

主論文の要旨

**Diallyl trisulfide augments ischemia-induced
angiogenesis via an endothelial nitric oxide
synthase-dependent mechanism**

（ダイアリルトリサルファイドは内皮型一酸化窒素合成酵素に依存する
機序で虚血による血管新生を促進する）

名古屋大学大学院医学系研究科 分子総合医学専攻
病態内科学講座 循環器内科学分野

（指導：室原 豊明 教授）

林田 竜

【緒言】

高齢化社会の進行に伴い、末梢血管疾患・重症虚血趾を有する患者数は増加し、QOLの低下や生命予後にも影響を与える重大な問題となっている。虚血組織において血管新生を促進してこれを改善することが重要である。硫化水素は有毒ガスとして知られているが、近年の研究で哺乳類の生体内においても微小濃度で産生されており、抗酸化作用、抗アポトーシス作用などを有することが報告されている。ダイアリルトリサルファイド (DATS) はニンニクオイルに含まれる有機硫化物で、グルタチオンと反応して硫化水素を放出する。心筋虚血再灌流モデルマウスにおいては、DATS 投与で虚血組織中の硫化水素濃度が増加し心筋保護的に働くことが報告されているが、末梢血管障害による虚血組織における硫化水素の役割は明らかではない。そこで我々は、硫化水素ドナーである DATS が虚血組織における血管新生に与える影響を検討した。

【対象および方法】

野生型マウス下肢虚血モデルを作成し、DATS もしくは生食の腹腔内投与を行い、血液や虚血組織における硫化水素及び硫化水素の貯蔵形態であるサルファ硫黄の濃度を測定した。またレーザードップラーによる虚血下肢の血流評価や、免疫染色による毛細血管密度 (CD31 陽性細胞) の測定を行った。抗酸化作用の評価のため虚血組織のジハイドロエチジウム (DHE) 染色や8 イソプロスタノール濃度の測定を行った。抗アポトーシス作用の評価のために虚血組織のタネル染色を行った。ウェスタンブロット法により Akt-eNOS シグナルの活性化を評価した。また、Akt や eNOS の阻害剤やノックアウトマウスを使用して、このシグナルの血管新生への関与を検討する実験を行った。eNOS の活性化に伴う一酸化窒素の変化を評価するため、その産物である硝酸塩・亜硝酸塩の虚血組織における濃度を測定した。続いて DATS の血管内皮細胞に対する影響を検討するため、人臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) を用いて前述と同様の検討を行った。

【結果】

DATS の投与により、血清中の硫化水素濃度には変化が見られなかったが、虚血組織中の硫化水素及びサルファ硫黄の増加が認められた (Figure1)。マウス下肢虚血モデルにおいて、DATS 投与群で有意な血流改善が認められた。また、虚血組織における CD31 の免疫染色では、DATS 投与群で毛細血管密度が増加していた (Figure2)。酸化ストレス評価のために行った DHE 染色では、虚血組織において陽性領域が見られていたが、DATS 投与群ではその縮小が見られた。また、虚血組織における 8 イソプロスタノール濃度が上昇していたが、DATS 投与により低下した。タネル染色では、虚血組織において陽性細胞が増加していたが、DATS 投与群ではその低下が見られた (Figure3)。ウェスタンブロットで Akt・eNOS のリン酸化を検討したところ、DATS 投与群で Akt・eNOS のリン酸化の亢進が認められた。DATS 投与群で一酸化窒素産物である硝酸塩・亜硝酸塩の虚血組織における濃度が上昇していた。そこで、Akt・eNOS シグナルの活性化が DATS による血管新生効果に重要であることを確認するため、Akt や eNOS の阻害実験を行っ

た。その結果、薬剤の使用や遺伝的に Akt・eNOS を阻害したマウスにおいては、DATS 投与で得られていた虚血下肢血流の改善効果は認められないことが確認された (Figure4)。HUVEC を用いた実験では、DATS+グルタチオンの投与により経時的に Akt や eNOS のリン酸化の亢進していることが明らかとなった。低酸素・低栄養条件下で培養した HUVEC では DHE 陽性細胞・タネル陽性細胞の増加が見られたが、DATS の添加によりこれらは低下した。しかし Akt や eNOS の阻害剤を培地に添加すると、DATS の添加で得られていた抗酸化効果や抗アポトーシス効果は消失していた (Figure5)。

【考察】

今回の実験において、以下のことが明らかとなった。

1. マウス下肢虚血モデルにおいて、DATS 投与は虚血による血管新生を促進する。
2. DATS は虚血組織の酸化ストレス障害やアポトーシスを抑制する。
3. Akt-eNOS シグナルは DATS の抗酸化作用や抗アポトーシス作用において重要な役割を担っている。

Akt-eNOS シグナルが血管新生促進に関与していることは以前から報告されている。今回、我々の研究において、DATS 投与により血管内皮細胞の酸化ストレスの低下とアポトーシス抑制、Akt・eNOS の活性化が見られた。Akt の阻害などによりこれらの効果は消失しており、DATS は Akt-eNOS シグナルを介して血管内皮細胞機能を改善していると考えられた。マウス下肢虚血モデルにおいても、DATS 投与により虚血組織中の Akt・eNOS 活性化が見られ、これらの阻害により DATS の血流改善効果は消失していた。以上より、DATS は Akt-eNOS シグナルを活性化し、虚血による酸化ストレスやアポトーシスを抑制し、その結果血管新生を促進すると考えられた。

eNOS 活性化による一酸化窒素の産生は末梢血管障害において保護的に作用することが報告されている。一酸化窒素と硫化水素はそれぞれ独立した機序でその効果を発揮しているが、硫化水素が eNOS の活性化を介して一酸化窒素を増加させたり、逆に一酸化窒素が生体内の硫化水素合成酵素であるシスタチオニン・ガンマ・リアーゼを増加させるという報告もあり、一酸化窒素と硫化水素には相互作用もあると思われる。今回の我々の実験結果からも DATS による血管内皮細胞機能の改善や血管新生促進に eNOS が影響を与えていると考えられ、DATS の血管保護作用においても一酸化窒素と硫化水素の相互作用が重要であると考えられる。

硫化水素が血管新生を促進するという報告はいくつかあるが、一方で DATS が血管新生を抑制して腫瘍の増大を抑制するという報告もある。この結果の食い違いは、DATS の投与量や投与方法の違いによる可能性がある。HUVEC において、DATS の添加が VEGF や Akt を阻害して細胞死を増加させるという報告がある。生体内において DATS は赤血球中のグルタチオンと反応して硫化水素を産生するが、細胞実験ではグルタチオンが存在しない、もしくはごく少量しか存在しないため硫化水素を産生できないと考えられた。我々が行った予備実験でも、DATS 単独の添加では HUVEC の障害が強く見られたが、DATS とグルタチオンを同時に添加すると Akt・eNOS が活性化し、酸化ストレス

やアポトーシスの抑制が見られ、細胞保護的に働くことが確認できた。つまり、高濃度の DATS そのものは細胞障害的に作用する可能性があるが、グルタチオンと反応して硫化水素を産生することで Akt-eNOS-NO 経路を活性化させ、細胞保護的に作用すると考えられた。

【結語】

今回我々の実験で、DATS は組織での硫化水素を増加させ、eNOS の活性化を通して虚血組織での血管新生反応を調節していることが明らかとなった。このような硫化水素を産生する薬剤を使用し、外因性の硫化水素を増加させることは心血管病の治療に有用である可能性が考えられる。