

## 論文の内容の要旨

論文題目 基礎および臨床的側面からみたアミノ酸投与が血管内皮機能  
および動脈壁硬化に及ぼす生理的影響に関する研究

氏名 森田 匡彦

### 研究意義と背景

「ヒトは血管とともに老いる」といわれるように、加齢に伴い動脈壁の硬化が普遍的に進展するが、血管の動的恒常性に重要な役割を演じるのが血管内皮細胞である。血管組織は血管内皮によって産生される生理活性物質により制御されており、その機能不全によりアテローム性動脈硬化症やそれに続く心血管イベントへと繋がるのが数多くの研究により明らかにされている。

血管内皮が産生する血管作動物質の中で、今日最も研究が進んでいるものが一酸化窒素 (NO) である。NO は cGMP シグナルを介し、血管平滑筋を弛緩させ、血管の緊張性を緩和する。動脈硬化の進行ステージにおいては、形態学的変化より前に内皮機能障害に伴う NO 産生能の低下が生じ、血管伸展性の低下が惹起される。

L-Citrulline は、生体内で NO 合成酵素 (NOS) の基質である L-Arginine の前駆体を演じる L 体遊離アミノ酸である。L-Arginine 自体は、主に腸管や肝臓で Arginase の強力な作用により代謝を受け、血管内皮では生物学的利用能が低い。一方で近年、生体組織の L-Arginine を増加し NO 産生を亢進するには、L-Citrulline 摂取が有益であることが報告され、心血管保護の見地において、L-Citrulline が注目されている。

そこで本研究では、血管の恒常性維持における基幹システムである血管内皮と NO に着目し、L-Citrulline 投与が血管機能に及ぼす生理作用を基礎および臨床の両側面から検討した。これにより、L-Citrulline が有する効能と作用機序を包括的に解明し、今後益々増加が見込まれる心血管疾患の予防的介入に資する機能性素材として、L-Citrulline を社会に供することを目指した。

## 第1章

NO サイクルを賦活化し、血管組織に適切なレベルの NO を供給するには、NO 合成基質である L-Arginine の生体利用をいかに効率的に向上できるかが鍵である。そこで、血中 L-Arginine 動態の見地から、L-Citrulline 経口投与が L-Arginine 全身循環に与える代謝上の有用性を検討した。ラットへの L-Arginine 単回経口投与 (2.85 mmol/kg) は、投与 2 時間までの短期において一過的に血漿 L-Arginine 濃度を上昇させたが、L-Citrulline 投与 (2.85 mmol/kg) では L-Arginine 群と比べ、持続的に循環血中 L-Arginine 濃度を高めることが明らかとなった。さらに NO サイクルは L-Arginine と L-Citrulline 間の代謝変換を介するため“L-Citrulline - L-Arginine recycling pathway”とも称され、NOS への局所的な L-Arginine の供給に必須の代謝経路である。よって、その構成代謝中間体である L-Citrulline、L-Arginine の同時投与により NO サイクルが活性化し得るかをラットおよびウサギを用いて実験的に検討した。その結果、L-Citrulline、L-Arginine の半用量併用経口投与 (各 1.43 mmol/kg) は各単独群と比べ、相乗的に、投与 1 時間以内の短期に血漿 L-Arginine レベルを速やかに増大させ、血中 NO、cGMP レベル、末梢血流を有意に増加させた。以上より、L-Citrulline が有する L-Arginine 全身循環における代謝上の有用性を明らかにした。

## 第2章

L-Citrulline による L-Arginine レベルの上昇を、NO を介する生理機能として検討した。血流の改善が末梢皮膚温の回復期に重要な役割を担うとの仮説のもと、マウスストレス誘発性末梢循環低下モデルを構築した。本モデルでは、ストレスによる末梢毛細血管の収縮を皮膚温として検知するとともに、NOS 阻害剤を用いた検討から、ストレスによる冷えからの回復に NO による皮膚血管の拡張反応が生理的に重要であることを示した。そこで、NO 産生促進に基づく循環改善を作用メカニズムの標的とし、L-Citrulline 投与 (1% 混餌食、20 日間) の生理的影響を評価した結果、L-Citrulline がストレス誘発性体温低下の回復を有意に促進することを見出し、この機序として NO による皮膚血管の拡張反応の関与が示唆された。

## 第3章

L-Citrulline による NO サイクル賦活化作用に注目し、より臨床病態に近いモデルで検討を進めた。ここでは、血管病変を基盤とした脳血管障害モデルを用い、マウス両側総頸動脈を一過的に 20 分間閉塞して脳微小血管に障害を課した後、L-Citrulline (0~100 mg/kg) を 10 日間

経口投与した。L-Citrulline 投与は、血管障害で低下する内皮型 NO 合成酵素 (eNOS) の発現レベルを回復し、海馬の NO 産生能を有意に増強することを明らかとした。さらに、血管内皮の脱落や、海馬神経細胞死を有意に抑制した。これら効果は、高次脳機能を行動薬理学的に解析することで、記憶学習能の有意な改善によっても実証された。またその新規メカニズムに、CaMK II を介した神経保護作用、神経系の可塑的变化の関与が示唆された。脳血管性認知症はアルツハイマー病と並び、重要な社会的課題であり、L-Citrulline 投与による著明な改善作用を実証したことは、脳血管保護の観点から意義ある結果と考えられる。

## 第4章

前章までに、L-Citrulline が、NO-cGMP pathway 活性化のメカニズムを基盤として、血管機能不全に対して抑制的に働く可能性を示した。しかし、サプリメントとして活用するためにはヒトでの有効性を実証することが極めて重要である。そこで、L-Citrulline を健常成人に摂取させた際の血中 L-Arginine と NO 動態、NO の生物学的作用を反映する血流動態をランダム化プラセボ対照クロスオーバー比較試験により検証した (N=14)。5 日間の L-Citrulline 摂取 (3.2 g/day) は血漿 L-Arginine 濃度と NOx 濃度を有意に上昇させ、これら両指標の間には統計的に有意な正の相関があることを臨床的に明らかにした。さらに、冷水負荷後の末梢血流の回復は、L-Citrulline 摂取時に顕著に亢進した。このことから、ヒトにおいても L-Citrulline 摂取は NO サイクルを活性化し血管機能を強化し得る可能性が示された。これら効果は L-Citrulline の作用機作の根幹を成すもので、ヒトで証明できた意義は大きい。

## 第5章

動脈硬化予防の観点からは、心血管疾患に繋がる臨床症状が発現する前に、動脈の質的变化を検知し、より予防的に血管機能に注意を払うことが重要である。そこで、L-Citrulline の臨床上的有用性を明らかにするため、動脈壁硬化の指標である brachial-ankle pulse wave velocity (baPWV) のリスクカットオフ値である > 1,400 cm/s の中高年男性を選抜し、ランダム化プラセボ対照並行群間比較試験を実施した (N=7~8)。その結果、プラセボ群と比べ、7 日間の L-Citrulline 摂取 (5.6 g/day) によって baPWV が有意に低下し、血管壁硬化の有意な改善作用が認められた。さらに、L-Citrulline 摂取による血漿 L-Arginine 濃度の上昇と baPWV の低下には有意な負の相関が認められた。このことから、L-Citrulline は eNOS への L-Arginine 利用能を促進し、血管内皮細胞からの NO 産生を増加させることにより、血管弾性の機能的

改善をもたらしたことが推察された。これら作用は、L-Citrulline の NO 産生賦活作用を血管硬化度の改善として初めてヒトで捉えたものであり、動脈硬化予防の側面から、意義のある知見と考えられる。

## 第6章

動脈硬化は、血管内皮障害を第一段階として進展することから、血管内皮機能不全は、心血管疾患合併症を助長する重要な規定因子である。従って、血管機能不全の予防および治療的観点で包括的な研究を進めるには、血管内皮への作用解明は必須である。そこで、Flow-mediated dilation (FMD：血流依存性血管拡張反応) の値が血管内皮機能不全とされる 5.5 % 以下である、冠動脈攣縮性狭心症患者への介入試験 (N=22) を行い、8 週間の L-Citrulline (800 mg/day) 継続摂取の影響を臨床的に評価した。その結果、L-Citrulline 摂取により、NO 依存性の血管内皮機能が有意に改善すること、その主たるメカニズムとして L-Citrulline は循環器疾患で上昇する内因性 NOS 阻害物質である ADMA レベルを抑制し、血漿 L-Arginine/ADMA 比を上昇させ L-Arginine 利用能を促進すること、および血管内皮を強力に障害する LDL の酸化変性を有意に抑制することを明らかにした。L-Citrulline による L-Arginine および NO の生物学的利用能の上昇に加え、LDL 酸化修飾の低減や、血漿 ADMA 濃度の低下など、血管内皮の主たる障害因子の抑制においても新規作用を明らかにした。

### 【総括・展望】

本研究では心血管障害に主眼をおいた食品からの新たな予防戦略を構築するため、L-Arginine 代謝に関わるアミノ酸 "L-Citrulline" による生理作用とその機序解明を目指した。その結果、L-Citrulline 摂取は、血管内皮において eNOS への L-Arginine 利用能を促進し、内皮由来 NO 産生系を活性化することにより、血管内皮機能や動脈伸展性を改善する作用を見出した。さらに、基礎および臨床試験の両側面から、L-Citrulline は脳血管閉塞や動脈硬化の予防に有益であると考えられた。