

審査の結果の要旨

氏名 加藤 幹雄

動脈硬化はアテローム硬化と細動脈硬化に大きく分類され、前者は、高脂血症により血管内皮細胞で構成される内膜の下に脂質を多く含んだマクロファージや遊走した血管平滑筋細胞 (VSMC) が蓄積し病巣が形成された状態を言い、後者は、高血圧などにより中膜を構成する VSMC が増殖やコラーゲン過剰産生することにより中膜肥厚が形成された状態を言う。降圧薬であるアンジオテンシン II 受容体拮抗薬 (ARB) やアンジオテンシン変換酵素阻害薬のレニン・アンジオテンシン (RA) 系抑制薬では、高血圧患者における脳梗塞、心筋梗塞などの心血管イベント抑制効果が示されており、これらのメカニズムのひとつとして降圧作用による細動脈硬化抑制が考えられている。一方で脳梗塞・心筋梗塞では、血管がアテローム硬化と細動脈硬化の複合的な病巣を呈するとされており、これら RA 系抑制薬の心血管イベント抑制作用のメカニズムに、抗アテローム硬化作用も関与している可能性が考えられる。しかし、ヒトにおいては RA 系抑制薬の抗アテローム硬化作用は実証されておらず高血圧を呈さない高脂血症患者には RA 系抑制薬は投与できないのが現状である。RA 系抑制薬をアテローム硬化抑制を目的として臨床応用するためには、基礎研究としてアテローム硬化発症・進展における RA 系の役割を更に検討する必要がある。本研究では、ARB であるオルメサルタン (OLM) の抗アテローム硬化作用が、アテローム硬化危険因子の血中コレステロールに影響を受けるかを検討し、更に抗アテローム硬化作用のメカニズムについて病理組織学的手法や培養細胞を用いて検討した。

I. OLM の ApoE ノックアウトマウスにおける抗アテローム硬化作用：血中コレステロール濃度が極度に高い場合

ApoE ノックアウト (ApoEKO) マウスに高脂肪食を摂取させ、血中コレステロール濃度を著しく高め、OLM を投与した。ApoEKO マウスは正常食下でも高脂血症を呈するが、高脂肪食により血中コレステロール濃度は約 2 倍に上昇したが、OLM による影響は見られなかった。大動脈表面病変面積は高脂肪食群では正常食群に比して約 2 倍増加し、OLM により正常食群、高脂肪食群ともにほぼ同じレベルまで減少した。また、大動脈弁部病変肥厚では、正常食群、高脂肪食群ともに OLM により減少し、その抑制率はほぼ同じ割合であった。

以上から、極度の高コレステロール血症下でも OLM は抗アテローム硬化作用を示した。

II. OLM の自然発症高脂血症ウサギにおける抗アテローム硬化作用：血中コレステロール濃度が低い場合

自然発症高脂血症モデル WHHL (Watanabe heritable hyperlipidemic) ウサギに HMG-CoA reductase 阻害薬プラバスタチン (PRV)、OLM をそれぞれ単独、併用投与した。

PRV (単独・併用) により血中コレステロール濃度の低下が見られたのに対し、OLM (単独) では血中コレステロール濃度に影響は見られなかった。大動脈表面病変面積は OLM により顕著に抑制され、大動脈病変肥厚はコレステロール低下薬により顕著に抑制された。また、病変表面積と肥厚の両方に対する作用が加味される大動脈組織コレステロール含量は、PRV、OLM ともに低下作用が見られ、更に併用効果が見られた。以上から、OLM はコレステロール低下薬と併用しても十分に抗アテローム硬化作用を発揮することが示され、またそれぞれが異なった作用機序によることが示唆された。

III. OLM のアテローム硬化発症・進展抑制メカニズム：病理組織学的検討

アンジオテンシン II (AngII) は RA 系の活性本体であり、その血管収縮作用や Na 貯留作用により血圧を上昇させる。また、局所 AngII は血圧上昇とは独立したメカニズムで病態発症に関与するとされる。II の研究で用いた WHHL ウサギを用い免疫組織学的検討を行なった。アテローム硬化病変部位では、ケモカインの monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) 発現亢進や酸化ストレスマーカー carboxymethyl lysine (CML) 蓄積が確認された。また、OLM による病変縮小、マクロファージ浸潤抑制とともに、MCP-1、CML 発現抑制が観察された。アテローム硬化形成において、AngII を介してケモカイン産生および酸化ストレスが亢進し、これを OLM が抑制することにより病変発症・進展を抑制すると考えられた。

IV. OLM のアテローム硬化発症・進展抑制のメカニズム：細胞実験

アテローム硬化形成において主役となる VSMC や単球・マクロファージの細胞間相互作用について培養細胞を用いて検討した。VSMC に AngII 刺激すると interleukin 6 (IL-6) と MCP-1 産生が亢進し、OLM 前処置により抑制された。また、抗酸化剤や NAD(P)H oxidase 阻害剤においても抑制作用が見られたことから、AngII による IL-6、MCP-1 産生に酸化ストレスや NAD(P)H oxidase の関与が示唆され、III の研究での病変解析の結果と一致した。

次に、VSMC により産生されたサイトカインやケモカインの役割について、VSMC を AngII 刺激した際の培養上清を用いて、単球遊走やマクロファージの酸化 LDL 取り込み能に対する作用を検討した。MCP-1 あるいは培養上清により単球遊走が亢進し、IL-6 あるいは培養上清によりラット腹腔マクロファージにおける酸化 LDL 取り込み能亢進が見られた。これらの細胞の活性化は OLM 前処置した培養上清では見られず、また、AngII 単独でも見られなかったことから、AngII 刺激により産生された MCP-1 や IL-6 などの促進因子を介していると考えられた。

以上から、AngII 刺激により産生される促進因子の濃度レベルで、単球やマクロファージの活性化が引き起こされることを初めて明らかにし、実際に生体内でも起こりうる現象であることが示された。また、局所で産生された AngII により、VSMC やマクロファージから活性酸素が産生され、それに引き続きサイトカインやケモカインなどが産生され、それに伴い酸化 LDL 産生、単球遊走、酸化 LDL の取り込みなどが亢進し、マクロファージ泡沫化が促進され、アテローム硬化が発症・進展すると考えられた。OLM は、これらのアテローム硬化発症・進展における AngII の作用を遮断したと考えられた。

本研究では、高脂血症モデル動物において、オルメサルタンは血中コレステロール濃度によらず、抗アテローム硬化作用を発揮し、RA系は直接的にアテローム硬化発症・進展に深く関与している可能性が示された。また、アテローム硬化に対し、オルメサルタンは病変肥厚よりも表面積を顕著に抑制し、コレステロール低下薬はその逆に表面積よりも肥厚を顕著に抑制したことから、RA系は血管炎症を中心とした病変形成を促進し、血中コレステロールは病変部へコレステロールを供給するという、それぞれ独立したメカニズムでアテローム硬化発症・進展に関与していることが示唆された。また、アテローム硬化発症・進展へのRA系関与のメカニズムとして酸化ストレス亢進によるサイトカインやケモカインの産生亢進、それに伴う血管平滑筋細胞増殖、酸化LDL産生、単球遊走、マクロファージの酸化LDLの取り込み亢進（泡沫化）が示された。

以上の結果は、RA系抑制薬が血中コレステロール濃度に拠らずに抗アテローム硬化作用を発揮することを示したはじめての知見であると同時に、動脈硬化発症・進展過程においてRA系の重要性を示した結果である。今後、AngIIによる動脈硬化発症・進展メカニズムの更なる解析が進むとともに、RA系抑制薬が抗アテローム硬化薬として臨床応用を行うための基礎研究が蓄積されることが期待された。以上のことから本研究は博士（薬学）の学位に十分値するものと判定した。