

平成 22 年 5 月 20 日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20790401
 研究課題名（和文）メタボリックシンドローム治療におけるアンジオテンシン II 受容体拮抗薬の有用性の検討
 研究課題名（英文）The investigation into the efficacy of angiotensin receptor blocker against metabolic syndrome
 研究代表者
 鳥羽 裕恵（TOBA HIROE）
 京都薬科大学・薬学部・助教
 研究者番号：90351270

研究成果の概要（和文）：アンジオテンシン II 受容体拮抗薬（ARB）テルミサルタンの有用性について、糖尿病モデルラットを用いて検討し、糖尿病性腎症・血管障害に対して、他の ARB 以上の改善作用が発揮されることを証明した。また、テルミサルタンによる臓器保護効果について、ラット胸部大動脈培養内皮細胞を用いて、過酸化水素水負荷による炎症反応の亢進をテルミサルタンは PPAR γ 活性化作用を介して抑制することを示した。

研究成果の概要（英文）：We have demonstrated that telmisartan inhibited renal and aortic injury in the diabetic rat model and these beneficial effects were stronger than those of other angiotensin receptor blocker (ARB), which have exhibited similar antihypertensive effects to those of telmisartan. In addition, we also showed that treatment with telmisartan suppressed inflammation in the H₂O₂-treated cultured vascular endothelial cells by PPAR γ .

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,400,000	720,000	3,120,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・応用薬理学

キーワード：臨床薬理学、メタボリックシンドローム

1. 研究開始当初の背景

高血圧症は、糖・脂質代謝異常とともにメタボリックシンドロームの一部として発症することが多く、心血管イベントを予防するには降圧のみならず代謝面の改善も含めた治療が重要であると考えられる。Angiotensin II receptor blockers (ARBs)は、降圧作用に加

え、組織の renin angiotensin system (RAS) を抑制することで直接的な臓器保護効果を発揮することが数多く立証されているが、さらに近年、大規模臨床試験により、ARBs による 2 型糖尿病の新規発症を抑制することが報告された (Dahlof B et al. *Lancet*. 2002; 359: 995-1003)。また、ARB には、RAS の抑制のみ

ならず、インスリン感受性改善薬の作用点である peroxisome proliferator-activated receptor- (PPAR-) 活性化作用を有することが発見され(Schupp Met al. *Circulation*. 2004; **109**: 2054-2057)、糖尿病新規発症予防の機序として注目を集めている。また PPAR- の発現が、脂肪細胞のみならず血管組織においても確認されるとともに、PPAR- リガンドによる pleiotropic な抗動脈硬化作用が証明されている。さらに PPAR- リガンドについても同様の報告が見られ、研究代表者は PPAR- リガンドの pioglitazone および PPAR- リガンドの bezafibrate を用いて報告している (Toba H et al. *Eur J Pharmacol*. 2006; **549**: 124-132)。そこで、ARBs や PPARs リガンドが降圧のみならず糖・脂質代謝を介して、さらに直接的な血管組織への作用によっても抗動脈硬化に関与しているか否かについて、in vivo、in vitro において検討する。

2. 研究の目的

(1) in vivo における検討

動脈硬化を誘発する病態モデルとして streptozotocin (STZ) 誘発型糖尿病モデルラットを使用する。ARBs (telmisartan、candesartan、losartan) を用い、血行力学的影響が同等である条件下で、血管障害及び腎障害に対する抑制効果を比較する。また、PPAR- リガンド (pioglitazone)、PPAR- リガンド (bezafibrate) の作用と比較検討する。

(2) in vitro における検討

初年度に立証した ARBs による臓器保護作用について、培養血管内皮細胞を用いて、さらに詳細に検討する。培養細胞に advanced glycation end product (AGE)、angiotensin II などを負荷した際に増大する炎症反応が、ARBs により抑制されること、また PPAR- 拮抗薬 GW9662 を用いることにより ARBs の抗炎症作用の一部が PPAR- を介していることを確認する。

3. 研究の方法

(1) 病態モデルの作成と治療薬の投与

糖尿病モデルラットは、STZ (65mg/kg, i.v.) を単回投与後、血糖値の上昇を確認する。ARBs は 5 mg/kg/day (Benson SC et al. *Hypertension*. 2004; **43**: 993-1002) で gavage 法にて病態モデル作成時から 4 週間投与した。投与期間については、以前、研究代表者が血管障害を確認した期間を採用し、

4 週間とした (Toba H et al. *Hypertens Res*. 2005; **28**: 689-700、Toba H et al. *Eur J Pharmacol*. 2006; **549**: 124-132)。

Pioglitazone、bezafibrate も同様に、以前の我々の上記の報告に従い、それぞれ、3、10mg/kg の用量で経口投与した。

(2) 代謝的・血行力学的変化の検討

血糖値および HbA_{1c} を測定し、治療薬による糖代謝への影響を確認した。覚醒下血圧は tail-cuff 法にて収縮期血圧、また観血的に平均動脈圧を測定した。また、1 週間毎に代謝ケージを用い、尿中蛋白排泄量を測定した。さらに、pioglitazone、bezafibrate による影響も確認した。

(3) 血管保護効果の検討

飼育期間終了後、胸部大動脈組織を摘出した。摘出胸部大動脈リング標本を用いた内皮依存性血管弛緩反応の検討を行った。また免疫組織染色、Western blotting 法、RT-PCR 法を用いて、炎症に関連した分子の発現変化を検討した。また、pioglitazone、bezafibrate との効果と比較した。

(4) ラット大動脈内皮細胞の培養

ラットから胸部大動脈組織を摘出し、explant 法にて血管内皮細胞を単離・培養した。継代後、第 3 世代を実験に用いた。

(5) 薬物負荷プロトコール

3 時間の過酸化水素水負荷の 1 時間前から ARBs (10 μM) 処置を行った。GW9662 併用群には、そのさらに 0.5 時間前から処置した。

(6) 血管保護効果の検討

薬物負荷後、細胞から RNA を抽出し、RT-PCR 法にて炎症反応に関連した分子の発現の変化を検討した。

4. 研究成果

(1) STZ 投与により糖尿病を誘発後、telmisartan (5 mg/kg/day)、pioglitazone (3 mg/kg/day)、bezafibrate (10 mg/kg/day) を 4 週間投与した。本投与量での各薬物の投与は覚醒下平均動脈圧と IVGTT により評価した耐糖能に影響を与えなかった。これら薬物の投与は糖尿病ラットの胸部大動脈組織において、主たる活性酸素種産生源と報告されている NADPH oxidase (p47phox) や接着分子 VCAM-1、走化性因子 MCP-1 の mRNA 発現増大を有意に改善することを確認した (P<0.05)。動脈硬化進展のあらゆる段階での関与が示

唆されている osteopontin の発現については、telmisartan と pioglitazone で抑制されたが、bezafibrate による改善効果は認められず、PPAR 活性の有無に依存した結果と考えられた。また、腎障害に加え血管障害との関連が重要視されている尿蛋白も telmisartan は抑制し (糖尿病群; 127 ± 10 mg/kg/day vs. telmisartan 群; 99 ± 8.4 mg/kg/day; $P < 0.05$) さらに糖尿病ラットにおける CCr の低下 (コントロール群; 1.5 ± 0.1 ml/min vs. 糖尿病群; 1.0 ± 0.1 ml/min) も改善した (telmisartan 群; 1.3 ± 0.1 ml/min; $P < 0.05$)。さらに、これらの telmisartan による尿蛋白改善、血管組織における抗酸化・抗炎症作用は、対照として投与した losartan 投与時よりも強く、telmisartan によるアンジオテンシン II 受容体拮抗作用に加え、PPAR 活性化作用による組織保護効果の可能性が示唆され、メタボリックシンドローム治療における本薬物の有用性が示された。

(2) ラットの胸部大動脈組織から explant 法にて、単離・培養した血管内皮細胞に H_2O_2 (1 mmol/l) を 6 時間負荷した。その後、血管内皮細胞から RNA を抽出し、血管組織での主たる活性酸素種の産生源と報告されている NADPH oxidase (p47phox)、走化性因子 MCP-1、接着分子 ICAM-1 の mRNA 発現を RT-PCR 法にて検討した。 H_2O_2 負荷により p47phox、MCP-1、ICAM-1 の mRNA 発現は増大したが、 H_2O_2 負荷の 1 時間前からテルミサルタン ($50 \mu\text{mol/l}$) を前処置すると、これらの分子の発現増大は有意に改善されることを確認し、テルミサルタンによる抗酸化・抗炎症作用を確認することができた。一方、これらの改善効果はロサルタン ($50 \mu\text{mol/l}$) 投与群では殆ど認められなかったため、テルミサルタンによる血管内皮保護効果に PPAR を介している可能性が示唆された。また、PPAR 阻害薬である GW9662 ($5 \mu\text{g/ml}$) をテルミサルタン処置のさらに 30 分前から投与すると、テルミサルタンによる NADPH oxidase、MCP-1、ICAM-1 の発現抑制作用が消失し、血管内皮細胞においてテルミサルタンは PPAR を介して抗酸化作用、抗炎症作用を発揮することを示すことができた。本検討によりテルミサルタンによるアンジオテンシン II 受容体拮抗作用に加え、PPAR 刺激による血管内皮細胞保護効果の可能性が示唆され、動脈硬化の初期病変である内皮機能障害に対するテルミサルタンの有用性が示唆された。

5. 主な発表論文等
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者に

は下線)

[雑誌論文](計 5 件)

Kobara M, Noda K, Kitamura M, Okamoto A, Shiraishi T, Toba H, Matsubara H, Nakata T. Antibody against interleukin-6 receptor attenuates left ventricular remodelling after myocardial infarction in mice. *Cardiovascular Research* 2010 (in press). 査読有
Toba H, Nakamori A, Tanaka Y, Yukiya R, Tatsuoka K, Narutaki M, Tokitaka M, Hariu H, Kobara M, Nakata T. Oral L-histidine exerts antihypertensive effects via central histamine H3 receptors and decreases nitric oxide content in the rostral ventrolateral medulla in spontaneously hypertensive rats. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 2010;37(1):62-68. 査読有
Toba H, Sawai N, Morishita M, Murata S, Yoshida M, Nakashima K, Morita Y, Kobara M, Nakata T. Chronic treatment with recombinant human erythropoietin exerts renoprotective effects beyond hematopoiesis in streptozotocin-induced diabetic rat. *European Journal of Pharmacology* 2009;612(1-3):106-114. 査読有
Taira M, Toba H, Murakami M, Iga I, Serizawa R, Murata S, Kobara M, Nakata T. Spironolactone exhibits direct renoprotective effects and inhibits renal renin-angiotensin-aldosterone system in diabetic rats. *European Journal of Pharmacology* 2008;589(1-3):264-271. 査読有
Hayashi H, Kobara M, Abe M, Tanaka N, Gouda E, Toba H, Yamada H, Tatsumi T, Nakata T, Matsubara H. Aldosterone nongenomically produces NADPH oxidase-dependent reactive oxygen species and induces myocyte apoptosis. *Hypertension Research* 2008;31(2):363-375. 査読有

[学会発表](計 4 件)

Hiroe Toba, Nobuyoshi Imai, Ryoko Serizawa, Tamotsu Takahashi, Takuya Mitani, Miyuki Kobara, Tetsuo Nakata. Pitavastatin inhibited diabetic nephropathy and decreased renal renin-angiotensin-aldosterone system in rats. *19th European Meeting on Hypertension* 2009/6/13 Milan, Italy.

Hiroe Toba, Mamiko Yoshida, Kohei Nakashima, Masayuki Morishita, Shoko Murata, Chisato Tojo, Yuko Oshima, Yosuke Morita, Miyuki Kobara, Tetsuo Nakata. Chronic treatment with Erythropoietin inhibits oxidative stress and inflammatory reaction in diabetic rat aorta beyond hematopoiesis. *19th European Meeting on Hypertension* 2009/6/13 Milan, Italy.

Hiroe Toba, Masafumi Murakami, Takuya Mitani, Nobuyoshi Imai, Ryoko Serizawa, Miyuki Kobara, Tetsuo Nakata. Spironolactone attenuated renal and vascular dysfunction via antioxidant properties and inhibited renal expression of ACE and CYP11B2 in deoxycorticosterone-salt rats. *Hypertension2008* 2008/6/16 Berlin, Germany.

Hiroe Toba, Naoki Sawai, Yosuke Morita, Kohei Nakashima, Mamiko Yoshida, Masayuki Morishita, Miyuki Kobara, Tetsuo Nakata. Erythropoietin attenuates diabetic nephropathy beyond hematopoiesis in streptozotocin-induced diabetic rats. *Hypertension2008* 2008/6/19 Berlin, Germany.

6 . 研究組織

(1)研究代表者

鳥羽 裕恵 (TOBA HIROE)
京都薬科大学・薬学部・助教
研究者番号：90351270