

機関番号 : 24701

研究種目 : 基盤研究 (C)

研究期間 : 2009~2011

課題番号 : 21591985

研究課題名 (和文) メタボリック症候群でのヒト血管ストレス機序解明と遺伝子治療および麻酔薬作用の研究

研究課題名 (英文) Mechanisms of oxidative stress in the human arteries from patients with metabolic syndrome and the treatment using a gene therapy

研究代表者

伊良波 浩 (IRANAMI HIROSHI)

和歌山県立医科大学・医学部・臨床教授

研究者番号 : 30193692

研究成果の概要 (和文) : ヒト大網動脈の血管内皮を除去し、長さ 2.5 mm のリング状標本を作成した。この標本を高濃度ブドウ糖群 (25.5 mmol/L) に 60 分間暴露すると、ATP 感受性カリウムチャネル開口薬による拡張反応および過分極反応は抑制された。高濃度ブドウ糖暴露標本では、血管平滑筋細胞内のスーパーオキシドレベルが増大しており、これには、細胞膜での NADPH oxidase サブセット p47phox タンパク発現と F アクチン比率の増大を伴っていることが明らかとなった。

研究成果の概要 (英文) : We prepared arterial rings with 2.5 mm length of human omental arteries without endothelium. Exposure toward a high concentration of D-glucose (22.5 mmol/L) reduced both relaxation and hyperpolarization in response to an ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel opener. In human vascular smooth muscle cells exposed to high glucose, intracellular levels of superoxide in addition to expression of NADPH oxidase subunit p47phox on cellular membrane increased and they were accompanied by the enhanced F-actin ratio in the smooth muscle cells.

交付決定額

(金額単位 : 円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	700,000	210,000	910,000
2010 年度	700,000	210,000	910,000
2011 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
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 : 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

糖尿病、高血圧、高コレステロール血症、高尿酸血症、喫煙などは、冠動脈危険因子として知られている。研究開始当初、これらの個々の病態に加え、メタボリック症候群が、新たな心血管疾患予測危険因子として世界的にクローズアップされていた。すなわち、インスリン抵抗性、内臓脂肪の蓄積、脂質代謝異常および高血圧を一つの症候群としてとらえ、心血管疾患の治療や予防の指標とする概

念である (Arterioscler Thromb Vasc Biol 2008; 28: 629-636)。

それまでの研究により、個々の心血管疾患危険因子を持つ動物モデルでは、ほぼ一様に血管への酸化ストレスが増大することが明らかになりつつある。例えば、強力な血管収縮物質であり、また、本態性高血圧の主因であるアンギオテンシン II は、NADPH oxidase という細胞内の酸化還元酵素活性を介し動物血管での酸化ストレスを増大させる (Am J

Physiol 2007; 292: C82-C97)。しかし、それぞれの心血管疾患危険因子が、どのような細胞内機序でこの酵素活性を増大させるかについては明らかでなかった。特に、メタボリック症候群は種々の病態を複合的に評価する概念であることから、この症候群を忠実に反映するモデル動物を作成することは困難であり、そのため、メタボリック症候群が、個々の病態以上に血管へストレスを与え、血管反応性を抑制するか否かについては知見がえられていなかった。

一方、動物モデルで常に議論となる点として、動物疾患モデルによる研究結果が、ヒト血管にそのまま適合するかどうかという問題がある。摘出可能なヒト血管を研究に使用できればよいが、ヒト血管を研究目的のみで採取することは倫理上問題がある。そのため、心血管疾患危険因子と実際のヒト血管反応性の関係は、大部分明らかにされていなかった。この問題を解決するために、申請者らは胃癌手術で摘出される大網内の血管に着目した。大網は、胃癌手術では胃病変部と共に摘出されるが、胃標本およびリンパ節を病理組織診断のため取り除いた後に廃棄される。したがって、これら血管に富む廃棄部分を研究に使用することは、倫理上の異論はなく患者の了解を得やすいと考えた。

体内で発生した炎症反応は、サイトカイン遊離を促し血管への酸化ストレスを増大させ、また逆に、酸化ストレスは血管での炎症反応を惹起することが、一部の動物モデルで明らかになった (Am J Physiol 2007; 292: H2073-H2082)。しかし、炎症で発生するサイトカインがどのような細胞内機序で、ヒト血管への酸化ストレスを増大させるかに関しては知見がない。さらに、サイトカインが、メタボリック症候群患者の血管でより強く酸化ストレスを増大させ、ヒト血管の反応性を抑制するか否かは明らかでなかった。一方、これまでの疫学的な研究により、糖尿病では感染症罹患率が増大し、特に麻酔・集中治療を受ける重症患者の予後を悪化させることが明らかとなった (Diabetologia 2007; 50: 549-554)。高血糖は、酸化ストレスを惹起し血管反応性を抑制するとされているが、サイトカインと高濃度ブドウ糖が相乗的にヒト血管酸化ストレスを増大させるか否かは検討されていなかった。

## 2. 研究の目的

本研究では、胃癌手術患者より摘出したヒト大網動脈を用いて以下の仮説を明らかにすることを目的とした。すなわち、1) 摘出ヒト血管で高濃度ブドウ糖およびサイトカイン暴露による酸化ストレスが、血管平滑筋機能を抑制しそれぞれが相乗的な抑制作用を発揮すること、2) この抑制の機序に NADPH oxidase

酵素活性が関与していること、3) NADPH oxidase 活性化の機序に細胞骨格の変化が呼応していること、4) メタボリック症候群患者と健常人とで、以上の血管内酸化ストレス惹起カスケードにどのような違いがあること、5) 細胞骨格と関連がある NADPH oxidase のコンパートメントに対する siRNA の適用はヒト血管を酸化ストレスの影響から保護すること、6) 麻酔薬もこれらの酵素機能を細胞骨格変化により抑制するがその作用には麻酔薬間で相違があること、という以上 6 つの仮説を検証することを当初の目的とした。

## 3. 研究の方法

手術患者より摘出された大網つきの胃標本を直ちにクレブス液に入れ 9°C に冷却保存する。本研究で使用する標準的クレブス液中の D-ブドウ糖濃度は、5.5 mmol/L (99 mg/dl) とする。病理組織標本を確保したのち、残り的大網を摘出 2 時間以内に 9°C に冷却のまま搬送する。現有の実体顕微鏡を用い、外径 0.8-1.2 mm のヒト大網動脈を摘出後、長さ 2.5 mm のリング状標本とする (ウエスタンブロッティングには各 3 cm ずつ用いる)。サンドペーパーで表面を粗にした 26 ゲージ針を血管内に一度通し、内皮細胞を除去する (Arterioscler Thromb Vasc Biol 2004; 24: 2290-2295)。

静止張力 1.2g を付加した血管をトロンボキサナアナログ U46619 ( $3 \times 10^{-8}$  mol/L) で収縮させ、ATP 感受性カリウムチャネル開口薬レブクロマカリム ( $10^{-8}$ - $10^{-5}$  mol/L)、電位依存性カルシウムチャネル阻害薬ジルチアゼム ( $10^{-7}$ - $10^{-4}$  mol/L) あるいは一酸化窒素ドナー NOC-7 ( $10^{-9}$ - $10^{-6}$  mol/L) の累積適用を行い、用量反応曲線を得る。ATP 感受性カリウムチャネル阻害薬グリベンクラミド ( $10^{-6}$  mol/L) の影響を観察する。

3 mol/L の KCl で満たしたガラス電極をマイクロマニピュレータで保持し観察チャンバーに入れた摘出血管に刺入する。現有のアンプ、レコーダを用いて平滑筋膜電位を測定する。レブクロマカリム ( $10^{-5}$  mol/L) による過分極反応とそれに及ぼすグリベンクラミド ( $10^{-6}$  mol/L) の影響を観察する。

ヒト血管平滑筋内タンパク発現を検討する。内皮細胞内での NADPH oxidase 各サブセットのうち、特に細胞内スーパーオキシドの産生の鍵を握ると考えられる p47phox の細胞膜分画レベルを検討する。これが有意に変化しない場合は、NOX1、NOX2、NOX4 および Rac-1 を評価する。

血管をコンパウンドで封埋後、-20°C に冷却して凍結する。凍結後現有のスライサーで 20  $\mu$ m の厚さのスライス標本作製する。スライドガラス上の標本にヒドロエチジン ( $2 \times 10^{-6}$  mol/L) を 20 分間適用する。その後、

現有の共焦点顕微鏡で 585 nm の波長で赤色蛍光を観察する。ヒドロエチジンは細胞内に発生したスーパーオキシドと結合し酸化されて臭化エチジンを産生する。

スライス標本に、細胞骨格のうち F アクチンフィラメント、アクチン結合タンパクであるコルタクチンおよび NADPH oxidase サブセット p47phox を免疫組織学的に評価する。二次抗体に標識する蛍光色素を赤色 (Alexa-594) と緑色 (Alexa-488) を適宜組み合わせ、共焦点顕微鏡によるライブセルイメージングで、コルタクチンや p47phox の動態と F アクチンの構造変化との関連を評価する。

さらに、当初は p47phox に対する siRNA および scrambled siRNA (ネガティブコントロール) を 1 標本あたり 0.1  $\mu$ mol/L 使用する計画をしていた。

これらの実験を正常ブドウ糖群あるいは高濃度ブドウ糖群 (2 種類)、正常 IL-6 群、低濃度 IL-6 群あるいは高濃度 IL-6 群 (3 種類)、高濃度ブドウ糖と低濃度 IL-6 群あるいは高濃度 IL-6 群の組み合わせ (2 種類) について繰り返す計画であった。

#### 4. 研究成果

メタボリック症候群のない患者手術患者より摘出された大網つきの胃標本を直ちにクレブス液に入れ 9°C に冷却保存した。

外径 0.8-1.2 mm のヒト大網動脈を摘出後、長さ 2.5 mm のリング状標本とした。正常ブドウ糖群 (5.5 mmol/L) あるいは高濃度ブドウ糖群 (25.5 mmol/L) に 60 分間暴露した後、U46619 ( $3 \times 10^{-8}$  mol/L) で血管を収縮させ、ATP 感受性カリウムチャンネル開口薬レブクロマカリム ( $10^{-8}$ - $10^{-5}$  mol/L) の用量反応曲線を得た。高濃度ブドウ糖暴露は、この開口薬による拡張反応を有意に抑制した。さらにこれら処置血管に対して、3 mol/L の KCl で満たしたガラス電極をマイクロマニピュレータで保持し観察チャンバーに入れた摘出血管に刺入し、血管平滑筋膜電位を測定した。等尺性張力変化測定の結果に一致し、高濃度ブドウ糖暴露血管ではレブクロマカリムによる過分極反応は有意に抑制された。

正常ブドウ糖群 (5.5 mmol/L) あるいは高濃度ブドウ糖群 (25.5 mmol/L) に 60 分間暴露した後、-80°C で保存した。保存した標本を用いて、後日ヒト血管平滑筋内での NADPH oxidase 各サブセットのタンパク発現レベルを検討した。その結果、高濃度ブドウ糖暴露により、特に細胞内スーパーオキシドの産生の鍵を握ると考えられる p47phox の細胞膜分画レベルが増大していることが明らかになった。さらに、高濃度ブドウ糖へ 60 分間暴露した直後の血管をコンパウンドで封埋

後、-20°C に冷却し作成した 20  $\mu$ m の厚さのスライス標本では、ヒドロエチジン ( $2 \times 10^{-6}$  mol/L) 20 分間適用後にえられる 585 nm 波長での赤色蛍光が増強しており、これらの血管平滑筋でのスーパーオキシドの産生増大も証明できた。

次いで、4% パラホルムアルデヒドで固定した血管スライス標本で、細胞膜構成物質アダプチンおよび NADPH oxidase サブセット p47phox を免疫組織学的に評価したところ、細胞膜での p47phox タンパク発現を裏付ける画像所見をえた。次いで、同様に作製したスライス標本に、細胞骨格のうち F アクチンフィラメントおよび G アクチンフィラメントを免疫組織学的に評価した。二次抗体に標識する蛍光色素を赤色 (Alexa-594) と緑色 (Alexa-488) を適宜組み合わせ、共焦点顕微鏡によるライブセルイメージングで、F および G アクチンの比率を評価したところ、高濃度ブドウ糖暴露により、F アクチン比率が高まることが明らかになった。

現在までに、IL-6 と高濃度ブドウ糖の相乗作用を繰り返し検討したが、IL-6 追加による影響は認められなかった。本研究期間を通じ、免疫染色時の各種薬剤の使用量や暴露時間の最適化までに時間を要したこと、胃がん手術が内視鏡手術主体となり、大網が得られる頻度が激減したことで、結果としてメタボリック症候群患者からの標本での検討は行えないままであること、さらに、以上の時間的、物質的理由により siRNA 投与実験に至っていないことが当初の計画とは異なることとなった。siRNA 実験については、今後、所属機関の資金を使用して考慮する予定である。

#### 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 7 件)

- ① 木下浩之: 高血糖病態が血管平滑筋機能に及ぼす影響. 循環制御 査読あり 2011; 32: 3-9
- ② 木下浩之: 『静脈麻酔薬の作用機序: 受容体と細胞内シグナル伝達機構』プロボフォーラム. Anesthesia 21 Century 査読なし 2011; 13: 4-10,
- ③ 木下浩之: 酸化ストレスからみた臓器保護: 心不全と酸化ストレス. 日本臨床麻酔学会雑誌 査読あり 2011; 31: 116-123,
- ④ 木下浩之: ホスファチジルイノシトール 3-キナーゼ-Akt 経路と血管病態生理. Anesthesia 21 Century 査読なし 2010; 12: 2309-2316,
- ⑤ Haba M, Hatakeyama N, Kinoshita H, Teramae H, Azma T, Hatano Y, Matsuda

N: The modulation of vascular ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel function via phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway activated by phenylephrine. J Pharmacol Exp Ther 査読あり 2010; 334: 673-678

- ⑥ 木下浩之: 血管への酸化ストレスと麻酔薬. 麻酔 査読あり 2009; 58: S101-S108
- ⑦ Habu M, Kinoshita H, Matsuda N, Azma T, Hama-Tomioka K, Hatakeyama N, Yamazaki M, Hatano Y: The beneficial effect of propofol on arterial adenosine triphosphate-sensitive K<sup>+</sup> channel function impaired by thromboxane. Anesthesiology 査読あり 2009; 111: 279-286

[学会発表] (計6件)

- ① Kinoshita H, Matsuda N, Iranami H, Azma T, Yamazaki M: Isoflurane protects ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels from oxidative stress caused by high glucose in the human artery. 2011 Annual Meeting of American Society of Anesthesiologist, Chicago, IL, USA, October 15-19, 2011
- ② 木下 浩之: 酸化ストレスが血管反応に及ぼす作用と麻酔薬、日本麻酔科学会第58回学術集会、兵庫県神戸市、2011.5.19-21
- ③ 木下 浩之、松田 直之、東 俊晴、畠山 登、伊良波 浩、山崎 光章: イソフルランは高濃度ブドウ糖による酸化ストレスからヒト ATP 感受性カリウムチャネル機能を保護する、日本麻酔科学会第58回学術集会、兵庫県神戸市、2011.5.19-21
- ④ Kinoshita H, Matsuda N, Hatakeyama N, Iranami H, Hatano Y: Isoflurane protects human ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels from oxidative stress induced by high glucose. 2010 Annual Meeting of American Society of Anesthesiologist, San Diego, CA, USA, October 16-20, 2010
- ⑤ 木下 浩之、松田 直之、東 俊晴、畠山 登、中畑 克俊、畑埜 義雄: 高濃度ブドウ糖で抑制されたヒト大網動脈 ATP 感受性カリウムチャネル機能に及ぼす細胞骨格制御の効果。日本麻酔科学会第57回学術集会、福岡県福岡市、2010年6月3-5日
- ⑥ Kinoshita H, Hatakeyama N, Hatano Y: The Role of Cytoskeleton in Vascular ATP-Sensitive K<sup>+</sup> Channel Function Modified by High Glucose. 2009 Annual Meeting of American Society of

Anesthesiologist, New Orleans, LA, USA, October 17-21, 2009

[その他]

ホームページ等

<http://www.wakayama-med.ac.jp/med/anesthesiology/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

伊良波 浩 (IRANAMI HIROSHI)  
和歌山県立医科大学・医学部・臨床教授  
研究者番号: 30193692

### (2) 研究分担者

木下 浩之 (KINOSHITA HIROYUKI)  
和歌山県立医科大学・医学部・准教授  
研究者番号: 70291490

### (3) 研究連携者

東 俊晴 (AZMA TOSHIHARU)  
埼玉医科大学・医学部・講師  
研究者番号: 60284197  
畠山 登 (HATAKEYAMA NOBORU)  
愛知医科大学・医学部・教授  
研究者番号: 70251907