

機関番号：24701

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2010

課題番号：19591815

研究課題名（和文）糖尿病・高血圧モデルにおけるスタチンの血管内皮保護作用に及ぼす  
麻酔薬の影響研究課題名（英文）The anesthetic modulation of the protective effect of statin on the  
endothelium function in diabetic and hypertensive animal models.

研究代表者

小川 幸志（OGAWA KOJI）

和歌山県立医科大学・医学部・准教授

研究者番号：30204077

研究成果の概要（和文）：高脂血症であるシンバスタチンを培養内皮細胞に暴露すると NO の産生増加がみられた。この NO の産生はセボフルランの存在下では抑制された。eNOS 蛋白発現を測定したところシンバスタチンによる eNOS 蛋白発現増加はセボフルランにより抑制されたが、eNOSmRNA 発現量は影響されなかった。スタチンの eNOS 発現増加には転写後制御レベルでの効果が影響しており、セボフルランはこの過程を抑制すると推察された。

研究成果の概要（英文）：Exposure of cultured endothelial cells to simvastatin induced NO production. The increase in NO production was significantly inhibited in the presence of sevoflurane. Sevoflurane also inhibited increase in eNOS expression in response to simvastatin, but not eNOSmRNA expression. It is suggested the transcriptional modification of eNOS may be involved in the statin-induced activation of eNOS-NO signaling pathways. Sevoflurane appears to affect this process.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	800,000	240,000	1,040,000
2008年度	800,000	240,000	1,040,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：麻酔科学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・麻酔・蘇生学

キーワード：スタチン、血管内皮細胞、一酸化窒素、揮発性麻酔薬、糖尿病

## 1. 研究開始当初の背景

申請者の属する研究室のメインテーマは血管収縮弛緩機構に及ぼす麻酔薬作用の機序の解明である。このテーマに沿って多くの研究がおこなわれてきたが、本研究申請当時はスタチン服用が本来のコレステロール低下作用とは関係なく、周術期心血管イベントを低下させるとの報告が相次いだ時期であった。このスタチンの血管作用を解明し、麻酔薬の修飾作用を解明することはより安全な周術期管理を行う上で重要と考え

られた。

## 2. 研究の目的

上述の研究背景より、動脈硬化モデルとして自然発症型糖尿病および高血圧ラットを用い、スタチンの短期的および長期投与による内皮機能改善作用に及ぼす麻酔薬の影響とその機序を解明することである。

### 3. 研究の方法

(1) 自然発症2型糖尿病ラット (OLETF: Otsuka Long Evans Tokushima Fatty Rat) を用いての内皮依存性弛緩反応に及ぼすシンバスタチンの影響

① 自然発症2型糖尿病ラット (OLETF) と対照ラット (LETO) をハロタンで麻酔し、断頭致死させた。開胸後胸部大動脈を摘出し、4℃に冷却したクレブスリング液の中で血管内皮を傷害しないように細心の注意を払いながら周囲の結合組織、脂肪を除去した。幅3mmの輪状標本を作成し以下の実験に用いた。

② 標本を混合ガス (酸素95%+炭酸ガス5%) で飽和した37℃のクレブス液中に至適静止張力下に懸垂し、等性張力を測定した。フェニレフリン ( $10^{-7}M$ ) で前収縮させた標本をアセチルコリン ( $10^{-9}$ ~ $10^{-5}M$ ) の累積投与を行い内皮依存性弛緩反応を観察した。

③ シンバスタチン ( $10^{-7}$ ~ $10^{-5}M$ ) をフェニレフリンによる収縮の30分前に前処置した標本を用いてアセチルコリンによる弛緩反応を観察した。

(2) 培養内皮細胞の一酸化窒素 (NO) 産生に及ぼすシンバスタチンの影響

① OLETF、LETO をハロタンで麻酔し、断頭致死させる。開胸後胸部大動脈を摘出する。大動脈標本にコラゲナーゼ type2 処理を行い、内皮細胞を回収する。FBS 添加 D-MEM 培地にて培養し、第2継代のものを試料として用いた。

② 試料を、シンバスタチン ( $10^{-5}M$ ) 存在下および非存在下で DAF-FM DA (NO 蛍光測定試薬) に暴露し、共焦点顕微鏡にて蛍光強度を観察した。

(3) シンバスタチンの培養内皮細胞 NO 産生増加に及ぼすセボフルランの作用

ウシ大動脈内皮細胞 (5~6継代) を用いた。細胞を DAF-FM DA (NO 蛍光測定試薬) に暴露し、セボフルラン 3.4% 存在下あるいは非存在下でシンバスタチン ( $10^{-6}M$ ) による蛍光強度の変化を共焦点顕微鏡下に観察した。

(4) 培養内皮細胞におけるシンバスタチンの eNOS 蛋白発現量に及ぼす作用とセボフルランによる修飾

ウシ大動脈内皮細胞を対照群、シンバスタチン ( $10^{-6}M$ ) に15分間暴露した群、シンバスタチンに加えセボフルラン 3.4%に15分間暴

露した群の3群に分け、各群から細胞抽出液を得た。抗 eNOS 抗体を用い、Western blotting により、eNOS 発現量を測定した。

(5) 培養内皮細胞におけるシンバスタチンの eNOS mRNA 発現に及ぼす作用とセボフルランの影響

ウシ大動脈内皮細胞を対照群、シンバスタチン ( $10^{-6}M$ ) に15分間暴露した群、シンバスタチンに加えセボフルラン 3.4%に15分間暴露した群の3群に分けた。各細胞より High pure RNA isolation kit (Roche applied Science) を用いて mRNA を抽出した。得られた mRNA より Transcriptional first strand cDNA synthesis kit (Roche applied Science) を用いて cDNA を逆転写し、real time PCR により eNOS mRNA を定量した。

### 4. 研究成果

1) ACh による最大弛緩反応は OLETF で  $63 \pm 6\%$  と LETO の  $89 \pm 3\%$  に比し減弱していた ( $P < 0.001$ )。シンバスタチン ( $10^{-5}M$ ) は LETO の ACh 最大弛緩反応には有意な影響を与えなかったが ( $88 \pm 3\%$ )、OLETF では最大弛緩反応を  $77 \pm 6\%$  まで回復させた ( $P < 0.01$ ) (図1)。シンバスタチンのこの作用は濃度依存性であった。

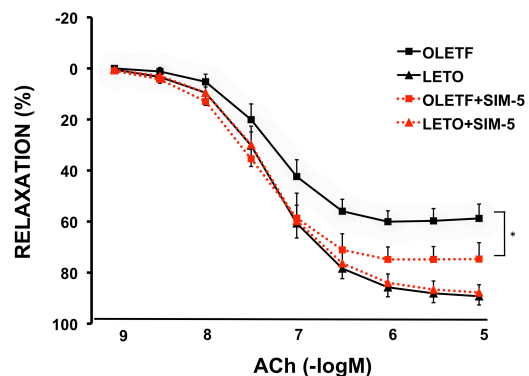


図1: シンバスタチンの内皮依存性弛緩反応に及ぼす影響

2) LETO では ACh ( $10^{-6}M$ ) により NO 産生を示す蛍光強度の増加がみられたが、OLETF では ACh による NO 産生の増加はみられなかった。シンバスタチン ( $10^{-6}M$ ) 存在下では OLETF では ACh による NO 産生が回復した。シンバスタチンは LETO での NO 産生には影響を与えなかった (図2)。

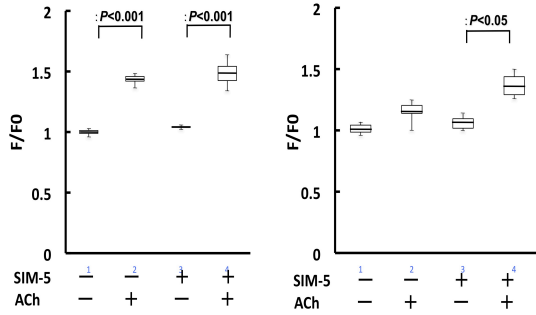


図2 : Ach 惹起 NO 産生に及ぼすシンバスタチンの影響

実験 1) と 2) の結果より糖尿病ラットではアセチルコリン刺激による血管内皮細胞の NO 産生量が低下しており、これが内皮依存性弛緩反応の低下を招来しており、シンバスタチンは低下した NO 産生能を回復させることにより弛緩反応を回復させたと考えられる。スタチンは正常内皮には影響せず、糖尿病のような内皮機能の低下した状態を回復させる作用を有することが示唆された。

3) ウシ大動脈内皮細胞において、シンバスタチン ( $10^{-5}M$ ) は NO 産生量を有意に上昇させた。しかし、セボフルラン 3.4% 存在下では NO 産生量増加は完全に抑制された (図 3)。

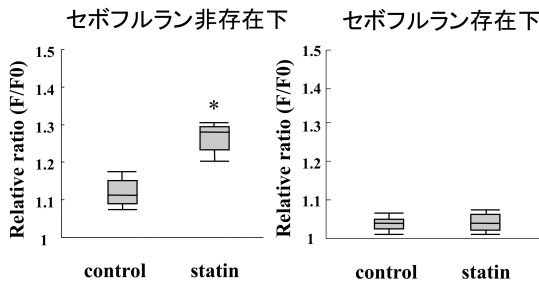


図3 : シンバスタチンによる NO 産生増加作用とそれに及ぼすセボフルランの影響

(4) 培養内皮細胞においてシンバスタチン ( $10^{-6}M$ ) 15 分間暴露は Western blotting 法により測定された eNOS 総蛋白量を増加させた。セボフルラン (3.4%) 存在下ではこの増加は抑制された (図 4)。

また、ser1177 のリン酸化 eNOS 発現量を測定したところ、シンバスタチン ( $10^{-6}M$ ) はリン酸化 eNOS 発現量を増加させた。セボフルラン (3.4%) はこのリン酸化は完全に抑制された (図 5)。

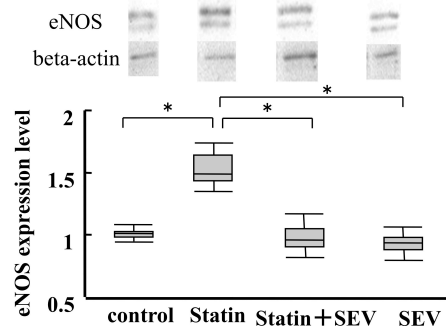


図4 : 総 eNOS 蛋白質発現に及ぼすシンバスタチンおよびセボフルランの効果

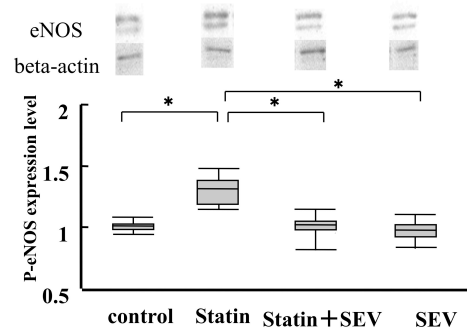


図5 : リン酸化 eNOS 蛋白質発現に及ぼすシンバスタチンおよびセボフルランの効果

(5) 培養内皮細胞においてシンバスタチン ( $10^{-6}M$ ) 15 分間暴露は eNOS mRNA の発現量に有意差な変化を認めなかった。また、セボフルランは eNOS mRNA 発現量に変化を与えなかった (図 6)。

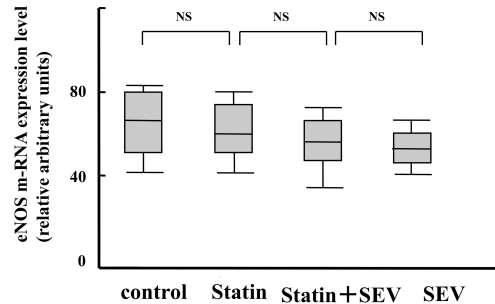


図6 : eNOS mRNA の発現量に及ぼすシンバスタチンおよびセボフルランの作用

シンバスタチンは、総 eNOS 蛋白質、リン酸化 eNOS 蛋白質ともに増加させたが、eNOS mRNA 量には有意差な変化を認めなかった。臨床濃度のセボフルランは、シンバスタチンによる eNOS 蛋白質量と NO 産生量増加を抑制した。

スタチン急性投与の NO 産生量増加の機序として、eNOS 転写後の段階での作用が示唆され、セボフルランはこれらの過程を抑制している可能性がある。

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 6 件)

1. Shimogai M, Ogawa K, Tokinaga Y, Yamazaki A, Hatano Y: The cellular mechanisms underlying the inhibitory effects of isoflurane and sevoflurane on arginine vasopressin-induced vasoconstriction. *J Anesth* 24:893–900, 2010、査読あり

2. Fujii K, Ogawa K, Tokinaga Y, Iranami H, Hatano Y: Sevoflurane does not alter norepinephrine-induced intracellular Ca<sup>2+</sup> changes in the diabetic rat aorta. *Can J Anesth* 57:1095–1101, 2010、査読あり

3. Minonishi T, Ogawa K, Tokinaga Y, Negoro T, Kimoto Y, Hatano Y: Differential vasodilation response to olprinone in rabbit renal and common carotid arteries. *J Anesth* 24: 61-66, 2010、査読あり

4. Qi F, Ogawa K, Tokinaga Y, Uematsu N, Minonishi T, Hatano Y: Volatile Anesthetics Inhibit Angiotensin II-induced Vascular Contraction by Modulating Myosin Light Chain Phosphatase Inhibiting Protein, CPI-17 and Regulatory Subunit, MYPT1 Phosphorylation. *Anesth Analg* 109: 412-417, 2009、査読あり

5. Tokinaga Y, Ogawa K, Yu J, Kuriyama T, Minonishi T, Hatano Y: Mechanism of the ropivacaine-induced increase in intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration in rat aortic smooth muscle. *Acta Anaesthesiol Scand* 51: 1155-1160, 2007、査読あり

6. Ishikawa A, Ogawa K, Tokinaga Y, Uematsu N, Mizumoto K, Hatano Y: The mechanism behind the inhibitory effect of isoflurane on Angiotensin II-induced contraction is different from that of sevoflurane. *Anesth Analg* 105: 97-102, 2007、査読あり

[学会発表] (計 9 件)

1. Tange K, Kawashima K, Tokinaga Y, Ogawa K, Hatano Y: The Effect of Sevoflurane on Simvastatin-Induced eNOS Expression in Cultured Endothelial Cells. 2010 Annual Meeting of American Society of Anesthesiologists. San Diego, USA, 2010.

10. 18

2. 丹下和晃、時永泰行、谷奥匡、平井亜葵、小川幸志、畑埜義雄: 急性シンバスタチン投与による一酸化窒素合成酵素発現に及ぼすセボフルランの影響。日本麻酔科学会第 57 回学術集会、福岡市、2010. 6. 4

3. Sugimoto K, Ogawa K, Tokinaga Y, Tange K, Hatano Y: Simvastatin restores the impaired endothelium-dependent relaxation in diabetic rats. 2009 Annual Meeting of American Society of Anesthesiologists. New Orleans, USA, 2009. 10. 18

4. Tange K, Tokinaga Y, Ogawa K, Hatano Y: Sevoflurane inhibits the increase in statin-Induced endothelial nitric oxide synthase expression. 2009 Annual Meeting of American Society of Anesthesiologists. New Orleans, USA, 2009. 10. 18

5. 時永泰行、小川幸志、木本吉紀、榎野仁奈、阪中容、畑埜義雄: シンバスタチンは糖尿病における内皮依存性弛緩反応低下を回復させる。日本麻酔科学会第 56 回学術集会、神戸市、2009. 8. 16

6. 丹下 和晃、時永泰行、井上真理子、佐古有希子、小川幸志、畑埜義雄: ウシ大動脈内皮細胞における一酸化窒素 (NO) 産生量に対するシンバスタチンの急性効果。日本麻酔科学会第 56 回学術集会、神戸市、2009. 8. 16

7. Tange K, Tokinaga Y, Ogawa K, Kuriyama T, Hatano Y: Acute effect of simvastatin on nitric oxide synthesis in bovine aortic endothelial cells. 2008 Annual Meeting of American Society of Anesthesiologists. Orlando, USA, 2008. 10. 19

8. Shimogai M, Tokinaga Y, Ogawa K, Iranami H, Hatano Y: Volatile anesthetics inhibit AVP-induced vasoconstriction by modulating intracellular Ca<sup>2+</sup> and Rho K. 2008 Annual Meeting of American Society of Anesthesiologists. Orlando, USA, 2008. 10. 19

9. 藤井 啓介、小川幸志、時永泰行、岩橋静江、伊良波浩、畑埜義雄: セボフルランは摘出ラット大動脈のシンバスタチン

による血管弛緩反応を増強する。日本麻酔科学会第 55 回学術集会、横浜市、2008. 6. 12

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小川 幸志 (OGAWA KOJI)  
和歌山県立医科大学・医学部・准教授  
研究者番号：30204077

### (2) 研究分担者

水本 一弘 (MIZUMOTO KAZUHIRO)  
和歌山県立医科大学・医学部・准教授  
研究者番号：50239258  
畑埜 義雄 (HATANO YOSHIO)  
和歌山県立医科大学・医学部・教授  
研究者番号：70115913

### (3) 連携研究者

なし