

平成 21 年 5 月 8 日現在

研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2007-2008
 課題番号：19591191
 研究課題名 (和文) 関節炎モデルの内皮機能障害と過剰血管酸化ストレスに対するスタチンの効果検討
 研究課題名 (英文) Effect of statins on endothelial dysfunction and increased vascular oxidative stress in rat arthritis model
 研究代表者
 守田 吉孝 (MORITA YOSHITAKA)
 川崎医科大学・医学部・講師
 研究者番号：50346441

研究成果の概要：関節リウマチ患者では全身に及ぶ炎症により血管も障害を受けており、心筋梗塞や脳卒中などの発症率が高いが、その対策は確立していない。本研究では、高脂血症の薬として広く用いられているスタチンが、ラットの実験的関節炎モデルにおいて、血管の酸化ストレスを軽減させ、血管保護作用を有することを初めて明らかにした。これはリウマチ患者の心血管イベント抑制を目的としたスタチンの有用性に一つの科学的根拠を与えるものである。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計			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、膠原病・アレルギー内科学

キーワード：関節リウマチ、アジュバント関節炎、関節炎モデル、スタチン、内皮機能、活性酸素、炎症、血管障害

1. 研究開始当初の背景

(1) **関節リウマチ(RA)と心血管障害**: RAの滑膜病変部での病態解析が進み、生物学的製剤の臨床応用など、現在RAの治療法は大きな変革時期を迎えている。しかしながら、未だ解決されていない重要な臨床課題の一つがRAの生命予後低下の問題である。RA患者の平均寿命は一般人と比し約10年短く、最大の原因因子は冠動脈疾患や脳卒中など心血管イベントの増加であることが知られている。活動性の高いRA患者において動脈硬化の初期変化として知られる血管内皮機能障害が疾

患早期より生じていることが報告された。その詳細なメカニズムは未だ明らかにされていないが、動脈硬化と炎症の関連が論じられる中、全身性炎症が早期血管障害に寄与している可能性も推察される。RA患者における早期血管障害のメカニズムを明らかにするには、動物モデルでの解析が必須であると考えられた。

(2) **関節炎モデルを用いた血管障害の解析**: 研究者は既に、RAの実験動物モデルとして広く用いられているラットのアジュバント関節

炎において、大動脈の内皮機能が著しく障害されていること、また動脈壁の活性酸素種の産生が、コントロールラットと比較し有意に増加してことを報告した(Arthritis Rheum 2006;54:1847-55)。この研究結果は、RAにおける血管機能異常が部分的に動物にモデル化できることを示したものであり、このラットモデルはRA患者の心血管イベントを減少させるための新規治療法の開発および既存薬剤の血管保護作用の検証に利用可能と考えられた。

(3) スタチンの血管保護作用：スタチン(HMG-CoA還元酵素阻害剤)はコレステロール低下作用のみならず、抗酸化作用・抗炎症作用など多様な薬理効果を有することが広く知られている。スタチンは高脂血症・糖尿病・高血圧患者で障害された血管内皮機能の改善効果を有し、患者の生命予後を改善することも報告されている。これらの事実は、同薬剤がRA患者の血管内皮機能障害の改善、そして心血管イベントの抑制に非常に有望である可能性を示唆する。

2. 研究の目的

RA患者の心血管障害予防を目的としたスタチン使用の是非に対し、関節炎モデルを用いて、その有用性を検証することが本研究課題の主目的である。具体的にはラットのアジュバント関節炎にスタチンを投与し、血管機能障害への効果を検討する。また血管壁に亢進している酸化ストレスに及ぼす効果また活性酸素産生に関する種々の酵素の発現と活性化に対する効果も明らかとする。スタチンには免疫抑制効果もあることが知られており、関節炎に対する効果も同時に検討する。

3. 研究の方法

(1) フルバスタチンのラット関節炎に対する効果：ラットのアジュバント関節炎を作成。関節炎発症時よりフルバスタチン(5 mg/kg)を連日経口投与し、関節炎に与える影響と体重を測定する。

(2) ラット大動脈の血管内皮機能測定：フルバスタチンを投与/未投与の関節炎ラット及びコントロールラットより胸部大動脈リングを作成。ノルエピネフリンにて最大収縮を惹起後、内皮依存性血管拡張薬であるアセチルコリンによる弛緩反応を測定する。

(3) 大動脈壁の活性酸素種の産生検討：フルバスタチンを投与/未投与の関節炎ラット大動脈壁における4-ヒドロキシノネナール(HNE)修飾蛋白とニトロチロシンの蛋白量をWestern解析する。動脈組織切片内の活性酸素産生をジヒドロエチジウム(DHE)の蛍光的酸

化反応と共焦点レーザー顕微鏡を利用し検討する。

(4) 大動脈壁の一酸化窒素合成酵素(eNOS)及びNAD(P)Hオキシダーゼの発現および活性化の検討：ラット血管壁におけるeNOSとNAD(P)Hオキシダーゼ(p22phox, gp91phox, p47phox)の発現をWestern blot及びReal-time PCR法にて解析する。大動脈壁抽出蛋白にL-アルギニンやNADHなどの基質を添加し、活性酸素産生をDHE蛍光反応にて定量する事によりeNOSやNAD(P)Hオキシダーゼの活性化を解析する。

(5) 血清テトラヒドロピオプテリン(BH4)とアディポネクチン濃度の測定：NOSの補酵素として重要な血清BH4濃度はHPLCで、アディポネクチン濃度はELISA法にて測定する。

4. 研究成果

(1) 研究結果のまとめ：

ラットのアジュバント関節炎の発症時よりフルバスタチン(5 mg/kg/日)を3週間経口投与したところ、関節炎ラットの血管機能障害は正常ラットレベルまで回復した(図1)。

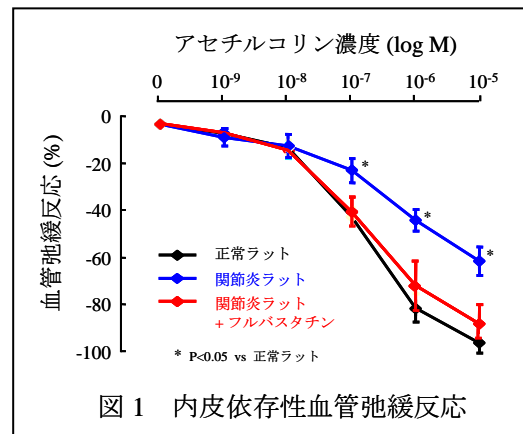


図1 内皮依存性血管弛緩反応

血管壁の酸化ストレスの程度をHNE修飾蛋白とニトロチロシンの蛋白量にて評価したところ、関節炎ラットで増加していた血管酸化ストレスはフルバスタチン投与にて有意に低下した(図2)。動脈組織切片内の活性酸素産生の局在を確認したところ、内皮細胞や平滑筋細胞から産生されていた活性酸素はフルバスタチン投与にて低下していた。

活性酸素産生に関与するNAD(P)HオキシダーゼとeNOSの酵素活性はフルバスタチン投与で低下し、NAD(P)Hオキシダーゼのp22phoxコンポーネントのmRNA発現も低下していた(図3)。eNOSの発現は変化なかったが、その補酵素のテトラヒドロピオプテリンの血清レベルはフルバスタチン投与で有意に上昇し、eNOSの機能異常(uncoupling)の改善と関係していた。

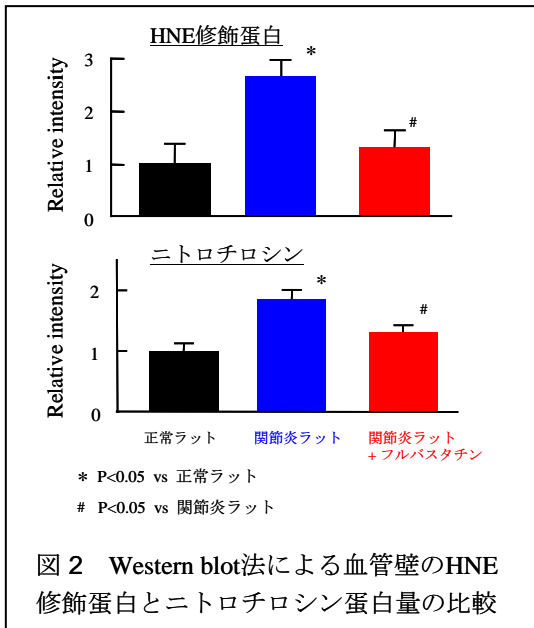


図2 Western blot法による血管壁のHNE修飾蛋白とニトロクロシン蛋白量の比較

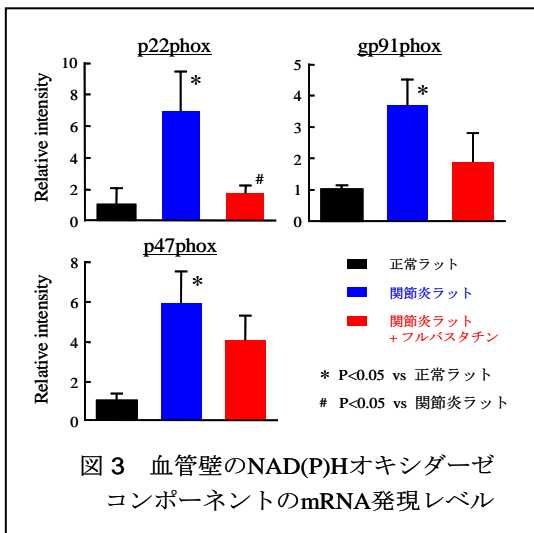


図3 血管壁のNAD(P)HオキシダーゼコンポーネントのmRNA発現レベル

フルバスタチンは関節炎の程度や血清脂質濃度に影響は与えなかった。抗動脈硬化作用があることが知られる血清アディポネクチン濃度は関節炎ラットで低下していたが、フルバスタチン投与によりその濃度は上昇した。

(2) 得られた成果の国内外における位置づけとインパクト:

RA患者と動脈硬化の関連に関しては数々の臨床研究結果が近年報告されている。また最近、スタチンのリウマチ性疾患に対する治療応用の可能性については専門誌(Arthritis Rheum 2006;54:393-407, Arthritis Rheum 2009; 60:1205-9)でも論じられており、リウマチ学において本研究テーマの研究者及び臨床家の関心の高さがうかがえる。これまでにスタチンの関節炎自体への効果について数件の基礎的および臨床研究結果が報告されていた

が、同薬剤がRA患者に対し最も有効性が期待される血管保護作用に関しモデル動物を用いた基礎的研究は今までになかった。

臨床的検討として、スタチンの一つシンバスタチンがリウマチ患者の血管内皮機能を改善するという研究結果(J Am Coll Cardiol 2005; 45: 461-4)が報告され、本研究結果はその臨床結果を基礎的に支持するものである。

リウマチ診療におけるスタチン使用の是非に対しては、更なる臨床研究の結果が待たれるが、リウマチ患者は多様な合併症を有し、ステロイドなど治療薬が多枝にわたり、また炎症の程度も変動することより、信頼性の高い臨床研究結果を得ることは比較的困難である。そうした背景のもと、本研究のようにモデル動物を用いた基礎的研究の成果は特に重要性が高く、インパクトも高いと考える。

本研究は現在、国際的にリウマチ医が非常に関心を寄せているリウマチ診療におけるスタチン使用の是非に一つの科学的根拠を与える可能性がある。

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 17 件)

- ① Morita Y (他 5 名 1 番目). Efficacy of low-dose tacrolimus added to methotrexate in patients with rheumatoid arthritis in Japan: a retrospective study. Mod Rheumatol 2008;18:379-84. 査読有
- ② Kobayashi S, Satoh M (他 8 名 2 番目). Blockade of serotonin 2A receptor improves glomerular endothelial function in rats with streptozotocin-induced diabetic nephropathy. Clin Exp Nephrol 12:119-25,2008. 査読有
- ③ Fujimoto S, Satoh M (他 8 名 2 番目) Olmesartan ameliorates progressive glomerular injury in subtotal nephrectomized rats through suppression of superoxide production. Hypertens Res 31:305-13,2008. 査読有
- ④ Satoh M (他 8 名 1 番目). Angiotensin II type 1 receptor blocker ameliorates uncoupled endothelial nitric oxide synthase in rats with experimental diabetic nephropathy. Nephrol Dial Transplant 23:3806-13,2008. 査読有
- ⑤ Namikoshi T, Satoh M (他 6 名 3 番目). Pioglitazone enhances the antihypertensive and renoprotective effects of candesartan in Zucker obese rats fed a high-protein diet. Hypertens Res 31:745-55,2008. 査読有
- ⑥ Yada T (他 8 名 1 番目). Role of Cu,Zn-SOD in the synthesis of endogenous vasodilator hydrogen peroxide during reactive hyperemia in mouse mesenteric

- microcirculation in vivo. *Am J Physiol* 294: H441-8,2008. 査読有
- ⑦ Haruna Y, Morita Y, Yada T, Satoh M, Fox DA, Kashiwara N. Fluvastatin reverses endothelial dysfunction and increased vascular oxidative stress in rat adjuvant-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 56:1827-35,2007. 査読有
- ⑧ Komai N, Morita Y (他 3 名 2 番目). Anti-tumor necrosis factor therapy increases serum adiponectin levels with the improvement of endothelial dysfunction in patients with rheumatoid arthritis. *Mod Rheumatol* 17:385-90,2007. 査読有
- ⑨ Satoh M (他 6 名 1 番目). Inhibition of apoptosis-regulated signaling kinase-1 and prevention of congestive heart failure by estrogen. *Circulation* 115:3197-204,2007. 査読有
- ⑩ Takeshita K, Satoh M (他 9 名 2 番目). Critical role of endothelial Notch1 signaling in postnatal angiogenesis. *Circ Res* 100:70-78,2007. 査読有
- ⑪ Haruna Y, Kashiwara N, Satoh M (他 8 名 3 番目). Amelioration of progressive renal injury by genetic manipulation of Klotho gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:2331-6, 2007. 査読有
- ⑫ Namikoshi T, Satoh M (他 6 名 2 番目). Pioglitazone ameliorates endothelial dysfunction in obese rats with nephropathy. *Biochem Biophys Res Commun* 361:835-40, 2007. 査読有
- ⑬ Namikoshi T, Tomita N, Satoh M (他 5 名 3 番目). Olmesartan ameliorates renovascular injury and oxidative stress in Zucker obese rats enhanced by dietary protein. *Am J Hypertens* 20:1085-91, 2007. 査読有
- ⑭ Okazaki Y, Satoh M (他 9 名 3 番目). Enhanced TGF-beta/Smad signaling in the early stage of diabetic nephropathy is independent of the AT1a receptor. *Clin Exp Nephrol* 11:77-87,2007. 査読有
- ⑮ Yada T (他 7 名 1 番目). Important role of endogenous hydrogen peroxide in pacing-induced metabolic coronary vasodilation in dogs in vivo. *J Am Coll Cardiol* 50:1272-8, 2007. 査読有
- ⑯ Yada T (他 7 名 1 番目). Changes of asymmetric dimethylarginine, nitric oxide, tetrahydrobiopterin, and oxidative stress in patients with acute myocardial infarction by medical treatments. *Clin Hemorheol Microcirc* 37:269-76, 2007. 査読有
- ⑰ Sukmawan R, Yada T (他 8 名 2 番目). Edaravone preserves coronary microvascular endothelial function after ischemia/reperfusion

on the beating canine heart in vivo. *J Pharmacol Sci* 104:341-8,2007. 査読有

[学会発表] (計 7 件)

- ① 作田建夫(代表: 守田吉孝)、TNF α は血管内皮機能を低下させる—抗サイトカイン療法と心血管保護作用に関連して—、第19回日本リウマチ学会中国四国支部学術集会、2008年10月25日、広島
- ② 作田建夫(代表: 守田吉孝)、ラット関節炎モデルの心血管障害:酸化ストレス亢進と心筋肥大、第36回日本臨床免疫学会総会、2008年10月17日、東京
- ③ Yoshitaka Morita、Systemic Inflammation in Rat Arthritis Model Potentiates Hypertensive and Vascular Hypertrophic Responses to Angiotensin II、第13回アジア太平洋リウマチ学会(APLAR)、2008年9月25日、横浜
- ④ 作田建夫(代表: 守田吉孝)、アジュバント関節炎はアンジオテンシンII持続投与高血圧ラットの心機能を低下させる、第52回日本リウマチ学会総会・学術集会、2008年4月23日、札幌
- ⑤ 守田吉孝、アンジオテンシンIIによる血管内皮機能障害はアジュバント関節炎の誘導にて増悪する、第52回日本リウマチ学会総会・学術集会、2008年4月22日、札幌
- ⑥ 作田建夫(代表: 守田吉孝)、高血圧性血管内皮障害は関節炎による全身性炎症にて増悪する—動物モデルを用いた検討—、第18回日本リウマチ学会中国・四国支部学術集会、2007年10月13日、倉敷
- ⑦ 守田吉孝、アジュバント関節炎ラットの血管内皮機能障害と過剰血管酸化ストレスに対するスタチンの効果検討、第51回日本リウマチ学会総会・学術集会、2007年4月27日、横浜

6. 研究組織

(1) 研究代表者

守田 吉孝 (MORITA YOSHITAKA)
川崎医科大学・医学部・講師
研究者番号: 50346441

(2) 研究分担者

佐藤 稔 (SATO MINORU)
川崎医科大学・医学部・講師
研究者番号: 70449891
矢田 豊隆 (YADA TOYOTAKA)
川崎医科大学・医学部・講師
研究者番号: 00210279