

学位論文の要旨

学位の種類	博 士	氏 名	大前 恒明
<p>学位論文題目</p> <p>Pioglitazone, a peroxisome proliferator-activated receptor-<math>\gamma</math> agonist, induces dilation of isolated retinal arterioles.</p> <p>(ピオグリタゾン<sup>1</sup>は網膜細動脈を拡張させる)</p> <p>共 著 者 名</p> <p>長岡 泰司、棚野 一郎、吉田 晃敏</p> <p>未 発 表</p> <p>研 究 目 的</p> <p>糖尿病網膜症は、我が国の成人失明の主因である。網膜症治療は、めざましく進歩しているが、網膜症の発症・進展を完全には抑制できていないのが現状である。我々は、2型糖尿病患者では、網膜症発症前・早期に網膜血流が低下していることを明らかにし<sup>1)</sup>、網膜微小循環障害が網膜症の病態に深く関わっていることが推測される。従って、網膜血流を改善する薬物などを用いて網膜症早期から適切な介入をすることにより、網膜症の発症進展を抑制できる可能性がでてきた。インスリン抵抗性改善薬として広く使用されているチアゾリジン誘導体は、peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)<math>\gamma</math> の agonist として、抗炎症・抗動脈硬化作用などさまざまな生理活性作用を有しており、臨床的にも心血管保護効果が注目されている。さらに最近では眼科領域においても、チアゾリジン誘導体は増殖糖尿病網膜症の発症を抑制するという報告<sup>2)</sup>がなされ、新しい網膜症治療薬としての可能性が期待されているが、チアゾリジン誘導体の網膜循環への直接作用については、未解明である。そこで本研究では、チアゾリジン誘導体であるピオグリタゾンの網膜細動脈への影響とその作用機序を検討した。</p> <p>材 料 ・ 方 法</p> <p>1. 実験動物</p> <p>実験には豚(週齢 16~24 週、体重 10-15kg) を用いた。</p>			

## 2. 実験方法

摘出豚眼球の網膜組織から血管を剥離・摘出し、血管内腔に生理的な血管内圧をかけ 50~70%程度の基礎緊張を確認し、薬剤を投与し血管径の変化を測定した。

### 網膜血管反応性の評価

基礎緊張の血管径を 0%とし、さらにカルシウムフリー溶液で完全に弛緩した血管を、血管の最大径 100%とする。薬物投与後、この基礎緊張から拡張した血管径を測定し、変化率(%)を網膜血管反応性の評価として使用した。

### 薬物投与による一酸化窒素(NO)産生能の評価

NO は、不安定な物質であり測定が困難である。そこで NO の代謝物である NO<sub>2</sub> と NO<sub>3</sub> の濃度をグリース法/高速液体クロマトグラフィーで測定した。薬剤投与後チャンバー内よりサンプルを採取し、NO の代謝物の和である NO<sub>x</sub> 濃度を算出した。対象コントロールとして溶媒 DMSO の NO<sub>x</sub> 濃度を同様の方法で算出した。

## 3. ピオグリタゾンの網膜血管への影響

### a) ピオグリタゾンの網膜細動脈への影響

ピオグリタゾン(10 nM~10 μM)を投与し、網膜血管の濃度依存性の反応を評価した。

### b) ピオグリタゾンの網膜血管への反応における血管内皮の関与

血管内皮剥離または、内皮由来血管拡張因子(NO, プロスタグランジン, 過分極因子)のそれぞれの抑制薬を使用し、ピオグリタゾンの血管に対する反応を比較した。また、同時に NO<sub>x</sub> も測定し、ピオグリタゾンとその溶媒である DMSO で比較した。NO 合成酵素(NOS)の活性化に重要である PI3kinase/Akt と AMPK のそれぞれの抑制薬である wortmannin と compound C を血管に前投薬し、ピオグリタゾンの血管への影響をそれぞれの薬剤投与前後で比較した。

### c) ピオグリタゾンの網膜血管の反応性における平滑筋のグアニル酸シクラーゼの関与

平滑筋レベルで NO に反応し cGMP を増加させ血管拡張を促すグアニル酸シクラーゼの抑制薬 ODQ を前投薬し、ODQ 投与前後でピオグリタゾンの血管への影響を比較した。

### d) ピオグリタゾンの網膜血管の反応における PPAR $\gamma$ の関与

PPAR $\gamma$  の antagonist である GW9662 を前投与し、GW9662 投与前後でピオグリタゾンの血管への影響を比較した。

### e) ピオグリタゾンの網膜血管の反応における K channel の関与

非選択的 K channel の blocker である TEA と血管拡張に関わる種々の K channel の blocker をそれぞれ前投薬し、ピオグリタゾンの血管への作用を比較した。

## 5. 統計学的処理

2 群間の比較には、Mann-Whitney U-test を、同一群の解析では、two way ANOVA 後 Bonferromi multiple-range test を行った。危険率 5%未満を統計学的有意とした。

## 成 績

### 1. ピオグリタゾンの網膜細動脈への影響

ピオグリタゾンは網膜細動脈を濃度依存性に拡張させた。

### 2. 内皮剥離後のピオグリタゾンの網膜細動脈への影響

内皮剥離後、ピオグリタゾンの細動脈の血管拡張は部分的ではあるが、有意に抑制された。

### 3. 内皮依存性の拡張経路

ピオグリタゾンの血管拡張は NOS 阻害薬である L-NAME により有意に抑制された。一方、他の内皮由来血管拡張因子の blocker は、ピオグリタゾンの血管拡張を抑制しなかった。さらに、ピオグリタゾン投与による NO<sub>x</sub> 値はコントロール群に比べ有意に増加していた。Wortmannin 投与と compound

C 投与によりピオグリタゾンの血管拡張は、L-NAMEと同程度に抑制された。

#### 4. 平滑筋のグアニル酸シクラーゼの関与

ピオグリタゾンの血管拡張は ODQ にて L-NAME と同程度に抑制された。

#### 5. 内皮非依存性の拡張経路

TEA にてピオグリタゾンの血管拡張が有意に抑制され、また、膜電位依存性 K ( $K_v$ ) channel の blocker である 4-AP にて TEA と同等の抑制効果がみられた。

他の K channel の blocker ではピオグリタゾンの血管拡張は抑制されなかった。さらに、4-AP と L-NAME の同時投与でピオグリタゾンの血管拡張が消失した。

#### 6. PPAR $\gamma$ のピオグリタゾンの血管拡張における影響

PPAR $\gamma$  の antagonist である GW9662 により L-NAME と同程度にピオグリタゾンの血管拡張が抑制された。さらに、TEA を GW9662 と同時投与することで、ピオグリタゾンの血管拡張は消失した。

### 考 案

本研究により、ピオグリタゾンは濃度依存性に網膜細動脈を拡張させることが判明した。このピオグリタゾンの網膜細動脈の拡張効果は、内皮剥離により部分的に抑制され、内皮依存性と内皮非依存性の血管拡張経路の存在が示唆された。NOS 阻害薬である L-NAME の投与で内皮剥離後の血管と同程度にピオグリタゾンの血管拡張が抑制され、さらにピオグリタゾン投与によりチャンパー内の NO $_x$  値が増加したことから、内皮依存性の血管拡張経路には、内皮から産生された NO の関与が推測された。また、PI3kinase/Akt と AMPK を抑制することでピオグリタゾンの血管拡張は L-NAME を投与された血管と同程度の抑制効果がみられることから、ピオグリタゾンの NO による内皮依存性の血管拡張には、PI3kinase/Akt と AMPK 両者とも関与していると考えられた。ODQ により L-NAME と同程度にピオグリタゾンの血管拡張が抑制されることから、NO/cGMP の経路の関与が推測された。さらに PPAR $\gamma$  を阻害することにより内皮剥離と L-NAME による血管拡張の抑制と同程度に抑制されることから、ピオグリタゾンは PPAR $\gamma$  を介し、内皮から NO を産生させることで網膜細動脈を拡張させることが示唆された。一方、非選択的 K channel の blocker である TEA と  $K_v$  channel の blocker である 4-AP によりピオグリタゾンの網膜血管拡張が同程度に抑制され、さらに 4-AP と L-NAME の同時投与により血管拡張が消失したことから、内皮非依存性の血管拡張経路には、平滑筋の  $K_v$  channel の関与が推測された。

我々はこれまでに脂質異常症治療薬であるシンバスタチンが、主に内皮依存性に網膜細動脈を拡張させる<sup>3)</sup>ことを明らかにした。糖尿病状態による血管障害は、まず血管内皮から起こると考えられており、シンバスタチンは血管内皮のみが障害された早期の病態において有効性が期待されるのに対して、このピオグリタゾンの作用は、血管内皮依存性と非依存性両方の経路に関与することから、平滑筋まで障害が及ぶ進行した病態においても網膜循環改善効果が期待できる。

我々は2型糖尿病患者の臨床研究において、発症前・早期の網膜症患者で網膜血流が低下していることを報告しており、本研究で示した網膜血管拡張作用を有するピオグリタゾン投与により、網膜血流

が改善すると網膜症の発症進展が抑制できる可能性が出てくる。今後、臨床試験を行い、その可能性を検討したい。

#### 結 論

1. ピオグリタゾン濃度は濃度依存性に網膜細動脈を拡張させる。その血管拡張には、内皮依存性と内皮非依存性の両方の経路が存在する。
2. 内皮依存性の血管拡張経路は、PPAR $\gamma$ を活性化し、PI3kinase/AktとAMPKを介し、最終的に網膜血管内皮からNOを産生し、平滑筋のcGMPを上昇させることにより引き起こされると推測された。
3. 内皮非依存性の血管拡張経路には、平滑筋のKv channelが関与している。
4. ピオグリタゾンによる網膜血管拡張が、網膜血流を改善させ、糖尿病網膜症発症・進展を抑制できる可能性が示唆された。

#### 引 用 文 献

1. Nagaoka T, Sato E, Takahashi A, Yokota H, Sogawa K, Yoshida A. Impaired Retinal Circulation in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus: Retinal Laser Doppler Velocimetry Study. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010;51:6729-34.
2. Shen LQ, Child A, Weber GM, Folkman J, Aiello LP. Rosiglitazone and delayed onset of proliferative diabetic retinopathy. *Arch Ophthalmol* 2008;126:793-799.
3. Nagaoka T, Hein TW, Yoshida A, Kuo L. Simvastatin elicits dilation of isolated porcine retinal arterioles: role of nitric oxide and mevalonate-rho kinase pathways. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007;48:825-832.

#### 参 考 論 文

1. 大前恒明、高橋淳士、長岡泰司、石子智士、佐藤栄一、吉田晃敏『網膜動脈循環動態変化を測定した網膜動脈分枝閉塞症の1例』日本眼科学会雑誌. 2009;113(8):800-807.

# 学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第 号											
学位の種類	博士(医学)	氏名	大前 恒明									
<table border="1"><tr><td>審査委員長</td><td>高井 章</td><td>印</td></tr><tr><td>審査委員</td><td>柏柳 誠</td><td>印</td></tr><tr><td>審査委員</td><td>廣川 博之</td><td>印</td></tr></table>				審査委員長	高井 章	印	審査委員	柏柳 誠	印	審査委員	廣川 博之	印
審査委員長	高井 章	印										
審査委員	柏柳 誠	印										
審査委員	廣川 博之	印										
学位論文題目												
Pioglitazone, a peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$ agonist, induces dilation of isolated retinal arterioles												
「ピオグリタゾンとは網脈細動脈を拡張させる」												
<p>【目的】 インスリン抵抗性改善薬として使われている thiazolidine 誘導体は、peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)-<math>\gamma</math> の agonist として、抗炎症作用、抗動脈硬化作用などの有用な薬理作用を示すことが知られており、臨床的にも心血管保護効果を有することが注目されている。最近、眼科領域でも、増殖糖尿病網膜症の発症を抑制するという報告がなされ、新しい網膜症治療薬としての可能性が注目されている。しかし thiazolidine 誘導体の網膜血管への作用については調べられていない。そこで本研究では、このタイプの薬剤の一種である pioglitazonene の、網脈細動脈収縮への影響とその作用機序を、ブタからの摘出標本を用いて検討した。</p> <p>【方法】 屠殺場で得られた両性ブタ(16-24 週齢)の新鮮眼球から摘出した網脈細動脈標本の両断端に細いカニューレを挿入、一端から生理的範囲の一定圧(55 cm-H<sub>2</sub>O; 40 mmHg に相当)を加えた状態での血管径変化を顕微ビデオカメラを用いて記録した。</p> <p>各種薬剤は血管外を灌流する生理的食塩水(PSS; NaCl, 145 mM; KCl, 4.7 mM; CaCl<sub>2</sub>, 2.0 mM; MgSO<sub>4</sub>, 1.2 mM; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.2 mM; glucose, 5.0 mM; pyruvate, 2.0 mM; EDTA, 0.02 mM; MOPS, 3.0 mM &amp; 1% (w/v) albumin)の中に投与した。薬剤投与時の血管内径の変化は、PSS で平衡化した状態と灌流液中の Ca<sup>2+</sup> を除去して弛緩させた状態との差を基準(100%)として normalize した。</p> <p style="text-align: right;">(次ページに続く)</p>												

主な結果は、次の三点に要約できる。

1. 内皮を温存したブタ細動脈標本において、pioglitazone (10 nM – 10 μM)は濃度依存性に拡張を起した。10 μM 投与時の拡張度は、Ca<sup>2+</sup>除去による拡張の 50 %であった。
2. この pioglitazone の血管拡張作用が見られる条件で灌流槽中の NO を測定すると有意にその上昇を認めた。pioglitazone の血管拡張作用は、L-NAME (NO 合成阻害剤; 10 μM)、wortmannin (PIP<sub>3</sub> kinase 阻害剤; 0.1 μM)、compound C (AMP-activated kinase [AMPK]阻害剤; 10 μM)、1H-1,2,4-oxadiazolo[4,3]quinoxalin-1-one (ODQ; guanylyl cyclase 阻害剤; 0.1 μM)、または GW9662 (PPAR<sub>γ</sub>阻害剤; 10 μM)のいずれによっても約 50 %抑制された。これらの薬剤と同時に K<sup>+</sup>チャンネル阻害剤の一つ TEA (10 mM)を加えると、pioglitazone の血管拡張作用の残りの 50%もほぼ完全に消失した。
3. pioglitazone は、界面活性剤処理により内皮を破壊した網膜細動脈標本でも、有意な細動脈拡張作用を発揮した。この作用は、GW9662 (10 μM)または TEA (10 mM)によって完全に消失した。

これらの結果は、pioglitazone 細動脈拡張作用の約 50%は、(おそらくは核内にあるものではなく細胞質に存在するタイプの)PPAR<sub>γ</sub>の活性化に始まり、PIP<sub>3</sub>-kinase/Akt および AMPK を介して、内皮細胞からの NO を産生を促し、最終的に平滑筋内の cGMP を上昇させることにより、血管を拡張させる、という経路を示唆する。一方、残りの 50%は、pioglitazone による血管平滑筋細胞内の PPAR<sub>γ</sub>の活性化が、何らかの経路を介して膜電位依存性 K<sup>+</sup>チャンネルの開口を促し、膜の過分極を起すことによっていることをうかがわせる。

このように、本論文は、pioglitazone が網膜細動脈拡張作用をもつことを初めて証明したのみならず、そのメカニズムをかなりのところまで解明したものと見える。

血管平滑筋細胞における電気生理学的実験などが行われていれば、なお説得力のある論文になったかと思われるが、学位論文としては十分の内容であると評価できる。

論文提出者は、3名の審査員による個別の口頭試問において、本論文の内容とその重要性について明確に説明し、また、関連領域についての試問でも適切な回答を与えた。それにより、当人がこの領域において十分な知識と経験を有することを確認できた。

以上より、本審査委員会は、本論文が学位授与に値するものと判定した。