

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590888

研究課題名(和文) 血管内皮細胞の保護による抗血栓作用についての検討

研究課題名(英文) Antithrombotic action by protection of vascular endothelial cells

研究代表者

石田 英之 (ISHIDA HIDEYUKI)

東海大学・医学部・教授

研究者番号：20222424

研究成果の概要(和文)：

塩化鉄処理 *in vivo* 血栓モデルにおいて nicorandil の抗血栓作用が観察されたが、血小板などの血球成分への nicorandil の抗凝固作用はなかった。このため本研究では、血管内皮細胞の保護による抗血栓作用について nicorandil を用いて検討した。

対照群、nicorandil 群、nicorandil + 5-HD 群、nicorandil + L-NAME (NOS 阻害剤)群を対象として、マウス動脈での塩化鉄処理による血栓形成時間を比較した。また、培養血管内皮細胞を用い eNOS および NO_x 生成への nicorandil の影響を測定した。*in vivo* 血栓モデルでの活性酸素種(ROS)産生は、dihydrorhodamine123 で測定した。塩化鉄処理により動脈内に処理後 12±3 分で大血栓が形成された。nicorandil 群では、大血栓形成までの時間が 55±11 分と延長した。Nicorandil + 5-HD 群では、19±5 分と nicorandil の作用は抑制されたが、nicorandil + L-NAME 群では、28±8 分と有意な抑制はなかった。培養血管内皮細胞において nicorandil 添加による eNOS の mRNA やリン酸化状態および NO_x 産生に変化はなかった。*in vivo* 血栓モデルにおいて塩化鉄処理による ROS の産生は、nicorandil 群で有意に抑制された。Nicorandil の抗血栓作用は、抗血小板作用や硝酸薬作用ではなく内皮細胞の機能障害を改善するためと考えられた。本作用の機序としては、ミトコンドリア ATP sensitive K⁺ channel 開口作用を介してミトコンドリアからの ROS 漏出を抑制する可能性が示唆された。Nicorandil は、ミトコンドリアの ROS 産生抑制を介する内皮細胞保護作用に伴う抗血栓作用の可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：

Although nicorandil has a number of beneficial cardiovascular actions, its effects on endothelial cells in the context of thrombosis have not been elucidated. Therefore, we have examined that antithrombotic action by protection of vascular endothelial cells using nicorandil

Arterial thrombosis was induced by endothelial injury caused by FeCl₃ in the mouse testicular artery. Thrombus growth led to complete occlusion 12 min after endothelial injury in control mice. The antiplatelet agent, nicorandil significantly slowed the growth of thrombi, resulting in arterial occlusion after 55 min. In the absence of endothelial cells, nicorandil did not inhibit platelet aggregation. The beneficial effect of nicorandil was prevented by 5-hydroxydecanoate, but not by L-NAME. The production of reactive oxygen species by FeCl₃ treatment was measured with the specific fluorescent probe, dihydrorhodamine 123. After

FeCl₃ treatment, nicorandil significantly inhibited the increase in fluorescence. In further experiments, incubation of human umbilical vein endothelial cells with nicorandil did not change the endothelial nitric oxide synthase (eNOS) mRNA levels, eNOS phosphorylation or nitrite production.

Nicorandil attenuates FeCl₃-induced thrombus formation in the mouse testicular artery, which suggests that it may inhibit the generation of reactive oxygen species by FeCl₃-treated endothelial cells through activation of the mitochondrial ATP-sensitive potassium channels.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬

科研費の分科・細目：循環器内科学

キーワード：血栓、血管内皮細胞、活性酸素種

1. 研究開始当初の背景

日本人の死因の第二位、第三位を占める心疾患と脳血管疾患の大半は、心臓、脳を灌流する冠状動脈、脳動脈の血栓性閉塞により惹起される心筋梗塞、脳梗塞である。心筋梗塞、脳梗塞などは、アテローム血栓症という単一の疾患概念に統一される。アテローム血栓症の発症には、血液の流動性を保ち、血栓が生じないように機能している血管内皮が傷害されること、あるいはもっと進行した形として内皮の剥離を生じることが必須であると考えられている。しかし、血栓形成の初期のメカニズムに関して、*in vitro* モデルでは従来から十分に研究されていたが、*in vivo* では十分に検討されていない。

2. 研究の目的

アテローム血栓症の発症メカニズムの解明および効率的な予防法の検討のため、マウスの精巣動脈を塩化鉄処理することで血小板血栓が形成される *in vivo* モデルを用いて、血管内皮細胞の保護による抗血栓作用について検討する。

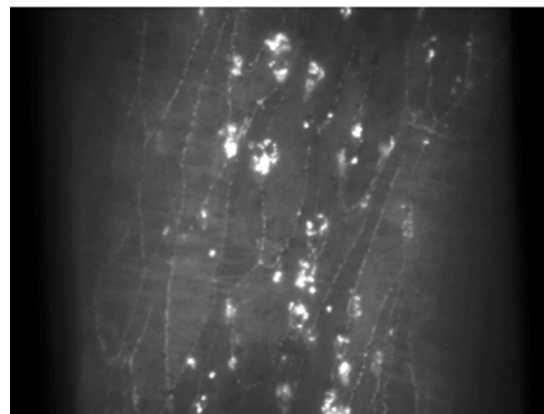
3. 研究の方法

リアルタイム3次元共焦点顕微鏡をもちいることでマウスの精巣動脈内での血小板血栓の形成をリアルタイムで観察できる *in vivo* モデルを確立した。本研究では、この *in vivo* モデルを用いて、血小板血栓形成時の血小板付着と血管内皮細胞の関係

を研究して、血管内皮細胞の保護による抗血栓作用について検討する。

4. 研究成果

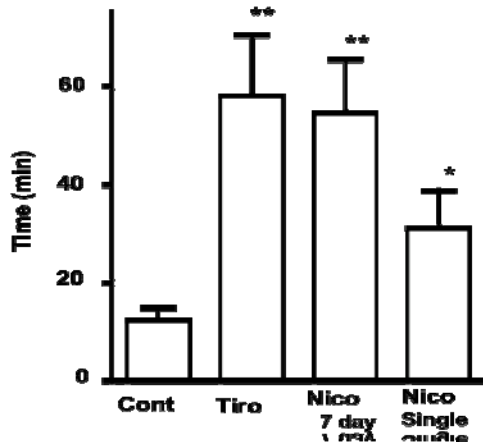
In vivo で血栓を作成する塩化鉄処理後の血小板の付着は、最初に血管内皮細胞の全体に均等に付着するのではなく、細胞の周りの部位に付着した。血管内皮細胞の周りの部位に付着した血小板に他の血小板が付着して血栓が大きくなることが観察された(下図参照)。また、血管を塞ぐ大血栓ができて内皮細胞が存在するがカラー3次元観察により確認できた。



大血栓形成時間

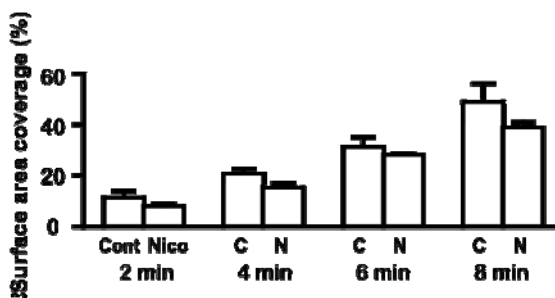
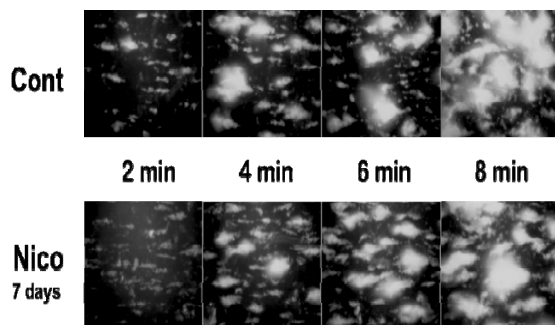
塩化鉄処理により動脈内に処理後12±3

分で大血栓が形成された。nicorandil群では、大血栓形成までの時間が一週間連続投与で 55 ± 11 分、単回投与で 31 ± 8 分と延長した（下図参照）。



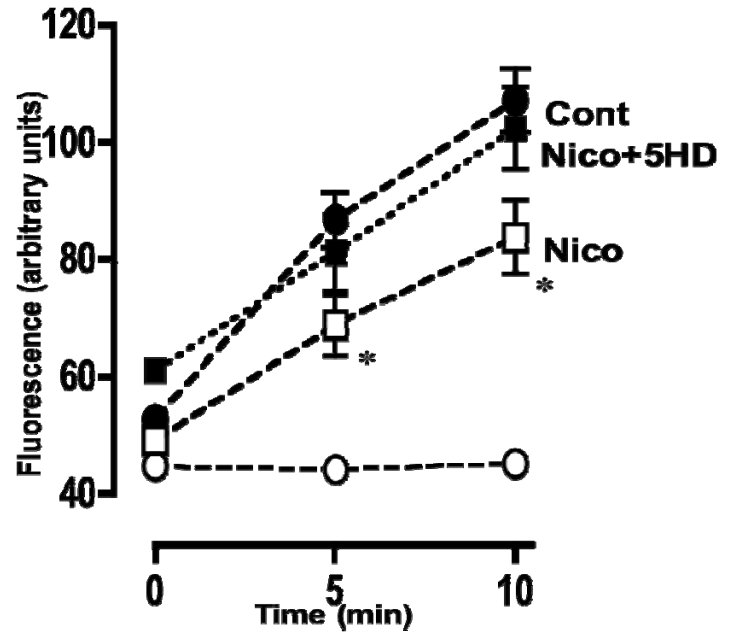
血管内皮細胞の影響

全血を用いた血流下でのコラーゲンシートへの血小板の付着でも、nicorandil投与による血小板付着占有率への影響はなかった（下図参照）。これより、nicorandilが内皮細胞に作用して血栓形成を抑制することがわかった。



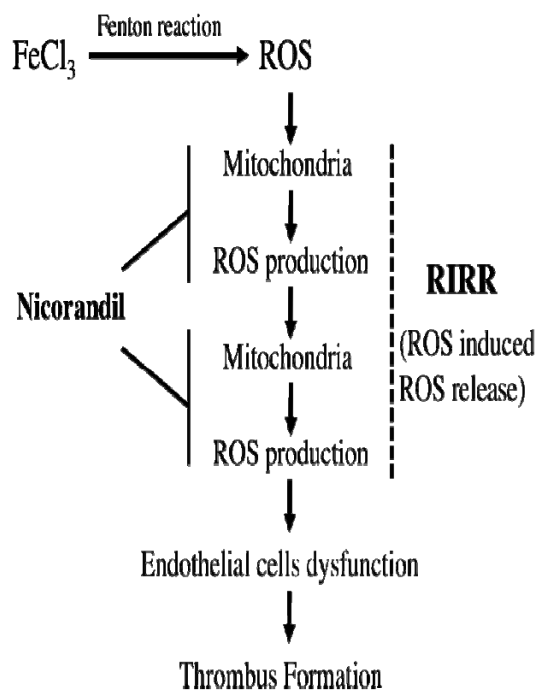
活性酸素種の産生

塩化鉄処理により活性酸素種が産生されることを蛍光指示薬dihydrorhodamine123の蛍光強度の増加で確認した。この活性酸素種の産生を抑制すると、血栓形成も抑制された（下図参照）。



まとめ

これらより、内皮細胞の状態が血栓形成に関係することがわかった（下図参照）。



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) Toda E, Ishida H, T. Aoki T, Urano T, Y. Takahari Y, Tamura N, Goto S. Possible Mechanism of Preventive Effects of Coffee Intake on the Formation of Arterial Occlusive Thrombosis. *Tokai J Exp Clin Med* 2010; 35(4), 133-6

2) Kawamura Y, Takahari Y, Tamura N, Eguchi Y, Urano T, Ishida H, Goto S. Imaging of structural changes in endothelial cells and thrombus formation at the site of FeCl₃-induced injuries in mice cremasteric arteries. *J Atheroscler Thromb* 2009; 16(6), 807-14

3) Eguchi Y, Takahari Y, Higashijima N, Ishizuka N, Tamura N, Kawamura Y, Ishida H, Nicorandil attenuates FeCl₃-induced thrombus formation through the inhibition of reactive oxygen species production. *Circulation J* 2009; 73(3)554-561

4) Tamura N, Kitajima Isao, Kawamura Y, Toda E, Eguchi Y, Ishida H, Goto, S. The important regulatory role of activated platelet-derived procoagulant activity in the propagation of thrombi formed under arterial blood flow conditions. *Circulation J* 2009; 73(3)554-561

5) Izuhara Y, Takahashi S, Nangaku M, Takizawa S, Ishida H, Kurokawa K, Strihou CY, Hirayama N, Miyata T. Inhibition of plasminogen activator inhibitor-1: its mechanism and effectiveness on coagulation and fibrosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2008,28(3) 672-677

6) 江口夕, 雫石正明, 石田英之 Nicorandilの心筋保護作用のメカニズム. *日本臨床麻酔学会誌* 2008, 28(7) 900-6

[学会発表] (計 4 件)

N. TAMURA, H. ISHIDA, S. GOTO, Local distribution of cytosolic calcium ion in platelet forming thrombi on collagen fibrils and von Willebrand factor under controlled blood flow condition
第 22 回国際血栓止血学会 2009.7.11-16

[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]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石田 英之 (ISHIDA HIDEYUKI)

研究者番号:

20222424