心血管保護薬としてのスタチンの多面的作用

平瀬徹明*・野出孝一

佐賀大学医学部 循環器・腎臓内科 〒849-8501 佐賀市鍋島5-1-1

Pleiotropic Effects of Statin in Cardiovascular Protection

Tetsuaki Hirase* and Koichi Node

Department of Cardiovascular and Renal Medicine, Saga University Faculty of Medicine
5-1-1 Nabeshima, Saga 849-8501, Japan

Statin inhibits HMG CoA reductase in cholesterol biosynthesis and lowers cholesterol levels in blood. It has been established by a lot of clinical studies that statin has protective effects against cardiovascular diseases. Experimental studies have shown that statin inhibits membrane translocation of Rho and Ras GTPases that results in activation, by decreasing cellular levels of isoprenoid intermediates. Inhibition of Rho by statin increases VEGF expression in endothelial cells that promotes cell survival. Statin also prevents endothelial hyperpermeability that is implicated in atherogenesis. Ras-mediated activation of T type calcium channel that may result in endothelial cell dysfunction is blocked by statin. Accordingly, statin has pleiotropic effects on cardiovascular cell function by modulating cell signaling.

Key words : statin / isoprenoid / Rho / Ras / endothelial cells

1. はじめに

スタチンは、アセチル CoA からメバロン酸、スクアレンを経由して内因性のコレステロールを生合成するメバロン酸経路における律速段階酵素である HMG-CoA reductase に対する阻害剤であり、高コレステロール血症に対する治療薬として開発された (Fig. 1)。スタチンは多くの大規模臨床試験において冠動脈疾患や脳血管障害の発症リスクを低下させる心血管保護作用を有することが明らかにされてきたが、その作用の一部は血中コレステロール低下作用に依存しない可能性が指摘されている¹⁾。一方、スタチンは細胞内シグナルに直接作用し多彩な細胞機能を修飾することによって血管内皮機能の改善、血管

平滑筋増殖抑制作用、血栓形成抑制作用、抗炎症作用、血管形成促進作用といった多面的作用を有することが実験研究により明らかになってきた²⁾。

血管内皮細胞は一層の細胞層を形成し、血液成分と血管壁のインターフェイスとして機能している。内皮細胞は、一酸化窒素・プロスタサイクリン・内皮依存性過分極因子といった血管弛緩因子やエンドセリン等の血管収縮因子を産生することで能動的に内皮依存性血管弛緩反応を調節し、血流制御に貢献している。内皮細胞は凝固・線溶関連因子を産生し、また白血球を介した活性化血小板との相互作用により血管壁における凝固・線溶調節に関与している。さらに内皮細胞はバリアーとして血管壁への血液成分の漏出や血球の遊走を制御することによって、組織恒常性の維持及び炎症反応制御を行っている。以上のように、内皮細胞は多彩かつ重要な血管生理機能の調節に関与するのみならず、内皮細胞機能の障害が動脈硬化をはじめとする血管障害の病態形成に重要な役割を果たすと考えられている³⁾。したがって、

* Corresponding author
Tel : 0952-34-2364
Fax : 0952-34-2089
E-mail : hiraset@med.saga-u.ac.jp

Fig. 1 Cholesterol biosynthesis and statin.

スタチンの内皮細胞機能に対する作用を検討することは、心血管保護におけるスタチンの作用を理解するうえで重要であると考えられる。

本稿では、まず始めにスタチンによる低分子量G蛋白質 Rho・Rasの活性調節機構について概説し、次に Rho による血管内皮細胞透過性調節や vascular endothelial growth factor (VEGF) 産生調節と Ras による血管内皮細胞増殖・遊走制御に対するスタチンの作用について我々が得た実験的知見に基づき考察する。

2. スタチンによる低分子量G蛋白質 Rho 及び Ras の活性調節機構

臨床研究によりスタチンによる心血管保護作用がスタチン投与開始後比較的早期から、また血中コレステロール低下によって期待されるよりも大きく認められたことから、スタチンの心血管細胞に対する直接作用が想定された。Laufsらは、培養ヒト内皮細胞において低分子量G蛋白質 Rho 及び Ras がスタチンにより細胞膜分画において減少し細胞質分画において増加することを示した⁴⁾。彼らはスタチンがメバロン酸経路を抑制する結果イソプレノイド中間代謝産物 geranylgeranylpyrophosphate (GGPP) 及び farnesylpyrophosphate (FPP) の細胞内レベルが減少することに着目し、GGPPの同時添加が Rho に対するスタチンの作用を、FPPの同時添加が Ras に対するスタチンの作用を減弱させることを明らかにした。Rho 及び Ras は不活性型である GDP 結合フォームとして細胞質に相対的に多く存在し、Rho は GGPP の存在下に geranylgeranyl transferase により geranylgeranyl 化され、Ras は FPP の存在下に farnesyl transferase により farnesyl 化され細胞膜へ移行する。細胞膜へ移行した Rho 及び Ras はそれぞれに対する gua-

Fig. 2 Geranylgeranylation is necessary for membrane translocation and activation of Rho GTPase.

nine nucleotide exchange factor により活性型である GTP 結合フォームに変換され、シグナル伝達に参与する。活性型 Rho 及び Ras は速やかにそれぞれに対する GTPase activating protein により加水分解されることにより不活性型である GDP 結合フォームに変換され、シグナル伝達を終了する (Fig. 2)。

以上のように、シグナル伝達における Rho 及び Ras の活性化においてイソプレノイド中間代謝産物の存在下での細胞膜への移行は必須であり、スタチンは細胞内のイソプレノイド中間代謝産物レベルを減少させることで Rho 及び Ras の活性化を抑制すると考えられる。実際、スタチンによる Rho の細胞膜への移行と活性化の抑制が培養ヒト内皮細胞において内皮型一酸化窒素合成酵素 (eNOS) の遺伝子発現を増加させることが示されている⁴⁾。

3. Rho による血管内皮細胞タイトジャンクション透過性調節とスタチン

近年動脈硬化は血管細胞及び免疫細胞が関与した血管壁の慢性炎症としてとらえられ、最も早期に観察される変化としては内皮細胞の活性化による透過性の亢進に起因する血液中の蛋白質・脂質の血管壁への漏出と白血球の内皮下への遊走であると考えられている⁵⁾。脂質異常症に合併する動脈硬化のモデルである WHHL ウサギにおいて、大動脈血管壁の血液中の蛋白質に対する透過性が亢進していることが明らかとなっている⁶⁾。血管壁透過性を調節している内皮細胞のバリアー機能においては、内皮細胞間接着部位に存在する細胞間接着装置タイトジャンクションによる細胞間隙を通過する血液中分子の移動制御が重要な役割を果たしている。タイトジャンクションは occludin や claudin 等の内在性膜蛋白質と、アクチン細胞骨格と結合した ZO-1 等の細胞膜裏打ち蛋白

Fig. 3 Endothelial barrier dysfunction induced by Rho and Rho kinase is blocked by statins.

質から構成される蛋白質複合体によりその機能が制御されている⁷⁾。

リゾフォスファチジン酸 (LPA) はヒト動脈硬化巣に豊富に存在するリズリン脂質で、細胞膜に存在する受容体を介し多彩な生理活性を示す。培養ヒト内皮細胞における我々の検討では、LPAはoccludinの磷酸化とタイトジャンクション透過性の亢進を生じた。これらはRho及びRho kinaseに対するdominant negative変異体の過剰発現やRho kinase阻害剤で抑制されたことから、Rho及びRho kinaseがoccludinの磷酸化とタイトジャンクション透過性の亢進を制御することが明らかとなった⁸⁾。また白血球と内皮細胞は接着分子を介して接着すると双方向性に細胞内シグナルが活性化される。内皮細胞膜に発現する接着分子ICAM-1により活性化されるシグナルについて抗体を用いたICAM-1クロスリンキングにより検討したところ、ICAM-1活性化はRho及びRho kinaseを介して内皮細胞透過性の亢進とoccludinの磷酸化を生じた。

以上の結果から、動脈硬化病変形成初期における血管透過性亢進による血液中分子の漏出と白血球の血管壁への遊走には、Rho及びRho kinaseを介した内皮細胞タイトジャンクションの機能変化が関与すると考えられる (Fig. 3)。WHHLウサギにおいて動脈硬化を発症した大動脈血管壁の透過性亢進が血中コレステロール値に依存せずにスタチンにより抑制されることから、スタチンによるRhoの活性化抑制は内皮細胞タイトジャンクション機能変化の抑制を介して動脈硬化性病変形成の抑制につながることを示唆される。

4. 血管内皮細胞におけるRhoによるVEGF産生調節とスタチン

VEGFは血管発生や、生体における血管の生存・維

Fig. 4 Statins upregulate VEGF expression in endothelial cells.

持、虚血組織における血管新生に重要な役割を果たす成長因子であることが知られている⁹⁾。我々は、培養ヒト血管内皮細胞において、スタチンがVEGFのアイソフォームVEGF₁₂₁とVEGF₁₆₅の遺伝子発現及び蛋白質発現を増加させることを報告している¹⁰⁾。スタチンによるVEGF発現誘導は細胞にメバロン酸あるいはGGPPを添加することで消失し、FPPの添加は影響を与えなかった。Rho及びRho kinaseに対するdominant negative変異体の過剰発現は用量依存性にVEGF遺伝子の発現を増加させた。VEGFの遺伝子発現を促進する転写因子hypoxia inducible factor 1α (HIF-1α)をスタチンは正に、Rho及びRho kinaseは負に調節していた。したがってスタチンは細胞内GGPPの産生低下からRho及びRhoの標的分子であるRho kinaseの活性化を抑制し、HIF-1αの核内レベルを上昇させることによりVEGF遺伝子の発現を増加させると考えられる (Fig. 4)。内皮細胞においてスタチンにより発現誘導されるVEGF遺伝子のレベルは平滑筋細胞その他のVEGF産生血管細胞に比して低いが、スタチンによる内皮細胞における低レベルのVEGF発現増加が血管の生存・維持、さらには血管障害の抑制に貢献すると考える。

5. アンジオテンシンIIにより誘導される血管内皮細胞増殖・遊走とスタチン

昇圧作用を有するペプチドホルモンであるアンジオテンシンIIは、細胞膜に発現する1型及び2型受容体を介して細胞内シグナルを伝達する。主に1型受容体を介したシグナルは、内皮細胞における一酸化窒素の産生低下や病的増殖、平滑筋細胞における増

Fig. 5 Statin inhibits angiotensin II signaling mediated by Ras in endothelial cells.

殖・遊走や活性酸素種の産生促進，心筋細胞肥大を生じ，動脈硬化を含む血管障害の促進や心筋肥大から心不全への進展に関与することが多くの研究により明らかにされてきた¹¹⁾。

我々は，培養内皮細胞シートをスクラッチにより機械的に部分剥離し，その後の内皮細胞の増殖・遊走を観察した．アンジオテンシンⅡは内皮細胞の増殖・遊走を促進したが，スタチンはこれを部分的に抑制した．アンジオテンシンⅡにより誘導される内皮細胞の増殖・遊走を制御するシグナルのうちスタチン感受性のシグナルについて検討を行った．T型カルシウムチャンネル阻害薬である mibefradil はアンジオテンシンⅡにより誘導される内皮細胞の増殖・遊走を抑制したが，L型カルシウムチャンネル阻害薬 nifedipine は同様の作用を示さなかったことから，アンジオテンシンⅡにより誘導される内皮細胞の増殖・遊走にT型カルシウムチャンネル活性が関与することが示唆された¹²⁾．T型及びL型カルシウムチャンネルを構成するコンポーネントのうち，T型カルシウムチャンネルを構成する $\alpha 1G$ の遺伝子発現のみが培養ヒト血管内皮細胞において検出され， $\alpha 1G$ 遺伝子発現はアンジオテンシンⅡにより増加した．アンジオテンシンⅡによる $\alpha 1G$ 遺伝子発現誘導は選択的阻害剤を用いた薬理的検討によりアンジオテンシンⅡ1型受容体を介していることが明らかとなった．またアンジオテンシンⅡによる $\alpha 1G$ 遺伝子発現誘導はスタチンにより抑制されたが，このスタチンの作用はメバロン酸あるいはFPPの添加により消去された．内皮細胞においてアンジオテンシンⅡは活性型であるGTP結合型Rasを増加させ，スタチンはこれを抑制した．Rasの下流分子であるMEKに対する阻害剤はまた $\alpha 1G$ 遺伝子の発現を抑制した．以上から，アンジオテンシンⅡは1型受容体を介してRas-MEK

Fig. 6 Rho and Ras promote atherosclerosis by causing endothelial cell dysfunction.

経路を活性化し $\alpha 1G$ コンポーネントの発現を増加させることでT型カルシウムチャンネル活性を上昇させると考えられ，スタチンはRasを抑制することでT型カルシウムチャンネル活性化を抑制することが示唆された (Fig. 5)．T型カルシウムチャンネルは成体の心血管組織では生理的には活性が低い，内皮細胞における活性酸素種の産生促進や平滑筋の増殖，心筋肥大や心不全の進展に関与することが示されていることから，病的心血管組織においてはT型カルシウムチャンネルが活性化されている可能性が考えられ，スタチンによるT型カルシウムチャンネル抑制作用の血管障害防止における有用性が示唆される．

6. おわりに

低分子量G蛋白質Rho及びRasの細胞膜への移行・活性化の抑制に加えて，内皮細胞においてスタチンがホスファチジルイノシトール3キナーゼ(PI₃K)依存性にセリン・スレオニンリン酸化酵素Aktの細胞膜への移行を促進することにより活性化することが示されている¹³⁾．細胞へのメバロン酸の投与によってスタチンによるAktの細胞膜への移行が抑制されることから，細胞内コレステロール量がスタチンによるAkt活性化の重要な規定因子であると考えられる．またスタチンがeNOSとシャペロンであるhsp90の複合体へのAktの動員とAktの標的であるeNOSの磷酸化を促進することが示されている¹⁴⁾．これらのことから，スタチンは細胞内コレステロール量の低下を介して細胞膜での蛋白質相互作用を変化させることによりPI₃K-Akt経路を活性化すると考えられる．

以上のように，スタチンはコレステロール生合成阻害によるコレステロール低下作用とともに，イソ

プレノイド中間代謝産物合成阻害を介した低分子量G蛋白質の活性抑制やPI₃K-Akt経路の活性化により細胞内シグナルに作用し、多彩な細胞機能を修飾する結果多面的作用を発揮していると考えられる (Fig. 6)。その多面性は血管内皮細胞機能の改善、平滑筋増殖抑制作用、血栓形成抑制作用、抗炎症作用から血管形成促進作用まで広がっている。今後スタチンの細胞機能への作用がさらに解明され、それに基づいて心血管病に対する臨床効果の検討が進むことが期待される。

文 献

- 1) Mills EJ, Rachlis B, Wu P, Devereaux PJ, Arora P, Perri D: *J. Am. Coll. Cardiol.*, **52**, 1769-1781 (2008)
- 2) Takemoto M, Liao JK: *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **21**, 1712-1719 (2001)
- 3) 平瀬徹明, 野出孝一: 循環器科 動脈硬化のすべて, **59** (Suppl. 3), 21-24 (2006)
- 4) Laufs U, Liao JK: *J. Biol. Chem.*, **273**, 24266-24271 (1998)
- 5) Ross R: *N. Engl. J. Med.*, **340**, 115-126 (1999)
- 6) van Nieuw Amerongen GP, Vermeer MA, Nègre-Aminou P, Lankelma J, Emeis JJ, van Hinsbergh VW: *Circulation*, **102**, 2803-2809 (2000)
- 7) Tsukita S, Furuse M, Itoh M: *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, **2**, 285-293 (2001)
- 8) Hirase T, Kawashima S, Wong EY, Ueyama T, Rikitake Y, Tsukita S, Yokoyama M, Staddon JM: *J. Biol. Chem.*, **276**, 10423-10431 (2001)
- 9) Robinson CJ, Stringer SE: *J. Cell. Sci.*, **114**, 853-865 (2001)
- 10) Nishimoto-Hazuku A, Hirase T, Ide N, Ikeda Y, Node K: *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **51**, 267-273 (2008)
- 11) Mehta PK, Griendling KK: *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.*, **292**, C82-C97 (2007)
- 12) Wang D, Hirase T, Inoue T, Node K: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **347**, 394-400 (2006)
- 13) Skalet-Rorowski A, Lutchman M, Kureishi Y, Lefer DJ, Faust JR, Walsh K: *Cardiovasc. Res.*, **57**, 253-264 (2003)
- 14) Brouet A, Sonveaux P, Dessy C, Moniotte S, Balligand JL, Feron O: *Circ. Res.*, **89**, 866-873 (2001)

(Received 7 July 2009 ;

Accepted 5 August 2009)

著者略歴

平瀬 徹明 (ひらせ てつあき)

1989年3月 神戸大学医学部卒業

1992年6月 岡崎国立共同研究機構生理学研究所 特別研究学生

1995年8月 Visiting Scientist, Eisai London Research Laboratories, University College London

1997年3月

2003年7月

2007年4月

search Laboratories, University College London

神戸大学大学院医学研究科博士課程修了

佐賀医科大学循環器内科 助手

佐賀大学医学部循環器内科 助教

野出 孝一 (の で こういち)

1989年 佐賀医科大学卒業

1997年 大阪大学大学院修了

1997年 ハーバード大学留学

2002年 佐賀医科大学内科学教授

2003年 佐賀大学内科学 教授

2008年 佐賀大学病院 ハートセンター長

2008年 佐賀大学 病院長特別補佐