

氏名(本籍)	宮田 則之 (神奈川県)
学位の種類	博士(薬学)
学位記番号	乙 第68号
学位授与年月日	平成7年9月14日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当者
学位論文の題名	糖尿病時および高血圧症時における血管平滑筋の薬物感受性変化－血管内皮細胞障害と関連して－
論文審査員	主査 学長 粕谷 豊 副査 教授 三澤 美和 副査 助教授 鎌田 勝雄 副査 助教授 鈴木 勉

## 論文内容の要旨

近年、糖尿病患者は急速に増加し、日本国内での患者数は1993年現在で約300万人と推定されている。かつては欧米と比較するとその患者は少なかったが、日本でも生活の変化や未だ例のない急速な高齢化に伴い、増加の一途をたどっている。また、高血圧症患者も高齢化に伴い、増加の傾向にあり社会的な問題となっている。糖尿病および高血圧症は、脳血管疾患、虚血性心疾患、動脈硬化症、腎症等の循環器系の合併症を高頻度に伴うことでも知られている。また、糖尿病および高血圧症はお互いが症状を増悪させる危険因子でもある。これらの病態時にみられる血管系合併症の原因は未だ明らかとなっていないが、神経伝達物質やホルモンなどに対する血管平滑筋や内皮細胞の機能変化が一部関与している可能性がある。そこで、実験的糖尿病動物および自然発症高血圧動物より血管平滑筋を摘出して、種々生理活性物質に対する薬物感受性変化を検討し、以下のような結果を得た。

1) Streptozotocin (STZ) 誘発糖尿病ラットの胸部大動脈における norepinephrine (NE) 誘発血管収縮作用を対照群と比較検討したところ、NEによる  $\alpha$ -adrenaline 受容体介在性血管収縮作用は糖尿病群において亢進していることを見いだした。さらに NE による収縮反応の反応性増大には 電位依存性  $Ca^{2+}$ -channel の活性化および phosphatidylinositol 代謝回転の亢進が関与していることが明らかとなった。

2) STZ 誘発糖尿病ラットの胸部大動脈における isoproterenol (ISO) による血管弛緩反応を対照群と比較検討したところ ISO による  $\beta$ -adrenaline 受容体介在性血管弛緩

反応は血管内皮細胞の有無に関わらず、糖尿病群において著明に減弱していた。しかし、血管平滑筋の *adenylate cyclase* 直接活性化薬である *forskolin* による血管弛緩反応は、両群の間に有意な差は認められなかった。このことから、糖尿病時における血管平滑筋の  $\beta$ -*adrenaline* 受容体の数の減少または親和性の低下が示唆された。また、この過程において *ISO* による血管弛緩反応が血管内皮細胞の存在に一部依存することを見いだした。血管平滑筋における  $\beta$ -*adrenaline* 受容体の機能低下は、自然発症糖尿病ラットである *WBN/Kob* ラットにおいても認められたことから、糖尿病時における  $\beta$ -*adrenaline* 受容体の機能は化学物質誘発糖尿病モデルおよび自然発症糖尿病モデルのいずれの I 型糖尿病モデルにおいても低下していることが明らかとなった。

3) 糖尿病時における血管内皮細胞の機能変化を検討する目的で、*STZ* 誘発糖尿病ラットの胸部大動脈における *acetylcholine* (*ACh*) 誘発内皮細胞依存性弛緩作用を対照群と比較検討した。その結果 *ACh* による血管弛緩反応の感受性は糖尿病群において有意に低下していることを見いだした。しかし内皮細胞非依存性弛緩薬である *sodium nitroprusside* (*SNP*, *soluble guanylate cyclase activator*) および *atrial natriuretic peptide* (*ANP*, *particulate guanylate cyclase activator*) による血管弛緩反応には有意な差は認められなかった。また、*ACh* による血管中 *cyclic GMP* 生成量を測定したところ、血管弛緩反応と同様に糖尿病群において有意な *cyclic GMP* 生成量の低下が認められた。以上のことから、*STZ* 誘発糖尿病ラットにおける血管内皮細胞の機能低下が明らかとなった。同様の検討を脳卒中易発症性高血圧自然発症ラット (*SHRSP*) の頸動脈においても検討したところ、同様の現象が認められたことから、血管内皮機能障害は糖尿病時および高血圧症時の血管に共通した現象であることが明らかとなった。

4) *STZ* 誘発糖尿病ラットで認められた血管内皮機能障害を自然発症糖尿病ラットにおいても検討したところ、糖尿病群において内皮細胞依存性弛緩作用の減弱が認められた。この血管内皮機能障害は内皮細胞由来弛緩因子の産生または放出の減少に起因しており、化学物質誘発糖尿病モデルおよび自然発症糖尿病モデルのいずれの I 型糖尿病モデルにおいても認められる現象であった。この過程において、自然発症糖尿病ラットにおける血管内皮機能障害は血糖値上昇以前から生じていることが明らかとなり、この現象は血糖値に依存せずに遺伝的に発現している可能性が示唆された。この血管内皮機能障害が起こると血管中 *cyclic GMP* 量が減少するため、血管緊張の増大、血小板凝集・

粘着、平滑筋増殖等が起こる可能性があり、このことが糖尿病時および高血圧症時に、動脈硬化症、脳血管疾患、虚血性心疾患、腎症等の合併症を高頻度に併発する原因の一つと考えられた。

5) SHRSP の門脈平滑筋における phorbol ester による血管収縮作用を検討したところ、その反応性は SHRSP において有意に増強していた。また、SHRSP の門脈に protein kinase C 阻害薬である staurosporine を前処置した後の phorbol ester 誘発血管収縮反応は、対照群と同様であったことから、高血圧症時の血管平滑筋における protein kinase C 活性の上昇が示唆された。

6) Cyclic GMP は、血管弛緩作用、血小板凝集阻害作用、平滑筋増殖抑制作用を有することが知られている。そこで、前述した病態動物の血管平滑筋における種々薬物感受性変化を考慮し、cyclic GMP 増加薬の血管弛緩機序を検討した。糖尿病時には NE 誘発血管収縮が亢進していることをすでに明らかとした。また、高血圧症時には交感神経の緊張が異常に高まっていることが報告されている。そこで、NE 誘発収縮に対する cyclic GMP 増加薬の影響を検討した。Cyclic GMP 増加薬はウサギ胸部大動脈において NE 誘発血管収縮を濃度依存的に抑制した。また、cyclic GMP 増加薬は  $Ca^{2+}$ -free 液下の NE 誘発一過性収縮も濃度依存的に抑制し、それに引き続く  $Ca^{2+}$  収縮も濃度依存的に抑制した。これらの NE 誘発収縮作用は、通常の Ca 拮抗薬には認められない作用であった。以上のことから、cyclic GMP 増加薬は NE 誘発収縮を抑制することが明らかとなり、病態時に活性化されている  $\alpha$ -adrenaline 受容体介在性収縮反応に対して有効である可能性が示唆された。

8) 糖尿病時には  $\beta$ -adrenaline 受容体の機能が低下することを先に見いだしているが、同様の現象が高血圧症時にも認められることが報告されている。末梢血管における  $\beta$ -adrenaline 受容体は血管弛緩性に働いていることから、 $\beta$ -adrenaline 受容体の機能が低下することにより、末梢抵抗が増大し、血圧上昇または末梢循環障害を引き起こすことも考えられている。そこで cyclic GMP 増加薬と  $\beta$ -adrenaline 受容体介在性弛緩反応との相互作用について検討した。ISO は endothelin-1 で収縮させたウサギ胸部大動脈を濃度依存的に弛緩させた。その際に nitroglycerin、ANP および CD-349 をそれぞれ前処置すると ISO による弛緩反応は濃度依存的に増強された。この増強作用

は、cyclic GMP analog である 8-Br-cyclic GMP でも同様の結果が得られた。また、この時の ISO による血管中 cyclic AMP 生成量を測定したところ、CD-349 および 8-Br-cyclic GMP によって、その生成量は増大した。以上のことから、cyclic GMP による cyclic AMP 弛緩作用および生成量の増強作用が認められた。この増強作用は、cyclic GMP-inhibitable cyclic AMP phosphodiesterase 阻害作用に起因していることが示唆され、cyclic GMP 増加薬が、病態時における  $\beta$ -adrenaline 受容体の機能低下を改善する可能性があることを示唆する結果となった。

9) SHRSP の門脈平滑筋における phorbol ester 誘発血管収縮作用を検討した結果、高血圧症時にはその収縮反応が亢進していることを見いだした。さらに、糖尿病時にも同様の現象が認められることが報告されている。そこで、protein kinase C 介在性血管収縮作用に対する cyclic GMP 増加薬の影響を検討した。Nitroglycerin, ANP および CD-349 はウサギ胸部大動脈における phorbol ester 誘発収縮を濃度依存的に抑制し、これらの抑制作用は methylene blue により拮抗されたことから、cyclic GMP 増加作用に基づいていることが明らかとなった。これらの作用は通常の Ca 拮抗薬には認められない作用であったことから、cyclic GMP 増加薬は高血圧症時に活性化されている protein kinase C 介在性血管収縮に対しても抑制作用を示すことが明らかとなった。

以上のように糖尿病時および高血圧症時においては、概して血管収縮性は亢進し、血管弛緩性は減弱する傾向にあった。特に、糖尿病時および高血圧症時の血管に共通した血管機能異常として、血管内皮細胞依存性弛緩作用の減弱が認められ、この血管内皮機能障害が、動脈硬化、虚血性心疾患、脳血管疾患等の種々血管系合併症の引金になっている可能性が示唆された。また、cyclic GMP 増加薬は血管平滑筋において、 $\alpha$ -adrenaline 受容体介在性収縮抑制作用、 $\beta$ -adrenaline 受容体介在性弛緩の増強作用および protein kinase C 介在性収縮抑制作用を有していることを見いだした。これらの作用は代表的な血管弛緩薬である Ca 拮抗薬には全く認められない作用であり、cyclic GMP 増加薬の特異的な作用であった。以上のことから、cyclic GMP 増加薬は、病態時に認められた血管の機能異常を改善する作用を有している可能性が示唆された。

## 論文審査の結果の要旨

本研究は、実験糖尿病モデルおよび自然発症高血圧モデル動物を用いて、血管平滑筋の薬物感受性変化を検討することにより、糖尿病時ならびに高血圧症時に見られる種々の血管障害の発生機序の解明と、障害の改善に手がかりを得ようとしたものである。

Streptozotocin (STZ)糖尿病ラットの胸部大動脈において $\alpha$ -adrenergic 受容体を介する収縮反応が亢進していることを認め、この反応性亢進には膜電位依存性 $Ca^{2+}$ -channelの活性化がおこっている事を明らかにすると共にPI代謝回転の亢進を示唆する結果を得た。

一方 $\beta$ -adrenergic 受容体を介する弛緩反応は減弱しており、これは血管内皮細胞の機能障害が一因であることを証明した。

高血圧症動物の摘出血管においても同じく、血管収縮反応の亢進と内皮依存性弛緩反応が減弱していることを明らかにした。

また、SHRSP の門脈平滑筋においては、phorbol ester により誘発される収縮反応がWKYに比して有意に増強されており、SHRSP ではprotein kinase Cの活性が上昇して反応性の変化に関与している可能性が示唆された。

本研究は血管内皮細胞や血管平滑筋細胞の病態時における機能変化を、細胞内情報伝達機構の変化まで含めて解析したことにより、この分野の研究に資するところ大である。さらの、これらの知見を基として、cyclic GMP増加作用薬が、糖尿病や高血圧症時の交感神経性血管収縮を改善する可能性を示唆した点も興味深い。以上、本論文は博士（薬学）の学位に充分値するものであると判定した。