

## 学位論文の要旨

学位の種類	博士	氏名	会沢佳昭
<b>学位論文題目</b>			
Pioglitazone Enhances Cytokine-induced Apoptosis in Vascular Smooth Muscle Cells and Reduces Intimal Hyperplasia			
(血管平滑筋細胞におけるピオグリタゾンのサイトカイン存在下 アポトーシス増強効果と新生内膜退縮効果)			
共著者名			
旭川医科大学内科学第1講座		川辺淳一、長谷部直幸、竹原有史、菊池健次郎	
Circulation 掲載予定			
<b>研究目的</b>			
<p>アポトーシスは、血管病変の形成において重要なメカニズムの一つである。炎症細胞や血管平滑筋細胞の増殖、遊走の増加には、多くのアポトーシスをともっており、細胞の複製と消去のバランスで血管組織のホメオスタシスが維持されている。血管平滑筋細胞において、炎症性サイトカインにより iNOS が誘導され、産生された過剰の NO によりアポトーシスが引き起こされる。</p> <p>チアゾリジン誘導体は、核内受容体である PPAR<math>\gamma</math> の ligand で、インスリン抵抗性改善薬と認識されているが、心血管系にも影響をあたえることがわかってきた。チアゾリジン誘導体は、成長因子で誘導される培養血管平滑筋細胞の増殖、遊走を抑制し、バルーン血管傷害モデルにおいて内膜肥厚の形成を抑制すると報告されている<sup>1)</sup>。しかし、バルーン血管傷害後の既に形成された内膜肥厚をチアゾリジン誘導体が退縮させるか否かは未だ明らかではない。また最近、サイトカインにより誘導される iNOS を、チアゾリジン誘導体である Troglitazone (TGZ) が upregulate する<sup>2)</sup>、逆に downregulate する<sup>3)</sup>との相反する報告がなされ、意見の一致をみていない。一方、近年に冠動脈疾患の治療として狭窄血管に対するバルーンやステントを用いた intervention (PCI) が広く行われている。しかし、PCI 後の再狭窄が 30~40%は生じ、その成因に内</p>			

膜肥厚が大きく関わりとされ、その発生予防、既に生じた内膜肥厚の退縮法の開発は極めて重要と考えられる。そこで本研究において我々は、まず *in vitro* の実験で、培養血管平滑筋細胞において、サイトカインにより誘導される iNOS に対する チアゾリジン誘導体である Pioglitazone (PGZ) の効果、及びアポトーシス増強効果の有無を検討した。次いで *in vivo* の実験で、バルーン傷害血管において既に形成された内膜肥厚に対し PGZ が、アポトーシスを誘導し、これを退縮させるのか否かを検討した。

### 材 料・方 法

(1) *in vitro* : SDラット胸部大動脈由来の血管平滑筋細胞を Explant 法にて分離培養し、第 4-8 継代を実験に供した。Subconfluent の状態で PGZ、TGZ、及び PPAR $\gamma$  の ligand である 15-deoxy- $\Delta^{12/14}$ -prostaglandin J2 (15d-PGJ2) をそれぞれ 0、0.1、1、10 $\mu$ M 加え、16 時間後 interleukin (IL)-1 $\beta$  (10ng/ml)、interferon(IFN)- $\gamma$  (10ng/ml) を反応させ、48 時間後 NO 産生量を Griess 法で測定し、iNOS 蛋白はウェスタン解析で測定した。アポトーシスの評価には、MTT assay、TUNEL 法を用いた。それぞれの実験は L-NMMA の有無で比較検討した。

(2) *in vivo* : 10 週令 SD ラット総頸動脈バルーン傷害モデルを作成し、新生内膜増殖がほぼプラトーに達する 2 週後を Control として、さらに 1 週間 Vehicle 又は PGZ (3mg/kg/day) を経口投与した後、総頸動脈を摘出し、凍結切片を作成した。ヘマトキシリン・エオジン染色により内膜/中膜-面積比を計測し、アポトーシス細胞検出のために ssDNA 抗体を、増殖細胞検出のために PCNA (proliferating cell nuclear antigen) 抗体を用い免疫組織染色を行い検討した。

測定値は平均値 $\pm$ 標準偏差で表し、平均値の差の検定には分散分析を用い、 $p < 0.05$  をもって有意とした。

### 成 績

(1) *in vitro* : PGZ、TGZ は、IL-1 $\beta$ +IFN $\gamma$  刺激で誘導される NO 産生を濃度依存的に増加させた。しかし 15d-PGJ2 については明らかな増強効果は示さなかった。チアゾリジン誘導体又は 15d-PGJ2 単独投与では NO 産生に変化は認められなかった。IL-1 $\beta$ +IFN- $\gamma$  刺激による iNOS の蛋白発現は、PGZ により有意に増加した。MTT assay では、IL-1 $\beta$ +IFN $\gamma$  刺激により cell viability の低下を認めた。PGZ はこれを濃度依存

的に増強させるが、その効果は L-NMMA (1 mM) により完全に阻害された。また IL-1 $\beta$ +IFN $\gamma$ 刺激により TUNEL 陽性率が有意に増加し (from 0.4 $\pm$ 0.2 to 5.2 $\pm$ 1.0% ; n=6, p<0.01)、PGZ (10 $\mu$ M)はさらにこれを増強したが (13.6 $\pm$ 2.9% ; n=6, p<0.05)、この効果は L-NMMA によって有意に抑制された (1.9 $\pm$ 0.9% ; n=6, p<0.05)。

(2) *in vivo* : PGZ 投与群では、Vehicle 投与群に比し約 30%の有意な内膜/中膜面積比の低下を認めた。新生内膜のアポトーシス細胞は、Control 群において 6%認められた。Vehicle 投与群においてもコントロール群と同様の低レベルを示したが、PGZ 投与群では 19%と有意な増加を認めた。また新生内膜の増殖細胞出現率は、各群間で有意差は認められなかった。

### 考 案

本研究の結果、バルーン傷害頸動脈の既に形成された内膜肥厚に対し、PGZ が新生内膜の増殖細胞出現率には影響を与えずにアポトーシスを誘導し、かつ内膜肥厚退縮効果を発揮することが初めて明示された。また培養血管平滑筋細胞において PGZ は、IL-1 $\beta$ +IFN $\gamma$  により誘導される NO 産生を約 60%増加させ、アポトーシスを増強させることが明らかとなった。

傷害動脈の新生内膜形成はアポトーシスと細胞複製とのバランスによりその程度が決定される。バルーン傷害後 1 週間以内に内膜の細胞増殖とアポトーシスはピークを迎え、その後基礎レベルまで低下すると報告されている。本研究においても、バルーン傷害後 2 週間で内膜肥厚はほぼ最大となり、増殖細胞とアポトーシス細胞の出現率は低レベルに落ち着いていた。PGZ による内膜肥厚の退縮は、新生内膜の増殖細胞出現率には影響を及ぼさずにアポトーシスを増強したことから、増殖抑制効果ではなく、アポトーシス誘導効果が主体をなすと考えられた。

また、研究により培養血管平滑筋細胞において、PGZ がサイトカインにより誘導される iNOS の蛋白発現を増強し、過剰に NO を産生させることが示された。チアゾリジン誘導体は、PPAR $\gamma$ と高い親和性を示すが、PPAR $\gamma$ の ligand である 15d-PGJ<sub>2</sub> はサイトカイン誘導の NO 産生に対して効果を示さなかったことか

ら、チアゾリジン誘導体の効果は PPAR $\gamma$ とは独立した機序によるものと推察される。このチアゾリジン誘導体の iNOS 蛋白発現増大の機序については、TGZ が iNOS の mRNA の半減期を延長させた<sup>2)</sup>との報告があるが、他の細胞内情報伝達系の関与も想定される。

### 結 論

PGZ は、サイトカインの存在下で血管平滑筋細胞の NO 産生を増加させ、アポトーシスを増強した。またバルーン傷害後の新生内膜肥厚に対して退縮効果を示した。この事実は、PCI 後の再狭窄病変に対する新たな治療戦略となる可能性を示唆するものである。

### 引 用 文 献

- 1) Law RE, Meehan WP, Xi X-P, Graf K, Wuthrich DA, Coats W, Faxon D, Hsueh WA. Troglitazone inhibits vascular smooth muscle cell growth and intimal hyperplasia. *J Clin Invest.* 1996; 98: 1897-1905.
- 2) Hattori Y, Hattori S, Kasai K. Troglitazone upregulates nitric oxide synthesis in vascular smooth muscle cells. *Hypertension.* 1999; 33: 943-948.
- 3) Ikeda U, Simpo M, Murakami Y, Shimada K. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- $\gamma$  Ligands Inhibit Nitric Oxide Synthesis in Vascular Smooth Muscle Cells. *Hypertension.* 2000; 35, 1232-1236.

### 参 考 論 文

- 1) 竹中 孝, 堀本和志, 会沢佳昭, 太田貴文, 石井 純, 児玉奈津子. 冠攣縮性狭心症における 2 年間の冠動脈径追跡. 冠攣縮は冠動脈硬化を促進するか. *心臓* 1994 ; 26 : 573-579.
- 2) 会沢佳昭, 竹中 孝, 堀本和志, 藤原正文, 関口守衛, 前沢秀彦. 2 年間に心筋変性の進行を認めたアルコール性心筋症の 1 例. *心臓* 1996 ; 28 : 422-426.
- 3) 会沢佳昭, 松橋浩伸, 名取俊介, 佐藤伸之, 石井良直, 川村祐一郎, 長谷部直幸, 菊池健次郎, 加藤淳一. 心房頻拍を伴い, 心筋生検にて postmyocarditis の所見を認めた産褥性心筋症の 1 例.  $\beta$  遮断薬療

法の有用性. *心臓* 2000 ; 32 : 491-496.

- 4) Jun-ichi Kawabe, Yoshiaki Aizawa, Naohumi Takehara, Naoyuki Hasebe, Kenjiro Kikuchi. Glucose modifies the cross-talk between insulin and the  $\beta$ -adrenergic signalling system in vascular smooth muscle cells. *J Hypertens* 2000; 18: 1457-1464.
- 5) Naohumi Takehara, Jun-ichi Kawabe, Yoshiaki Aizawa, Naoyuki Hasebe, Kenjiro Kikuchi. High glucose attenuates insulin-induced mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 (MKP-1) expression in vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Acta* 2000; 1497: 244-252.

## 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	會 澤 佳 昭
<p>審査委員長 牛 首 文 隆 ㊞</p> <p>審査委員 笹 嶋 唯 博 ㊞</p> <p>審査委員 菊 池 健 次 郎 ㊞</p>			
<p>学 位 論 文 題 目</p> <p><b>Pioglitazone Enhances Cytokine-Induced Apoptosis in Vascular Smooth Muscle Cells and Reduces Intimal Hyperplasia</b></p> <p>(血管平滑筋細胞におけるピオグリタゾンのサイトカイン存在下アポトーシス増強効果と新生内膜退縮効果)</p>			
<p>動脈硬化の発症・進展や血管内皮障害後の再狭窄などの病態において、種々の炎症性メディエータが重要な役割を果たすと考えられている。これらには、炎症性サイトカインや一酸化窒素 (NO) などが含まれる。近年、インターロイキン (IL) -1<math>\beta</math> やインターフェロン (IFN) -<math>\gamma</math> などが、血管平滑筋細胞 (VSMCs) において誘導型NO合成酵素 (iNOS) の発現を誘導することが報告され、これが VSMCs の増殖やアポトーシスに関与することが報告されている。一方、チアゾリジン誘導体が、炎症性サイトカインによる iNOS の発現誘導を増強することも知られている。しかし、VSMCs におけるチアゾリジン誘導体の iNOS 発現増強作用と血管内膜肥厚との関係に関しては、不明な点が多く残されている。</p>			

そこで本研究は、ラット大動脈からの培養 VSMCs を用いて、IL-1 $\beta$  と IFN- $\gamma$  による iNOS 発現誘導や、それに起因するアポトーシスに対するチアゾリジン誘導体であるピオグリタゾンの効果を検討した。また、これらの機構が関与すると考えられている病態モデルであるラット総頸動脈バルーン擦過モデルを用いて、ピオグリタゾンの内膜肥厚に対する効果を解析した。

その結果、培養 VSMCs における IL-1 $\beta$  と IFN- $\gamma$  による iNOS 発現誘導を、ピオグリタゾンは有意に増強するとともに、産生された NO による VSMCs のアポトーシス作用をも増強した。また、このピオグリタゾンの作用は、PPAR $\gamma$  のアゴニストである 15d-PGJ<sub>2</sub> によっては再現されず、その作用機構として PPAR $\gamma$  の活性化以外の機構が示唆された。一方、ラット総頸動脈バルーン擦過モデルでは、内皮剥離後 2 週間で新生内膜肥厚が観察されたが、その後 1 週間ピオグリタゾンを投与することにより、新生内膜でのアポトーシス細胞の増加と内膜肥厚の有意な退縮が観察された。

以上の結果、ピオグリタゾンは、VSMCs における炎症性サイトカインによる iNOS の発現誘導を増強することにより、NO を介する VSMCs のアポトーシスを増強することが明らかにされた。さらに、この作用により、ピオグリタゾンは一旦形成された新生内膜肥厚を退縮させることが証明された。この成果は、カテーテルによる血行再建術後に認められる血管再狭窄に対し、ピオグリタゾンが新たな治療戦略となる可能性を示唆するものであり、その意義は大きいものと考えられる。

なお、論文提出者に対し各審査委員より、本論文とその関連領域に関して試問が行われ、適切な回答が得られた。

以上より、本論文は博士の学位論文として適切であると判定した。