

平成 21 年 5 月 26 日現在

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19590866  
 研究課題名（和文）血管内皮機能を標的としたグルココルチコイド誘発性血管障害に対する新規治療法の開発  
 研究課題名（英文）A novel therapeutic strategy for glucocorticoid-induced vascular endothelial dysfunction  
 研究代表者  
 赤池 雅史（AKAIKE MASASHI）  
 徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・准教授  
 研究者番号 90271080

研究成果の概要：グルココルチコイド過剰マウスでは、血圧上昇、血管内皮機能低下、酸化ストレス増加、一酸化窒素産生低下がみられ、これらはピタバスタチンにより改善した。培養ヒト臍帯静脈血管内皮細胞では、ピタバスタチンはデキサメサゾンによる活性酸素産生の増加と内皮型一酸化窒素合成酵素の発現低下を改善し、この作用はイソプレノイド中間体であるグラニルグラニルピロリン酸により完全に消失した。ピタバスタチンは血管内皮細胞に対する多面的作用により、グルココルチコイド誘発性血管障害の新規治療法となる可能性がある。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：血管内皮機能、酸化ストレス、活性酸素、一酸化窒素、一酸化窒素合成酵素、グルココルチコイド、スタチン

## 1. 研究開始当初の背景

グルココルチコイド (GC) は自己免疫疾患などの多くの疾患の治療に使用されるが、本剤の大量・長期投与は、高血圧、動脈硬化、心肥大などの重篤な心血管系合併症を引き起こすため、GC 治療を行う上で大きな支障となっている。また、GC 過剰の代表的疾患であるクッシング症候群では高血圧ならびに心血管合併症は生命予後の規定因子として最も重要である。GC 誘発性高血圧の主要病態は、塩分・水分貯留ではなく、末梢血管

抵抗の増大と考えられている。我々は GC 治療を受けた患者では、その投与量と相関して前腕の内皮依存性血管弛緩反応が低下することを始めて報告し、GC 過剰による血管内皮機能低下を明らかにした。GC 過剰は血管内皮細胞における内皮型一酸化窒素合成酵素 (eNOS) の発現を低下させることが知られているが、我々はさらに GC 過剰が血管系での活性酸素産生を増加させ NO の消去を亢進することを見出している。このような GC による NO bioavailability の低下は GC 誘発性



血管障害の重要な発症機序であり、GC 過剰症に対する新しい予防・治療法開発の標的と考えられる。

HMG-CoA 還元酵素阻害薬 (スタチン) は強力なコレステロール低下作用だけでなく eNOS 発現増強や血管内皮機能の改善など血管系への多面的直接作用が注目されている。特にピタバスタチンは腸管からの吸収後に肝チトクローム P450 による代謝をほとんど受けないため、高い血中濃度を維持し、*in vitro* で確認された血管系への多面的作用が *in vivo* でも発揮されることが期待できる。

## 2. 研究の目的

本研究では GC 過剰による血管内皮機能障害、特に酸化ストレス亢進と NO 産生低下を、ピタバスタチンが改善することを、動物モデルならびに培養血管内皮細胞を用いて明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1) GC 過剰マウスを用いた検討

C57BL/6J (オス, 12 週齢) をコントロール群, ピタバスタチン投与群, デキサメサゾン (DEX) 投与群, DEX およびピタバスタチン投与群の 4 群 (各群 n=6) に分け検討した。ピタバスタチンは 0.3mg/kg/day を経口投与し, DEX はピタバスタチンの投与開始後 8 日目から 0.3mg/kg/day を経口投与した。DEX 投与開始後 14 日目に血圧, 脈拍, 血管内皮機能, 尿中硝酸/亜硝酸 (NOx) 排泄量, 大動脈における eNOS 蛋白発現, dihydroethidium (DHE) 染色および尿中 8-OHdG 排泄量について解析を行った。血圧, 脈拍は tail cuff method により測定した。血管内皮機能は 2 分間の下肢完全阻血を解除直後に生じる反応性充血時の大腿動脈径の変化を CCD カメラを用いて 15 秒ごとに 2 分間にわたり撮影記録し, 阻血解除後の大腿動脈径の増加率により評価した。大動脈の eNOS 蛋白の発現量は胸腹部大動脈を摘出しウエスタンブロット法により評価した。尿中 NOx 排泄量は Griess 法により測定し, 尿中 8-OHdG 排泄量は ELISA により測定した。

### (2) 培養血管内皮細胞を用いた検討

ヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC) の培養系にピタバスタチン  $10^{-5}$ M を添加し, その 12 時間後にデキサメサゾン (DEX)  $10^{-5}$ M を添加し, さらに DEX 添加 16 時間後に DHE 染色, luciferase reporter gene assay による eNOS プロモーター活性, real time PCR 法による eNOS の mRNA 量, およびウエスタンブロットによる eNOS 蛋白発現を解析した。また, ピタバスタチンとともにメバロン酸 100 $\mu$ M, ゲラニルゲラニルピロリン酸 (GGPP) 10 $\mu$ M, あるいはファルネシルピロリン酸 (FPP) 10 $\mu$ M を同時に添加し eNOS 発現に及ぼす影響について解析した。eNOS プロモーター活

性の評価は eNOS プロモーター遺伝子の -1193~+109, -1001~+109, -742~+109, -265~+109 を組み込んだ luciferase reporter vector を Lipofectamine plus (Invitrogen) を用いて HUVEC に transfection し, luciferase assay system により解析した。また, actinomycin D を添加し, eNOS mRNA の安定性について解析した。

(倫理面への配慮)

本研究はヘルシンキ宣言, 徳島大学遺伝子組み換え実験安全管理委員会規定, 徳島大学医学部動物実験委員会規定ならびに徳島大学倫理委員会規定に基づき施行した。

## 4. 研究成果

### 1) GC 過剰マウスにおける血圧, 脈拍, 血糖および脂質の変化とピタバスタチンの効果

収縮期, 拡張期および平均血圧は, いずれも DEX 投与群においてコントロール群と比較して有意に高値であったが, ピタバスタチン投与群, DEX およびピタバスタチン投与群ではコントロール群と差がなかった (図 1)。脈拍はいずれの群においても差がなかった。

表1. 体重および代謝データ

	Control	PIT	DEX	DEX + PIT
Body weight (g)	27.0 ± 1.1	25.6 ± 0.2	25.6 ± 0.2	24.8 ± 0.3
Total cholesterol (mg/dL)	62 ± 4	63 ± 2	88 ± 10**	79 ± 8
Triglycerides (mg/dL)	87 ± 27	45 ± 17*	81 ± 16	43 ± 18##
HDL-cholesterol (mg/dL)	36 ± 4	39 ± 3	58 ± 7**	52 ± 7##
Fasting blood sugar (mg/dl)	93.5 ± 8.0	87.7 ± 13.6	97.7 ± 9.2	85.2 ± 12.4

n=6 animals for each group. Data were shown as mean ± SD. \*\* p<0.01 and \*p<0.05 vs control. ## p<0.01 vs DEX

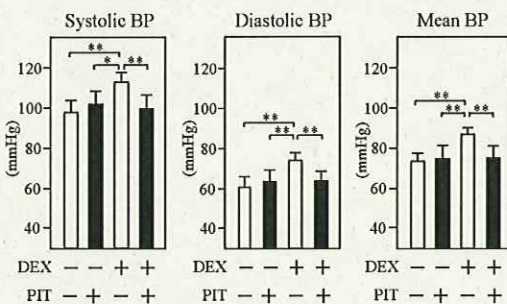


図1. 血圧に及ぼすピタバスタチンの効果

### 2) GC 過剰マウスにおける血管内皮機能に及ぼすピタバスタチンの効果

DEX 投与群では反応性充血時の大腿動脈拡張反応が低下していたが, DEX およびピタバスタチン投与群では DEX 投与による大腿動脈拡張反応の低下が改善して

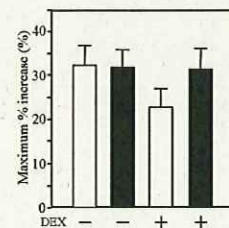


図2. 内皮依存性血管拡張反応に及ぼすピタバスタチンの効果



いた (図 2).

### 3) GC 過剰マウスにおける酸化ストレスに及ぼすピタバスタチンの効果

DHE 染色による superoxide 産生の検討では, DEX 投与群の大動脈で産生増加が認められたが, DEX およびピタバスタチン投与群ではコントロール群と同程度に減少していた (図 3A). また, 尿中 8-OHdG 排泄量についても DEX 投与群で有意に増加していたが, DEX およびピタバスタチン投与群ではコントロール群と差がなかった (図 3B).

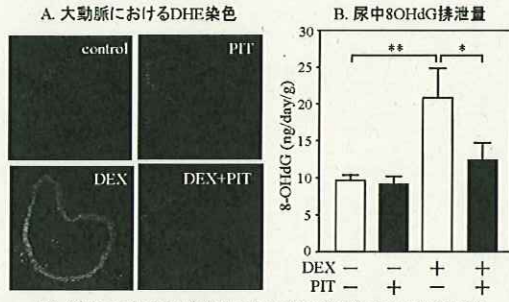


図3. グルココルチコイド過剰マウスにおける酸化ストレスに及ぼすピタバスタチンの効果

### 4) GC 過剰マウスにおける尿中 NOx 排泄量および大動脈における eNOS 発現に及ぼすピタバスタチンの効果

尿中 NOx 排泄量はピタバスタチン投与群ではコントロール群と比較して増加が認められた. DEX 投与群では有意に減少していたが, DEX およびピタバスタチン投与群ではこの減少が改善していた (図 4A). eNOS 蛋白発現はピタバスタチン投与群ではコントロール群と比較して増加が認められた. DEX 投与群では eNOS 蛋白発現が著明に抑制されていたが, DEX およびピタバスタチン投与群ではこの抑制が改善していた (図 4B).

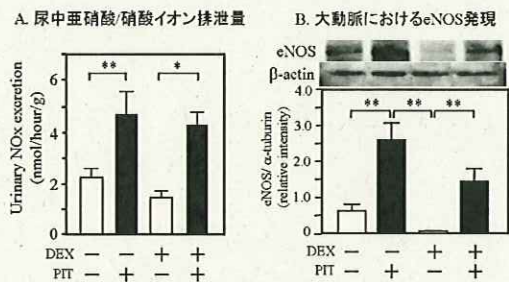


図4. グルココルチコイド過剰マウスにおける一酸化窒素産生に及ぼすピタバスタチンの効果

### 5) HUVEC における GC による酸化ストレス亢進に及ぼすピタバスタチンの効果

DHE 染色による HUVEC での superoxide 産生の検討では, DEX により産生増加が認められたが, DEX およびピタバスタチン投与群ではコントロール群と同程度に減少していた (図 5).

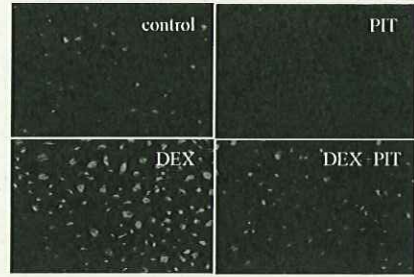


図5. 培養ヒト臍帯静脈内皮細胞におけるグルココルチコイドによる酸化ストレス亢進に及ぼすピタバスタチンの効果

### 6) HUVEC における eNOS 発現に及ぼすピタバスタチンの効果とイソプレノイド中間体の影響

HUVEC における eNOS 蛋白の発現量はピタバスタチンの添加により有意に増加した. DEX 添加は eNOS 蛋白の発現量を有意に抑制したが, この抑制作用はピタバスタチンの添加により消失した (図 6A). DEX 存在下の HUVEC におけるピタバスタチンの eNOS 蛋白発現増加作用はメバロン酸および GGPP の添加によりほとんど消失した. 一方, FPP の添加は影響を与えなかった (図 6B).

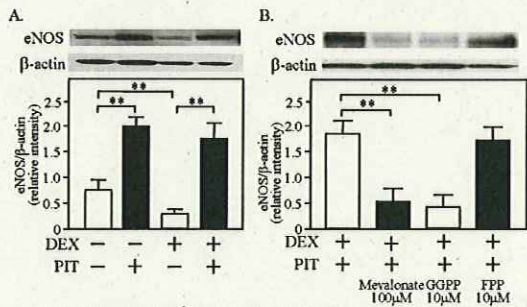


図6. 培養ヒト臍帯静脈内皮細胞におけるグルココルチコイドによる eNOS 発現抑制に及ぼすピタバスタチンの効果

### 7) eNOS mRNA の発現ならびに安定性に及ぼすピタバスタチンの作用

HUVEC における eNOS mRNA の発現量は DEX の添加により有意に減少したが, ピタバスタチンの添加により有意に増加した (図 7A). eNOS mRNA の安定性は DEX 添加により有意に減少したが, この作用はピタバスタチンの添加により消失した (図 7B).

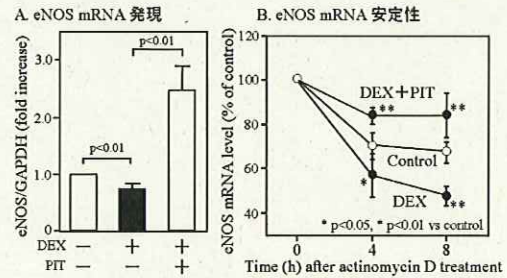


図7. グルココルチコイドによる eNOS mRNA の不安定化に及ぼすピタバスタチンの効果



8) eNOS プロモーター活性に及ぼすピタバスタチンの効果

ピタバスタチンは4種類のeNOSプロモーターのいずれにおいてもその活性を増加させ、その効果はDEX添加群においても同等に認められた。なお、DEX添加はeNOSプロモーター活性に有意な影響を及ぼさなかった(図8)。

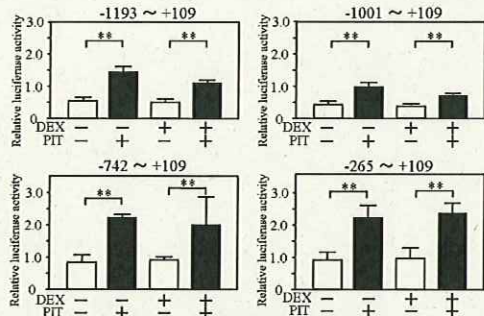


図8. グルココルチコイド過剰状態の培養ヒト臍帯静脈内皮細胞におけるeNOSプロモーター活性に及ぼすピタバスタチンの影響

今回の検討ではDEXを投与したGC過剰マウスにおいて、ピタバスタチンの同時投与がグルココルチコイド過剰による血圧上昇を有意に抑制し、反応性充血時の大腿動脈拡張反応低下を改善した。GC過剰による高血圧の発症機序としてはNO bioavailabilityの低下による血管内皮機能低下に基づく末梢血管抵抗の増大が重要であることが報告されている。また、反応性充血時のflow-mediated vasodilatationは内皮依存性の血管拡張反応であり、血管内皮機能のよい指標である。今回の結果からピタバスタチンはGC過剰により低下したNO bioavailabilityを改善し、血管内皮機能ならびに血管拡張性を改善したと考えられる。また、今回の検討ではDEX投与は大動脈におけるeNOS蛋白質量の発現を著しく減少させたが、ピタバスタチンの投与はそれをほぼ完全に回復させたことから、ピタバスタチンはeNOS発現を増加させることによりNO産生量を増加させ、GC過剰による血管内皮機能低下を改善したと考えられる。同時に、GC過剰による酸化ストレスの亢進をピタバスタチンが抑制した結果も得られており、酸化ストレス抑制によるNO消去の抑制作用も血管内皮機能改善に寄与している可能性がある。

HUVECの培養系を用いた今回の検討では、ピタバスタチンはDEXによるeNOS蛋白質発現の抑制を改善し、この作用はコレステロール合成経路のイソプレノイド中間体であるGGPPによって相殺されたことから、グルココルチコイド誘発性血管内皮機能障害に対するピタバスタチンの改善効果は、血管内皮細胞への直接的多面的作用と考えられる。また、ピタバスタチンはDEXによる

eNOS mRNAの半減期短縮を抑制し、同時にeNOSプロモーター活性を増加させたことから、ピタバスタチンによるeNOS発現増加作用は、eNOS mRNA安定性の改善とeNOS遺伝子の転写亢進によると考えられる。

以上の結果は、ピタバスタチンは、グルココルチコイド誘発性血管内皮機能障害および高血圧の治療・予防に有効である可能性を示すものである。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計9件)

①赤池雅史, 松本俊夫. ステロイド投与下におけるスタチンと血管内皮. 災害外科 2009 in press (査読無).

②Aihara K, Azuma H, Akaike M, Sata M, Matsumoto T. Heparin cofactor II, a novel vascular remodeling factor: its clinical significance and molecular pathogenesis in atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb* 2009 in press (査読有).

③Aihara K, Azuma H, Akaike M, Kurobe H, Sumitomo Y, Yoshida S, Ise T, Iwase T, Ishikawa K, Sata M, Kitagawa T, Matsumoto T. Heparin Cofactor II Is an Independent Protective Factor Against Peripheral Arterial Disease in Elderly Subjects With Cardiovascular Risk Factors. *J Atheroscler Thromb* 2009 in press (査読有).

④Ikeda Y, Aihara K, Yoshida S, Sato T, Yagi S, Iwase T, Sumitomo Y, Ise T, Ishikawa K, Azuma H, Akaike M, Kato S, Matsumoto T. Androgen-Androgen Receptor System Protects against Angiotensin II-Induced Vascular Remodeling. *Endocrinology* 150(6):2857-2864, 2009 (査読有).

⑦Yagi S, Akaike M, Fujimura M, Ise T, Yoshida S, Sumitomo Y, Ikeda Y, Iwase T, Aihara K, Azuma H, Kurushima A, Ichikawa Y, Kitagawa T, Kimura T, Nishiuchi T, Matsumoto T. Infective endocarditis caused by lactobacillus. *Intern Med* 47(12):1113-6, 2008 (査読有).

⑤Yamaguchi H, Komamura K, Choraku M, Hirono A, Takamori N, Tamura K, Akaike M, Azuma H. Impact of serum insulin-like growth factor-1 on early prognosis in acute myocardial infarction. *Intern Med* 47(9):819-25, 2008 (査読有).

⑥Yagi S, Aihara K, Ikeda Y, Sumitomo Y, Yoshida S, Ise T, Iwase T, Ishikawa K, Azuma H, Akaike M, Matsumoto T. Pitavastatin, an HMG-CoA Reductase Inhibitor, Exerts eNOS-independent Protective Actions against Angiotensin II-Induced Cardiovascular Remodeling and Renal Insufficiency. *Circ Res* 102(1):68-76, 2008 (査読有).



- ⑧ Aihara K, Azuma H, Akaike M, Ikeda Y, Sata M, Takamori N, Yagi S, Iwase T, Sumitomo Y, Sato T, Nakamichi Y, Yamamoto Y, Yoshimura K, Watanabe T, Nakamura T, Oomizu A, Tsukada M, Hayashi H, Sudo T, Kato S, Matsumoto T. Strain-dependent embryonic lethality and exaggerated vascular remodeling in heparin cofactor II-deficient mice. *J Clin Invest* 117:1486-9, 2007 (査読有) .
- ⑨ 赤池雅史, 松本俊夫. ステロイド過剰による NO bioavailability の低下と血管内皮機能障害. *CLINICAL CALCIUM* 17(6):864-870, 2007 (査読無) .

[学会発表] (計 7 件)

- ① Yagi S, Akaike M, Aihara K, Ishikawa K, Ise T, Yoshida S, Sumitomo Y, Ikeda Y, Iwase T, Soeki T, Matsumoto T, Sata M. Pitavastatin exerts eNOS-independent protective action against angiotensin II-induced atrial remodeling through attenuating Rac1-mediated oxidative stress 73<sup>th</sup> Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society, Osaka, 2009.3.20-22.
- ② Yagi S, Akaike M, Aihara K, Ishikawa K, Ise T, Yoshida S, Sumitomo Y, Ikeda Y, Iwase T, Soeki T, Matsumoto T, Sata M. A novel eNOS-independent protective action of statin against angiotensin II-induced atrial remodeling via attenuating Rac-1-mediated oxidative stress. American Heart Association 2008. New Orleans, America, 2008.11.8-12.
- ③ 赤池雅史, 八木秀介, 栗飯原賢一, 石川カズ江, 池田康将, 吉田守美子, 住友由佳, 岩瀬俊, 阿部純一, 松本俊夫, 佐田政隆. ピタバスタチンは ERK5-KLF2 経路の活性化を介して血管内皮細胞での一酸化窒素合成酵素の発現を亢進する. 第 31 回日本高血圧学会総会, 札幌市, 2008.10.9-11.
- ④ Akaike M, Aihara K, Yagi S, Ikeda Y, Ishikawa K, Ise T, Yoshida S, Sumitomo Y, Iwase T, Matsumoto T. Pitavastatin, an HMG-CoA Reductase Inhibitor, Prevents Glucocorticoid-induced Hypertension through Increased Nitric Oxide Production as a Pleiotropic Effect on Vascular Endothelial Cells. 22nd Scientific Meeting of the International Society of Hypertension Berlin, Germany, 2008.6.14-19.
- ⑤ Akaike M, Yagi S, Aihara K, Ikeda Y, Ishikawa K, Ise T, Yoshida S, Sumitomo Y, Iwase T, Abe J, Matsumoto T. HMG-CoA Reductase Inhibitor Pitavastatin Increases the Expression of Endothelial NOS through Activation of ERK5-KLF2 Pathway in Vascular Endothelial Cells. 72<sup>th</sup> Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society, Fukuoka, 2008.3.28-30.

- ⑥ 赤池雅史, 栗飯原賢一, 八木秀介, 池田康将, 石川カズ江, 住友由佳, 岩瀬俊, 松本俊夫. グルココルチコイド誘発性高血圧に対するピタバスタチンの効果とその機序の検討. 第 30 回日本高血圧学会学総会, 宜野湾市, 2007.10.25-27.
- ⑦ 赤池雅史 シンポジウム「大腿骨頭壊死症の病態解明」ステロイド性骨壊死と血管内皮障害 第 34 回日本股関節学会, 金沢市, 2007.10.11.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他] なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

赤池 雅史 (AKAIKE MASASHI)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・准教授

研究者番号 90271080

(2) 研究分担者

栗飯原 賢一 (AIHARA KEN-IHCHI)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・講師

研究者番号 70372711

岩瀬 俊 (IWASE TAKASHI)

徳島大学・医学部・歯学部附属病院・助教  
研究者番号 10403718

(3) 連携研究者

なし