

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592247

研究課題名(和文)血管平滑筋細胞における分化・増殖の分子基盤の解析

研究課題名(英文) Intracellular signaling of proliferation and differentiation in vascular smooth muscle cells

研究代表者

熊澤 昌彦 (KUMAZAWA, Masahiko)

岐阜大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：10303504

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：静脈麻酔薬は手術中のみならず集中治療領域においても使用され、数日にわたり投与されることもある。静脈麻酔薬が直接血管平滑筋に影響を与えることは知られているが、長期に使用された時の平滑筋細胞の遊走に及ぼす影響は未だ知られていない。

静脈麻酔薬が血管平滑筋細胞の遊走にあたる影響を検討した、結果プロポフォルとミダゾラムがp38 MAP kinaseを介して血管平滑筋細胞の遊走に関与していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)： Intravenous anesthetics are used during the perioperative and/or postoperative period in critically ill patients. Intravenous anesthetics are firmly established to have direct effects on vascular smooth muscle cells. In the present study, we investigated the effects of intravenous anesthetics on PDGF-BB-induced VSMC migration and the mechanism. Our results strongly suggest that propofol or midazolam inhibits VSMC migration by PDGF-BB via suppression of p38 MAPK activation. Propofol or midazolam may affect VSMC function in critically ill patients.

研究分野：麻酔・疼痛治療

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：血管平滑筋細胞 動脈硬化 創傷治療 静脈麻酔薬 細胞内情報伝達

1. 研究開始当初の背景

(1)血管傷害が起こると、種々のサイトカインや増殖因子、酸化ストレス等の影響によって、収縮型の平滑筋細胞は増殖型に形質転換する。これは、血管傷害に対する適応現象の一つとして機能すると考えられるが、一方では、病的新生内膜や動脈硬化の一因となっている(=脱分化)。脱分化現象の解明や、血管再生治療における機能血管再生など様々な臨床的課題に対する基盤として、平滑筋細胞の発生・分化・増殖の分子メカニズムを明らかにすることはきわめて重要である。

(2)手術・全身麻酔は生体に多大なストレスを負荷する。特に、心臓・大血管・脳血管の手術は直接血管に傷害を与えることとなる。直接の機械的刺激による傷害に加えて、手術・麻酔によるストレス時には、norepinephrine、serotonin、dopamineなどのカテコラミンやモノアミンが増加し血管攣縮、内皮細胞の傷害とそれに引き続く組織傷害が生じる。

(3)周術期のβ遮断薬の使用が、術後長期にわたり心血管イベントを減少するとの報告(Mangano DT. *et al.* New Eng J Med 1996)がなされたことから判るように、心血管イベントを含め、手術後の長期予後をよりよくするために、周術期の血管の機能とそのメカニズム解明を行うことは今後の麻酔科領域の発展に必須である。

2. 研究の目的

(1)培養血管平滑筋細胞において、細胞増殖因子が、血管平滑筋細胞の分化・増殖を誘導する細胞内情報伝達機構を検討する。

(2)全身麻酔薬が培養血管平滑筋細胞の分化・増殖に与える影響を検討し、その細胞内情報伝達機構を検討する。

(3)実験動物(ラット、ラビット)において、喫煙が脳血管あるいは脊髄血管に与える影響とそのメカニズムを検討する。また、喫煙による血管への有害事象を予防する薬剤を検討する。

3. 研究の方法

(1)培養血管平滑筋細胞(細胞株および初代培養)を用いて、PDGF、TGF-β、AP、ET-1、AVP、thrombin、A-II、S-1-Pなどの血管作動物質が、細胞の分化・増殖・アポトーシスに及ぼす影響とその機序を明らかにする。

(2)全身麻酔薬(sevoflurane、isoflurane、propofol、midazolam、dexmedetomidine、remifentanylなど)を含め、周術期に使用される薬剤が血管作動物質による細胞の分化・増殖・アポトーシスに及ぼす影響とその機序を明ら

かにする。

(3)喫煙モデルの実験動物に cranial window あるいは spinal window を作成する。ACh を window 内に局所投与し、脳血管・脊髄血管径を測定する。周術期に使用する薬剤を全身投与し、脳・脊髄血管に与える影響と作用機序を検討する。

4. 研究成果

(1)1、ラットの cranial window において、脳血管は内皮依存性血管拡張物質である ACh の window 内投与により拡張したが、ラットに喫煙をさせると脳血管は ACh により収縮した。2、禁煙補助薬として使われる varenicline (ニコチン作動性 ACh 受容体拮抗薬)の全身投与により喫煙ラットにおける ACh による脳血管収縮は抑制された。以上より、喫煙は血管内皮による脳血管拡張作用を障害し、varenicline は喫煙による内皮機能障害を予防する可能性が示唆された。

(2)1、血管平滑筋細胞(A10細胞)において、PDGF-BB は AMPK- をリン酸化した。2、compound C (AMPK の阻害薬)は PDGF-BB による A10細胞の遊走を抑制した。3、PDGF-BB は AMPK の下流の基質である acetyl CoA carboxylase のリン酸化を促進し、そのリン酸化は compound C により抑制された。4、AMPK- の down regulation により、PDGF-BB による A10細胞の遊走は抑制された。5、c-Raf、MEK 1/2、p44/p42 MAP kinase は PDGF-BB によりリン酸化され、そのリン酸化は compound C で抑制された。PI3K、Akt は PDGF-BB によりリン酸化され、そのリン酸化は compound C で抑制された。6、AICAR(AMPK の活性化物質)は A10細胞の遊走を促進した。AICAR により Akt の Ser473 残基はリン酸化されたが、Thr308 残基および p44/p42 MAP kinase はリン酸化されなかった。7、PD98059 (MEK 1/2 の阻害薬)は、PDGF-BB による p44/p42 MAP kinase のリン酸化を抑制したが Akt のリン酸化には影響しなかった。LY294002 (PI3K の阻害薬)は、PDGF-BB による Akt のリン酸化を抑制したが p44/p42 MAP kinase のリン酸化に影響しなかった。以上より、PDGF-BB は AMPK の活性化を介して、p44/p42 MAP kinase 経路と PI3K/Akt 経路をそれぞれ独立して活性化し、血管平滑筋細胞の遊走を制御していると考えられた。

(3)1、喫煙ラットの cranial window において、nicorandil の全身投与下では ACh の window 内投与により脳血管を拡張した。2、nicorandil 投与前の glibenclamide (K⁺ channel blocker) 投与により、この nicorandil による反応は消失したが、L-NAME (NOS 阻害薬)によっては影響を受けなかった。以上より、喫煙は血管内皮による脳血管拡張作用を障害し、nicorandil は喫煙による血管

内皮機能障害を予防する可能性が示唆された。また、この nicorandil の血管内皮機能保護作用は K⁺ channel を介している と推測された。

(4)1. 静脈麻酔薬の propofol、midazolam は PDGF-BB による A10 細胞、ヒト血管平滑筋初代培養細胞の遊走を抑制したが、dexmedetomidine と ketamine は影響しなかった。2. propofol、midazolam は PDGF 受容体のリン酸化に影響しなかった。3. propofol、midazolam は PDGF-BB による p44/p42 MAP kinase、SAPK/JNK、Akt のリン酸化に影響しなかったが、p38 MAP kinase のリン酸化を抑制した。4. dexmedetomidine と ketamine は PDGF-BB による p38 MAP kinase のリン酸化に影響しなかった。以上より、propofol、midazolam は血管平滑筋細胞の遊走を抑制することが示された。これらによる遊走抑制は p38 MAP kinase のリン酸化抑制が関与することが示唆された。

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 4 件)

1 Iida M, Tanabe K, Kozawa O, Iida H: Differential effects of intravenous anesthetics on PDGF-BB-induced vascular smooth muscle cell migration. Cell Physiol Biochem 査読有 2014 In Press

2 Iida M, Tanabe K, Matsushima-Nishiwaki R, Kozawa O, Iida H: Adenosine monophosphate-activated protein kinase regulates platelet-derived growth factor-BB-induced vascular smooth muscle cell migration. Arch Biochem Biophys. 査読有 530, 83-92, 2013

3 Iwata K, Iida H, Iida M, Takenaka M, Tanabe K, Fukuoka N, Uchida M: Nicorandil protects pial arterioles from endothelial dysfunction induced by smoking in rat. J Neurosurg Anesthesiol. 査読有 25, 392-398, 2013

4 Iida M, Iida H, Takenaka M, Tanabe K, Iwata K: Preventive effect of varenicline on impairment of endothelial function in cerebral vessels induced by acute smoking in rats. J Anesth. 査読有 26, 928-931, 2012

[学会発表](計 4 件)

1 岩田賢治、田辺久美子、飯田宏樹、Effects

of topical and intravenous JM1232(-) on cerebrovascular reactivity in rats. American Society of Anesthesiologists 2012 Annual Meeting、2012.10.13-17、Washington

2 道野朋洋、熊沢昌彦、田辺久美子、飯田宏樹、Pial Arteriolar Vasoconstriction After Unclamping of Abdominal Aortic Cross-Clamp is Not Associated With Obvious Cerebral Endothelial Dysfunction. American Society of Anesthesiologists 2012 Annual Meeting、2012.10.13-17、Washington

3 飯田美紀、田辺久美子、飯田宏樹、プロポフォルが周術期血管障害に与える影響 - platelet-derived growth factor-BB による血管平滑筋細胞の遊走能を指標にして -、日本麻酔科学会第 60 回学術集会、2013.05.23-25、札幌

4 飯田美紀、田辺久美子、飯田宏樹、Inhibitory effects of propofol or midazolam on PDGF-BB-induced vascular smooth muscle cell migration. Euroanesthesia、2014.05.31-06.03、Sweden

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

熊澤 昌彦 (KUMAZAWA, Masahiko)
岐阜大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：(10303504)

(2)研究分担者

田辺 久美子 (TANABE, Kumiko)
岐阜大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：(30402209)

飯田 宏樹 (IIDA, Hiroki)
岐阜大学・医学部附属病院・教授
研究者番号：(30159561)

(3)連携研究者

()

研究者番号：