

スタチンの多面的作用における SmgGDS の役割の解明

田中 眞一

目次

1. 要約	・・・	4
略語集		
2. 研究背景	・・・	6
2.1 スタチンの多面的作用		
2.2 低分子量 GTP 結合タンパク質の活性制御機構とスタチンの多面的作用における Rac1 経路の役割		
2.3 SmgGDS の細胞内分子機構		
3. 研究目的	・・・	9
4. 研究方法	・・・	10
4.1 細胞培養実験		
4.1.1 細胞培養および薬物処理		
4.1.2 Small interfering RNA (siRNA) の HUVEC への導入		
4.1.3 ウェスタンブロット解析		
4.1.4 ROS 産生の解析		
4.2 動物実験		
4.2.1 動物		
4.2.2 マウスにおける AngII 誘発冠動脈中内膜肥厚および血管周囲線維化の評価		
4.3 臨床研究		
4.3.1 健常成人被験者の PMNL 中の SmgGDS 発現量変化および酸化ストレス指標との相関関係評価		
4.4 統計学的解析		

5. 研究結果	・・・ 14
5.1 スタチンは選択的な Rac1 分解に関与する SmgGDS 発現を増加させる	
5.2 スタチンは SmgGDS 発現増加を介して Rac1 の分解を促進する	
5.3 スタチンは SmgGDS 発現増加作用を介して ROS 産生を抑制する	
5.4 SmgGDS \pm マウスではスタチンの心血管保護作用が消失する	
5.5 国内臨床用量スタチンは SmgGDS 発現を増加させ酸化ストレス指標減少と相関関係を有する	
5.6 スタチンによる SmgGDS 発現増加作用はメバロン酸経路を介した作用ではない	
5.7 スタチンは β 1 インテグリンに作用し Akt1 経路を介して SmgGDS を増加させる	
6. 考察	・・・ 19
6.1 本研究で得られた知見	
6.2 本研究の臨床的意義	
6.3 本研究による創薬の可能性	
6.4 スタチンの多面的作用に関与する他の経路	
6.5 スタチンによる SmgGDS 発現増加作用の分子的機序	
6.6 本研究の限界	
7. 結論	・・・ 24
8. 謝辞	・・・ 25
9. 引用文献	・・・ 26
10. 図の説明	・・・ 30
11. 図	・・・ 37
12. 表	・・・ 56

1. 要約

【背景】 3-ヒドロキシ 3-メチルグルタリル-CoA 還元酵素阻害薬であるスタチンには、その主な作用であるコレステロール低下作用だけでなく、コレステロール低下作用によらず心血管系疾患に対して保護的にはたらく多面的作用を有することが多数報告されている。多面的作用の分子的機序としては間接的な RhoA/Rho キナーゼ経路の抑制作用に由来すると一般的に考えられているが、我々はこれまでの研究で国内臨床用量のスタチンは RhoA/Rho キナーゼ経路を抑制することなく選択的に Rac1 経路を抑制することを明らかにした。しかし、スタチンが選択的に Rac1 経路を抑制する作用機序は未だ不明であった。そこで、国内臨床用量スタチンの選択的 Rac1 経路抑制作用の分子的機序を明らかにすることを目的として、低分子量 GTP 結合タンパク質 GDP 解離刺激因子 (SmgGDS) に着目して研究を行った。

【方法・結果】 スタチンをヒト臍帯静脈内皮細胞に作用させると濃度依存的に SmgGDS 発現量を増加させた。また、SmgGDS をノックダウンした細胞ではスタチンによる Rac1 分解促進作用およびアンギオテンシン II (AngII) に誘発される活性酸素種 (ROS) 産生抑制作用が減弱した。*in vivo* において、WT マウスにスタチンを投与すると腹部大動脈の SmgGDS 発現量を増加させた。また、WT マウスでは、AngII 投与により誘発される冠動脈中膜肥厚および血管周囲の線維化に対し、スタチンが保護的な作用を示したが、SmgGDS ヘテロ欠損マウスではスタチンによる保護的作用が消失した。健常成人被験者において、国内臨床用量のスタチンは末梢血多核白血球中の SmgGDS 発現量を増加させ、その増加と酸化ストレス指標減少との間に相関関係が認められた。最後に、スタチンによる SmgGDS 発現増加作用の分子的機序を明らかにするため、Akt1 または β 1 インテグリンをノックダウンした細胞にスタチンを作用させたところ、スタチンによる SmgGDS 発現増加作用が消失した。

【結論】 *in vitro*、*in vivo* および健常成人被験者における研究により、国内臨床用量のスタチンは RhoA/Rho キナーゼ経路を介して多面的作用を発現するのではなく、 β 1 インテグリン/Akt1 経路を介して SmgGDS 発現量を増加させ、選択的に Rac1 経路および ROS 産生を抑制し、多面的作用を発現している可能性が示された。

略語集

- AngII**; angiotensin II, アンギオテンシン II
- ATOR**; atorvastatin, アトルバスタチン
- eNOS**; endothelial nitric oxide synthase, 内皮型一酸化窒素合成酵素
- FPP**; farnesyl pyrophosphate, ファルネシルピロリン酸
- GAP**; GTPase activating protein; GAP, GTPase 活性化タンパク質
- GDP**; guanosine triphosphate, グアノシン二リン酸
- GDI**; GDP dissociation inhibitor, GDP 解離阻害因子
- GEF**; guanine nucleotide exchange factor, グアニンヌクレオチド交換因子
- GGPP**; geranylgeranyl pyrophosphate, ゲラニルゲラニルピロリン酸
- GSK3 β** ; glycogen synthase kinase 3 β , グリコーゲン合成酵素キナーゼ 3 β
- GTP**; guanosine triphosphate, グアノシン三リン酸
- HDL**; high-density lipoprotein, 高比重リポタンパク質
- HE**; hematoxylin eosin, ヘマトキシリン・エオジン
- HMG-CoA**; 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA, 3-ヒドロキシ 3-メチルグルタリル-CoA
- HUVEC**; human umbilical venous endothelial cells, ヒト臍帯静脈内皮細胞
- LDL**; low-density lipoprotein, 低比重リポタンパク質
- MDA**; malondialdehyde-modified, マロンジアルデヒド修飾
- MT**; Masson's trichrome, マッソン・トリクローム
- PITA**; pitavastatin, ピタバスタチン
- PMNL**; polymorphonuclear leukocytes, 多核白血球
- PRA**; pravastatin, プラバスタチン
- ROS**; reactive oxygen species, 活性酸素種
- SmgGDS**; small GTP-binding protein dissociation stimulator, 低分子量 GTP 結合タンパク質 GDP 解離刺激因子
- TGF**; transforming growth factor, トランスフォーミング増殖因子
- VEGF**; vascular endothelial growth factor, 血管内皮成長因子
- WT**; wild-type, 野生型

2. 研究背景

2.1 スタチンの多面的作用

スタチンは、3-ヒドロキシ 3-メチルグルタリル-CoA (3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA; HMG-CoA) 還元酵素を阻害し、コレステロールの生合成を低下させる高脂血症治療薬の総称で、世界中で広く使用されている^{1), 2)}。近年、スタチンには、主な作用であるコレステロール低下作用だけでなく、コレステロール低下作用によらず心血管系疾患に対して保護的にはたらく多面的作用を有することが多数報告されている^{3), 4)}。その作用機序としては、スタチンがコレステロールの生合成過程における中間産物のファルネシルピロリン酸 (Farnesyl pyrophosphate; FPP) の産生を抑制し、RhoA の活性化に關与するゲラニルゲラニルピロリン酸 (Geranylgeranyl pyrophosphate; GGPP) の産生を抑制することで、間接的に RhoA/Rho キナーゼ経路を抑制することに由来すると考えられている^{5), 6)}。しかし、多くの研究で用いられているスタチンの用量は、国内の臨床用量と比べ非常に高用量が用いられており、スタチンの多面的作用を説明するには十分でない。

2.2 低分子量 GTP 結合タンパク質の活性制御機構とスタチンの多面的作用における Rac1 経路の役割

Rho、Ras のような低分子量グアノシン三リン酸 (guanosine triphosphate ; GTP) 結合タンパク質スーパーファミリーは、遺伝子発現調整をはじめ細胞骨格形成や細胞内小細胞輸送など多岐にわたる機能を有している⁷⁾。その中でも Rho を中心とした Rac や Cdc42 を含む Rho ファミリーは、細胞骨格形成や遺伝子発現などに対する調整因子として重要な役割を担っている。Rho はグアノシン二リン酸 (guanosine triphosphate ; GDP) 結合型から GTP 結合型へ変換されることにより不活性型から活性型へと変化する。この活性化機構は、GDP 解離阻害因子 (GDP dissociation inhibitor; GDI)、グアニン-ヌクレオチド交換因子 (guanine nucleotide exchange factor; GEF) や GTPase 活性化タンパク質 (GTPase activating protein; GAP) のような因子により厳密に制御されている⁸⁾ (図 1)。通常、非刺激下の細胞において Rho の大部分は GDI と結合後、細胞膜より解離し GDP 結合型として細胞質に存在している。細胞がアゴニスト刺激など

により活性化されると GEF の働きにより GDP 結合型より GTP 結合型に変換され、細胞膜へと移行し標的タンパク質に作用してシグナルを伝達する。GAP は GTP を脱リン酸化することにより、再び、Rho を非活性体の GDP 結合型へと変換する⁸⁾。

我々は、ヒトにおける国内臨床用量のスタチンの RhoA/Rho キナーゼ活性に対する作用を検証するため、10 名の健常成人被験者に国内臨床最大用量である 20 mg/日のアトルバスタチンを服用してもらい、スタチンの服用前および服用開始から 1 週間後の空腹時に末梢血多核白血球 (polymorphonuclear leukocytes; PMNL) を採取し、活性型である GTP 結合型 RhoA 発現についてウエスタンブロットを用いて評価した⁹⁾。その結果、国内臨床用量のアトルバスタチンは活性型である GTP 結合型 RhoA の発現を低下させることはなく、Rho キナーゼの基質の一つである MBS のリン酸化体の発現も低下させなかった (図 2A, B)。一方、同用量のアトルバスタチンは活性型である GTP 結合型 Rac1 の発現を有意に低下させた⁹⁾ (図 2C)。この研究から、健常成人被験者において国内臨床用量スタチンは RhoA/Rho キナーゼ経路を抑制せず、選択的に Rac1 経路を抑制することが示された⁹⁾ (図 3)。

Rac1 は活性酸素種 (reactive oxygen species; ROS) 産生において重要な役割を有しており、心肥大における重要な因子の一つである。マウス AngII 誘発心肥大モデルにおいてシンバスタチンが Rac1 を介して心臓や血管平滑筋における ROS 産生を抑制することが報告されている¹⁰⁾。これらの知見はヒトの心臓組織を用いた解析でも確認されていることからスタチンの多面的作用において、Rac1 経路を介した ROS 産生抑制経路は中心的な役割を有していると考えられる^{11), 12)}。

2.3 SmgGDS の細胞内分子機構

国内臨床用量スタチンが RhoA/Rho キナーゼ経路を抑制せず、選択的に Rac1 経路を抑制することが明らかとなったが、選択的に Rac1 経路を抑制する分子的機序は不明であった。そこでスタチンの選択的 Rac1 経路抑制作用の分子的機序を解明するため、GEF の一種である低分子量 GTP 結合タンパク質 GDP 解離刺激因子 (small GTP-binding protein dissociation stimulator; SmgGDS) に着目した。SmgGDS は、GEF の中で唯一アルマジロタンパク質ファミリーに属し、RhoA や Rac1 の細胞内局在に関与する機能が報告されている^{13), 14), 15)}。SmgGDS は細胞内において、RhoA と Rac1 と

同様に結合するが、RhoA と Rac1 の C 末側の配列を認識し核移行シグナル配列を有する Rac1 のみを細胞質から核内へ移行させる^{15),16)}。その後、核内に輸送された Rac1 はプロテアソームにより分解を受けることが報告されている¹⁷⁾。一方、RhoA は核移行シグナル配列を有しておらず、プロテアソームによる分解を受けることはない¹⁷⁾。この SmgGDS の機能が、スタチンの選択的 Rac1 経路抑制作用に関与している可能性を考え、スタチンの SmgGDS に対する作用を検証した。

3. 研究目的

国内臨床用量スタチンの選択的 Rac1 経路抑制作用の分子的機序を明らかにすることを初めとして、スタチンの多面的作用の詳細な分子的機序を明らかにすることを目的として研究を行った。

4. 研究方法

4.1 細胞培養実験

4.1.1 細胞培養および薬物処理

ヒト臍帯静脈内皮細胞 (Human Umbilical Venous Endothelial Cells; HUVEC、タカラバイオ) を EGM-2 培地 (ロンザ) で 24 時間インキュベート (5% CO₂, 37°C) した。24 時間インキュベートした後、スタチン (アトルバスタチンおよびピタバスタチン) を HUVEC に添加し、24 時間処理した。FPP (シグマ) または GGPP (シグマ) はスタチンと同時に添加し、24 時間処理した。プロテアソーム阻害薬である MG-132 (カルビオケム) はスタチンと同時に添加し、14 時間処理した。各薬剤処理後、HUVEC を氷冷したリン酸塩緩衝食塩水 (Phosphate buffered saline; PBS) で 2 度洗浄し、次いで溶解用緩衝液を加えた後に超音波で処理した。細胞溶解液は遠心分離した後、上清をウエスタンブロットに用いた。HUVEC を分画する際は、Qproteome 細胞コンパートメントキット (キアゲン) を用いた。

4.1.2 Small interfering RNA (siRNA) の HUVEC への導入

SmgGDS、グリコーゲン合成酵素キナーゼ 3β (glycogen synthase kinase 3β; GSK3β)、Akt1、Akt2、Akt3 および β1 インテグリンに対する siRNA はキアゲンより購入した。また、ネガティブコントロール siRNA はキアゲンの AllStars Negative control siRNA を使用した。HUVEC への siRNA の導入には、HiperFect Transfection Reagent (キアゲン) を用いて、10 nmol/L の濃度で調製した siRNA を使用し、導入した。導入から 72 時間後の HUVEC をウエスタンブロットにより解析した。スタチン (アトルバスタチンおよびピタバスタチン) は siRNA 導入から 48 時間後に添加し、siRNA 導入の最後の 24 時間処理した。

4.1.3 ウエスタンブロット解析

培養細胞、マウス組織中およびヒト末梢血 PMNL 中の各種タンパク質の発現量を定量するため、同量の細胞溶解液もしくは組織溶解液を SDS-PAGE にて分離し、PVDF 膜 (GE ヘルスケア) に転写した。転写した PVDF 膜を、抗 SmgGDS 抗体 (BD transduction

Lab.)、抗 RhoA 抗体 (サンタクルズ)、抗 Rac1 抗体 (ミリポア)、抗 GTP-RhoA 抗体 (アップステート)、抗 GTP-Rac1 抗体 (アップステート)、抗 MBS 抗体 (コバンス)、抗リン酸化 MBS (Thr696) 抗体 (アップステート)、抗 GSK3 α/β 抗体 (セルシグナリング)、抗 2 型血管内皮成長因子 (vascular endothelial growth factor; VEGF) 受容体抗体 (セルシグナリング)、抗リン酸化 Akt (Ser473) 抗体 (セルシグナリング)、抗 Akt (pan) 抗体 (セルシグナリング)、抗 Akt 1 抗体 (セルシグナリング)、抗 Akt 2 抗体 (セルシグナリング)、抗 Akt 3 抗体 (セルシグナリング)、抗 β 1 インテグリン抗体 (セルシグナリング)、抗 β アクチン抗体 (アブカム)、抗 LAMIN 抗体 (BD transduction Lab.) の 1 次抗体で処理した。その後、horseradish-peroxidase-conjugated ウサギ抗マウス抗体、ヤギ抗ウサギ抗体で処理し、enhanced chemiluminescence system (ECL Western Blotting Detection Kit, GE ヘルスケア) を使用し、目的とするタンパク質を検出した。タンパク質の定量には Image J (NIH) を使用した。

4.1.4 ROS 産生の解析

HUVEC に 1 $\mu\text{mol/L}$ のアンギオテンシン II (Angiotensin II; AngII) (和光) を添加し、3 時間インキュベートした (37°C、5% CO₂)。その後、37°C に加温した PBS で 2 回洗浄し、5 $\mu\text{mol/L}$ の 2, 7 ジクロロフルオレセインジアセテート (2, 7-dichlorofluorescein diacetate; DCF) (ケイマン) を添加し、30 分間インキュベートした (37°C、5% CO₂)。DCF 処理後、488 nm 波長光を蛍光顕微鏡 (BIOREVO, キーエンス) にて観察した。蛍光強度は BZ-II analyzer software (キーエンス) を用いて解析した。

4.2 動物実験

すべての動物実験プロトコルは「国立大学法人東北大学における動物実験等に関する規定」に基づき作成し、東北大学動物実験センターの承認を得て、規定に従い実施した。すべての動物は標準的ガイドラインに従い、人道的な保護を受けた (承認番号: 2011 医動-274, 2012 医動-110)。

4.2.1 動物

SmgGDS 欠損マウスは神戸大学の高井義美教授より分与いただき、実験に使用した。

SmgGDS 完全欠損 (SmgGDS^{-/-}) マウスは生後間もなく心不全を発症し死亡するため、SmgGDS ヘテロ欠損 (SmgGDS^{+/-}) マウスを使用した¹⁸⁾。また、対照には同腹仔の野生型 (SmgGDS^{+/+}, wild-type; WT) マウスを使用した。ジェノタイピングは拡散自動生成システム (Maxwell 16, プロメガ) を用いてマウス尾部より抽出した DNA を鋳型にして PCR 法によって確認した。

4.2.2 マウスにおける AngII 誘発冠動脈中膜肥厚および血管周囲線維化の評価

イソフルラン麻酔下において、10 週齢の SmgGDS^{+/-}マウスもしくは SmgGDS^{+/+}マウスの背部皮下に 2.0 mg/kg/日の投与量となるように調製した AngII もしくは生理食塩水を添加した浸透圧ポンプ (Alzet model 2002, Alze Corp.) を留置した。浸透圧ポンプ留置後、溶媒 (0.5%メチルセルロース) もしくはスタチン (アトルバスタチンおよびプラバスタチン) を毎日、2 週間、強制経口投与した。浸透圧ポンプ留置から 2 週間後の血圧を、非侵襲性血圧測定装置 (MK-2000、室町) を用いて測定した。また、血漿中脂質 (トリグリセリド、総コレステロール、低比重リポタンパク質 (low-density lipoprotein; LDL) コレステロール、高比重リポタンパク質 (high-density lipoprotein; HDL) コレステロール) を高速液体クロマトグラフィーシステム (スカイライトバイオテック) を用いて測定した。

病理組織学的な解析は、以下の手順で行った。マウスの心臓組織を 10%ホルマリンにて固定し、パラフィン包埋した。その後、5 μm に薄切した標本を作製し、ヘマトキシリン・エオジン (hematoxylin eosin; HE) 染色およびマッソン・トリクローム (Masson's trichrome; MT) 染色を行った。画像撮影は研究用システム顕微鏡 (BX51、オリンパス) を用い、解析は Image J (NIH) を使用した

4.3 臨床研究

4.3.1 健常成人被験者の PMNL 中の SmgGDS 発現量変化および酸化ストレス指標との相関関係評価

臨床研究実施計画は東北大学大学院医学系研究科倫理委員会の承認を得て、当委員会の規定に従いヘルシンキ宣言を遵守して実施した (承認番号: 2010-502)。

20 名の健常成人被験者から同意説明、同意取得後、10 名ずつランダムに 2 群に割

り付けた (表 1)。1 群目に割り付けられた被験者は 20 mg のプラバスタチンを 1 日 1 回、2 週間服用し、2 週間の休薬後、20 mg のアトルバスタチンを 1 日 1 回、2 週間服用した。2 群目に割り付けられた被験者は、1 群目とは逆にアトルバスタチンから開始しプラバスタチンに移行するクロスオーバー試験を実施した (図 11)。スタチン服用前および最終服用の 12 時間後の空腹時に被験者より採血し、末梢血から PMNL を採取し、SmgGDS 発現量をウエスタンブロットにより解析した。また、血漿中の脂質プロファイルについても確認した。

4.4 統計学的解析

結果は平均値±標準誤差で表記した。2 群間のパラメーターの比較を、unpaired Student t 検定で実施した。統計解析について、一元配置分散分析の後、Dunnett 検定を実施した。統計的有意差は JMP 8 (SAS Institute) で評価した。P 値 < 0.05 を統計的に有意であると考えた。

5. 研究結果

5.1 スタチンは選択的な Rac1 分解に関与する SmgGDS 発現を増加させる

HUVEC にスタチン（アトルバスタチンまたはピタバスタチン）を添加し、添加から 24 時間後の HUVEC を回収し、ウエスタンブロットにより SmgGDS の発現量を確認した。その結果、スタチンは濃度依存的に SmgGDS の発現を増加させた（図 4A, B）。

また、マウスに 10 mg/kg のアトルバスタチンを 1 日 1 回の頻度で 1 週間、経口投与した後、腹部大動脈を採取し、ウエスタンブロットにより組織抽出液中の SmgGDS の発現量を確認した。その結果、溶媒投与群に比べアトルバスタチン投与群では SmgGDS の発現が増加した（図 5）。50 mg/kg のプラバスタチンを用いた検討でも同様の結果が得られた（図 5）。

以上の結果より、スタチンは *in vitro* および *in vivo* で SmgGDS を増加させることを明らかにした。

5.2 スタチンは SmgGDS 発現増加を介して Rac1 の分解を促進する

スタチンによる SmgGDS 増加作用が選択的な Rac1 の分解に関連があることを検証するために、SmgGDS に対する siRNA を導入し、SmgGDS をノックダウンさせた HUVEC を用いて検討を行った。ネガティブコントロール siRNA を導入した HUVEC にアトルバスタチンを添加し、添加から 24 時間後の HUVEC を回収し、ウエスタンブロットにより Rac1 の発現量を確認した。その結果、アトルバスタチンは Rac1 の発現量を低下させた（図 6A）。これに対して、SmgGDS siRNA を導入した HUVEC ではアトルバスタチンによる Rac1 の発現量低下は認められなかった（図 6A）。さらに、アトルバスタチンのみを添加した HUVEC と、アトルバスタチンに加えプロテアソーム阻害薬である MG-132 を添加した HUVEC の核を分画し、核画分中の Rac1 の発現量をウエスタンブロットにより確認した。その結果、アトルバスタチン添加により核画分中の Rac1 の発現量が低下していることを確認し、その低下は MG-132 を処理することにより抑制された（図 6B）。ピタバスタチンを用いた検討でも同様の結果が得られた（図 7A, B）。

以上の結果より、スタチンは SmgGDS 発現増加作用を介して核内における Rac1 の

プロテアソーム分解を亢進していることが示された。

5.3 スタチンは SmgGDS 発現増加作用を介して ROS 産生を抑制する

スタチンによる Rac1 分解と多面的作用との関連性を検証するため、SmgGDS siRNA を導入した HUVEC を用いて ROS 産生に対する影響を検討した。AngII を HUVEC に添加することにより誘発される ROS 産生を DCF 染色にて観察した。ネガティブコントロール siRNA を導入した HUVEC では、AngII 添加により DCF 染色の輝度が強くなり、ROS 産生が増加した。これに、アトルバスタチンを前処理しておくことで ROS 産生の増加は抑制された (図 8)。一方、SmgGDS siRNA を導入した HUVEC では、AngII 添加による ROS 産生は増加したが、アトルバスタチン前処理による ROS 産生抑制作用は認められなかった (図 8)。ピタバスタチンを用いた検討でも同様の結果が得られた (図 9)。

以上の結果より、スタチンは SmgGDS 発現増加作用を介して Rac1 分解を促進し、ROS 産生を抑制していることが示された。

5.4 SmgGDS^{+/-}マウスではスタチンの心血管保護作用が消失する

in vitro で確認したスタチンの SmgGDS 発現増加作用を介した Rac1 経路抑制および ROS 産生抑制効果の *in vivo* における意義を検証するため、SmgGDS^{+/-}マウスを用いて実験を行った。SmgGDS^{+/-}マウスに AngII を 2 週間、浸透圧ポンプを用いて持続皮下投与することにより誘発される冠動脈中膜肥厚および血管周囲の線維化に対して、SmgGDS^{+/+}マウスと比べスタチンの心血管系への保護作用に影響があるか否か検討を行った。

体重はいずれの群においても差は認められなかった。収縮期血圧は、AngII 投与群で溶媒投与群に比べ上昇したが、スタチン (アトルバスタチンまたはプラバスタチン) の投与による変化は認められなかった。また、血漿中脂質プロファイルは、AngII 投与により一部で増加する傾向が認められたが、スタチンの投与による変化は認められなかった (表 2)。

次に、冠動脈の中膜肥厚および血管周囲の線維化に対するスタチンの作用について検討を行った。AngII の投与によって、SmgGDS^{+/+}マウスおよび SmgGDS^{+/-}マウスの両

方で、溶媒投与群に比べ冠動脈の中膜が肥厚し、血管周囲の線維化が亢進した(図 10A, B, C)。SmgGDS^{+/+}マウスでは、スタチンを投与することで、冠動脈中膜肥厚および血管周囲の線維化を有意に抑制した。スタチンが血圧および血漿中脂質プロファイルに影響を与えていないことより、これらの作用はスタチンの多面的作用によるものであると考えられた。これに対して、SmgGDS^{+/-}マウスでは、スタチンによる冠動脈中膜肥厚および血管周囲の線維化の抑制作用は認められなかった(図 10A, B, C)。なお、心肥大や心臓の拡張能の評価においても同様の結果が認められている¹⁹⁾。

以上の結果より、*in vivo*においても*in vitro*の結果同様、スタチンの多面的作用はSmgGDSを介した作用であることが示された。

5.5 国内臨床用量スタチンは SmgGDS 発現を増加させ酸化ストレス指標減少と相関関係を有する

ヒトにおける国内臨床用量スタチンの SmgGDS に対する作用を検証するため、20名の健常成人被験者に国内臨床最大用量である 20 mg/日のプラバスタチンおよび 20 mg/日のアトルバスタチンを服用するクロスオーバー試験を実施した(図 11)。スタチンの服用前後の PMNL を採取し、ウエスタンブロットにより SmgGDS 発現量を確認した結果、いずれのスタチンも SmgGDS の発現量を増加させた(図 12)。

さらに、SmgGDS の増加と LDL コレステロールの変化との相関関係を確認した結果、SmgGDS の増加と LDL コレステロールの変化との間に相関関係は認められなかった(図 13A, B)。これに対して、SmgGDS の増加と酸化ストレス指標の一つであるマロンジアルデヒド修飾(MDA)-LDL コレステロール減少との相関関係を確認した結果、MDA-LDL コレステロール減少との間に相関関係が認められた(図 13C, D)。

以上の結果より、健常成人被験者において、国内臨床用量スタチンは PMNL 中の SmgGDS 発現量を増加させ、その増加は酸化ストレス指標の減少と相関関係があることが示された。

5.6 スタチンによる SmgGDS 発現増加作用はメバロン酸経路を介した作用ではない

スタチンによる SmgGDS 発現増加作用がコレステロール生合成経路であるメバロン酸経路を介する作用か否かを検証した。これまで、スタチンがメバロン酸の産生を

抑制し、間接的に Akt 経路を活性化することが報告されている²⁰⁾。そこで、メバロン酸とスタチン(アトルバスタチンまたはピタバスタチン)を同時に HUVEC に添加し、添加から 24 時間後の HUVEC を回収し、ウエスタンブロットにより SmgGDS の発現量を確認した。その結果、メバロン酸はスタチンによる SmgGDS 発現増加作用を抑制しなかった(図 14A)。さらに、メバロン酸経路の中間産物である FPP または GGPP とスタチンを同時に HUVEC に添加し、添加から 24 時間後の HUVEC を回収し、ウエスタンブロットにより SmgGDS の発現量を確認した。その結果、メバロン酸と同様に、FPP および GGPP はスタチンによる SmgGDS 増加作用を抑制しなかった(図 14B)。以上の結果より、スタチンの SmgGDS 増加作用はメバロン酸経路を介した作用ではないことが示された。

5.7 スタチンは $\beta 1$ インテグリンに作用し Akt1 経路を介して SmgGDS を増加させる

スタチンは SmgGDS と同じアルマジロタンパク質ファミリーに属する β カテニンの発現を、GSK3 β を阻害することで増加させることが報告されている²¹⁾。 β カテニンは GSK3 β によってリン酸化されるとユビキチン化されプロテアソームによって分解されることが知られている^{22), 23)}。スタチンは間接的に GSK3 β を阻害することで β カテニンのユビキチン化を抑制し β カテニンの安定化に寄与すると考えられる。そこで、HUVEC に GSK3 β siRNA を導入し、ウエスタンブロットにより SmgGDS の発現量を確認したが、予想に反して SmgGDS の発現増加は認められなかった(図 15)。

そこで GSK3 β の上流に位置する Akt に対するアトルバスタチンの作用について検証した。まず、アトルバスタチンを HUVEC に添加し、リン酸化 Akt の発現量を経時的に確認した。その結果、アトルバスタチンは経時的にリン酸化 Akt 発現を亢進した(図 16)。次に、スタチンによる SmgGDS 発現増加作用に Akt が関与しているか否かを検証するため、Akt1、Akt2 または Akt3 の siRNA を HUVEC に導入し、各 Akt をノックダウンした HUVEC にアトルバスタチンを添加し、アトルバスタチンの SmgGDS 発現量に対する Akt の影響を確認した。その結果、Akt1 に対する siRNA を導入した HUVEC においては、アトルバスタチンによる SmgGDS 発現増加作用が消失したが(図 17A)、Akt2 または Akt3 siRNA 導入は、アトルバスタチンによる SmgGDS 発現増加作用に影響しなかった(図 17B, C)。

さらに、Akt1 の上流に位置する $\beta 1$ インテグリンに対するアトルバスタチンの作用についても検証した。 $\beta 1$ インテグリンの siRNA を HUVEC に導入し、 $\beta 1$ インテグリンをノックダウンした HUVEC にアトルバスタチンを添加し、アトルバスタチンの SmgGDS 発現量に対する $\beta 1$ インテグリンの影響を確認した。その結果、 $\beta 1$ インテグリンに対する siRNA を導入した HUVEC ではアトルバスタチンによる SmgGDS 発現増加作用が消失した (図 18A)。2 型 VEGF 受容体の siRNA を導入した HUVEC についても同様の検証を行ったが、2 型 VEGF 受容体の siRNA を導入した HUVEC ではアトルバスタチンは SmgGDS 発現増加作用に影響を与えなかった (図 18B)。

以上の結果より、スタチンは $\beta 1$ インテグリンに作用し、その下流にある Akt1 のリン酸化を亢進させることにより SmgGDS 発現増加に寄与していることが示された。

6. 考察

6.1 本研究で得られた知見

in vitro、*in vivo* および健常成人被験者における研究により、SmgGDS がスタチンの多面的作用において重要な役割を有していることを世界で初めて示した (図 19)。

スタチンは $\beta 1$ インテグリンに作用して Akt1 のリン酸化を亢進する。リン酸化された Akt1 は SmgGDS の転写後の安定化に寄与し、その結果、SmgGDS の発現量を増加させる。発現量が増加した SmgGDS は細胞質において Rac1 と結合し、Rac1 を選択的に核内へ移行させる。核内に移行した Rac1 はプロテアソームによる分解を受け、ROS 産生を抑制することで心血管系に対して保護的な作用を発揮し、スタチンの多面的作用を発現すると考えられる (図 19)。

本研究では 3 種類のスタチン (アトルバスタチン、ピタバスタチン、プラバスタチン) を使用し、その全てで SmgGDS 発現増加作用が認められたため、SmgGDS 発現増加作用はスタチンのクラス効果であると考えられる。

6.2 本研究の臨床的意義

これまで多くの研究により、スタチンは RhoA/Rho キナーゼ経路を抑制することにより多面的作用を発現し、Rho キナーゼ阻害薬として機能する可能性が示唆されてきた^{5), 6)}。我々の過去の知見に基づくと、スタチンが RhoA/Rho キナーゼ経路を阻害するためには、Rac1 経路を阻害する用量の 3 倍以上高い用量を投与する必要があり、アトルバスタチンにおいては 60 mg/日と非常に高用量となる⁹⁾。高用量のスタチンを投与すると RhoA/Rho キナーゼ経路を抑制することは明らかであるが、RhoA/Rho キナーゼ経路阻害を目的とした高用量スタチンの投与は、副作用の観点から推奨できない。本研究の成果により国内臨床用量のスタチンは Rho キナーゼ阻害薬ではなく、Rac1 経路抑制薬として臨床応用できる可能性が示された。

薬剤の投与量に応じた分子的機序を正しく理解することで、病態に即した治療薬の選択や、Rho キナーゼ阻害剤²⁴⁾との併用など、新たな治療戦略の提案につながり、本研究の臨床的意義は非常に大きい。特に、肺高血圧症や狭心症等の疾患は、比較的 RhoA/Rho キナーゼ経路の関与が高い疾患として知られており²⁴⁾、このような疾患に

対して、国内臨床用量のスタチンが誤った認識のまま RhoA/Rho キナーゼ経路阻害薬として臨床応用されることがあれば、患者にとって不利益となる。本研究の結果より、国内臨床用量のスタチンを Rac1 経路依存的な疾患に対して臨床応用する提案が可能になると考えられる。

6.3 本研究による創薬の可能性

本研究の結果より、心血管系疾患に対して選択的 Rac1 阻害薬の臨床応用が有望と考えられる。Rac1 の全身性または血管内皮特異的欠損マウスは胎生致死である^{25), 26)}。また、Rac1 の心筋特異的欠損マウスは AngII 誘発心肥大に対して抵抗性を示すが、拡張型心不全の表現型を有することが報告されている²⁷⁾。現在、癌患者における血管新生および転移の抑制を目的として、選択的 Rac1 阻害薬は多数開発されているものの、副作用の問題により臨床試験に至った化合物はないのが現状である²⁸⁾。

一方、人為的に細胞内の SmgGDS を増やすことができれば心血管系疾患に対する新たな治療薬の開発につながる可能性がある。最近、我々は SmgGDS-HA を細胞外から添加すると、SmgGDS-HA が細胞内に取り込まれることを確認した¹⁹⁾。これは、SmgGDS のタンパク質製剤としての可能性を示唆する結果である。さらに、我々は SmgGDS 活性化薬の探索にも取り組んでおり、SmgGDS を標的とした創薬の可能性を視野に入れ、研究を進めている。

6.4 スタチンの多面的作用に関与する他の経路

RhoA/Rho キナーゼおよび Rac1 経路以外にもスタチンの多面的作用の分子的機序に関する報告がなされている。スタチンは内皮型一酸化窒素合成酵素 (endothelial nitric oxide synthase; eNOS) の活性化を介して多面的作用を発現することが報告されている²⁰⁾。しかし、最近、eNOS 欠損マウスにおいても AngII 誘発心肥大および心臓の拡張能障害をスタチンが抑制することが報告され、スタチンの多面的作用における eNOS の寄与は部分的である可能性が示唆されている²⁹⁾。また、スタチンが ROS 産生抑制作用を介してトランスフォーミング増殖因子 (transforming growth factor; TGF) β 1/Smad 経路を抑制することが報告されている³⁰⁾。TGF- β 1 は組織の線維化を促進することが知られており、TGF- β 1 を過剰発現するマウスは心肥大および心臓の線維化

を自然発症するが、TGF- β 1 欠損マウスは AngII 誘発心肥大に抵抗性を示す^{30), 31)}。これらのスタチンの多面的作用は、eNOS とは独立した ROS/TGF- β 1/Smad 経路を介した作用と考えられる。

さらに、スタチンには薬剤自体にラジカルスカベンジ作用があることが報告されている³²⁾。そのため、スタチンの SmgGDS を介した ROS 産生抑制作用の研究結果はこの作用を考慮して考察する必要がある (図 8A, 9A)。今回、スタチンを同じ濃度で作用させたネガティブコントロール siRNA を導入した HUVEC と SmgGDS siRNA を導入した HUVEC の結果を比較しても、スタチンによる ROS 産生抑制作用に明らかな差が認められた。このことより、本研究において、スタチン自体のラジカルスカベンジ作用による影響は限局的であると考えられる。

6.5 スタチンによる SmgGDS 発現増加作用の分子的機序

本研究の結果より、スタチンは β 1 インテグリンに作用し、Akt1 を介して SmgGDS の発現量を増加させることが示された。

Akt のリン酸化のピークが 10 から 15 分であるのに対し、SmgGDS の発現増加は 24 時間後に観察されており、時間差が生じている。この時間差は、キナーゼによるリン酸化速度とタンパク質発現の転写速度の違いにより生じたものと考えられる。また、現在、Akt のリン酸化から SmgGDS 発現増加に至る間の因子は不明であることから、間の因子のシグナル伝達およびタンパク質発現の転写速度が関与している可能性も考えられる。

また、今回、Akt の 3 つのアイソフォームの違いにより、スタチンの SmgGDS 増加作用に対して寄与が異なることが示された。3 つのアイソフォームは高い相同性を有し、それぞれ類似した構造を有している³³⁾。一方、Akt1 は恒常的に、Akt2 は肝臓、骨格筋および脂肪に、Akt3 は脳および精巣などの組織にそれぞれ多く発現しており、発現分布が異なっている³⁴⁾。特に血管内皮細胞では Akt1 が主に発現しており、主な基質は eNOS および I κ B キナーゼであることが知られているが、血管平滑筋細胞では Akt1 が主に発現しているにもかかわらず、主な基質は Fork-head box protein および GSK3 であることが報告されており³⁴⁾、細胞種によって基質特異性が異なる可能性も示唆されている。また、Akt アイソフォーム間の細胞内局在の違いについても報告さ

れている³⁴⁾。Akt1は細胞質に、Akt2は細胞質の中でもミトコンドリアに、Akt3は核に局在していることが知られているが、細胞内局在についても細胞種によって異なることが報告されている³⁴⁾。アイソフォーム間の基質特異性等、未だ不明な点が多いため、スタチンによる SmgGDS 発現増加作用においてアイソフォーム間の寄与に違いが生じた原因は不明であるが、我々は、スタチンによる SmgGDS 発現増加作用も細胞種によって異なることを報告しており^{19), 35)}、Akt アイソフォーム間の寄与も細胞種によって異なる可能性があることから、今回使用した HUVEC では Akt1 の寄与が高かったものと考えられる。今後、Akt アイソフォームの寄与や Akt1 から SmgGDS 発現増加に至る間の因子について、様々な細胞種を用いて、ノックダウン実験だけでなく CRISPR-Cas9 によるノックアウト実験により明らかにする必要があるものと考えられる。

6.6 本研究の限界

本試験にはいくつかの限界がある。

第一は、スタチンの選択と使用濃度に関する点である。*in vitro* 試験では、水溶性のプラバスタチンは、細胞内に取り込まれる際、有機アニオントランスポーターを必要とするため使用せず、脂溶性のアトルバスタチンとピタバスタチンのみを使用した。また、*in vitro* 試験では、血漿中濃度よりも高濃度のスタチンを使用した。これは、低濃度のスタチンの添加では SmgGDS の発現増加を確認できなかったため、ウェスタンブロットの検出力の限界および細胞種・標的分子の違いによるものと考えている。

スタチンの主作用であるコレステロール低下作用の標的細胞は肝臓細胞であり、これまでヒト肝癌由来細胞である HepG2 細胞を用いた研究において、アトルバスタチンおよびピタバスタチンは 1.9 から 5.8 nM で HMG-CoA 還元酵素阻害作用を示すことが報告されており、ヒトの血中濃度に近い値となっている^{36), 37)}。一方、同じ HepG2 細胞を用いた研究でも、LDL 受容体発現増加作用に関しては 200 倍以上高い濃度のスタチンを使用し検証している^{37), 38)}。このことより、細胞種・標的分子等により *in vitro* 試験における使用濃度に影響があるものと考えられ、使用濃度の違いが生じる可能性が考えられる。また、アトルバスタチンは、M1 および M2 代謝物が多く生じることが知られており、これら代謝物の *in vitro* 活性はアトルバスタチンとほぼ同等である

ことから、使用濃度に代謝物が影響した可能性も考えられる。一方、健常成人被験者での試験において、国内臨床用量のスタチンは SmgGDS 発現量を増加させた。これより、*in vitro* 試験の結果は、ヒト生体での国内臨床用量スタチンの作用を反映しているものと考えている。

第二は、*in vivo* 試験において SmgGDS ヘテロ欠損 (SmgGDS^{+/-}) マウスを使用した点である。SmgGDS 完全欠損 (SmgGDS^{-/-}) マウスは生後間もなく心不全を発症し、死亡する¹⁸⁾。そのため、本研究では、SmgGDS ヘテロ欠損 (SmgGDS^{+/-}) マウスを使用した。SmgGDS^{+/-}マウスは発育および生殖能力共に正常で、その他異常な表現型は認められない。AngII により誘発される冠動脈の中膜肥厚および血管周囲の線維化の程度も SmgGDS^{+/-}マウスと同等で、悪化は認められない。SmgGDS の発現量が低下しているにもかかわらず悪化が認められない原因は不明であるが、SmgGDS^{+/-}マウスにおける SmgGDS 発現量の低下は、心血管系への表現型を悪化させるには不十分であったと考えられる。今後、SmgGDS の *in vivo* における機能を詳細に解析するためには、組織特異的な SmgGDS 欠損マウスや SmgGDS 過剰発現マウスの作製・検証が必要である。

第三は、健常成人被験者における試験の限界である。健常成人被験者での試験において、血管内皮細胞採取は困難なため、PMNL を用いてスタチンによる SmgGDS 発現増加作用を確認した。この方法は心血管系における低分子量 GTP 結合タンパク質の活性を反映した測定法として広く使用されている^{9),39)}。また、本研究では、スタチンの服用により健常成人被験者の血漿中総コレステロールおよび LDL コレステロール低下が認められており (表 3)、コレステロール低下による SmgGDS 発現量変化に対する影響を完全には排除できない結果となっている。さらに、本研究では、健常成人被験者での試験結果に留まるため、心血管系疾患 (冠動脈疾患、高血圧、心不全等) 患者での SmgGDS 発現量およびスタチンの多面的作用発現について詳細に検証する必要があると考えられる。

7. 結語

国内臨床用量のスタチンの多面的作用は、RhoA/Rho キナーゼ経路を介した作用ではなく、選択的に Rac1 経路および ROS 産生抑制を介した作用である。スタチンによる選択的 Rac1 経路抑制には SmgGDS が重要な役割を有している。

本研究の成果は、文献 35 および文献 40 として出版されている。

8. 謝辞

終わりに臨み、本研究の機会を賜り終始懇切な御指導、御鞭撻を賜りました本学大学院医学系研究科 循環器内科学の下川宏明教授に謹んで感謝の意を表します。

次いで、随時有益な御助言と温かい励ましを賜りました久留米大学の福本義弘教授ならびに国際医療福祉大学の柴信行教授に心より感謝いたします。

また、SmgGDS 欠損マウスをご提供いただきました神戸大学の高井義美教授、抗 SmgGDS 抗体をご提供いただきました Wisconsin 医科大学の Carol L. Williams 教授、有益な御助言をいただきました Chicago 大学の James K. Liao 教授、アトルバスタチンをご提供いただきました Pfizer 株式会社、プラバスタチンをご提供いただきました第一三共株式会社、ピタバスタチンをご提供いただきました興和株式会社、数々の御支援、御協力を頂きました本学大学院医学系研究科循環器内科学の皆様に深く感謝いたします。

本研究は日本文部科学省による新学術領域研究に対する研究費補助金、東北大学グローバル医学系 COE プログラム Network Medicine 創生拠点および日本学術振興会による科学研究費助成事業から一部資金援助を受けました。

2017年12月 田中 眞一

9. 引用文献

- (1) Scandinavian Simvastatin Survival Study Group. Randomized trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Survival Study (4S). *Lancet* 1994;344:1383-1389.
- (2) Levine GN, Keaney JF Jr, Vita JA. Cholesterol reduction in cardiovascular disease. Clinical benefits and possible mechanisms. *N. Engl. J. Med.* 1995;332:512-521.
- (3) Davignon J. Beneficial cardiovascular pleiotropic effects of statins. *Circulation* 2004;109:39-43.
- (4) Liao JK, Laufs U. Pleiotropic effects of statins. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2005;45:89-118.
- (5) Hall A. Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* 1998;279:509-514.
- (6) Takemoto M, Liao JK. Pleiotropic effects of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2001;21:1712-1719.
- (7) Shimokawa H, Takeshita A. Rho-kinase is an important therapeutic target in cardiovascular medicine. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2005;25:1767-1775.
- (8) 田中眞一, 下川宏明. Rho/Rho-kinase. *Heart View.* 2009;11 月増刊号:92-98.
- (9) Rashid M, Tawara S, Fukumoto Y, Seto M, Yano K, Shimokawa H. Importance of Rac1 signaling pathway inhibition in the pleiotropic effects of HMG-CoA reductase inhibitors. *Circ. J.* 2009;73:361-370.
- (10) Brown JH, Del Re DP, Sussman MA. The Rac and Rho hall of fame: A decade of hypertrophic signaling hits. *Circ. Res.* 2006;98:730-742.
- (11) Takemoto M, Node K, Nakagami H, Liao Y, Grimm M, Takemoto Y, Kitakaze M, Liao JK. Statins as antioxidant therapy for preventing cardiac myocyte hypertrophy. *J. Clin. Invest.* 2001;108:1429-1437.
- (12) Wassmann S, Laufs U, Bäumer AT, Müller K, Konkol C, Sauer H, Böhm M, Nickenig G. Inhibition of geranylgeranylation reduces angiotensin II-mediated free radical production in vascular smooth muscle cells: Involvement of AT1 receptor expression and Rac1 GTPase. *Mol. Pharmacol.* 2001;59:646-654.

- (13) Yamamoto T, Kaibuchi K, Mizuno T, Hiroyoshi M, Shirataki H, Takai Y. Purification and characterization from bovine brain cytosol of proteins that regulate the GDP/GTP exchange reaction of smg p21s, ras p21-like GTP-binding proteins. *J. Biol. Chem.* 1990;265:16626-16634.
- (14) Mizuno T, Kaibuchi K, Yamamoto T, Kawamura M, Sakoda T, Fujioka H, Matsuura Y, Takai Y. A stimulatory GDP/GTP exchange protein for smg p21 is active on the post-translationally processed form of c-Ki-ras p21 and rhoA p21. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1991;88:6442-6446.
- (15) Williams CL. The polybasic region of Ras and Rho family small GTPases: A regulator of protein interactions and membrane association and a site of nuclear localization signal sequences. *Cell Signal.* 2003;15:1071-1080.
- (16) Hamel B, Monaghan-Benson E, Rojas RJ, Temple BRS, Marston DJ, Burridge K, Sondek J. SmgGDS is a guanine nucleotide exchange factor that specifically activates RhoA and RhoC. *J. Biol. Chem.* 2011;286:12141-12148.
- (17) Lanning CC, Daddona JL, Ruiz-Velasco R, Shafer SH, Williams CL. The Rac1 C-terminal polybasic region regulates the nuclear localization and protein degradation of Rac1. *J. Biol. Chem.* 2004;279:44197-44210.
- (18) Takakura A, Miyoshi J, Ishizaki H, Tanaka M, Togawa A, Nishizawa Y, Yoshida H, Nishikawa S, Takai Y. Involvement of a small GTP-binding protein (G protein) regulator, small G protein GDP dissociation stimulator, in antiapoptotic cell survival signaling. *Mol. Biol. Cell* 2000;11:1875-1886.
- (19) Kudo S, Satoh K, NOgi M, Suzuki K, Sunamura S, Omura J, Kikuchi N, Kurosawa R, Satoh T, Minami T, Ikeda S, Miyata S, Shimokawa H. SmgGDS as a crucial mediator of the inhibitory effects of statins on cardiac hypertrophy and fibrosis. *Hypertension* 2016;67:878-889.
- (20) Kureishi Y, Luo Z, Shiojima I, Bialik A, Fulton D, Lefer DJ, Sessa WC, Walsh K. The HMG-CoA reductase inhibitor simvastatin activates the protein kinase Akt and promotes angiogenesis in normocholesterolemic animals. *Nat. Med.* 2000;6:1004-1010.
- (21) Bergmann MW, Rechner C, Freund C, Baurand A, El Jamali A, Dietz R. Statins inhibit

- reoxygenation-induced cardiomyocyte apoptosis: role for glycogen synthase kinase 3 β and transcription factor β -catenin. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2004;37:681-690.
- (22) Liu C, Li Y, Semenov M, Han C, Baeg GH, Tan Y, Zhang Z, Lin X, He X. Control of catenin phosphorylation/degradation by a dual-kinase mechanism. *Cell* 2002;108:837-847.
- (23) Coluccia AM, Vacca A, Duñach M, Mologni L, Redaelli S, Bustos V, Benati D, Pinna LA, Gambacorti-Passerini C. Bcr-Abl stabilizes β -catenin in chronic myeloid leukemia through its tyrosine phosphorylation. *EMBO J.* 2007;412:211-216.
- (24) Shimokawa, H., Rashid, M. Development of Rho-kinase inhibitors for cardiovascular medicine. *Trends Pharmacol. Sci.* 2007;28:296-302.
- (25) Sugihara K, Nakatsuji N, Nakamura K, Nakao K, Hashimoto R, Otani H, Sakagami H, Kondo H, Nozawa H, Aiba A, Katsuki M. Rac1 is required for the formation of three germ layers during gastrulation. *Oncogene* 1998;17:3427-3433.
- (26) Tan W, Palmby TR, Gavard J, Amornphimoltham P, Zheng Y, Gutkind JS. An essential role for Rac1 in endothelial cell function and vascular development. *FASEB J* 2008;22:1829-38.
- (27) 佐藤稔, 竹下亨典, Liao JK. 心筋特異的 Rac1 遺伝子欠損マウスは拡張型心不全を呈する. *日本内分泌学会雑誌* 2007;83:583.
- (28) Bid HK, Roberts RD, Manchanda PK, Houghton PJ. RAC1: An Emerging Therapeutic Option for Targeting Cancer Angiogenesis and Metastasis. *Mol. Cancer Ther* 2013;12:1925-34.
- (29) Yagi S, Aihara K, Ikeda Y, Sumitomo Y, Yoshida S, Ise T, Iwase T, Ishikawa K, Azuma H, Akaike M, Matsumoto T. Pitavastatin, an HMG-CoA reductase inhibitor, exerts eNOS-independent protective actions against angiotensin II induced cardiovascular remodeling and renal insufficiency. *Circ. Res.* 2008;102:68-76.
- (30) Brooks WW, Conrad CH. Myocardial fibrosis in transforming growth factor beta (1) heterozygous mice. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2000;32:187-195.
- (31) Schultz J, Witt SA, Glascock BJ, Nieman ML, Reiser PJ, Nix SL, Kimball TR, Doetschman T. TGF-beta1 mediates the hypertrophic cardiomyocyte growth induced by

- angiotensin II. *J. Clin. Invest.* 2002;109:787-796.
- (32) Franzoni F, Quiñones-Galvan A, Regoli F, Ferrannini E, Galetta F. A comparative study of the in vitro antioxidant activity of statins. *International Journal of Cardiology* 2003;90:317-321.
- (33) Hanada M, Feng J, Hemmings BA. Structure, regulation and function of PKB/AKT - a major therapeutic target. *Biochim Biophys Acta* 2004;1697:3-16.
- (34) Yu H, Littlewood T, Bennett M. Akt isoforms in vascular disease. *Vascular Pharmacology* 2015;71:57-64.
- (35) Minami T, Satoh K, Nogi M, Kudo S, Miyata S, Tanaka S, Shimokawa H. Statins up-regulate SmgGDS through β 1-integrin/Akt1 pathway in endothelial cells. *Cardiovasc. Res.* 2016;109:151-161.
- (36) 船津敏之, 田中秀行, 臼田眞治. 新規 HMG-CoA 還元酵素阻害薬 YM548 の HepG2 細胞における HMG-CoA 還元酵素 阻害作用およびコレステロール合成抑制作用. *薬理と治療* 1998;26:1435-1441.
- (37) Morikawa S, Umetani M, Nakagawa S, Yamazaki H, Suganami H, Inoue K, Kitahara M, Hamakubo T, Kodama T, Saito Y. Relative induction of mRNA for HMG CoA reductase and LDL receptor by five different HMG-CoA reductase inhibitors in cultured human cells. *J Atheroscler Thromb.* 2000;7:138-44.
- (38) 船津敏之, 田中秀行, 臼田眞治, 後藤 正英, 西嶋智見, 井田素子, 下川晃彦. HepG2 細胞における新規 HMG-CoA 還元酵素阻害薬 YM548 の LDL 受容体活性および LDL 受容体遺伝子発現量に対する作用. *薬理と治療* 1998;26:1443-1450.
- (39) Liu, P.Y., Liu, Y.W., Lin, L.J., Chen, J.H., Liao, J.K. Evidence for statin pleiotropy in humans: Differential effects of statins and ezetimibe Rho-associated coiled-coil containing protein kinase activity, endothelial function, and inflammation. *Circulation* 2009;119:131-138.
- (40) Tanaka S, Fukumoto Y, Nochioka K, Minami T, Kudo S, Shiba N, Takai Y, Williams CL, Liao JK, Shimokawa H. Statins exert the pleiotropic effects through small GTP-binding protein dissociation stimulator upregulation with a resultant Rac1 degradation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2013;33:1591-1600.

10. 図の説明

図 1 Rho/Rho キナーゼの制御機構

文献 8 より改変引用。Rho は GDI と結合後、GDP 結合型として細胞質に存在している。GEF は Rho を GDP 結合型から GTP 結合型に変換し、Rho キナーゼを活性化する。GAP は Rho を GDP 結合型へと変換する。

GTPase 活性化タンパク質：GAP、グアノシン二リン酸：GDP、GDP 解離阻害因子：GDI、グアニンヌクレオチド交換因子：GEF、グアノシン三リン酸：GTP。

図 2 健常成人被験者 PMNL におけるアトルバスタチンの RhoA/Rho キナーゼ経路および Rac1 経路に対する作用

文献 9 より改変引用。平均値±標準誤差 (n=10)。国内臨床用量のアトルバスタチンは RhoA/Rho キナーゼ経路を抑制せず、Rac1 活性を抑制する。

アトルバスタチン：ATOR。

図 3 国内臨床用量スタチンにおける多面的作用と Rac1 経路の寄与

文献 9 より改変引用。国内臨床用量のスタチンは RhoA/Rho キナーゼ経路よりも Rac1 経路を強く抑制する。Rac1 経路を抑制した結果、ROS 産生を抑制し、心筋細胞肥大、中膜肥厚、血管周囲の線維化や肥大関連遺伝子発現の抑制を介して、心血管肥厚および冠動脈硬化を改善する。

PAK：p21 活性化キナーゼ、ASK1：アポトーシスシグナル調節キナーゼ、ROS：活性酸素種、ERK：細胞外シグナル調節キナーゼ

図 4 HUVEC におけるスタチンの SmgGDS 発現増加作用

文献 40 より改変引用。平均値±標準誤差 (n=3)。HUVEC にスタチンを添加し、添加から 24 時間後の HUVEC を回収し、ウエスタンブロットにより SmgGDS の発現量を解析した結果を示す。(A) アトルバスタチンは濃度依存的に SmgGDS 発現量を増加させる。(B) ピタバスタチンは濃度依存的に SmgGDS 発現量を増加させる。

アトルバスタチン：ATOR、ピタバスタチン：PITA。

図 5 マウスにおけるスタチンの SmgGDS 発現増加作用

文献 40 より改変引用。平均値±標準誤差 (n=10)。マウスに 10 mg/kg のアトルバスタチンまたは 50mg/kg のプラバスタチンを 1 日 1 回の頻度で 1 週間、経口投与した後、腹部大動脈を採取し、ウエスタンブロットにより組織抽出液中の SmgGDS 発現量を解析した結果を示す。溶媒投与群に比べスタチンを投与したマウスでは SmgGDS の発現が増加する。

アトルバスタチン：ATOR、プラバスタチン：PRA。

図 6 HUVEC におけるアトルバスタチンの Rac1 分解促進作用

文献 40 より改変引用。平均値±標準誤差 (n=3)。(A) SmgGDS siRNA またはネガティブコントロール siRNA を導入した HUVEC にアトルバスタチンを添加し、添加から 24 時間後の HUVEC を回収し、ウエスタンブロットにより Rac1 の発現量を解析した結果を示す。ネガティブコントロール siRNA を導入した HUVEC ではアトルバスタチンは Rac1 発現量を低下させるが、SmgGDS siRNA を導入した HUVEC ではアトルバスタチンによる Rac1 発現量低下作用は認められない。(B) アトルバスタチンのみを添加した HUVEC と、アトルバスタチンに加え MG-132 を添加した HUVEC の核画分中の Rac1 の発現量をウエスタンブロットにより解析した結果を示す。アトルバスタチンは核画分中の Rac1 の発現量を低下させ、MG-132 はアトルバスタチンによる Rac1 発現量低下を抑制する。

アトルバスタチン：ATOR。

図 7 HUVEC におけるピタバスタチンの Rac1 分解促進作用

文献 40 より改変引用。平均値±標準誤差 (n=3)。(A) SmgGDS siRNA またはネガティブコントロール siRNA を導入した HUVEC にピタバスタチンを添加し、添加から 24 時間後の HUVEC を回収し、ウエスタンブロットにより Rac1 の発現量を解析した結果を示す。ネガティブコントロール siRNA を導入した HUVEC ではピタバスタチンは Rac1 発現量を低下させるが、SmgGDS siRNA を導入した HUVEC ではピタバスタチンによる Rac1 発現量低下作用は認められない。(B) ピタバスタチンのみを添加した HUVEC と、ピタバスタチンに加え MG-132 を添加した HUVEC の核画分中の Rac1

の発現量をウエスタンブロットにより解析した結果を示す。ピタバスタチンは核画分中の Rac1 の発現量を低下させ、MG-132 はピタバスタチンによる Rac1 発現量低下を抑制する。

ピタバスタチン : PITA。

図 8 HUVEC におけるアトルバスタチンの ROS 産生抑制作用と SmgGDS の寄与

文献 40 より改変引用。平均値±標準誤差 (n=8)。SmgGDS siRNA またはネガティブコントロール siRNA を導入した HUVEC を用いてアトルバスタチンの ROS 産生に対する作用を解析した結果を示す。(A) ネガティブコントロール siRNA を導入した HUVEC では、AngII 添加により ROS 産生が増加し、アトルバスタチンを前処理することにより ROS 産生は抑制される。SmgGDS siRNA を導入した HUVEC では、AngII 添加により ROS 産生は増加したが、アトルバスタチン前処理による ROS 産生抑制作用は認められない。(B) A の輝度を定量化したグラフ。

アトルバスタチン : ATOR、AngII : アンギオテンシン II。

図 9 HUVEC におけるピタバスタチンの ROS 産生抑制作用と SmgGDS の寄与

文献 40 より改変引用。平均値±標準誤差 (n=8)。SmgGDS siRNA またはネガティブコントロール siRNA を導入した HUVEC を用いてピタバスタチンの ROS 産生に対する作用を解析した結果を示す。(A) ネガティブコントロール siRNA を導入した HUVEC では、AngII 添加により ROS 産生が増加し、ピタバスタチンを前処理することにより ROS 産生は抑制される。SmgGDS siRNA を導入した HUVEC では、AngII 添加により ROS 産生は増加したが、ピタバスタチン前処理による ROS 産生抑制作用は認められない。(B) A の輝度を定量化したグラフ。

ピタバスタチン : PITA、アンギオテンシン II : AngII。

図 10 マウスにおけるスタチンの冠動脈中膜肥厚および血管周囲の線維化抑制作用と SmgGDS の寄与

文献 40 より改変引用。平均値±標準誤差 (n=10)。マウスに AngII を投与することにより誘発される冠動脈中膜肥厚および血管周囲の線維化における、スタチンの保護

的な作用に対して、SmgGDS^{+/+}マウスと SmgGDS^{+/-}マウスを比較検証した結果を示す。

(A) AngII の投与により SmgGDS^{+/+}マウスおよび SmgGDS^{+/-}マウスで、溶媒投与群に比べ冠動脈中膜肥厚および血管周囲に線維化の亢進が認められる。SmgGDS^{+/+}マウスでは、スタチン投与により、冠動脈中膜肥厚および血管周囲の線維化亢進を抑制される。SmgGDS^{+/-}マウスでは、スタチン投与による冠動脈中膜肥厚および血管周囲の線維化亢進の抑制作用は認められない。(B) A の冠動脈中膜肥厚を定量化したグラフ。(C) A の血管周囲の線維化を定量化したグラフ。

アトルバスタチン：ATOR、プラバスタチン：PRA、アンギオテンシン II：AngII。

図 11 健常成人被験者を対象とした試験における試験デザイン

文献 40 より改変引用。20 名の健常成人被験者をランダムに 2 群に均等に割り付ける。1 群目に割り付けられた 10 名の被験者は国内臨床最大用量である 20 mg/day のアトルバスタチンを 1 日 1 回の頻度で 2 週間服用し、2 週間の休薬の後、20 mg/day のプラバスタチンを 1 日 1 回の頻度で 2 週間服用する。2 群目に割り付けられた 10 名の被験者は 20 mg/day のプラバスタチンを 1 日 1 回の頻度で 2 週間服用し、2 週間の休薬の後、20 mg/day のアトルバスタチンを 1 日 1 回の頻度で 2 週間服用する。

図 12 健常成人被験者におけるスタチンの SmgGDS 発現増加作用

文献 40 より改変引用。平均値±標準偏差 (n=20)。スタチンの服用前後の末梢血 PMNL を採取し、ウエスタンブロットにより SmgGDS 発現量を解析した結果を示す。いずれのスタチンも SmgGDS の発現を増加させる。
アトルバスタチン：ATOR、プラバスタチン：PRA。

図 13 健常成人被験者におけるスタチンの SmgGDS 発現増加作用と酸化ストレス指標との相関関係

文献 40 より改変引用。スタチンによる SmgGDS 発現増加と LDL コレステロール変化または MDA-LDL コレステロール減少との相関関係を解析した結果を示す。(A, B) SmgGDS 発現増加と LDL コレステロール変化との間には相関関係は認められない。(C, D) SmgGDS 発現増加と MDA-LDL コレステロール減少との間に相関関係が認め

られる。

アトルバスタチン：ATOR、プラバスタチン：PRA、MDA：マロンジアルデヒド修飾。

図 14 HUVEC におけるスタチンの SmgGDS 発現増加作用に対するメバロン酸経路の関係

文献 40 より改変引用。平均値±標準誤差 (n=3)。メバロン酸とアトルバスタチンまたはピタバスタチンを同時に HUVEC に添加し、添加から 24 時間後の HUVEC を回収し、ウエスタンブロットにより SmgGDS の発現量を解析した結果を示す。(A) メバロン酸はアトルバスタチンまたはピタバスタチンによる SmgGDS 増加作用を抑制しない。また、FPP または GGPP もメバロン酸と同様にアトルバスタチンまたはピタバスタチンを同時に HUVEC に添加し、添加から 24 時間後の細胞を回収し、ウエスタンブロットにより SmgGDS の発現量を解析した結果を示す。(B) FPP および GGPP はアトルバスタチンまたはピタバスタチンによる SmgGDS 増加作用を抑制しない。アトルバスタチン：ATOR、ピタバスタチン：PITA、FPP：ファルネシルピロリン酸、GGPP：ゲラニルゲラニルピロリン酸。

図 15 HUVEC における GSK3β siRNA の SmgGDS 発現に対する作用

文献 35 より改変引用。平均値±標準誤差 (n=3)。GSK3β siRNA またはネガティブコントロール siRNA を導入した HUVEC を回収し、ウエスタンブロットにより SmgGDS の発現量を解析した結果を示す。ネガティブコントロール siRNA を導入した HUVEC に比べ SmgGDS siRNA を導入した HUVEC では SmgGDS 発現量増加は認められない。

グリコーゲン合成酵素キナーゼ 3β：GSK3β。

図 16 HUVEC におけるスタチンの Akt リン酸化亢進作用

文献 35 より改変引用。平均値±標準誤差 (n=3)。HUVEC にアトルバスタチンを添加し、経時的にリン酸化 Akt 発現量を解析した結果を示す。アトルバスタチンを添加していない細胞のリン酸化 Akt の発現量を 1 とした場合、10 μmol/L のアトルバスタチンを添加した細胞のリン酸化 Akt の発現量は、それぞれ 5 分で約 1.6 倍、10 分で約

1.9 倍、15 分で約 2.3 倍、30 分で約 0.9 倍であった。アトルバスタチンの添加から 15 分後をピークとして経時的に Akt のリン酸化を亢進した。

アトルバスタチン：ATOR。

図 17 HUVEC におけるスタチンの Akt1 を介した SmgGDS 発現増加作用

文献 35 より改変引用。平均値±標準誤差 (n=3)。Akt1、Akt2、Akt3 またはネガティブコントロール siRNA を導入した HUVEC を用いて、アトルバスタチンの SmgGDS 発現量に対する作用を解析した結果を示す。(A) Akt1 siRNA を導入した HUVEC では、アトルバスタチンによる SmgGDS 発現増加作用が消失する。(B, C) Akt2 または Akt3 siRNA を導入した HUVEC では、アトルバスタチンによる SmgGDS 発現増加作用が認められる。

アトルバスタチン：ATOR。

図 18 HUVEC におけるスタチンの β 1 インテグリンを介した SmgGDS 発現増加作用

文献 35 より改変引用。平均値±標準誤差 (n=3)。 β 1 インテグリン siRNA を導入した HUVEC を用いて、アトルバスタチンの SmgGDS 発現量に対する作用を解析した結果を示す。(A) β 1 インテグリン siRNA を導入した HUVEC では、アトルバスタチンによる SmgGDS 発現増加作用が消失する。(B) 2 型 VEGF 受容体 siRNA を導入した HUVEC では、アトルバスタチンによる SmgGDS 発現増加作用が認められる。

アトルバスタチン：ATOR、血管内皮成長因子：VEGF。

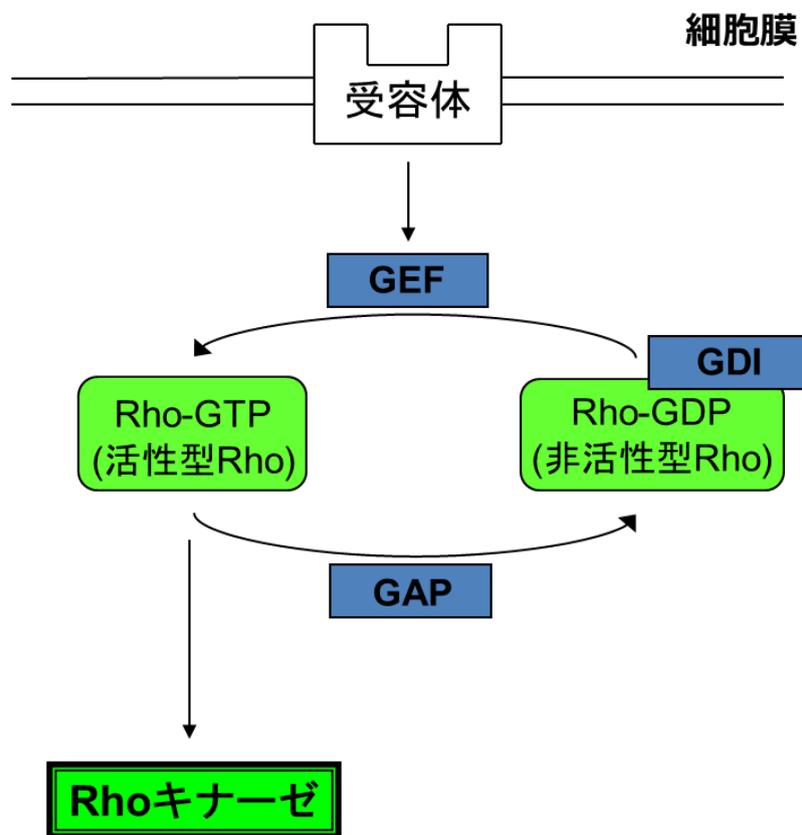
図 19 本研究のまとめ

文献 35 および 40 より改変引用。(左) 国内臨床用量スタチンは β 1 インテグリンに作用して Akt1 のリン酸化を亢進する。リン酸化された Akt1 は SmgGDS の転写後の安定化に寄与し、その結果、SmgGDS の発現量を増加させる。発現量が増加した SmgGDS は細胞質において Rac1 と結合し、Rac1 を選択的に核内へ移行させる。核内に移行した Rac1 はプロテアソームによる分解を受け、ROS 産生を抑制することで心血管系に対して保護的な作用を発揮し、スタチンの多面的作用を発現する。(右) 高用量のスタチンは、これまでに報告されているとおりメバロン酸経路を介して

RhoA/Rho キナーゼ経路を抑制する。

ファルネシルピロリン酸 : FPP、ゲラニルゲラニルピロリン酸 : GGPP、3-ヒドロキシ
3-メチルグルタルル-CoA : HMG-CoA、活性酸素種 : ROS、血管内皮成長因子 : VEGF。

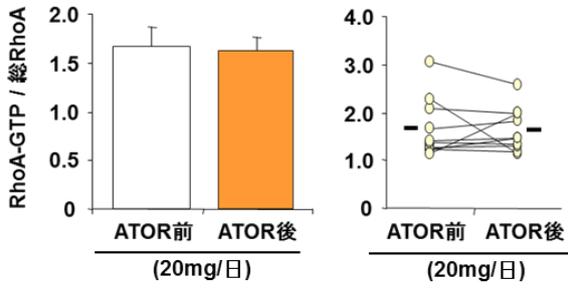
図1



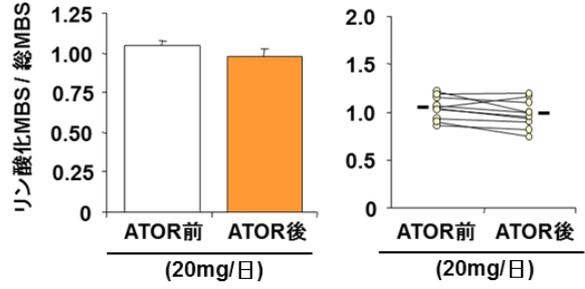
文献8より改変引用

図2

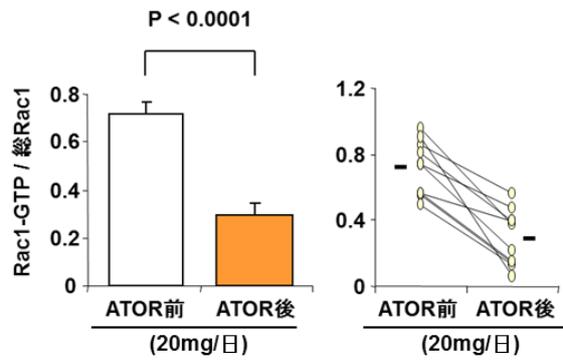
A. GTP結合型RhoA



B. リン酸化 MBS

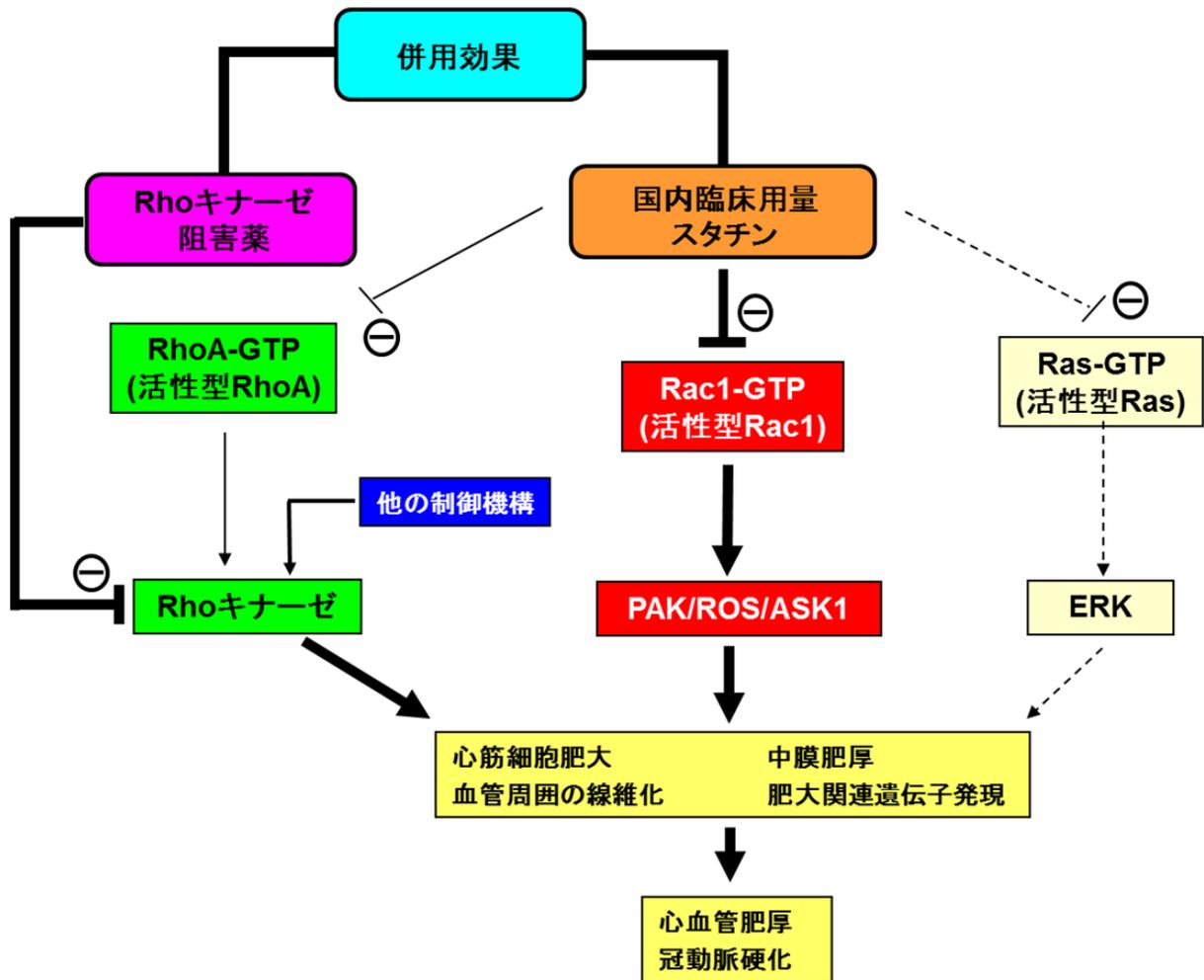


C. GTP結合型Rac1



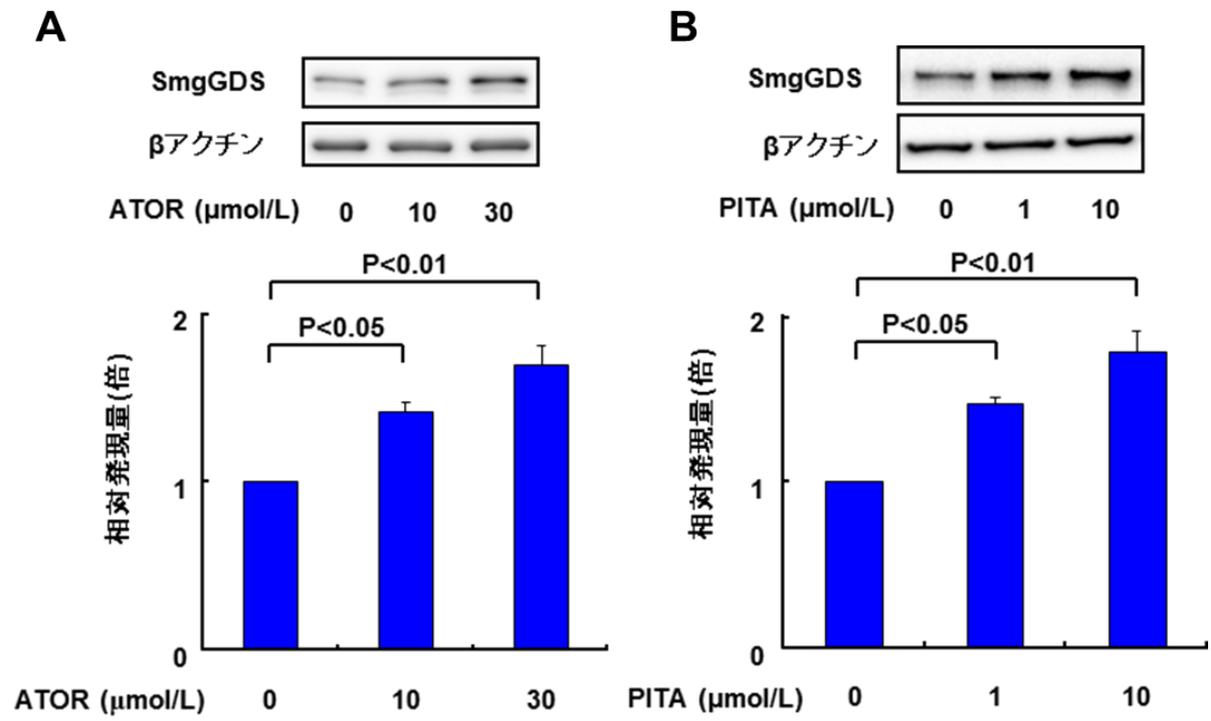
文献9より改変引用

図3



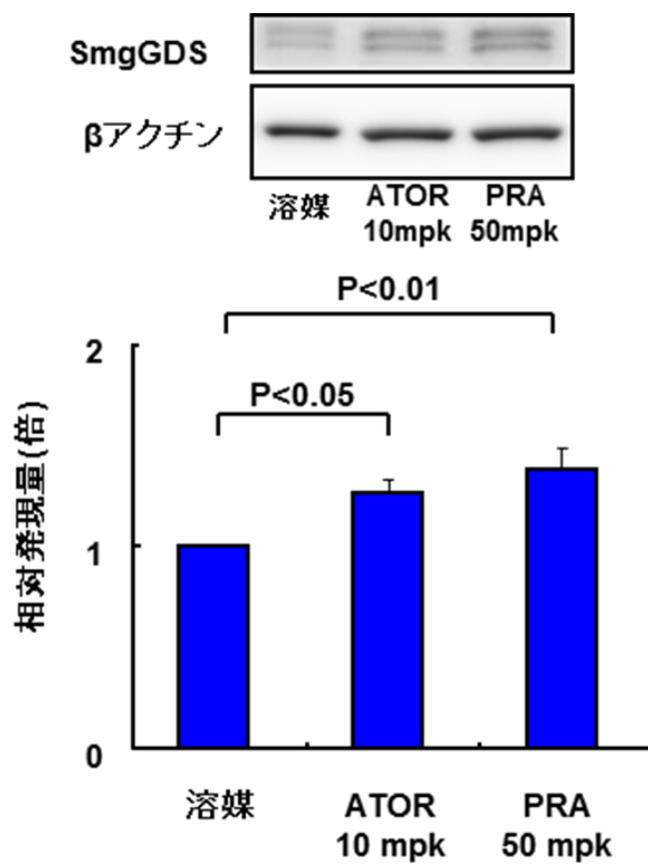
文献9より改変引用

図4



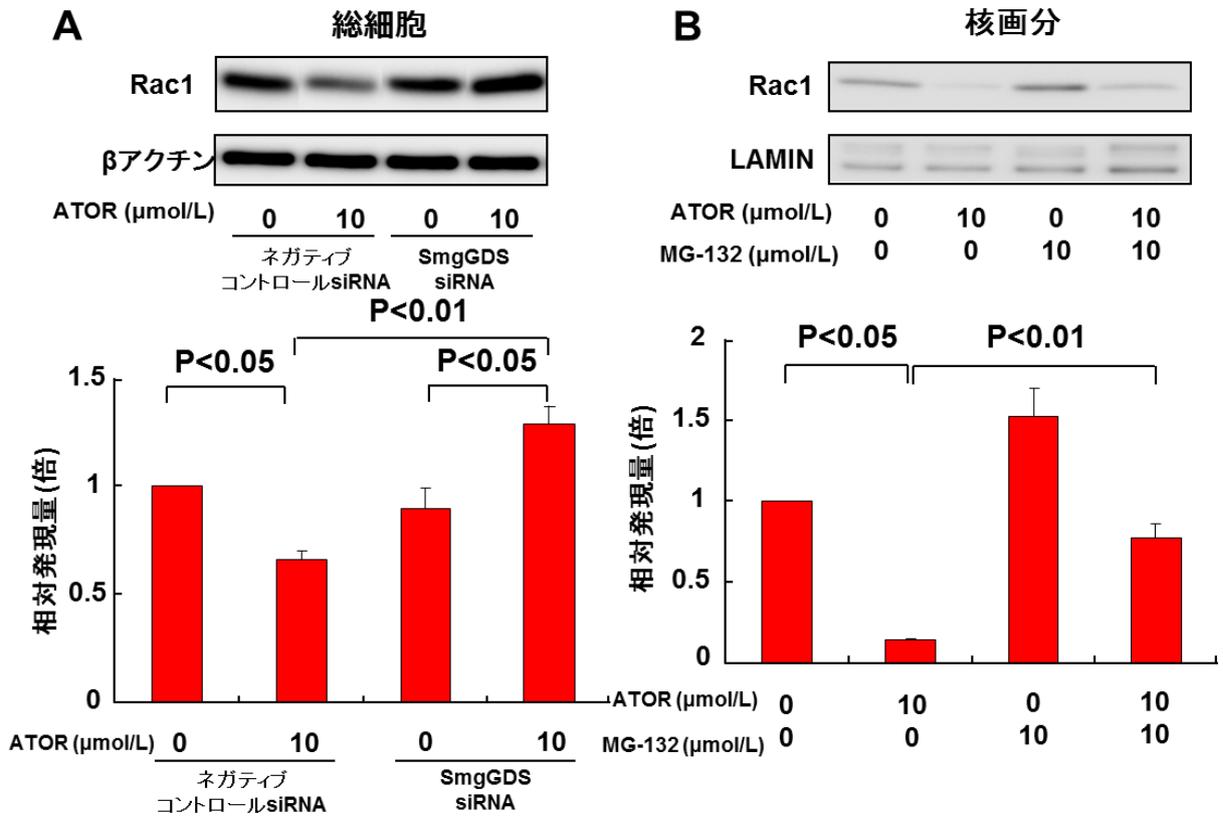
文献40より改変引用

図5



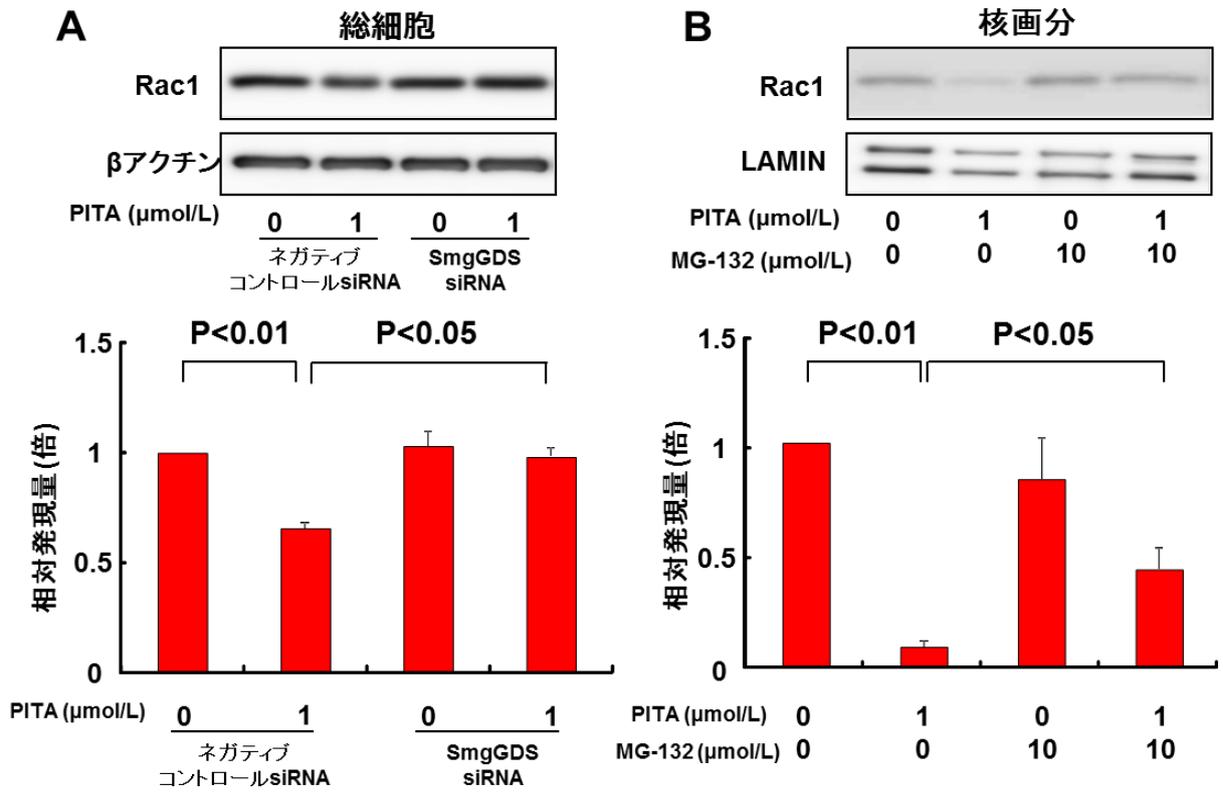
文献40より改変引用

図6



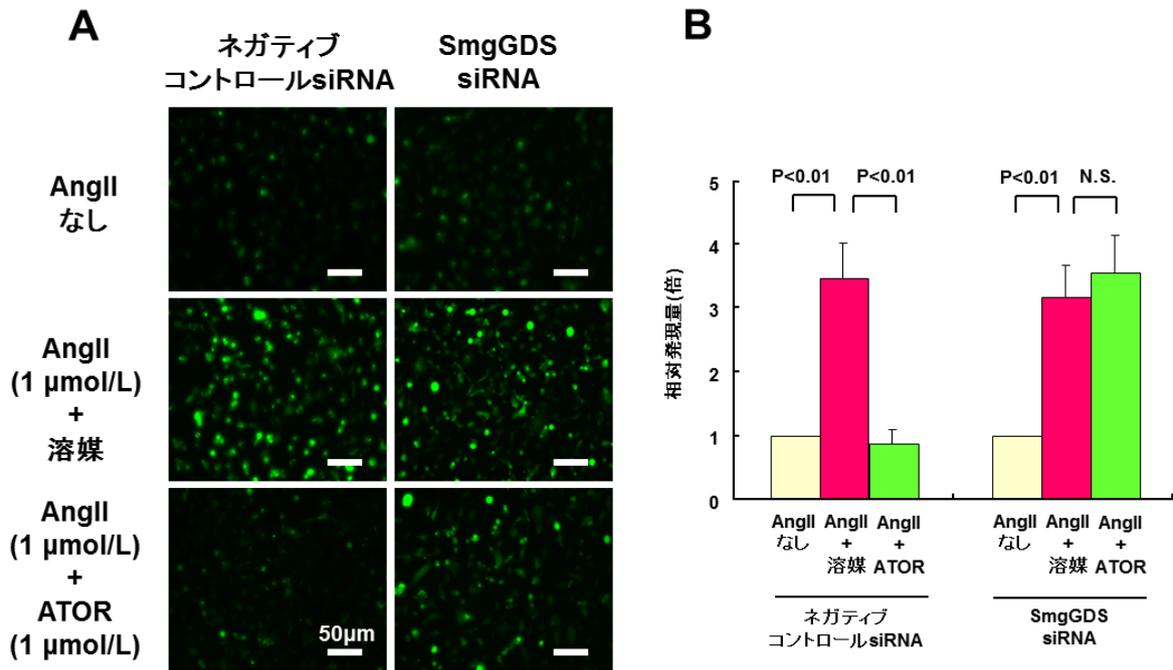
文献40より改変引用

図7



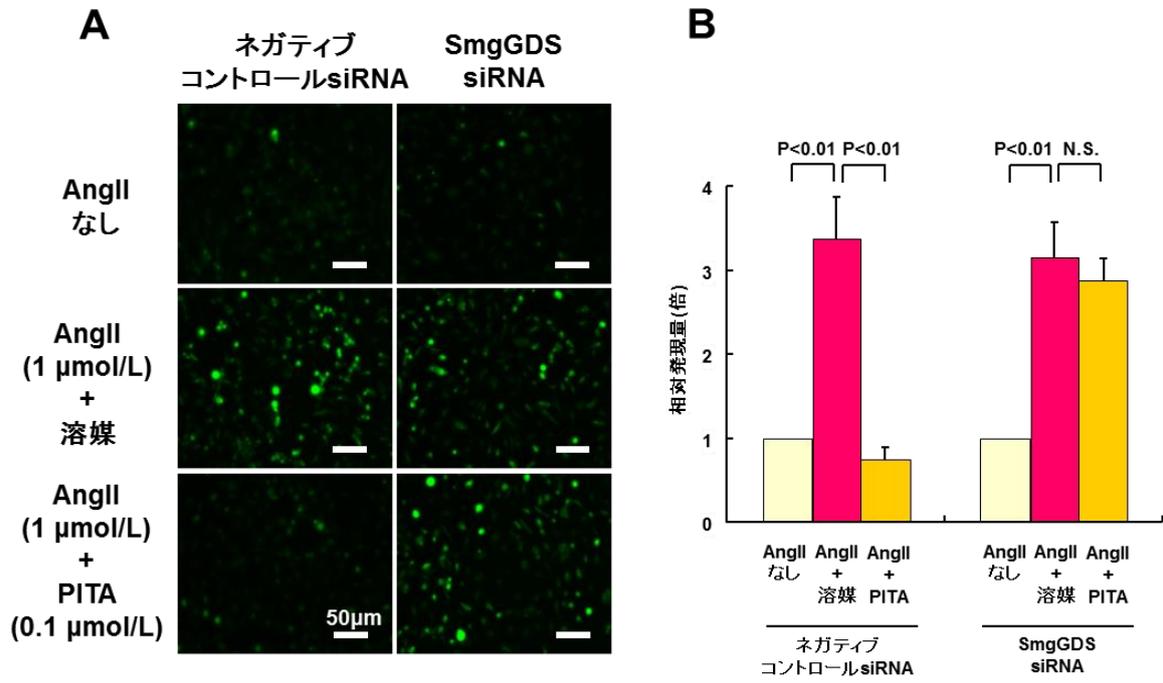
文献40より改変引用

図8



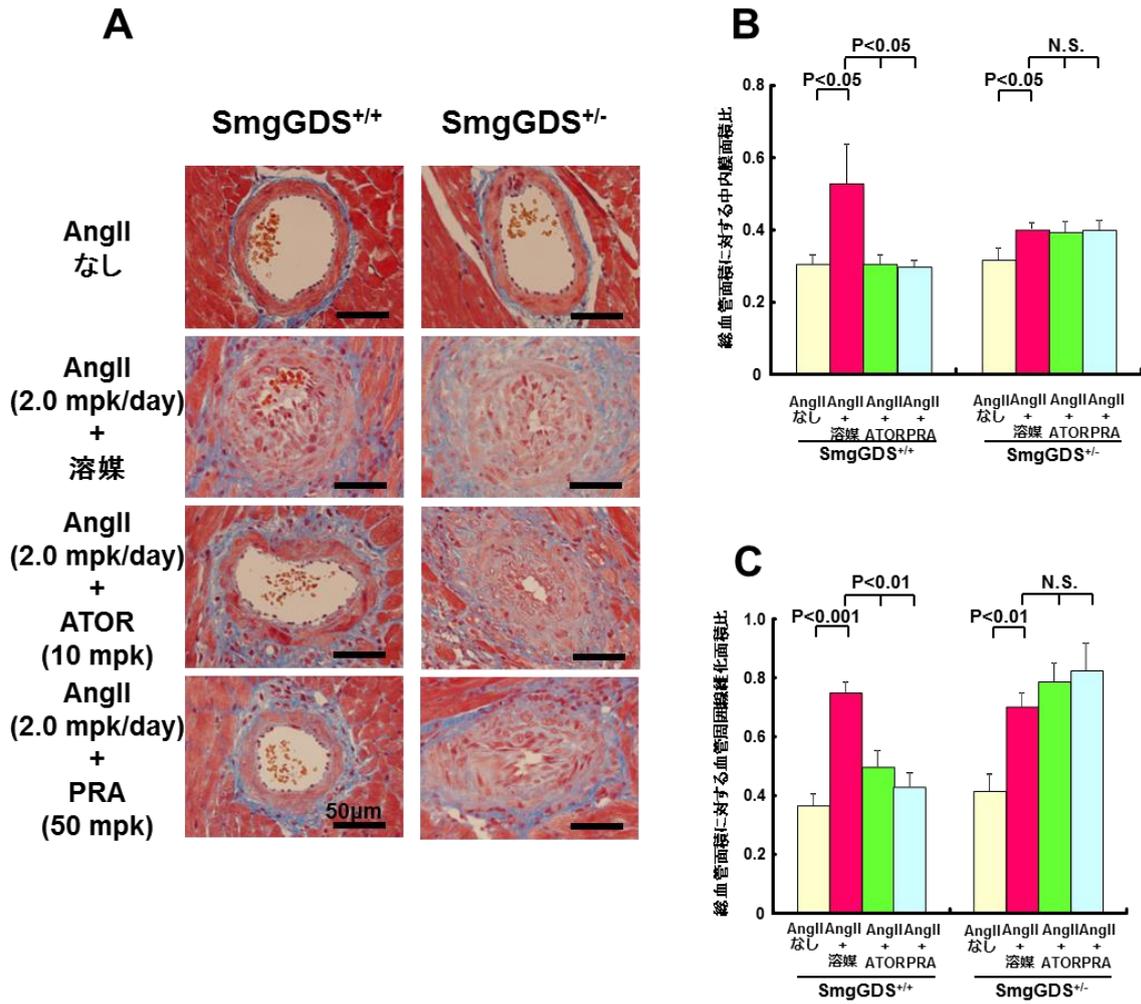
文献40より改変引用

図9



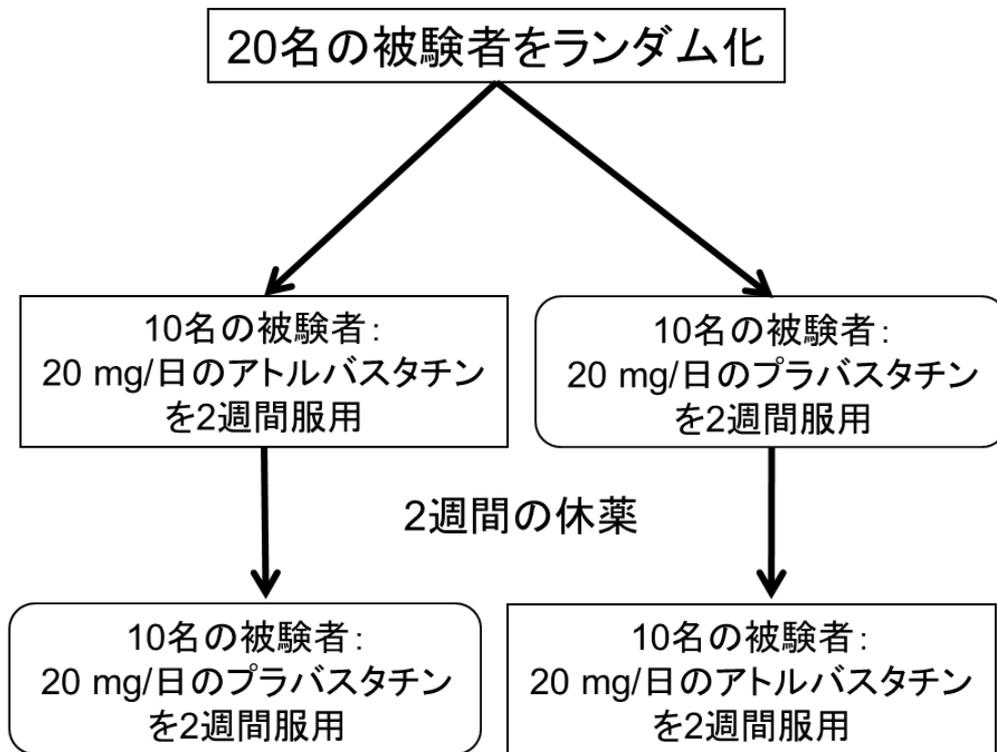
文献40より改変引用

図10



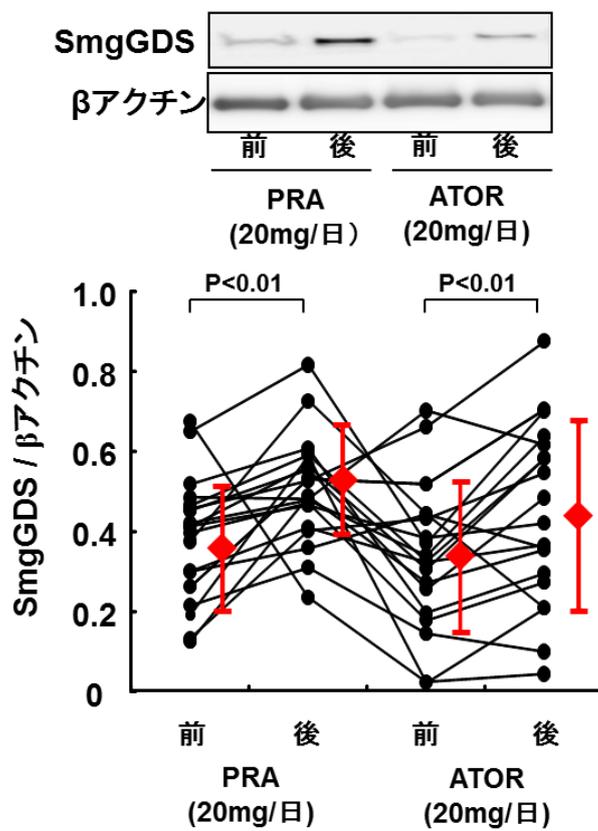
文献40より改変引用

図11



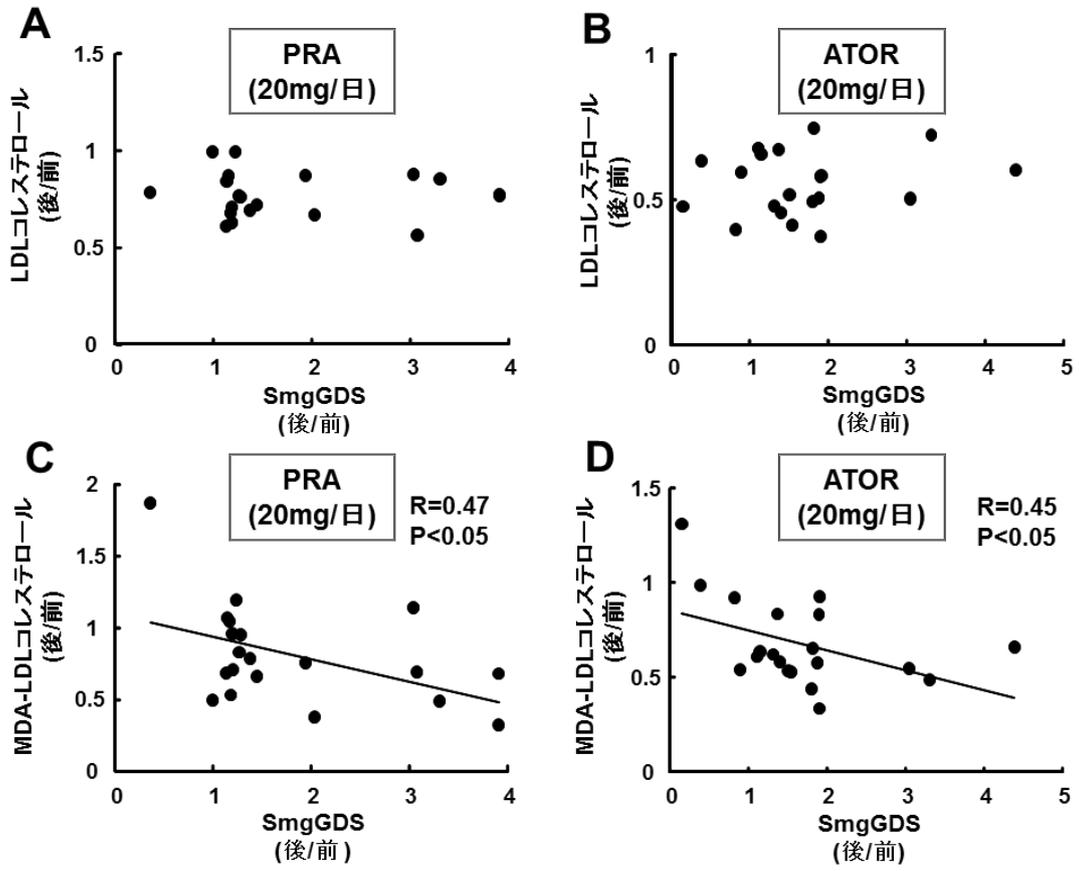
文献40より改変引用

図12



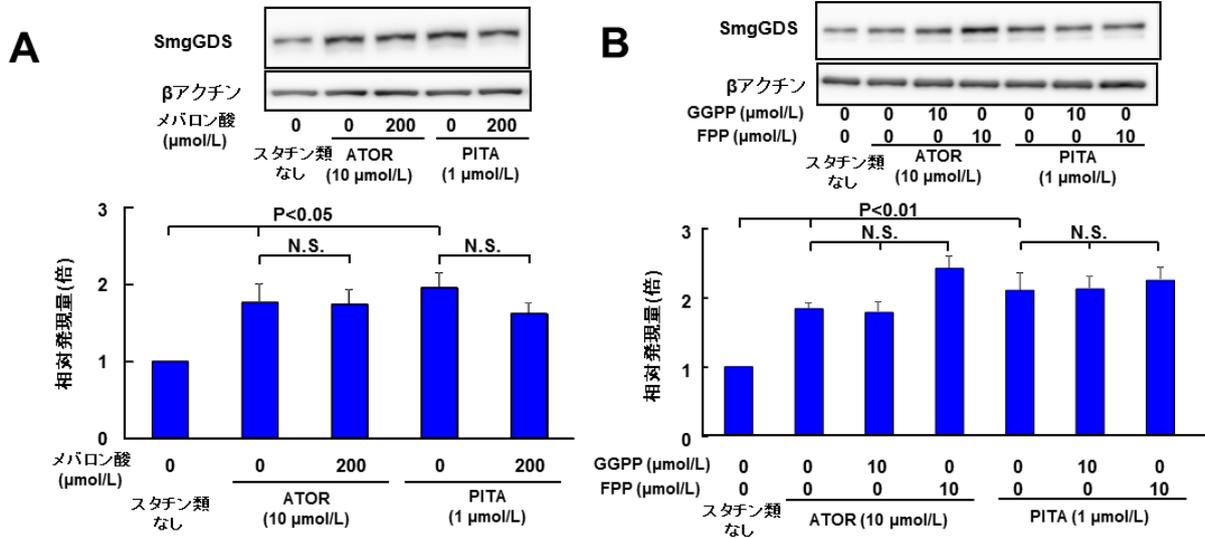
文献40より改変引用

図13



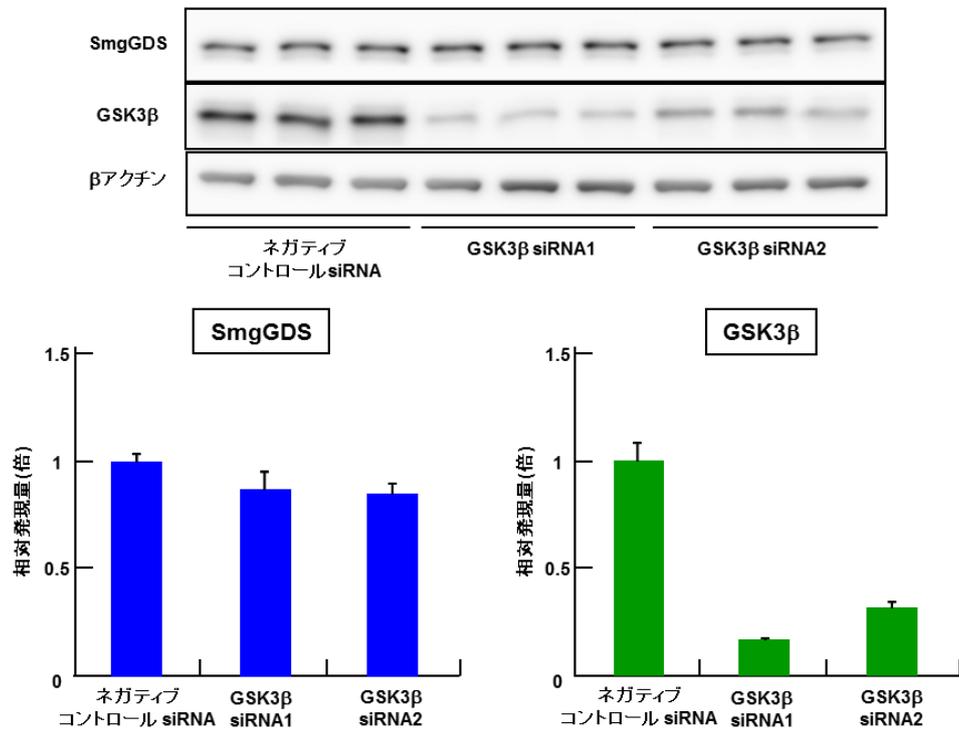
文献40より改変引用

図14



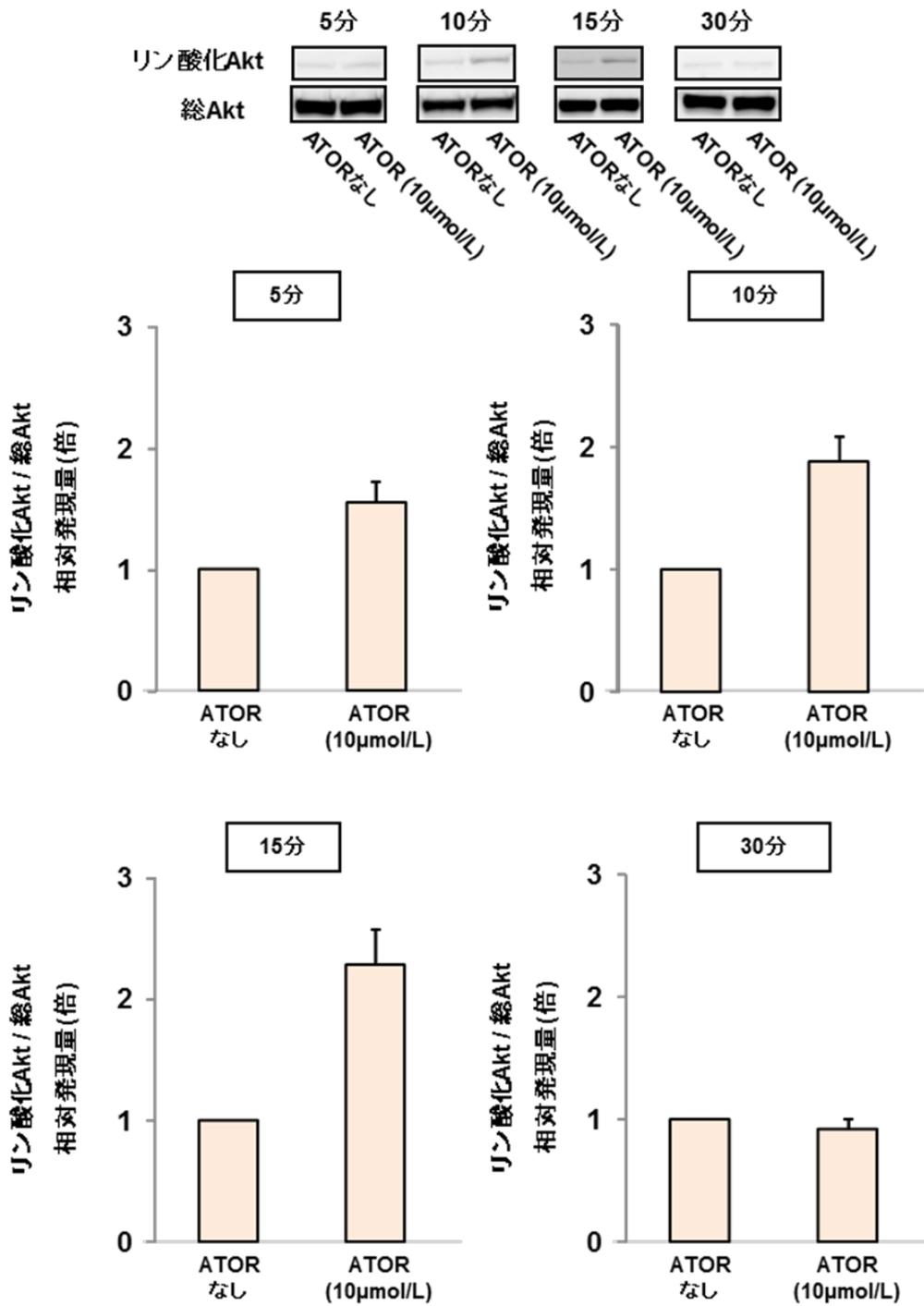
文献40より改変引用

図15



文献35より改変引用

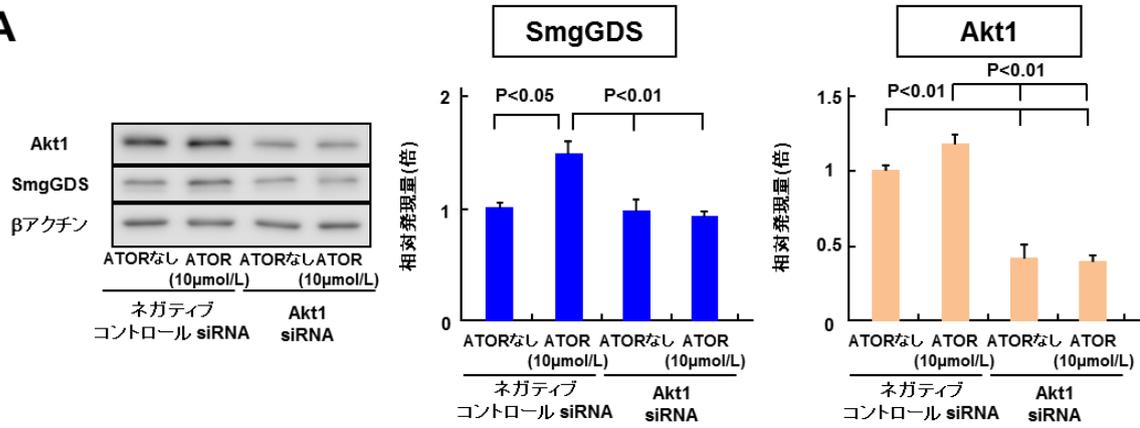
図16



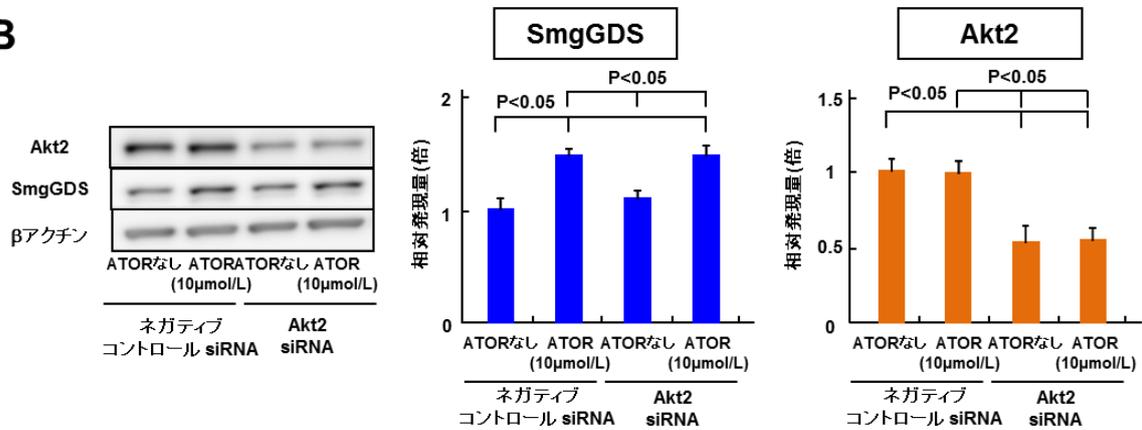
文献35より改変引用

図17

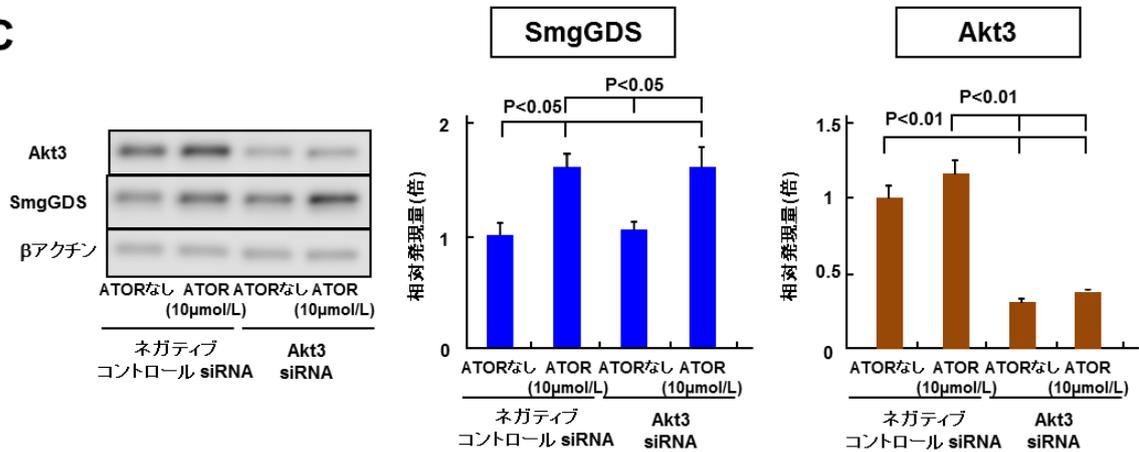
A



B



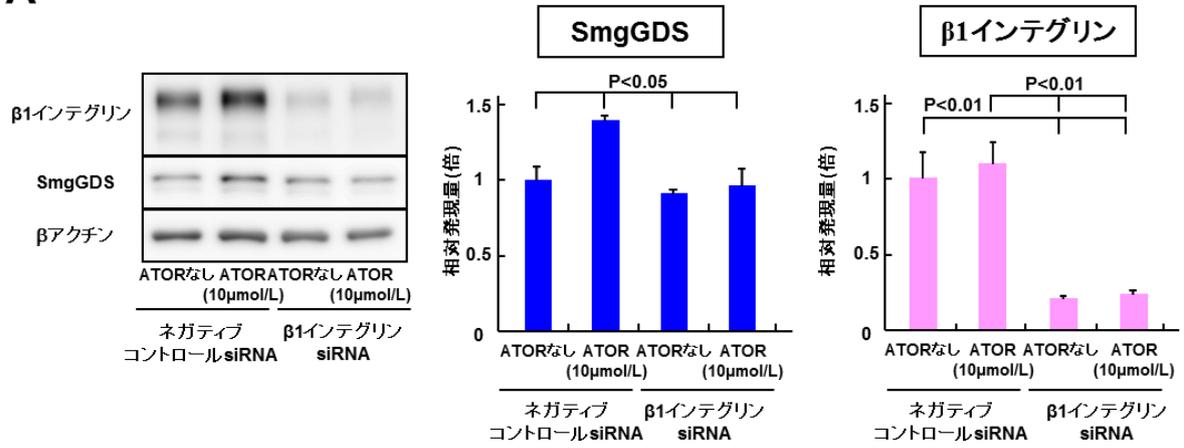
C



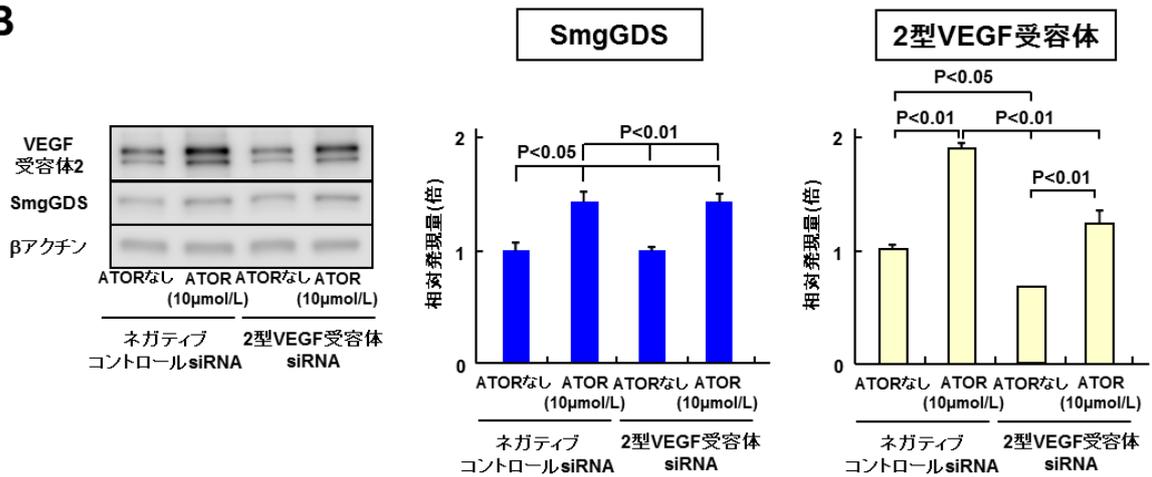
文献35より改変引用

図18

A

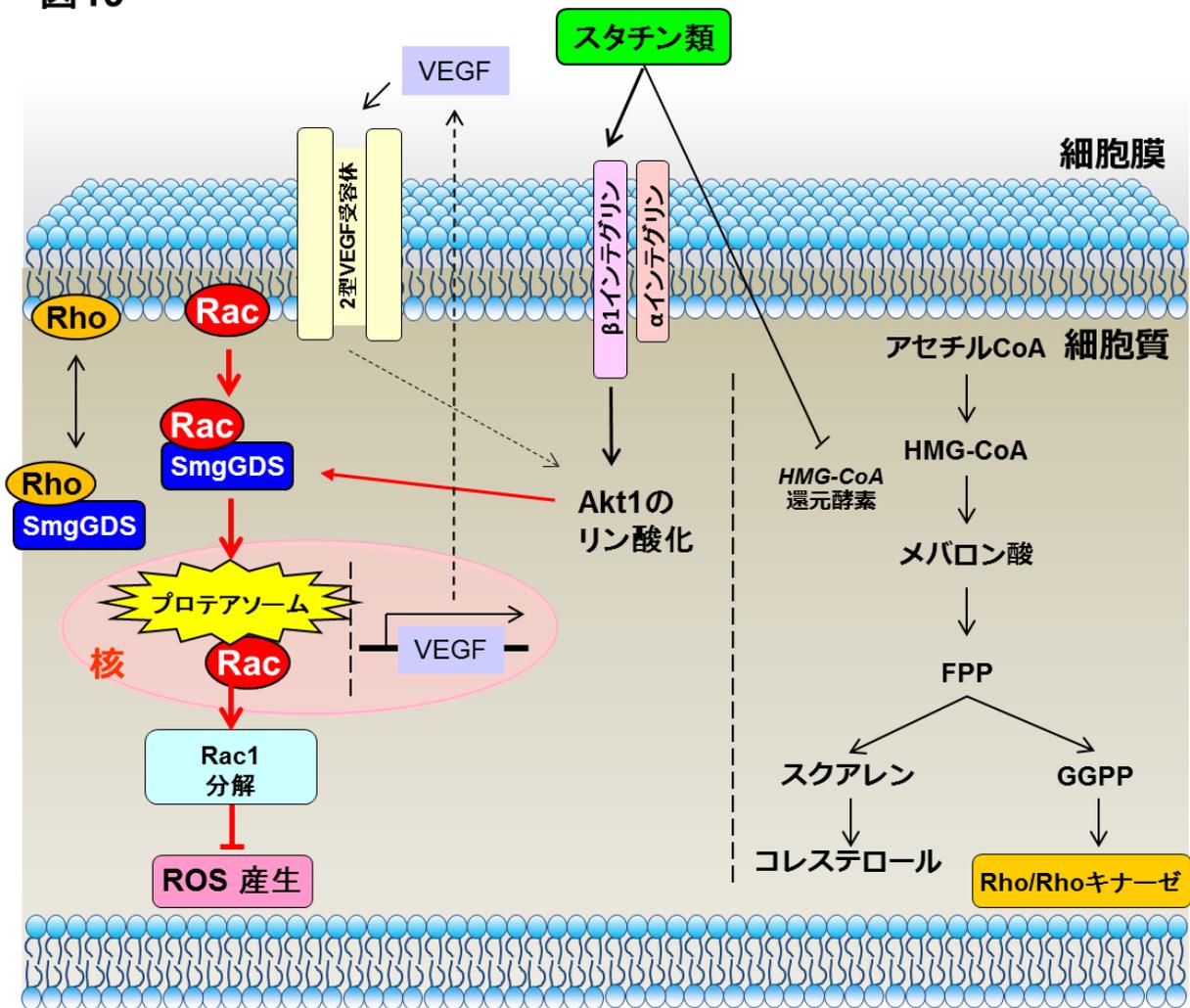


B



文献35より改変引用

図19



文献35、40より改変引用

表1. 被験者背景 (ベースライン特性)

	総例数 (n=20)
年齢 (歳)	30.9 ± 0.7
性別	
男性, n (%)	16 (80%)
女性, n (%)	4 (20%)
体重 (kg)	68.2 ± 2.4
血圧	
収縮期 (mmHg)	124.6 ± 2.2
拡張期 (mmHg)	77.5 ± 1.5
心拍数 (拍/分)	72.2 ± 2.3

平均値 ± 標準誤差。

文献40より改変引用

表2. *in vivo*試験におけるスタチン類の血圧および血漿脂質プロファイルに対する効果

	SmgGDS ^{+/+}				SmgGDS ^{+/-}			
	AngII なし	AngII (2.0mpk/day) + 溶媒	AngII (2.0mpk/day) + ATOR (10 mpk)	AngII (2.0mpk/day) + PRA (50 mpk)	AngII なし	AngII (2.0mpk/day) + 溶媒	AngII (2.0mpk/day) + ATOR (10 mpk)	AngII (2.0mpk/day) + PRA (50 mpk)
体重 (g)	28.2±1.0	28.2±1.0	27.5±1.1	28.2±0.7	29.4±0.6	27.8±0.8	26.9±0.5	27.1±1.0
収縮期血圧 (mmHg)	119.5±3.6	154.5±7.3*	146.7±7.6	141.0±7.3	112.5±4.3	137.8±9.0*	140.4±4.4	146.7±6.6
総コレステロール (mg/dL)	91.2±2.7	113.8±21.5	98.3±7.7	111.2±6.8	84.0±5.8	109.6±5.7	102.3±6.9	116.7±5.7
LDLコレステロール (mg/dL)	10.7±0.9	16.2±4.4	13.7±1.6	16.1±2.3	10.4±1.4	12.4±1.1*	13.6±1.8	16.1±1.6
HDLコレステロール (mg/dL)	74.2±3.4	88.3±14.3	76.3±6.8	88.0±4.5	67.1±4.8	89.9±4.8	81.9±4.8	94.0±4.1
トリグリセリド (mg/dL)	52.5±8.3	54.2±17.9	67.0±11.0	47.3±10.9	52.0±6.2	78.8±13.6*	81.4±20.1	56.6±7.3

平均値±標準誤差 (n=10)。AngII: アンジオテンシンII, ATOR: アトルバスタチン,
PRA: プラバスタチン, LDL: 低比重リポタンパク質 (low-density lipoprotein),
HDL: 高比重リポタンパク質 (high-density lipoprotein)。*: P値 < 0.05。

文献40より改変引用

表3. スタチン類の血漿脂質プロファイル、血糖値、インスリンおよびインスリン抵抗指数に対する効果

	プラバスタチン (20 mg/日)				アトルバスタチン (20 mg/日)			
	基準値	2週間後	変化率 (%)	P value	基準値	2週間後	変化率 (%)	P value
空腹時脂質 (mg/dL)								
総コレステロール	192 ± 4.5	165 ± 4.5	-14	<0.001	197 ± 5.0	138 ± 3.8	-30	<0.001
LDLコレステロール	116 ± 4.5	88 ± 4.0	-24	<0.001	118 ± 4.3	64 ± 3.4	-46	<0.001
HDLコレステロール	58 ± 2.7	61 ± 2.8	5	<0.05	60 ± 2.9	60 ± 2.7	0	N.S.
トリグリセリド	103 ± 12.9	87 ± 9.1	-16	N.S.	109 ± 9.9	73 ± 6.5	-33	<0.001
レムナントコレステロール	4.1 ± 0.5	3.2 ± 0.3	-22	<0.05	4.0 ± 0.3	2.6 ± 0.1	-35	<0.001

MDA-LDLコレステロール (U/L)	113 ± 9.6	85 ± 6.7	-25	<0.01	118 ± 10.6	73 ± 4.5	-38	<0.001

糖 (mg/dL)	96 ± 1.4	99 ± 1.3	3	N.S.	97 ± 1.3	98 ± 1.5	1	N.S.
インスリン (μIU/mL)	9.4 ± 1.1	8.4 ± 0.9	-11	N.S.	8.8 ± 0.8	8.3 ± 0.5	-6	N.S.
HOMA-IR	2.2 ± 0.3	2.1 ± 0.2	5	N.S.	2.1 ± 0.2	2.0 ± 0.1	-5	N.S.

平均値 ± 標準誤差 (n=20)。

LDL: 低比重リポタンパク質 (low-density lipoprotein),

HDL: 高比重リポタンパク質 (high-density lipoprotein),

MDA: マロンジアルデヒド修飾 (malondialdehyde-modified)

HOMA-IR: インスリン抵抗性指数 (homeostasis model assessment-insulin resistance)。

文献40より改変引用