

学位論文題名

実験的糖尿病ラット摘出大動脈における収縮反応性の
変化に関する薬理学的研究

学位論文内容の要旨

糖尿病患者ではその経過中に血管障害による合併症の頻度が高いことは良く知られている。血栓症及び動脈硬化性病変はmacroangiopathyとして代表的なものであり更にmicroangiopathyが腎症、網膜症、末梢ニューロパチー等の主要な原因と考えられている。この細血管床の構造的、及び機能的変化を形成するに至る病態生理学的過程については殆ど解明されていない。しかし、その中でも血管の収縮、拡張を調節している神経伝達物質や循環ホルモンに対する血管の反応性の変化が糖尿病病態で生じており血管障害の要因の一つとなり得る事が示唆されている。しかしながら糖尿病病態における血管反応性の変化がどのような機構で起こっているのかに関しては未だに十分な解明はなされていない。そこで本研究はstreptozotocin (STZ)誘発性糖尿病ラットより摘出した大動脈輪状標本を用い、KCl、Ca²⁺チャネル活性化薬、 α_1 受容体を初めとする各種アゴニスト等の血管収縮物質による収縮反応を機能的実験により対照標本と比較検討しその収縮反応の特性に薬理的解析を加えることにより、その反応性変化の機構を明確にする事を目的として行った。

8週齢のWistar系ラットにSTZ 45 mg/kgを静注し糖尿病を作成し、対照ラットには溶媒としてのクエン酸溶液のみを静注した。その後8~12週に胸部大動脈を摘出し幅4 mmの輪状標本として人為的に内皮を除去した後実験に供した。なお、同時に腎静脈より採血して血糖値を測定した。標本は95%酸素と5%二酸化炭素の混合ガスで通気している25 mlの器官槽に懸垂した。栄養液は生理的塩類溶液(PSS)を使用し液温は37℃に維持した。標本には1 gの前負荷をかけ発生張力を等尺性に測定した。

STZ誘発糖尿病ラットの体重、大動脈輪状標本重量は対照群に比し有意に小さく血等値は著明に上昇していた。40 mM K⁺による収縮反応は、糖尿病群で顕著に減弱していた。すなわち40 mM K⁺による大動脈標本の収縮は対照群では73±5 mg/mg wet weightに対し糖尿病群では28±4 mg/mg wet weightでありこの差は統計的に有意であった。KClの濃度反応曲線では14 mM以上の濃度でその収縮反応が有意に低下していたがEC₅₀値は両群間に差を認めなかった。Ca²⁺活性化薬であるBay K 8644は通常のパSS (5.9 mM K⁺)では両群において収縮反応は認められなかった。PSSのK⁺濃度15 mMにすると対照群においては全例で濃度依存性の収縮反応が惹起されたが糖尿病群ではBay K 8644に対する感受性は低下し全体の収縮反応は有意に低下していた。Norepinephrine (NE)および5-hydroxytryptamine (5-HT)により両群において濃度依存性の収縮反応が惹起されたがその反応性は糖尿病群で有意に増強していた。しかしそのEC₅₀値は両群間に差を認めなかった。Ca²⁺チャネル拮抗薬である1 μ M nifedipine存在下でNEおよび5-HTの収縮反応の程度は両群共に減弱しそれにより両群間の差は認められなくなった。すなわちnifedipineの前処置は糖尿病群で観察されたNEおよび5-HTによる収縮

反応の増強を消失させた。Protein kinase C (PKC)阻害薬である 20 nM staurosporine 前処置により NE の最大収縮反応は抑制され特に糖尿病群での抑制は顕著であった。また 5-HT では 300 μ M まで用いても staurosporine 存在下では両群共に有意な収縮反応を惹起しえなかった。Endothelin-1 (ET-1)および thromboxane A_2 誘導体である U46619 の収縮反応は比較的緩徐であり両群で濃度依存性の反応を示したが ET-1 は 1 nM 以上の濃度で、U46619 は 100 nM 以上の濃度で、いずれも糖尿病群で有意に増強していた。1 μ M nifedipine 前処置により ET-1 および U46619 による収縮反応は特に糖尿病群において減弱し結果として両群における反応は同程度となった。また staurosporine 前処置により ET-1 および U46619 の収縮反応は両群において著明に抑制され両群間で差を認めなくなった。PKC 活性化薬である Phorbol 12,13-dibutyrate (PDBu)による収縮反応は対照群において 20~30 分で最大に達しプラトーになったが、一方糖尿病群においては当初緩徐であった反応が途中で急峻に反応の増強する二相性のパターンを示した。この二相性の収縮反応は糖尿病群に特異的であり結果として PDBu の最大収縮反応は糖尿病群で有意に高くなった。PKC を活性化する他のホルボール・エステルである 300 nM 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate もまた糖尿病群において PDBu と同様の二相性収縮反応を示した。Ca²⁺ free 溶液中あるいは nifedipine 存在下では対照群の PDBu の濃度反応曲線は最大反応は変化することなしに右方に移動し、一方糖尿病群において濃度反応曲線は右方移動すると共に最大反応も有意に減弱し結果として両群に差を認めなくなった。また、糖尿病群において認められた PDBu による二相性の収縮反応は Ca²⁺ free 溶液中あるいは nifedipine 存在化では消失した。20 nM staurosporine の前処置により 30 nM PDBu の収縮反応は著明に減弱し対照群においては一過性となり、糖尿病群においては完全に消失した。Ca²⁺ free 溶液中での NE による収縮反応は一過性の急峻な収縮とそれに続く小さな持続性収縮を示したが、最大収縮の程度は両群間で有意の差を認めなかった。一方 Ca²⁺ free 溶液中での caffeine による収縮反応は NE のそれよりも小さく一過性の収縮のみを示したが糖尿病群において有意に減弱していた。また 1 μ M ryanodine 前処置により caffeine の収縮反応は完全に消失し、NE のそれは両群で抑制された。

本研究は糖尿病ラット大動脈標本において (1) 細胞外 K⁺濃度上昇あるいは Ca²⁺チャネル活性化薬である Bay K 8644 による収縮反応が顕著に減弱していること、(2) 一方 NE、5-HT、ET-1 あるいは U46619 といったアゴニスト刺激による収縮反応は有意に増強していること、(3) PKC を直接活性化するホルボール・エステルによる収縮反応もまた増強していること、(4) これらアゴニストおよびホルボール・エステルによる収縮反応の増強は Ca²⁺チャネル拮抗薬である nifedipine により消失すること、(5) 細胞内 Ca²⁺貯蔵部位からの Ca²⁺放出による収縮反応に関しては caffeine による作用が特異的に損なわれていることを明らかにした。

以上より糖尿病ラット大動脈において脱分極反応に伴う Ca²⁺チャネル開口による収縮反応、細胞内貯蔵部位からの Ca²⁺誘発性 Ca²⁺放出による反応は減弱しているが一方種々の生理活性物質による収縮反応は増加した PKC 活性化過程により磷酸化された Ca²⁺チャネルを通る Ca²⁺流入量の増加により増強していることが示唆された。我々は既に糖尿病ラット大動脈において内皮依存性弛緩反応が損なわれていることを報告しており、今回本研究で示された内因性生理活性物質による収縮反応の増強はこれと相乗的に作用し糖尿病病態での血管病変の進行に関与している可能性が考えられる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 菅 野 盛 夫
副 査 教 授 北 畠 顯
副 査 教 授 小 池 隆 夫

学 位 論 文 題 名

実験的糖尿病ラット摘出大動脈における収縮反応性の 変化に関する薬理学的研究

糖尿病患者ではその経過中に血管障害による合併症の頻度が高いことは良く知られている。血栓症や動脈硬化性病変に加えて細小血管障害に起因する腎症、網膜症および末梢ニューロパチー等は糖尿病患者の「生活の質」や予後を決める因子となっている。この細血管床障害を形成するに至る病態生理学的過程については解明されていないが、糖尿病病態で生じる血管収縮・拡張調節に働く神経伝達物質や循環ホルモンに対する血管の反応性の変化が血管障害の要因の一つとなり得る事が指摘されている。しかし、これらの糖尿病病態における血管反応性の変化が発現する機構に関する解析は十分になされていない。本研究は、ストレプトゾトシン(STZ)誘発性糖尿病ラットより摘出した大動脈輪状標本を用い、KCl、Ca²⁺チャネル活性化薬、 α_1 受容体刺激薬を初めとする各種受容体アゴニストおよび PKC 活性化物質による血管収縮反応を対照標本のそれらと比較検討し、薬理学的解析を加えることによってその反応性変化の機構を明確にする事を目的としている。実験方法として標準的な血管標本収縮解析法を用いている。すなわち、STZ45mg/kg を静注した糖尿病 Wistar 系ラット、および、STZ の溶媒であるクエン酸溶液のみを投与した対照同系ラットから投与8～12週後に作製した内皮細胞除去胸部大動脈輪状標本の等尺性張力を、酸素飽和生理的塩類溶液 (PSS) 中で常法にしたがって測定している。得られた結果は次のように要約される。すなわち、細胞外 K⁺濃度上昇による脱分極あるいは Ca²⁺チャネル活性化薬である Bay K8644による収縮反応が顕著に減弱していることを認め、一方、ノルエピネフリン、5-ヒドロキシトリプタミン、エンドセリン-1あるいは U46619といったアゴニスト刺激による収縮反応は有意に増強していて、その増強は Ca²⁺チャネル遮断薬であるニフェジピンおよび PKC 阻害薬であるスタウロスポリンによって消失することを明らかにした。また、

PKCを直接活性化するホルボールエステルによる収縮反応は2相性となって増強し、この増強もニフェジピンにより消失すること、さらに、細胞内Ca²⁺貯蔵部位らのCa²⁺放出による収縮反応に関してはカフェインによる作用が特異的に損なわれていることを明らかにした。すなわち、膨大な実験から、直接的なCa²⁺チャネル開口刺激による収縮および細胞内貯蔵部位からのCa²⁺誘発性Ca²⁺放出による収縮が減弱する一方、種々の生理活性物質による収縮は増加する特異な血管反応性の変化が糖尿病病態で惹起されることを明らかにし、さらに、この血管収縮反応増強は、アゴニスト刺激によるPKC活性化、そして、これに引き続くCa²⁺チャネル磷酸化を介するCa²⁺チャネル機能調節機構の変調によってCa²⁺流入量を増加するによって発現すると考察している。そして、本研究で示した内因性生理活性物質による収縮反応の増強と申請者が既に報告している糖尿病血管の内皮依存性弛緩反応障害が糖尿病病態での血管病変の進行に相乗的に関与している可能性が考えられると結論している。学位論文の公開発表に際して、副査の小池教授からは、申請者が明らかにした糖尿病病態にみられる血管収縮反応増強が高血糖によるのか、それとも、機能蛋白の糖化によるのか、STZによる糖尿病モデルで得られた大動脈収縮反応性異常が臨床での微小血管障害とどの様に関連するのか、副査の北畠教授からは、PKC活性薬による収縮反応が2相性になる機序、細小血管における収縮反応の変化はどうか、循環器内科佐久間博士からは、機能蛋白糖化を抑制する薬物の効果の検討の有無、臨床検査医学講座川口教授からは、糖尿病態にある血管平滑筋のCa²⁺チャネル数の変化、PKC活性変化やアイソザイム変化に関する文献的考察、血管平滑筋収縮蛋白の機能的および分子的变化に関する知見等の質問があったが、申請者は、実験結果に基づいて、また、文献的知識を駆使して誠実に、かつ、概ね適切に回答し得た。

糖尿病の重篤な合併症である血管障害の発生基盤となり得る血管平滑筋の機能的変化を明らかにした本研究は、糖尿病による血管障害の治療もしくは予防研究の今後の展開に新たな視点を設定するものと評価される。

審査員一同は、申請者の豊富な学識に併せて、この研究が関連領域研究の進展に与える成果を評価し、申請者が博士（医学）を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。