

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 28 日現在

機関番号：24701

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2011

課題番号：20791090

研究課題名（和文）スタチン急性投与における内皮機能改善効果に及ぼす麻酔薬の影響

研究課題名（英文）The effect of sevoflurane on simvastatin-induced eNOS expression in cultured endothelial cells.

研究代表者

丹下 和晃（TANGE KAZUAKI）

和歌山県立医科大学 医学部 助教

研究者番号：70405471

研究成果の概要（和文）：ウシ大動脈内皮細胞においてシンバスタチンは適用後非常に早期に細胞内 NO 産生を促進した。また、15 分間の急性シンバスタチン適用は総 eNOS 蛋白質、リン酸化 eNOS 蛋白質ともに増加させた。しかし、セボフルランはスタチンによる総 eNOS 蛋白質、リン酸化 eNOS 蛋白質発現量の増加と NO 産生量の増加を有意に抑制した。

研究成果の概要（英文）：Acute exposure to simvastatin induces a rapid increase in endothelial NO production and that sevoflurane inhibits the statin-induced increase in NO production. Exposure to simvastatin for 15 min induced an increase in eNOS expression in BAECs, and sevoflurane inhibited the increase in statin-induced eNOS expression.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009 年度	600,000	180,000	780,000
2010 年度	600,000	180,000	780,000
2011 年度	600,000	180,000	780,000
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

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：麻酔学

1. 研究開始当初の背景

Rho-kinase は血管内皮と平滑筋に存在している。内皮では Rho-kinase 活性が増加すると、eNOS 活性、発現が抑制され、結果として NO 産生は減少する。平滑筋では、Rho-kinase は平滑筋収縮タンパク質の Ca²⁺感受性を増強し、平滑筋を収縮させる方向に働いている。近年、スタチンは LDL コレステロール低下療法の治療薬として中心的な役割を果たし、臨床で広く用いられている。また、スタチンの

急性、慢性投与において、LDL コレステロール低下作用とは別に、血管内皮由来の培養細胞を用いた実験系や、ヒト上腕動脈を対象として血管内皮機能改善作用が報告されている。スタチンは、HMG-CoA 還元酵素を抑制することにより、Rho-kinase を抑制する。その結果として、eNOS の産生および活性を増加させ、NO を産生し、血管を拡張させることが報告されている。以前、我々は、摘出血管平滑筋を用いて、吸入麻酔薬のセボフルランは Rho-kinase を抑制することを示した。しかし、

スタチンが血管内皮で抑制している Rho-kinase の活性に関して、セボフルランの影響は全く知られていない。

2. 研究の目的

今回、我々は、スタチンによる内皮機能改善作用が、セボフルランでは増強するという仮説をたてた。本研究では、スタチン急性投与培養内皮細胞モデル系を用いて、内皮機能改善作用に対するセボフルランの効果を細胞内シグナル伝達機構の面から明らかにし、内皮、平滑筋を含む血管全体に対する Rho-kinase と麻酔薬の関係を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

ウシ大動脈内皮細胞 (5~6 継代) によるスタチン急性投与培養内皮細胞モデル系を用い、セボフルランの存在下、非存在下において、以下の実験を行った。

(1) 化学発光による NO の計測。

NO 測定用蛍光試薬である DAF-FM DA (Diaminofluorescein-FM diacetyl) 10^{-5} M で培養細胞を負荷した後、リン酸緩衝液 (PBS コントロール群) あるいは 10^{-6} M シンバスタチンを溶解したリン酸緩衝液 (シンバスタチン群) を適用した。

リン酸緩衝液あるいはスタチン溶解液適用直後の輝度 (F0) に対する適用 5 分後の蛍光色素の輝度 (F) を、セボフルラン 3.4% 曝露下、非曝露下でそれぞれ比較検討した。

以降の Western blotting と real time RT-PCR では培養細胞を

- ・ コントロール群
- ・ シンバスタチン 10^{-6} M を 15 分間適用した群
- ・ シンバスタチンの適用に加えセボフルラン 3.4% に 15 分間曝露した群
- ・ セボフルラン 3.4% に 15 分間曝露した群

の 4 群に分けた。

(2) Western blotting による総 eNOS 蛋白質の定量。

上記 4 群の細胞抽出液を試料として、抗 eNOS 抗体を用い Western blotting により総 eNOS 発現レベルを測定した。

β アクチンの発現量で標準化を行った。

(3) Western blotting による Ser1177 がリン酸化された eNOS (Ser1177) 蛋白質の定量。

上記 4 群の細胞抽出液を試料として、抗 eNOS (Ser1177) 抗体を用い Western blotting により Ser1177 がリン酸化された eNOS 蛋白質発現レベルを測定した。
 β アクチンの発現量で標準化を行った。

4. 研究成果

(1) 化学発光による NO の計測。

ウシ大動脈内皮細胞において、シンバスタチン群はコントロール群に比べ、F/ F0 で表される NO 産生量を有意に上昇させた。しかし、セボフルラン 3.4% を曝露した細胞では、シンバスタチン群とコントロール群で F/ F0 で表される NO 産生量に有意差は認めなかった。

(2) Western blotting による総 eNOS 蛋白質の定量。

シンバスタチンを 15 分間適用した群はコントロール群に比べ、有意に総蛋白質質量が増加した。しかし、セボフルラン存在下ではその増加は完全に抑制された。また、セボフルラン単独では総 eNOS 蛋白質質量には影響しなかった。

(3) Western blotting による Ser1177 がリン酸化された eNOS (Ser1177) 蛋白質の定量。

シンバスタチンを 15 分間適用した群はコントロール群に比べ、有意に eNOS (Ser1177) 蛋白質が増加した。しかし、セボフルラン存在下ではその増加は完全に抑制された。また、セボフルラン単独ではリン酸化 eNOS の定量にも有意差は認めなかった。

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 0 件)

[学会発表] (計 3 件)

① The effect of sevoflurane on simvastatin-induced eNOS expression in cultured endothelial cells.
2010 annual meeting of American Society of

Anesthesiologist
2010年10月19日
丹下和晃

② Sevoflurane inhibits the increase in
statin-induced endothelial nitric
oxide synthase expression
2009 annual meeting of American Society of
Anesthesiologist
2009年10月17日
丹下和晃

③ Acute effect of simvastatin on Nitric
Oxide synthesis in bovine aortic
endothelial cells
2008 annual meeting of American Society of
Anesthesiologist
2008年10月21日
丹下和晃

6. 研究組織

(1) 研究代表者

丹下 和晃 (TANGE KAZUAKI)
和歌山県立医科大学 医学部 助教

研究者番号：70405471

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

