

機関番号：37604

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790104

研究課題名 (和文) 糖尿病患者の冠動脈バイパス血管の長期開存を目指して (薬理的検討)

研究課題名 (英文) Pharmacological studies on responsiveness of 5-hydroxytryptamine to overcome perioperative spasm of coronary artery bypass graft in diabetes mellitus

研究代表者

鳥取部 直子 (TOTORIBE NAOKO)

九州保健福祉大学・薬学部・講師

研究者番号：70322576

研究成果の概要 (和文): 糖尿病患者の冠動脈バイパス血管において、セロトニン 2A (5-HT_{2A}) およびセロトニン 1B (5-HT_{1B}) 両受容体が存在し、この受容体を介した血管反応性が增大していること、また、そのメカニズムに、細胞内情報伝達経路の一つである Rho/Rho キナーゼ経路が関与していることを薬理的に明らかとした。さらに、インスリンは、5-HT の血管反応性を減弱させることを見出した。本研究結果は、糖尿病患者のバイパス術後のれん縮予防、さらには、血小板-血栓性塞栓・狭窄改善を目指した、有用な基礎的・薬理的知見を提供するものと思われる。

1. 研究成果の概要 (英文): Diabetes mellitus (DM) could enhance 5-HT-induced vasocontraction via the activation of 5-HT_{2A} and 5-HT_{1B} receptors of the human internal thoracic artery (ITA) and saphenous vein (SV). The enhanced vasocontractions to 5-HT in DM were mediated by the activation of Rho/Rho kinase pathways. Insulin inhibited 5-HT-induced vasocontraction in SV. These results indicate the useful pharmacological findings to prevent 5-HT-induced vasospasm when the human ITA and SV from patients with DM were used as an arterial graft.

交付決定額

(金額単位: 円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	500,000	150,000	650,000
2010 年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,100,000	330,000	1,430,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：薬理学

1. 研究開始当初の背景

虚血性心疾患は心筋虚血により発症する心筋障害であり、狭心症と心筋梗塞に代表される。これら冠動脈疾患の主な外科的手術として冠動脈バイパス手術が行われるが、使用する血管の術中および術後の血管れん縮の防止と術後の血栓性閉塞・狭窄の軽減が動脈

の長期開存率ならびに予後の良好な長期成績結果をもたらすとされている。研究代表者は、H19年度～H20年度の科学研究費補助金 (若手研究B) の採択研究において、バイパスグラフト血管の長期開存を目指すことを目的として、血小板由来の生理活性物質の一つであるセロトニン (5-HT) に着目し、そ

のグラフト血管反応性と各種 5-HT 受容体拮抗薬の影響、さらには、グラフト血管（内胸動脈）に存在する 5-HT 受容体の同定を行った（課題番号：19790082, 研究課題名：長期開存を目指したヒト冠動脈バイパス血管の薬理的検討）。その結果、ヒト内胸動脈において、5-HT_{2A} 受容体および 5-HT_{1B} 受容体の発現が確認され、血管れん縮に関与していることが明らかとなり、内胸動脈を使用する冠動脈バイパス手術の術中および術後の血管れん縮予防には、5-HT_{2A} 受容体拮抗薬に加えて 5-HT_{1B} 受容体拮抗薬併用が有用となる可能性を示唆した。

このようなバイパスグラフト血管反応性を検討する中で、申請者は、試料提供者のうち糖尿病群において、非糖尿病群に比較して 5-HT の血管反応性が有意に増強していることを見出し、さらにこの糖尿病群の血管反応性増強作用には、5-HT_{2A} および 5-HT_{1B} 受容体の両者が関わっていることを示唆した。このことから、糖尿病患者の冠動脈バイパス手術の術中および術後の血管れん縮予防には、特に、5-HT 受容体に対する拮抗薬が有効である可能性が示唆されるとともに、そのサブタイプは、5-HT_{2A} 受容体と 5-HT_{1B} 受容体の両者に対して拮抗作用を示すものが有用となる可能性が示唆される。現在、血管れん縮防止・予防薬として塩酸パパベリンと Ca²⁺拮抗薬が使用されている。塩酸パパベリンは血管機能障害の誘発、Ca²⁺拮抗薬は著効を示さないことから、代用できる血管れん縮防止・予防薬の探索が切望されている。さらに、糖尿病は、バイパスグラフト血管の長期開存率を低下させるリスクファクターとして知られていることから、糖尿病患者の冠動脈バイパス術中および術後の血管れん縮を防止し、バイパスグラフト血管の長期開存を目指した薬理的な検討が必要である。

2. 研究の目的

以下の3点を本研究の目的とする。

- (1) 近年、冠動脈バイパス手術で多用されているグラフト血管（大伏在静脈）における 5-HT 血管反応性と各種 5-HT 受容体拮抗薬の影響および 5-HT 受容体の同定
- (2) 糖尿病群におけるグラフト血管の 5-HT 血管反応性増強のメカニズムの解明
- (3) インスリンと 5-HT との関連性

3. 研究の方法

ヒト内胸動脈および大伏在静脈は、宮崎県立延岡病院心臓血管外科（延岡市）および、くわばら医院（宮崎市）にて、冠動脈

バイパス手術のためのグラフト材料、または、下肢静脈瘤切除術にて摘出された血管の不用部位を使用した。また、これらはいずれも、試料提供者の書面による同意を得たものを使用した。摘出された血管は Krebs-Henseleit 液（栄養液）に保存し水中にて直ちに本学に移送、実験に供した。これらグラフト血管の処置に関しては、これまでの報告 (Gao Y.J., Yang H., Teoh K., Lee R.M. (2003) Detrimental effects of papaverine on the human internal thoracic artery. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **126**, 179-185) に従って行った。

(1) 摘出リング状標本における張力変化の測定

ヒト内胸動脈および大伏在静脈のリング状標本を Krebs-Henseleit 液を満たしたマグナス管内に懸垂し、張力変化をアナログ・デジタル変換器（8チャンネルの Power Lab）を用いて等尺性に記録した。また、5-HT_{2A} と 5-HT_{1B} 受容体拮抗薬、Rho キナーゼ阻害薬およびインスリンは、30分前から処置させて使用した。

(2) ヒト大伏在静脈に存在する 5-HT_{2A} および 5-HT_{1B} 受容体の同定・確認

5-HT_{2A} および 5-HT_{1B} 受容体に対する抗体を用い、免疫組織学的手法により、大伏在静脈平滑筋細胞に存在する 5-HT 受容体を同定し、確認した。

4. 研究成果

(1) グラフト血管（大伏在静脈）における 5-HT 血管反応性と各種 5-HT 受容体拮抗薬の影響および 5-HT 受容体の同定

① ヒト大伏在静脈において、5-HT による収縮反応が確認され、その収縮に対し、サルポグレラート (5-HT_{2A} 受容体拮抗薬) および SB224289 (5-HT_{1B} 受容体拮抗薬) が有意に抑制作用を示すことを明らかとした (図1)。

② ヒト大伏在静脈における 5-HT の収縮反応に対し、サルポグレラートおよび SB224289 の両者を併用すると、その収縮反応がほぼ完全に抑制されることを明らかとした (図1)。

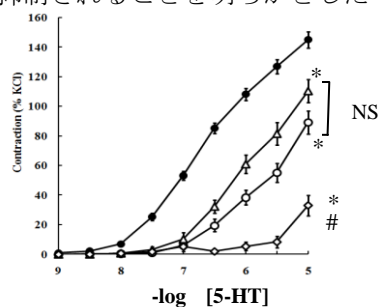


図1. ヒト大伏在静脈における 5-HT による収縮反応に対するサルポグレラート(5-HT_{2A} 受容体拮

抗薬) および SB224289 (5-HT_{1B} 受容体拮抗薬) の影響

[1.0 μmol/L sarpogrelate (○), 1.0 μmol/L SB224289 (△) or a combination of 1.0 μmol/L sarpogrelate plus 1.0 μmol/L SB224289 (◇). (●), control. *P<0.05 compared with control, #P<0.05 compared with sarpogrelate or SB224289 alone; NS, no significant difference. Two-way ANOVA with multiple comparison using Turkey test.]

③ ヒト大伏在静脈における 5-HT 受容体の存在の有無について、免疫組織学的手法を用いて検討したところ、ヒト大伏在静脈平滑筋細胞に 5-HT_{2A} および 5-HT_{1B} 受容体サブタイプが存在することを確認した (図2)。

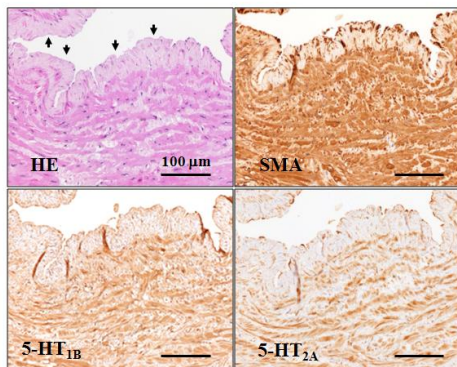
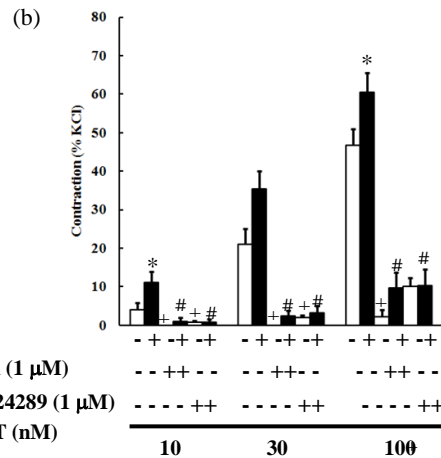
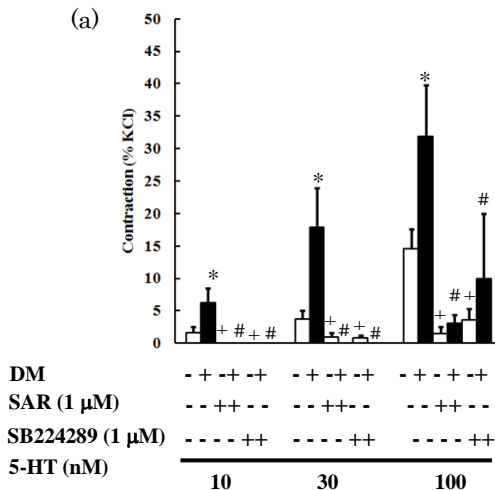


図2. ヒト大伏在静脈における 5-HT 受容体 (5-HT_{2A} 受容体および5-HT_{1B} 受容体)

(2) 糖尿病群におけるグラフト血管の 5-HT 血管反応性増強のメカニズムの解明

① 糖尿病ヒト内胸動脈および大伏在静脈において、5-HT による血管収縮反応は、非糖尿病群に比較して糖尿病群で有意に増強していた (図 3a, b)。

② 糖尿病ヒト内胸動脈および大伏在静脈において、サルポグレラートおよび SB224289 は、いずれも 5-HT による血管収縮反応を有意に抑制したが、両者の間に有意な差は認められなかった (図3a, b)。



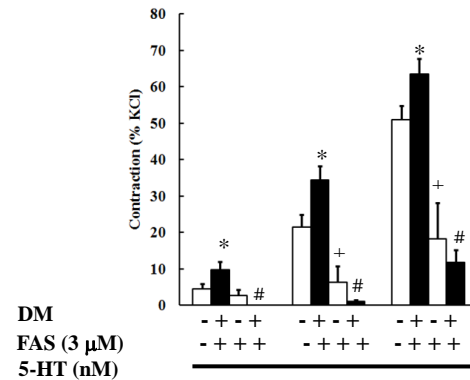
DM
SAR (1 μM)
SB224289 (1 μM)
5-HT (nM)

図3. 糖尿病群および非糖尿病群における 5-HT による収縮反応に対するサルポグレラート(5-HT_{2A} 受容体拮抗薬) および SB224289 (5-HT_{1B} 受容体拮抗薬) の影響

(a; ヒト内胸動脈, b; ヒト大伏在静脈)

[*,+P<0.05 compared with DM (-), #P<0.05 compared with DM (+)]

③ 糖尿病ヒト大伏在静脈において、ファスジル (FAS; Rho キナーゼ阻害薬) は、5-HT による血管収縮反応を有意に抑制した (図4)。



DM
FAS (3 μM)
5-HT (nM)

図4. 糖尿病群および非糖尿病群における 5-HT による収縮反応に対するファスジル (FAS; Rho キナーゼ阻害薬) の影響

[*,+P<0.05 compared with DM (-), #P<0.05 compared with DM (+)]

(3) インスリンと 5-HT との関連性

ヒト大伏在静脈において、インスリンは、濃度依存的に 5-HT による血管収縮反応を抑制した (図 5)。

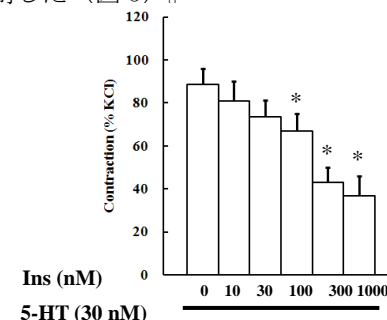


図5. ヒト大伏在静脈における 5-HT による収縮反応に対するインスリンの影響

[*P<0.05 compared with Ins 0 nM, Ins; insulin]

本研究結果より、バイパスグラフト血管として多用されているヒト大伏在静脈においても、5-HT による血管収縮に 5-HT_{2A} 受容体および 5-HT_{1B} 受容体の両受容体が大きく寄与していることを確認した。また、糖尿病群において、非糖尿病群に比較して 5-HT の血管反応性が両グラフト血管において有意に増強しており、この血管反応性増強には、5-HT_{2A} および 5-HT_{1B} 受容体の両者が関わっていること、さらに、Rho キナーゼが関与していることを明らかとした。また、正常の血管、すなわち非糖尿病群におけるヒト大伏在静脈において、インスリン処置下の 5-HT の血管反応性が減弱していたことから、糖尿病群におけるインスリンの影響についても検討する必要がある。

糖尿病患者のバイパスグラフト血管の長期開存を目指した術中・術後のれん縮予防には、特に、5-HT 受容体に対する拮抗薬 (5-HT_{2A} 受容体と 5-HT_{1B} 受容体の両者に対して拮抗作用を示すもの) および Rho キナーゼ阻害薬が有効である可能性が示唆される。

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 2 件)

① Nakamura E., Tanaka N., Kuwabara M., Yamashita A., Matsuo Y., Kanai T., Onitsuka T., Asada Y., Hisa H., Yamamoto R. (2010) Relative Contributions of 5-Hydroxytryptamine (5-HT) Receptor Subtypes in 5-HT-induced Vasoconstriction of the Distended Human Saphenous Vein as a Coronary Artery Bypass Graft. *Biol. Pharm. Bull.* **34**, 82-86. 査読有

② Tanaka N. (2009) Pharmacological studies on responsiveness of 5-hydroxytryptamine to overcome perioperative spasm of coronary artery bypass graft. *Yakugaku Zasshi.* **129**, 1049-1053. 査読有

[学会発表] (計 9 件)

① 金井祐, 松尾徳子, 田中直子, 桑原正知, 中村栄作, 比佐博彰, 山本隆一: ヒト内皮除去大伏在静脈におけるインスリンの NO 非依存性血管弛緩反応, 日本薬理学会第 84 回年会, 2011. 3, 横浜.

② 田中直子, 桑原正知, 中村栄作, 松尾徳子, 金井祐, 浅田祐士郎, 比佐博彰, 山本隆一: 糖尿病のセロトニン誘発性動脈血管収縮

増強作用, 第 1 回「血管障害とセロトニン」フォーラム, 田辺三菱製薬, 2011. 2, 東京.

③ 山本隆一, 田中直子, 桑原正知, 中村栄作, 松尾徳子, 金井祐, 浅田祐士郎, 山下篤, 比佐博彰: ヒト内胸動脈および大伏在状静脈における 5-HT_{2A} 受容体および 5-HT_{1B} 受容体を介したセロトニン誘発性血管収縮作用について, 第 40 回日本心脈管作動物質学会 2011.2, 高松.

④ 金井祐, 松尾徳子, 田中直子, 桑原正知, 比佐博彰, 山本隆一: セロトニンの血管収縮反応に対するインスリンの抑制効果 — 摘出ヒト大伏在静脈での検討 —, 第 63 回日本薬理学会西南部会, 2010.11, 鹿児島.

⑤ Tanaka N., Kanai T., Matsuo Y., Kuwabara M., Nakamura E., Nakamura K., Asada Y., Hisa H., Yamamoto R.: Different contributions of Rho-kinase to the vasoconstrictions caused by 5-HT and noradrenalin in the isolated internal thoracic artery and saphenous vein. *World Pharma* 2010, July 17-23, copenhagen, Denmark.

⑥ 中村栄作, 田中直子, 児嶋一司, 新名克彦, 桑原正知, 中村都英, 山本隆一, 鬼塚敏男: 下肢静脈瘤患者の静脈壁の血管反応の検討, 第 30 回日本静脈学会総会, 2010. 6, 宮崎.

⑦ 田中直子, 金井祐, 松尾徳子, 桑原正知, 中村栄作, 中村都英, 浅田祐士郎, 比佐博彰, 山本隆一: 動脈および静脈グラフトにおける Rho-kinase 阻害薬の効果の相違, 第 83 回日本薬理学会年会, 2010. 3, 大阪.

⑧ 田中直子, 桑原正知, 中村栄作, 松尾徳子, 金井祐, 浅田祐士郎, 比佐博彰, 山本隆一: ヒト冠動脈バイパス血管の収縮反応に対する Rho-kinase 阻害薬の効果について, 第 62 回日本薬理学会西南部会, 2009. 11, 松山.

⑨ 中村栄作, 田中直子, 児嶋一司, 新名克彦, 桑原正知, 中村都英, 山本隆一, 鬼塚敏男: Vascular responsiveness to 5-hydroxytryptamine in isolated vessel in diabetes mellitus, 第 62 回日本胸部外科学会, 2009. 10, 横浜.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)
○取得状況 (計 0 件)

[その他]
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鳥取部 直子 (TOTORIBE NAOKO)

九州保健福祉大学・薬学部・講師

研究者番号：70322576

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし