

学位論文題名

Angiogenesis induced by advanced glycation end products
and its prevention by cerivastatin

(後期糖化反応生成物による血管新生誘導及び
血管新生阻止におけるセリバスタチン効果についての検討)

学位論文内容の要旨

後期糖化反応生成物 (Advanced glycation end products 以下AGE)は蛋白の非酵素的糖化反応によって生成され、糖尿病状態では、高血糖持続に伴いAGEの形成、蓄積が促進されることが知られている。AGEはグルコース以外の還元糖からも生成され、糖尿病患者には様々なAGEが存在することが報告されている。糖尿病にみられる特有の血管合併症の成因は今だ明らかにされていないが、AGEも成因の一つと考えられている。糖尿病の細小血管障害である糖尿病網膜症においては、AGEは周皮細胞の脱落を誘発し、内皮細胞においては血管内皮増殖因子 (Vascular endothelial growth factor 以下VEGF)のオートクライン産出を介して血管新生、血栓傾向を招くと考えられている。しかし、多様なAGEが血管新生活性を持ちうるかは不明であり、また血管新生誘導における分子機構も十分明らかにされていない。我々は、多様なAGEが血管新生活性を持ちうるか検討し、血管新生誘導における分子機構について解析をおこなった。

また近年、高脂血症治療薬であるHMG-CoA還元酵素阻害剤(Hydroxymethylglutaryl CoA reductase inhibitor)であるスタチンは本来コレステロールの生成を阻害する薬剤として開発されたが、脂質の低下とは無関係に、心血管系イベントの抑制につながる多種多様な作用を持つことが報告されている。この機序の一つとして、スタチンがmevalonateからisoprenyl基への生成を阻害することによって、RasやRhoなどの細胞内情報伝達物質であるsmall G proteinのfarnesyl化やgeranylgeranyl化が抑制され、細胞内情報伝達物質としての機能が阻害されるためと考えられている。動脈硬化における平滑筋細胞の増殖、遊走や、大動脈のNO産出ではその関与が報告されているが、細小血管、特に糖尿病細小血管障害においてはその効果はまだ十分検討されていない。そこで我々は、スタチンがAGEの血管新生誘導に影響を及ぼすか合わせて検討をおこなった。

まず我々は、bovine serum albumin(以下BSA)とglyceraldehyde, glycolaldehydeなどの還元糖からAGEを生成し、AGEとnon-glycated BSAをヒト皮膚微小血管内皮細胞に添加し、DNA合成能、管腔形成能、VEGFmRNA産生、Angiopoietin1, 2のmRNAの比較をおこなったところ、glyceraldehyde, glycolaldehyde由来のAGEはBSAに比べ、DNA合成能、管腔形成能、VEGFmRNA、Angiopoietin2 mRNA産出が亢進がみられ、これらのAGEも血管新生活性を持ちうるということが明らかにされた。またAGEの血管新生における分子機構を明らかにするため、Receptor for AGE(以下RAGE)の関与、転写因子nuclear factor- κ B(以下NF- κ B), activator protein-1(以下AP-1)活性を調べるとともに、各転写因子阻害剤、さらにRasの阻害剤を用いVEGFmRNA産出への影響について検討した。その結果、内皮細胞にRAGEを過剰発現させると、AGEのDNA合成能はさらに亢進がみられた。

転写因子NF- κ B, AP-1の活性化がみられたが、これらの阻害剤はRasの阻害剤と同様に VEGFmRNAの産出を抑制した。またスタチンがAGEの血管新生活性に及ぼす影響については、DNA合成能、管腔形成能、転写因子活性、VEGFmRNA産生を検討したところ、スタチン投与により血管内皮細胞におけるAGEの作用は完全に抑制された。

以上から、AGEが微小血管内皮細胞に働き、増殖と管腔形成を促進する分子機構には RAGEを介したRas、転写因子NF- κ B, AP-1の活性化とそれに引き続くオートクライン VEGFの産出の亢進が関わるということが明らかとなった。Angiopoietin2は、Angiopoietin1に拮抗し、内皮細胞と周皮細胞との接着安定化を妨げ、VEGF存在下において血管新生を促進させることが報告されている。糖尿病状態では、AGEによるAngiopoietin2の産出亢進によって、血管の安定化が低下し、周皮細胞の脱落がおこることにより、VEGFとともに血管新生を促進させると考えられた。スタチンを内皮細胞にAGEとともに添加すると、AGEによる転写因子NF- κ B, AP-1の活性化とVEGFの産出亢進が抑えられ、血管新生活性が抑制されることがわかった。また、NF- κ B, AP-1の阻害剤やRasの形成阻害剤の投与でもスタチンと同様にAGEの作用が完全に抑制された。スタチンはRasのfarnesyl化を阻害することにより、AGEの血管新生活性を抑制すると考えられた。スタチンは、新たなAGE阻害剤、抗血管新生剤となりうるかもしれない。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小 池 隆 夫

副 査 教 授 長 嶋 和 郎

副 査 教 授 大 野 重 昭

学 位 論 文 題 名

Angiogenesis induced by advanced glycation end products and its prevention by cerivastatin

(後期糖化反応生成物による血管新生誘導及び
血管新生阻止におけるセリバスタチン効果についての検討)

学位論文の内容は、糖尿病網膜症の成因の一つと考えられる後期糖化反応生成物 (advanced glycation end products 以下 AGE) による血管新生誘導の分子機構の解明と HMG-CoA 還元酵素阻害剤であるセリバスタチンの血管新生誘導阻害効果についての検討である。血管新生誘導の分子機構については、AGE が AGE 受容体 (RAGE) を介して Ras を活性化させ、NF- κ B, AP-1 の転写活性を亢進させることにより、VEGF の遺伝子発現を促進し、内皮細胞にオートクラインに血管新生を誘導すると考えられ、セリバスタチンの血管誘導抑制効果は Ras の脂質修飾を阻止することによって AGE のシグナル伝達を阻害することによって由来するという内容であった。質疑応答では長嶋教授から、用いた血管内皮細胞の種類について、NF- κ B, AP-1 のどちらか一方だけでも VEGF の発現を抑制する理由、AGE の RAGE, Ras, NF- κ B, AP-1 以外の伝達物質について、さらに VEGF mRNA 発現量とタンパク発現量の解離についての質問があった。これに対し、用いた細胞はヒト皮膚微小血管内皮細胞であること、VEGF 発現には NF- κ B と AP-1 は同時に結合する必要が考えられること、その他のシグナル伝達物質としては MAPK の存在がわかっていること、VEGF タンパクは細胞外に放出される以外に膜に結合している可能性があるためとの解答があった。大野教授からは今回用いた細胞以外のアッセイ系の検討、AGE が血管新生誘導以外に血管閉塞などの病態に関与している可能性、網膜症と他のサイトカインとの関連性、この研究の臨床への貢献についての質議があり、解答は *in vivo* のアッセイは網膜症モデルがないため難しく今回は微小血管内皮細胞で解析をおこなったこと、AGE には血栓形成促進や白血球凝集促進作用も認められること、現在網膜症と関連するサイトカインとして VEGF 以外に MCP-1, ICAM やオステオポンチンも報告されていること、今回の研究により既存のスタチン製剤が網膜症の治療になりうる可能性があるというものであった。小池教授からは、すべての AGE が RAGE に結合するか、なぜわざわざ RAGE のトランスフェクションをおこなったか、スタチンの網膜症への効果についてのスタディはあるかとの質問があり、それに対し、AGE の一部が RAGE に結合することは知られているが、まだ多くの AGE については不明であること、RAGE のトランスフェクションの理由は、AGE 作用に対する影響も評価するため、スタチンの網膜症に対するスタディはまだ行われていないとの解答があった。上出教授からは、スタチンの組織分布と、スタチンは他のタンパクを低下させるか、Rho の関与はないか、細胞遊走もみるとよかったのでは

という質問に対し、スタチンは肝臓以外にも血管内皮細胞にも分布すると考えられること、スタチンは PAI-1 などの動脈硬化に関連するタンパクも低下させること、指摘通り細胞遊走で Rho の関与を検討することも重要と思うとの解答があった。

本研究は、糖尿病網膜症の血管新生のメカニズムを分子レベルで解明し、そのメカニズムに基づいて、既存のスタチン製剤が網膜症の発症、進展を抑制しうることを見出し、臨床応用に発展しうるという点で高く評価され、今後、抑制効果の評価が期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。