

## NO 合成酵素完全欠損マウスの開発

筒井正人, <sup>\*,a</sup> 下川宏明, <sup>b</sup> 守下 敢, <sup>c</sup> 中田 靖, <sup>c</sup>  
佐羽内 研, <sup>a</sup> 中島康秀, <sup>c</sup> 柳原延章<sup>a</sup>

Development of Genetically Engineered Mice Lacking  
All Three Nitric Oxide Synthase Isoforms

Masato TSUTSUI, <sup>\*,a</sup> Hiroaki SHIMOKAWA, <sup>b</sup> Tsuyoshi MORISHITA, <sup>c</sup> Sei NAKATA, <sup>c</sup>  
Ken SABANAI, <sup>a</sup> Yasuhide NAKASHIMA, <sup>c</sup> and Nobuyuki YANAGIHARA<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Department of Pharmacology, School of Medicine, University of Occupational and Environmental Health, 1-1 Iseigaoka, Yahatanishi-ku, Kitakyushu 807-8555, Japan, <sup>b</sup>Department of Cardiovascular Medicine, Tohoku University Graduate School of Medicine, 1-1 Seiryomachi, Aoba-ku, Sendai 980-8574, Japan, and <sup>c</sup>Second Department of Internal Medicine, School of Medicine, University of Occupational and Environmental Health, 1-1 Iseigaoka, Yahatanishi-ku, Kitakyushu 807-8555, Japan

(Received May 21, 2007)

The nitric oxide (NO) synthases (NOSs) system consists of three different isoforms, including neuronal (nNOS), inducible (iNOS), and endothelial NOSs (eNOS). The roles of NO *in vivo* have been extensively investigated in pharmacological studies with NOS inhibitors and in studies with mice lacking each NOS isoform. However, in the pharmacological studies, the specificity of NOS inhibitors continues to be an issue of debate, while in the studies with mice lacking each NOS isoform, compensatory mechanism by other NOSs appears to be involved. Thus, the ultimate roles of endogenous NO in our body still remain to be fully elucidated. To address this important issue, we have successfully developed mice in which all three NOS genes are completely disrupted. NOS expression and activities were totally absent in the triply n/i/eNOS<sup>-/-</sup> mice before and after treatment with lipopolysaccharide. While the triply n/i/eNOS<sup>-/-</sup> mice were viable, their survival and fertility rates were markedly reduced as compared with wild-type mice. The first noticeable phenotypes were polyuria, polydipsia, and renal unresponsiveness to vasopressin, characteristics consistent with nephrogenic diabetes insipidus. We subsequently observed that in those mice, arteriosclerosis is spontaneously developed with a clustering of cardiovascular risk factors. These results provide the first evidence that genetic disruption of all three NOSs causes a variety of cardiovascular diseases in mice *in vivo*, demonstrating the critical role of the endogenous NOSs system in maintaining cardiovascular homeostasis.

**Key words**—nitric oxide synthase; knockout mouse; cardiovascular disease; nephrogenic diabetes insipidus; metabolic syndrome

## 1. はじめに

一酸化窒素 (NO) は、生体の恒常性の維持に重要な役割を果たしている。<sup>1-6)</sup> NO は、L-アルギニンが L-シトルリンに変換される過程で、NO 合成酵素 (NOS) を触媒として生成される。NO はガス状

フリーラジカルであり、細胞膜を自由に通過して、受容体を介さずに直接、あるいは可溶性グアニル酸シクラーゼ/cGMP 経路を介して、多彩な作用を発揮する。NOS には、神経型 (nNOS, NOS1)、誘導型 (iNOS, NOS2)、及び内皮型 (eNOS, NOS3) の 3 種類の異なったアイソフォームが存在する。<sup>1-6)</sup> nNOS や eNOS はそれぞれ神経系や血管系に恒常的に発現し、静止状態及び刺激状態の両方で、カルシウム依存性に少量の NO を産生する。一方、iNOS は細菌性エンドトキシンや炎症性サイトカインの刺激によって発現が誘導され、カルシウム非依存性に大量の NO を産生する。<sup>1-6)</sup>

<sup>a</sup>産業医科大学医学部薬理学 (〒807-8555 北九州市八幡西区医生ヶ丘 1-1), <sup>b</sup>東北大学大学院医学系研究科循環器病態学 (〒980-8574 仙台市青葉区星陵町 1-1), <sup>c</sup>産業医科大学医学部第二内科学 (〒807-8555 北九州市八幡西区医生ヶ丘 1-1)

\*e-mail: mt2498@med.uoeh-u.ac.jp

本総説は、日本薬学会第 127 年会シンポジウム S19 で発表したものを中心に記述したものである。

遺伝子改変動物は、生体内における標的遺伝子の機能を研究するための、極めて有用な実験ツールである。これまでに、NOS 遺伝子を単独にあるいは二重に欠損させた動物が作製されている。<sup>7-17)</sup> nNOS 欠損マウスは、胃幽門部括約筋の肥厚や、<sup>9)</sup> 異常な攻撃行動、<sup>13)</sup> あるいは脳虚血に対する抵抗性を呈する。<sup>18)</sup> eNOS 欠損マウスは高血圧で、<sup>10)</sup> 脳虚血に弱く、<sup>19)</sup> また血管傷害に対する血管病変形成が増悪する。<sup>20)</sup> iNOS 欠損マウスの主要な表現型は、病原体による感染の増悪や、細菌性リポ多糖類 (LPS) による低血圧に対する抵抗性である。<sup>17)</sup> また、ダブル n/eNOSs 欠損マウスでは、脳海馬における長期増強 (LTP) の障害が認められる。<sup>15)</sup> このように、生体内における各 NOS アイソフォームの個々の役割は、これまでに広く研究されてきた。しかし、各 NOS 間には代償機構が働くために、<sup>15)</sup> NOS システム全体に由来する NO の究極の役割については、いまだ十分に解明されていない。

この点を検討するために、われわれは、3つの NOSs がすべて欠失した NOS 完全欠損マウス (トリプル n/i/eNOSs 欠損マウス) を開発した (Fig. 1(A)).<sup>21)</sup> 本総説では、前半に、トリプル NOSs 欠損マウスの開発に至ったわれわれのこれまでの研究の背景について簡単に紹介し、後半に、このマウスの創出と初期の機能解析について概説する。

## 2. われわれの過去の NO 研究

われわれは、最初に、血管内皮における NO 産生の分子機構について検討した。内皮 NO 産生の機序には、Gi 蛋白質を介する経路と Gq 蛋白質を介する経路の少なくとも2つのシグナル伝達路が存在する。われわれは、内皮機能不全には内皮 Gi 蛋白質の発現低下が関与することをヒトで初めて報告した。<sup>22,23)</sup>

次に、われわれは、イヌ脳動脈の NO 産生における内皮 tetrahydrobiopterin 濃度増加の作用について検討した。本研究において、われわれは、tetrahydrobiopterin が、自己酸化反応により superoxide を産生し NO 産生を低下させる作用と、eNOS の補酵素として NO 産生を増加させる作用の二面性があることを見出した。<sup>24,25)</sup> これらの結果より、細胞内 tetrahydrobiopterin 濃度と抗酸化酵素活性のバランスが、内皮 NO 産生における重要な規定因子であることが示唆された。<sup>24,25)</sup>

3 番目として、われわれは、脳血管における *ex vivo* 及び *in vivo* eNOS 遺伝子治療の有用性について検討した。われわれは、recombinant eNOS 遺伝子を血管外膜に強制発現させると、内皮を剥離した血管において内皮非依存性、外膜依存性弛緩反応が引き起こされることを報告した。<sup>26-29)</sup> これらの知見は、eNOS 遺伝子導入により外膜が血管トーンスの調節に役割を果たすようになるという血管生物学の新しい概念を提唱した。<sup>26-29)</sup> さらに、外膜への eNOS 遺伝子導入は、脳血管病に対する新しい治療戦略になり得る可能性が示唆された。

4 番目に、われわれは、L-アルギニンアナログの NO 非依存性血管作用について検討した。合成 L-アルギニンアナログ (L-NAME, L-NNA) あるいは内因性 L-アルギニンアナログ (ADMA, L-NMMA) を動物に長期に経口投与すると、血管病変が形成される。この機序には、内皮 NO 産生阻害の機序が関与すると、これまで盲目的に信じられてきた。しかし、われわれは、L-アルギニンアナログの長期投与が野生型マウスと eNOS 欠損マウスに同程度の血管病変を惹起することを見出し、L-アルギニンアナログの NO 非依存性血管作用を報告した。<sup>30,31)</sup> この機序には、レニン・アンジオテンシン系の活性化と酸化ストレスの増大が関与していた。<sup>30,31)</sup>

5 番目に、われわれは、nNOS の血管保護作用について検討した。動脈硬化における eNOS や iNOS の役割は広く知られているが、nNOS の役割は不明であった。われわれは、この点を nNOS 欠損マウスや種々の動脈硬化モデルを用いて検討し、nNOS が動脈硬化病変形成や血管トーンスの亢進に対して抑制的に作用することを初めて明らかにした。<sup>32,33)</sup> われわれは、さらに、神経系では恒常的に発現する nNOS が血管系では誘導型 NOS として振る舞っていることを見出した。<sup>32-34)</sup>



筒井正人

産業医大薬理学准教授。1988年産業医大卒業、産業医大第二内科(循環器内科)入局。その後、麻生飯塚病院循環器内科医員、米国メイヨークリニック(Katusic 研) 研究員、門司労災病院循環器内科副部長、産業医大第二内科 学内講師を経て、2001年より現職に至る。専門分野は、NO 研究、血管生物学、循環器病学、遺伝子治療学。

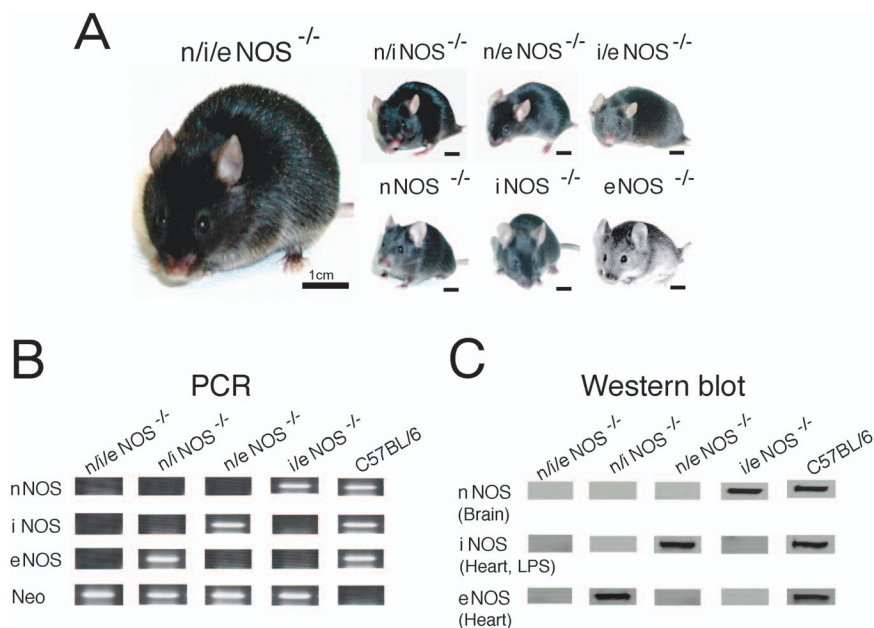


Fig. 1. Appearance (A), PCR Analysis (B), and Western Blot Analysis (C) of Wild-Type and NOS<sup>-/-</sup> Mice

(A) We first produced 3 kinds of doubly NOS<sup>-/-</sup> mice by crossbreeding singly NOS<sup>-/-</sup> mice. The doubly NOS<sup>-/-</sup> mice were then crossed, and triply n/i/eNOS<sup>-/-</sup> mice were finally generated. (B) PCR analysis in tail genomic DNA indicated the presence of all three NOS genes in the wild-type C57BL/6 mice, but the absence of the genes in the triply n/i/eNOS<sup>-/-</sup> mice. (C) Western blot analysis also revealed the absence of all three NOS proteins in the brain and the heart of triply n/i/eNOS<sup>-/-</sup> mice before and after treatment with lipopolysaccharide (LPS, 20 mg/kg IP, 12 hrs).

これらの一連の研究において、われわれは3つのNOSsがすべて、抗動脈硬化機構において重要な役割を果たしていることを明らかにすることができた。しかし、各NOS間には代償機構が働くために、NO/NOSsシステム全体の役割については依然不明な点が多い。この点を検討するために、われわれは、次の展開として、3つのNOSsがすべて欠失したNOSs完全欠損マウスを開発することを着想した。

### 3. NOS完全欠損マウスの樹立

われわれは、最初に、3種類のシングルNOS欠損マウスを交配させて、3種類のダブルNOSs欠損マウスを作製した。次に、ダブルNOSs欠損マウスをさらに交互に交配させて、トリプルn/i/eNOSs欠損マウス(NOSs完全欠損マウス)を創出した(Fig. 1(A)).<sup>21)</sup>

NOは多くの生命現象に深く関与している。<sup>1-6)</sup>したがって、このプロジェクトの開始時には、トリプルNOSs欠損マウスが胎生致死であることも予想したが、幸運にもそうではなかった。トリプルNOSs欠損マウスの外見は野生型マウスと同様で(Fig. 1(A))、正常に発育し、体重も正常に増加し、繁殖も可能であった。PCR、ウエスタンブロー

ット解析、及びL-シトルリンアッセイで評価したこのマウスのNOS発現及び全NOS活性は、すべて完全に欠如していた(Fig. 1(B), (C)とFig. 2)。過去に、nNOSとiNOSにはsplice variantsの存在が報告されているが、残存するNOSの発現や機能はLPS投与前後で全く認めなかった(Fig. 1(B), (C)とFig. 2)。以上の結果より、NOS完全欠損マウスの樹立を確認した。

次に、われわれは、トリプルNOSs欠損マウスの全身のNO産生が、完全に欠落しているか否かを、全身のNO産生の指標である血漿中NOx濃度及び尿中NOx排泄量を測定することにより検討した。トリプルNOSs欠損マウスにおける血漿中NOx濃度及び尿中NOx排泄量は、ともに野生型マウスの約3%と極めて低値であった。なお、NOレベルが完全にゼロでないのは、NOS非依存性NO産生機構が関与していることによると考えられた。<sup>35)</sup>事実、細菌(特に腸内細菌)は硝酸代謝を介してNOxを産生し、次にミオグロビンは通常と全く逆の経路でNOxからNOを産生することが報告されている。<sup>36)</sup>加えて、カタラーゼがhydroxylamineやsodium azideからNOを産生することも報告されている。<sup>37)</sup>

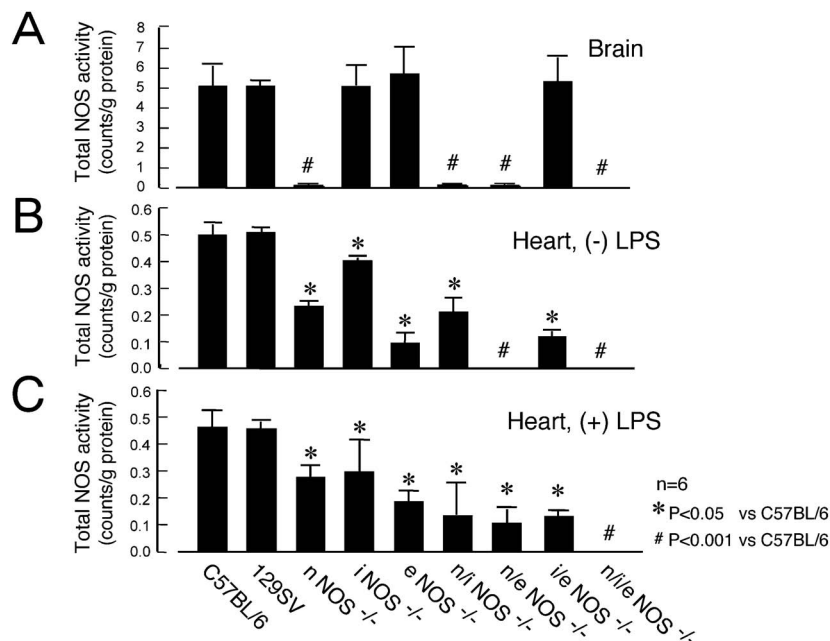


Fig. 2. Total NOS Activity in the Brain and the Heart of Wild-Type and NOS<sup>-/-</sup> Mice

(A) In the normal brain, total NOS activity was markedly reduced in nNOS<sup>-/-</sup> mice as compared with the wild-type mice, and it was completely absent in the triply n/i/eNOS<sup>-/-</sup> mice. (B) In the normal heart, total NOS activity was significantly reduced in nNOS<sup>-/-</sup>, iNOS<sup>-/-</sup>, and eNOS<sup>-/-</sup> mice, and it was also completely deficient in the triply n/i/eNOS<sup>-/-</sup> mice. (C) In addition, in the heart treated with lipopolysaccharide, total NOS activity was again undetected in the triply n/i/eNOS<sup>-/-</sup> mice.

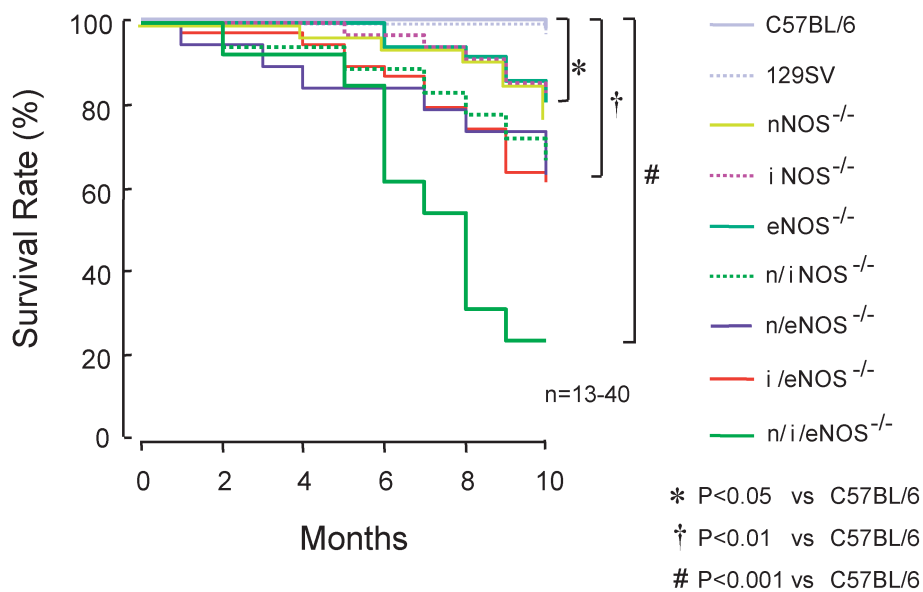


Fig. 3. Survival Rate in Both Genders of Wild-Type and NOS<sup>-/-</sup> Mice

During the 10 months of follow-up, all the wild-type mice lived, whereas approximately 80% of the triply n/i/eNOS<sup>-/-</sup> mice died. Survival rate was significantly worse in proportion to the number of disrupted NOS isoforms in the order of singly, doubly, and triply NOS<sup>-/-</sup> mice.

#### 4. トリプル NOSs 欠損マウスにおける生存率と出生率

合計 9 種類のマウス (2 種類の野生型マウス, 3 種類のシングル NOS 欠損マウス, 3 種類のダブル NOSs 欠損マウス, 及びトリプル NOSs 欠損マウス)

において, 生存率と出生率を検討した. 10 カ月間の観察期間中, 野生型マウスはすべて生存したが (生存率 100%), トリプル NOSs 欠損マウスは 13 匹中 3 匹しか生存し得なかった (生存率 23%) (Fig. 3).<sup>21)</sup> 生存率は, ノックアウトされた NOS ア

イソフォームの数に比例してシングル、ダブル、トリプルの順で段階的に低下していた (Fig. 3)。また、出生率も、生存率と同様に、ノックアウトされた NOS アイソフォームの数に比例して段階的に低下していた。<sup>21)</sup> これらの結果より、NOSs システムが生命の維持や出生において必須の役割を果たしていることが示唆された。

### 5. トリプル NOSs 欠損マウスにおける自然発症心筋梗塞

われわれは、次に、トリプル NOSs 欠損マウスの死因について検討した。病理学的解析では、興味深いことに、死亡したマウスの実に半数以上が自然発症の心筋梗塞で死亡していると判断された。冠動脈には、高度の内膜肥厚、中膜肥厚、及び外膜線維化が認められた。また、これらのマウスには、外膜における肥満細胞の浸潤も観察された。<sup>21)</sup> 肥満細胞から遊離されるヒスタミンは動脈硬化冠動脈においてスパズムを誘発することが報告されていることから、トリプル NOSs 欠損マウスの死因の少なくとも一部には、冠スパズムによる心筋虚血が関与することが推察された。<sup>21)</sup>

過去に自然発症の心筋梗塞を引き起こすマウスモデルとして高比重リポ蛋白質受容体と apolipoprotein E のダブル欠損マウスが報告されている。<sup>38)</sup> し

かし、このマウスは生後 2 ヶ月以内にすべてのマウスが死亡してしまい、実験に広く使用するのは困難である。<sup>38)</sup> われわれのトリプル NOSs 欠損マウスは、実験に有用な世界初の自然発症心筋梗塞マウスモデルであると考えられた。

### 6. トリプル NOSs 欠損マウスにおける腎性尿崩症

トリプル NOSs 欠損マウスの樹立には成功したものの、生存率と出生率の著明な低下を認め、このマウスが非常に貴重であったので、当初はマウスを屠殺せずに非侵襲的解析を行った。注意深い観察により、このマウスが多尿を呈することに気付いたので、われわれは次に生体内の水バランスについて検討した。2~3 ヶ月齢のトリプル NOSs 欠損マウスは、野生型マウスに比して、多尿、多飲、脱水の所見を認めた (Fig. 4)。<sup>21)</sup> 多尿においては、浸透圧利尿と水利尿の鑑別が必要である。トリプル NOSs 欠損マウスの尿は、低浸透圧、低イオンで、尿糖を認めなかったことから、ナトリウム利尿や糖尿病による浸透圧利尿は除外された。<sup>21)</sup> 水利尿は、中枢性尿崩症、腎性尿崩症や心因性多飲によって生じる。トリプル NOSs 欠損マウスには脱水の所見がみられたので、心因性多飲は除外できた。次にわれわれは、中枢性尿崩症と腎性尿崩症を鑑別するために、

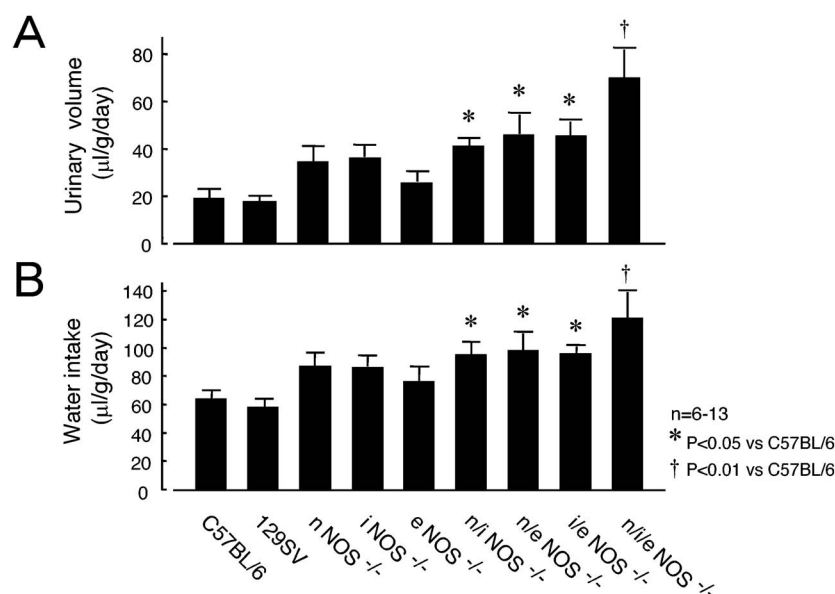


Fig. 4. Urinary Volume (A) and Water Intake (B) in Wild-Type and NOS<sup>-/-</sup> Mice

(A) Urinary volume was significantly increased in accordance with the number of disrupted NOS genes in the order of singly, doubly, and triply NOS<sup>-/-</sup> mice, and the triply n/i/e NOS<sup>-/-</sup> mice exhibited approximately 3-fold increase in urinary volume as compared with the wild-type mice. (B) Water intake was also significantly enhanced in the order of singly, doubly, and triply NOS<sup>-/-</sup> mice.

中枢におけるバソプレッシン（抗利尿ホルモン）分泌量及び腎臓におけるバソプレッシン感受性を検討した。トリプル NOSs 欠損マウスにおいて、外因性バソプレッシンに対する腎臓の抗利尿反応は著明に減弱していたが、中枢のバソプレッシン分泌量は正常であった。以上より、このマウスの尿崩症は腎性であることが同定できた (Fig. 5).<sup>21)</sup> 腎性尿崩症は、先天性（遺伝性）と後天性の2つのカテゴリーに分類される。後天性腎性尿崩症は、高カルシウム血症や低カリウム血症などの電解質異常や、腎不全によって引き起こされる。トリプル NOSs 欠損マウスにおいて、血漿カルシウム濃度や血漿カリウム濃度は正常であったが、腎臓には尿細管のアポトーシス、糸球体硬化や糸球体内血栓が認められた。<sup>21)</sup> したがって、これらの腎臓の構造変化が、このマウスにおける腎性尿崩症の発現に関与していることが示唆された。

通常、腎糸球体内血栓による虚血性尿細管ダメージは、遠位尿細管や集合管よりも近位尿細管において高度である。しかし、トリプル NOSs 欠損マウスにおける尿細管病変は、近位尿細管よりもむしろ遠位尿細管や集合管において高度に認められた。<sup>21)</sup> したがって、尿細管病変は糸球体血栓によって生じているのではないことが考えられた。

生理的状态において、バソプレッシンは、腎臓集合管主細胞の V2 受容体に結合し、アデニル酸シクラーゼを刺激し、cAMP を増加させて、cAMP 依存性蛋白質リン酸化酵素を活性化させる。このリン酸化酵素は、水チャネルアクアポリン-2 をリン酸化し、アクアポリン-2 の細胞質小胞から細胞膜へのトランスロケーションを引き起こし、水の再吸収を増加させる。腎性尿崩症は、血中バソプレッシンレベルは低下していないにも係わらず、尿濃縮能が障害された病態である。遺伝性腎性尿崩症において、バソプレッシンに対する腎臓の反応性は、V2 受容体やアクアポリン-2 の遺伝子異常のために障害されている。われわれは、トリプル NOSs 欠損マウスにおける腎性尿崩症の機序をさらに明らかにするために、腎臓の構造変化が生じていない生後 1 週齢のマウスの集合管において、cAMP の産生とアクアポリン-2 の局在について検討した。生後 1 週齢のマウスの集合管において、バソプレッシン刺激による cAMP の産生は、野生型マウスに比して

トリプル NOSs 欠損マウスで有意に低下していた。<sup>21)</sup> さらに、集合管細胞膜におけるアクアポリン-2 の発現も、トリプル NOSs 欠損マウスで有意に低下していた。<sup>21)</sup> 以上より、トリプル NOSs 欠損マウスは、後天性腎性尿崩症の特徴に加えて、先天性腎性尿崩症の特徴も有していると考えられた。

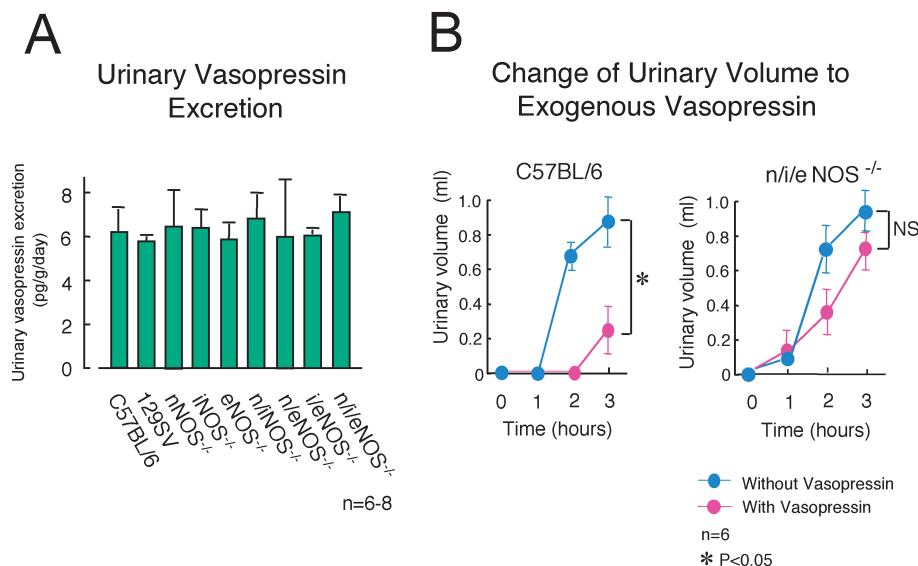
#### 7. トリプル NOSs 欠損マウスの心血管病表現型

われわれは、最近、トリプル NOSs 欠損マウスに自然発症の血管病変が形成されるという仮説を検証した。<sup>39)</sup> 実験は、通常食で飼育した 2 ヶ月齢及び 5 ヶ月齢のオスの野生型マウス、nNOS 欠損マウス、iNOS 欠損マウス、eNOS 欠損マウス、及びトリプル NOSs 欠損マウスを用いて行った。2 ヶ月齢では、いずれのマウスにおいても有意な血管病変は形成されていなかった。しかし、5 ヶ月齢では、トリプル NOSs 欠損マウスにおいてのみ、心外膜を走行する大きな冠動脈と心筋内を走行する微小冠動脈の両方に、有意な血管壁の肥厚と外膜の線維化が認められた。<sup>39)</sup> 重要なことに、冠動脈におけるアンジオテンシン変換酵素 (ACE) の発現、並びに心臓におけるスーパーオキシド産生もまた、トリプル NOSs 欠損マウスにおいてのみ有意に増加していた。以上より、NOSs システムの完全欠損は、ACE のアップレギュレーションと酸化ストレスの増大を伴った自然発症冠動脈硬化を引き起こすことが示唆された。<sup>39)</sup>

われわれは、さらに、トリプル NOSs 欠損マウスに心血管病の危険因子が存在するか否かを検討した。<sup>40)</sup> 興味深いことに、このマウスには、内臓脂肪型肥満、高血圧、高中性脂肪血症、耐糖能異常、インスリン抵抗性といった最近話題のメタボリックシンドロームの病態がすべて揃って認められた。

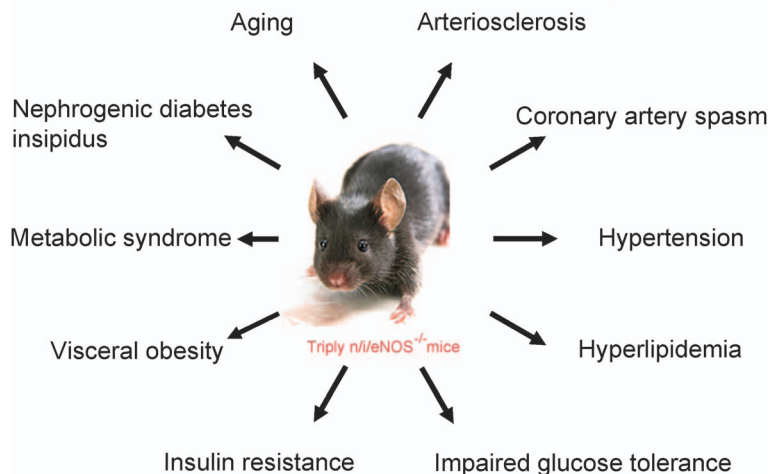
#### 8. おわりに

われわれは、3つの NOS アイソフォームがすべて欠失した遺伝子改変動物の開発に世界で初めて成功した。初期の機能解析において、われわれは、この NOSs 完全欠損マウスが、加齢、動脈硬化、冠動脈スパズム、メタボリックシンドローム、及び腎性尿崩症の病態を呈することを見出した (Fig. 6)。このように、全 NOSs 遺伝子の完全欠損が多彩な心血管病を引き起こしたことから、NO 産生障害が当該疾患の成因に中心的役割を果たしていることが示唆された。



**Fig. 5. Central Vasopressin Release (A) and Renal Sensitivity to Vasopressin (B) in Wild-Type and NOS<sup>-/-</sup> Mice**  
 (A) Central vasopressin secretion, as assessed by urinary vasopressin excretion, was normal in the triply n/i/eNOS<sup>-/-</sup> mice as compared with the wild-type mice. (B) Administration of synthetic vasopressin (0.002 unit, IP) significantly reduced urinary volume in the wild-type C57BL/6 mice, whereas this anti-diuretic effect was markedly impaired in the triply n/i/eNOS<sup>-/-</sup> mice. From these results, we identified that the triply n/i/eNOS<sup>-/-</sup> mice suffer from nephrogenic diabetes insipidus.

### Cardiovascular Phenotypes in Mice Lacking All NOSs



**Fig. 6. Schematic Diagram Showing the Cardiovascular Phenotypes in Mice Lacking All NOS Isoforms**  
 The triply n/i/eNOS<sup>-/-</sup> mice manifest a variety of cardiovascular phenotypes, including aging, arteriosclerosis, coronary artery spasm, metabolic syndrome, and nephrogenic diabetes insipidus. These findings demonstrate a central role of NO derived from the whole NOS system in the pathogenesis of the cardiovascular diseases. Our triply mutant mouse may be a new animal model of the disorders.

これまで生体内における NO の役割が、薬理学的研究やシングル NOS 欠損マウスを用いて広く研究されてきた。しかし、薬理学的研究では薬剤の選択性や特異性が常に問題となり、また、シングル NOS 欠損マウスではノックアウトされない他の NOS の代償機構が働くために、NOSs システム全体に由来する NO の真の役割についてはいまだ不

明な点が多い。われわれが開発した NOS 完全欠損マウスはこれらの問題を解決し、全 NOSs システムの役割を解明する有用な実験ツールである。

**謝辞** 本研究の遂行に多大なご支援を賜りました産業医科大学医学部第2病理学の笹栗靖之教授、谷本昭英准教授、Ke-Yong Wang 助教、産業医科大



学医学部第1生理学の上田陽一教授, 及び産業医科大学医学部第2内科学の太崎博美准教授に厚くお礼申し上げます。また, 研究助成の支援を頂きました文部科学省, 日本学術振興会, 持田記念医学薬学振興財団, 代謝異常治療研究基金, 木村記念循環器財団, 金原一郎記念医学医療振興財団, 神澤医学研究振興財団, 病態代謝研究会, 三共(株), 山之内製薬(株), 及び産業医科大学に深謝申し上げます。

## REFERENCES

- 1) Brecht D. S., Snyder S. H., *Annu. Rev. Biochem.*, **63**, 175–195 (1994).
- 2) Furchgott R. F., *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **24**, 175–197 (1984).
- 3) Ignarro L. J., *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **30**, 535–560 (1990).
- 4) Moncada S., Palmer R. M. J., Higgs E. A., *Pharmacol. Rev.*, **43**, 109–142 (1991).
- 5) Murad F., *Circulation*, **95**, 1101–1103 (1997).
- 6) Shimokawa H., *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **31**, 23–37 (1999).
- 7) Godecke A., Decking U. K., Ding Z., Hirschhain J., Bidmon H. J., Godecke S., Schrader J., *Circ. Res.*, **82**, 186–194 (1998).
- 8) Gyurko R., Leupen S., Huang P. L., *Endocrinology*, **143**, 2767–2774 (2002).
- 9) Huang P. L., Dawson T. M., Brecht D. S., Snyder S. H., Fishman M. C., *Cell*, **75**, 1273–1286 (1993).
- 10) Huang P. L., Huang Z., Mashimo H., Bloch K. D., Moskowitz M. A., Bevan J. A., Fishman M. C., *Nature.*, **377**, 239–242 (1995).
- 11) Laubach V. E., Shesely E. G., Smithies O., Sherman P. A., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **92**, 10688–10692 (1995).
- 12) MacMicking J. D., Nathan C., Hom G., Chartrain N., Fletcher D. S., Trumbauer M., Stevens K., Xie Q. W., Sokol K., Hutchinson N., Chen H., Mudgett J. S., *Cell*, **81**, 641–650 (1995).
- 13) Nelson R. J., Demas G. E., Huang P. L., Fishman M. C., Dawson V. L., Dawson T. M., Snyder S. H., *Nature*, **378**, 383–386 (1995).
- 14) Shesely E. G., Maeda N., Kim H. S., Desai K. M., Kregel J. H., Laubach V. E., Sherman P. A., Sessa W. C., Smithies O., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **93**, 13176–13181 (1996).
- 15) Son H., Hawkins R. D., Martin K., Kiebler M., Huang P. L., Fishman M. C., Kandel E. R., *Cell*, **87**, 1015–1023 (1996).
- 16) Tranguch S., Huet-Hudson Y., *Mol. Reprod. Dev.*, **65**, 175–179 (2003).
- 17) Wei X. Q., Charles I. G., Smith A., Ure J., Feng G. J., Huang F. P., Xu D., Muller W., Moncada S., Liew F. Y., *Nature*, **375**, 408–411 (1995).
- 18) Huang Z., Huang P. L., Panahian N., Dalkara T., Fishman M. C., Moskowitz M. A., *Science*, **265**, 1883–1885 (1994).
- 19) Huang Z., Huang P. L., Ma J., Meng W., Ayata C., Fishman M. C., Moskowitz M. A., *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **16**, 981–987 (1996).
- 20) Yogo K., Shimokawa H., Funakoshi H., Kandabashi T., Miyata K., Okamoto S., Egashira K., Huang P., Akaike T., Takeshita A., *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **20**, E96–E100 (2000).
- 21) Morishita T., Tsutsui M., Shimokawa H., Sabanai K., Tadaki H., Suda O., Nakata S., Tanimoto A., Wang K. Y., Ueta Y., Sasaguri Y., Nakashima Y., Yanagihara N., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **102**, 10616–10621 (2005).
- 22) Shimokawa H., Tsutsui M., Mizuki T., Hase K., Kuwaoka I., Nogami N., Okamatsu S., Nakanishi K., *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **27**, 297–302 (1996).
- 23) Tsutsui M., Shimokawa H., Tanaka S., Kuwaoka I., Hase K., Nogami N., Nakanishi K., Okamatsu S., *Eur. Heart J.*, **15**, 1261–1266 (1994).
- 24) Kinoshita H., Tsutsui M., Milstien S., Katusic Z. S., *Prog. Neurobiol.*, **52**, 295–302 (1997).
- 25) Tsutsui M., Milstien S., Katusic Z. S., *Circ. Res.*, **79**, 336–342 (1996).
- 26) Tsutsui M., Chen A. F., O'Brien T., Crotty T. B., Katusic Z. S., *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **18**, 1231–1241 (1998).
- 27) Tsutsui M., Onoue H., Iida Y., Smith L., O'Brien T., Katusic Z. S., *Am. J. Physiol.*, **276**, H1846–1852 (1999).
- 28) Tsutsui M., Onoue H., Iida Y., Smith L., O'Brien T., Katusic Z. S., *Am. J. Physiol.*,



- 278, H420–427 (2000).
- 29) Tsutsui M., Onoue H., Iida Y., Smith L., O'Brien T., Katusic Z. S., *Am. J. Physiol.*, **278**, H367–372 (2000).
- 30) Suda O., Tsutsui M., Morishita T., Tanimoto A., Horiuchi M., Tasaki H., Huang P. L., Sasaguri Y., Yanagihara N., Nakashima Y., *Circulation*, **106**, 1729–1735 (2002).
- 31) Suda O., Tsutsui M., Morishita T., Tasaki H., Ueno S., Nakata S., Tsujimoto T., Toyohira Y., Hayashida Y., Sasaguri Y., Ueta Y., Nakashima Y., Yanagihara N., *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **24**, 1682–1688 (2004).
- 32) Morishita T., Tsutsui M., Shimokawa H., Horiuchi M., Tanimoto A., Suda O., Tasaki H., Huang P. L., Sasaguri Y., Yanagihara N., Nakashima Y., *FASEB J.*, **16**, 1994–1996 (2002).
- 33) Tsutsui M., *J. Atheroscler. Thromb.*, **11**, 41–48 (2004).
- 34) Nakata S., Tsutsui M., Shimokawa H., Tamura M., Tasaki H., Morishita T., Suda O., Ueno S., Toyohira Y., Nakashima Y., Yanagihara N., *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **25**, 2502–2508 (2005).
- 35) Lundberg J. O. Weitzberg E., *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **25**, 915–922 (2005).
- 36) Koizumi C., Brown W. D., *J. Food Sci.*, **36**, 1105–1109 (1971).
- 37) Nichol C. A., Smith G. K., Duch D. S., *Ann. Rev. Biochem.*, **54**, 729–764 (1985).
- 38) Braun A., Trigatti B. L., Post M. J., Sato K., Simons M., Edelberg J. M., Rosenberg R. D., Schrenzel M., Krieger M., *Circ. Res.*, **90**, 270–276 (2002).
- 39) Nagasaki M., Tsutsui M., Shimokawa H., Morishita T., Nakata S., Sabanai K., Yanagihara N., *Circulation*, **112**, II–166 (2005).
- 40) Nakata S., Tsutsui M., Sabanai K., Morishita T., Nagasaki M., Yanagihara N., *Circulation*, **112**, II–56 (2005).