

## 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 6 月 21 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21591986

研究課題名（和文）スタチンによる血管内皮傷害に対する急性期改善作用機序の解明

研究課題名（英文）The mechanisms of the effect of statin on acute improvement of endothelial dysfunction

研究代表者

瀬藤 容子 (SETO YOKO)

和歌山県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：30433353

研究成果の概要（和文）：高脂血症治療薬であるシンバスタチンは、糖尿病モデルラットの培養血管内皮細胞の一酸化窒素（NO）の産生を増加させた。内皮型 NO 合成酵素（eNOS）タンパク発現を測定したところシンバスタチンによる eNOS タンパク発現増加は PI<sub>3</sub>K 阻害薬により抑制されたが、Akt のリン酸化はシンバスタチンに影響されなかった。スタチンの eNOS 発現増加には、PI<sub>3</sub>K から Akt を介さない経路での NO 産生増加機序の関与が示唆された。

研究成果の概要（英文）：In diabetes model, simvastatin exposure to cultured endothelial cells increased the nitric oxide (NO) production. PI<sub>3</sub>K inhibitor inhibited the increase in eNOS expression in response to simvastatin, but phosphorylation of Akt protein was not affected by simvastatin. It is suggested that direct effect of PI3K without through Akt protein pathway may be involved in the statin induced activation of eNOS-NO signaling pathways.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：スタチン、糖尿病、一酸化窒素、内皮型一酸化窒素合成酵素、Phosphoinositole 3-kinase、Akt タンパク質

## 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った。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 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl (HMG)-CoA 還元酵素阻害薬（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。高脂血症治療薬であるスタチンは、脂質低下作用以外に内皮細胞機能改善効果を有するが、その機序については明らかにされていなかった。このスタチンの血管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2型糖尿病ラットを用い、スタチンの急性投与による内皮機能改善作用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ラット: 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 (OLETF) ラットと対照 (LETO: Long-Evans Tokushima Otsuka) ラット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ゲル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4mm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、等尺性張力を測定した。フェニレフリン (10<sup>-7</sup>M) で前収縮させた標本にアセチルコリン (10<sup>-9</sup>~10<sup>-5</sup>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<sup>-7</sup>~10<sup>-5</sup>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ラットおよびLETOラット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<sup>-5</sup>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) 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

OLETFラットより摘出し培養した内皮細胞を対照群、シンバスタチン (10<sup>-6</sup>M) に15分間暴露した群、シンバスタチンに加えPI3K阻害薬であるLY-294002 (10<sup>-5</sup>M) 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。

### (4) 培養内皮細胞におけるシンバスタチンの Akt 発現率に及ぼす影響

OLETFラットおよびLETOラットから単離した培養血管内皮細胞にシンバスタチン (10<sup>-6</sup>M) を適用したのち、アセチルコリン (10<sup>-6</sup>M) を適用した。その後BD Phosflow™ Lyse/Fix Buffer を用いて細胞を固定し、BD Phosflow™ Perm Buffer III を用いて細胞膜透過処理を行い、蛍光標識抗体である抗リン酸化AKTモノクローナル抗体で細胞を染色したのち、フローサイトメーターによる解析を行った。

## 4. 研究成果

(1) AChによる最大弛緩反応はOLETFラットで63±6%とLETOラットの89±3%に比し減弱していた (P<0.001)。シンバスタチン (10<sup>-5</sup>M) はLETOラットのACh最大弛緩反応には有意な影響を与えなかったが (88±3%)、OLETFラットでは最大弛緩反応を77±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。

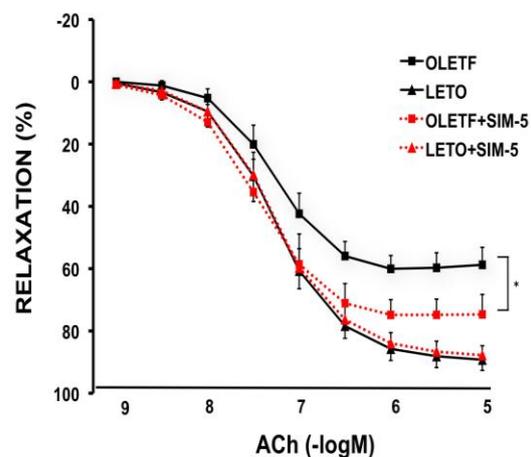


図1: シンバスタチンの内皮依存性弛緩反応に及ぼす影響

(2) LETO ラットでは 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 ラットでは 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 ラットでは Ach による NO 産生が回復した。シンバスタチンは LETO ラットでの NO 産生には影響を与えなかった (図 2)。

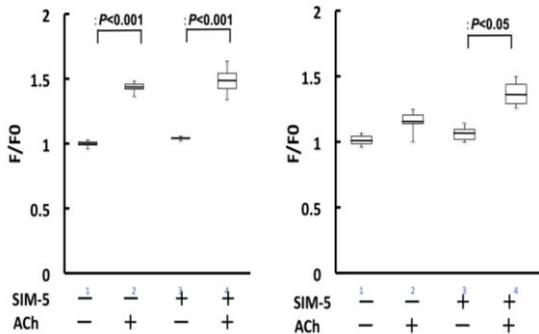


図 2 : LETO ラットおよび OLETF ラットにおける Ach 惹起 NO 産生に及ぼすシンバスタチンの影響

これらの実験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いていること、および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) OLETF ラットより摘出し培養した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 総タンパク量を増加させた。PI3K 阻害薬である LY-294002 の存在下ではこの増加は抑制された (図 3、4)。

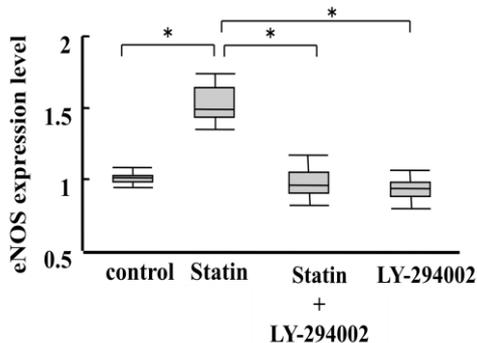


図 3 : 総 eNOS タンパク質発現に及ぼすシンバスタチンおよび LY-294002 の効果

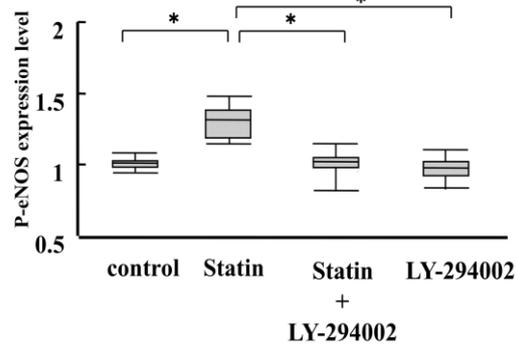


図 4 : リン酸化 eNOS タンパク質発現に及ぼすシンバスタチンおよび LY-294002 の効果

(4) LETO ラットと OLETF ラットでは、AKT のリン酸化は LETO ラットで高頻度であり、OLETF ラットでは抑制されていた。しかし、シンバスタチンの適用は、OLETF ラットにおける活性化 AKT の発現率に影響を与えなかった。

シンバスタチンは、総 eNOS タンパク質、リン酸化 eNOS タンパク質ともに増加させ、PI3K 阻害薬はシンバスタチンによる eNOS 増加を抑制した。しかし、Akt のリン酸化はシンバスタチンによって影響されなかった。

スタチン急性投与の NO 産生量増加の機序として、PI3K から Akt を介さずに NO 産生量を増加させる機序での作用が示唆されたが、その同定には至らなかった。

## 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 3 件)

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

2. 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

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

〔学会発表〕（計 1 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.

6. 研究組織

(1)研究代表者

瀬藤 容子 (SETO YOKO)

和歌山県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：30433353

(2)研究分担者

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