

機関番号：17401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008 ～ 2010

課題番号：20591835

研究課題名（和文）ストレス惹起インスリン抵抗性による血管内皮障害への新しい治療戦略

研究課題名（英文） New treatment strategies for vascular endothelial damage due to stress-induced insulin resistance

研究代表者

杉田 道子 (SUGITA MICHIKO)

熊本大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：70305019

研究成果の概要（和文）：ストレス惹起インスリン抵抗性血管内皮障害に対するRAS阻害剤（ファルネシルトランスフェラーゼ阻害剤）の治療への可能性を評価した。血管内皮障害は、ストレス惹起インスリン抵抗性における重要臓器障害の主要因である。一方HMG-CoA還元酵素阻害剤（スタチン）のlipid-lowering-independent effectがタンパクのファルネシル化抑制とされている。ファルネシルトランスフェラーゼ阻害剤で血管内皮障害を抑制できれば、さらにはスタチンの血管内皮障害治療への期待も広がることになる。重症疾患モデルとしてLPSマウスを用いた。雄性C57BL6マウスにLPS30mg/kg腹腔内投与し、その後RAS 阻害剤であるFTI-277を腹腔内投与した。LPS投与から18時間後、上下行大動脈を採取し実験に供した。また処置後6日間観察を継続した。FTI277投与は有意に生存率を向上させた。ファルネシルトランスフェラーゼ阻害薬は血管内皮細胞における酸化ストレスを抑制し、臓器血流維持により生存率を向上させることが示唆され、治療薬としての可能性に期待ができる。

研究成果の概要（英文）：RAS inhibitors (farnesyltransferase inhibitor) on stress-induced insulin resistance and vascular endothelial damage were evaluated for therapeutic potential. Vascular endothelial damage is a major cause of organ failure in critical stress-induced insulin resistance. Meanwhile HMG-CoA reductase inhibitor (statin) lipid-lowering-independent effect is the suppression of protein farnesylation. If you can inhibit the vascular endothelial damage in the security inhibitor of farnesyltrans and more will be expected to spread to statin therapy in vascular endothelial damage. LPS mice as a model for critical disease. C57BL6 mice intraperitoneally administered LPS30mg/kg, FTI RAS inhibitor was administered intraperitoneally and then 18 hours after administration of LPS, experiments were subjected to the ascending aorta were taken down. Observation was continued for six days after the procedure. FTI277 administration has significantly improved the survival rate. Farnesyltransferase inhibitor suppresses oxidative stress in endothelial cells, is suggested to improve survival by maintaining organ blood flow can be expected as a potential therapeutic agent.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：麻酔・蘇生学

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：インスリン抵抗性、血管内皮障害

1. 研究開始当初の背景

周術期には外科的侵襲などのストレスによりインスリン抵抗性の亢進を生じ、surgical diabetes と呼ばれる耐糖能異常を引き起こす。特に敗血症、熱傷などの critical illness の状態においてはインスリン抵抗性の増加、hyperglycemia により、易感染性や創傷治癒遅延をはじめ心筋障害、血管障害、肝腎障害など主要臓器にさまざまな障害をもたらす。そのため周術期患者および重症患者における血糖コントロールの重要性については多くの報告がある (Van den Berghe et al. *Diabetes* 55:3151-59, 2006, 2006)、一方でそのコントロール法については未だ議論的であり明確な見解は得られていない。また血糖の変動自体が重症患者において酸化ストレスを増加し、血管内皮障害を引き起こす可能性も示唆されている (Egi M et al. *Anesthesiology* 105:244-52, 2006)。血管内皮障害はインスリン抵抗性による臓器不全の主要因とされており、早期の病態解明が待たれるところである。血管内皮機能は健常者においては NO やエンドセリン-1 (ET-1) に司られているが、インスリン抵抗性の状態では酸化 LDL や Nitrosative stress が Ras-ERK 経路を介して、血管内皮障害を増悪させている可能性がある (Clavreul N et al. *ATVB* 26:2454-61, 2006 図 1)。Ras を血管細胞に導入すると、下流シグナル分子である ERK を活性化し、細胞老化や炎症性のサイトカインの発現が亢進する。HMG-CoA 還元酵素阻害剤の lipid-lowering-independent effect がタンパクのファルネシル化抑制とされている。FPTase の阻害剤で血管内皮障害を

抑制できれば、さらにはスタチンの血管内皮障害治療への期待も広がることになる。

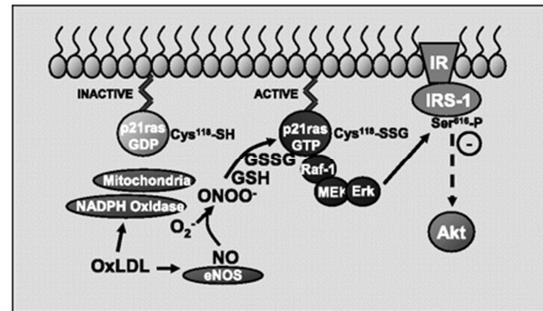


図 1

2. 研究の目的

本研究の目的はストレス惹起インスリン抵抗性血管内皮障害に対する RAS 阻害剤 (ファルネシルトランスフェラーゼ阻害剤) の治療戦略への可能性を評価することである。

3. 研究の方法

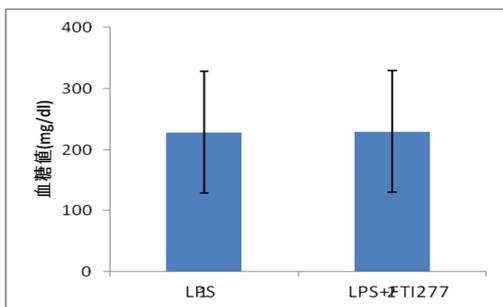
重症患者モデル動物を用い RAS 阻害剤投与による血管収縮弛緩反応、血管内皮細胞内シグナルトランスダクションの変化について検討した。重症患者モデルとして LPS マウスを用いた。6 週齢雄性 C57BL6 マウスに LPS30mg/kg 腹腔内投与し、その後 RAS 阻害剤である FTI-277 15mg/kg を腹腔内投与した。LPS 投与から 18 時間後、ペントバルビタールにて麻酔、瀉血後上下行大動脈を採取し実験に供した。①摘出した下行大動脈を、直ちにクレブス・リンゲル液に保存した。実体顕微鏡下に付着組織を剥離除去し、長径 3~4mm のリング標本を作成した。4ml 容量のオーガンバス中にリング標本を吊るし、一端を圧トランスデューサーに接続する。0.5g の基礎張力をかけた後、フェニレフリンの用量依

存反応曲線、その後にアセチルコリンによる内皮依存性血管弛緩反用量依存曲線を記録した。②PBSにて灌流固定後大動脈（大動脈起始部、上下行大動脈）を取出し速やかにOCTコンパウンド内で液体窒素にて冷却し凍結切片を作成した。各種抗体にて免疫染色およびDihydroethidiumを用いてスーパーオキシド産生を調べた。

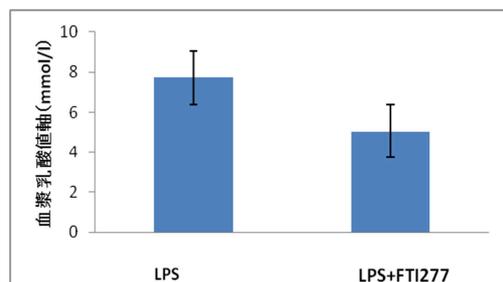
（実験方法の修正）Ras阻害剤として当初manumycinを用いていたが、最近FTI-277の有用性を示す報告が相次いだため、FTI-277に変更することとした。但しFTI-277は非常に高価であるため、ラットへの投与は不可能であった。そのためモデル動物をマウスに変更し、それに伴いストレス惹起をLPSへ、また内皮細胞の単離やタンパクの抽出が難しくなるため、これらの検討は免疫染色で行うこととした。

4. 研究成果

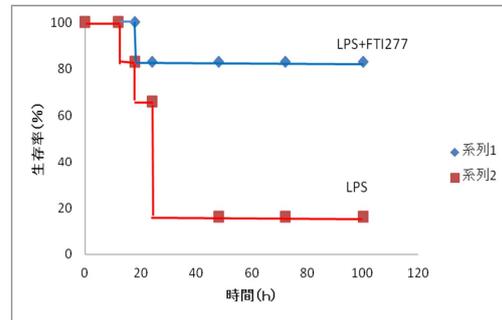
1) LPS投与マウスは18時間後に高血糖状態に陥っておりインスリン抵抗性が生じているものと考えられた。FTI-277の投与では血糖値に有意な差は認めなかった。



2) 血清乳酸値はLPS投与により上昇し乳酸アシドーシスを呈し、臓器血流障害が生じて



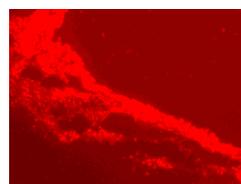
いることが示唆された。FTI-277は乳酸値上昇を抑制し、臓器血流維持に寄与していると思われた。



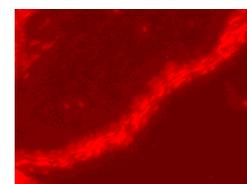
3) LPS、FTI-277投与後、6日間の追跡調査を行ったところ、生存率はFTI-277投与群で有意に改善した。

4) 血管弛緩収縮反応についてはLPS投与により血管弛緩反応は低下したもののFTI-277による明らかな変化は認めなかった。

5) スーパーオキシド産生についてはLPSで増加するがFTI-277はその産生を抑制した。FTI-277の投与はストレスにより惹起された血管内皮細胞の酸化ストレスを抑制し、臓器血流を改善しその他の機序（免疫能の改善など）とともに生存率を劇的にしたものと考えられる。



LPS



LPS+FTI277

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 2 件)

1. Sugita M, Sugita H, Kim M, Mao J, Yasuda Y, Habiro M, Shinozaki S, Yasuhara S, Shimizu N, Martyn JA, Kaneki M. Inducible nitric oxide synthase deficiency ameliorates skeletal muscle insulin resistance but does not alter unexpected lower blood glucose levels after burn injury in C57BL/6 mice *Metabolism*. 61(1):127-36. 2012 (査読あり) in press
2. Taguchi H, Ichinose K, Tanimoto H, Sugita M, Tashiro M, Yamamoto T. Stroke volume variation obtained with Vigileo/FloTrac™ system during bleeding and fluid overload in dogs. *J Anesth*. 25(4):563-8. 2011 (査読あり)

[学会発表] (計 2 件)

- ① 問端 朋、杉田道子、山本達郎、胸腔鏡下肺切除術後疼痛に対する 0.25%レボブピバカインと 125%レボブピバカインの硬膜外投与の効果、日本麻酔科学会第 57 回学術集会、平成 22 年 6 月 4 日、福岡市、福岡国際会議場
- ② 中村彩加、杉田道子、問端朋、大塚賀子、山本達郎、胸腔鏡下肺切除術後疼痛に対する 0.25%、0.125%、0.0625%レボブピバカイン硬膜外投与効果の比較、日本麻酔科学会九州地方会、平成 22 年 9 月 25 日、福岡市、福岡県中小企業振興センター

6. 研究組織

(1) 研究代表者

杉田 道子 (SUGITA MICHIKO)
熊本大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：70305919