

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26463070

研究課題名(和文)血管新生のin vitro評価系構築と周術期血管新生医療への貢献

研究課題名(英文)The contribution of in vitro angiogenesis assays and angiogenesis therapies during the perioperative period

研究代表者

高石 和美 (TAKASHI, Kazumi)

徳島大学・病院・講師

研究者番号：20325286

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：周術期に用いる静脈麻酔薬が血管新生に与える影響については明らかではない。血管新生には、血管内皮細胞増殖因子(Vascular endothelial growth factor: VEGF)の放出や、血管内皮細胞/線維芽細胞の増殖、血管内皮細胞の遊走、管腔形成が関与しているため、これらに対する静脈麻酔薬の影響を検討した。その結果、ミダゾラムとジアゼパムはラット大動脈平滑筋(A10)細胞からのVEGF産生を濃度依存性に増加させた。また、50  $\mu$ Mミダゾラムは、血管内皮細胞の遊走と管腔形成を有意に抑制した。その他の静脈麻酔薬は血管新生の各段階に影響を与えなかった。

研究成果の概要(英文)：The detailed effects of anesthetics on angiogenesis have not yet been clarified. Angiogenesis is composed of some processes: the release of regulators as such vascular endothelial growth factor (VEGF), cell proliferation, migration, and tube formation. The aim of this study was to determine the effects of intravenous anesthetics on the release of VEGF, cell proliferation, cell migration and in vitro capillary tube formation. As the results, midazolam and diazepam but not propofol and ketamine significantly increased the release of VEGF in A10 cells in a dose dependent manner. Fifty  $\mu$ M of midazolam significantly impaired endothelial cell migration and in vitro capillary tube formation. Diazepam, propofol and ketamine did not show any enhancing or suppressive effects on cell proliferation, cell migration and capillary tube formation. Dexmedetomidine did not show any effects on cell proliferation and cell migration.

研究分野：歯科麻酔科学

キーワード：血管新生 静脈麻酔

### 1. 研究開始当初の背景

血管新生は、すでに臨床応用が開始されている再生医療である。主な血管新生療法の一つは、急性心筋梗塞発症後に骨髄単核球細胞または末梢血内皮細胞前駆細胞を採取し、注入移植する方法である。これにより左室駆出率は改善する (Britten MB, et al. Circulation; 108: 2212-18, 2003)。また、難治性の閉塞性動脈硬化症やパーチャー病において、血管内皮細胞増殖因子である VEGF (vascular endothelial growth factor) 遺伝子を含む発現プラスミドを血管内へ投与方法により臨床症状の改善を認めている (Baumgartner I, et al. Ann Intern Med; 132: 880-4, 2000)。VEGF は主な血管新生促進因子であり、マクロファージや血管平滑筋細胞、線維芽細胞や腫瘍細胞から産生される。VEGF にはいくつかのアイソフォームがあるが、そのうち VEGF-A は血管新生に最も重要で、血管内皮細胞の VEGFR-1、R-2 に結合する (図1)。

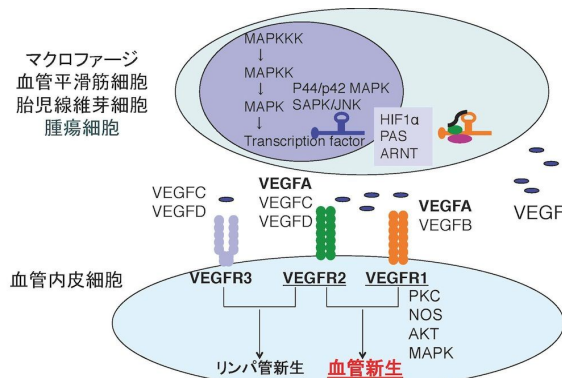


図1. VEGFと血管新生

一方、悪性腫瘍や糖尿病性網膜症において血管新生は病態の悪化を招く。つまり、血管新生は病態により一方では治癒を、もう一方では悪化につながる因子となる。そして、再生医療あるいは悪性腫瘍の治療において周術期に静脈麻酔薬が血管新生に与える影響についてはほとんど知られていない。

術中、術後に持続投与される鎮静薬であるミダゾラムには VEGF 産生を促進するという報告がある (Tanabe K, et al, Anesthesiology; 98: 1147-54, 2003)。しかし、ミダゾラムが血管新生に与える影響について詳細は不明である。さらに、血管新生は、血管新生促進因子の産生、血管内皮細胞の増殖・遊走、血管平滑筋細胞増殖、管腔形成、という各段階からなるが、これら各段階に対する静脈麻酔薬の影響については不明である。

### 2. 研究の目的

周術期に持続投与や長期投与を行う静脈麻酔薬が血管新生の各段階に与える影響について検討する。具体的には、ミダゾラム、ジアゼパム、プロポフォール、ケタミン、デクスメトミジンについて検討する。

### 3. 研究の方法

(1) 血管新生促進因子の産生に対する静脈麻酔薬の影響について

ラット大動脈平滑筋細胞 (A10細胞) を培養し、細胞から産生される VEGF 蛋白濃度を VEGF enzyme-linked immunosorbent assay kit を用いて ELISA 法によりプレートリーダーを用いて測定した。12時間ごとに上清液を採取する。測定日数は、VEGF 濃度がプラトーに達する 72 時間までとする。同様の条件下で各種濃度 (1~100 μM) のプロポフォール、ケタミン、ミダゾラム、ジアゼパムを作用させた。

(2) VEGF mRNA 発現に対する影響について

上記で VEGF 産生に有意な効果がみられたミダゾラムとジアゼパムについて、VEGF mRNA 発現に対する影響を real time PCR 法にて検討した。

(3) 静脈麻酔薬が血管内皮細胞および線維芽細胞の増殖に与える影響について

細胞培養：正常ヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC; Human Umbilical Vein Endothelial Cells) および正常ヒト皮膚線維芽細胞 (NHDF; Normal Human Dermal Fibroblast Cells) を培養し、48 時間の増殖能に与えるミダゾラム、ジアゼパム、プロポフォール、ケタミン、デクスメトミジンの影響を検討した。細胞増殖能は、発色試薬である WST-8 試薬が、生細胞中の脱水素酵素により還元されてオレンジ色の水溶性ホルマゾンを生産することを利用し、その吸光度をプレートリーダーで測定することから生細胞数を判定し比較検討した。

(4) 静脈麻酔薬が血管内皮細胞の遊走に与える影響について

HUVEC を培養し、遊走能に与えるミダゾラム、ジアゼパム、プロポフォール、ケタミン、デクスメトミジンの影響を検討した。細胞遊走能は、8 μM ポアを有するメンブランが内装されたシャーレ (アンジオジェネシス血管内皮細胞マイグレーションアッセイシステム®, CORNING) を使用した。メンブラン下部には 2% FBS を含む培地および含まない培地を入れ、上部構造へは 2% FBS を添加していない培地中へ HUVEC を播種した。薬剤の影響をみる場合には、上下のチャンパーへ同濃度の薬剤を添加した。22 時間後にメンブラン下面へ誘導した細胞を Calcein AM で染色し蛍光度を測定した。

(5) 管腔形成に与える静脈麻酔薬の影響について

HUVEC と NHDF の共培養プレート (クラボウ) を使用し、3 日間あるいは 10 日間細胞を培養し、形成された管腔を CD31 抗体で染色し管腔面積、長さ、分岐点数、細管数の 4 項目について評価した。同様の実験系において、VEGFA 存在下と

非存在下における管腔形成を比較し、各種濃度(1~100 μM)のミダゾラム、ジアゼパム、プロポフォール、ケタミンを作用させコントロールと比較した。また、VEGF受容体のリン酸化阻害剤であるSuramin (50 μM)を作用させ抑制度を比較した。

(6) 結果は平均値 ± 標準偏差で示し分散分析およびScheffé testを用いて統計学的検討を行い、P < 0.05を有意差ありとした。

#### 4. 研究成果

##### (1) 血管新生促進因子の産生に対する静脈酔薬の影響について

過去の実験結果と同様に、ミダゾラムとジアゼパムはA10細胞からのVEGF産生を有意に促進したが、プロポフォールとケタミンはA10細胞からのVEGF産生に影響を与えなかった(図2, 3)。

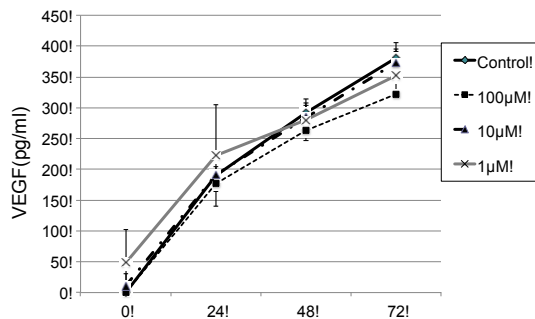


図2. プロポフォールがA10細胞からのVEGF産生に与える影響

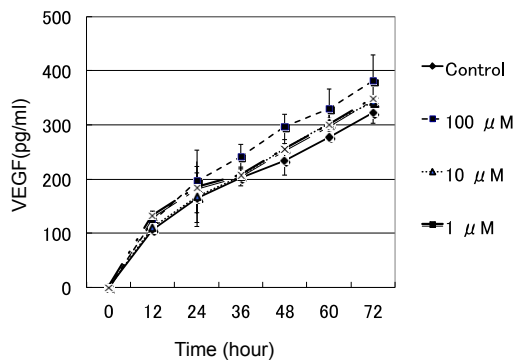


図3. ケタミンがA10細胞からのVEGF産生に与える影響

##### (2) VEGF mRNA発現に対する影響について

ミダゾラム(50 μM)とジアゼパム(50 μM)がA10細胞のVEGF mRNA発現に対する影響をreal time PCR法で検討した。その結果、ミダゾラムとジアゼパムは24時間後のVEGF mRNA発現を増加する傾向を示した。

##### (3) 静脈酔薬がHUVECおよびNHDFの増殖能に与える影響について

いずれの静脈酔薬もHUVECおよびNHDFの増殖能に影響を与えなかった(図4, 5)。

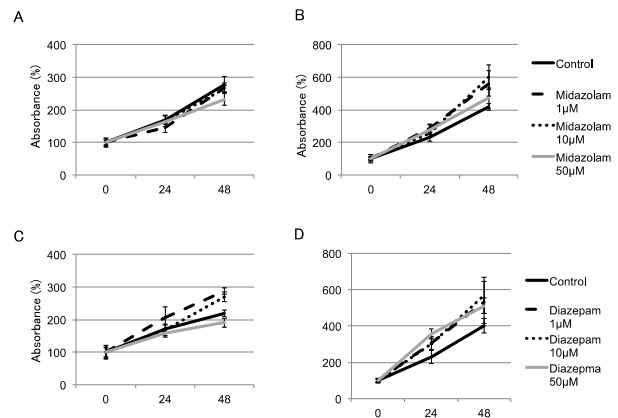


図4. A: ミダゾラムがHUVEC増殖能に与える影響  
B: ミダゾラムがNHDF増殖能に与える影響  
C: ジアゼパムがHUVEC増殖能に与える影響  
D: ジアゼパムがNHDF増殖能に与える影響

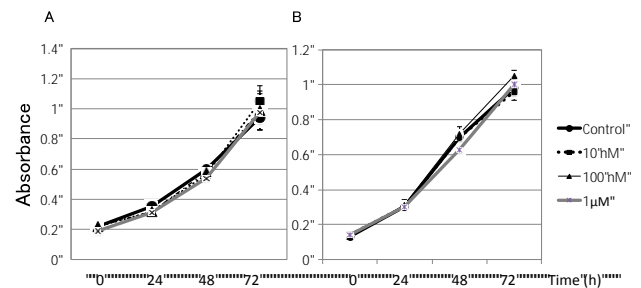


図5. A: デクスメトミジンがHUVEC増殖能に与える影響  
B: デクスメトミジンがNHDF増殖能に与える影響

##### (4) 静脈酔薬がHUVECの遊走に与える影響について

50 μMミダゾラムは、22時間FBSで誘導されたHUVECの遊走を有意に抑制した(コントロール:  $364.0 \pm 42.4 \times 10^2$ , 50 μM ミダゾラム:  $248.5 \pm 23.7 \times 10^2$ ,  $p < 0.01$ ) (図6)。

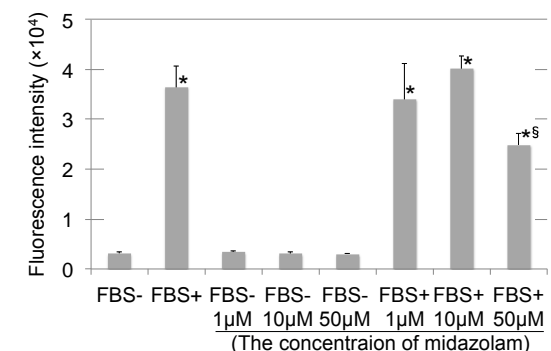


図6. ミダゾラムがHUVECの遊走に与える影響

他の静脈酔薬はHUVECの遊走に影響を与えなかった。

##### (5) 管腔形成に与える静脈酔薬の影響について

10日間の管腔形成

過去の我々の実験結果と同様に、50 μMミダゾラムは、VEGF存在下の管腔形成についてすべての項目を有意に抑制した（管腔面積コントロール:  $330.8 \pm 63.7 \times 10^3$  pixels, ミダゾラム:  $42.1 \pm 11.1 \times 10^3$  pixels,  $p < 0.001$ ; 管腔長さコントロール:  $31.7 \pm 6.1 \times 10^3$  pixels, ミダゾラム:  $4.2 \pm 1.3 \times 10^3$  pixels,  $p < 0.001$ ; 分岐点数コントロール:  $197.7 \pm 59.6$  pixels, ミダゾラム:  $16.8 \pm 7.1$  pixels,  $p < 0.001$ ; 細管数コントロール:  $449.1 \pm 101.3$  pixels, ミダゾラム:  $77.4 \pm 25.7$  pixels,  $p < 0.001$ ）。他の静脈麻酔薬は10日間の管腔形成に影響を与えなかった。

### 3日間の管腔形成

50 μMミダゾラムは、VEGF非存在下の管腔形成において、管腔面積、長さおよび細管数を有意に促進した（管腔面積コントロール:  $63.5 \pm 17.5 \times 10^3$  pixels, ミダゾラム:  $125.2 \pm 61.9 \times 10^3$  pixels,  $p = 0.032$ ; 管腔長さコントロール:  $4.54 \pm 1.11 \times 10^3$  pixel, ミダゾラム:  $9.48 \pm 2.21 \times 10^3$  pixels,  $p = 0.006$ ; 細管数コントロール:  $83.6 \pm 18.8$  pixels, ミダゾラム:  $181.9 \pm 44.6$  pixels,  $p = 0.002$ ）。

50 μMミダゾラムは、VEGF存在下の管腔形成についてすべての項目を有意に抑制した（管腔面積コントロール:  $321.4 \pm 85.5 \times 10^3$  pixels, ミダゾラム:  $46.8 \pm 13.9 \times 10^3$  pixels,  $p < 0.001$ ; 管腔長さコントロール:  $21.9 \pm 5.8 \times 10^3$  pixels, ミダゾラム:  $4.1 \pm 1.5 \times 10^3$  pixels,  $p < 0.001$ ; 分岐点数コントロール:  $132.7 \pm 54.1$  pixels, ミダゾラム:  $17.7 \pm 9.4$  pixels,  $p < 0.001$ ; 細管数コントロール:  $340.1 \pm 102.0$  pixels, ミダゾラム:  $88.0 \pm 31.9$  pixels,  $p < 0.001$ ）。

他の静脈麻酔薬は3日間の管腔形成に影響を与えなかった(図7)。

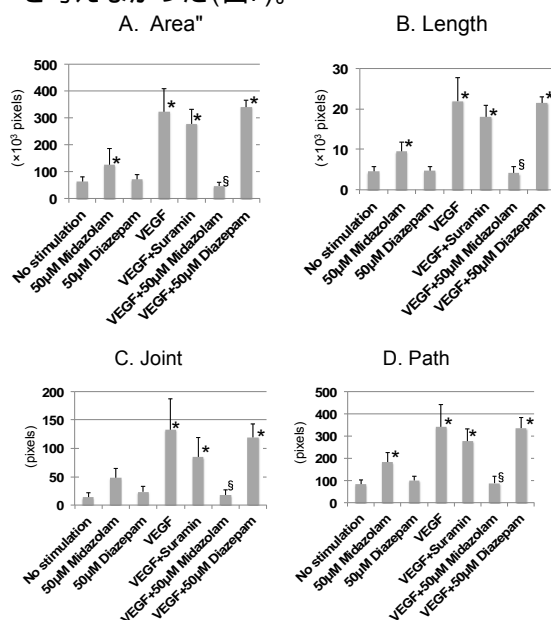


図7. VEGF 存在下/非存在下にミダゾラムとジアゼパムが3日間の管腔形成に与える影響

## 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6件)

- (1) Mita N, Kawahito S, Soga T, Katayama T, Wakamatsu N, Kawahara T, Kakuta N, Hamaguchi E, Tsutsumi YM, Tanaka K, Takaishi K, Kitahata H; Anesthetic management of a patient with unraptured sinus of valsalva aneurysm with ventricular outflow tract obstruction. *Circulation Control*, 37, 195-198, 2016. 査読有
- (2) 川人伸次, 曾我朋宏, 箕田直治, 堤保夫, 田中克也, 高石和美, 北畑洋, 木下浩之; カリウムチャンネルと循環制御, 37, 181-184, 2016. 査読有
- (3) 川人伸次, 高石和美, 曾我朋宏, 北畑洋; 血管新生に及ぼす麻酔薬と周術期管理法の影響. *BIO Clinica*, 31, 67-71, 2016. 査読無
- (4) Kambe N, Kawahito S, Mita N, Takashi K, Katayama T, Sakai Y, Soga T, Kawano H, Matsushita m, Shimada M, Kitagawa T, Kitahata H; Impact of newly developed, next-generation artificial endocrine pancreas. *Journal of Medical Investigation*, 62, 41-44, 2015. 査読有
- (5) Takaishi K, Kawahito S, Yamada H, Soeki T, Sata N, Kitahata H; Increase in prominence of electrocardiographic J wave after a single dose of propofol in a patient with early ventricular depolarization. *Anaesthesia*, 69, 170-175, 2014. 査読有
- (6) Sakai Y, Kawahito S, Takashi K, Mita N, Kinoshita H, Hatakeyama N, Azuma T, Nakaya Y, Kitahata H; Propofol-induced relaxation of rat aorta is altered by aging. *Journal of Medical Investigation*, 61, 278-284, 2014. 査読有

〔学会発表〕(計7件)

- (1) Satomi S, Kawahito S, Soga T, Mita N, Kakuta N, Hamaguchi E, Takaishi K, Kitahata H, Tsutsumi YM, Tanaka K; Accuracy and reliability of continuous blood glucose monitoring during pediatric cardiopulmonary bypass. The Annual Meeting of the American Society of Anesthesiologists, Chicago (USA), 2016/10/25.
- (2) 高石和美, 川人伸次, 青山智祐, 大塚良, 江口覚, 富岡重正, 北畑洋; ヒト臍帯静脈血管内皮細胞において静脈麻酔薬が細胞遊走に与える影響. 第43回日本歯科麻酔学会総会・学術集会, 学術総合

- センター (東京都・千代田区),  
2015/10/31.
- (3) Mita N, Kawahito S, Soga T, Tanaka K, Takashi K, Kitahata H; Blood glucose control by artificial endocrine pancreas during hepatectomy prevents postoperative acute kidney injury. The Annual Meeting of the American Society of Anesthesiologists, San Diego (USA), 2015/10/27.
- (4) Kitahata H, Tsutsumi Y, Aoyama T, Takaishi K, Kawahito S, Tanaka K; Role of sirtuins in cardioprotection by ischemic and anesthetic preconditioning. Euroanaesthesia 2015, The European Anaesthesiology Congress, Berlin (Germany), 2015/6/1.
- (5) Takaishi K, Kawahito S, Soga T, Otsuka R, Tsutsumi Y, Kitahata H; Effects of beta-3 adrenergic stimulation on nitric oxide production in myocardial cells of neonatal rats. Euroanaesthesia 2015, The European Anaesthesiology Congress, Berlin (Germany), 2015/5/31.
- (6) Takaishi K, Kawahito S, Mita N, Aoyama T, Otsuka R, Kitahata H; The effects of intravenous anesthetics on cell migration using cultured human umbilical vein endothelial cells, International Anesthesia Research Society 2015 Annual Meeting and International Science Symposium, Honolulu (USA), 2015/3/22.
- (7) Takashi K, Kawahito S, Aoyama T, Otsuka R, Mita N, Eguchi S, Tomioka S, Kitahata H; The effects of ketamine on the release of vascular endothelial growth factor and in vitro capillary tube formation. The Federation of Asian Dental Anesthesiology Societies, The Nippon Dental University School of Life Dentistry Niigata campus (Niigata・Janan), 2014/10/11.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

高石 和美 (TAKAISHI, Kazumi)  
徳島大学・病院・講師  
研究者番号: 20325286

### (2) 研究分担者

北畑 洋 (KITAHATA, Hiroshi)  
徳島大学大学院・医歯薬学研究部・教授  
研究者番号: 60161486

川人 伸次 (KAWAHITO, Shinji)  
徳島大学大学院・医歯薬学研究部・特任教授  
研究者番号: 60284296