

論文の内容の要旨

論文題目 アンジオテンシンⅡ受容体拮抗薬による血管内皮保護作用についての検討

氏名 明城 正博

<背景>

Renin-angiotensin system (RAS) は血圧調節機構の1つで、動脈硬化、高血圧症、左室肥大、心筋梗塞、心不全など様々な疾患の病態生理に関与しており、高血圧症、腎疾患、心血管疾患における治療ターゲットとなっている。降圧作用以外に、ACE阻害薬とARBは様々な重症度の症例において、腎臓病進行のリスクや心血管疾患の致死率、発病率を低下させることが複数の大規模試験で報告されており、RAS阻害薬による治療が降圧作用を超えて臨床的に有用であることが示されている。RASの主要要素であるアンジオテンシンⅡ (Ang Ⅱ) は血圧上昇作用以外に、炎症、線維化、血栓形成を催起する作用もあり、それらの作用は血圧とは独立して、細胞レベル、分子レベルで調節されている。Ang Ⅱはangiotensin Ⅱ type 1 (AT₁) receptor (AT₁R)を活性化させ、reactive oxygen species(ROS)の産生を増加させ、内皮細胞の老化、アポトーシスの惹起、血管内膜増殖の増強といった動脈硬化の進展に関与する。RAS阻害の血管新生、内皮修復への関与も知られ、ARBも降圧作用とは別に、血管内皮の再生、動脈硬化の予防など多面的効果が報告されており、ARBに共通のclass effectだけでなく、薬剤個々のdrug effectについての報告も多い。特にtelmisartanでは、peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ)を介した脂質代謝改善作用など多くのdrug

effect が報告されている。

血管内皮保護作用に関連する酵素として、AMP-activated protein kinase (AMPK) や endothelial nitric oxide synthase (eNOS) などが挙げられる。AMPK はフィブラート、スタチンなどの薬物による活性化が報告され、それぞれが抗動脈硬化作用を発揮する一因と考えられている。eNOS によって産生される NO は血管緊張の緩和だけでなく、血管の恒常性保持において重要な役割を担っており、抗動脈硬化、抗増殖、抗血栓作用を持つ。eNOS の翻訳後の機能調節には多くのキナーゼやフォスファターゼを介した複数部位のリン酸化が密接に関わっており、なかでも eNOS- Ser¹¹⁷⁷ リン酸化は eNOS 活性調節において最も重要と考えられている。

本実験では、ARB による血管内皮保護作用を検討するために、薬剤による AMPK、eNOS のリン酸化を介した活性化を中心に検討した。

<方法>

ARB の class effect だけでなくそれぞれの drug effect も含めた抗動脈硬化作用を検討するため、ARB での処置による血管内皮細胞 (HUVEC) における eNOS 活性、特に eNOS- Ser¹¹⁷⁷ リン酸化レベルの変化や AMPK α -Thr¹⁷² リン酸化レベルの変化を観察した。また、アデノウイルス感染による dominant negative タンパク過剰発現や、種々のキナーゼ阻害剤、アンタゴニスト処置によるシグナル遮断を利用して、eNOS- Ser¹¹⁷⁷ リン酸化レベルの変化に関与する可能性のあるカスケードについての検討も行った。それぞれのタンパクの発現は western blot 法で確認し、アデノウイルスベクターは Ad-dominant negative AMPK α を、阻害剤は phosphatidylinositol-3 kinase (PI3-K) 阻害剤、protein kinase A (PKA) 阻害剤、p38 mitogen-activated protein kinase (p38 MAPK) 阻害剤、PPAR γ アンタゴニスト、PPAR β/δ アンタゴニストを使用した。また、eNOS 活性、NO 産生亢進の指標として細胞内 guanosine 3',5'-cyclic monophosphate (cyclic GMP) 濃度を ELISA 法を用いて測定した。In vivo の実験では、valsartan、telmisartan を投与した健常マウスの大動脈の組織免疫染色を行い、

phosphorylated (phospho) -eNOS (Ser1177) の染色強度を比較した。

<結果>

HUVEC に valsartan、irbesartan、telmisartan での処置を行い、western blot 法でタンパクの発現を観察したところ、telmisartan で eNOS- Ser¹¹⁷⁷ リン酸化、AMPK α -Thr¹⁷² リン酸化の時間依存性、濃度依存性の亢進を認めた。また健常マウスに valsartan、telmisartan を 1 週間投与し、大動脈の組織免疫染色を行ったところ、telmisartan 群でのみ血管内皮の抗 phospho-eNOS (Ser1177) 抗体での染色強度の亢進を認めた。高濃度の valsartan 前処置による AT1 阻害下での telmisartan 処置でも同様に eNOS- Ser¹¹⁷⁷ リン酸化、AMPK α -Thr¹⁷² リン酸化の亢進を認めた。Telmisartan による eNOS- Ser¹¹⁷⁷ リン酸化亢進に関与する細胞内シグナルについて検討するため、PI3-K 阻害剤、PKA 阻害剤、PPAR γ アンタゴニスト、PPAR β / δ アンタゴニストでの前処置下で telmisartan 処置を行ったが、いずれの前処置下でも eNOS- Ser¹¹⁷⁷ リン酸化亢進を認め、アデノウイルスベクター感染による dominant negative AMPK α 過剰発現下での telmisartan 処置でも、eNOS- Ser¹¹⁷⁷ リン酸化亢進を認めた。また、eNOS- Ser¹¹⁷⁷ リン酸化、AMPK α -Thr¹⁷² リン酸化の他にも CREB (cAMP response element binding protein) -Ser¹³³ リン酸化、p38 MAPK-Thr¹⁸⁰/Tyr¹⁸² リン酸化の亢進が確認され、p38 MAPK 阻害剤前処置により telmisartan 処置による eNOS- Ser¹¹⁷⁷ リン酸化が抑制された。ELISA 法による細胞内 cyclic GMP 濃度測定では、telmisartan 処置により細胞内 cyclic GMP 濃度が上昇し、p38 MAPK 阻害剤前処置により cyclic GMP 濃度上昇が抑制されることが確認された。

<結論>

Telmisartan は、血管内皮細胞において AMPK α -Thr¹⁷² リン酸化、eNOS- Ser¹¹⁷⁷ リン酸化を有意に亢進させるという ARB の中でも特有の作用を持ち、eNOS 活性を上昇させる。この telmisartan による eNOS- Ser¹¹⁷⁷ リン酸化は、p38 MAPK 活性化を介して促進される。