

論文の内容の要旨

論文題目 重症敗血症における内皮型一酸化窒素合成酵素(NOS3)
の心保護効果

指導教員 山田 芳嗣 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成19年4月入学

医学博士課程

外科学専攻

坊垣 昌彦

敗血症は感染に起因した全身性炎症反応症候群 (systemic inflammatory response syndrome: SIRS) と定義され、その発症頻度は増加傾向にあるとされている。抗菌薬の早期投与や人工呼吸管理の改善をはじめとする治療法の進歩により全体の死亡率は減少傾向にはあるものの、重症敗血症患者においては、依然として死亡率は25 - 50%と高く、医学的また医療経済的にも非常に重要な問題となっている。一酸化窒素(NO)が敗血症の病態生理に深く関与していることは広く認識されているが、その役割および作用機序に関しては、まだ十分には解明されていない。

NOは生体内では主としてNO合成酵素(NOS)によって合成され、生体内情報伝達物質として作用する。NOSは少なくとも3種類が知られており、主に神経細胞に発現しているNOS1(neuronal NOS:nNOS)、炎症等の刺激によって様々な細胞に発現するNOS2(inducible NOS:iNOS)、主に内皮細胞・心筋細胞等に発現しているNOS3(endothelial

NOS : eNOS) がある。NOS1 と NOS3 は恒常的に発現しているのに対して、NOS2 は誘導型であり刺激のない状態では発現レベルは低いとされる。

敗血症においては、NOS2 によって産生された大量の NO が血圧低下や臓器機能不全をもたらすと考えられており、実際、エンドトキシン投与による敗血症モデルにおいては、NOS2 の遺伝的欠失あるいは NOS2 の阻害薬の投与によって臓器障害が改善されることが示されている。しかし、敗血症患者に非特異的な NOS 阻害薬を用いた臨床試験では、動物実験の結果とは対照的に、NOS 阻害薬により死亡率が増加したため早期に臨床試験が中止となった。動物実験と患者で研究デザインが異なっていることも重要な要素ではあるが、用いられた NOS 阻害薬が非選択的であったことは結果に大きな影響を及ぼしていると考えられ、この臨床試験の結果は敗血症においては NOS2 の選択的抑制が重要である可能性を示すとともに、NOS1 および NOS3 がむしろ保護的に作用することを間接的に示唆するものであった。

敗血症における NOS3 の役割に関しては、NOS3 を過剰発現させたトランスジェニックマウスを用いた研究では NOS3 の保護作用が示されているものの、内在性に発現しているレベルの NOS3 が保護的であるかどうかは依然として不明である。NOS3 の臓器保護における役割については、心不全領域で多くの研究がなされてきており、虚血再灌流モデル、圧負荷心不全モデルなどを用いて NOS3 が保護的に作用していることが示されている。慢性心不全において NOS3 が保護的に作用するメカニズムに関してはまだ十分には解明されていないが、近年、心不全のメカニズムとしてミトコンドリア機能が重要であることが指摘されている。ミトコンドリア機能の調節に NOS3 が関与しているとの報告も散見され、慢性心不全における NOS3 の心保護作用のメカニズムのひとつとしてミトコンドリア機能調節異常の可能性も考えられる。

以上のことから、敗血症における NOS3 の臓器保護効果を検討する上で、特に敗血

症性心不全において NOS3 が保護的に作用するのではないかと考えられ、本研究では心機能を中心に検討することとした。endotoxin 投与モデルは必ずしも臨床的な敗血症の病態生理を反映していないと指摘されていることを考慮して、臨床的な敗血症に近いとされる polymicrobial sepsis モデルを採用した。本研究の目的は、『NOS3 ノックアウトマウス (NOS3KO) では敗血症性心不全が増悪すること』、言い換えれば『内因性に発現しているレベルの NOS3 が敗血症において心保護効果をもつこと』を証明することである。

<実験方法の概要>

実験動物 : オスの野生型 (WT) または NOS3KO

(C57BL/6 系統、月齢 2-6、体重 20-30 グラム)

敗血症モデル : 消化管穿孔による polymicrobial sepsis モデル

(Colon Ascendens Stent Peritonitis: CASP)

主な検討項目 : CASP 後の心機能について、in vivo、単離心筋細胞レベルで検討した。

また、心機能障害のメカニズムを検討するため、心筋ミトコンドリア機能を比較し、さらに心臓および他臓器の (肝・肺) の炎症性サイトカインの発現レベルを比較した。

<結果>

NOS3KO では WT と比較して、敗血症徴候がより早く出現し、生存時間は有意に短かったことから NOS3 欠失が polymicrobial sepsis の重症化に関与していることが示唆された。

CASP22 時間後に施行した血行動態測定では、WT に比べて NOS3KO では収縮能・拡張

能ともに心機能障害が増悪していた。

単離心筋細胞においても CASP によって心筋細胞の機能は収縮能、拡張能ともに障害されたが、その程度は NOS3KO において WT よりも重篤であった。心筋線維のカルシウム感受性には NOS3KO と WT で大きな差はなく、心筋細胞の機能障害が重篤化する原因として、カルシウム調節機構の障害の程度が NOS3KO において WT よりも大きいことが考えられた。

CASP22 時間後に単離した心筋細胞ではミトコンドリア膜電位が低下していたが、この膜電位の低下は NOS3KO において WT よりも有意に大きかった。また CASP22 時間後に心筋ミトコンドリアを単離したところ、NOS3KO のミトコンドリアではカルシウム負荷によるミトコンドリア膜透過性遷移 (MPT) が WT よりも早く生じる傾向が認められた。さらに、CASP 後のミトコンドリアでは ATP 合成能が低下していたが、この合成能の低下は NOS3KO において WT よりも増悪していた。

心臓での炎症性サイトカインの遺伝子発現レベルは総じて CASP により上昇したが、上昇の程度は NOS3KO において WT よりも大きい傾向があり、NOS3 欠失により CASP 後の心筋の炎症が増悪することが示唆された。また、肝・肺においても CASP 後の炎症性サイトカインの発現レベルは NOS3KO において有意に上昇の程度が大きく、NOS3 欠失によって全身性に炎症が増強されることが示唆された。

なお、心臓においては NOS3 欠失による NOS1 あるいは NOS2 の代償性発現は認められず、心臓組織中の NO 代謝産物の濃度にも差は認められなかった。

<考察>

本研究では NOS3 欠失によって敗血症による心機能障害が悪化することがマウス polymicrobial sepsis モデルを用いて示された。NOS3KO においては、CASP 後の心機

能は収縮能・拡張能ともに WT よりも強く障害され、単離心筋細胞を用いた解析では、細胞内カルシウム濃度の調節機構が障害されていることがわかった。これらの障害はミトコンドリアの機能低下、なかでもミトコンドリアの ATP 合成能の低下と関連していたが、ATP は細胞内カルシウム濃度の調節に重要な筋小胞体 Ca^{2+} -ATPase の機能の決定因子とされている。また、NOS3KO では polymicrobial sepsis によって、心臓を含めて全身性に炎症が増強していた。以上をあわせると、NOS3 欠失により polymicrobial sepsis にともなう心臓組織の炎症が増強し、それによって心機能が増悪する、言い換えれば内因性の NOS3 は心臓組織の炎症を抑制し、心臓保護的な役割を果たすことが示された。また、保護作用のメカニズムとして、ミトコンドリア機能の維持によって細胞内カルシウム調節機構の障害を抑制することが重要であることが示唆された。

本研究では polymicrobial sepsis において NOS3 が心臓の炎症を抑制し、またミトコンドリアの機能障害を抑制することが示されたが、その分子メカニズムについてはほとんどわかっていない。NO シグナル系が重要なことは当然であるが、血漿中濃度や組織中濃度といった指標では、NO 分子の役割を十分に解明することはできない。NO 合成酵素には細胞内局在があることもわかっており、今後は NOS および NO の細胞内局在を考慮した議論が重要になってくると思われる。また、sepsis は多臓器不全をひき起こす全身の炎症性病態であり、心機能障害においても他臓器の機能障害の影響は無視できない。本研究でも NOS3KO によって肝臓、肺の炎症も増悪しており、NOS3 の心保護効果のメカニズムとして、全身の炎症を抑制することに加えて心臓で臓器特異的に作用するメカニズムが存在するかどうかは不明である。今後、NOS3 の conditional knock out マウスが使用可能となり、これらの未解決の問題の解明が進むことが期待される。

以上、本研究では、NOS3 欠失により、polymicrobial sepsis にともなう心機能障害が増悪すること、この心機能障害は心筋細胞のカルシウム調節機構の障害の増悪をともなっており、その原因としてミトコンドリア機能障害が重要であることが示唆された。この結果からは、NOS3 が臨床的敗血症において臓器保護効果を持つことが予想され、将来的には NOS3 の機能を調整することが、敗血症性心不全の治療の目標となる可能性がある。