

# 学位論文の要旨

|  |    |    |       |
|--|----|----|-------|
| 学位の種類  | 博士 | 氏名 | 神谷 隆行 |
| <p>学位論文題目</p> <p><b>Role of Ca<sup>2+</sup>-Dependent and Ca<sup>2+</sup>-Sensitive Mechanisms in Sphingosine 1-Phosphate-Induced Constriction of Isolated Porcine Retinal Arterioles in Vitro</b></p> <p>(スフィンゴシン 1リン酸による網膜細動脈収縮における<br/>Ca<sup>2+</sup>依存性および Ca<sup>2+</sup>非依存性メカニズムの役割)</p> <p>共著者名</p> <p>長岡泰司、大前恒明、善岡尊文、大野晋治、棚野一郎、吉田晃敏</p> <p>Experimental Eye Research<br/>平成26年 掲載予定</p> <p>研究目的</p> <p>糖尿病網膜症は糖尿病細小血管合併症の1つで、成人失明の主な原因であり、その治療法の確立が急務とされている。最近我々は2型糖尿病患者の眼循環の臨床研究を行い、網膜症発症前・発症早期に網膜血流が低下している<sup>1)</sup>ことを明らかにし、網膜循環障害が網膜症の病態に深く関わっている可能性を示した。このことから、網膜症発症前・発症早期の病態をより深く理解することが網膜症の更なる治療につながる事が考えられる。生体内において脂質は、エネルギー源や細胞膜の主要な構成成分として重要な役割を担っており、その脂質の1つであるスフィンゴシン 1-リン酸(S1P)は生体内反応調節に関わる多彩な機能をもつ生理活性物質であり、S1Pの生理活性作用の1つである血管緊張の調節に関しては、拡張作用または収縮作用を示すなど臓器特異性がある<sup>2)</sup>ことが知られている。さらに糖尿病患者においてS1Pの前駆体であるスフィンゴシンの血中濃度が上昇している<sup>3)</sup>という報告もあり、網膜血管に対しS1Pが収縮作用を示すのであれば、糖尿病患者における網膜血流低下に血中S1P濃度上昇が関与する可能性が示唆される。しかしながら、S1Pの網膜循環への作用は未解明である。そこで本研究では、S1P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 15-25kg) を用いた。

### 2. 実験方法

屠殺後眼球を摘出し、網膜組織から網膜細動脈(血管径 70-100 $\mu$ m)を摘出した。内腔に生理的な圧をかけ血管最大径の 40~60%程度の基礎緊張を確認し、薬剤投与後の血管径の変化を測定した。

薬剤投与後、基礎緊張(薬剤投与前)からの血管径の変化を基礎緊張時の血管径で除したものを収縮率として算出し、網膜血管反応性の評価に用いた。

### 3. S1P の網膜血管への影響

#### a) S1P の網膜細動脈への影響

S1P (1nM~10 $\mu$ M)を投与し、網膜血管の濃度依存性の反応性を評価した。

#### b) S1P の網膜血管への反応における受容体の関与

S1P 受容体(S1PR)の antagonist である、compound 5 (S1PR1 antagonist)、JTE-013 (S1PR2 antagonist)、suramin (S1PR3 antagonist)を S1P 投与前に前投与し、antagonist 投与前後で S1P の網膜血管への影響を比較した。

#### c) S1P の網膜血管への反応における血管内皮の関与

内皮剥離前後で S1P の反応を比較した。

#### d) S1P の網膜血管の反応性における Ca<sup>2+</sup>非依存性経路の関与

Ca<sup>2+</sup>非依存性経路の血管収縮で重要とされる Rho kinase (ROCK)と Protein kinase C (PKC) のそれぞれの阻害剤 H-1152 と Gö-6983 を前投与し、S1P の網膜血管への影響をそれぞれの薬剤投与前後で比較した。

#### e) S1P の網膜血管の反応における Phospholipase C (PLC)の関与

PKC の活性や細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度の調節に働くと考えられる PLC の阻害剤 U73122 を前投与し、S1P の血管への影響を薬剤投与前後で比較した。

#### f) S1P の網膜血管の反応における Ca<sup>2+</sup> channel の関与

Ca<sup>2+</sup>依存性経路の血管収縮で重要とされる L-type voltage-operated calcium channels (L-VOCCs)の阻害剤である nifedipine を前投与し、S1P の血管への影響を薬剤投与前後で比較した。

#### g) S1P の網膜血管の反応における Myosin Light Chain Kinase (MLCK)の関与

平滑筋収縮に重要な役割を果たす MLCK の阻害剤である ML-9 を S1P 投与前に前投与し、S1P の血管への反応を比較した。

#### h) S1PR の網膜血管における局在

網膜摘出血管を用い凍結切片標本を作成し、これに対し S1PR2 抗体にて免疫染色を行い S1PR2 の網膜血管における局在を検討した。

### 4. 統計学的処理

薬物(阻害剤)投与群における対照群との比較には、二元配置分散分析 (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. S1P の網膜細動脈への影響

S1P は濃度依存性(1nM~10 $\mu$ M)に網膜細動脈を収縮させた。

#### 2. S1P の網膜血管への反応における受容体の関与

S1PR のうち S1PR1、S1PR3 の antagonist では S1P の血管収縮は抑制されなかったが、S1PR2 の antagonist により血管収縮が抑制された。

### 3. 内皮剥離後の S1P の網膜細動脈への影響

内皮剥離後、S1P の血管収縮は抑制されなかった。

### 4. S1P の $Ca^{2+}$ 非依存性血管収縮経路

S1P の血管収縮は H-1152、Gö-6983 により有意に抑制された。一方、H-1152 と Gö-6983 同時投与群における S1P の血管収縮は、H-1152 単独投与群と同程度に抑制された。

### 5. S1P の網膜血管収縮における PLC の関与

S1P の網膜血管収縮は U73122 により部分的ではあるが有意に抑制された。

### 6. S1P の $Ca^{2+}$ 依存性血管収縮経路

#### a) L-VOCCs の関与

S1P の血管収縮は nifedipine にて部分的に抑制された。nifedipine と U73122 を同時投与すると、血管収縮は消失した。

#### b) MLCK の関与

ML-9 にて S1P の血管収縮が部分的ではあるが有意に抑制された。さらに、ML-9 と H-1152 または Gö-6983 を同時投与することで、S1P の血管収縮は消失した。

### 7. S1PR2 の網膜血管における局在

豚網膜摘出血管において血管内皮、血管平滑筋両方に S1PR2 の発現を認めた。

## 考 案

本研究において、S1P は濃度依存性に網膜細動脈を収縮させることが判明した。S1P は、大動脈においては拡張作用を示すこと、頸動脈や大腿動脈に対しては明らかな変化を認めないこと、腎動脈や脳底動脈では収縮作用を示すなど臓器特異性が報告されている。本研究の結果を含めると、S1P は網膜血管を含む微小循環にも影響を及ぼすことが示唆された。また、S1P の網膜細動脈の収縮効果は S1PR antagonist のうち S1PR2 antagonist JTE-013 でのみ抑制されたことから、S1P の網膜血管の収縮効果は S1PR2 を介していると考えられた。さらに、免疫染色により S1PR2 は網膜血管において血管内皮と血管平滑筋の両方に局在していることが示されたが、S1P の網膜細動脈の収縮作用には内皮剥離は影響を与えなかったことから、S1P は網膜血管の平滑筋に存在する S1PR2 を介して網膜細動脈を収縮させると考えられる。また、ROCK や PKC のそれぞれの阻害剤 H-1152 および Gö-6983 により S1P の血管収縮が抑制されたことから、S1P による網膜細動脈の収縮作用には ROCK や PKC といった  $Ca^{2+}$ 非依存性経路が関与していることが示唆された。一方、 $Ca^{2+}$  channel の一つである L-VOCCs の blocker である nifedipine、PKC の活性や細胞内  $Ca^{2+}$ 濃度調節に働くとされる PLC の阻害薬である U73122 により S1P の網膜血管収縮が抑制された。さらに nifedipine と U73122 の同時投与にて血管収縮が消失したことから、L-VOCCs と PLC が S1P の網膜細動脈の収縮において重要な役割を果たしていると考えられる。また、MLCK の阻害剤 ML-9 により S1P の網膜血管収縮が部分的に抑制され、ML-9 と H-1152 または Gö-6983 の同時投与によりほとんどすべての血管収縮が抑制された。これらの結果から、ROCK や PKC といった  $Ca^{2+}$ 非依存性経路と、L-VOCCs や MLCK などの  $Ca^{2+}$ 依存性経路の両者が、S1P の網膜細動脈の収縮に関与していることが考えられる。

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いるが、本研究により判明した S1P による網膜血管の収縮が、網膜血流の低下を引き起こし、網膜症

発症の一因を担っている可能性がある。従って、本研究で示した S1P による網膜細動脈の収縮作用やその収縮のメカニズムの解明が網膜症の新しい治療につながる可能性がある。今後、臨床試験を行い、S1P を標的とした新規診断法や新規治療法の開発の可能性について、さらなる検討を行いたい。

## 結 論

1. S1P は濃度依存性に網膜細動脈を収縮させる。その血管収縮は血管平滑筋に存在する S1PR2 を介して生じる。
2. S1P は、Ca<sup>2+</sup>非依存性経路と Ca<sup>2+</sup>依存性経路の両者を介して網膜細動脈を収縮させる。
3. Ca<sup>2+</sup>非依存性の経路には、ROCK と PKC が関与している。
4. Ca<sup>2+</sup>依存性の経路には、L-VOCCs が関与している。
5. S1P による網膜血管収縮が、網膜血流を低下させ、糖尿病網膜症の病態に関与している可能性がある。

## 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.
2. Dantas A. P, Igarashi J, Michel T. Sphingosine 1-phosphate and control of vascular tone. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003.
3. Gorska M, Dobrzyn A, Baranowski M. Concentrations of sphingosine and sphinganine in plasma of patients with type 2 diabetes. *Med Sci Monit* 2005.

## 参 考 論 文

1. Omae T, Nagaoka T, Tanano I, Kamiya T, Yoshida A. Fenofibrate, an anti-dyslipidemia drug, elicits the dilation of isolated porcine retinal arterioles: role of nitric oxide and AMP-activated protein kinase. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2012.
2. Tanano I, Nagaoka T, Omae T, Ishibazawa A, Kamiya T, Ono S, Yoshida A. Dilation of Porcine Retinal Arterioles to Cilostazol: Roles of eNOS Phosphorylation via cAMP/Protein Kinase A and AMP-Activated Protein Kinase and Potassium Channels. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2013

(最終項)

## 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 | 神谷 隆行 |       |      |   |  |      |      |   |  |      |       |   |  |
| <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%; border-bottom: 1px solid black; text-align: center;">印</td> <td style="width: 20%;"></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="border-bottom: 1px solid black; text-align: center;">印</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="border-bottom: 1px solid black; text-align: center;">印</td> <td></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  |       |       |      |   |  |      |      |   |  |      |       |   |  |
| <p style="margin: 0;">学 位 論 文 題 目</p> <p style="margin: 0;">Role of Ca<sup>2+</sup>-dependent and Ca<sup>2+</sup>-sensitive mechanisms in sphingosine 1-phosphate induced constriction of isolated porcine retinal arterioles in vitro</p> <p style="margin: 0;">「スフィンゴシン1-リン酸による網膜細動脈収縮におけるCa<sup>2+</sup>依存性およびCa<sup>2+</sup>非依存性メカニズムの役割」</p> <p style="margin: 0;"><i>Experimental Eye Research</i> 掲載予定</p>  |        |    |       |       |      |   |  |      |      |   |  |      |       |   |  |
| <p>【背景・目的】</p> <p>Sphingosine 1-phosphate (S1P)の摘出ブタ網膜細動脈標本の収縮に対する影響とその作用機序を検討する。2型糖尿病でS1P前駆体である sphingosine の血中濃度が上昇しているという報告がある。糖尿病性網膜症の発症に S1P が関与する可能性を議論する。</p> <p>【方法】</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>● 屠殺場で入手した新鮮ブタ眼球から摘出した網膜血管を使用した。</li> <li>● 血管(長さ数 100 μm) の両端に微細なカニューレを挿入し、内腔に 55 mmH<sub>2</sub>O の静止水圧を負荷し内径が 45.2±1.5 μm となった状態を基準とし、刺激に伴う内径変化を顕微鏡ビデオカメラで記録した。</li> <li>● 刺激薬剤は、organ bath に累加的に添加し、血管壁の外側から作用させた。</li> </ul>  |        |    |       |       |      |   |  |      |      |   |  |      |       |   |  |

### 【主な結果】

1. S1P (0.1-10  $\mu\text{M}$ )は、濃度依存的に血管径の縮小を起こした。最高濃度域では基準径の30%の径減少を記録した。
2. S1Pの血管収縮作用は、2型S1P受容体(S1PR2)の阻害剤JTE-013 (1  $\mu\text{M}$ )の存在下で消失したが、1型受容体の阻害剤 compound 5 (1  $\mu\text{M}$ )または3型受容体阻害剤 suramin (100  $\mu\text{M}$ )には影響されなかった。
3. 免疫染色により、S1PR2 が、血管平滑筋ならびに内皮細胞に発現していることを確認した。
4. 血管内皮を界面活性剤 CHAPS で破壊しても、S1Pの血管収縮作用はほとんど変化しなかった。
5. S1P (0.1-10  $\mu\text{M}$ )の血管収縮作用は、Phospholipase C $\beta$  (PLC)阻害剤 U73122 (1  $\mu\text{M}$ )、protein kinase C (PKC)阻害剤 G $\delta$ -6983 (3  $\mu\text{M}$ )、Rhokinase (ROCK)阻害剤 H-1152 (3  $\mu\text{M}$ )、膜電依存性 L 型 Ca<sup>2+</sup>チャネル阻害剤 nifedipine、および myosin light chain kinase (MLCK)阻害剤 ML-9 (10  $\mu\text{M}$ ) がそれぞれ単独で存在する条件では、50-70%減弱した。
6. S1P (0.1-10  $\mu\text{M}$ )の血管収縮作用は、G $\delta$ -6983 と H-1152、G $\delta$ -6983 と ML-9、H-1152 と ML-9、または nifedipin と U73122 が同時に存在する条件では、ほぼ消失した。(各阻害剤濃度は5の単独投与の時と同じ。)
7. H-1152 と G $\delta$ -6983 は、それぞれを単独で投与した場合と、同時に投与した場合とで、S1Pによる血管収縮を抑制する度合に有意な違いを認めなかった。

### 【評価】

本論文は、摘出ブタ網膜細動脈において、S1P が、血管平滑筋に存在する S1PR2 を刺激し、PLC、PKC、Ca<sup>2+</sup>流入、ROCK などの信号伝達メカニズムを介して収縮作用を発現することを実験的に明らかにした。

糖尿病性網膜症の発症に関わる因子として sphingosine 誘導体が関与することが注目される中であって、臨床的にも注目される成果といえよう。

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。