現部位と近接して、強い細胞傷害性を示すペルオキシナイトライト (ONOO⁻) の産生物が認められる。また、nNOS に関する報告はあまり見当たらないが、やはり正常血管ではほとんど発現が認められず、進行した動脈硬化病変では、内皮や浸潤炎症細胞に発現が認められるとの報告がなされている¹¹⁾。

● 遺伝子操作マウスにより明らかになった NO の抗動脈硬化作用とは？

生体において、それぞれの NOS より産生される NO がどのように動脈硬化の発症・進展とかかわっているかに関しては、それぞれの NOS 遺伝子欠損マウスを用いた研究により解明が進んだ。まず eNOS に関しては、eNOS 遺伝子欠損マウスと apoE 遺伝子欠損マウスの交配実験の結果が少なくとも 2 施設より報告されており、eNOS 遺伝子が欠損することにより動脈硬化が増悪すると報告されている¹²⁾¹³⁾。これは、生体において eNOS/NO 系が動脈硬化の抑制にはたらいっていることを意味する。しかしながら、eNOS 遺伝子欠損による動脈硬化病変の悪化は、血管局所における抗動脈硬化分子としての eNOS 由来 NO の作用の消失によるだけではなく、eNOS 欠損による血圧上昇も関係している可能性がある。一方、高コレステロール食負荷のマウス動脈硬化モデルにおいては、eNOS 遺伝子欠損により、動脈硬化病変が軽減するという、これらの論文と相反する結果を示

す報告も存在する¹⁴⁾。

血管壁におけるもう一つの NOS、iNOS に関しては、iNOS 由来の大量の NO は炎症惹起性にはたらし、LDL 酸化に関係していることが実験的に示されている。そして iNOS 遺伝子欠損マウスと apoE 遺伝子欠損マウスの交配実験が少なくとも 3 施設から報告されている¹⁵⁾¹⁶⁾。高コレステロール食の負荷条件により多少結果は異なるが、iNOS の非存在下では動脈硬化病変が減少し、また粥腫の組成も線維成分の多いより安定したものへと変化するとされている。以上より、動脈硬化の進展に伴い発現する iNOS により産生される NO は、病変をさらに進行させ、粥腫をより不安定なものへと変化させているものと推定される。これらに対し、nNOS に関しては nNOS 遺伝子欠損マウスと apoE 遺伝子欠損マウスの交配実験をおこなったところ、動脈硬化が進行すると結果が学会抄録¹⁷⁾として報告されているが詳細は不明である。

● ヒトにおいて NO が動脈硬化を抑制するという証拠はあるのか？

ヒトにおいて、NO が動脈硬化の発症・進展と関係するかどうかを検証することはなかなか困難である。この原因として、ヒトにおける動脈硬化の進行が緩徐であることに加え、内因性 NO と同様の作用を血管壁にもたらしような外因性 NO を投与することの困難さがあげられる。硝酸薬は NO を放出することにより作用することはよく知られているが、硝酸薬によって動脈硬化を抑制できたという報告は動物実験においてもほとんど見当たらない。最近、Muller ら¹⁸⁾はイソソルビドの大量投与 (200 mg/kg/日) が高コレステロール食負荷の家兎動脈硬化モデルにおいて、血管からの O₂⁻ 産生を低下させ、動脈硬化病変を軽減すると報告している。しかしながら、大量の外因性 NO の投与は NO 耐性を血管に生じさせることも考えられるため、この報告の意義は今後検証されなくてはならないと考える。

一方、ヒトにおいて NO が抗動脈硬化作用を有するというを示す間接的証拠はいくつかあげられる。この場

表② 内皮機能が将来の心血管イベントの予知因子になることを示した報告のまとめ

	患者数	対象	対象血管	観察期間	結果
冠動脈					
Schächinger ら (2000)	147	診断カテーテル	心外膜側冠動脈	82 ヶ月	Ach/FMD 反応は心血管イベントの独立した予知因子
Halcox ら (2002)	308	診断カテーテル	心外膜側冠動脈 および微小冠動脈	46 ヶ月	Ach 反応は心血管イベントの独立した予知因子
Al Suwaidi ら (2000)	157	冠動脈疾患患者	微小冠動脈	28 ヶ月	Ach による拡張の減弱した患者で心血管イベント発症
末梢血管					
Heitzer ら (2001)	281	冠動脈疾患患者	前腕抵抗血管	54 ヶ月	Ach 反応は心血管イベントの独立した予知因子
Perticone ら (2001)	225	高血圧患者	前腕抵抗血管	31 ヶ月	Ach 反応は心血管イベントの独立した予知因子
Gokce ら (2000)	187	血管手術前患者	とう骨動脈	1 ヶ月	FMD 反応は術後の心血管イベントの独立した予知因子
Neunteufl ら (2000)	77	胸痛患者	とう骨動脈	60 ヶ月	FMD 反応は心血管イベントの独立した予知因子

Ach：アセチルコリンの冠動脈あるいはとう骨動脈内への注入による血管拡張反応。
FMD：血流依存性の血管拡張反応。

(Landmesser U et al : *Circulation* 109 (suppl 1) : S27-S33, 2004 より改変引用)

合、EDR が重要な役割を果たす。すでに述べたように、EDR の減弱は内皮機能障害、そして eNOS により産生される NO 作用の低下を示すものである。すでにスタチンやアンジオテンシン変換酵素 (ACE) 阻害薬あるいはアンジオテンシン受容体拮抗薬 (ARB) による、血管内皮での eNOS 発現の増加に伴う EDR の改善、動脈硬化病変の進展抑制、さらには動脈硬化性疾患が主たる原因と考えられる心血管イベントの減少が報告されている。これらの薬剤は、内皮細胞への作用以外にも、血管に対し多彩な作用を有するため、これらの薬剤による動脈硬化病変の抑制効果が、すなわち eNOS/NO 系の増強効果を介したものであるとはいえないが、やはり内皮細胞由来 NO の抗動脈硬化作用を示唆するものである。

一方、この数年、血管内皮機能障害の程度が冠動脈疾患患者の予後に関係するとの報告がなされている (表②)。2002 年に Halcox ら¹⁹⁾ は約 300 名の患者の平均 4 年間の追跡調査において、冠動脈内にアセチルコリンを投与した場合の血管反応と、観察期間における心血管イベント発症との関連を調べた。その結果、冠動脈抵抗血管での拡張反応の低下群、および冠動脈心外膜側の太い部位が拡張せずに収縮する群において、その後の心血管イベントの発症が多いことを報告した。この報告に先立って、Schächinger ら²⁰⁾ は平均 7 年間、最長 10 年間の追跡調査

により、初回解析時の冠動脈病変の有無にかかわらず、冠動脈心外膜側の血管の種々の刺激に対する拡張反応の程度が、その後の心血管イベント発症の予知因子となりうることを報告した。この場合興味深いことに、アセチルコリンや血流増加に対する拡張反応の低下、すなわち内皮依存性の血管拡張反応の低下のみならず、ニトログリセリンによる血管拡張反応、すなわち内皮に依存しない反応までもが、心血管イベント発症の予知因子になることが明らかにされた。これは前述の家兎の進行した動脈硬化血管では、内皮のみならず平滑筋レベルにおいても NO に対する拡張反応性が低下しているとの報告と合致するものであり、動脈硬化においては内皮同様血管平滑筋にも機能異常が生じていることを示唆する所見と考えられる。さらにその後、冠動脈ばかりでなく、前腕動脈での血流依存性の血管拡張反応 (flow mediated dilatation : FMD) で判定した内皮機能が、心血管イベント発症に関係することもいくつかの施設から報告されてきている²¹⁾ (表②)。

これらの報告は、心血管イベントの基盤に存在する動脈硬化病変の進展が、内皮機能に大きく影響を受けていることを意味すると解釈される。実際に、前述の Schächinger らの報告²⁰⁾ においても、冠動脈造影において有意な狭窄病変を示さない冠動脈局所の経時的な観察において、

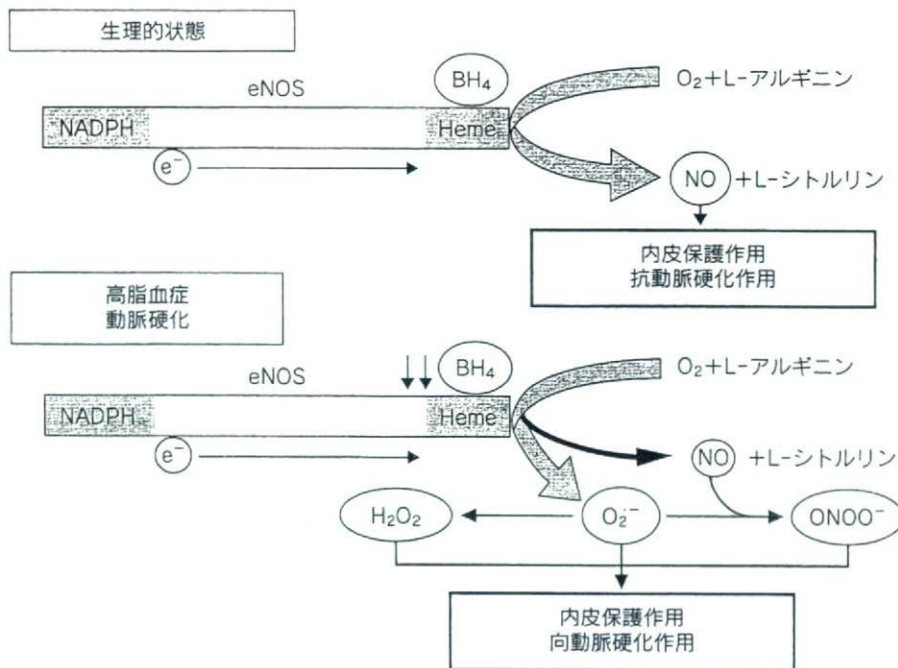


図1 eNOSの動脈硬化における二面性(われわれの仮説)
 高脂血症・動脈硬化では補酵素BH₄の含有量低下によりeNOS uncouplingが生じる。eNOSはNOのみならずO₂⁻も産生し、NOの抗動脈硬化作用を阻害するとともに、場合によっては動脈硬化の悪化に関与する可能性がある。
 (Kawashima S et al : *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24 : 998-1005, 2004 より引用改変)

その後の追跡冠動脈造影でアセチルコリンにより血管が拡張せず収縮した部位、すなわち内皮が傷害されEDRが減弱している部位に、器質的狭窄病変が出現したと述べられている。そして、内皮機能のうち最も重要なものがeNOS由来のNO産生であることより、これら一連の臨床研究の結果は、eNOS由来NOが、動脈硬化の防止・抑制にはたらいていることを示唆する所見と理解される。

● 動脈硬化に対してeNOSは抑制作用をもたらすだけなのか？

すでにNOSの遺伝子操作マウスの項で述べたように、eNOS遺伝子の欠損が逆に動脈硬化の抑制をもたらすとの報告¹⁴⁾も存在する。この報告は何を意味するのだろうか？ この報告ではその機序について明記はしていないものの、コントロールマウスでは内皮細胞によるLDL酸化が生じており、それはNOS阻害薬でブロック

されるのに対し、eNOS遺伝子欠損マウスの内皮細胞によるLDL酸化は軽度で、しかもNOS阻害薬でブロックできなかったと報告されている。これはeNOSがLDLの酸化に関与していることを示唆するものである。

この数年NOS研究において“NOS uncoupling (機能異常)”という現象が注目されている²²⁾²³⁾。これはNOSがある種の条件下では、NOよりむしろO₂⁻を産生することを意味する。すなわち、NOSがNO産生酵素として正常に作用するには、補酵素であるテトラヒドロピオプテリン(BH₄)の存在が必須であり、BH₄の不足下ではNOSはダイマー化できず不安定となり、NOSのリクターゼ領域で産生された電子が、オキシゲナーゼ領域においてL-アルギニンよりむしろ酸素に供与される結果、O₂⁻が産生される²⁴⁾。

生体においても、このNOS uncouplingはまず糖尿病における内皮機能障害に関係していることが報告され²⁵⁾²⁶⁾注目された。その後、2001年に動脈硬化血管においても

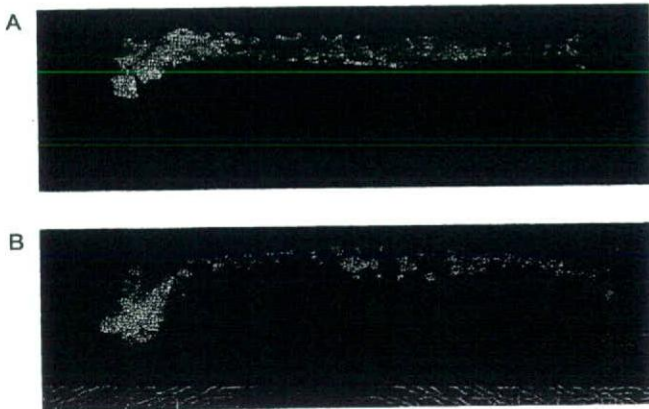


図2 apoE 遺伝子欠損マウスでは eNOS 過剰発現により奇異性に動脈硬化病変が増強する (16 週齢での大動脈における検討)
A: 通常の apoE 遺伝子欠損マウスの動脈硬化病変,
B: eNOS を過剰発現した apoE 遺伝子欠損マウスの動脈硬化病変。
(Ozaki M *et al*, 2002²⁹) より引用)

同様の現象が生じており、動脈硬化血管における EDR の減弱に関与していることがはじめて報告された²⁷⁾ (図1)。

同時期に、われわれは内皮細胞に eNOS が過剰発現するトランスジェニックマウス (eNOS-Tg)²⁸⁾ と、動脈硬化易発症モデルである apoE 遺伝子欠損マウス (apoE-KO) との交配実験をおこなっており、その結果、当初の予想に反し、eNOS を過剰発現させた apoE 遺伝子欠損マウス (apoE-KO/eNOS-Tg) では、apoE-KO にくらべ動脈硬化病変は減少しておらず、逆に増強していることを見出していた (図2)。

そこでわれわれ²⁹⁾ は、この奇異性の動脈硬化病変増強の機序として、eNOS の uncoupling による内皮からの O_2^- 産生の増加が関係すると考え、更なる検討をおこなった。そして内皮での eNOS 過剰発現の結果、血管壁、とくに内皮からの O_2^- 産生が増加していること、そして血管における BH_4 濃度が低下していることを見出した。この動脈硬化血管における BH_4 濃度の低下は、 BH_4 合成の減少と BH_4 が酸化され BH_2 に変化するものの 2 つの機序が関係する。そこで合成 BH_4 の長期経口投与をおこなうと、血管壁の BH_4 濃度の増加とともに、eNOS 過剰発現により増強した動脈硬化病変が、ほぼ通常の apoE 遺伝子欠損マウスの病変レベルまで軽減することを見出し

た。また、さらに内因性の BH_4 濃度を増加させるため、 BH_4 産生の律速酵素である GTPCH-1 (GTP cyclohydrolase-1) が内皮に過剰発現した遺伝子操作マウスとの交配実験をおこない、GTPCH-1 が過剰発現した apoE-KO/eNOS-Tg (apoE-KO/eNOS-Tg/GTPCH-Tg) を作製した。その結果、apoE-KO/eNOS-Tg/GTPCH-Tg では、血管壁の BH_4 濃度の増加とともに、血管壁からの O_2^- 産生が低下し、動脈硬化病変が軽減することを見出した。

以上の一連の研究より、高脂血症・動脈硬化では補酵素 BH_4 の低下のため、過剰発現させた eNOS には uncoupling が生じており、eNOS は NO よりむしろ O_2^- を産生していること、この増加した O_2^- により動脈硬化が増強したものと考えられた。また、通常の apoE 遺伝子欠損マウスにおいても eNOS uncoupling が生じており、この uncoupling を BH_4 を増加させることにより是正すると、動脈硬化病変が軽減することも報告された³⁰⁾。その後の研究により、内皮細胞において eNOS が NO 産生酵素として最も効率的にはたらくためには、至適な eNOS と BH_4 のバランスが存在しており、そのバランスが少しでも BH_4 の相対的不足に傾くと、NOS 産生酵素としての活性が低下することも明らかになりつつある³¹⁾。以上をふまえてわれわれは現在、eNOS 過剰発現マウスで見出した動脈硬化病変の増強は、特殊な条件下の研究であるものの、eNOS uncoupling が、本来の eNOS/NO 系の抗動脈硬化作用を減弱させているという現象は、おそらくヒトの動脈硬化の進展プロセスにおいても生じているのではないかと考えている。

このような観点に立つと、動脈硬化を eNOS/NO 系から防止、治療しようと考えるとき、単に eNOS 発現を増強させるだけでなく、eNOS の NO 産生酵素としての作用を最大限に引き出すため、並行して内皮細胞における BH_4 濃度を増加させるような治療法が望まれることになる。 BH_4 の内皮細胞での代謝経路やその産生を規定する因子に関しては詳細はまだ明らかでない。同様に BH_4 の主たる産生酵素 GTPCH-1 の活性や発現の調節因子にも不明な点が多い。一方、動脈硬化の抑制効果が確立しているスタチンに、GTPCH-1 の発現増加、 BH_4 の産生増

加作用があることが明らかになっている³²⁾。この意味においても、高脂血症・動脈硬化においてスタチンを投与することは非常に合目的であり、他の薬剤のBH₄に対する影響に関しての知見を広げるとともに、BH₄を効率的に増加させる薬剤の開発が望まれる。

● おわりに

このように eNOS により産生される NO は抗動脈硬化分子としてはたらくと考えられるが、eNOS が必ずしも NO のみを産生するのではなく、そのカウンター分子である O₂⁻をも産生することとは、eNOS/NO 系を用いた動脈硬化の治療法を考えるうえで留意すべきことである。また他の NOS, すなわち iNOS あるいは nNOS により産生される NO が、生体において実際にどのように動脈硬化と関係しているかに関してはまだ不明な点も多く、更なる今後の研究が望まれる。



文 献

- 1) Moncada S, Higgs A: The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med* **329**: 2002-2012, 1993
- 2) De Caterina R, Libby P, Peng HB *et al*: Nitric oxide decreases cytokine-induced endothelial activation. Nitric oxide selectively reduces endothelial expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines. *J Clin Invest* **96**: 60-68, 1995
- 3) Lloyd-Jones DM, Bloch KD: The vascular biology of nitric oxide and its role in atherogenesis. *Annu Rev Med* **47**: 365-375, 1996
- 4) Qian H, Neplioueva V, Shetty GA *et al*: Nitric oxide synthase gene therapy rapidly reduces adhesion molecule expression and inflammatory cell infiltration in carotid arteries of cholesterol-fed rabbits. *Circulation* **99**: 2979-2982, 1999
- 5) Kawashima S, Yamashita T, Ozaki M *et al*: Endothelial NO synthase overexpression inhibits lesion formation in mouse model of vascular remodeling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **21**: 201-207, 2001
- 6) Rikitake Y, Kawashima S, Takeshita S *et al*: Anti-oxidative properties of fluvastatin, an HMG-CoA reductase inhibitor, contribute to prevention of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. *Atherosclerosis* **154**: 87-96, 2001
- 7) Drexler H: Endothelial dysfunction: clinical implications. *Prog Cardiovasc Dis* **39**: 287-324, 1997
- 8) Cai H, Harrison DG: Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res* **87**: 840-844, 2000
- 9) Kanazawa K, Kawashima S, Mikami S *et al*: Endothelial constitutive nitric oxide synthase protein and mRNA increased in rabbit atherosclerotic aorta despite impaired endothelium-dependent vascular relaxation. *Am J Pathol* **148**: 1949-1956, 1996
- 10) Melichar VO, Behr-Roussel D, Zabel U *et al*: Reduced cGMP signaling associated with neointimal proliferation and vascular dysfunction in late-stage atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**: 16671-16676, 2004
- 11) Wilcox JN, Subramanian RR, Sundell CL *et al*: Expression of multiple isoforms of nitric oxide synthase in normal and atherosclerotic vessels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **17**: 2479-2488, 1997
- 12) Knowles JW, Reddick RL, Jennette JC *et al*: Enhanced atherosclerosis and kidney dysfunction in eNOS (-/-) Apoe (-/-) mice are ameliorated by enalapril treatment. *J Clin Invest* **105**: 451-458, 2000
- 13) Kuhlencordt PJ, Gyurko R, Han F *et al*: Accelerated atherosclerosis, aortic aneurysm formation, and ischemic heart disease in apolipoprotein E/endothelial nitric oxide synthase double-knockout mice. *Circulation* **104**: 448-454, 2001
- 14) Shi W, Wang X, Shih DM *et al*: Paradoxical reduction of fatty streak formation in mice lacking endothelial nitric oxide synthase. *Circulation* **105**: 2078-2082, 2002
- 15) Detmers PA, Hernandez M, Mudgett J *et al*: Deficiency in inducible nitric oxide synthase results in reduced atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *J Immunol* **165**: 3430-3435, 2000
- 16) Niu XL, Yang X, Hoshiai K *et al*: Inducible nitric oxide synthase deficiency does not affect the susceptibility of mice to atherosclerosis but increases collagen content in lesions. *Circulation* **103**: 1115-1120, 2001
- 17) Hoetten S, Hu K, Widder J *et al*: Atheroprotective effects of neuronal nitric oxide synthase in apolipoprotein E knockout mice. *Circulation* **108**: IV-40 (abstract), 2003
- 18) Muller S, Konig I, Meyer W *et al*: Inhibition of vascular oxidative stress in hypercholesterolemia by eccentric isosorbide mononitrate. *J Am Coll Cardiol* **44**: 624-631, 2004

- 19) Halcox JP, Schenke WH, Zalos G *et al* : Prognostic value of coronary vascular endothelial dysfunction. *Circulation* **106** : 653-658, 2002
- 20) Schächinger V, Britten MB, Zeiher AM : Prognostic impact of coronary vasodilator dysfunction on adverse long-term outcome of coronary heart disease. *Circulation* **101** : 1899-1906, 2000
- 21) Quyyumi AA : Prognostic value of endothelial function. *Am J Cardiol* **91** : H19-H24, 2003
- 22) Cosentino F, Luscher TF : Tetrahydrobiopterin and endothelial nitric oxide synthase activity. *Cardiovasc Res* **43** : 274-278, 1999
- 23) Katusic ZS : Vascular endothelial dysfunction : does tetrahydrobiopterin play a role? *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **281** : H981-H986, 2001
- 24) Vasquez-Vivar J, Kalyanaraman B, Martasek P *et al* : Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase : the influence of cofactors. *Proc Natl Acad Sci USA* **95** : 9220-9225, 1998
- 25) Shinozaki K, Kashiwagi A, Nishio Y *et al* : Abnormal biopterin metabolism is a major cause of impaired endothelium-dependent relaxation through nitric oxide/O₂⁻ imbalance in insulin-resistant rat aorta. *Diabetes* **48** : 2437-2445, 1999
- 26) Alp NJ, Channon KM : Regulation of endothelial nitric oxide synthase by tetrahydrobiopterin in vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **24** : 413-420, 2004
- 27) Laursen JB, Somers M, Kurz S *et al* : Endothelial regulation of vasomotion in apoE-deficient mice : implications for interactions between peroxynitrite and tetrahydrobiopterin. *Circulation* **103** : 1282-1288, 2001
- 28) Ohashi Y, Kawashima S, Hirata K *et al* : Hypotension and reduced nitric oxide-elicited vasorelaxation in transgenic mice overexpressing endothelial nitric oxide synthase. *J Clin Invest* **102** : 2061-2071, 1998
- 29) Ozaki M, Kawashima S, Yamashita T *et al* : Overexpression of endothelial nitric oxide synthase accelerates atherosclerotic lesion formation in apoE-deficient mice. *J Clin Invest* **110** : 331-340, 2002
- 30) Alp NJ, McAteer MA, Khoo J *et al* : Increased endothelial tetrahydrobiopterin synthesis by targeted transgenic GTP-cyclohydrolase I overexpression reduces endothelial dysfunction and atherosclerosis in ApoE-knockout mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **24** : 445-450, 2004
- 31) Bendall JK, Alp NJ, Kawashima S *et al* : Stoichiometric relationships between endothelial tetrahydrobiopterin, eNOS activity and eNOS coupling in vivo : insights from transgenic mice with endothelial-targeted GTPCH-1 and eNOS overexpression. *Circ Res* **97** : 864-871, 2005
- 32) Hattori Y, Nakanishi N, Akimoto K *et al* : HMG-CoA reductase inhibitor increases GTP cyclohydrolase 1 mRNA and tetrahydrobiopterin in vascular endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **23** : 176-182, 2003

川嶋 成乃亮 (かわしま・せいのみすけ)

神戸大学大学院医学系研究科循環呼吸器病態学助教授

1952年 大阪府生まれ。

1977年 神戸大学医学部卒業。

1982年 ポストン大学, ロチェスター大学留学。

1985年 兵庫医科大学内科学第一講座助手。

1992年 神戸大学医学部内科学第一講座助手。

同講師を経て, 2000年より現職。

専門：循環器内科。

研究テーマ：虚血性心疾患の分子機序，一酸化窒素の心血管系における役割の解明。

保護プロセス

NO の心臓防御作用



川嶋 成乃亮

多彩な機能をもつ NO

NO はまさに多機能分子と呼ぶのにふさわしい多彩な作用を有しており、生体のさまざまな細胞において L-アルギニンを基質に NO 合成酵素 (NOS) により産生される。NOS には少なくとも三つのアイソフォーム、①脳神経型 NOS (nNOS)、②誘導型 NOS (iNOS)、③内皮型 NOS (eNOS) があり、一般に nNOS および eNOS により産生される NO は nM のオーダーなのに対し、iNOS は μM のオーダーの大量の NO を産生する¹⁾。

そして NO の作用機序には、cGMP を介するものと介さないものがある。すなわち、血管平滑筋弛緩・拡張作用などは、NO が可溶性グアニル酸シクラーゼを活性化し cGMP を産生することにより、cGMP 依存性キナーゼが活性化され生じる。一方、NO は直接的に標的タンパクのチオール基のニトロシル化をもたらすことによっても作用する。



NO の生理的な
心機能への影響

NO はさまざまな経路により心臓に作用する

心臓において、nNOS は心臓に分布する神経末端に、eNOS は血管内皮細胞および心筋細胞に存在し、iNOS は通常は発現していないが炎症が生じることにより、心臓に浸潤するマクロファージや血管平滑筋等に発現する¹⁾。

そして、NO は心臓に対しては、血管を介しての作用と、心筋に対する直接作用との両者によって作用する。また、循環器領域において広く使われる硝酸薬は、生体内で NO に変換されて作用している。

心機能への影響

◎それぞれの NOS アイソフォーム由来 NO による心機能調節

NO は基礎心筋収縮力に対し、低濃度では増強、高濃度では抑制という 2 方向性の作用を有する²⁾。

低濃度での心筋収縮力の増加は eNOS 由来 NO が関係し、その程度は約 10% と軽度である。機序としては、直接的に心筋小胞体 (SR) のリアノジン受容体および細胞膜の電位依存性カルシウムチャネルを開口することによる。一方、iNOS 由来の大量の NO により、

cGMP を介して電位依存性カルシウムチャネルからのカルシウム流入が抑制され、またトロポニン I のリン酸化により、収縮力が低下する。

心筋細胞の nNOS 由来の NO にも心筋細胞へのカルシウム流入を抑制し、心筋収縮を抑制する可能性がある。また、eNOS 由来 NO は心臓の弛緩能も改善する。

◎NO は β 刺激による

心筋収縮力増加を抑制する

β アドレナリン受容体刺激による心筋収縮力の増加に対して、eNOS 由来の内因性 NO は、 β 受容体以降の cAMP 作用の抑制、L 型カルシウムチャネルからの細胞内へのカルシウム流入の抑制、トロポニン I のリン酸化などを介して抑制的に働く。

このことは、 β 刺激によるカテコラミン毒性から心筋を防御する機構との解釈もできる。そして、通常心筋の β 刺激に対応する受容体は β_1 受容体であるのに対し、この eNOS 由来 NO により修飾を受けている β 受容体は β_3 受容体である。

◎NO には陰性変力作用もある

一方、NO は心拍数を低下させる。この作用は、主として神経末端の nNOS 由来 NO による迷走神経刺激を介す

KAWASHIMA, Seinosuke
神戸大学大学院医学系研究科 循環呼吸器病態学

る。一方、心筋細胞の eNOS 由来 NO も同様に迷走神経作用を増強させることより、nNOS と eNOS が協同して迷走神経による心拍数のコントロールを増強させているものと考えられる。

心筋酸素消費・

エネルギー代謝への影響

心臓の微小血管の内皮の eNOS により産生される NO は、ミトコンドリアのアコニターゼや電子伝達系の複合体 I および II をニトロシル化することや、チトクローム C の活性を抑制することにより、心筋の酸素消費を減少させる³⁾。

一方、NO は心筋のエネルギー産生においてグルコース利用を抑制しており、NO を抑制することで、エネルギー産生基質が遊離脂肪酸からグルコースへスイッチすることが示唆されている。脂肪酸に比べグルコースを利用し ATP 産生を行う場合は、必要な酸素量が少なくすむことより、虚血下などでは、より合目的なエネルギー産生経路と考えられる。



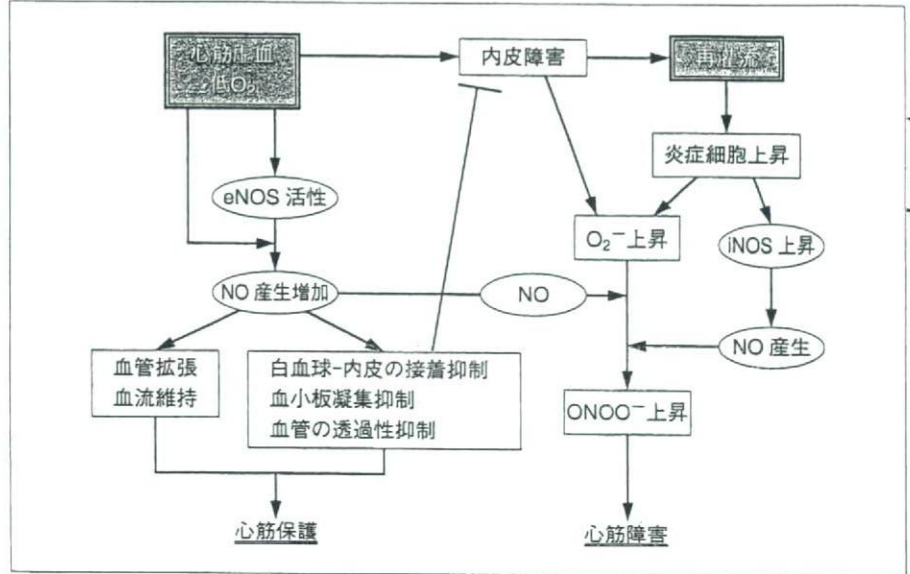
心筋虚血と NO (図 1)

虚血再灌流の防御因子としての NO

◎心筋虚血と NO

心筋虚血の出現早期において、eNOS が活性し、NO 産生が増加する。この NO は心筋虚血に対し防御的に働く。すなわち、eNOS 由来 NO は血管を拡張させ、組織灌流を維持し、また血小板凝集を抑制することにより心筋虚血を軽減しようとする。そして虚血が進行すると、アシドーシスにより eNOS 活性は低下し、虚血時間がさらに続くと、eNOS タンパク発現自身も低下し、内

▼図 1 虚血・再灌流における NO の役割
T: 抑制, ONOO⁻: ペルオキシナイト



皮細胞からの NO 産生は著減する。

このような虚血条件下の心筋では、この NO の減少が心筋代謝量を減少させ、またエネルギー産生を解糖系にスイッチさせることにより、心筋の酸素消費とエネルギー供給バランスの観点からは心筋保護に働いていると見なせる。

◎再灌流と NO

再灌流における NO の役割は複雑であり、防御と障害の二面性を有す⁴⁾。まず、虚血時における eNOS 由来の NO は、白血球の内皮細胞への接着の抑制、内皮の透過性の保持などの内皮機能保護により、続いて生じる再灌流時の障害を軽減する。

また、NO は、再灌流障害のメディエータであるスーパーオキシド ($\cdot O_2^-$) の作用をブロックすることや、ミトコンドリアの K_{ATP} チャンネル (ATP 感受性 K⁺ チャンネル) を開口することでミトコンドリア内へのカルシウム流入を

抑制し、アポトーシスを抑えることで、直接的にも心筋保護作用を有すと考えられる。さらに、NO は細胞膜のカルシウムチャネルを抑制することで再灌流時のカルシウム過負荷を軽減する。

一方、再灌流とともに産生される iNOS 由来の大量の NO は、スーパーオキシドと反応し細胞傷害性の強いペルオキシナイトライド (ONOO⁻) となり、アポトーシスをもたらし心筋障害に働くと考えられている。そのため、iNOS に選択的の強い阻害薬は再灌流障害を軽減する、と報告されている。

このように NO にはその産生源の違いにより、また産生される時期により、虚血再灌流障害に対して、相反する作用がある。従来、生態における NO の役割を検討するには L-NAME などの NOS 阻害薬が用いられてきたが、その投与時期、また NOS への選択性、すなわち eNOS および iNOS のどちらをより選択的に阻害するかにより、その効果が違ってくる⁵⁾。

Preconditioning (PC) の
メデイエータとしての NO

◎早期 PC と NO

再灌流後 1~2 時間で発現する早期 PC には KATP チャネル、特にミトコンドリア膜の KATP チャネルの活性化が重要とされており、従来アデノシンがその活性物質として挙げられて、その活性化に至るプロテインキナーゼ protein kinase C (PKC) を始めとした細胞内情報伝達機構の研究がなされてきた（「アデノシン虚血性心疾患治療の新展開」の項参照）。そして、この早期保護効果にも NO が関係する可能性があげられている。

◎晚期 PC と NO

再灌流後 24~48 時間で発現する晚期 PC のメデイエータとして iNOS 由来の NO が関与する。晚期 PC 発現には転写因子 NF κ B の活性化が必須であり、おそらく虚血早期に eNOS より産生された NO ならびにペルオキシナイトライドが、PKC、さらに種々のチロシンキナーゼを活性化し、そして NF κ B の活性化をもたらし、その結果 iNOS 遺伝子発現が生じ、さらなる NO 産生が生じる、との仮説が唱えられている⁶⁾。

産生された NO や、NO と活性酸素種との反応物は、KATP チャネルを活性化し心筋を防御する。また、NF κ B により発現が誘導された Mn SOD やシクロオキシゲナーゼ 2 (Cox-2) も晚期 PC に関係している。

それではこのような NO の心筋虚血への防御作用を用いて、どのように心臓を守ればよいのだろうか？

◎NO を投与するタイミングが必要

NO 供与薬、NO 産生基質である L-アルギニン、NO ガスが有効に作用するには、投与のタイミングが重要であることが動物実験により判明している。

再灌流後にこれらの薬物を投与した場合はむしろ障害が増強する。これに対し、心筋虚血作成前、あるいは虚血後で再灌流前に、これらの NO 供与薬を投与した場合は、梗塞サイズの縮小、心機能の維持など、防御効果を示すとの報告が大勢を占め、その機序としては白血球-内皮細胞の接着抑制など、内皮保護による作用が重要と考えられる。

◎臨床の場での応用：現状と問題点

【現状】臨床の場においてこのような再灌流障害が密接に関係するものとして、開心手術後の体外循環からの離脱があげられる。大動脈クランプの解除とともに心筋の再灌流障害が出現し、心筋収縮傷害が生じ、これをどのようにして軽減するかは重要である。NO を用いた治療戦略として、一つの方法は NO 供与薬や L-アルギニンを含んだ心筋保護液を用いる方法であり、もう一つは体外循環時ならびにその離脱後にわたり NO ガス吸入を行うことである⁷⁾。

両者ともに、これまでにいくつかの施設より報告がなされており、心筋障害の指標としての CKMB の流出量の低下、再灌流後不整脈の減少、術後心筋梗塞発症の減少が認められる、とされている。しかしながら、いずれの報告も患者数が少なく、まだ確立した方法とは言えない。

一方、急性心筋梗塞における再灌流療法に際しても、再灌流障害が出現する。大動物の実験では、NO 供与薬を冠動脈内より再灌流開始前から投与し、

その後再灌流中も投与を継続することにより梗塞サイズの減少を認めたとの報告がある。臨床においては再灌流障害の定量化は困難であり、再灌流後の内皮障害を表すと考えられる no-reflow に関して、NO 供与薬兼 K⁺ チャネル開口薬であるニコランジルの冠動脈内への投与が no-reflow の防止効果を示し、心機能保持にも有効とされている。

純粋な NO 供与薬としては、冠動脈に狭窄病変を有す患者において、PCI 後に no-reflow を認めた場合、ニトロプルシドナトリウムの冠動脈内投与により、血流が改善したとの報告⁸⁾ がある。

【問題点】ただ、ここで問題となるのは、硝酸薬のような NO 供与薬を生体に投与しても、内因性 NO の有すさまざまな作用の一部しか再現できないということがある。これには、おそらく既存の NO 供与薬が、NO の放出と同時に活性酸素種も放出していることや、NO の細胞内での局在が関係すると考えられる。NO を用いた心保護のためには、NO 供与薬から放出された NO がより有効に作用するような投与方法の開発や、さらには新しい NO 供与薬の開発が必要である。



心不全と NO

不全心筋と NO

◎iNOS 由来 NO は、不全心での心機能低下、心筋のアポトーシスに関係？
心筋炎・移植後心などの炎症・免疫の関与する病態では炎症細胞を中心に iNOS 発現が著増するが、拡張型心筋症や陳旧性心筋梗塞などでも心筋での

iNOS 発現が認められる、との報告が多い。そして不全心全般において、主として iNOS 由来の NO により、心筋収縮力が抑制されていると考えられてきた。

しかしながら、iNOS を過剰発現させた遺伝子操作マウスのデータなどに基づいた最近の考え方としては、心不全一般における基礎心筋収縮力の低下に iNOS が関与していることに関しては否定的になりつつある。また、iNOS 由来の大量 NO は心筋細胞のアポトーシスをもたらすことが実験的に明らかになっているが、これも、心筋炎などに限られた現象のようだ。

◎心不全では

eNOS 由来 NO の低下が重要

心不全において認められる β 刺激に対する反応性の低下の機序の一部に、NO による β_3 受容体シグナルの抑制が関係し、正常心と比べ不全心では、NO による β 刺激の抑制がより強くなっている。また、心不全では、血管の eNOS 発現・活性は低下することが明らかになっている。

NO には心筋酸素消費量を低下させ、心筋のエネルギー消費・仕事量効率を改善する作用があることから、心臓において NO は保護的に働いており、心不全における eNOS 由来 NO の低下が心筋を疲弊させ、心機能低下をもたらしているとの考え方もある。

NO は心室リモデリングを抑制する
NO は心筋梗塞後の心室リモデリングにも影響を与える。心筋梗塞後の心室リモデリングは、心室腔の拡大とともに非梗塞部心筋の肥大をもたらし、さらなる心筋虚血の発現、心収縮力の低

▼表 1 NO を用いた心筋保護の可能性
(ACE 阻害薬、AngII 受容体拮抗薬を除いてはまだ研究段階)

心不全・心臓からの灌漑	L-アルギニン、NO 供与薬を含有する cardioplegia 液の使用 術中、術後に持続する NO ガス吸入療法
急性心筋梗塞の再灌漑療法	冠動脈内へのニコランジルの投与（むしろ K^+ チャネル開口薬として） ニトログリセリンよりもより効果的な NO 供与薬の冠動脈内への投与
心不全・梗塞後リモデリング	eNOS 活性・発現作用を有する薬物の投与 ACE 阻害薬、Ang II 受容体拮抗薬 スタチン？

下をもたらすことで心不全を進行させる。

eNOS 由来 NO は、梗塞後の心腔拡大、左心機能低下、非梗塞部心筋の肥大を抑制し、リモデリングの防止に働いている⁹⁾。

それでは、NO の観点から
不全心、心室リモデリングを
どのように治療するか？

◎ACE 阻害薬などの eNOS からの

NO 産生を増加させる薬物が有用
心不全治療において NO 供与薬である硝酸薬は広く用いられているが、主としてその血管拡張作用により心臓への前負荷を減らすことが目的であり、心筋への作用を期待したものではない。また L-アルギニンや NO 供与薬を不全心そのものの治療に用いようとの臨床試験もほとんど行われていない。

一方、ACE 阻害薬ならびにアンギオテンシン II (Ang II) 受容体拮抗薬には eNOS 活性増加作用がある。これらの薬物は心不全患者の予後改善に有効であり、また心筋梗塞後の心室リモデリングの抑制作用もあることから、今日の慢性心不全および心筋梗塞後患者の標準的治療薬となっている。