



Title	Nitric Oxide Synthesis Leads to Vascular Endothelial Growth Factor Synthesis via the NO/Cyclic Guanosine 3', 5' -Monophosphate (cGMP) Pathway in Human Corpus Cavernosal Smooth Muscle Cells
Author(s)	小森, 和彦
Citation	大阪大学, 2008, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/48970
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏名	小森和彦
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第21849号
学位授与年月日	平成20年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科臓器制御医学専攻
学位論文名	Nitric Oxide Synthesis Leads to Vascular Endothelial Growth Factor Synthesis via the NO/Cyclic Guanosine 3', 5'-Monophosphate (cGMP) Pathway in Human Corpus Cavernosal Smooth Muscle Cells (ヒト陰茎海綿体平滑筋細胞におけるNO産生は、NO/cGMP経路を通じてVEGF産生を促進する)
論文審査委員	(主査) 教授 奥山 明彦 (副査) 教授 中村 仁信 教授 祖父江憲治

論文内容の要旨

〔目的〕

血管などの平滑筋細胞は、細胞株が樹立され様々な基礎研究に利用されている。血管平滑筋細胞にとって Nitric Oxide (NO) は他から供給され、結果として細胞は拡張すると考えられていた。ところが近年、血管平滑筋細胞自らが Nitric Oxide Synthase (NOS) を発現し、NO を産生する可能性が報告された。一方陰茎海綿体においても、平滑筋細胞は他から NO を供給されると考えられていたが、陰茎海綿体平滑筋細胞株は現在のところ入手不可能で、陰茎海綿体平滑筋細胞自身の NO 産生については十分な検討がなされていない。本研究では、ヒト陰茎海綿体平滑筋細胞を樹立し、NOS の発現および NO の産生を検討した。それに引き続き、NO 産生に伴って細胞内 cGMP が増加しているか検討した。また、NO を介して血管平滑筋細胞の Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) 産生が増加するとの報告があり、同様の現象が陰茎海綿体平滑筋細胞でも認められるか検討を加えた。

〔方法ならびに成績〕

文書による同意を得た陰茎癌患者の手術時に採取した陰茎海綿体平滑筋正常組織から得られた細胞集団を継代培養の後、免疫染色および Immunoblotting にて α Sm-actin、Desmin、Calponin、CD31、そして eNOS (endothelial NOS) の発現を検討した。続いて、細胞を NOS の基質である L-arginine (L-arg) を添加した Phosphate Buffered Saline (PBS) 溶液中で培養し、上清中の NO_x (NO₂+NO₃) 濃度を酸化窒素分析システムにて測定した。また、血清を加えた PBS に L-arg、さらに勃起不全治療薬のひとつで、細胞内 cGMP を増加させる作用のある Phosphodiesterase-5 (PDE-5) inhibitor、vardenafil を加えて 24 時間培養し、上清中の VEGF 濃度と細胞内 cGMP 濃度を enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit を用いて測定した。次に、NOS inhibitor である N^ω-Nitro-L-Arginine Methyl Ester (L-NAME) を添加し、NO 産生を低下させることで、VEGF 産生および細胞内 cGMP 濃度が減少するかについても検討した。

得られた細胞集団は、免疫染色および Immunoblotting にて α Sm-actin、Desmin、Calponin の発現を認める一方、CD31 陰性であったことより平滑筋細胞と確認された。以降、陰茎海綿体平滑筋細胞 (以下 OCSMC-1) として継代

培養した。また、免疫染色およびImmunoblottingにてOCSMC-1におけるeNOSの発現が確認された。L-argを添加したPBS中でOCSMC-1を5時間培養したところ、L-arg濃度依存性に培養上清中のNOx濃度および細胞内cGMP濃度は増加した。次に、NO産生および細胞内cGMPの経時的変化を、1～24時間後においてL-arg 5 mMとPBS(対照)群で比較したところ、L-arg 5 mM群ではどの時間においてもPBS群に比べて、有意にNOx濃度と細胞内cGMP濃度が増加した。また、24時間培養した上清中のVEGF濃度に関しても、L-arg 5 mM群の方がPBS(対照)群より有意に高く、vardenafilを加えた群ではVEGF濃度はさらに増加した。そのときの細胞内cGMP濃度もL-arg 5 mM群の方がPBS(対照)群より有意に高く、vardenafilを加えた群ではさらに増加した。一方で、L-NAMEを添加すると、VEGF産生および細胞内cGMP濃度が有意に低下した。

〔 総 括 〕

ヒト陰茎海綿体平滑筋細胞OCSMC-1はNOを産生し、NOの産生増加に従ってcGMPが増加すること、さらにVEGF産生も促進されることが示された。平滑筋細胞におけるNOを介したVEGF産生増加のメカニズムは完全には解明されてはいないが、本研究の結果よりNO/cGMP経路を介している可能性が示唆された。平滑筋細胞により産生されたVEGFが血管内皮細胞に作用し、その障害の修復に寄与する可能性を考慮すると、L-argとPDE-5 inhibitorを併用することで、陰茎海綿体平滑筋細胞のNO/cGMP経路を介したVEGF産生が促進され、勃起不全の原因の一つである血管内皮障害が改善される可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

血管などの平滑筋細胞にとってNitric Oxide(NO)は他から供給されるもので、それにより平滑筋細胞は拡張すると考えられてきた。本研究では、樹立したヒト陰茎海綿体平滑筋細胞OCSMC-1が内皮型一酸化窒素合成酵素(eNOS)を発現し、自らNOを産生することを示した。

また、OCSMC-1において、NOの産生増加に従って細胞内cGMPが増加し、それに従ってVascular Endothelial Growth Factor(VEGF)産生も促進されることを初めて証明した。

平滑筋細胞により産生されたVEGFが血管内皮細胞に作用することでその障害の修復に寄与することから、陰茎海綿体平滑筋細胞の産生したNOが、NO/cGMP経路を介したVEGF産生を促進し、勃起不全の原因の一つである血管内皮障害を改善するという新たな可能性を示した。よって、本研究の成果は博士(医学)の学位授与に値すると考える。