

氏名（本籍） 塚 本 宏 樹

学位の種類 博 士 (薬 学)

学位記番号 薬博第 346 号

学位授与年月日 平成16年3月25日

学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当

研究科、専攻 東北大学大学院薬学研究科
(博士課程) 医療薬科学専攻

学位論文題目

チアゾリジンジオン誘導体のプロスタノイド産生に及ぼす影響と
その作用機序の解析

論文審査委員 (主査) 教授 後藤 順一

教授 今井 潤

助教授 平澤 典保

論文内容要旨

[目的]

糖尿病は、高脂血症、高血圧とともに代表的な生活習慣病の一つであり、網膜血管閉塞症、腎症等の細小血管障害や心筋梗塞等の動脈硬化性疾患を併発しやすい。動脈硬化性疾患の発症予防には厳格な血糖管理が有効であるが、その予防効果は細小血管障害で認められる予防効果に比べて弱いことが明らかにされている。糖尿病患者数は近年急速に増加しているため、動脈硬化性疾患の発症を予防する優れた薬剤の開発が切望されている。

2型糖尿病は末梢組織におけるインスリン抵抗性を成因として発症する。現在、このインスリン抵抗性を改善する薬剤として thiazolidinedione derivatives (TZDs) である rosiglitazone と pioglitazone が臨床で使用されている。TZDs によるインスリン抵抗性の改善には peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) の活性化が深く関わっている。PPAR γ とは標的遺伝子のプロモーターに存在する PPAR responsive element に結合し、その遺伝子の転写をリガンド依存的に活性化する核内受容体であり、脂肪細胞において強く発現している。また、マクロファージ、血管内皮細胞、血管平滑筋細胞等の血管系を構成する細胞に発現する PPAR γ が動脈硬化抑制的な役割を担うことから、PPAR γ アゴニストである TZDs の動脈硬化性疾患への有用性が期待されると共に、糖尿病治療薬として PPAR γ を標的とした薬剤が注目されている。

脂肪酸は生体のエネルギー源あるいは細胞膜の構成成分として重要であるだけでなく、prostaglandin (PG) や thromboxane (TX) といった prostanoid に変換され、炎症反応や血液凝固反応に関与する。特に、血小板やマクロファージにより産生される TXA₂ は強い血小板凝集作用を有し、糖尿病患者においてその産生が亢進していることから、糖尿病性細小血管障害や動脈硬化性疾患への関与が示唆されてきた。また、低用量の aspirin が動脈硬化性疾患の発症を予防することや、TXA₂ 受容体アンタゴニストが糖尿病患者における動脈硬化の進展を抑制することが報告されており、TXA₂ の産生抑制やその作用減弱が動脈硬化性疾患の発症予防に有効であると考えられている。さらには、動脈硬化巣（プラーク）に浸潤したマクロファージの多くは cyclooxygenase (COX) -2 や membrane-associated PGE synthase を高発現しており、PGE₂ の産生亢進とプラークの脆弱化との関連性が指摘されている。

プラークに浸潤したマクロファージが COX-2 と PPAR γ を発現し、COX-2 プロモーターに PPAR responsive element が存在することから、TZDs は TXA₂ や PGE₂ の産生に何らかの影響を及ぼす可能性が考えられる。しかしながら、TZDs の TXA₂ と PGE₂ の産生に及ぼす影響とその作用機序については未だ明確な説明はなされていない。そこで本研究では TZDs の動脈硬化性疾患への有用性と PPAR γ を標的とした糖尿病治療薬の開発に有益な情報を得ることを目的とし、TZDs の TXA₂ と PGE₂ の産生に及ぼす影響とその作用機序について検討した。

[結果]

TZDs の TXA₂ と PGE₂ の産生に及ぼす影響

TZDs の TXA₂ と PGE₂ の産生に及ぼす影響を PPAR γ 発現細胞である U937 細胞を用いて検討し、rosiglitazone と pioglitazone が lipopolysaccharide (LPS) 刺激による TXA₂ と PGE₂ の産生を亢進することを明らかにした。しかしながら、rosiglitazone が TXA₂ と PGE₂ の産生を亢進するためには PPAR γ を活性化する濃度よりも高濃度を必要とすることが判明した。そればかりか、rosiglitazone と pioglitazone では PPAR γ を活性化する濃度に 10 倍程度の違いがあるにも関わらず、同程度の TXA₂ と PGE₂ の産生亢進作用を示すことも判明し、TZDs による TXA₂ と PGE₂ の産生亢進は PPAR γ の活性化とは独立した作用機序により発現していることが示唆された。

TZDs による TXA₂ と PGE₂ の産生亢進への PPAR γ の関与

TZDs による TXA₂ と PGE₂ の産生亢進に PPAR γ が関与するかどうかを明らかにするため、PPAR γ アンタゴニスト (GW9662) と PPAR γ 非発現細胞を用いて検討した。その結果、PPAR γ アンタゴニストが rosiglitazone による LPS 刺激 TXA₂ 産生の亢進を抑制せず、PPAR γ 非発現細胞である NIH3T3 細胞においても rosiglitazone と pioglitazone が PGE₂ の産生を亢進することが判明した。これらの結果より、TZDs による TXA₂ と PGE₂ の産生亢進は PPAR γ 非依存的な作用機序により発現していることが明らかになった。

TZDs による TXA₂ と PGE₂ の産生亢進機序の検討

TXA₂ や PGE₂ 等の prostanoid は細胞膜中の arachidonic acid (AA) を基質とした一連の酵素反応 (AA カスケード) によって産生される。すなわち、細胞膜リン脂質からの AA の遊離と COX による過酸化反応により生じた PGH₂ から分子種特異的合成酵素により各 prostanoid 分子種が生合成される。

TZDs が TXA₂ や PGE₂ といった複数の prostanoid の産生を亢進することから、TZDs は TXA₂ と PGE₂ の産生に共通な産生経路に影響を与えていると考えられる。そこで、TZDs による TXA₂ と PGE₂ の産生亢進機序を明らかにするため、TZDs の細胞膜からの AA 遊離量と COX 発現量に及ぼす影響について検討した。その結果、rosiglitazone は COX-1 と COX-2 の発現には影響を与えないものの、細胞膜からの AA 遊離量を有意に増加させた。さらに、³H AA 標識 U937 細胞の ³H TXA₂ 産生に及ぼす rosiglitazone の影響の検討により、rosiglitazone が LPS 刺激による ³H TXA₂ の産生を亢進させることを示し、TZDs が COX-1 や COX-2 の発現誘導ではなく細胞膜からの AA の遊離量の増加により TXA₂ と PGE₂ の産生を亢進させることを明らかにした。また、GW9662 が rosiglitazone による AA 遊離量の増加を抑制せず、NIH3T3 細胞においても rosiglitazone と pioglitazone による有意な AA 遊離量の増加が認められたことから、TZDs による AA 遊離量の増加が PPAR γ 非依存的であることが示された。

更に TZDs による AA 遊離量の増加機序について解析を行った。Rosiglitazone による AA 遊離量の増加は一過性ではなく経時的に認められることから、TZDs による AA 遊離量の増加に cytosolic phospholipase A₂

α (cPLA₂ α) の発現誘導やリン酸化による酵素活性の上昇が関与することが推察された。しかしながら、rosiglitazone は cPLA₂ α の発現には影響を与えず、タンパク合成阻害薬 (actinomycin D, cycloheximide) は rosiglitazone による AA 遊離量の増加を抑制しなかった。さらに、MAPK/ERK kinase 阻害薬 (U0126) と protein kinase C 阻害薬 (H-7) が rosiglitazone による AA 遊離量の増加を抑制しないことや、rosiglitazone がリン酸 p38 量を増加させないことも判明した。これらの一連の結果は、TZDs による AA 遊離量の増加には AA 遊離過程の関与は乏しいことを示唆している。また、本実験において用いた AA 遊離量の評価系では、AA 遊離量が遊離過程の変動だけでなく再取込過程の変動によっても変化することが考えられるため、TZDs が細胞膜から遊離した AA の再取込過程を抑制することによって遊離 AA 量を増加している可能性を想定し、rosiglitazone の AA 取込過程に及ぼす影響について検討した。その結果、rosiglitazone は細胞膜への AA 取込量を持続的に抑制することが判明し、TZDs は遊離した AA の細胞膜への再取込を抑制することにより、遊離 AA 量を増加させることが示唆された。

[結論]

動脈硬化性疾患を発症しやすい糖尿病や高脂血症、高血圧の治療は極めて重要であり、優れた治療薬の開発が切望されている。TZDs を始めとした PPAR γ アゴニストは脂肪細胞の PPAR γ の活性化により 2 型糖尿病の発症・進展に関わるインスリン抵抗性を改善するのみならず、マクロファージ等の血管系細胞に発現する PPAR γ を活性化し、動脈硬化性疾患を予防することが期待されている。

本研究では TZDs が AA 再取込過程の抑制により、遊離 AA 量を増加させ、TXA₂ や PGE₂ の産生を亢進させることを明らかにした。TXA₂ と PGE₂ はプラークの脆弱化とそれにより誘発される血栓形成の重要なメディエーターであることから、TZDs が動脈硬化性疾患を発症させやすいことが示唆された。しかしながら、TZDs による TXA₂ と PGE₂ の産生亢進は PPAR γ 非依存的な作用機序により発現されているため、thiazolidine2, 4-dione 構造を有さない PPAR γ アゴニストはこのような副作用を回避した優れた糖尿病治療薬として期待される。また、rosiglitazone と pioglitazone による PPAR γ 非依存的な TXA₂ と PGE₂ の産生亢進は、最大血中薬物濃度よりも高濃度で発現していることから、生体内においてこのような作用が発現しているかどうかについては更なる検討が必要である。

以上、本研究の成果が PPAR γ を標的とした糖尿病治療薬の開発において有用な知見となるとともに、TZDs の動脈硬化性疾患への有用性を解析するための一助になることを期待する。

審査結果の要旨

糖尿病は代表的な生活習慣病の一つであり、しかも網膜血管閉塞症、腎症などの微小血管障害や心筋梗塞等の動脈硬化性疾患を併発しやすい。とりわけ動脈硬化性疾患は発症の予防が難しく、糖尿病の治療がもっとも大切とされる。現在インスリン抵抗性を改善する薬剤として、peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) の活性化に關与するチアゾリジンジオン誘導体 (TZDs) が臨床で使用されている。一方、強い血小板凝集作用を持つトロンボキサン A2 (TXA2) は、糖尿病性細小血管障害や動脈硬化性疾患への關与が示唆されており、また動脈硬化薬とプロスタグランディン E2 (PGE2) 産生亢進との関係も指摘されている。本研究は、こうした観点から TZDs の TXA2 と PGE2 産生に及ぼす影響とその作用機序について検討を加えたものである。

先ず、TZDs の TXA2 および PGE2 の産生に及ぼす影響を PPAR γ 発現細胞を用いて検討したところ、認められた TZDs による産生亢進は PPAR γ の活性化とは独立した作用機序により発現することが判明した。このことは PPAR γ アンタゴニストを用いる実験によっても裏付けられた。次いで、細胞膜からのアラキドン酸遊離と COX 発現量に及ぼす TZDs の影響について吟味を加えた。その結果 COX の発現誘導ではなく、細胞膜からのアラキドン酸の遊離量の増加により TXA2 と PGE2 の産生を亢進することが判明した。またこのアラキドン酸遊離量の増加は PPAR γ 非依存的であった。

引き続き、アラキドン酸遊離量増加の機序について検討を加えたところ、細胞膜へのアラキドン酸取込量を持続的に抑制することから、TZDs が細胞膜への再取込を抑制することにより結果的に遊離アラキドン酸量が増加したものと結論された。

以上、本論文は、TZDs のプロスタノイド産生に及ぼす機序を明らかにし、PPAR γ を標的とする糖尿病治療薬の開発に有用な知見を与えると共に、TZDs の動脈硬化性疾患への有用性を解析する上で重要な情報を提供したものであり、博士 (薬学) の学位論文として合格と認める。