

スタチンの pleiotropic effects と その分子機序

塩田 正之, 泉 康雄, 中尾 隆文, 岩尾 洋

要約: スタチン (HMG-CoA 還元酵素阻害薬) はコレステロール合成経路の律速段階である HMG-CoA 還元酵素を阻害することにより血清コレステロールを低下させる作用を有する。スタチンの冠動脈イベントの発症や進行の抑制は大規模臨床試験によっても証明されているが、コレステロールの低下作用だけでは説明のつかない他の作用機序によって動脈硬化性疾患の発症進展を抑制していることを示す報告が相次いでいる。血管弛緩を誘導する遺伝子の誘導, 血管収縮遺伝子の抑制に加えて, 抗凝固活性を有する遺伝子の誘導, 炎症性因子, 血栓形成促進遺伝子の発現抑制を誘導する。このようにスタチンは, 同時に多くの遺伝子発現に対して正と負の両面から制御をかけることで血行動態の改善方向に機能している。一方で eNOS を活性化することで血管新生を誘発し, 血管の恒常性維持に積極的に関わることが示されている。それらスタチンの pleiotropic effects の分子機序に対する研究が盛んに行われており, 注目すべきものとして PI3K/Akt 経路の活性化とイソプレノイド産生低下による低分子量 GTP 結合タンパク質の活性抑制が挙げられる。近年, スタチンが *in vitro*, *in vivo* の血管新生において用量依存的に, 二相性の効果をもつことが報告された。低用量のスタチンは血管新生を促進し, 高用量のスタチンは逆にこれを阻害する。以上よりスタチンは当初の予想以上のポテンシャルを有しており, 今後, 各臓器での作用を系統的に解明し, 至適投与量を検討することが重要となってくると考えられる。

1. はじめに

病気の大半は複合的な要因から構成される多因子疾患であり, 循環器疾患や, 生活習慣病だけでなくガン

に至るまで, 多数の遺伝子と多数の制御因子がその発症進展に寄与していることが明らかとなってきた。この観点から DNA, RNA, タンパク質の包括的な解析, 理解なくしては生命システム, その破綻の結果生じる疾患を理解するのは不可能といえる。

薬理ゲノミクス (pharmacogenomics) はヒトゲノムプロジェクトの進展を背景として, ポストゲノムの遺伝子多型 (ゲノム), 遺伝子発現プロファイル (トランスクリプトーム), プロテオーム解析という包括的解析を主軸として進展してきた。いまや薬理ゲノミクスの手段は創薬やテーラーメイド医療だけに留まらず, 生命システム自体を理解する上で不可欠となってきた。

2. 血管内皮におけるスタチンの多様な効果

血管はひとつのシステム (制御系) であり, 血管壁構成細胞群 (内皮, 平滑筋, 線維芽細胞) が相互に機能しあって, 循環, 細胞の遊走, 凝固, 線溶などを制御することで恒常性を維持している。ACE 阻害薬, アンジオテンシン II 受容体拮抗薬 (ARB), カルシウム拮抗薬, スタチンなどの循環器疾患に対する薬剤の心血管保護作用は, 裏を返せば個々の薬剤が標的とする分子がシステムとして複雑に制御しあっているということに他ならない。

なかでも血管内皮細胞は物理的刺激や代謝上の変化を素早く感知し, 環境変化に適応べくシグナル伝達経路を活性化することで生体の恒常性を維持している。NO を産生し, 血管トーンスの調節および血管壁への血小板凝集や血栓形成を抑制することなどで血流を維持する。高脂血症や高血圧, 糖尿病によって血管内皮に障害が生じると, 内皮機能が低下し NO の産生障害

が生じる。さらに血管収縮, 血管壁への血小板凝集ならびに血栓形成, 炎症が引き起こされ, その結果, 動脈硬化が生じ, 虚血性心疾患や脳卒中に至ると考えられる。

スタチン (HMG-CoA 還元酵素阻害薬) はコレステロール合成経路の律速段階である HMG-CoA 還元酵素を阻害することにより血清コレステロールを低下させる作用を有する。スタチンの冠動脈イベントの発症や進行の抑制は大規模臨床試験によっても証明されているが, コレステロールの低下作用だけでは説明のつかない他の作用機序によって動脈硬化性疾患の発症進展を抑制していることを示す報告が相次いでいる (1-3)。プラークサイズの縮小以外に血管内皮細胞やマクロファージに対する直接作用を持つことが示唆されており, スタチンが高コレステロール血症のない症例においても有意に冠動脈イベントの発症を抑制すること, 血清コレステロールが正常な動物モデルにおいても心血管保護作用を示すことが報告されている。このスタチンのコレステロール低下作用に依存しない作用は, 多面的な作用 (pleiotropic effects) として内皮機能改善という点で注目されており, その機序が検討されてきた。近年の研究で, スタチンの pleiotropic effects には内皮機能改善作用の他に炎症反応の抑制, プラークの安定化, 血栓形成の抑制, 抗酸化, および増殖抑制作用などがあることも明らかになってきた (4-7)。本稿では特に内皮に焦点をあて, スタチンの pleiotropic effects とそのメカニズムに関して概説する。

1) スタチンと遺伝子発現

薬剤の作用は長期にわたり, 結局のところ遺伝子の発現誘導や抑制を伴う。スタチンの血管内皮に対する作用として, NO 合成酵素 (eNOS) の mRNA の安定化に寄与することで発現量を上昇させることが多くの結果から明らかにされている (8)。また, endothelin-1 (ET-1) の産生を抑制する一方で, 血管を拡張させる方向に働くプロスタサイクリン産生を高める (9)。この ET-1 への作用はコレステロールや酸化 LDL の添加では抑制されないが, メバロン酸の添加で抑制される (10)。このように血管拡張因子の発現を亢進させ, 同時に血管収縮因子の発現を抑制させることで血行動態を改善する方向に向かわせていると考えられる。

さらにスタチンは血管内皮細胞において炎症反応のトリガーとなる遺伝子発現を制御しうることも明らかになってきた。炎症促進に働く PAI-I の発現, 炎症性サイトカインの産生を抑制し, 炎症抑制的にはたらくトロンボモジュリンの発現を転写後のレベルで増加させる。ピタバスタチンの内皮細胞に対する影響をトラ

ンスクリプトーム解析した結果からも, eNOS などの血管弛緩を誘導する遺伝子の誘導, ET-1 などの血管収縮遺伝子の抑制に加えて, トロンボモジュリンなど抗凝固活性を有する遺伝子の誘導, IL-8, MCP-1 などの炎症性因子, PAI-1 などの血栓形成促進遺伝子の発現抑制が認められた (11, 12)。このようにスタチンは, 同時に多くの遺伝子発現に対して正と負の両面から制御をかけることで血行動態の改善方向に機能している。(図 1)

2) スタチンによる NO 産生と血管新生

動脈硬化症において血管内皮細胞の機能低下は eNOS の活性低下によると説明されている。この eNOS の活性低下に対するスタチンの影響が検討された結果, スタチンの持つ種々の血管保護作用の一部は NO を介することが明らかとなった。この機序としてスタチンは eNOS mRNA の半減期を上昇させることが報告されている (8, 3, 14)。スタチンにより産生亢進した NO は直接 ROS と反応することで, チオレドキシンのような ROS スカベンジャーを亢進させる (15)。さらにスタチンはオキシダントの形成を減らすことや, NAD (P) H オキシダーゼ由来の ROS 産生を抑制することで ROS 産生を低下させる (16, 17)。またいくつかの培養細胞の系でスタチンは eNOS の発現量の他に, リン酸化を上昇させることで NO の産生量を亢進させることも示されている。活性化した eNOS は, 多くの動物モデルで血管新生を促進すると同時に, 産生された NO は粥状硬化巣の安定化に寄与するとされている (13, 18, 19)。これはメバロン酸の添加によって相殺されることからスタチンの直接作用と考えられる。実際, ウサギの下肢動脈結紮実験においては, スタチン投与群での側副血行路の発達を示された (18)。また最近ではスタチンが低酸素誘導性の肺高血圧症を eNOS 活性を介して保護するという報告もある (20)。このように NO は内皮弛緩作用を持つだけでなくスーパーオキシドに拮抗する数少ない生体分子であり, その活性化は多くの positive effects をもたらしていると考えられる。

3. Pleiotropic effects の分子機序

近年, スタチンの pleiotropic effects の分子機序に対する研究が盛んに行われており, 注目すべきものとして PI3K/Akt 経路の活性化とイソプレノイド産生低下による低分子量 GTP 結合タンパク質の活性抑制が挙げられる (14, 21)。(図 2)

1) PI3K-Akt 経路

PI3K-Akt 経路は血管内皮細胞において様々な刺激

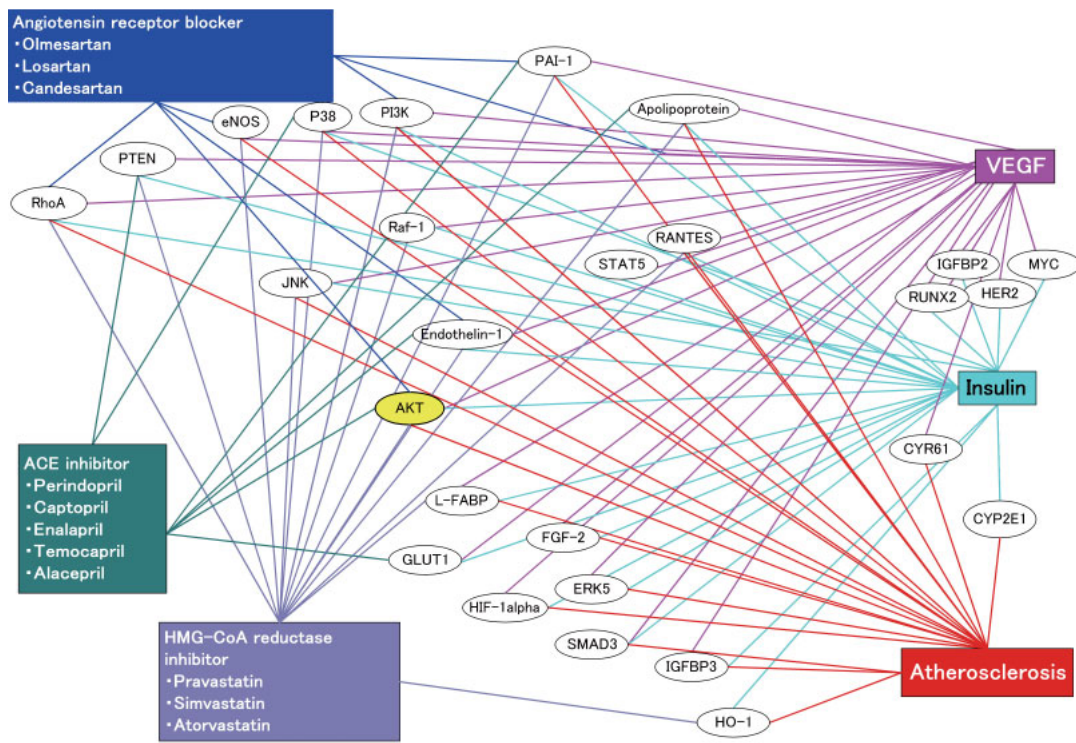


図1 血管内皮細胞において Akt に相互作用する分子
Akt はスタチンにより活性化され、多くの分子へ関与することで内皮機能を維持する。

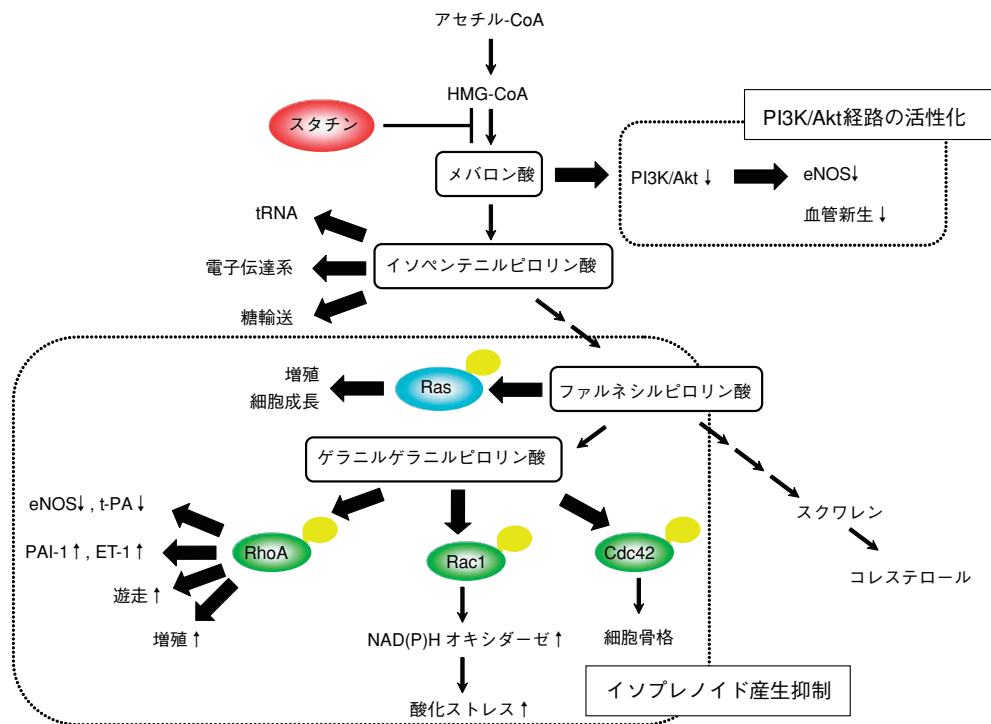


図2 スタチンのコレステロール合成経路への関与
スタチンは HMG-CoA 還元酵素を阻害することでコレステロール合成経路を阻害する。その結果、PI3K/Akt 経路を活性化させ、同時にインプレノイド産生を抑制することで低分子量 G タンパク質の機能低下を誘導することで内皮機能改善する。これらの血清中コレステロール低下作用によらない機能は pleiotropic effects として注目されている。

によって活性化され, 生存, 遊走, NO 産生などの細胞機能促進を介して *in vitro* および *in vivo* の血管新生に関与している. 最近, Akt1 ノックアウトマウスにおいて Akt1 が血管新生時の血管の成熟や透過性の維持にとって必須であることが報告され, PI3K-Akt 経路が血管機能を正常に維持する上で必須の制御機構といえる (22).

スタチンの作用の一つに eNOS の発現, 活性化を介した血管新生があるが, それは PI3K-Akt 依存性に内皮前駆細胞 (EPC) を動員し, 血管新生を促進するとの報告が相次いでなされている (23-25). 臨床的にもシンバスタチンの服用者は血流中の EPC の増加が認められる (24, 25). スタチンは骨髄中での造血幹細胞から EPC への分化, 末梢血への EPC の動員, EPC の生存, 遊走と末梢血への接着を促進するというように各ステージで EPC を制御することで, 血管新生および障害血管の修復を促進すると考えられる. その機序として, 間接的に NO の持つ血管新生作用を誘導するだけでなく, 直接的に Akt の経路を介して EPC の分化の調節, アポトーシスの抑制を行う可能性が考えられている.

スタチンは PI3K を活性化し, PI(3,4) P₂ から PI(3,4,5) P₃ への変換を促すと, それに引き続いて PI(3,4,5) P₃ によって PDK-1 が活性化される. 活性化された PDK-1 と PDK-2 によって Akt はリン酸化を受けて活性化する. 活性化した Akt は eNOS の Ser1177 をリン酸化することにより eNOS を活性化し, NO 合成を促進する (26, 27). これまでの解析の結果, スタチンによる血清除去時のアポトーシスの抑制や, *in vitro*, *in vivo* レベルでの血管新生の促進作用は Akt のリン酸化を介していることが明らかにされている (18). これらの結果からスタチンの心血管保護作用の一部は血管内皮における PI3K-Akt 経路の活性化によって説明できる. ではスタチンはどのような機序で Akt を活性化するのだろうか.

スタチンによる Akt 活性化のメカニズムとして, 培養細胞においてスタチンが PI3K 依存性に Akt の細胞膜への移行を促進することが示されている (28). これはメバロン酸の投与により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. 一方でスタチンは Akt をカベオラヘリクルートすることで eNOS の活性を制御することが示唆されている (29). eNOS はコレステロールやスフィンゴ脂質に富む細胞膜表面のくぼみ構造であるカベオラとよばれる細胞膜ドメインに局在し, そこに局在するカベオリンと会合している.

カベオリンは G タンパク質, プロテインキナーゼ C, eNOS などのシグナル伝達に関与しており, カベオリンと結合した eNOS は活性が低下する (30, 31). スタチンは eNOS-カベオリンの会合を抑制し, 逆に eNOS とシャペロンである hsp90 の複合体形成, および Akt-eNOS の会合と eNOS のリン酸化を促進することが報告されている (29). これらより, スタチンは細胞内コレステロール量の低下を介して Akt をカベオラへ局在化し, 細胞膜でのタンパク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.

また, スタチンはカベオリンの転写活性を調節することによって機能的な eNOS を増加させることも報告されている. 動脈硬化巣ではカベオリンの発現亢進が認められ, カベオリンに結合した eNOS が増加することにより, 内皮の弛緩作用に寄与する遊離型 eNOS が減少している可能性が示されている (32). スタチンは, 増加した細胞膜のカベオリンを減少させることによって内皮弛緩作用を改善すると考えられる.

2) イソプレノイドの生成阻害

コレステロール生合成経路の中間体であるイソプレノイドは電子伝達, 糖輸送, タンパク発現やタンパクの機能調節などの細胞機能を維持する上で重要な分子である. このイソプレノイドの枯渇はスタチンの多面的作用の一因と考えられている.

低分子量 G タンパク質 Ras, Rho ファミリーは, ゲラニルゲラニルピロリン酸やファルネシルピロリン酸といったイソプレノイド中間代謝産物による翻訳後修飾により活性調節を受ける (24). ゲラニルゲラニルピロリン酸による Rho のゲラニルゲラニル化は Rho の局在を決定し, ファルネシルピロリン酸による Ras のファルネシル化は Ras の細胞質から細胞膜への移行を制御することで Ras の活性化を調節する. したがってスタチンはコレステロール合成経路を阻害することでイソプレノイド中間代謝産物であるゲラニルゲラニルピロリン酸やファルネシルピロリン酸の生成を阻害し, 結果として Ras や Rho の活性を抑制する (33).

スタチンの Rho を介するイベントとして, ET-1 の合成低下, AT1, tPA の発現抑制や, eNOS, PAI-1 の発現亢進が報告されている. Rho の活性化は eNOS mRNA の安定性を減弱させ, 逆に Rho の不活性化は eNOS 遺伝子発現を増加させることが明らかになっている. さらに eNOS の mRNA 不安定化に関わる Rho の下流のメディエーターは ROCK であることが報告されている (34, 35). RhoA-ROCK はまた, PTEN の細胞内局在を変えることで Akt の活性を抑制すると

いう報告もあることから、Rho-ROCK 経路は eNOS の発現と活性化という二段階の異なるメカニズムによって内皮機能を負に調節していることになる (36)。また最近、Rho の下流には転写因子 KLF2 があり、それが Rho の阻害で発現増加すること、スタチンの eNOS、トロンボモジュリンの発現上昇には KLF2 が必要であることが明らかにされた (37)。さらにスタチンが Rho-Rho キナーゼの阻害と Akt の活性化を介して組織因子の発現を抑えることも明らかにされている (38)。一方でスタチンによる単核球から EPC への分化促進効果は PI3K の阻害薬 LY294002、メバロン酸によって抑制される一方で、ゲラニルゲラニルピロリン酸や Rho キナーゼ阻害薬によって阻害されないことから、単核球から EPC への分化は PI3K-Akt 経路により制御され、Rho-Rho キナーゼ経路は関与しない可能性が示されている (39)。

一方、Rac は NAD (P) H オキシダーゼの活性化とスーパーオキシドの産生を行うことから、Rac を阻害する結果、eNOS の活性化とスーパーオキシドの産生を減少させることになる (13, 40, 41)。またスタチンによる Rac/cdc42 の阻害がトロンボモジュリンの発現を増加させることが報告されている (42)。Rho, Rac の経路の阻害は NO の活性を上昇させ、酸化ストレスを低下させることで血管収縮から拡張へとバランスシフトさせることで内皮機能保護効果を発揮すると考えられる。

4. Biphasic effects

スタチンは *in vitro*, *in vivo* の血管新生において用量依存的に、二相性の効果をもつことが報告されている。低用量のスタチンは血管新生を促進し、高用量のスタチンは逆に阻害する (43, 44)。0.01-0.1 μ M のアトルバスタチンあるいはメバスタチンは PI3K-Akt 経路に依存した eNOS の活性化を介して血管内皮細胞や EPC の遊走や血管新生プロセスを促進する。対照的に 0.1 μ M の濃度以上では血管内皮のアポトーシスを誘発することで遊走を阻害し、血管新生を抑制した。セリバスタチンでも高濃度ではコレステロール非依存性に血管新生抑制効果が生じ、Rho/FAK/Akt の経路を阻害しうることが示された (45)。これまでの多くの報告が pleiotropic effects の機序として低分子量 G タンパク質の不活性化を主要経路と考えていたが、常用量の濃度ではむしろ Ras を活性化し Akt, eNOS リン酸化を促進することが明らかにされた (44)。また常用量濃度のスタチンは eNOS mRNA の安定性には寄与せず、eNOS の翻訳後修飾を介して NO 産生を増

加させることも報告されている (45)。このように bi-phasic effects の生じる機序としては、その用量に応じてシグナルの強度や経路を選択する可能性もあるが、高濃度のスタチンはイソプレニル化経路の過剰な阻害によって電子伝達や糖輸送、タンパク発現に関わるイソプレノイド産生をも阻害する可能性があげられる。Akt, Rho はいずれも多機能分子であり、多くの下流因子を伴って、生命の維持に広く関与している。過度な活性化、不活性化によってシステムとしてのバランスを崩す事がないか、吟味する必要があるかもしれない。

5. おわりに

これまでの研究により、スタチンは PI3K-Akt 系の活性化と低分子量 G タンパク質の不活性化という 2 つの異なる経路を介して血管内皮細胞の NO 産生を増加させ、血管内皮機能を改善させることがわかってきた。しかし、どのようにして細胞内コレステロール合成系が Akt 経路を調節するのか、Akt や Rho の下流のエフェクター分子は何かという問いに対する十分な答えは得られていない。これらの問いへの解答は内皮機能維持のための新たな薬剤のターゲットを導きうる。

実際の薬剤の使用は長期にわたり、遺伝子発現を伴うという点において、転写誘導される遺伝子を解析対象としたトランスクリプトームは有効である。今後はトランスクリプトーム解析から得られた成果をもとに各臓器での作用を系統的に解明し、至適投与量の設定を図っていくことが望ましいと考えられる。また eNOS の遺伝子多型の存在も明らかになっており、それらを含めた薬理ゲノミクスの今後の発展に期待したい。一方で、スタチンの pleiotropic effects が eNOS の翻訳後修飾や、Akt のリン酸化、低分子量 G タンパク質のイソプレニル化のような翻訳後修飾で説明されることから、その作用機序、薬効発現の解明においては、薬理ゲノミクスの中でも翻訳後修飾やタンパク質の相互作用を視野に入れた大規模な解析も必要になってくるであろう。今後はこういった手法がシグナル伝達経路の解明という分子生物学の領域だけでなく、薬の作用機序の解明、ひいては病態発症、進展機序の解明にとって必須の技術となり得ることが予想される。スタチン以外に ACE 阻害薬や一部のカルシウム拮抗薬、ARB など本来の降圧作用に加えて内皮機能亢進が報告されていることから、これら薬剤との併用の過程で生じるメカニズムの解明において、十分な力を発揮すると考えられる。

文 献

- 1) Shepherd J, et al. N Engl J Med. 1995;333:1301-1307.
- 2) WOS-COPS. Circulation. 1998;97:1440-1445.
- 3) Libby P, et al. Nat Med. 2002;8:1257-1262.
- 4) Delanty N, et al. Stroke. 1997;28:2315-2320.
- 5) Rosenson R, et al. JAMA. 1998;279:1643-1650.
- 6) Davignon J, et al. Curr Opin Lipidol. 1999;106:543-559.
- 7) Vaughan CJ, et al. J Am Coll Cardiol. 2000;35:1-10.
- 8) Laufs U, et al. J Biol Chem. 1997;272:31725-31729.
- 9) Seeger H, et al. Int J Clin Pharmacol Ther. 2000;38:270-272.
- 10) Hernandez-Perera O, et al. J Clin Invest. 1998;101:2711-2719.
- 11) Morikawa S, et al. J Atheroscler Thromb. 2002;9:178-183.
- 12) Morikawa S, et al. J Atheroscler Thromb. 2004;11:62-72.
- 13) Laufs U, et al. Circulation. 1998;97:1129-1135.
- 14) Gonzalez-Fernandez F, et al. Atherosclerosis. 2001;155:61-70.
- 15) Haendeler J, et al. Nat Cell Biol. 2002;4:743-749.
- 16) Shishehbor MH, et al. Circulation. 2003;108:426-431.
- 17) Rueckschloss U, et al. Circulation. 2001;104:1767-1772.
- 18) Kureishi Y, et al. Nat Med. 2000;6:1004-1010.
- 19) Urbich C, et al. Circ Res. 2002;90:737-744.
- 20) Murata T, et al. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2005;25:2335-2342.
- 21) Liao JK, et al. J Clin Invest. 2002;110:285-288.
- 22) Chen J, et al. Nat Med. 2005;11:1188-1196.
- 23) Dimmeler S, et al. J Clin Invest. 2001;108:391-397.
- 24) Llevadot J, et al. J Clin Invest. 2001;108:399-405.
- 25) Vasa M, et al. Circulation. 2001;103:2885-2890.
- 26) Fulton D, et al. Nature. 1999;399:597-601.
- 27) Dimmeler S, et al. Nature. 1999;399:601-605.
- 28) Skaletz-Forowski A, et al. Cardiovasc Res. 2003;57:253-264.
- 29) Brouet A, et al. Circ Res. 2001;89:866-873.
- 30) Garcia-Cardena G, et al. Proc Natl Acad Sci USA. 1996;93:6448-6453.
- 31) Ju H, et al. J Biol Chem. 1997;272:18522-18525.
- 32) Pelat M, et al. Circulation. 2003;107:2480-2486.
- 33) Park HJ, et al. Circ Res. 2002;91:143-150.
- 34) Eto M, et al. Circ Res. 2001;89:583-590.
- 35) Takemoto M, et al. Circulation. 2002;106:57-62.
- 36) Li Z, et al. Nat Cell Biol. 2005;7:399-404.
- 37) Sen-Banerjee S, et al. Circulation. 2005;112:720-726.
- 38) Eto M, et al. Circulation. 2002;105:1756-1759.
- 39) Dimmeler S, et al. J Clin Invest. 2001;108:391-397.
- 40) Wagner AH, et al. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2000;20:61-69.
- 41) Endres M, et al. Proc Natl Acad Sci USA. 1998;95:8880-8885.
- 42) Masamura K, et al. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2003;23:512-517.
- 43) Weis M, et al. Circulation. 2002;105:739-745.
- 44) Urbich C, et al. Circ Res. 2002;90:737-744.
- 45) Vincent L, et al. Thromb Haemost. 2003;89:530-537.

著者プロフィール

塩田 正之 (しおた まさゆき)

大阪市立大学大学院医学研究科 分子病態薬理学, 助手, 博士 (農学).

◇産業技術総合研究所特別研究員を経て2004年より現職, 現在の専門は分子薬理学. 大学院在学時より一貫してシグナル伝達研究に従事. 現在は, 分子間相互作用を中心に心血管保護作用を持つ薬剤の分子機序解明に取り組んでいる.

泉 康雄 (いずみ やすかつ)

大阪市立大学大学院医学研究科 分子病態薬理学, 助手.

◇1994年滋賀医科大学医学部卒業, '00年大阪市立大学大学院医学研究科 博士課程修了 (医学博士), '01年同 循環器病態内科学研究医, '02年1月同大学院分子病態薬理学助手, '05年6月より米国ヒューストンにある Baylor 医科大学の Michael D. Schneider 教授の研究室に留学中. ◇研究テーマ: 大阪市立大学在職中は, 光山勝慶先生 (現熊本大学教授) のもと, *in vivo* における心血管病における細胞内分子機序, 特に MAP キナーゼ経路を中心とした機序の解明に取り組む. 現在は, 新たな切り口で心肥大・心不全の分子機序解明に取り組んでいる. ◇趣味: スポーツ観戦, スキー, 読書.

中尾 隆文 (なかお たかふみ)

大阪市立大学大学院医学研究科 分子病態薬理学, 助手.

◇1994年大阪市立大学医学部卒業, '00年大阪市立大学大学院医学研究科 博士課程修了 (医学博士), 専門は血液学.

岩尾 洋 (いわお ひろし)

本号 21A をご参照下さい.