

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 24 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462444

研究課題名(和文) 内皮グリコカリックスの障害および麻酔薬による保護作用の検討

研究課題名(英文) The restoring effect of anesthetics on damaged-endothelial glycocalyx

## 研究代表者

時永 泰行 (Tokinaga, Yasuyuki)

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号：60438281

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：血管内皮細胞の内膜面にはグリコカリックスとよばれる糖鎖の層が存在し、透過選択性のある防護壁として、局所濃度調節領域として、物理的刺激的シグナル伝達経路の一部として働いている。グリコカリックスの保護に関して、内皮依存性弛緩反応における麻酔薬の効果を明らかにした報告はない。本研究では、グリコカリックス障害時の内皮依存性弛緩反応における麻酔薬の効果を明らかにすることを目的とした。本研究からラット大動脈標本にシアリダーゼを適用し、その後の内皮依存性弛緩反応が抑制されることを認め、その抑制がセボフルランを暴露することにより改善することを認めた。

研究成果の概要(英文)：The healthy vascular endothelium is coated by endothelial glycocalyx that has several functions including an inert barrier, active reservoir, and mechanotransduction. From the viewpoint of preserve endothelial glycocalyx, the effect of anesthetics on endothelium-dependent vasodilation remains unclear. This study investigated the effect of anesthetics on endothelium-dependent vasodilation when endothelial glycocalyx damaged. Endothelium-dependent vasodilation was significantly inhibited by sialidase which digests glycocalyx component. Sevoflurane restored this inhibition of endothelium-dependent vasodilation significantly.

研究分野：麻酔科学

キーワード：グリコカリックス 麻酔薬

1. 研究開始当初の背景

血管内皮細胞の内膜面にはグリコカリックスとよばれる糖鎖の層が存在し、多様な機能をもつ(1, 2)。グリコカリックスはおよそ0.5から3 $\mu$ mの厚さがあり、糖タンパク質、プロテオグリカン、および、グリコサミノグリカンにより構成されている。グリコカリックスの機能は、第1に透過選択性のある防護壁として、第2に酵素、補酵素、液性伝達物質(例えば、extracellular superoxide dismutase, antithrombin III, anticoagulant heparansulphates)の局所濃度調節領域として、第3にシェアストレスといった物理的刺激のシグナル伝達経路の一部として働いている(図1)。また、糖鎖の層は血管以外においても、機能をもつことが示されている(3)。グリコカリックス構成要素の一つでもある polysialic acid が brain-derived neurotrophic factor (BDNF) と複合体を形成し、BDNF は polysialic acid と結合後、細胞表面の受容体と結合し作用を示す、すなわち、polysialic acid は細胞表面で局所的 BDNF 濃度の調節に関与している。

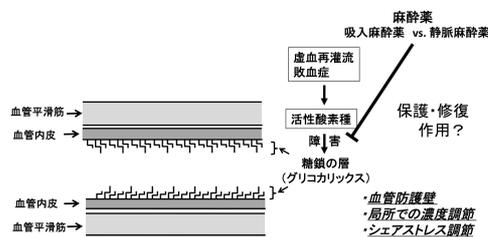


図1 血管内皮におけるグリコカリックス

グリコカリックスに対する障害は、虚血再還流時(4)敗血症、炎症に伴う Tumor necrosis factor (TNF) - (5) lipopolysaccharide (LPS) に暴露された時、動脈硬化、糖尿病による血管病変の一環として、さらに、hypervolemia によって起きる(6)。これらのグリコカリックスの障害には活性酸素種の関与が示されている(7)。グリコカリックスの保護に関して、Hydrocortisone の投与(8) albumin の投与(9)、ラジカルスカベンジャーの投与(10) normovolemia の維持といった方法(5)が試みられているが、一般化された方法は未だない。一方、麻酔薬のグリコカリックスに対する効果として、ブタ心臓の Langendorff model において、虚血によるグリコカリックスの障害をセボフルランが抑制することが示されている(11)。

引用文献

(1) Broekhuizen LN, Mooija HL, Kasteleina JJP, et al. Endothelial glycocalyx as potential diagnostic and therapeutic target in cardiovascular disease. *Current Opinion in Lipidology* 2009; 20:57-62  
 (2) Pahakis MY, Kosky JR, Dull RO, et al. The Role of Endothelial Glycocalyx

Components in Mechanotransduction of Fluid Shear Stress. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007; 355(1): 228-233

(3) Chappell D, Dörfler N, Jacob M, et al. GLYCOCALYX PROTECTION REDUCES LEUKOCYTE ADHESION AFTER ISCHEMIA/REPERFUSION. *SHOCK*, 2010; 34(2): 133-139  
 (4) Kanato Y, Kitajima K, Sato C. Direct binding of polysialic acid to a brain-derived neurotrophic factor depends on the degree of polymerization. *Glycobiology* 2008; 18 (12):1 044-1053  
 (5) Chappell D, Kiefer KH, Jacob M, et al. TNF- $\alpha$  induced shedding of the endothelial glycocalyx is prevented by hydrocortisone and antithrombin. *Basic Res Cardiol* 2009; 104:78-89  
 (6) Becker BF, Chappell D, Bruegger D, et al. Therapeutic strategies targeting the endothelial glycocalyx: acute deficits, but great potential. *Cardiovascular Research* 2010; 87:300-310  
 (7) Kumagai R, Lu X, Kassab GS. Role of Glycocalyx in Flow-Induced Production of Nitric Oxide and Reactive Oxygen Species. *Free Radic Biol Med.* 2009; 47(5): 600-607  
 (8) Chappell D, Jacob M, Kiefer KH, et al. Hydrocortisone Preserves the Vascular Barrier by Protecting the Endothelial Glycocalyx *Anesthesiology* 2007; 107:776-84  
 (9) Kozar RA, Peng Z, Zhang R, et al. Plasma Restoration of Endothelial Glycocalyx in a Rodent Model of Hemorrhagic Shock *Anesth Analg* 2011; 112:1289-95  
 (10) Bruegger D, Rehm M, Jacob M, et al. Exogenous nitric oxide requires an endothelial glycocalyx to prevent postischemic coronary vascular leak in guinea pig hearts. *Critical Care* 2008; 12:R73  
 (11) Annecke T, Chappell D, Chen C, et al. Sevoflurane preserves the endothelial glycocalyx against ischaemia-reperfusion injury. *Br J Anaesth* 2010; 104: 414-21

2. 研究の目的

グリコカリックスに関して、内皮依存性弛緩反応における麻酔薬の効果を明らかにした報告はない。本研究では、麻酔薬は、グリコカリックスの障害を抑制することにより、内皮依存性弛緩反応を保護する効果があるという仮説をたて、グリコカリックス障害時の内皮依存性弛緩反応における麻酔薬の効果を明らかにすることを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) 等尺性張力変化の測定

Wistar 雄性ラットより胸部下行大動脈リング状標本を調製し、標本を 95% 酸素-5% 二酸化炭素でバブリングしたクレスリンゲル液中に懸垂する。3 × 10<sup>-7</sup> M フェニレフリンを適用し収縮を得た後、10<sup>-6</sup> M アセチルコリンを適用し、内皮依存性血管弛緩反応を計測する。標本をクレス液で洗浄し、糖鎖分解酵素 (Sialidase、37、30 分間) あるいは過酸化水素処理 (37、8 分間) し、洗浄後、再び 3 × 10<sup>-7</sup> M フェニレフリンを適用し収縮を得た後、10<sup>-6</sup> M アセチルコリンを適用し、内皮依存性血管弛緩反応を計測する。糖鎖分解酵素処理、過酸化水素処理の前後での内皮依存性血管弛緩反応を比較する (1)。

#### (2) グリコカリックス障害の組織化学的検討

Wistar 雄性ラットより胸部下行大動脈リング状標本を調製し、標本を 95% 酸素-5% 二酸化炭素でバブリングしたクレスリンゲル液中に懸垂する。糖鎖分解酵素処理 (Sialidase、0、10<sup>-3</sup>、2 × 10<sup>-3</sup>、4 × 10<sup>-3</sup> (units/ml)、37、30 分間) あるいは、過酸化水素処理 (0、10<sup>-4</sup>、3 × 10<sup>-4</sup>、10<sup>-3</sup> (M)、37、8 分間) し、切片標本作製し、組織化学的染色を行い、共焦点顕微鏡によりグリコカリックスの層の厚さを比較する (2)。

### 引用文献

- (1) Ogawa K, Tokinaga Y, Iwahashi S, et al. Halothane does not protect against vascular injury in isolated cerebral and mesenteric arteries. *Can J Anaesth.* 2005; 52(8):870-7
- (2) Ebong EE, Macaluso FP, Spray DC, et al. Imaging the Endothelial Glycocalyx In Vitro by Rapid Freezing/Freeze Substitution Transmission Electron Microscopy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011; 31:1908-1915

### 4. 研究成果

本研究からラット大動脈標本にシアリダーゼを適用し、その後の内皮依存性弛緩反応が抑制されることを認め (図 2)、その抑制がセボフルランを暴露することにより改善することを認めた (図 3)。

内皮グリコカリックス障害を検討するにあたり、過酸化水素処理の条件は、10<sup>-3</sup> M、37、8 分間が最も適していることを見いだした。

内皮グリコカリックス障害を観察するために、ラット大動脈の凍結標本を用いて、糖鎖に特異的に結合する FITC 標識したレクチンにより染色を行った。蛍光顕微鏡、共焦点顕微鏡のいずれでも内皮グリコカリックスの観察が可能であった (図 4)。

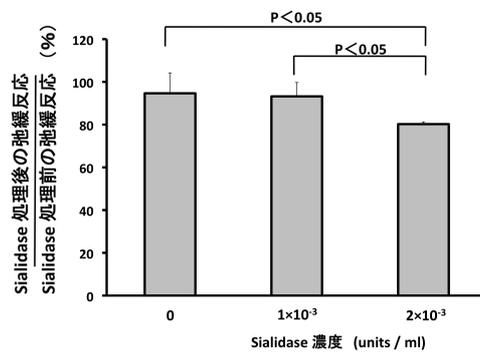


図2 内皮依存性弛緩反応のSialidase 処理前後での変化 (n=6)

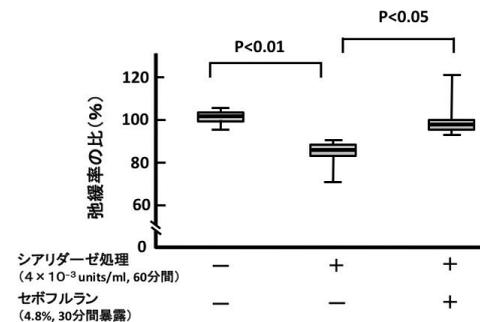


図3. シアリダーゼ処理による内皮依存性弛緩抑制に対するセボフルラン暴露の影響 (n=6)  
弛緩率の比 (%) = シアリダーゼ処理後の弛緩率 / シアリダーゼ処理前の弛緩率

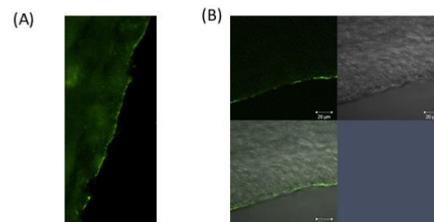


図4. FITC標識レクチンを用いた内皮グリコカリックスの観察  
(A) 蛍光顕微鏡、(B) 共焦点顕微鏡

### 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)

[学会発表] (計 5 件)

Kazuma S, Tokinaga Y, Takada Y, Hayashi S, Azumaguchi R, Kimizuka M, Yamakage M. Effect of albumin on the attenuation of endothelium-dependent vasodilation of rat aorta treated by sialidase. The annual meeting of the American Society of Anesthesiologists. San Diego, USA. Oct. 24-28, 2015.

Kazuma S, Tokinaga Y, Takada Y, Hayashi S, Azumaguchi R, Kimizuka M, Yamakage M. Both desflurane and sevoflurane inhibit endothelium-dependent vasodilation

by different mechanisms. The annual meeting of the American Society of Anesthesiologists. San Diego, USA. Oct. 24-28, 2015.

Kazuma S, Tokenaga Y, Takada Y, Hayashi S, Yamakage M. Desflurane as well as sevoflurane inhibits endothelium-dependent vasodilation by a different mechanism. The annual meeting of the American Society of Anesthesiologists. New Orleans, USA. Oct. 11-15, 2014

本間舞子, 時永泰行, 数馬聡, 林俊輔, 山蔭道明: 内皮グリコカリックス障害による血管内皮依存性弛緩作用の抑制に及ぼすセボフルランの影響. 日本麻酔科学会北海道・東北支部第5回学術集会(弘前) 2015.9.12.

数馬聡, 時永泰行, 高田幸昌, 林俊輔, 山蔭道明: デスフルランはセボフルランと異なる機序で血管内皮依存性弛緩反応を抑制する(優秀演題). 日本麻酔科学会第4回北海道・東北支部学術集会(札幌) 2014.9.1.

〔図書〕(計1件)

時永泰行、山蔭道明 医歯薬出版株式会社 医学のあゆみ 2015 299-300

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

時永 泰行 (Tokenaga Yasuyuki)

札幌医科大学 医学部 助教

研究者番号: 60438281

### (2) 研究分担者

枝長 充隆 (Edanaga Mitsutaka)

札幌医科大学 医学部 講師

研究者番号: 70616169