



Angiotensin II type 1 receptor blocker telmisartan suppresses superoxide production and reduces atherosclerotic lesion formation in apolipoprotein E-deficient mice

高谷, 具史

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2006-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲3503

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1003503>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



【 87 】

氏 名・（本 籍） 高谷 具史 （ 兵庫県 ）

博士の専攻分野の名称 博士（医学）

学 位 記 番 号 博い第1709号

学位授与の 要 件 学位規則第5条第1項該当

学位授与の 日 付 平成18年3月25日

【 学位論文題目 】

Angiotensin II type 1 receptor blocker telmisartan suppresses
superoxide production and reduces atherosclerotic lesion
formation in apolipoprotein E-deficient mice
（アンジオテンシンⅡタイプ1 受容体拮抗薬テルミサルタンは
アポリポプロテインE欠損マウスにおいて、スーパーオキシド産生を
抑制して、動脈硬化病変形成を抑制する）

審 査 委 員

主 査 教 授 秋田 穂束
教 授 久野 高義
教 授 八木 直人

[緒言]

レニン-アンジオテンシン-アルドステロン系の主要な構成要素であるアンジオテンシンⅡについては、これまでに血管収縮による血圧上昇作用以外にも動脈硬化病変形成促進に関するさまざまな作用が報告されている。最近ではその中でもアンジオテンシンⅡが酸化ストレスを誘導する作用を持つ点に注目が集まっている。動脈硬化病変では、さまざまな血管を構成する細胞において活性酸素種の産生が増強しているが、これにアンジオテンシンⅡが深く関わっていることが知られている。組織学的な検討によると、アンジオテンシン変換酵素やアンジオテンシンⅡタイプ1受容体の発現が動脈硬化血管において増加しており、局所組織におけるアンジオテンシンの作用の増強が示唆されている。さらに血管におけるアンジオテンシンⅡによる酸化ストレス産生は、NAD(P)H オキシダーゼの活性化を介することが報告されている。

活性酸素種は動脈硬化を促進するさまざまな作用を持っている。これまでの動物実験で、アンジオテンシン変換酵素阻害薬やアンジオテンシンⅡタイプ1受容体拮抗薬が、さまざまな機序を介して動脈硬化病変形成を抑制することが報告されている。しかしながら、生体においてこれらの薬剤が抗酸化作用を示すかどうか、さらにその作用が抗動脈硬化作用と関連するかどうかは明らかとはなっていない。そこで我々はアンジオテンシンⅡタイプ1受容体拮抗薬であるテルミサルタンを、動脈硬化発症モデルマウスであるアポリポプロテインE欠損マウスに投与して、血圧低下作用に依存しないアンジオテンシンⅡタイプ1受容体拮抗薬の抗酸化ストレス作用、並びに抗動脈硬化作用の有無に関する実験を行った。

[方法]

普通食を与えた生後4週齢の雌雄のアポリポプロテインE欠損マウスに対して、飲水内にテルミサルタンを混和して投与し、その後12週間飼育した。テルミサルタン投与量は0.3mg/kg体重/日(少量投与群)および3mg/kg体重/日(多量投与群)とし、非投与群との比較検討を行った。血中の各脂質、グルコース、インスリンを測定し、脈拍、体血圧については非観血的非加温式尾部カフ法にて測定した。動脈硬化病変形成の評価に関しては、マウスを生理的食塩水で還流した後、心臓を取り出しOCTで固定、大動脈弁

輪組織の部分を100μmおきに5連続で10μm厚の切片として作成し、ズダン染色を行ってプラーク面積を定量評価した。続いて局所病変における酸化ストレスの関与の評価のために、同組織切片をMOMA-2、Malondialdehyde(MDA)、4-hydroxy-2-nonenal(HNE)抗体を用いて免疫染色を施行した。さらに血管組織由来のスーパーオキシド産生量をルシゲニン法で評価した。続いて血管組織のNAD(P)Hオキシダーゼ活性を測定するために、血管組織のホモジネート液とともに基質としてNADHあるいはNADPHを加えて、一部はさらにNAD(P)Hオキシダーゼ阻害薬であるDiphenylene iodoniumやApocyninで前処置を行ってルシゲニン法を施行した。また、ジハイドロエチジウム法を用いて、血管壁の、特に内皮細胞由来のスーパーオキシド産生量を定量的に評価した。最後に、全身性の炎症や酸化ストレスのマーカーである、血清アミロイドAおよび血中および尿中のイソプロスタンをELISA法にて測定した。

[結果]

1. テルミサルタンはマウスの血中脂質、グルコース、インスリン濃度および体重、脈拍には影響を与えなかった。
2. テルミサルタンの少量投与群では収縮期体血圧は低下しなかったが、雌雄ともに有意に動脈硬化病変形成を抑制していた。一方で、多量投与群では収縮期血圧の低下に伴い、さらなる動脈硬化病変の形成の抑制が認められた。
3. テルミサルタンは免疫染色法を用いた検討において、動脈硬化病変におけるマクロファージ集積を抑制し、組織における酸化ストレスの指標であるMDAやHNEの病変における発現を抑制することが明らかとなった。
4. テルミサルタンはルシゲニン法を用いた検討によって、血管組織由来のスーパーオキシド産生を抑制することがわかった。さらにこの作用は、NAD(P)Hオキシダーゼ活性の抑制を介することが判明した。
5. テルミサルタンはジハイドロエチジウムを用いた検討によって、血管組織全周性に、特に内皮細胞における酸化ストレス産生を抑制することがわかった。
6. テルミサルタンは全身性の酸化ストレスのマーカーである血中、尿中のイソプロスタンを抑制したが、炎症のマーカーである血清アミロイドAに関しては抑制を認めな

動脈硬化血管において活性酸素種の産生が増加し、また抗酸化薬は動脈硬化の進展を抑
制するという実験的ならびに臨床的な観察から、酸化ストレスが動脈硬化の発症と進展に
直接関与することが示唆されている。活性酸素種は、動脈硬化病変において内皮細胞や平滑
筋細胞などといったさまざまな細胞から産生され、この活性酸素種の産生にアンジオテン
シン II が NAD(P)H オキシダーゼの活性化を介して関与していることが報告されている。
アンジオテンシン II の作用を抑制するアンジオテンシン II タイプ 1 受容体拮抗薬 (ARB)
は、すでに降圧薬として臨床で広く使用されているが、その降圧作用を介さない抗酸化作
用による動脈硬化抑制作用の有無に注目が集まっている。これまでもさまざまな実験動
物を用いて検討がなされているが、その多くは高用量を投与して血圧を十分降下させた上
で動脈硬化を抑制した場合の機序に関する報告である。本研究の目的は、臨床使用されて
いる程度の低用量の ARB であるテルミサルタンが、降圧作用非依存性に動脈硬化病変形成
を抑制するのか、またもし抑制するのなら、その機序として酸化ストレスが関与するの
かどうかを検討することである。
本研究では普通食を与えた生後 4 週齢の雌雄の易動脈硬化発症モデルであるアポリポプ
ロテイン E 欠損マウスに対し、飲水内にテルミサルタンを混入して投与し、その後 12 週
間飼育して各実験を施行した。投与量は 0.3 mg/kg 体重/日 (低用量投与群) および 3 mg/kg
体重/日 (高用量投与群) とし、対照群との比較検討を行った。テルミサルタンは高用量群
と低用量群ともマウスの血中脂質、グルコース、インスリン濃度および体重、脈拍には影
響を与えなかった。テルミサルタンの低用量投与群では血圧の降下作用は示さなかったが、
雌雄ともに有意に大動脈弁輪部分での動脈硬化病変形成を抑制した。一方、テルミサルタ
ンの高用量投与群では、血圧の降下に伴い動脈硬化病変形成の更なる抑制を認めた。免疫
染色法を用いた組織学的検討では、テルミサルタンは動脈硬化病変局所におけるマクロ
ファージの集積を抑制し、脂質過酸化のマーカーである Malondialdehyde や 4-hydroxy-
2-nonenal の発現を抑制した。さらにテルミサルタンは NAD(P)H オキシダーゼ活性の抑制
を介して、血管組織由来のスーパーオキシド産生を抑制した。同じくテルミサルタンは
in situ で、血管組織の全周性に、特に内皮細胞からのスーパーオキシド産生を抑制し

[illegible]

った。

[考察]

これまでの動物実験モデルにおいても、アンジオテンシンⅡタイプ1受容体拮抗薬が動脈硬化病変形成を抑制することが報告されている。その機序としては、種々のケモカイン発現の抑制、マクロファージ集積の抑制やLDL酸化の抑制などが示されている。アンジオテンシンⅡタイプ1受容体拮抗薬は多くの同様の動物実験において、ヒトに使用する程度と比較して過剰な投与量が用いられるため、実験動物の血圧が著しく低下する場合が多く、それに伴う酸化ストレスへの影響を除外することは難しい。

そこで今回我々はテルミサルタン投与量に関して、実験動物の血圧を変動させることなく、かつ本薬剤の常用量を内服しているヒトの血中濃度よりもさらに低い血中濃度になるように設定し実験を行った。その結果、血圧を低下させない程度のテルミサルタンの少量投与において、十分に酸化ストレスを抑制することが可能であり、さらにそれに伴って動脈硬化病変形成を抑制することが証明できた。さらに多量投与では十分な降圧に伴ってさらなる動脈硬化病変形成の抑制が認められた。

すでにアンジオテンシンⅡタイプ1受容体拮抗薬は臨床で広く応用されていて、大規模試験においてもさまざま病態への使用が推奨されているが、今後高血圧を背景にもつ患者以外、例えば他の動脈硬化疾患の危険因子を抱える患者などに対しても、酸化ストレス抑制作用のある薬剤として、適応が広がっていく可能性を今回の実験結果は示唆した。

[結論]

アンジオテンシンⅡタイプ1受容体拮抗薬テルミサルタンは、血圧低下作用を示さずに動脈硬化病変形成を抑制することが明らかとなった。その機序として、血管におけるNAD(P)Hオキシダーゼ活性を抑制することによる酸化ストレス産生の抑制が関与していると考えられた。

神戸大学大学院医学系研究科（博士課程）

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第 1710 号	氏 名	高谷 具史
論文題目 Title of Dissertation	<p>Angiotensin II type 1 receptor blocker telmisartan suppresses superoxide production and reduces atherosclerotic lesion formation in apolipoprotein E-deficient mice</p> <p>アンジオテンシンⅡタイプ1受容体拮抗薬テルミサルタンはアポリポプロテインE欠損マウスにおいて、スーパーオキシド産生を抑制して、動脈硬化病変形成を抑制する</p>		
審査委員 Examiner	<p>主 査 秋田 穂来 Chief Examiner</p> <p>副 査 久野 尚義 Vice-examiner</p> <p>副 査 ハナ 直人 Vice-examiner</p>		
審査終了日	平成 18 年 1 月 18 日		

(要旨は1,000字～2,000字程度)