

学位論文の要旨

学位の種類	博士	氏名	棚野 一郎
<p>学位論文題目</p> <p>Cilostazol, a phosphodiesterase 3 inhibitor, elicits dilation of porcine retinal arterioles via a cAMP/protein kinase A and AMP-activated protein kinase dependent mechanism</p> <p>(シロスタゾールは網膜細動脈を拡張させる)</p> <p>共著者名</p> <p>長岡 泰司、石羽澤 明弘、大前 恒明、神谷 隆行、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きたが、現在でも、網膜症の発症・進展を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¹⁾、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を示唆した。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で、網膜症の発症進展を抑制できる可能性が示唆された。シロスタゾールはホスホジエステラーゼ3 (PDE3) の選択的阻害薬であり、細胞内の cAMP 濃度を増加させ、血小板機能抑制や末梢血管拡張作用を持ち、末梢閉塞性動脈疾患 (PAD) の虚血症状の改善や脳梗塞の予防のための抗血小板薬として使用されている²⁾。近年、基礎実験において各種動物実験でシロスタゾールの大血管の血管拡張作用や血管保護作用が報告されており、全身的な血管障害に対する改善効果が注目されている。眼科領域においても動物 vivo 実験においてシロスタゾールによる眼血流量増加や網膜血管拡張作用が報告されており、眼疾患への応用も期待されている。しかしながらその詳細な拡張メカニズムについては不明な部分が多い。</p> <p>本研究では、摘出血管を用いてシロスタゾールの網膜細動脈への影響とその作用機序を検討した。</p>			

材料・方法

1. 実験動物

実験には豚(週齢 16~24 週、体重 10-15kg)の眼球を用いた。

2. 実験方法

豚を屠殺後、速やかに豚眼球を摘出し、網膜組織から細動脈を剥離・摘出した。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。

3. シロスタゾールの網膜血管への影響

a) シロスタゾールの網膜細動脈への影響

シロスタゾール(10 nM~10 μ M)を投与し、網膜血管の濃度依存性の反応を評価した。

b) シロスタゾールの網膜細動脈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、シロスタゾールの血管に対する反応を比較した。

c) シロスタゾールの網膜細動脈の反応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、シロスタゾールの血管に対する反応を比較した。

d) シロスタゾールの網膜細動脈への反応における eNOS リン酸化経路の関与

NO 合成酵素(NOS)の活性化に重要であるサイクリック AMP (cAMP)/プロテインキナーゼ A (PKA) と AMP キナーゼ (AMPK)、それぞれの抑制薬である Rp-8-Br-cAMPS と compound C を使用し、シロスタゾールの血管に対する反応を比較した。また、cAMP/PKA、AMPK の網膜血管への直接の影響を調べるため、それぞれの活性薬である forskolin と AICAR を投与し血管の反応を評価した。

e) シロスタゾールの網膜細動脈の反応における 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、シロスタゾールの血管への作用を比較した。

4. 培養細胞を用いた eNOS および AMPK のリン酸化の評価

ヒト網膜微小血管内皮細胞 (HRMECs) を用いて、シロスタゾールによる eNOS と AMPK、それぞれのリン酸化の活性化をウェスタンブロット解析した。

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 Bonferroni 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. シロスタゾールの網膜細動脈への影響

シロスタゾールは網膜細動脈を濃度依存性に最大で約 40%拡張させた。

2. シロスタゾールによる拡張作用における血管内皮細胞の関与

内皮剥離後、シロスタゾールの網膜血管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の検討

シロスタゾールの血管拡張は 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、シロスタゾールの血管拡張を抑制しなかった。

4. 平滑筋のグアニル酸シクラーゼの関与

シロスタゾールの血管拡張は ODQ にて L-NAME と同程度に抑制された。

5. 網膜血管における eNOS リン酸化経路の関与

Rp-8-Br-cAMPS 投与によりシロスタゾールの血管拡張は、L-NAME と同程度に抑制された。また cAMP/PKA の活性化薬である forskolin は網膜血管を拡張した。一方、Compound C 投与によりシロスタゾールの血管拡張は一部抑制された。Compound C と Rp-8-Br-cAMPS、L-NAME の同時投与によりシロスタゾールの拡張作用はさらに抑制された。また、AMPK 活性化剤の AICAR は網膜血管を拡張した。

7. 内皮非依存性の拡張経路の検討

TEA にてシロスタゾールの血管拡張が有意に抑制され、また、大コンダクタンスカルシウム依存性 K (BK) channel の blocker である iberiotoxin にて TEA と同等の抑制効果がみられた。他の K channel の blocker ではシロスタゾールの血管拡張は抑制されなかった。さらに、TEA と L-NAME の同時投与でシロスタゾールの血管拡張はさらに抑制された。

8. シロスタゾールの HRMECs における影響

シロスタゾールは HRMECs において eNOS と AMPK のリン酸化を有意に活性化した。また、compound C により AMPK のリン酸化は有意に抑制された。

考 案

本研究により、シロスタゾール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たことから、内皮依存性と非依存性の血管拡張

経路の存在が示唆された。L-NAME の投与で内皮剥離後の血管と同程度にシロスタゾールの血管拡張が抑制されたことから、内皮由来の NO の関与が推測された。ODQ により L-NAME と同程度に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。cAMP/PKA を抑制することでシロスタゾールの血管拡張は L-NAME を投与された血管と同程度の抑制効果がみられたことから、シロスタゾールの NO による内皮依存性の血管拡張には、cAMP/PKA が関与していると考えられた。また AMPK の抑制によりシロスタゾールの拡張作用が一部抑制されたことから、その部分的な関与も推測された。一方、内皮非依存性経路としては非選択的 K channel の blocker である TEA と BK channel の blocker である iberiotoxin によりシロスタゾールの網膜血管拡張が同程度に抑制されたことから、平滑筋における BK channel の関与が推測された。また、HRMECs を用い、シロスタゾールは内皮細胞において eNOS や AMPK のリン酸化を活性化することを確認した。

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、血管内皮障害の発症や進展の予防が糖尿病血管合併症の治療戦略に重要である。今回我々はシロスタゾールが cAMP/PKA を介し、内皮より NO を産生し血管を拡張させることを明らかにした。また一部分ではあるが AMPK を活性化することを明らかにし、今後、AMPK をターゲットとした糖尿病網膜症の治療戦略にも役立つ可能性が示唆された。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シロスタゾール投与により、網膜血流を改善させ網膜症の発症進展が抑制できる可能性が示唆された。










結 論

1. シロスタゾールは濃度依存性に豚の網膜細動脈を拡張させ、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、cAMP/PKA と一部 AMPK を介して eNOS をリン酸化させ、最終的に網膜血管内皮から NO を産生し、平滑筋の cGMP を上昇させて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 BK channel の関与が明らかとなった。
4. シロスタゾール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・進展を抑制できるか、今後の検討に繋げたい。

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. Kambayashi J, Liu Y, Sun B, Shakur Y, Yoshitake M, Czerwiec F. Cilostazol as a unique antithrombotic agent. *Curr Pharm Des.* 2003;9:2289-302.

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	棚野 一郎												
<table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 40%; border-bottom: 1px solid black;">審査委員長</td> <td style="width: 30%; border-bottom: 1px solid black;">高井 章</td> <td style="width: 10%; text-align: center; border-bottom: 1px solid black;"></td> <td style="width: 10%;"></td> </tr> <tr> <td style="border-bottom: 1px solid black;">審査委員</td> <td style="border-bottom: 1px solid black;">柏柳 誠</td> <td style="text-align: center; border-bottom: 1px solid black;"></td> <td></td> </tr> <tr> <td style="border-bottom: 1px solid black;">審査委員</td> <td style="border-bottom: 1px solid black;">廣川 博之</td> <td style="text-align: center; border-bottom: 1px solid black;"></td> <td></td> </tr> </table>				審査委員長	高井 章			審査委員	柏柳 誠			審査委員	廣川 博之		
審査委員長	高井 章														
審査委員	柏柳 誠														
審査委員	廣川 博之														
<p style="margin: 0;">学 位 論 文 題 目</p> <p style="margin: 0;">Cilostazol, a phosphodiesterase 3 inhibitor, elicits dilation of porcine retinal arteriole via a cAMP/protein kinase A and AMP-activated protein kinase dependent mechanism</p> <p style="margin: 0;">「シロスタゾールは cAMP/プロテインキナーゼ A および AMP 活性化プロテインキナーゼに依存した機構を介してブタ網膜細動脈を拡張させる」</p>															
<p>【目的】ホスホジエステラーゼ 3 の選択的阻害剤の一つであるシロスタゾールは、血小板機能抑制や末梢血管拡張作用を持ち、末梢閉塞性動脈疾患や虚血症状の改善や脳梗塞の予防などの目的で使われている。眼科領域でも、動物 vivo 実験において眼血流量増加や網膜血管拡張を起こすことが知られており、眼疾患への応用も期待されているが、その詳細なメカニズムは不明である。この研究では、ブタ網膜から摘出した細動脈標本において等張力的収縮の画像的観察を行い、シロスタゾールと、信号伝達分子の活性化剤、阻害剤の効果を検討した。</p> <p>【方法】屠殺場で入手したブタ(週齢 16-24, 体重 10-15 kg)の新鮮眼球から摘出した細動脈を用いた。正常液(36-37°C)で満たした標本槽(バス)内に両端を結紮固定した血管の内腔に約 40 mmHg の一定圧を加えた状態での直径の変化を画像的に記録した。</p> <ul style="list-style-type: none"> ● シロスタゾールをはじめ、各種薬剤はバス液に投与した。 ● 血管径の増加は、Ca 除去液(+1 mM EDTA)中での最大拡張を基準とするパーセンテージで表した。 															

【主な結果】

1. 健常な内皮を持つ標本で、シロスタゾール(0.01-10 μM) は濃度依存性に網膜細動脈拡張作用を示した。最大弛緩レベルは Ca^{2+} 除去による弛緩効果の 40%であった。PKA 活性化剤 forskolin (0.1 μM)も同等の弛緩作用を示した。シロスタゾールの作用は、血管内皮を界面活性剤(CHAPS)処理により破壊した標本では、2/3 減弱した。10 μM シロスタゾールの弛緩効果は、NOS 阻害剤 L-NAME (10 μM)、グアニル酸シクラーゼ阻害剤 ODQ (0.1 μM) またはプロテインキナーゼ A(PKA) 阻害剤 Rp-8-Br-cAMPS (10 mM)により、内皮破壊によるのと同程度に抑制された。なお、これらの阻害剤は、PKA 活性化剤 forskolin (0.1 μM)の弛緩作用も同様に抑制した。
2. Sodium nitroprusside (SNP; 0.1 – 100 μM)も、濃度依存性に網膜細動脈拡張作用を示した。その最高濃度域での弛緩は Ca^{2+} 除去による弛緩の 88%に達した。SNP の弛緩効果は、内膜除去、L-NAME、Rp-8-Br-cAMPS、Compound C、TEA により影響されなかった。
3. シロスタゾール(10 μM)の弛緩効果は、AMP 活性化プロテインキナーゼ(AMPK)の阻害剤 Compound C (10 μM)によっても部分的に(上記 L-NAME などの作用の 2/3)に抑制された。AMPK 活性化剤 AICAR (3 mM)は、10 μM シロスタゾールによる弛緩の 70%程度の弛緩を起こした。この効果は、L-NAME (10 μM)および Compound C (10 μM)の投与により消失した。
4. 10 μM シロスタゾールの弛緩効果は、K チャネルの非特異的阻害剤 TEA (10 mM)、BK 型 K チャネルの阻害剤 iberiotoxin (0.1 μM)によって、50%抑制されたが、ATP 感受性 K チャネルの阻害剤 glybenclamide (5 μM)には影響されなかった。
5. ヒト網膜微小血管内皮細胞の初代培養系で、シロスタゾール (10 μM)は、eNOS の Ser-1177 および AMPK の Thr-172 のリン酸化を増加させた。後者のリン酸化上昇は、Compound C (10 μM)の存在下では見られなかった。

【評価】

この研究は、(1)シロスタゾールが網膜細動脈に弛緩効果を示すことを摘出標本で初めて定量的に検討した点、(2)その弛緩効果の多くの部分が cAMP/PKA を介する内皮での NO 発生によることを明確に示した点、そして(3)NO の産生促進には AMPK を介する経路も一部関与することを示唆するデータを示した点、さらに(4)細動脈平滑筋細胞膜の BK チャネルの開口が弛緩作用の一部に関与していることを示した点、などにおいて評価できる。

AMPK 活性化メカニズムについてのさらに踏み込んだ検討が行われていればさらに申分なかったと思われるが、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。