

## 長期開存を目指したヒト冠動脈バイパス血管のセロトニン反応性に関する薬理学的研究

田中直子

### Pharmacological Studies on Responsiveness of 5-Hydroxytryptamine to Overcome Perioperative Spasm of Coronary Artery Bypass Graft

Naoko TANAKA

First Department of Pharmacology, School of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University of Health and Welfare, 1714-1 Yoshino-cho, Nobeoka, Miyazaki 882-8508, Japan

(Received April 24, 2009)

In ischemic heart diseases, the use of the internal thoracic artery (ITA) as an arterial graft has been associated with longer survival and better quality of life. However, it has been reported that vasospasm of the ITA graft frequently occurs and increases perioperative and postoperative morbidity. Serotonin (5-HT) plays an important role in the occurrence of vasospasm. We examined 5-HT receptor subtypes responsible for the 5-HT-induced vasoconstriction in the human ITA. The contractile response caused by 5-HT was mediated by activation of not only 5-HT<sub>2A</sub> receptors but also 5-HT<sub>1B</sub> receptors. We also examined the relationship between 5-HT-induced vasoconstriction of the rabbit femoral artery and arteriosclerosis using the arteriosclerosis model of repeated balloon-injury. The contractile response caused by 5-HT in the femoral artery with arteriosclerosis was significantly greater than that in the normal artery. Additionally, we demonstrated that insulin induced internalization of 5-HT<sub>2A</sub> receptors from the plasma membrane in HEK293 cells. Diabetes mellitus (DM) is a risk factor for ischemic heart diseases. We evaluated the 5-HT-induced vasoconstriction, mediated by activation of 5-HT<sub>2A</sub> and 5-HT<sub>1B</sub> receptors, in the ITA obtained from patients with DM or without DM undergoing coronary bypass surgery. The contractile response caused by 5-HT in the ITA from patients with DM was significantly greater than that from patients without DM. Our findings suggest that when the ITA is used as an arterial graft, simultaneous treatment with 5-HT<sub>2A</sub> and 5-HT<sub>1B</sub> receptor antagonists is useful to prevent 5-HT-induced vasospasm, especially in patients with DM.

**Key words**—internal thoracic artery (ITA); serotonin (5-HT); diabetes mellitus (DM)

#### 1. はじめに

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、使用する自己バイパスグラフト血管の術中及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、バイパスグラフト血管の長期開存率の上昇並びに予後の良好な長期成績をもたらすとされている。<sup>1-3)</sup> 一方、セロトニン (5-HT) は活性化した血小板より遊離され、血栓の形成に重

要な役割を演じるとともに血管平滑筋のれん縮を誘発することが報告されている。<sup>4-9)</sup> したがって、バイパス血管に着目し、5-HTの血管反応性を薬理的に詳細に検討することは、バイパス手術後の長期成績改善の新規薬物の導入につながる可能性がある。本研究の最終目的は、5-HTに対する血管反応性を薬理的に詳細に検討することにより、糖尿病患者を含めた虚血性心疾患のバイパス手術後の予後改善のための新しい血管れん縮予防薬の探索である。われわれは、動物実験や培養細胞を用いた基礎研究に加えて、ヒト血管を用いた研究を進めている。ヒト血管は宮崎県立延岡病院心臓血管外科から、患者の同意が得られた場合にのみ、冠動脈バイパス手術後の余剰血管の提供を受け、実験に供している。したがって、動物実験や培養細胞実験で得た

九州保健福祉大学薬学部薬理学第一講座 (〒882-8508 宮崎県延岡市吉野町 1714-1)

e-mail: naokot@phoenix.ac.jp

本総説は、平成20年度日本薬学会九州支部学術奨励賞受賞を記念して記述したものである。

結果とヒト血管の実験結果を総合的に考察することができる貴重なデータを得ることができ、さらにそのデータを臨床へフィードバックできる環境下にある。また、提供された血管は、名前を伏せて病歴が提供されるため、病態群と非病態群との比較検討が可能となる。

## 2. 血小板と血管組織における 5-HT 受容体の役割

5-HT は、生体内において、血管作動性物質や神経伝達物質として、種々の重要な役割を担う生理活性物質である。血小板の活性化に伴い放出された 5-HT は、血小板膜上の 5-HT<sub>2A</sub> 受容体を介して血小板の凝集を促進するとともに、更なる 5-HT 放出を引き起こす。<sup>10-12</sup> また、5-HT は一般に、血管平滑筋細胞膜上の 5-HT<sub>2A</sub> 及び 5-HT<sub>1B</sub> 受容体を刺激して血管収縮作用を引き起こす。<sup>13-17</sup> 血管平滑筋細胞には、さらに 5-HT<sub>7</sub> 受容体が存在し、直接的に血管拡張作用を引き起こすことが知られているが、ヒト血管における分布については不明な点が多い。一方、血管内皮細胞には 5-HT<sub>1B</sub> 受容体が存在し、一酸化窒素 (NO) を介して血管拡張作用を引き起こす (Fig. 1).<sup>14</sup>

本研究においては、バイパスグラフト血管のれん縮に直接関与する平滑筋細胞に着目し、5-HT の血管反応性について薬理学的に検討した。

## 3. 動脈硬化と血管反応性

反復バルーン傷害により動脈硬化を引き起こしたウサギ大腿動脈閉塞性血栓症モデルの摘出大腿動脈において、5-HT の血管反応性が増大していた。このメカニズムとしては、動脈硬化を引き起こした血

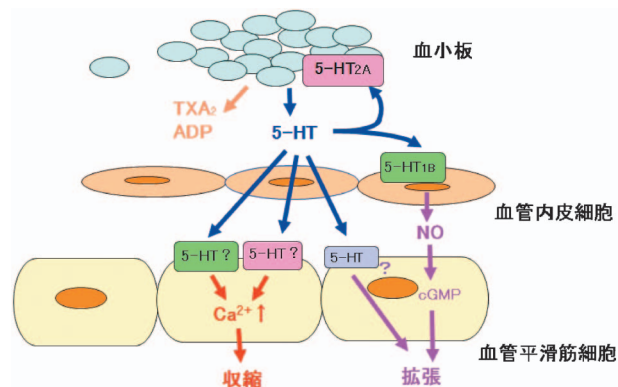


Fig. 1. Actions of Serotonin (5-HT) in the Human Internal Thoracic Artery

管においては、内膜肥厚が生じ、5-HT<sub>2A</sub> 受容体の感受性増大が起きていること、さらにその増大には Rho-kinase が大きく係わっていることを明らかにしている。このことから、動脈硬化を引き起こした血管においては、5-HT に対する反応性増大による高い血管れん縮発現の可能性が強く示唆された。<sup>18,19)</sup>

## 4. インスリンと 5-HT<sub>2A</sub> 受容体

5-HT<sub>2A</sub> 受容体を強発現させた HEK293 細胞において、インスリンが細胞膜表面の 5-HT<sub>2A</sub> 受容体の内在化を引き起こし受容体総数を減少させること (Fig. 2), さらに、5-HT による細胞外からの Ca<sup>2+</sup> 流入を有意に抑制することを明らかにした。このことから、インスリン作用不全、すなわち糖尿病においては、血管平滑筋細胞膜 5-HT<sub>2A</sub> 受容体の数が相対的に増加しており、5-HT に対して高い感受性を示す可能性が示唆された。<sup>20)</sup>

## 5. ヒト内胸動脈の 5-HT 受容体サブタイプ

冠動脈バイパス手術の際に、バイパスグラフト血管として最も多用されている内胸動脈において、5-HT は濃度依存的に収縮反応を引き起こした。5-HT<sub>2A</sub> 受容体拮抗薬であるサルポグレラート (SAR) 及び 5-HT<sub>1B</sub> 受容体拮抗薬である SB224289 は、いずれも 5-HT による収縮反応を有意に抑制したが完全には遮断しなかった。さらに、SAR 及び SB224289 の同時投与は、5-HT による収縮反応を完全に抑制した [Fig. 3(A)]. また、内胸動脈平滑筋細胞において、5-HT<sub>2A</sub> 受容体及び 5-HT<sub>1B</sub> 受容

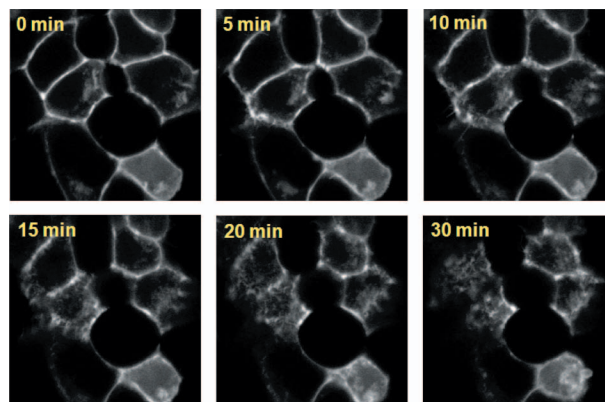


Fig. 2. Typical Photographs Showing Insulin-induced 5-HT<sub>2A</sub>-YFP Internalization in HEK293 Cells

Fluorescence images were taken before and 5-30 min after the application of insulin (10 nmol/l). Numbers above images, time of insulin exposure in minutes.

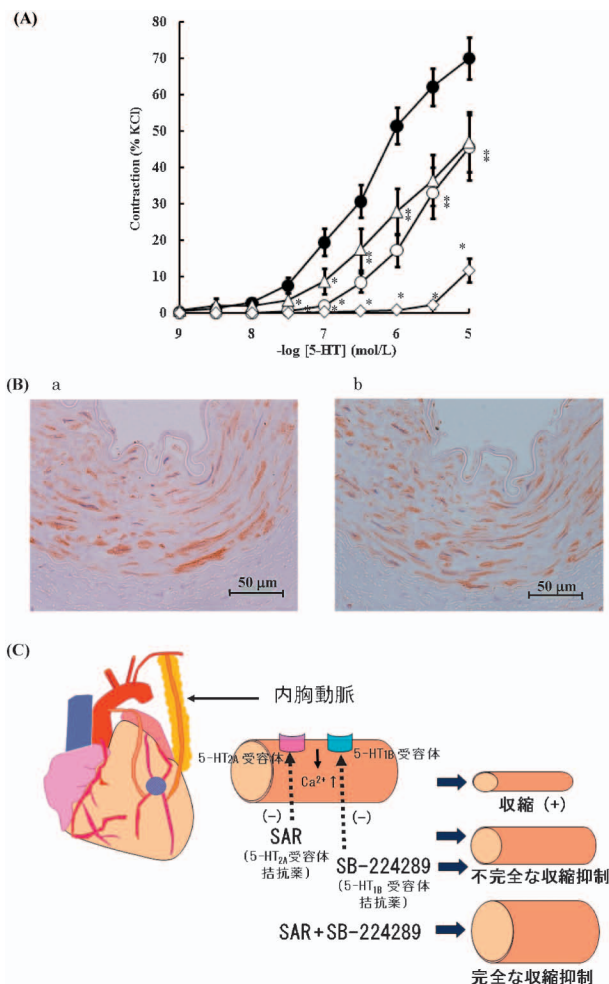


Fig. 3. The vascular responsiveness to 5-HT and the presence of 5-HT receptors in the human internal thoracic artery

(A) Cumulative concentration-response curves for 5-HT-induced contractions in the human internal thoracic artery in the presence of 1.0 μmol/l sarpogrelate (○), 1.0 μmol/l SB224289 (△), or a combination of 1.0 μmol/l sarpogrelate plus SB224289 (◇). (●), control. Sarpogrelate, SB224289 and sarpogrelate plus SB224289 were added to the bath for 30 min prior to the addition of 5-HT. Data are the mean ± S.E.M. ( $n=5$ ). \* $p < 0.05$  compared with control. (B) Immunohistochemistry for (a) 5-HT<sub>2A</sub> and (b) 5-HT<sub>1B</sub> receptors in the human internal thoracic artery. Positive immunoreactions stained brown with 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride. (C) Effects of sarpogrelate (SAR; antagonist of 5-HT<sub>2A</sub> receptor) and SB-224289 (antagonist of 5-HT<sub>1B</sub> receptor) on 5-HT-induced contraction of the human internal thoracic artery.

体の発現が免疫組織化学染色により確認された [Fig. 3(B)].

内胸動脈において、5-HTによる血管収縮作用には、平滑筋細胞の5-HT<sub>2A</sub>及び5-HT<sub>1B</sub>受容体の両受容体が関与していることを明らかとした。血管内皮細胞には、5-HT<sub>1B</sub>受容体が存在して、弛緩物質NOを介した血管拡張作用を引き起こすとされるが、ヒト内胸動脈での内皮細胞における5-HT<sub>1B</sub>受容体の意義(役割)は不明である。冠動脈バイパス手術においてグラフト血管の内皮細胞は、障害を受

けている可能性が高く、十分な血管拡張を引き起こせないことも考えられる。

以上のことから、内胸動脈をバイパスグラフト血管として使用する冠動脈バイパス手術の術中及び術後の血管れん縮予防には、5-HT<sub>2A</sub>受容体拮抗薬に加えて5-HT<sub>1B</sub>受容体拮抗薬併用が有用となる可能性が示唆された [Fig. 3(C)].<sup>21)</sup>

## 6. 糖尿病患者の内胸動脈の5-HTによる血管反応性の変化

今日わが国において、心筋梗塞などの動脈硬化性疾患が急増している原因として、糖尿病の罹患率の増加が挙げられ、大きな社会問題となっている。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が、その詳細なメカニズムについては検討されていない。本研究において、バイパスグラフト血管の反応性を検討する中で、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た [Fig. 4(A)]. このことから、糖尿病患者では、血小板由来の5-HTによる血管れん縮が高頻度で発現する可能性が示唆された。さらにこの糖尿病群の血管反応性増強作用には、5-HT<sub>2A</sub>及び5-HT<sub>1B</sub>受容体の両者が関わっていることを明らかにした。以上の結果から、糖尿病患者の冠動脈バイパス手術の術中及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<sub>2A</sub>受容体と5-HT<sub>1B</sub>受容体の両受容体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た [Fig. 4(B)]. 今後、5-HT<sub>2A</sub>受容体及び5-HT<sub>1B</sub>受容体の遺伝子やタンパク質の発現レベル、さらには細胞内シグナリングの詳細を検討し、糖尿病患者のバイパスグラフト血管を長期開存させるための薬理的知見を提供していく予定である。

## 7. おわりに

本研究において、糖尿病性虚血性心疾患の血管れん縮増大には、5-HT受容体の細胞膜発現量増加と5-HT受容体刺激に伴うRho-kinaseを介する選択的な細胞内シグナルトランスダクションの増幅が関与することが示唆された。また、5-HT受容体の細胞膜発現量増加には、5-HT<sub>2A</sub>受容体のみならず、5-HT<sub>1B</sub>受容体も関与する可能性が示唆された。以

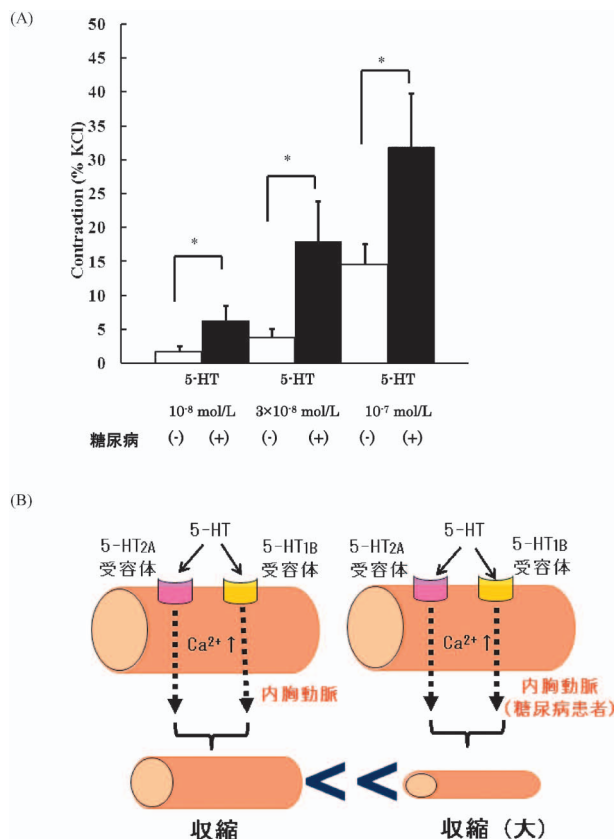


Fig. 4. The enhanced vascular responsiveness to 5-HT in internal thoracic arteries from the patients with diabetes mellitus (DM)

(A) 5-HT-induced contractions in internal thoracic arteries from the patients with and without DM. \* $p < 0.05$ . (B) Diagram of the 5-HT system of the internal thoracic arteries from the patients with and without DM.

上の結果より、糖尿病患者の内胸動脈を使用する冠動脈バイパス手術では、5-HT<sub>2A</sub>及び5-HT<sub>1B</sub>受容体拮抗薬の併用使用が、バイパスグラフト血管の長期開存率を高める可能性を明らかとした。現在、血管れん縮抑制薬としては、塩酸パパベリンや $Ca^{2+}$ 拮抗薬が使用されている。塩酸パパベリンは血管機能傷害の誘発、 $Ca^{2+}$ 拮抗薬は著効がないとされていることから、新たな血管れん縮抑制薬の探索が切望されている。高齢化や生活習慣の変化に伴い、冠動脈バイパス手術施行回数が年々増加している中で、本研究の社会的意義は大きいと思われる。

**謝辞** 本研究は、九州保健福祉大学薬学部薬理学第一講座にて行われたものであり、山本隆一教授に心より感謝申し上げます。また、本研究の遂行に際し、ご教示・ご協力下さいました比佐博彰教授(九州保健福祉大学薬学部薬理学第二講座)に御礼

申し上げます。さらに本研究は、宮崎県立延岡病院心臓血管外科、くわばら医院及び宮崎大学医学部病理学第一講座との共同研究で進められたものであり、中村栄作医師、中村都英医師(宮崎県立延岡病院心臓血管外科)、桑原正知医師(くわばら医院)、浅田祐士郎教授(宮崎大学医学部病理学第一講座)及びご協力頂いた諸先生方に深謝いたします。

## REFERENCES

- 1) Sarabu M. R., McClung J. A., Fass A., Reed G. E., *Ann. Thorac. Surg.*, **44**, 199–200 (1987).
- 2) Blanche C., Chauv A., *Ann. Thorac. Surg.*, **45**, 586 (1988).
- 3) Von Segesser L., Simonert F., Meier B., Finci L., Faidutti B., *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, **35**, 352–354 (1987).
- 4) Vanhoutte P. M., Shimokawa H., *Circulation*, **80**, 1–9 (1989).
- 5) Miyata K., Shimokawa H., Higo T., Yamawaki T., Katsumata N., Kandabashi T., Tanaka E., Takamura Y., Yogo K., Egashira K., Takeshita A., *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **35**, 294–301 (2000).
- 6) Shimokawa H., Tomoike H., Nabeyama S., Yamamoto H., Araki H., Nakamura M., Ishii Y., Tanaka K., *Science*, **221**, 560–562 (1983).
- 7) Hesistad D. D., Armstrong M. L., Marcus M. L., Piegors D. J., Mark A. L., *Circ. Res.*, **54**, 711–718 (1984).
- 8) Golino P., Piscione F., Willeron J. T., Cappelli-Bigazzi M., Focaccio A., Villari B., Indolfi C., Russolillo E., Condorelli M., Chiariello M., *N. Engl. J. Med.*, **324**, 641–648 (1991).
- 9) McFadden E. P., Clarke J. G., Davies G. J., Kaski J. C., Haider A. W., Maseri A., *N. Engl. J. Med.*, **324**, 648–654 (1991).
- 10) Vikenes K., Farstad M., Nordrehaug J. E., *Circulation*, **100**, 483–489 (1999).
- 11) Hara K., Hirowatari Y., Yoshika M., Komiya Y., Tsuka Y., Takahashi H., *J. Lab. Clin. Med.*, **144**, 31–37 (2004).
- 12) Golino P., Ashton J. H., Buja L. M., Rosolowsky M., Taylor A. L., McNatt J., Campbell W. B., Willerson J. T., *Circulation*, **79**, 154–166 (1989).

- 13) Nagatomo T., Rashid M., Muntasir H. A., Komiyama T., *Pharmacol. Ther.*, **104**, 59–81 (2004).
- 14) Hoyer D., Clarke D. E., Fozard J. R., Hartig P. R., Martin G. R., Mylecharane E. J., Saxena P. R., Humphrey P. P., *Pharmacol. Rev.*, **46**, 157–203 (1994).
- 15) Stojnic N., Bukarica L. G., Peric M., Lesic A., Lipkovski J. M., Heinle H., *J. Pharmacol. Sci.*, **100**, 34–40 (2006).
- 16) Ark M., Ozveren E., Yazici G., Korkmaz B., Buyukafsar K., Arikan O., Kubat H., Songu-Mize E., *Cell Biochem. Biophys.*, **41**, 331–342 (2004).
- 17) Wackenfors A., Jarvius M., Ingemansson R., Edvinsson L., Malmsjo M., *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **45**, 476–484 (2005).
- 18) Nishihira K., Yamashita A., Tanaka N., Kawamoto R., Imamura T., Yamamoto R., Eto T., Asada Y., *J. Thromb. Haemost.*, **4**, 247–255 (2006).
- 19) Nishihira K., Yamashita A., Tanaka N., Moriguchi-Goto S., Imamura T., Ishida T., Kawashima S., Yamamoto R., Kitamura K., Asada Y., *J. Thromb. Haemost.*, **6**, 1207–1214 (2008).
- 20) Ohkura M., Tanaka N., Kobayashi H., Wada A., Nakai J., Yamamoto R., *Eur. J. Pharmacol.*, **518**, 18–21 (2005).
- 21) Tanaka N., Nakamura E., Ohkura M., Kuwabara M., Yamashita A., Onitsuka T., Asada Y., Hisa H., Yamamoto R., *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, **35**, 836–840 (2008).