

|         |   |            |
|---------|---|------------|
| 氏名(本籍)  | 石田 恵子   | (静岡県)      |
| 学位の種類   | 博士(薬学)  |            |
| 学位記番号   | 甲 第158号   |            |
| 学位授与年月日 | 平成25年3月15日  |            |
| 学位授与の要件 | 学位規則第4条第1項該当者   |            |
| 学位論文の題名 | Mechanisms underlying the diabetes-related changes in the extracellular nucleotides-induced responses in superior mesenteric arteries from rats |            |
| 論文審査委員  | 主査  | 教授 小林 恒雄   |
|         | 副査  | 教授 辻 勉     |
|         | 副査  | 准教授 輪 千浩 史 |

## 論文内容の要旨

近年、ライフスタイルの変化などにより増加の一途を辿っている糖尿病は、長期的な罹患により腎症、網膜症、神経障害など、糖尿病に特有の三大合併症を誘発する他、脳梗塞、心筋梗塞などのリスクファクターとなる重大な疾患である。糖尿病合併症は患者の **quality of life (QOL)** を著しく低下するばかりでなく、社会問題となっている医療費増加の一要因である。しかしながら、糖尿病合併症は血糖コントロールのみでは完全に予防することができないため、合併症の発症・進展の抑止を目的とした治療戦略の確立が重要な課題となっている。合併症の病理学的特徴は血管障害であり、糖尿病病態時において内皮細胞由来弛緩因子 (**endothelium-derived relaxing factors; EDRFs**) と収縮因子 (**endothelium-derived contracting factors; EDCFs**) のバランス異常が報告されている。EDRF は、主に一酸化窒素 (**nitric oxide; NO**)、プロスタサイクリン (**PGI<sub>2</sub>**)、内皮由来過分極因子 (**endothelium-derived hyperpolarizing factor; EDHF**) など、EDCF は **PGE<sub>2</sub>**、**PGF<sub>2α</sub>**、**PGD<sub>2</sub>**、**TXA<sub>2</sub>** などのアラキドン酸代謝物、**endothelin-1** などがあり、これらが相互にクロストークして血管緊張性が巧妙に調節されている。このため EDRF と EDCF を介した細胞情報伝達機構障害の解明は、新たな治療ターゲットとなりうる可能性がある。一方、内皮由来因子の寄与は血管径により異なる。腸間膜動脈は、EDRF に着目すると胸部大動脈とは異なり、NO だけでなく EDHF も放出し、EDCF とクロストークすることで血管緊張性を調節している。さらに循環血流量を制御することから、臓器の血流障害、すなわち臓器機能不全の発症に深く寄与する血管である。そこで今回、糖尿病モ

デルラットの腸間膜動脈を用いて、EDRF と EDCF のバランス異常、特に cyclooxygenase (COX) 依存内皮由来収縮因子に着目して検討を行った。また、細胞外 nucleotides は活性血小板や内皮細胞から放出され、P2-receptor に作用することで、EDRF、EDCF とともに遊離し血管緊張性だけでなく血栓防止などにも重要な役割を果たす物質の一つである。このため、特に purinergic signalling を介した血管機能障害メカニズムを明らかとすることで、新たな糖尿病性血管障害に治療ターゲットの確立を目指し研究を行った。

HMG-CoA 還元酵素阻害剤である pravastatin は脂質異常症の有無にかかわらず、Rho-kinase 活性や酸化ストレスを低下することで、心血管障害時におけるリスクイベントを減少させる多面的効果があることが報告され始めている。Rho-kinase は血管緊張性調節だけでなく、endothelial NO synthase (eNOS) の発現低下や酸化ストレス産生亢進作用も報告されており、このため EDCF 増大への関与が想定される。しかしながら、長期的に糖尿病に罹患した状態での pravastatin の EDCF 増大に対する効果や詳細な分子メカニズムについては明らかとなっていない。そこで私は、2 型糖尿病モデル Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) ラット (52 - 56 週齢) に、pravastatin (10 mg/kg/day; p.o.) を 4 週間投与し、これら動物より摘出した腸間膜動脈を用い、acetylcholine (ACh) による弛緩反応並びに収縮反応について検討した。

OLETF ラットにおいて血糖値、コレステロール、トリグリセリド、high-density lipoprotein (HDL)、遊離脂肪酸、血圧の増加が認められたのに対し、pravastatin 投与は遊離脂肪酸の低下が認められたものの、これら血中パラメーター及び血圧には影響を及ぼさなかった。OLETF ラット腸間膜動脈について、ACh による弛緩反応の減弱、EDCF 収縮反応の増大 (この反応は Rho-kinase inhibitor Y27632 により抑制された)、ACh 刺激下の PGE<sub>2</sub> 産生量、superoxide 産生量増加、COX-1 発現、Rho-kinase の基質である PERM (phosphorylated ezrin, radixin, and moesin) 発現増加が認められた。これらの変化に対し pravastatin 投与は、ACh による弛緩反応増大、EDCF 収縮反応抑制、ACh 刺激下の PGE<sub>2</sub> 産生量、superoxide 産生量抑制、PERM 発現の低下効果を示した。以上の結果より、pravastatin は 2 型糖尿病ラット腸間膜動脈において Rho-kinase の抑制、および抗酸化作用を促進することで PGE<sub>2</sub> 産生を低下し、EDCF 反応性の抑制により血管内皮機能障害を改善することが明らかとなった。

一方、血管において細胞外 nucleotides (ATP、UTP) は、内皮、平滑筋細胞膜上の P2X (P2X<sub>1</sub>-P2X<sub>7</sub>)、P2Y (P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>4</sub>, P2Y<sub>6</sub>, and P2Y<sub>11</sub>-P2Y<sub>14</sub>) receptor

に作用する。特に内皮細胞膜上の P2 receptor に作用することで EDRF や EDCF を遊離し、血管緊張性を調節することから、糖尿病や高血圧、動脈硬化などの循環器疾患の進展発症に重要な役割を果たしている可能性が想定される。しかしながら、病態時における血管反応性の変化やそのシグナル伝達については明らかとなっていない。

そこで私は、2型糖尿病モデル Goto-Kakizaki (GK) ラット(37-42 週齢) 上腸間膜動脈を用い、細胞外 nucleotides (ATP、UTP) に対する感受性の変化、並びにそのシグナル伝達に焦点を当て検討を行った。また、angiotensin II は、血圧調節に関与するのみならず、血管に対して多彩な作用を示し、種々の病態に対する関与が指摘され、angiotensin II type I receptor blockers (ARBs) が 2 型糖尿病患者の血管機能障害に有用であることが報告されている。そこで、ARB である losartan (25 mg/kg/day; 2 week) 投与群を作成し、その影響について検討した。その結果、GK ラット上腸間膜動脈では、1) ATP、UTP 誘発収縮反応性増大 (この反応は COX inhibitor、cPLA<sub>2</sub> inhibitor、P2Y antagonist および内皮除去により抑制された)、2) ATP、UTP 刺激下の PGE<sub>2</sub>、PGF<sub>2α</sub> 産生量、p-cPLA<sub>2</sub> 発現増大、3) COX-1、COX-2 発現増加、4) superoxide 産生量増大、5) P2Y<sub>2</sub>、P2Y<sub>6</sub> receptor 発現は同程度であったが P2Y<sub>4</sub> receptor 発現減少が認められた。これらの障害は losartan 投与により 1) ATP、UTP 誘発収縮反応、2) UTP 刺激下の PGE<sub>2</sub>、PGF<sub>2α</sub> 産生量、3) UTP 刺激下の p-cPLA<sub>2</sub> level、4) COX-2、P2Y<sub>4</sub> receptor 発現、5) superoxide 産生が是正された。以上の結果より、2 型糖尿病時における ATP、UTP 収縮反応性の増大は P2Y receptor を介した cPLA<sub>2</sub>/COX 経路の活性によることが明らかとなった。また losartan はこれらのシグナルを抑制したが、これには酸化ストレス低下が一要因だと考えられる。

続いて、P2Y 刺激時において特に産生量が増加していた prostanoids の一つである prostaglandine E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) に着目した。EDCF の一つである PGE<sub>2</sub> は、糖尿病や高血圧症など心血管病態時においてその産生が増大する。PGE<sub>2</sub> receptor は、4 つのサブタイプ (EP1-EP4) が存在し、中でも血管平滑筋細胞に存在する EP1、EP3 receptor を介し、血管収縮反応が惹起されることが報告されている。しかしながら、2型糖尿病時における PGE<sub>2</sub> 感受性の変化、またそのシグナル伝達については全く明らかにされていない。ATP、UTP 収縮反応性の増大は、血管内皮細胞における PGE<sub>2</sub> 産生量増加だけでなく、平滑筋細胞における PGE<sub>2</sub> の感受性増大も一因ではないかと考え、GK ラット (38-42 週齢) を用い、長期的に糖尿病に罹患した状態での PGE<sub>2</sub> 収縮反応性の変化並びにそ

のシグナル伝達について検討を行った。

GK ラット上腸間膜動脈において、内皮除去標本および、L-NNA (NOS inhibitor) 前処置下における PGE<sub>2</sub> 収縮反応性の増大が観察された。しかし、この収縮増大は、AH6809 (non-selective EP receptor antagonist) により抑制されたが、sc-19220 (EP1 receptor antagonist) 前処置下では影響が認められなかった。また sulprostone (EP3 receptor agonist) 並びに 17-phenyl-trinor-PGE<sub>2</sub> (EP1 and EP3 receptor agonist) による収縮反応性は GK ラットにおいて増大しており、この収縮は rottlerin [selective protein kinase C (PKC)  $\delta$  inhibitor] 処置により抑制された。さらに GK ラット上腸間膜動脈では、sulprostone 刺激による PKC $\delta$ 、並びに平滑筋収縮調節因子である caldesmon の活性上昇が認められた。このため、GK ラット上腸間膜動脈における PGE<sub>2</sub> 収縮反応性の増大は、血管平滑筋の EP3 receptor を介した PKC  $\delta$  活性増加の関与が示唆された。

一方、細胞外 nucleotides は、P2Y<sub>1</sub>、P2Y<sub>2</sub> receptor に作用することで、血管弛緩反応に関与することも報告されている。EDRF の一つである NO は eNOS から産生され、その活性は Ca<sup>2+</sup>/calmodulin だけでなく様々なキナーゼによりリン酸化されることで調節されている。種々存在する eNOS のリン酸化サイトのうち、活性調節は Ser<sup>1177</sup>、抑制調節は Thr<sup>495</sup> 部位が担っており、eNOS 活性低下による NO 産生低下が、糖尿病性血管機能障害を引き起こす一因であることが報告されている。そこで今回、糖尿病病態時における細胞外 nucleotides の弛緩反応性変化、特に 1 型糖尿病を長期的に罹患した状態での細胞外 nucleotides の血管反応の変化について検討を行った。実験には 8 週齢の雄性 Wistar ラットに streptozotocin (STZ; 65 mg/kg) を尾静脈注射し、投与後 50 - 57 週経過した動物 (58 - 65 週齢) を STZ 誘発糖尿病ラットとして用いた。STZ 誘発糖尿病ラット上腸間膜動脈において、ADP 誘発弛緩反応 (この反応は内皮除去標本、NOS inhibitor、selective P2Y<sub>1</sub> receptor antagonist 処置により抑制された)、2-MeSADP (P2Y<sub>1</sub> receptor selective agonist) 誘発弛緩反応の減弱が観察された。しかしながら、ATP 誘発弛緩反応は変化が認められなかった。また、ADP 刺激時の NO 代謝物産生量、eNOS の Ser<sup>1177</sup> 部位のリン酸化タンパク発現が有意に低下していたことより、上腸間膜動脈において ADP は、内皮の P2Y<sub>1</sub> receptor を介し NO を産生することで弛緩反応を引き起こすが、糖尿病時、この弛緩反応性が減弱することが明らかとなった。

本研究により、COX 依存内皮由来収縮因子は ACh 刺激だけでなく、細胞外 nucleotides による P2Y receptor を介した経路でも遊離されることを確認し

た。さらに、糖尿病モデルの上腸間膜動脈では、血管内皮細胞における cPLA<sub>2</sub>/COX 経路の活性亢進と、平滑筋細胞における PKC $\delta$  活性増加による PGE<sub>2</sub> の感受性増大により、収縮反応性増強が惹起されていることが明らかとなった。また、P2Y<sub>1</sub> receptor を介した NO 依存性弛緩反応は糖尿病モデルにおいて減弱することを確認した。つまり糖尿病の長期的な罹患は、細胞外 nucleotides 刺激による血管緊張性調節も障害し、血管機能障害を惹起することが明らかとなった。よって、糖尿病性血管障害において purinergic signalling が有用な治療ターゲットとなりうる可能性が示された。

## 論文審査の結果の要旨

糖尿病は、長期的な罹患により腎症、網膜症、神経障害など、糖尿病に特有の三大合併症を誘発する他、脳梗塞、心筋梗塞などのリスクファクターとなる重大な疾患である。更にこれら合併症の病理学的特徴は血管障害であり、糖尿病病態時において内皮細胞由来弛緩因子 (endothelium-derived relaxing factors; EDRFs) と収縮因子 (endothelium-derived contracting factors; EDCFs) のバランス異常が報告されている。このため EDRF と EDCF を介した細胞情報伝達機構障害の解明は、新たな治療ターゲットとなりうる可能性がある。そこで本論文は、糖尿病モデルラットの上腸間膜動脈を用いて、EDRF と EDCF のバランス異常、特に cyclooxygenase (COX) 依存内皮由来収縮因子に着目して検討を行った。また、細胞外 nucleotides は活性血小板や内皮細胞から放出され、P2-receptor に作用することで、EDRF、EDCF とともに遊離し血管緊張性だけでなく血栓防止などにも重要な役割を果たす物質の一つである。このため、特に purinergic signalling を介した血管機能障害メカニズムを明らかとすることで、新たな糖尿病性血管障害に治療ターゲットの確立を目指し研究を行っている。

第一章において、2型糖尿病モデル Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) ラットに、pravastatin を投与し、これら動物より摘出した上腸間膜動脈を用い、acetylcholine (ACh) による弛緩反応並びに収縮反応について検討した。OLETF ラット上腸間膜動脈について、ACh による弛緩反応の減弱、EDCF 収縮反応の増大、ACh 刺激下の PGE<sub>2</sub> 産生量、superoxide 産生量増加、COX-1 発現、Rho-kinase の基質である PERM (phosphorylated ezrin, radixin, and moesin) 発現増加が認められた。これらの変化に対し pravastatin 投与は、ACh による弛緩反応増大、EDCF 収縮反応抑制、ACh 刺激下の PGE<sub>2</sub> 産生量、superoxide 産生量抑制、PERM 発現の低下効果を示した。以上の結果より、pravastatin は2型糖尿病ラット上腸間膜動脈において Rho-kinase の抑制、および抗酸化作用を促進することで PGE<sub>2</sub> 産生を低下し、EDCF 反応性の抑制により血管内皮機能障害を改善することが明らかとなった。第二章において、2型糖尿病モデル Goto-Kakizaki (GK) ラット上腸間膜動脈を用い、細胞外 nucleotides (ATP、UTP) に対する感受性の変化、並びにそのシグナル伝達に焦点を当て検討を行った。GK ラット上腸間膜動脈では、1) ATP、UTP 誘発収縮反応性増大、2) ATP、UTP 刺激下の PGE<sub>2</sub>、PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  産生量、p-cPLA<sub>2</sub> 発

現増大、3) COX-1、COX-2 発現増加、4) superoxide 産生量増大、5) P2Y<sub>2</sub>、P2Y<sub>6</sub> receptor 発現は同程度であったが P2Y<sub>4</sub> receptor 発現減少が認められた。これらの障害は losartan 投与により 1) ATP、UTP 誘発収縮反応、2) UTP 刺激下の PGE<sub>2</sub>、PGF<sub>2α</sub> 産生量、3) UTP 刺激下の p-cPLA<sub>2</sub> level、4) COX-2、P2Y<sub>4</sub> receptor 発現、5) superoxide 産生が是正された。以上の結果より、2型糖尿病時における ATP、UTP 収縮反応性の増大は P2Y receptor を介した cPLA<sub>2</sub>/COX 経路の活性によることが明らかとなった。第三章においては、GK ラット上腸間膜動脈において、内皮除去標本および、L-NNA (NOS inhibitor) 前処置下における PGE<sub>2</sub> 収縮反応性の増大が観察された。しかし、この収縮増大は、AH6809 (non-selective EP receptor antagonist) により抑制されたが、sc-19220 (EP1 receptor antagonist) 前処置下では影響が認められなかった。また sulprostone (EP3 receptor agonist) 並びに 17-phenyl-trinor-PGE<sub>2</sub> (EP1 and EP3 receptor agonist) による収縮反応性は GK ラットにおいて増大しており、この収縮は rottlerin [selective protein kinase C (PKC) δ inhibitor] 処置により抑制された。さらに GK ラット上腸間膜動脈では、sulprostone 刺激による PKC δ、並びに平滑筋収縮調節因子である caldesmon の活性上昇が認められた。このため、GK ラット上腸間膜動脈における PGE<sub>2</sub> 収縮反応性の増大は、血管平滑筋の EP3 receptor を介した PKC δ 活性増加の関与が示唆された。第四章において、STZ 誘発糖尿病ラット上腸間膜動脈は、ADP 誘発弛緩反応、2-MeSADP (P2Y<sub>1</sub> receptor selective agonist) 誘発弛緩反応の減弱が観察された。しかしながら、ATP 誘発弛緩反応は変化が認められなかった。また、ADP 刺激時の NO 代謝物産生量、eNOS の Ser<sup>1177</sup> 部位のリン酸化タンパク発現が有意に低下していたことより、上腸間膜動脈において ADP は、内皮の P2Y<sub>1</sub> receptor を介し NO を産生することで弛緩反応を引き起こすが、糖尿病時、この弛緩反応性が減弱することが明らかとなった。

本研究により、COX 依存内皮由来収縮因子は ACh 刺激だけでなく、細胞外 nucleotides による P2Y receptor を介した経路でも遊離されることを確認した。さらに、糖尿病モデルの上腸間膜動脈では、血管内皮細胞における cPLA<sub>2</sub>/COX 経路の活性亢進と、平滑筋細胞における PKC δ 活性増加による PGE<sub>2</sub> の感受性増大により、収縮反応性増強が惹起されていることが明らかとなった。また、P2Y<sub>1</sub> receptor を介した NO 依存性弛緩反応は糖尿病モデルにおいて減弱することを確認した。つまり糖尿病の長期的な罹患は、細胞外 nucleotides 刺激による血管緊張性調節も障害し、血管機能障害を惹起することが明らかと

なり、糖尿病性血管障害において purinergic signalling が有用な治療ターゲットとなりうる可能性が示された。これらの内容は論文全体にわたって正確に表現されており、本論文は博士（薬学）の学位を授与するに十分値する内容を有していると判断した。