

論文の内容の要旨

論文題目：糖尿病状態での血管障害に対する内因性サイトカインの関与について

指導教官：永井 良三教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 14 年 4 月入学

内科学専攻

氏名：竹田 亮

背景および目的

糖尿病患者では非糖尿病患者と比べて冠動脈狭窄の頻度が高く、また病変も多岐に及んでいることが多い。さらに血管形成術後の再狭窄率も高いことが知られている。

糖尿病患者で血管障害が生じる機序としてはポリオール経路の活性化、酸化ストレスの亢進そしてプロテインキナーゼ C の活性化などが考えられているが、高血糖や高脂血症に由来する **advanced glycation endproducts (AGEs)** の産生亢進とその受容体である **RAGE** との相互作用も機序の 1 つと考えられている。これまでに糖尿病モデル動物の血管障害部位で **RAGE** やそのリガンドの発現が非糖尿病動物と比較して亢進していることや可溶型 (**soluble**)**RAGE** の投与によって糖尿病における血管障害や病的血管新生が軽減されることが報告されている。また糖尿病患者の大動脈内皮細胞には **RAGE** およびそれに引き続く **monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1)** の発現が亢進していることが報告されている。

しかしどのような機序で糖尿病状態での障害血管に **RAGE** が発現してくるかは不明であった。

一方、近年糖尿病の基盤にはインスリン抵抗性の存在が示唆されるようになり、そのインスリン抵抗性には内臓脂肪の関与が報告されている。内臓脂肪からは **tumor necrosis factor- α (TNF- α)**や **IL-6**をはじめとする多くのサイトカイン (アディポサイトカイン)の放出が増加しており、これまでに血圧上昇、食欲調節、糖代謝異常、動脈硬化そして病的血管新生などの多くの病態形成に関与していることが報告されてきた。一方でアディポネクチンのように抗動脈硬化作用や抗糖尿病作用を示すサイトカインも報告されてきた。しかしこれまでに内臓脂肪由来のサイトカインがどのように再狭窄に関与しているかの検討は十分ではない。

今回、機械的血管傷害による新生内膜形成に対する **TNF- α** をはじめとした内因性サイトカインの影響を内因性サイトカイン産生抑制薬である **Semapimod (Sem)**および 1 型 **TNF** 受容体の機能を遮断する作用を有するアデノウイルス (**AdTNFR Δ C**)を使用して検討した。また新生内膜形成に対する内因性サイトカインと **RAGE** の関連を検討する目的で **RAGE** を強制発現させるアデノウイルス (**AdRAGEwt**)と **AGEs** を捕捉する作用を有する可溶性 (soluble)**RAGE (AdsRAGE)**を発現させるアデノウイルスを作成して、新生内膜形成に対する効果を検討した。

方法

糖尿病モデル動物には **Obese Zucker rat (OZ)**を使用し、対照には **Lean Zucker rat (LZ)**を使用した。OZ 群には **Sem** を 12 週齢から 4 週間投与し (**OZ/Sem**)、コントロール群には等量の生理食塩水を投与した。3 群とも 14 週齢の時点で大腿動

脈に **Cuff** を留置し、2 週間後に新生内膜形成を内膜/中膜比 (**I/M** 比)で評価し、**Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA)**、**S100/calgranulins**、**RAGE**、**Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (VCAM-1)**および **ED-1** の発現を検討した。また **AGEs-RAGE** 系の新生内膜形成に対する作用を評価するために **OZ** 群に **AdsRAGE** を、そして **OZ/Sem** 群に **AdRAGEwt** を大腿動脈に感染させた後に **Cuff** を留置し新生内膜形成を検討した。さらにサイトカインの中でも特に **TNF- α** の作用を検討するため **AdTNFR Δ C** を **OZ** 群に感染させて同様の実験を行った。**RAGE** に関しては最終的に **real time PCR** を行って半定量化して評価した。

結果

1. **Semapimod** のラット基礎データに対する影響

16 週齢の時点で体重、収縮期血圧、空腹時血糖、中性脂肪、総コレステロール値は **OZ** 群で **LZ** 群よりも有意に上昇していた。**OZ** 群に **Sem** を投与してもそれらの値は変化しなかった。

2. **Semapimod** の血清および臓器中のサイトカイン濃度および血清 **CRP** に対する影響

16 週齢の時点で 3 群の血清および内臓脂肪や大動脈などから抽出したタンパク中のサイトカイン濃度を **ELISA** 法で測定した。血清および内臓脂肪中の **TNF- α** , **IL-1 β** , **IL-6** 濃度は **OZ** 群で **LZ** 群に比べて有意に上昇しており、**Sem** 投与で **OZ** 群のサイトカイン濃度は低下した。**TNF- α** および **IL-1 β** に関しては大動脈由来のタンパク中の濃度も同様の結果が得られた。血清 **CRP** 濃度は **OZ** 群で **LZ** 群に比べて有意に上昇しており、**Sem** 投与によって **OZ** 群の血清 **CRP** 濃度は有意に低下していた。

3. **Cuff** 留置による血管傷害に対する **Semapimod** の影響

Cuff 留置 2 週間後に **HE** 染色で **I/M** 比を評価した。新生内膜形成は **OZ** 群で **LZ** 群と比較して

有意に亢進しており、**Sem** 投与によって新生内膜形成は有意に抑制された。**PCNA** 染色による新生内膜内の細胞増殖の評価でも同様の結果となった。

4. 新生内膜における **S100/calgranulins** および **RAGE** 発現の検討

糖尿病性血管障害の機序の1つである **AGEs-RAGE** 系を検討するため **RAGE** とそのリガンドである **S100/calgranulins** の免疫染色を行った。両者ともに発現の中心は血管内皮であり、それらの発現は **OZ** 群で **LZ** 群よりも亢進し、**Sem** 投与によって **OZ** 群での発現は低下した。**Sham** 群では発現が認められず、**RAGE** の発現は血管傷害により誘導されると考えられた。

5. 糖尿病状態での新生内膜形成に対する **RAGE** の関与の検討

糖尿病モデルでの新生内膜形成は **RAGE** を介していることを検討するため **OZ** 群および **OZ/Sem** 群の大腿動脈にそれぞれ **AdsRAGE** および **AdRAGEwt** を感染させた後に **Cuff** 留置を行った。その結果 **OZ** 群では **AdsRAGE** によってサイトカイン濃度が高値であるにもかかわらず新生内膜形成が抑制され、**OZ/Sem** 群では **AdRAGEwt** 感染によってサイトカイン濃度が低下しているにもかかわらず新生内膜形成が亢進した。

6. **TNF- α** 単独での新生内膜形成に対する影響

今回サイトカインの中でも特に **TNF- α** の影響を検討するため **dominant negative TNF** 受容体を発現するアデノウイルスを **OZ** 群の大腿動脈に感染させた。2 週間の **Cuff** 留置によって **AdTNFR Δ C** 感染群は **AdGFP** 感染群に比較して新生内膜形成が有意に抑制された。また **S100/calgranulins** および **RAGE** の発現も **AdTNFR Δ C** 感染群では **AdGFP** 感染群と比較して減少していた。

7. **AGEs-RAGE** 系の血管障害因子誘導に対する検討

AGEs-RAGE が血管障害を誘発する際には接着因子や単球/マクロファージの誘導を引き起こ

すことが知られている。そのため新生内膜での **VCAM-1** および **ED-1** 染色を行った。両者とも **OZ** 群で発現は **LZ** 群よりも亢進し、**OZ/Sem** 群でそれらの発現は低下していた。また **OZ** 群に **AdTNFR Δ C** および **AdsRAGE** を感染させると両者の発現は減少し、**OZ/Sem** 群に **AdRAGEwt** を感染させるとそれらの発現は増加していた。

8. real time PCR による RAGE の半定量化

RAGE に関しては最終的に半定量化を行って確認した。**RAGE** の発現はやはり **OZ** 群で **LZ** 群と比較して増加しており、**Sem** 投与で抑制された。また **OZ** 群に **AdTNFR Δ C** を感染させると **AdGFP** 感染群に比べて発現量は減少していた。

考察

TNF- α をはじめとする内因性サイトカインのインスリンシグナルに対する役割については良く知られているが、新生内膜形成に対する役割についてはまだ十分には検討されていない。本研究では、内因性サイトカイン産生抑制薬である **Semapimod** および **dominant negative TNF** 受容体を発現するアデノウイルスを用いて主として内臓脂肪から放出される **TNF- α** をはじめとしたサイトカインが糖尿病状態での新生内膜形成および細胞増殖を増加させることを示した。また **OZ** 群や **OZ/Sem** 群に **AdsRAGE** および **AdRAGEwt** を感染させた状態での新生内膜形成の結果から、**AGEs-RAGE** 系が細胞だけでなく *in vivo* においても接着因子や単球遊走を引き起こすことで新生内膜を形成する可能性が示唆された。さらに **OZ** 群に **AdTNFR Δ C** を感染させた実験結果から、**TNF- α** をはじめとするサイトカインが血管内皮に作用し、直接 **RAGE** の発現を誘導する可能性があることを示した。これまでは **AGEs-RAGE** 系がサイトカインの放出を誘導することは報告されてきたが、本研究はその逆の経路もありえることを示した最初の例であると考えられる。また本研究ではこれまでの報告と異なって **S100/calgranulins** および **RAGE** の発現は

血管内皮のみであった。培養内皮細胞の実験では **AGEs-RAGE** の活性化が多くの組織障害因子を誘導しているという結果から、内皮のみでの **AGEs-RAGE** の発現は新生内膜を形成するのに十分であると考えられる。

結論

TNF- α をはじめとする内因性サイトカインは糖尿病状態での新生内膜形成に関与しており、その機序にはサイトカインによる **RAGE** 発現の増強が考えられた。内因性サイトカインや **RAGE** を抑制することは血管形成術後の再狭窄予防に有用な治療手段となることが考えられる。