

原 著

新生内膜肥厚モデルにおける Thiazolidine 系インスリン感受性 改善薬 Pioglitazone の血管保護作用

東京女子医科大学 医学部 第二内科学 (主任: 出村 博教授)

シズメ 鎮目 ヒロシ 浩・吉本 ヨシモト 貴宣・成瀬 タカノブ ナルセ 光栄・出村 ミツヒデ デムラ 博 ヒロシ

(受付 平成 10 年 8 月 27 日)

Vasculo-protective Effect of Insulin Sensitizing Thiazolidine Derivative Pioglitazone in Vascular Neo-intimal Formation

Hiroshi SHIZUME, Takanobu YOSHIMOTO,
Mitsuhide NARUSE and Hiroshi DEMURA

Department of Medicine (Director: Prof. Hiroshi DEMURA), School of Medicine,
Tokyo Women's Medical University

It has been demonstrated that thiazolidine, a novel insulin sensitizing agent, has inhibitory effects on the growth of cultured vascular smooth muscle cells (VSMC) in vitro, in addition to its effects on glucose and lipid metabolism. This study was undertaken to examine the in vivo effects of the thiazolidine compound pioglitazone (PIO) on carotid neo-intimal thickening after endothelial injury in Wistar rats. PIO treatment (3 mg/kg/day, for 1 week before and 2 weeks after endothelial injury) remarkably decreased neo-intimal cross-section areas ($63.8 \pm 4.9 \times 10^3 \mu\text{m}^2$ vs $196 \pm 7.6 \times 10^3 \mu\text{m}^2$ in controls, $p < 0.05$), bromodeoxyuridine uptake in the neo-intima, (as a marker of DNA synthesis), and expression of EIIIA fibronectin as a marker of the synthetic phenotype of VSMC. These results suggest that PIO has direct vasculo-protective effects in acute vascular injury in vivo by inhibition of VSMC proliferation and through phenotypic change of VSMC.

緒 言

Thiazolidine 系化合物はインスリン感受性改善薬として糖尿病治療に応用されつつある¹⁾。この化合物は内因性のインスリン分泌を増加することなく、骨格筋等の標的組織におけるインスリン感受性を改善させ、ブドウ糖の取り込みを促進することから、糖尿病、特に、インスリン抵抗性/高インスリン血症を伴う肥満型のインスリン非依存型糖尿病での有用性が示されている¹⁾²⁾。インスリン抵抗性/高インスリン血症は高血圧や動脈硬化症において重要な病態生理学的役割を担うことか

ら³⁾、本系統の薬剤は糖、脂質代謝異常の改善に加えて、インスリン抵抗性/高インスリン血症の改善により糖尿病合併症の進展を防止することが予想される。事実、肥満、糖尿病、高インスリン血症、高血圧のいわゆる「死の4重奏」のモデル動物とされる Wistar fatty ラットにおいて、本系の薬剤である pioglitazone (5-[4-[2-(5-ethyl-2-pyridil)ethoxy] benzyl]-2,4-thiazolidinedione; PIO) が、糖・脂質代謝に加えて、降圧効果および腎・血管保護作用を示すことが報告されている⁴⁾⁵⁾。

ところで動脈硬化や血管形成術後の再狭窄等の

病態においては血管平滑筋細胞の増殖が中心的役割を担うが、それにはホルモンや増殖因子など種々の mitogen の活性化が関与する。Thiazolidine 系化合物は in vitro において種々の mitogen 刺激による血管平滑筋細胞の増殖を強力に抑制することが報告⁶⁾⁻⁹⁾され、これらの化合物が糖、脂質代謝の改善を介さず、血管に対して直接的な抗動脈硬化作用を示す可能性も示唆される。しかし、in vivo におけるその作用の詳細は不明である。そこで本研究では血圧、糖代謝ともに正常なラットにおいて、PIO が頸動脈内皮傷害後の新生内膜肥厚に及ぼす影響とその機序について検討した。

対象および方法

1. 対象と実験プロトコール

動物実験は東京女子医科大学の動物実験倫理委員会規定を遵守した(承認番号 98-83)。

8 週齢の Wistar 系雄ラット(日本チャールズリバー)を、温度、湿度および照明サイクルの管理下、水、食餌の自由摂取条件で飼育した。

10 週齢の時点でラットを PIO 群と vehicle 群の 2 群に分け、前者では PIO (3 mg/kg/day) を 5% アラビアゴム懸濁液として、朝 1 回胃管を用いて投与し、後者では 5% アラビアゴム懸濁液のみを投与した。7 日後、Fishman らの方法¹⁰⁾に基づき空気乾燥により頸動脈内皮を傷害した。すなわち、ネンブタール麻酔(50 mg/kg, i. p.) 下で頸部を正中切開し、第 1 気管軟骨から第 8 気管軟骨にかけて約 1 cm の右総頸動脈を周囲の結合織から剥離し、両端を 4-0 絹糸で結紮した。30 ゲージ針で穿刺し、血液を生理食塩水で洗浄除去後、25 ml/min の窒素ガスを 3 分間通気し空気乾燥による血管内皮傷害を行った。結紮を解除し、綿棒で穿刺部を圧迫止血して血流再開を確認後、切開部を縫合した。

術後、PIO あるいは vehicle を更に 14 日間投与した。術後 14 日目、tail cuff 法で収縮期血圧を測定後、各ラットをネンブタール麻酔下で脱血し、4% パラフォルムアルデヒドで全身を灌流固定して左右の総頸動脈を摘出した。16 時間の後固定の後、脱水処理、パラフィン包埋し、以下の組織学

的検索に供した。また、脱血の際に得られた血液検体を用いて血糖および血漿インスリン濃度を測定した。

2. 頸動脈新生内膜断面積の定量的評価

4μm 厚の頸動脈切片を作製し、ヘマトキシリン-エオジンで染色した。光学顕微鏡(オリンパス Model BHS 323) 付属の自動撮影装置(オリンパス Model PM 20) で 35 mm カラーライドフィルムに撮影し、フィルムスキャナー(POLASCAN 35, ポラロイド) でコンピュータ(Power Macintosh 6200/75) に画像取り込み後、NIH Image¹¹⁾ を用いて頸動脈新生内膜の断面積を計測した。スケールのキャリブレーションは、ステージマイクロメーター(ニコン, 0-1 mm/100) を同様に撮影し、画像処理して行った。新生内膜の断面積は内弾性板と血管内腔で境界された部分の面積とした。

3. Bromodeoxyuridine (BrdU) 取り込みを指標とした新生内膜 DNA 合成の検討

チミジンのアナログである BrdU は新生内膜の増殖細胞核に取り込まれることから DNA 合成の指標となる。内皮傷害後、BrdU (30 mg/kg) を連日皮下投与し、灌流固定した切片で酵素抗体法を用いた BrdU 免疫染色キット(日本アマシャム) で染色した。塩化ニッケル含有 diaminobenzidine (DAB) で発色後、メチルグリーンで核染色を行った。新生内膜の細胞中、BrdU 染色陽性細胞の比率を BrdU ラベリング指数($[\text{BrdU 陽性細胞}/\text{総細胞数}] \times 100$) として算出し、新生内膜細胞の DNA 合成能の指標とした。

4. フィブロネクチン EIIIA ドメインの免疫組織化学的検討

正常血管中膜を構成する分化型血管平滑筋細胞は収縮型フェノタイプを示す一方、動脈硬化病変部位では合成型フェノタイプを示す。細胞フィブロネクチンであるフィブロネクチン EIIIA ドメインは合成型フェノタイプの細胞でのみ特異的に合成される¹²⁾。そこでフィブロネクチンの EIIIA ドメインに対する特異的なモノクローナル抗体(IST-9)¹²⁾¹³⁾ [Dr. L.Zardi (Laboratory of Cell Biology, Istituto Nazionale per la Ricerca sul Cancro, Genoa, Italy) より供与] を用いて、新生内膜

表 頸動脈内膜肥厚モデルラットにおいて pioglitazone 投与が収縮期血圧, 血糖, 血漿インスリン濃度に及ぼす影響

	n	収縮期血圧 (mmHg)	血糖 (mg/dl)	血漿インスリン濃度 (ng/ml)
Vehicle 群	5	116 ± 5	153 ± 9	9.5 ± 1.4
PIO 群	5	114 ± 6	147 ± 10	8.8 ± 2.0

数値は平均値 ± 標準誤差, PIO; pioglitazone.

を免疫組織化学的に染色した. すなわち, 4 μm 厚の頸動脈切片を脱パラフィン処理, 洗浄後, 1%ウシ血清アルブミン含有リン酸緩衝液中で15分間室温でブロッキングし, 一次抗体 (IST-9) と 4°C 12時間インキュベーション後, Vectastain ABC キット (ベクター社, Burlingame, CA) により免疫組織染色を行った. 免疫染色活性を半定量的に比較するため Ravalli らの方法¹⁰⁾に準じて, 染色程度を 0~3 の 4 段階 (0: 染色なし, 1: 弱く染色, 2: 中等度に染色, 3: 強く染色) に分類し, 染色指数とした.

5. 統計学的解析

いずれの検討も各群 n=5 で実施し, 結果は平均値 ± 標準誤差で表した. 2 群間の平均値の差の検討は Student t test で行った. $p < 0.05$ を有意水準とした.

結 果

頸動脈内皮傷害 14 日後の収縮期血圧, 随時血糖, 血漿免疫活性インスリン濃度は vehicle 群と

PIO 群間で有意差を認めなかった (表).

頸動脈内皮傷害 14 日後の頸動脈断面のヘマトキシリン-エオジン染色を図 1 に示す. 非傷害側においては vehicle 群, PIO 群いずれにおいても頸動脈内膜はほとんど存在せず, 内膜断面積は計測不能であった (図 1 a). vehicle 群では傷害側 (図 1 b) で著明な新生内膜肥厚 (断面積: $196 \pm 7.6 \times 10^3 \mu\text{m}^2$, n=5) を認めたが, PIO 群では内膜断面積の著明な減少 ($63.8 \pm 4.9 \times 10^3 \mu\text{m}^2$, n=5, $p = 0.005$) を認めた (図 1 c, 図 2 a).

Vehicle 群における傷害側血管中膜には細胞核への BrdU 取り込みを認めなかったのに対して, 肥厚した新生内膜層の細胞には核への著明な BrdU 取り込み (BrdU ラベリング指数: $26.1 \pm 3.1\%$, n=5) を認め, 合成型フェノタイプの血管平滑筋細胞の増殖が示された (図 3 a). 一方, PIO 群では新生内膜肥厚の著明な軽減と並行して同部位への BrdU 取り込みも有意に減少 (BrdU ラベリング指数: $14.0 \pm 1.6\%$, n=5, $p = 0.01$) した (図 3 b, 図 2 b).

フィブロネクチン EIIIA ドメインは vehicle 群の傷害側頸動脈の新生内膜において強い染色を認めたのに対して, 中膜には染色を認めなかった (図 4 a). 一方, PIO 群では新生内膜肥厚の軽減と並行して同部位のフィブロネクチン EIIIA ドメイン染色の明らかな減少を認めた ($p = 0.01$) (図 4 b, 図 2 c).

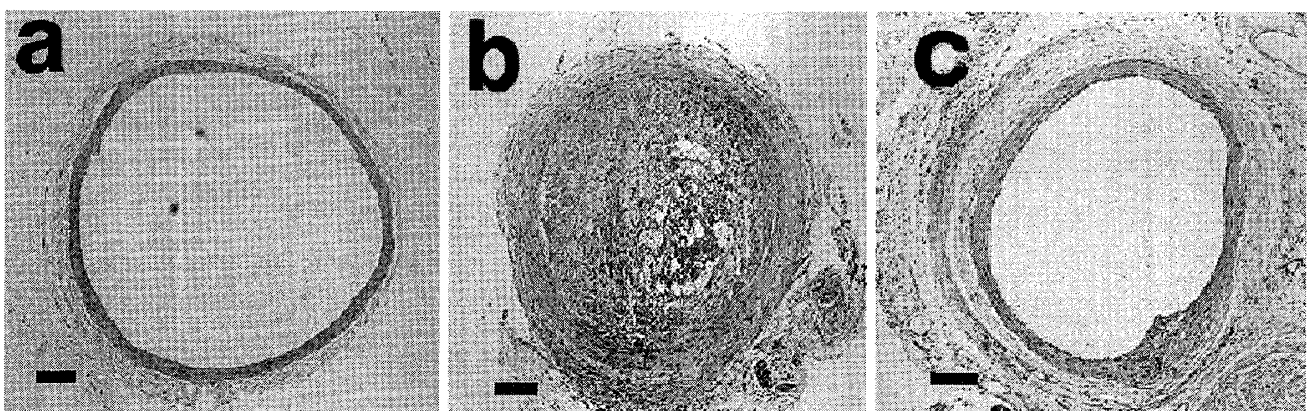


図 1 頸動脈内皮傷害に伴う新生内膜肥厚と PIO 投与の影響

a: vehicle 群における非傷害側の頸動脈断面, b: vehicle 群における傷害側の頸動脈断面, c: PIO 群における傷害側の頸動脈断面, ヘマトキシリン-エオジン染色, Bar = 100 μm.

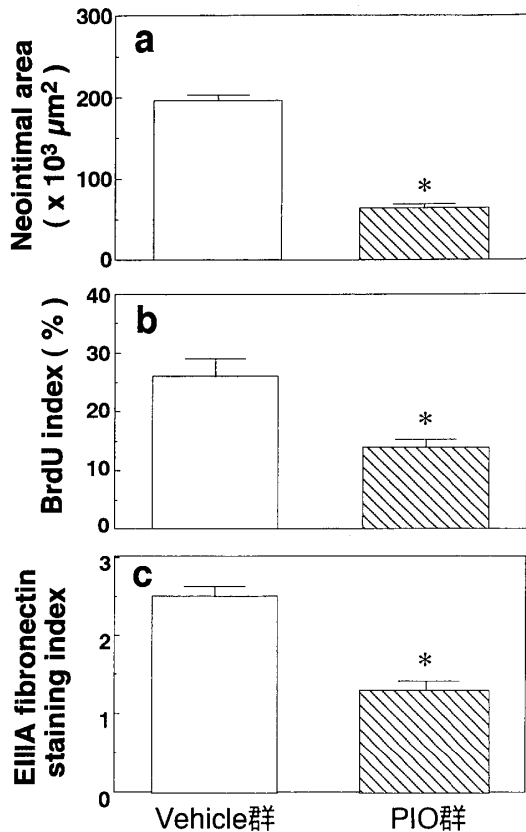


図2 PIO投与が頸動脈内皮傷害に伴う新生内膜肥厚部分の断面積 (a), BrdUラベリング指数 (b) およびフィブロネクチン EIIIA ドメイン染色指数 (c) におよぼす影響の半定量的比較
数値は平均値 \pm 標準誤差 (n=5), *p<0.05 vs vehicle 群.

考 察

Thiazolidine 系化合物は糖, 脂質代謝の改善作用, 血圧降下作用を介して臓器保護作用を示すことが報告^{4)~6)}されているが, 血管に対する直接的な

保護作用の詳細は明らかではない. 今回, 著者らは糖, 脂質代謝, 血圧のいずれも正常なラットにおいて, 空気乾燥法による頸動脈内皮傷害後の内膜肥厚に対する PIO の効果を検討した. 今回検討に用いた Wistar 系ラットの頸動脈では非傷害側では内膜はほとんど存在せず, 傷害側での内膜肥厚は内皮傷害による新生内膜形成を示している. 今回の検討で本剤は血糖, 血漿インスリン濃度, 血圧に影響することなく新生内膜肥厚を著明に抑制することが明らかとなった. この結果は同じく thiazolidine 系化合物である troglitazone が, バルーンカテーテルによるラット大動脈内皮傷害後の新生内膜肥厚を有意に抑制したとの報告⁷⁾とも一致しており, 本剤が, 代謝や血行動態の変化を介さず, 血管壁に対して直接的な新生内膜肥厚抑制作用を示すことが示された.

血管内皮傷害後の新生内膜肥厚には, 内皮傷害に伴い活性化される種々の mitogen が血管平滑筋細胞の遊走, 増殖を促進する¹⁵⁾. Thiazolidine 系化合物は in vitro において, 血清, インスリン, 血小板由来成長因子, アンジオテンシン II 等の mitogene 刺激による血管平滑筋細胞の増殖を強力に阻害することが報告^{6)~9)}されているが, in vivo における作用は明らかではない. 今回, 著者らは新生内膜部位における DNA 合成を BrdU 取り込みを指標として検討した結果, PIO 投与による BrdU 取り込みの顕著な減少を認めた. 以上より PIO は in vivo においても in vitro と同様に血管平滑筋細胞の DNA 合成/細胞増殖を抑制するこ

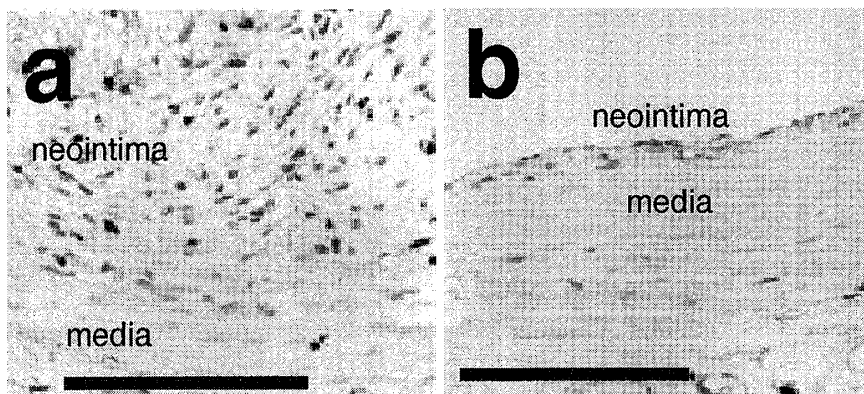


図3 頸動脈内皮傷害に伴う新生内膜肥厚部分における BrdU 免疫染色
a: vehicle 群, b: PIO 群, Bar=100 μm .

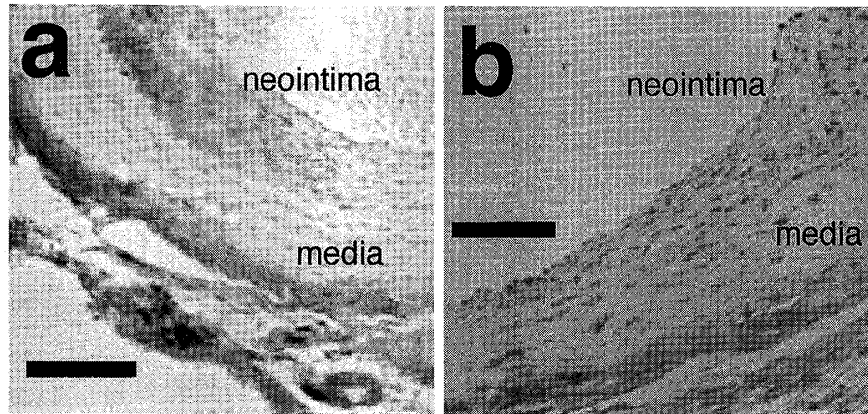


図4 頸動脈内皮傷害に伴う新生内膜肥厚部分におけるフィブロネクチン EIIIA ドメインの免疫染色
a: vehicle 群, b: PIO 群, Bar=100 μ m.

とにより、新生内膜肥厚阻害作用を示すと考えられる。

血管平滑筋細胞には、主に血管中膜に存在し収縮装置である筋フィラメントの豊富な“収縮型”と培養細胞に代表される、筋フィラメントは乏しい反面、活発な増殖能、細胞外マトリックス合成能を示す幼若な“合成型”の2種のフェノタイプが存在する。動脈硬化病変に見られる血管平滑筋細胞の増殖に際しては、収縮型から合成型へのフェノタイプの変換が重要な役割を担っている¹⁵⁾¹⁶⁾。そこで著者らは合成型に特異的なフィブロネクチン EIIIA ドメインを指標として、PIOが血管平滑筋細胞のフェノタイプに及ぼす影響を検討した。その結果、PIOは血管平滑筋細胞のフェノタイプが収縮型から合成型に変換することを抑制する作用を有することが明らかとなった。この結果は同じく thiazolidine 化合物である ciglitazone が培養血管平滑筋細胞において収縮型の指標である α アクチンの発現を増加させるとの報告⁹⁾とも一致している。それ故、thiazolidine 系化合物は血管平滑筋細胞の増殖抑制に加えて、そのフェノタイプ変換をも阻害することにより、抗動脈硬化作用を発現する可能性が考えられた。

Troglitazone は α -tocopherol と立体構造が類似しており強力な抗酸化作用を有することが示唆されている¹⁷⁾。一般に抗酸化剤は抗動脈硬化作用を示すこと¹⁸⁾から、Law ら⁷⁾の報告した troglitazone の血管保護作用もこの抗酸化作用を介する

可能性が考えられる。しかしながら、抗酸化作用を認めないと報告されている PIO¹⁷⁾も troglitazone と同様に強力な血管内膜肥厚抑制作用を示したことから、thiazolidine 系化合物の血管保護作用は抗酸化作用以外の機序の関与がより大であると考えられる。最近、Law ら⁷⁾、Graf ら¹⁹⁾は troglitazone が mitogene 刺激下の培養血管平滑筋細胞において、MAP kinase (ERK 1/ERK 2) あるいはその下流因子の作用を抑制することを報告している。MAP kinase 経路は血管平滑筋細胞の増殖・肥大に中心的な役割を担うこと²⁰⁾から、PIOも MAP kinase 系の抑制を介して作用を発現する可能性も示唆されるが、その細胞内情報伝達系への影響の詳細は不明で今後更に検討が必要である。

結 論

Thiazolidine 系化合物である PIO は、既に報告されているインスリン感受性、糖、脂質代謝の改善効果に加えて、血管に対する直接作用により抗動脈硬化作用を示すことを明らかにした。また、その効果発現には、血管平滑筋細胞の DNA 合成阻害、細胞増殖抑制作用および収縮型から合成型へのフェノタイプの変換抑制作用などの機序が関与することが示唆された。

Pioglitazone を提供していただいた武田薬品工業(株)(大阪)、フィブロネクチン EIIIA ドメインに対するモノクローナル抗体を提供していただいた Dr.L. Zardi (Istituto Nazionale per la Ricerca sul Cancro,

Genoa, Italy) に感謝致します。

文 献

- 1) **Ikeda H, Taketomi S, Sugiyama Y et al** : Effects of pioglitazone on glucose and lipid metabolism in normal and insulin resistant animals. *Arzneim-Forsch* **40** : 156-162, 1990
- 2) **Nolan JJ, Ludvik B, Beerdsen P et al** : Improvement in glucose tolerance and insulin resistance in obese subjects treated with troglitazone. *N Engl J Med* **331** : 1188-1193, 1994
- 3) **Sowers JR, Standley PR, Ram JL et al** : Hyperinsulinemia, insulin resistance, and hyperglycemia: contributing factors in the pathogenesis of hypertension and atherosclerosis. *Am J Hypertens* **6** (Suppl) : 260S-270S, 1993
- 4) **Yoshioka S, Nishino H, Shiraki T et al** : Antihypertensive effects of CS-045 treatment in obese Zucker rats. *Metabolism* **42** : 75-80, 1993
- 5) **Yoshimoto T, Naruse M, Nishikawa M et al** : Antihypertensive and vasculo- and renoprotective effects of pioglitazone in genetically obese diabetic rats. *Am J Physiol* **272** : E989-E996, 1997
- 6) **Dubey RK, Zhang HY, Reddy SR et al** : Pioglitazone attenuates hypertension and inhibits growth of renal arteriolar smooth muscle in rats. *Am J Physiol* **265** : R726-R732, 1993
- 7) **Law RE, Meehan WP, Xi XP et al** : Troglitazone inhibits vascular smooth muscle cell growth and intimal hyperplasia. *J Clin Invest* **98** : 1897-1905, 1996
- 8) **Peuler JD, Phare SM, Iannucci AR et al** : Differential inhibitory effects of antidiabetic drugs on arterial smooth muscle cell proliferation. *Am J Hypertens* **9** : 188-192, 1996
- 9) **Morikang E, Benson SC, Kurtz TW et al** : Effects of thiazolidinediones on growth and differentiation of human aorta and coronary myocytes. *Am J Hypertens* **10** : 440-446, 1997
- 10) **Fishman JA, Ryan GB, Karnovsky MJ** : Endothelial regeneration in the rat carotid artery and the significance of endothelial denudation in the pathogenesis of intimal thickening. *Lab Invest* **32** : 339-351, 1975
- 11) **Rasband WS, Bright DS** : NIH Image: a public domain image processing program for the Macintosh. *Microbeam Anal Soc J* **4** : 137-149, 1995
- 12) **Glukhova MA, Frid MG, Shekhonin BV et al** : Expression of extra domain A fibronectin sequence in vascular smooth muscle cells is phenotype dependent. *J Cell Biol* **109** : 357-366, 1989
- 13) **Carnemolla B, Borsi L, Zardi L et al** : Localization of the cellular-fibronectin-specific epitope recognized by the monoclonal antibody IST-9 using fusion proteins expressed in *E. Coli*. *FEBS Lett* **215** : 269-273, 1987
- 14) **Ravalli S, Szabolcs M, Albala A et al** : Increased immunoreactive endothelin-1 in human transplant coronary artery disease. *Circulation* **94** : 2096-2102, 1996
- 15) **Schwartz SM, Campbell GR, Campbell JH** : Replication of smooth muscle cells in vascular disease. *Circ Res* **58** : 427-444, 1986
- 16) **Thyberg J, Nilsson J, Palmberg L et al** : Adult human arterial smooth muscle cells in primary culture. Modulation from contractile to synthetic phenotype. *Cell Tissue Res* **239** : 69-74, 1985
- 17) **Inoue I, Katayama S, Takahashi K et al** : Troglitazone has a scavenging effect on reactive oxygen species. *Biochem Biophys Res Commun* **235** : 113-116, 1997
- 18) **Berliner JA, Heinecke JW** : The role of oxidized lipoproteins in atherosclerosis. *Free Radic Biol Med* **20** : 707-727, 1996
- 19) **Graf K, Xi XP, Hsueh WA et al** : Troglitazone inhibits angiotensin II-induced DNA synthesis and migration in vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett* **400** : 119-121, 1997
- 20) **Force T, Bonventre JV** : Growth factors and mitogen-activated protein kinases. *Hypertension* **31** : 152-161, 1998