

学 位 論 文 の 要 旨

学位の種類	博 士	氏 名	大野 晋治
<p>学 位 論 文 題 目</p> <p>Beraprost Sodium, a Stable Prostacyclin Analogue, Elicits Dilation of Porcine Retinal Arterioles: Roles of eNOS and Potassium Channels</p> <p>(ベラプロストナトリウムは網膜細動脈を拡張させる)</p> <p>共 著 者 名</p> <p>長岡 泰司, 大前 恒明, 棚野 一郎, 神谷 隆行, 大谷 真一, 吉田 晃敏</p> <p><i>Invest Ophthalmol Vis Sci.</i> 2014;55:5752-5759.</p> <p>研 究 目 的</p> <p>糖尿病網膜症は、我が国の中途失明原因の上位を占める重要な疾患で、その治療法の確立は急務である。我々は2型糖尿病患者において、網膜症の発症以前から血管内皮機能が障害されていることを報告¹⁾しており、血管内皮機能が網膜症の発症・進展に関わっている可能性がある。網膜血管内皮は血液網膜関門を形成するのみならず、一酸化窒素(NO)や内皮由来過分極因子(EDHF)などの内皮由来血管拡張因子(EDRF)を産生し、網膜血流を調整しているが、糖尿病患者ではEDRFの産生が減少していることが報告されている。従って、減少したEDRFの作用を補うことにより網膜循環を改善させ、網膜症の悪化を抑制できる可能性がある。</p> <p>プロスタサイクリンは血管内皮で産生されるEDRFの一種で、特異的受容体であるIP受容体に結合し、細胞内のcAMP濃度を上昇させ、血管拡張や血小板凝集抑制など様々な作用を有する。しかし、ラットの肺動脈や腸間膜動脈ではIP受容体以外のプロスタグランジン受容体にも結合し、血管を収縮させることが報告²⁾されており、その作用には臓器特異性があることが知られているが、プロスタサイクリンの網膜循環への作用とその詳細なメカニズムに関しては未解明である。</p> <p>本研究では、プロスタサイクリンアナログ製剤として肺動脈高血圧症や慢性動脈閉塞症の治療に使用されているベラプロストを用いて、プロスタサイクリンの網膜細動脈への作用と機序を検討した。</p>			

材 料 ・ 方 法

1. 実験動物

実験にはブタ(週齢 16-24 週、体重 25-35kg)の眼球を用いた。

2. 実験方法

ブタを屠殺後、速やかに眼球を摘出し、網膜から細動脈を剥離し、その両端をピペットに結紮した。摘出した血管に生理的な圧をかけ、基礎緊張を確認後、各種薬剤を血管外腔に投与し、血管径の変化をビデオカメラ付き顕微鏡で測定した。

基礎緊張の血管径を 0%、カルシウムフリー溶液で完全に弛緩した時の血管径を 100%とし、薬物投与後の血管径を基礎緊張からの変化率(%)で表し、網膜血管の反応性とした。

3. ベラプロストの網膜血管への影響

a) 網膜細動脈径への影響

ベラプロスト(0.1 pM-0.1 μM)を投与し、網膜血管の反応性を評価した。

b) プロスタグランジン受容体の関与

プロスタサイクリン受容体 (IP 受容体)、トロンボキサン受容体 (TP 受容体)、プロスタグランジン E₂ 受容体 (EP₁ 受容体、EP₃ 受容体) のそれぞれの阻害薬を前投与し、反応を比較した。

c) 血管内皮依存性経路の検討

血管内皮剥離モデルまたは EDRF (NO、cytochrome P450 代謝産物、EDHF) のそれぞれの阻害薬を使用し、反応を比較した。また、ベラプロスト投与後のチャンバー内溶液を採取し、NO の安定代謝物である NO_x の濃度を測定した。

d) グアニル酸シクラーゼの関与

NO に反応し cGMP の増加を介して血管拡張を促すグアニル酸シクラーゼの阻害薬 ODQ を前投薬し、反応を比較した。

e) eNOS 活性化経路の検討

NO 合成酵素 (NOS) の活性化に重要であるプロテインキナーゼ A (PKA) の阻害薬である Rp-8-Br-cAMPS を前投与し、反応を比較した。

f) 血管内皮非依存性経路の検討

内皮非依存性経路として重要な K channel の各種阻害剤を前投与し、反応を比較した。

4. 網膜細動脈における IP 受容体の局在

ブタ網膜細動脈の凍結切片標本を作成し、抗 IP 受容体抗体にて免疫染色を行い、IP 受容体の網膜細動脈における局在を検討した。

5. 統計学的処理

対照群と薬剤（阻害剤）投与群との比較には、二元配置分散分析（Two-way ANOVA）後、Bonferroni multiple-range test を行った。NO_x 濃度の比較には Mann-Whitney *U* test を行った。危険率 5%未満を統計学的有意とした。

成 績

1. ベラプロストの網膜細動脈径への影響

ベラプロストは網膜細動脈を濃度依存性に拡張させ、最高濃度である 0.1 μM において約 70% の血管拡張が得られた。

2. プロスタグランジン受容体の関与

IP 受容体の阻害剤である CAY10441 の前投与により、ベラプロストの血管拡張反応は完全に消失した。TP 受容体、EP₁受容体、EP₃受容体の阻害薬は影響を与えなかった。

3. 網膜細動脈における IP 受容体の局在

ブタ網膜細動脈において、血管内皮と平滑筋の両方に IP 受容体の発現が認められた。

4. 血管内皮依存性経路

血管内皮剥離により、ベラプロストの網膜血管拡張作用は部分的に抑制された。また、NOS 阻害薬である L-NAME は内皮剥離と同程度血管拡張を抑制した。さらに、ベラプロスト投与により、チャンバー内の NO_x 濃度は有意に上昇した。一方、他の EDRF の阻害薬はベラプロストの血管拡張を抑制しなかった。

5. グアニル酸シクラーゼの関与

ベラプロストによる血管拡張はグアニル酸シクラーゼ阻害薬である ODQ によって、L-NAME と同程度抑制された。

6. eNOS 活性化経路

PKA の阻害薬である Rp-8-Br-cAMPS はベラプロストの血管拡張を L-NAME と同程度抑制した。Rp-8-Br-cAMPS と L-NAME の同時投与では、さらなる抑制効果は得られなかった。

7. 血管内皮非依存性経路

非選択的 K channel 阻害薬である TEA はベラプロストによる血管拡張を有意に抑制し、その程度は ATP 依存性 K channel 阻害薬である Glibenclamide と同程度であった。

考 案

本研究により、ベラプロストは血管内皮と平滑筋の両方に存在する IP 受容体を介して網膜細動脈を拡張させることが明らかとなった。このベラプロストによる拡張作用は、血管内皮剥離により部分的に抑制されたことから、血管内皮依存性経路と内皮非依存性経路の存在が示唆された。血管内皮依存性経路としては eNOS 阻害薬である L-NAME とグアニル酸シクラーゼ阻害薬である ODQ により、内皮剥離と同程度ベラプロストの血管拡張が抑制されたことから、NO/cGMP 経路が関与していると推測された。また、PKA 阻害薬 Rp-8-Br-cAMPS の前投与により、ベラプロストによる血管拡張が L-NAME と同程度抑制され、Rp-8-Br-cAMPS と L-NAME の同時投与によりさらなる抑制効果が得られなかったことから、NO の産生経路として cAMP/PKA 経路が関与していると考えられた。これらの血管内皮におけるベラプロストの NO 産生作用は、チャンバー内溶液の NOx 濃度測定からも確認できた。一方、内皮非依存性経路としては非選択的 K channel 阻害薬である TEA と、ATP 依存性 K channel 阻害薬である Glibenclamide により、ベラプロストの網膜血管拡張が同程度抑制されたことから、平滑筋における ATP 依存性 K channel の関与が示唆された。

我々は 2 型糖尿病患者における臨床研究において、糖尿病発症早期から網膜血流量が低下していることを報告⁹⁾しているが、本研究で示したベラプロストは血管内皮機能障害によって減少するプロスタサイクリンのみならず NO の作用も補うことから、血管内皮機能および網膜血流に着目した糖尿病網膜症の新規治療薬となる可能性がある。今後、ベラプロストを用いた臨床研究を行い、糖尿病網膜症の発症・進展を抑制できるか、さらなる検討を行いたい。

結 論

1. ベラプロストは血管内皮と平滑筋両方の IP 受容体を介して、網膜細動脈を拡張させる。
2. 内皮依存性の血管拡張には cAMP/PKA 経路による NO の産生が関与している。
3. 内皮非依存性の血管拡張には ATP 依存性 K channel が関与している。
4. ベラプロストは糖尿病網膜症などの網膜血流障害を引き起こす疾患の網膜血流を改善させ、それらの疾患の治療に有用である可能性がある。




引用文献

1. Sogawa K, Nagaoka T, Tanano I, Tani T, Omae T, Nakabayashi S, Ishibazawa A, Takahashi A, Yoshida A. Association Between Diabetic Retinopathy and Flow-Mediated Vasodilation in Type 2 DM. *Curr Eye Res.* 2012;37:446-451
2. Xavier FE, Blanco-Rivero J, Ferrer M, Balfagón G. Endothelium modulates vasoconstrictor response to prostaglandin I₂ in rat mesenteric resistance arteries: interaction between EP₁ and TP receptors. *Br J Pharmacol.* 2009;158:1787-1795
3. 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.

参考文献

1. 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;54:1443-1449
2. Kamiya T, Nagaoka T, Omae T, Yoshioka T, Ono S, Tanano I, Yoshida A. Role of Ca²⁺-dependent and Ca²⁺-sensitive mechanisms in sphingosine 1-phosphate-induced constriction of isolated porcine retinal arterioles in vitro. *Exp Eye Res.* 2014;121:94-101

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	大野 晋治
<p>審査委員長 柏柳 誠 </p> <p>審査委員 廣川 博之 </p> <p>審査委員 船越 洋 </p>			
<p>学位論文題目</p> <p>Beraprost Sodium, a Stable Prostacyclin Analogue, Elicits Dilation of Porcine Retinal Arterioles: Roles of eNOS and Potassium Channels</p> <p>(ベラプロストナトリウムは網膜細動脈を拡張させる)</p>			
<p>糖尿病網膜症は、我が国の中途失明原因の上位を占めている。糖尿病患者では内皮由来血管拡張因子(EDRF)の産生が減少している。EDRF の一種であるプロスタサイクリンは血管内皮で産生され、血管拡張や血小板凝集抑制など様々な作用を有することが報告されている。しかしながら、プロスタサイクリンの網膜循環への作用とその詳細なメカニズムに関しては未解明であった。申請者は、プロスタサイクリンのアナログ製剤であるベラプロストを用いて、プロスタサイクリンの網膜細動脈への作用と機序を検討した。</p> <p>実験にはブタ網膜細動脈を用い、ビデオカメラ付き顕微鏡で血管径の変化を測定した。また、NO の変化を調べるために、NOx の濃度を測定した。さらに、抗 IP 受容体抗体を用いて免疫染色を行い、IP 受容体の網膜細動脈における局在を検討した。</p>			

ベラプロストは、網膜細動脈を濃度依存的に拡張させた。この血管拡張反応は、IP 受容体の阻害剤の CAY10441 により完全に消失した。また、ブタ網膜細動脈の血管内皮と平滑筋の両方に IP 受容体の発現が認められた。これらの結果は、ベラプロストは血管内皮と平滑筋に存在する IP 受容体を介して細動脈を拡張させる可能性を示唆した。また、血管内皮剥離により、ベラプロストの網膜血管拡張作用は部分的に抑制された。NOS 阻害薬の L-NAME とグアニル酸シクラーゼ阻害薬の ODQ はベラプロストによる血管拡張を抑制した。ベラプロストは NO_x 濃度を上昇させたことから、経内皮経路には、NO と cGMP が関与していることが示唆された。また、ATP 依存性 K channel 阻害薬の Glibenclamide により、ベラプロストの網膜血管拡張が部分的に抑制されたことから、平滑筋の ATP 依存性 K channel も関与することを明らかにした。本研究は、ベラプロストの網膜細動脈に対する作用を明らかにするとともに、ベラプロストが糖尿病網膜症などの網膜血流障害を引き起こす疾患の網膜血流を改善させ、それらの疾患の治療に有用である可能性を示した。論文内容と関連領域についての各審査委員による試問に対しても適切な回答が得られ、提出者はこの領域において十分な知識を有することが示された。以上の審査結果から、本審査委員会は、本論文が博士（医学）の学位に値するものであると判定した。