

生体内NO動態に及ぼすAngiotensin IIの影響： カテーテル型NOセンサーによる影響

今西 敏雄¹ 池島 英之¹ 黒井 章央¹ 後藤 真巳² 望月 精一²
吉田 清³ 赤阪 隆史¹

要 旨： Angiotensin I(Ang II)-infusion rabbit modelを用いて、大動脈血管内皮の一酸化窒素(NO) 産生能およびその産生能に影響を及ぼす因子について検討してみた。NO産生能はカテーテル型NO センサーを大腿動脈アプローチにより腹部大動脈に留置し、アセチルコリン(ACh)の投与に伴う NO変化率を測定した。その結果、ACh刺激による血管内皮からのNO分泌能はAng IIにより濃度依存性に低下し、また、その低下は、Ang IIタイプ1 受容体(AT1受容体)ブロッカー(ARB)により有意に改善した。一方、同等の降圧効果であってもhydralazineでは抑制できなかった。さらに、Ang IIによる血中NO濃度の低下は、活性酸素除去薬であるtempolにより有意に改善した。結論としてAng IIはAT1受容体を賦活化し、酸化ストレスを増強することにより、AChにより誘導される血管内皮由来のNOのbioavailabilityを阻害させた。(J Jpn Coll Angiol, 2007, 47: 397-402)

Key words: nitric oxide, angiotensin II, endothelial function

はじめに

一酸化窒素(nitric oxide: NO)は生体内においてさまざまな生理的・病態生理的作用を有する。NOは血管拡張作用のほか、血管平滑筋の増殖抑制作用、血小板凝集抑制作用なども報告されており、動脈硬化抑制因子として注目されている。しかし、生体におけるNOは、極めて短時間のうちに酸化・失活し、その作用は放出部近傍に限られ、計測が極めて困難であると考えられてきた。近年、カテーテル型NOセンサーが開発され、動物実験において大動脈内や冠静脈洞内における経時的なNOの変化を計測できる可能性が報告され、人体におけるNO動態がより詳細に解明される展望が開かれた¹⁻³⁾。本法は血管内皮NO産生能を内皮依存性血管拡張反応(flow-mediated dilation: FMD)などの間接的指標ではなく、NO変化率として直接計測することが可能である。

粥状動脈硬化やある種の高血圧症の病態では、angiotensin I(Ang II)濃度が上昇している。Ang IIが血管内皮弛緩反応を障害することはよく知られているが、この機序として膜結合型nicotinamide adenine dinucleotide phosphate(NADPH)oxidaseを介したスーパーオキシドの亢進が指摘されている⁴⁾。実際、Ang II誘導によるラット高血圧モデルにおいて、アセチルコリン(ACh)に対する血管拡張反応の障害は抗酸化剤により改善すると報告されている⁵⁾。これらの研究成果を踏まえて、現在、長期間のAng IIの投与による血管内皮機能不全の原因として、血管内皮内のスーパーオキシドの活性亢進が有力視されている^{6,7)}。しかしながら、これらの報告の問題点として、血管内皮由来のNO産生は血管弛緩反応を計測することにより、間接的に評価されることが挙げられる。さらに、Ang IIが血管平滑筋細胞に直接作用することにより、血管内皮依存性のNOの血管弛緩反応を修飾している可能性も否定できない。以上の点より、血中のNO濃度を直接測定することは、血管内皮機能の詳細な評価を可能にすると考えられる。

¹和歌山県立医科大学循環器内科

²川崎医療短期大学臨床工学科

³川崎医科大学循環器内科

2007年2月21日受付 2007年6月20日受理

今回、われわれはAng IIの慢性投与はNO bioavailabilityにどのように影響するかに関して、カテーテル型NOセンサーを用いて血中NO濃度を直接測定することにより検討した。

方 法

(1) カテーテル型NOセンサー

カテーテル型NOセンサーは4Frのカテーテルにはめ込まれており、シリコン固定されている。また、先端部分はゴム製の軟らかいtipが取り付けられ、センサー部分も弾力性があるため血管壁への障害を防ぐ構造になっている。また、2つの金属のワイヤは感知部分を並走する構造になっている。NOセンサーはNO濃度を電流に換算して求める。NOセンサーのキャリブレーションにはNO飽和溶液を用いた。このNO飽和溶液は蒸留水50mlに対して1, 3, および5 μ l注入すると、終濃度が各々38, 114, および190nMになるように調節されている。カテーテル型NOセンサーをスターで攪拌した蒸留水に浸し、引き続きNO飽和溶液を1, 3, および5 μ l順次投与した。今回の研究で使用したNOセンサーの感度は平均321 \pm 12 pAnmol-NO l-1と計測された。

(2) 動物実験

Ang II-infusion rabbit modelを用いる。36頭の雄New Zealand White Rabbitを用いて、以下の6群に振り分ける。すなわち、Vehicle群、Ang II(60ng/kg/min)投与群、Ang II(200ng/kg/min)投与群、Ang II(200ng/kg/min)+valsartan(Ang II type I receptor antagonist; 5mg/kg/day)投与群、Ang II(200ng/kg/min)+hydralazine(α -blocker; 10mg/kg/day)投与群、Ang II(200ng/kg/min)+tempol(a superoxide dismutase mimetic, Sigma Chemical社製; 10mmol/L)^{8,9}投与群の6群(各々6頭)である。Ang IIはosmotic minipump(Alzet model 2 ML2, Alza社製)を用い投与する。2週間後にウサギを麻酔下に血圧、心拍数、および大動脈血管内皮由来のNO産生能を評価する。

(3) 血中NO濃度の測定

血管内皮依存性のNOの測定はカテーテル型NOセンサーを下行大動脈に留置し、大動脈弓部より1あるいは4 μ g/kg/minのAChを投与し、その変化率を求めるこ

とで評価する。また血管内皮のNO産生を阻害する目的で、5 mg/kgのNG-methyl-L-arginine(L-NMMA, NO合成阻害剤)を10分間かけて投与し、その後引き続きAChを投与することにより、本システムのNO測定法の妥当性を検討する。カテーテル型NOの測定はNitric Oxide Measuring System(NM69-0058, ナカノマーカントイル社製)を用いる。

(4) 血中ニトロチロシン濃度の測定

NOはスーパーオキシドと反応すると強力な酸化剤であるperoxynitriteを産生する。このperoxynitriteは蛋白と反応し、ニトロチロシンを産生する。このニトロチロシンは安定代謝産物として*in vivo*におけるNO依存性の酸化ストレスの指標として用いられている。今回の研究において、Ang IIはニトロチロシン形成にどのように影響するかを検討した。血中ニトロチロシン濃度はNWLSSTM nitrotyrosine enzyme-linked immunoassay (ELISA) Kit(Northwest Life Science Specialties社製)を用いて測定した¹⁰⁾。

結 果

大動脈血管内皮由来NO濃度の評価

4 μ g/kg/minのACh投与は有意な血圧および心拍数の低下を惹起した(Table 1)。一方、L-NMMAにより前処置しておくこと、このACh誘導による血圧および心拍数の減弱作用は有意に軽減した。また、AChは濃度依存性にbase-to-peak値、すなわち、血中NO濃度を上昇させた。また、その効果はL-NMMAにより著明に抑制された(Fig. 1)。

Ang IIの大動脈血管内皮由来NO濃度および血中ニトロチロシン濃度に及ぼす作用Ang II 200群はコントロール群に比し、有意に平均血圧および心拍数を上昇させた(Table 2)。また、その効果はhydralazineあるいはvalsartanを同時に投与することにより有意に抑制された(Table 2)。

次にAChによるNO産生誘導能に及ぼす作用について検討した。Ang II 200群はコントロール群に比し、有意に血中NO濃度を低下させた。また、その効果はvalsartanあるいはtempolの同時投与により有意に抑制された(Fig. 2)。

L-NMMA投与によるBasal NO濃度の減少はコントロール群に比し、Ang II 200群で有意に低下した。すな

Table 1 Hemodynamic data in this study

	Mean blood pressure (mmHg)		Heart rate (bpm)	
	Pre-ACh	Post-ACh	Pre-ACh	Post-ACh
Vehicle(saline)	68.8 ± 1.5	69.5 ± 1.1	168 ± 2	169 ± 3
ACh(1 μ g/kg/min)	70.1 ± 1.8	66.5 ± 2.4	167 ± 3	155 ± 2
ACh(4 μ g/kg/min)	69.9 ± 2.1	52.4 ± 2.2*	168 ± 3	133 ± 2*
ACh(4 μ g/kg/min)+ L-NMMA	72.5 ± 2.1	62.1 ± 1.9	171 ± 3	153 ± 4

Data are the mean \pm SEM, *p < 0.05 vs pre-ACh

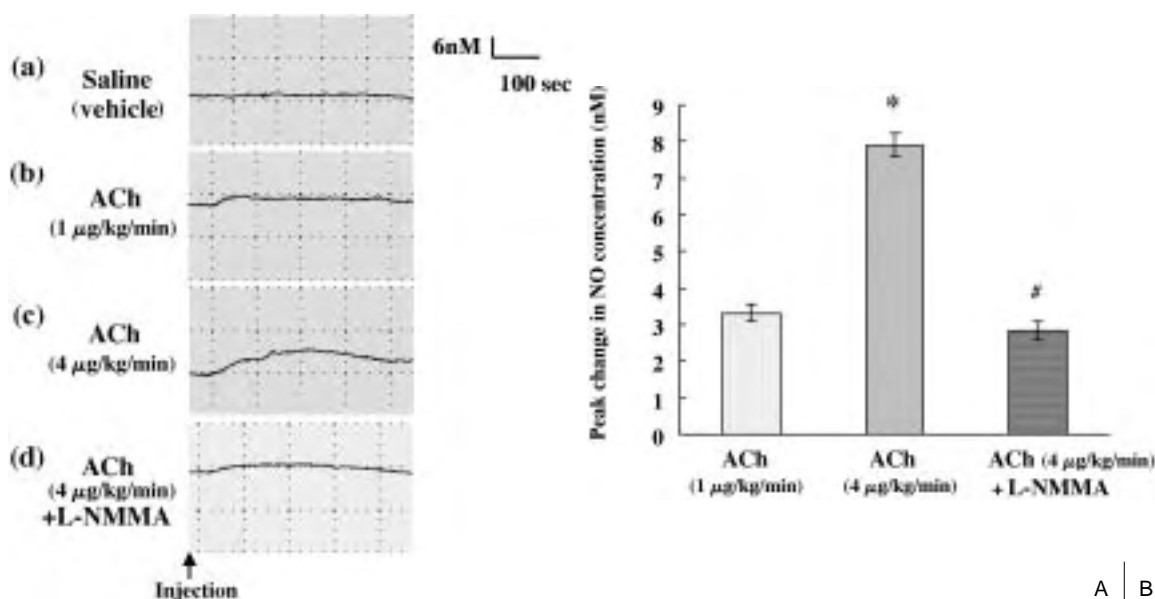


Figure 1 ACh-induced change in NO concentration and the effect of NOS inhibition.

A: Typical tracings of the plasma NO concentration in the abdominal aorta. Saline (vehicle) was injected at the arrow for 5 min (a). ACh at 1 (b) or 4 (c) μ g/kg/min was injected at the arrow for 5 min. ACh at 4 μ g/kg/min was injected at the arrow for 5 min after inhibition of NO synthesis by infusion of L-NMMA for 10 min (d). The injection of saline caused only a treatment fluctuation but no increase in NO concentration. In contrast, ACh increased NO concentration markedly in a dose-dependent manner. L-NMMA attenuated the increase of NO concentration by ACh.

B: Plasma NO concentration measured by the peak response was increased by ACh in a dose-dependent manner (1 and 4 μ g/kg/min). L-NMMA suppressed the increase of NO concentration by ACh significantly.

Data are the mean \pm SEM (n = 6), *p < 0.05 vs vehicle (control), #p < 0.05 vs ACh (4 μ g/kg/min)

わち, basal NOのbioavailabilityの低下を示唆した。このAng IIによる効果はvalsartanあるいはtempolの同時投与により有意に抑制された(Fig. 2)。

最後に, Ang IIおよび種々の薬剤の同時投与による血中peroxynitrite濃度に及ぼす効果をみた。Ang II 200群はコントロール群に比し, 血中peroxynitrite濃度の有意な上昇を認めた。一方, このAng IIによる効果は, valsartanあるいはtempolの同時投与により有意に抑制された(Fig. 3)。

考 察

今回の研究において, Ang IIは濃度依存性にNO bioavailabilityを低下させることを明らかにした。この原因として酸化ストレスの増加が関与していた。血管内皮から産生されるNOは血流中に拡散し, 血液構成物, 例えば赤血球や蛋白と反応する。この際, NOはオキシヘモグロビンと反応し急速に不活化されると想定されてきた。このため, NOの半減期は短く, その作用

Table 2 Final measures by group

	MAP (mmHg)	HR (bpm)	BW (kg)
Vehicle (control)	69.5 ± 1.1	169 ± 2	2.34 ± 0.06
Ang II 60	70.5 ± 1.2	171 ± 1	2.42 ± 0.03
Ang II 200	83.0 ± 2.7*	180 ± 2*	2.41 ± 0.04
Ang II 200 + hydralazine	71.7 ± 3.9#	169 ± 3#	2.33 ± 0.06
Ang II 200 + valsartan	70.5 ± 3.2#	171 ± 2#	2.31 ± 0.08
Ang II 200 + tempol	75.0 ± 2.9	176 ± 3	2.40 ± 0.06

Data are the mean ± SEM, *P<0.05 vs vehicle (control), #P<0.05 vs Ang II 200
MAP: mean aortic pressure, HR: heart rate, BW: body weight

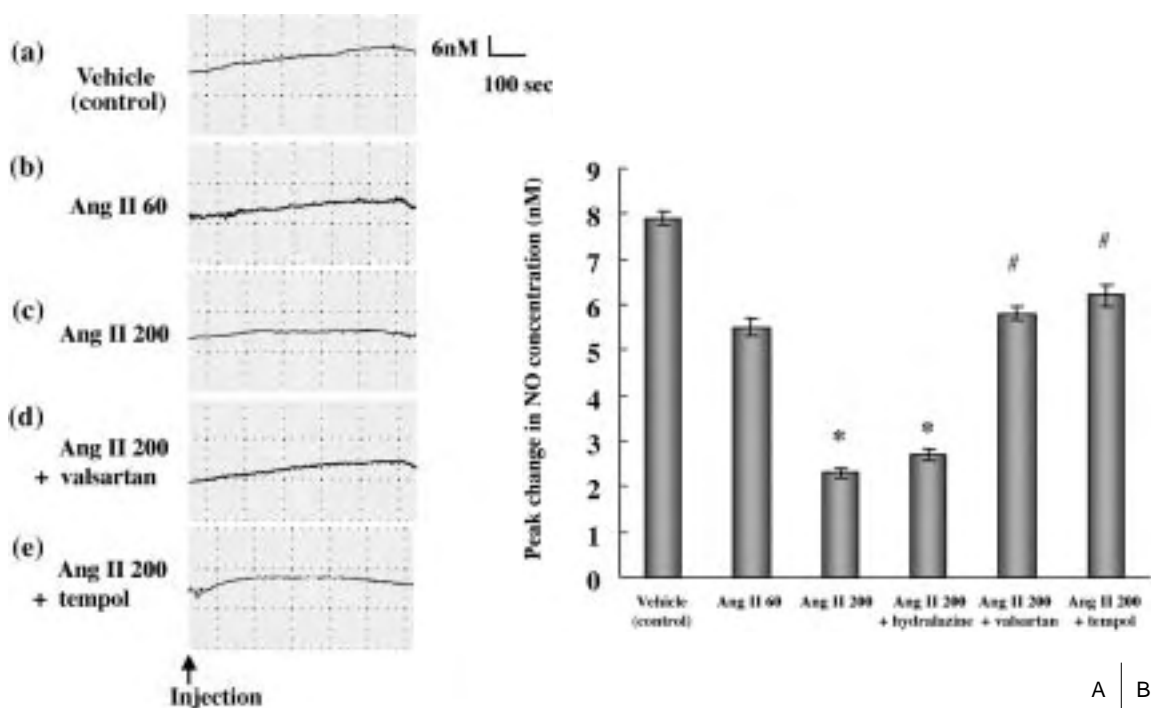


Figure 2 Effect of chronic treatment with Ang II on ACh-induced plasma NO concentration. A: Typical tracings of the plasma NO concentration induced by ACh in the aorta treated with vehicle (control; a), Ang II 60 (b), Ang II 200 (c), Ang II 200 + valsartan (d), and Ang II 200 + tempol (e) (n = 6 for each group). B: ACh-induced increases in the NO concentration measured by the peak response in aorta treated with vehicle (control), Ang II 60, Ang II 200, Ang II 200 + hydralazine, Ang II 200 + valsartan, and Ang II + tempol. The decrease of plasma NO concentration in Ang II 200 rabbits was significantly reversed by co-treatment of either valsartan or tempol but not hydralazine. Data are expressed as an absolute value. Bars represent mean ± SEM, *p < 0.05 vs control, #p < 0.05 vs Ang II 200

はNO産生部位に近接した領域に限定される可能性が高いと考えられてきた。しかしながら、Stamlerら¹¹⁾は、NOはS-nitrosohemoglobinとして血中に存在することを明らかにした。現在、NOはあたかも内分泌性物質のごとく、全身を循環すると考えられている。実際、基礎

的および臨床的研究においてNOは循環血液中において活性を有しており、産生部位から離れた血管系にも作用することが明らかにされている¹²⁾。

今回の研究において、長期間のAng IIの投与はNOセンサーにより計測される血中NO濃度を低下させること

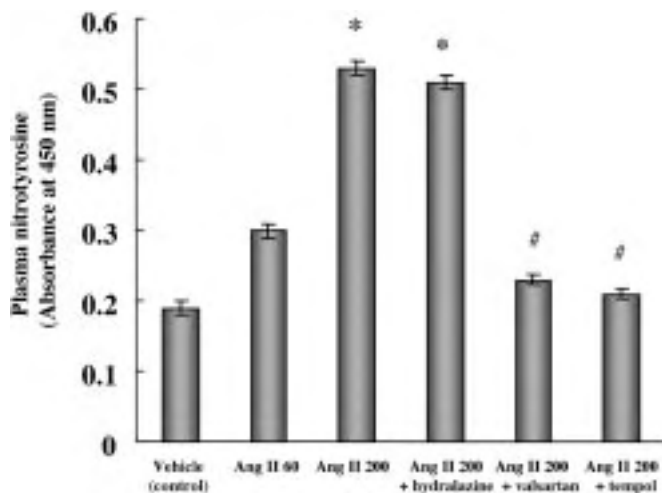


Figure 3 Chronic treatment with Ang II increases plasma peroxynitrite in Ang II-infusion rabbit model. The levels of plasma peroxynitrite treated with vehicle (control), Ang II 60, Ang II 200, Ang II 200 + hydralazine, Ang II 200 + valsartan, and Ang II + tempol were detected as described in the methods section. Data are expressed as the mean \pm SEM ($n = 6$), * $p < 0.05$ compared with the control group, # $p < 0.05$ compared with Ang II 200-treated group

を示した。この結果は以前の報告と一致する。すなわち、Mollnauら¹³はAng IIを長期間投与したラット大動脈の摘出血管のNO産生をelectron paramagnetic resonanceを用いて計測したところ、減弱していると報告している。彼らはこの機序として、NADPH oxidaseの活性により誘導されるスーパーオキシドがendothelial NO synthase(eNOS) uncouplingを惹起し、NO/cyclic guanosine monophosphate(cGMP)シグナル伝達系を障害し、血管内皮機能不全に至るという説を提唱している。実際、今回の研究において、抗酸化剤であるtempolはAChにより誘導されるNOの産生を有意に低下させた。

総 括

Ang IIは酸化ストレスを増強することにより、血管内皮から定常的に産生/放出されるNOおよびAChにより誘導されるNOの両者を阻害する。

ARBはAng IIの血管内皮への酸化ストレスを減弱し、血管内皮から定常的に産生/放出されるNOおよびAChにより誘導されるNOを保持する作用を有する。

追 記

本論文は内容の一部に、Hypertension, 2006, 48: 1058–1065³を含む。

文 献

- 1) Mochizuki S, Miyasaka T, Goto M et al: Measurement of acetylcholine-induced endothelium-derived nitric oxide in aorta using a newly developed catheter-type nitric oxide sensor. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 306: 505–508.
- 2) Neishi Y, Mochizuki S, Miyasaka T et al: Evaluation of bioavailability of nitric oxide in coronary circulation by direct measurement of plasma nitric oxide concentration. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102: 11456–11461.
- 3) Imanishi T, Kobayashi K, Kuroi A et al: Effects of angiotensin II on NO bioavailability evaluated using a catheter-type NO sensor. *Hypertension*, 2006, 48: 1058–1065.
- 4) Dinerman JL, Lowenstein CJ, Snyder SH: Molecular mechanisms of nitric oxide regulation. Potential relevance to cardiovascular disease. *Circ Res*, 1993, 73: 217–222.
- 5) Griending KK, Minieri CA, Ollerenshaw JD et al: Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res*, 1994, 74: 1141–1148.
- 6) Rajagopalan S, Kurz S, Münzel T et al: Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation. Contribution to alterations of vasomotor tone. *J Clin Invest*, 1996, 97: 1916–1923.
- 7) Pagano PJ, Clark JK, Cifuentes-Pagano ME et al: Localization of a constitutively active, phagocyte-like NADPH oxidase in rabbit aortic adventitia: enhancement by angiotensin II. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94: 14483–14488.

- 8) Matsui H, Shimosawa T, Itakura K et al: Adrenomedullin can protect against pulmonary vascular remodeling induced by hypoxia. *Circulation*, 2004, **109**: 2246–2251.
- 9) Ogihara T, Asano T, Ando K et al: Angiotensin II-induced insulin resistance is associated with enhanced insulin signaling. *Hypertension*, 2002, **40**: 872–879.
- 10) Ver Steege JC, Koster-Kamphuis L, van Straaten EA et al: Nitrotyrosine in plasma of celiac disease patients as detected by a new sandwich ELISA. *Free Radic Biol Med*, 1998, **25**: 953–963.
- 11) Stamler JS, Jia L, Eu JP et al: Blood flow regulation by S-nitrosohemoglobin in the physiological oxygen gradient. *Science*, 1997, **276**: 2034–2037.
- 12) Vallance P, Paton S, Bhagat K et al: Direct measurement of nitric oxide in human beings. *Lancet*, 1995, **346**: 153–154.
- 13) Mollnau H, Wendt M, Szöcs K et al: Effects of angiotensin II infusion on the expression and function of NAD(P)H oxidase and components of nitric oxide/cGMP signaling. *Circ Res*, 2002, **90**: E58–E65.

Nitric Oxide Bioavailability of Angiotensin II on Evaluated by a Catheter-Type Nitric Oxide Sensor

Toshio Imanishi,¹ Hideyuki Ikejima,¹ Akio Kuroi,¹ Masami Goto,² Seiichi Mochizuki,² Kiyoshi Yoshida,³ and Takashi Akasaka¹

¹Department of Cardiovascular Medicine, Wakayama Medical University, Wakayama, Japan

²Department of Medical Engineering, Kawasaki Medical School, Okayama, Japan

³Division of Cardiology, Kawasaki Medical School, Okayama, Japan

Key words: nitric oxide, angiotensin II, endothelial function

We investigated the chronic effects of Ang II bioavailability of NO on Ang II-infused rabbits using a catheter-type NO sensor. Male New Zealand rabbits were infused with vehicle (sham), Ang II at a rate of 200 ng/kg/min, either alone, in combination with hydralazine, Ang II type I receptor antagonist (valsartan), or an anti-oxidant (tempol) for 14 days. Plasma NO concentration was measured using the catheter-type NO sensor located in the aorta. We then infused saline (vehicle) and acetylcholine (ACh) into the aortic arch with or without pre-treatment with NG-methyl-L-arginine (L-NMMA). An increase in plasma NO levels in response to ACh was significantly attenuated in the Ang II group than in the control group. Plasma peroxynitrite concentrations in Ang II group were significantly higher than in the control group. The negative effects of Ang II, i.e., the decrease in ACh-induced NO production and the increase in oxidative stress were significantly suppressed by the co-treatment with either valsartan or tempol. Our study suggests that chronic treatment with Ang II improves the decreased NO bioavailability in the aorta.

(*J Jpn Coll Angiol*, 2007, **47**: 397–402)