

学位論文要旨

学位申請者氏名 菌田 邦博

論文題名

亜硝酸ナトリウムの経口補給による循環器・呼吸器疾患モデルに対する臓器保護効果

はじめに

生体内の一酸化窒素(NO)は、血管内皮細胞でL-アルギニンを介してNO合成酵素(NOS)により産生され、血管拡張作用、抗炎症作用などの生理作用を示す。しかし、老化や生活習慣病(高血圧、糖尿尿、脂質代謝異常など)により血管内皮障害が起こるとNOS由来のNO産生が低下する。このNOの低下は、循環器疾患、呼吸器疾患の発症に関連していることが知られている。一方、我々が日常的に野菜や果物から摂取している硝酸塩や亜硝酸塩から酵素・化学的にNOを産生する経路が発見され、新たなNO供給源としての役割が期待されている。しかし、食事由来の亜硝酸塩からのNO産生に関する生体内の主要因子や亜硝酸塩の経口摂取による疾患に対する有効性については明らかになっていなかった。

そこで、本研究では亜硝酸ナトリウムの生体内でのNO産生に関する主要因子を明らかにし、我が国の死因の上位に位置している循環器系疾患と呼吸器系疾患に対する亜硝酸ナトリウムの経口補給による臓器保護効果を明らかにすることを目的に研究を実施した。

(1) 亜硝酸ナトリウムの血圧降下作用と生体内でのNO産生に対する主要因子の同定

ニトログリセリン(NTG)からのNO産生に関するミトコンドリアアルデヒド脱水素酵素(ALDH2)と虚血下(低酸素条件下)で亜硝酸塩からのNO産生に関するキサンチン酸化酵素(XO)に焦点を当て、亜硝酸ナトリウムからのNO産生に対するALDH2とXOの関係について血圧降下作用を指標として検討した。NO合成阻害剤である*N*-omega-nitro-L-arginine methyl ester(L-NAME)を処置したNO不足高血圧モデルラットにALDH2阻害剤またはXO阻害剤を処置した後、亜硝酸ナトリウムを静脈内投与し、血圧と血中と組織の亜硝酸イオン濃度を測定した。XO阻害は、亜硝酸ナトリウムの血圧降下作用や亜硝酸ナトリウムの体内動態に影響を与えなかった。一方、ALDH2の阻害は亜硝酸ナトリウムによる血圧降下作用を減弱し、さらに血中および臓器中の亜硝酸イオンのクリアランスを遅延させた。

これらのことから、亜硝酸ナトリウムは生体内に入ると各種臓器に分布し、臓器中に発現しているALDH2を介してNOを産生することで血圧降下作用(生理作用)を示す可能性を見出した。

(2) 亜硝酸ナトリウムの補給による循環器疾患モデルに対する臓器保護作用

血管内皮障害などによる慢性的なNOの不足は、循環器疾患の発症に関係していること

が知られている。そこで、L-NAME 誘発性の NO 不足の高血圧モデルラットを作成し、日常的に摂取可能な量の亜硝酸ナトリウムの経口補給による臓器保護効果について検討した。

L-NAME をラットに 8 週間処置すると血圧の上昇から左心室や冠動脈の肥大や線維化を引き起こした。一方で、亜硝酸ナトリウムの補給は、血圧を低下させ左心室や冠動脈の肥大や線維化を改善した。さらに、L-NAME 処置によって増加した線維化誘導因子 (TGF- β) と線維化の指標である Collagen type 1 α 1 や Fibronectin の mRNA を抑制した。また、NO の不足は、レニン-アンジオテンシン系 (RAS) の活性化から臓器障害を起因することが報告されていることから RAS に対する亜硝酸ナトリウムの影響について検討した。L-NAME 処置により、血中のアンジオテンシン II (AT II) と心臓中のアンジオテンシン II 受容体 1 型 (AT1R) の mRNA およびタンパク質の発現量を増加させたが、亜硝酸ナトリウムの補給により抑制した。

以上の結果から、日常的に食事から摂取可能な量の亜硝酸ナトリウムを補給は NO 不足に伴って起こる RAS の活性化を抑制し、心臓リモデリングを改善することが示唆された。

(3) 亜硝酸ナトリウムの補給による呼吸器疾患モデルに対する臓器保護作用

近年、患者数が増加している慢性閉塞性肺疾患 (COPD) の主要な病変に肺気腫がある。肺気腫は、喫煙や大気汚染物質の吸引による肺の炎症が引き金となって発症する。一方で、亜硝酸塩は生体内で NO を介して抗炎症作用を示すことが報告されている。そこで本研究では、エラストラーゼ誘発性の肺気腫モデルマウスを作成し、亜硝酸ナトリウムの経口補給による臓器保護効果について検討を行った。肺気腫モデルマウスへの亜硝酸ナトリウムの経口補給は気腫性病変を改善し、肺胞中に存在する炎症系細胞のマクロファージの増加を抑制した。

以上の結果から、慢性的な亜硝酸ナトリウムの経口補給は肺の炎症を抑制することで肺気腫病変を抑制することが示唆された。

結論

亜硝酸ナトリウムは、生体内に吸収されると全身の臓器に分布し、臓器に発現している ALDH2 によって NO に変換され血圧降下作用を示すことが示唆された。また、NO 産生低下による心臓リモデリングに対して日常的に摂取可能な量の亜硝酸ナトリウムを補給することで病態を一部改善することを明らかにした。さらに、NO 産生低下が伴わない肺気腫に対しても抗炎症作用を介して病態悪化を抑制することを明らかにした。

本研究結果は、硝酸塩や亜硝酸塩を豊富に含む野菜や果実の積極的な摂取が循環器系疾患や呼吸器系疾患に対して臓器保護効果を示すことを示唆しており、循環器・呼吸器系疾患の予防や治療のための新たな食事療法の開発に役に立つ情報になるものと考えられる。

Abstract of dissertation

Degree applicant: Kunihiro Sonoda

Title: Protective effects of oral supplementation of sodium nitrite on animal models with cardiovascular and respiratory diseases

Introduction

Nitric oxide (NO) is produced in vivo by NO synthase (NOS) using L-arginine as a substrate. In vascular endothelial cells, NO generated by endothelial NOS (eNOS) exhibits physiological functions such as vasodilatory, anti-inflammatory, and anti-oxidative actions. However, endogenous NO production by eNOS is decreased due to vascular endothelial injuries following aging and lifestyle-related diseases (such as hypertension, diabetes mellitus, and dyslipidemia), that is closely related to the subsequent development of cardiovascular and chronic respiratory diseases. On the other hand, NO is also produced from diets via enterosalivary nitrate-nitrite-NO pathway, suggesting that dietary habit rich in vegetables and fruits is expected to serve as an alternative source of NO activity. However, the mechanism through which NO is generated from dietary nitrate and nitrite, and their factors responsible for NO activation have not been clarified in detail.

This study, therefore, aims to clarify the factors leading to in vivo NO production from nitrate and nitrite, and also to elucidate the organ-protective effects of dietary nitrate and nitrite on lifestyle-related diseases.

(1) Identification of the factors responsible for hypotensive effect of sodium nitrite and NO production in vivo

The relation of NO production from nitrite by mitochondrial aldehyde dehydrogenase 2 (ALDH2) and xanthine oxidase (XO) to its hypotensive effect was examined, focusing on NO production from nitroglycerin (NTG) by mitochondrial ALDH2 and NO production from nitrite by XO under hypoxic conditions. Rat treated with NO synthesis inhibitor, *N*-omega-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) (NO-deficient hypertensive rat model), are treated with ALDH2 inhibitor or XO inhibitor, followed by intravenous administration of sodium nitrite. The arterial blood pressures and the concentrations of nitrite in blood and tissues were measured. Inhibition of XO had no impact not only on hypotensive effect of sodium nitrite but also on pharmacokinetics of nitrite. On the other hand, inhibition of ALDH2 attenuated hypotensive effect of sodium nitrite and delayed the clearance of nitrite in blood and organ tissues.

Based on these results, we showed that nitrite are systemically distributed in organ tissues following the intraperitoneal injection of sodium nitrite, and catalyzed partially by ALDH2 to generate NO with the subsequent physiological effects (including hypotensive effect) on the organ tissues.

(2) Protective effects of oral supplementation of sodium nitrite on cardiovascular diseases

It is well known that cardiovascular diseases are caused by chronic NO deficiency. In this study, we used L-NAME-induced hypertensive rats, and examined protective effects of chronic supplementation of sodium nitrite available for daily intake. Treatment of rats with L-NAME for 8 weeks induced hypertension with hypertrophy and fibrosis of myocardial and coronary artery, which were consequently improved by oral supplementation of sodium nitrite with reduced protein level of TGF- β and transcriptional levels of collagen type 1 α 1 and fibronectin. We further examined the effect of sodium nitrite on renin-angiotensin system (RAS) which is known to be activated by NO deficiency. L-NAME increased plasma levels of angiotensin II and protein and transcriptional levels of angiotensin II receptor type 1 in cardiac tissues, and they were inhibited by oral supplementation of sodium nitrite.

These results indicate that dietary nitrite available for daily intake may suppress RAS activation and subsequent cardiac remodeling caused by NO deficiency.

(3) Protective effects of oral supplementation of sodium nitrite on elastase-induced emphysema

Emphysema is a major lesion of chronic obstructive pulmonary disease (COPD). Emphysema is induced by pulmonary inflammation caused by smoking and inhalation of air pollutants. Recent research works have reported that nitrite exhibits an anti-inflammatory action via NO-mediated mechanism. We prepared mouse model with elastase-induced emphysema and examined the protective effect of oral supplementation of sodium nitrite on this lesion. Dietary sodium nitrite histologically improved emphysematous lesions and suppressed the accumulation of inflammatory macrophages in the alveoli.

These results suggest that chronic oral supplementation of sodium nitrite suppresses inflammatory cell accumulation in alveoli and subsequent development of emphysematous lesion in the lung.

Conclusion

The present study showed that nitrite were distributed in a wide variety of peripheral tissues after systemic circulation, and enzymatically converted to NO partially by ALDH2 present in the tissues, and exerting physiological actions on the various organs such as vascular beds. In addition, we showed that oral supplementation of sodium nitrite in an amount that can be taken on a daily basis partially improves the cardiac remodeling caused by NO deficiency and also suppresses pulmonary emphysema through anti-inflammatory action of NO.

This study suggests that daily consumption of vegetables and fruits rich in nitrate and nitrite may have protective effects against cardiovascular and chronic respiratory diseases, and provides useful information for developing and designing diets to prevent and treat lifestyle-related diseases.

論文審査の結果の要旨

生体内の一酸化窒素 (NO) は、血管内皮細胞で L-アルギニンを介して NO 合成酵素 (NOS) により産生され、血管拡張作用、抗炎症作用などの生理作用を示す。しかし、老化や生活習慣病 (高血圧、糖尿病、脂質代謝異常など) により血管内皮障害が起こると NOS 由来の NO 産生が低下する。この NO の低下は、循環器疾患、呼吸器疾患の発症に関連していることが知られている。一方、我々が日常的に野菜や果物から摂取している硝酸塩や亜硝酸塩から酵素・化学的に NO を産生する経路が発見され、新たな NO 供給源としての役割が期待されている。しかし、食事由来の亜硝酸ナトリウムからの NO 産生に関する主要因子や循環器・呼吸器疾患に対する有効性などは明らかにはなっていなかった。そこで、菌田邦博氏は、亜硝酸塩の経口摂取の生体への影響について、*in vivo*における亜硝酸ナトリウムの血圧降下作用と NO 産生に対する主要因子ならびに機序について同定するとともに、食事からの亜硝酸ナトリウムの補給による循環器疾患および呼吸器疾患に対する臓器保護効果、すなわち NO 不足により起因される心臓リモデリングと肺の炎症によって引き起こされる肺気腫に対する亜硝酸ナトリウムの経口補給の有効性を明らかにすることを目的に詳細な実験研究を実施した。

本論文は、三つの章により構成されている。以下に各章の概要を示す。

第一章では、亜硝酸ナトリウムの血圧降下作用と生体内での NO 産生機序について明らかにするために、様々な疾患を惹起することが知られている血管内皮障害を想定して、内因性 NO 合成阻害剤の N-omega-L-arginin methyl ester (L-NAME) を処置した内因性 NO 不足による高血圧モデルラットを用い亜硝酸ナトリウムの血圧降下作用について検討した。その結果、亜硝酸ナトリウムを経口または静脈内投与すると用量依存的な血圧降下作用を示した。正常酸素環境下における亜硝酸ナトリウムからの NO 産生は、NO 供与体として用いられているニトログリセリンと同様、主要臓器中に発現しているミトコンドリアアルデヒド脱水素酵素 (ALDH2) によるものであることを明らかにした。一方、ALDH2 の阻害は亜硝酸ナトリウムによる血圧降下作用を減弱し、さらに血中および臓器中の亜硝酸イオンのクリアランスを遅延させた。これらのことから、亜硝酸ナトリウムは生体内に入ると各種臓器に分布し、臓器中に発現している ALDH2 を介して NO を産生することで血圧降下作用を示すことが示された。

第二章では、血管内皮障害などによる慢性的な NO の不足は、循環器疾患の発症に関係することが知られていることから、L-NAME 処置による内因性 NO 不足に伴う高血圧性の心疾患モデルラットに日常的に摂取可能な濃度の亜硝酸ナトリウムを持続的に投与し、摂取された亜硝酸ナトリウムによる臓器保護作用について検討した。その結果、L-NAME の処置は、血圧の上昇と心臓リモデリング (心臓や冠動脈の肥大や線維化など) を誘発した。一方で、亜硝酸ナトリウムの補給は、血圧を低下させ心臓リモデリングを改善した。さらに、L-NAME 処置によって増加した線維化誘導因子 (TGF- β) と線維化の指標である Collagen type 1 α 1 や Fibronectin の mRNA を抑制した。また、NO の不足は、レニン-アンジオテンシン系 (RAS) の活性化から臓器障害を引き起こすことが報告されていることに着目し、RAS に対する亜硝酸ナトリウムの影響について検討した。L-NAME 処置により、血中のアンジオテンシン II (AT II) と心臓中のアンジオテンシン II 受容体 1 型 (AT1R) の mRNA ならびにタンパク質の発現量を増加させたが、亜硝酸ナトリウムの補給により抑制された。そのメカニズムに血漿の AT II 濃度の上昇や心臓に発現する AT1R の発現増加が関与していることが分かった。以上により、日常的に食事から摂取可

能な量の亜硝酸ナトリウムを経口補給させることで NO の不足で起こった RAS の活性化を抑制し、心臓リモデリング改善効果を明らかにした。第一章ならびに第二章により、NO が不足した条件下における亜硝酸ナトリウム補給の有効性が明らかにされた。

第三章では、食事療法が確立されていない呼吸器疾患を対象に NO の不足を伴わない病態に対する亜硝酸ナトリウム補給の影響を検討した。エラストーゼを肺に噴霧した肺気腫モデル動物を作成し、亜硝酸ナトリウムを経口補給した結果、亜硝酸ナトリウムの補給は、肺気腫による肺胞実質における F4/80 陽性マクロファージの著しい増加を用量依存的に抑制した。このことから、亜硝酸ナトリウムの経口補給は肺気腫の初期段階で起こる炎症に対して抗炎症作用を介して病態の悪化を抑制することが示され、持続的な亜硝酸ナトリウムの経口補給は肺の炎症を抑制することで肺気腫の病変進行を抑制することを明らかにした。

以上本論文によって、食物の摂取によって持続的に補給される亜硝酸ナトリウムは生体内に吸収された後、全身に分布して各臓器に存在する ALDH2 により NO に変換され、内因性の NO 産生低下によって起こる血圧上昇および RAS の活性化を抑制することで心臓リモデリングを改善し、炎症を伴う肺気腫に対しては抗炎症作用を介して病態の進行を抑制することが示唆された。これまで、食物から摂取される亜硝酸塩については、食品衛生的な見地より、*in vitro* におけるニトロソアミンなどの発がん性物質の生成の観点から摂取に注意を要するものとして扱われる傾向にあった。本論文により持続的な摂取がむしろ NO を介する血圧降下作用、心臓リモデリング改善効果などの循環器系疾患に対する予防・改善効果や呼吸器系疾患の抑制に深く関わっていることが明らかとなり、野菜等の食品に含まれる亜硝酸塩の摂取有効性ならびに機能性が示されたことは特筆に値するものである。以上のことから、本論文は、本研究科課程によらない博士（薬科学）論文に十分値するものと評価した。