

学位論文題名

Coronary capillary network remodeling and hypofibrinolysis in aged obese diabetic rats : Implications for increased myocardial vulnerability to ischemia

(加齢肥満糖尿病ラットにおける冠毛細血管ネットワークの再構築と低線維素溶解状態は虚血に対する心筋の脆弱性を強める可能性がある)

学位論文内容の要旨

I. 背景

糖尿病は冠動脈疾患、脳卒中、心不全などの心血管病に対する重要な危険因子である。米国のフラミンガム研究では糖尿病患者の冠動脈疾患の発症リスクは男性で非糖尿病患者の約2倍、女性で約3倍に達した。糖尿病性心筋障害は大血管障害のない糖尿病患者にも起こり、また明らかな虚血がなくても代謝異常の程度に関係して起こり得る。

動物モデルが糖尿病と心血管病変の研究に有用である。内臓脂肪型肥満、II型糖尿病、高脂血症を併せ持つ Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty ラット (OLETF ラット) は II 型糖尿病モデルラットとして用いられる。視床下部 CCK-A receptor 遺伝子欠損が満腹感欠如をおこして過食と肥満を引き起こす。経口血糖負荷試験では10週齢ですでに糖負荷後の高血糖、高インスリン血症が認められた。OLETF の網膜や膵臓毛細血管についての報告はあるが心臓における毛細血管の変化の報告はまれである。

Plasminogen activator inhibitor type-I (PAI-I) は、線維素溶解を抑制し易血栓性を惹起するほかに、細胞周囲の蛋白分解を阻害し細胞の遊走を調節することで、血管の再構築に関連する。糖尿病患者では血中 PAI-1 レベルが高く血栓性心血管疾患に罹患しやすい一因と考えられている。

II. 目的

OLETF ラットを用いて2型糖尿病と加齢に伴う冠毛細血管再構築の変化を検討する。

III. 方法

20、40、60週齢の OLETF ラットとその対照となる Long-Evans Tokushima Otsuka (LETO) ラットについて検討した。血圧は大腿動脈にカニューレーションし観血的に測定した。1日絶食後の血糖はグルコースオキシダーゼ法にて測定し、インスリンはラットインスリンに特異的な ELISA 法で測定した。ラットの左室毛細血管の細動脈性部位には alkaline phosphatase (AP)、細静脈性部位には dipeptidylpeptidase IV (DPPIV) と2つの酵素があるので Koyama らの方法により二重染色して動脈性毛細血管を青、中間性を紫、静脈性を赤に染めることが可能である。この方法で細動脈性部位、中間性部位、細静脈性部位を染め分け、デジタイザーでピクセルをカウントして3者を区別し、左室毛細血管密度及びその組成を比較した。二重染色の結果から、毛細血管密度、毛細血管数対心筋細胞数比 (以下 C:M ratio)、capillary domain area (1本の毛細血管が灌流する面積) について解析した。

PAI-I 活性は t-PA 添加後の残存する t-PA 活性を吸光度を測定することにより間接的に求めた。

#### IV. 結 果

体重は、LETO に比べ OLETF で有意に増加した。OLETF の心重量も LETO に比べ有意に増加した。体重増加に伴い心重量も増加したため LETO と OLETF の心重量/体重比は OLETF の方が低い傾向にあった。平均血圧は、LETO に比べ OLETF で有意に上昇した。血糖は、20、40週で LETO に比べ OLETF で高い傾向にあり、60週では有意差なかった。インスリン濃度は、20、60週で LETO と OLETF で有意差はなく、40週で OLETF で有意に高かった。20週では OLETF ラットでは LETO に比べ総毛細血管密度の増加が認められた。40、60週では差がなく、両者とも加齢に伴い総毛細血管密度は減少した。糖尿病による代謝障害、微小循環障害に対する毛細血管密度増加による代償性酸素運搬の改善が、糖尿病進行と加齢により、破綻したことが示唆された。毛細血管密度を組成別に見ると、LETO に比べ OLETF での毛細血管密度の減少は、中間性および静脈性毛細血管成分の減少によるものと思われた。毛細血管数対心筋細胞数比 (C:M ratio) は加齢により、各群とも上昇する傾向にあった。これは、毛細血管密度の減少により、心筋細胞もより減少していったことが考えられた。1本の毛細血管の支配する面積すなわち capillary domain area は LETO に比べ、OLETF では20週で低く、酸素供給に有利であった適応が、糖尿病進行と加齢とともに面積が増大し、40、60週では LETO と近似しており、代償機能の破綻が考えられた。PAI-I 活性は OLETF で LETO に比べ、加齢と共に増加した。

#### V. 考 察

20週では LETO に比べ OLETF ラットでは毛細血管密度の増加が認められた。これは肥大した心筋細胞に十分な酸素と栄養を供給するために毛細血管が増加して、心筋細胞1個あたりの毛細血管の数が増えた適応と考えられる。毛細血管密度の増加は、糖尿病により微小循環の障害から来る虚血に対する適応反応とも考えられる。毛細血管のうち特に動脈性毛細血管が増加し、酸素を豊富に含んだ動脈性血液の流れている毛細血管が増えていると考えられる。40、60週では毛細血管密度に差がなかった。糖尿病による代謝障害、微小循環障害に対する毛細血管密度増加による代償性酸素運搬の改善が、糖尿病進行と加齢により、破綻したことが示唆された。PAI-1 の増加は、線維素溶解を抑制し易血栓性を惹起するほかに、間質における細胞周囲の蛋白分解を抑制し、細胞の遊走を減少させる。その結果、代償適応した毛細血管再構築が抑制される可能性が考えられた。2型糖尿病における心筋微小循環の適応が失われると、虚血や心機能障害に陥りやすくなることが示唆された。OLETF の加齢による冠毛細血管ネットワークの再構築の特徴をヒトへ外挿していくことが2型糖尿病にみられる心筋障害のメカニズム解明に寄与することが示唆された。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 川 口 秀 明  
副 査 教 授 吉 岡 充 弘  
副 査 教 授 北 畠 顕

学 位 論 文 題 名

## Coronary capillary network remodeling and hypofibrinolysis in aged obese diabetic rats : Implications for increased myocardial vulnerability to ischemia

(加齢肥満糖尿病ラットにおける冠毛細血管ネットワークの再構築と低線維素溶解状態は虚血に対する心筋の脆弱性を強める可能性がある)

糖尿病は冠動脈疾患、脳卒中、心不全などの心血管病に対する重要な危険因子である。糖尿病性心筋障害は大血管障害のない糖尿病患者にも起こり、また明らかな虚血がなくても代謝異常の程度に関係して起こり得る。内臓脂肪型肥満、II型糖尿病、高脂血症を併せ持つ Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty ラット (OLETF ラット) は II 型糖尿病モデルラットとして用いられる。OLETF の網膜や膵臓毛細血管についての報告はあるが心臓における毛細血管の変化の報告はまれである。

Plasminogen activator inhibitor type-I (PAI-I)は、糖尿病患者では血中レベルが高く血栓性心血管疾患に罹患しやすい一因と考えられている。

OLETF ラットを用いて II 型糖尿病と加齢に伴う冠毛細血管再構築の変化を検討する。

20、40、60 週齢の OLETF ラットとその対照となる Long-Evans Tokushima Otsuka (LETO) ラットについて検討した。血圧、血糖、インスリン濃度、PAI-I 活性を測定した。ラットの左室毛細血管の細動脈性部位には alkaline phosphatase (AP)、細静脈性部位には dipeptidylpeptidase IV (DPPIV)と 2 つの酵素があるので、二重染色して細動脈性部位、中間性部位、細静脈性部位を染め分け、毛細血管密度、毛細血管数対心筋細胞数比 (以下 C:M ratio)、capillary domain area (1本の毛細血管が灌流する面積)について解析した。

体重、心重量は、LETO に比べ OLETF で有意に増加した。心重量/体重比は OLETF の方が低い傾向にあった。平均血圧は、LETO に比べ OLETF で有意に上昇した。血糖は、20、40 週で LETO に比べ OLETF で高い傾向にあり、60 週では有意差なかった。インスリン濃度は、20、60 週で LETO と OLETF で有意差はなく、40 週で OLETF で有意に高かった。20

週では OLETF ラットでは LETO に比べ総毛細血管密度の増加が認められた。40、60 週では差がなく、両者とも加齢に伴い総毛細血管密度は減少した。糖尿病による代謝障害、微小循環障害に対する毛細血管密度増加による代償性酸素運搬の改善が、糖尿病進行と加齢により破綻したことが示唆された。毛細血管密度を組成別に見ると、LETO に比べ OLETF での毛細血管密度の減少は、中間性および静脈性毛細血管成分の減少によるものと思われた。C:M ratio は加齢により、各群とも上昇する傾向にあった。これは、毛細血管密度の減少により、心筋細胞もより減少していったことが考えられた。capillary domain area は LETO に比べ、OLETF では 20 週で低く、酸素供給に有利であった適応が、糖尿病進行と加齢とともに面積が増大し、40、60 週では LETO と近似しており、代償機能の破綻が考えられた。PAI-I 活性は OLETF で LETO に比べ、加齢と共に増加した。

PAI-1 の増加は、線維素溶解を抑制し易血栓性を惹起するほかに、間質における細胞周囲の蛋白分解を抑制し、細胞の遊走を減少させる。その結果、代償適応した毛細血管再構築が抑制される可能性が考えられた。II 型糖尿病における心筋微小循環の適応が失われると、虚血や心機能障害に陥りやすくなることが示唆された。

口頭発表に際し、吉岡教授から OLETF ラットの糖尿病発現時期について、OLETF20 週以前の毛細血管密度や酸素運搬の代償機構に関する報告について、OLETF で 40 週で静脈性が減る理由について、動脈性毛細血管と静脈性毛細血管の区別の根拠についての質問がなされた。北畠教授から OLETF の 20 週における代償機能は何によって起こっているかについて、OLETF の拡張機能障害とコラーゲン含有量について、コラーゲン定量の方法について、糖尿病による心筋毛細血管ネットワークの再構築と治療法に関する報告についての質問がなされた。また、川口教授から PAI-I が血管新生に及ぼす影響について、PAI-I と VEGF との関係について、20 週ラット心筋においてのみ毛細血管密度が上昇する機序について質問がなされた。いずれの質問に対しても、申請者は過去の実験データや関連論文を引用し、概ね妥当な回答を行った。

この論文は、II 型糖尿病と加齢に伴う冠毛細血管再構築の経時的変化の解明と治療への新しいアプローチとして意義のあるものとして高く評価され、今後この分野における更なる研究の発展が期待される。審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（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。