

## 糖尿病性血管合併症における内皮由来過分極因子の重要性と治療戦略へのアプローチ

松本 貴之

**A Therapeutic Target for Endothelium-derived Hyperpolarizing Factor Signaling in Diabetic Vascular Complication**

Takayuki MATSUMOTO

*Department of Physiology and Morphology, Institute of Medicinal Chemistry, Hoshi University, 2-4-41 Ebara, Shinagawa-ku, Tokyo 142-8501, Japan*

(Received February 4, 2010)

Vascular tone is tightly regulated by endothelium-derived factors. These include relaxing factors (EDRFs) such as nitric oxide (NO), hyperpolarizing factors (EDHFs), and contracting factors (EDCFs). Although EDHF is a prominent vasodilator, particularly in smaller arteries, little attention has been paid to the potential role of EDHF responses in diabetes. EDHF signaling may involve various factors, including several diffusible factors and non-diffusible factors (e.g., gap junctions). It has been demonstrated that the alterations in EDHF relaxation seen in mesenteric arteries from diabetic rats may be attributable to an increase in phosphodiesterase 3 (PDE3) activity, leading to a reduction in the action of adenosine 3',5'-cyclic monophosphate (cAMP), and consequently the activity of protein kinase A (PKA) is decreased in such arteries. Moreover, it has been suggested that the imbalance between EDRFs and EDCFs is present in mesenteric arteries from type 2 diabetic rats and the EDHF relaxation can be partly reversed by suppression of EDCF signaling. Indeed, chronic treatment with metformin, eicosapentaenoic acid, or thromboxane synthase inhibitor can reduce EDCF signaling and normalize EDHF signaling in mesenteric arteries from type 2 diabetic rats. Although the improvement or restoration of EDHF responses has not been the direct subject of any pharmaceutical effort, increasing cAMP/PKA signaling (e.g., by inhibiting PDE3 activity) or reducing EDCFs signaling has potential as an interesting therapeutic target in diabetic vasculopathy.

**Key words**—endothelium-derived hyperpolarizing factor; endothelial dysfunction; diabetes; adenosine 3',5'-cyclic monophosphate; endothelium-derived contracting factor; prostanoids

**1. はじめに**

今日、糖尿病は、生活習慣病の一角を形成する最も注目される疾患の一つであることは周知の事実である。糖尿病性血管障害は、主として、動脈硬化性病変を特徴とする大血管症（脳・心・末梢血管系の動脈硬化症）と、糖尿病に特有の細小血管障害（網膜症・腎症・神経障害）に分類されているが、いずれも血管内皮細胞の機能障害が初期に認められ、血管病の発症・進展に内皮細胞の機能変化が大きく関与している。ゆえに、血管内皮細胞の機能変化を検討することは、糖尿病研究における重要なテーマで

ある。<sup>1-3)</sup>

血管内皮細胞は、直接血液と接する一層の上皮細胞で、種々の刺激により、血管収縮因子 (endothelium-derived contracting factor; EDCF), 弛緩因子 (endothelium-derived relaxing factor; EDRF), 増殖因子, 抗凝固因子等を産生, 放出し, 血管平滑筋細胞の張力, 代謝, 増殖や, 血液凝固等を調節している。<sup>4-7)</sup> EDCFとしては, アラキドン酸代謝物, endothelin-1 (ET-1) 等があり, EDRFとしては, nitric oxide (NO), prostacyclin (PGI<sub>2</sub>), 内皮由来過分極因子 (endothelium-derived hyperpolarizing factor; EDHF) が知られている。<sup>1-8)</sup> これら EDRF の寄与は血管径により異なり, NOは大血管にて主要な因子であるが, 一方, EDHFは血管径が小さくなる程その寄与が大きい。<sup>5,6)</sup> EDHFは, これまで, K<sup>+</sup> ion, epoxyeicosatrienoic acids, 過酸化水素, gap

星薬科大学医薬品化学研究所機能形態研究室 (〒142-8501 東京都品川区荏原 2-4-41)

e-mail: t-matsu@hoshi.ac.jp

本総説は、平成 21 年度日本薬学会関東支部奨励賞の受賞を記念して記述したものである。

junction 等の候補因子が挙がってきているが、動物種、血管部位によってこれらの因子の関与が異なり、いまだ統一した見解が得られていないのが現状である。<sup>5-7)</sup> EDHF は、NO とは対照的に細小血管で強く認められるため、EDHF の障害が網膜症、腎症、神経症等の発症・進展に大きく寄与している可能性が考えられる。換言すれば、EDHF 反応を改善すれば、糖尿病性細小血管障害を軽減できる可能性があると考えられる。<sup>6,7)</sup>

EDCF に関しては、ET-1 やアラキドン酸カスケードの cyclooxygenase (COX) 経路の代謝産物 (prostanoids) が知られている。EDCF に関連する prostanoids は、平滑筋細胞膜上に存在する thromboxane-prostanoid (TP) receptors を活性化することによって収縮反応をきたす。<sup>8)</sup> EDCF の反応性異常は、これまで種々の疾患 (高血圧・肥満・糖尿病) や、aging によって起こることが報告され、<sup>8)</sup> また、EDCF は、NO や EDHF といった EDRF の作用とクロストークすることが、明らかになりつつあるが、糖尿病病態時におけるクロストークに関しては、いまだ未解決の部分が多く、詳細な分子基盤の解明が待たれるところである。

本総説においては、糖尿病時における EDHF signaling の障害メカニズムの解明並びにその治療戦略へのアプローチに関して、筆者らの研究を中心に報告したい。

## 2. Streptozotocin (STZ) 誘発糖尿病ラット腸間膜動脈における EDHF 様弛緩反応と cAMP との関係

血管内皮細胞に acetylcholine (ACh) 等が作用すると、NO や、 $\text{PGI}_2$  が産生し、平滑筋が弛緩するが、これらとは異なる EDHF も産生され、膜の過分極を引き起こし弛緩する。すなわち、EDHF は、血管に存在する  $\text{K}^+$  チャネルを、直接あるいは間接的に開口することにより平滑筋の過分極を引き起こすような non-NO/non- $\text{PGI}_2$  性の内皮由来弛緩因子であり、EDHF 研究はしばしば、NO 合成酵素 (NOS) と COX の阻害薬を処置して検討されている。糖尿病時における EDHF の反応について検討するため、STZ 誘発 1 型糖尿病ラット腸間膜動脈における ACh 誘発 EDHF 様弛緩反応について検討を行った (Fig. 1)。同週齢の対照群と比較し、STZ 群で、EDHF 様弛緩反応の減弱が観察された [Fig.

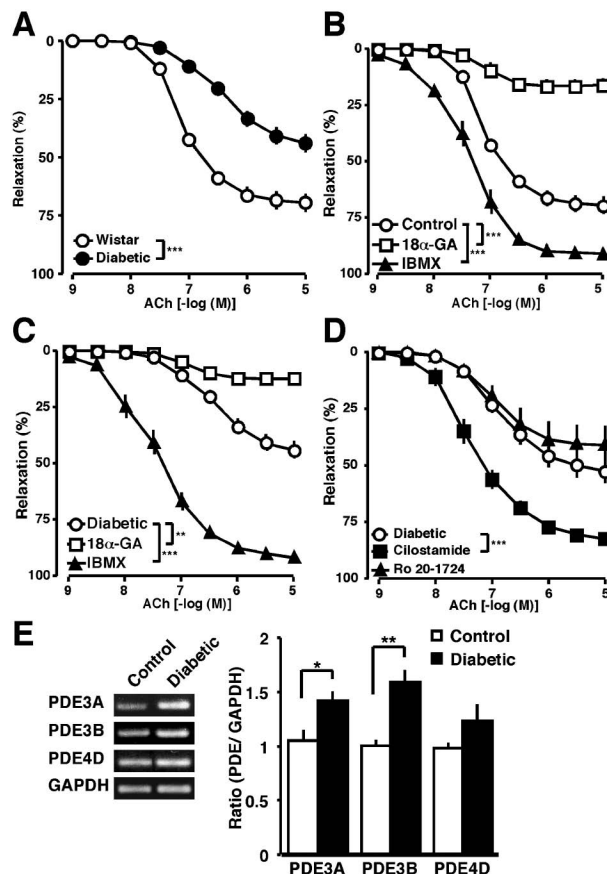


Fig. 1. Alterations in EDHF-type Relaxation and PDE Expression in Mesenteric Arteries from Control Wistar Rats and STZ-induced Diabetic Rats

(A) ACh-induced EDHF-type relaxations (in the presence of  $100 \mu\text{M}$  L-NNA and  $10 \mu\text{M}$  indomethacin) in mesenteric arteries from control (Wistar) and STZ-induced (Diabetic) rats. (B, C) Effects of the gap junction inhibitor 18 $\alpha$ -glycyrrhethinic acid (18 $\alpha$ -GA,  $100 \mu\text{M}$ ) and the PDE inhibitor IBMX ( $20 \mu\text{M}$ ) on the EDHF-type relaxations in mesenteric arteries from control (B) and diabetic (C) rats. (D) Effects of specific PDE inhibitors on EDHF-type relaxations in mesenteric arteries from diabetic rats. EDHF-type relaxations were enhanced by the selective PDE3 inhibitor ( $1 \mu\text{M}$  clistostamide) but not by the selective PDE4 inhibitor ( $10 \mu\text{M}$  Ro 20-1724). (A–D) Data are means  $\pm$  S.E. of 6–13 experiments. (E) RT-PCR assay of expressions of the mRNAs for PDEs in mesenteric arteries. Values are mean  $\pm$  S.E. of 3 determinations. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ . Modified from Matsumoto *et al.*<sup>10)</sup>

1(A)]. EDHF は、いくつかの候補因子が挙がってきており、血管部位や動物種によって寄与が異なることが知られている。<sup>5,6)</sup> そこで、gap junction 阻害薬を処置して検討したところ、EDHF 様弛緩反応の抑制が観察された [Figs. 1 (B) and (C)]. EDHF は単一で作用するのではなく、いくつかの因子が複合的に作用する可能性についても報告されているが、現時点では少なくともラット腸間膜動脈においては、EDHF signaling は主として、gap junction が内皮細胞の過分極を平滑筋細胞に伝えるために引き起こされるものと考えられる。

Gap junction は、コネキシンという 4 回膜貫通型タンパク質が 6 つ集まって形成されるコネクソンという中央に穴のあいた構造が、隣り合った細胞のそれぞれの膜にあり、これら 2 つが細胞外部分で結合して細胞同士をつなぐ小さなトンネルのような構造を形成している。<sup>11)</sup> イオンや小さな分子 (<1 kDa) は gap junction を通過できるので、隣接した細胞間に gap junction が存在していると、細胞同士は電氣的にカップリングしていることになる。血管細胞においても、内皮細胞同士、平滑筋細胞同士の gap junction の存在が知られているが、内皮細胞と平滑筋細胞間の gap junction の存在も知られ、これを介した電氣的伝導すなわち過分極 signal の伝達が EDHF signal として重要であることが近年明らかとなっている。<sup>9)</sup> EDHF 様弛緩反応には gap junction が関与することが明らかとなったが、セカンドメッセンジャーである cyclic AMP(cAMP) が gap junction を介する電氣的カップリングを促進し、EDHF signaling の調節因子として働くことが報告されている。<sup>9)</sup> そこで、cAMP を分解する酵素である phosphodiesterase (PDE) の阻害薬である IBMX を処置することで、細胞内 cAMP 量を上昇させた条件下において EDHF 様弛緩反応について検討したところ、弛緩反応の著明な増強が観察された [Figs. 1(B) and (C)]. 興味深いことに、この条件下における EDHF 様弛緩反応は、糖尿病群と対照群で同程度であった。したがって、糖尿病時においては、cAMP 系 signaling の障害によって、cAMP の EDHF signaling に対する調節作用が欠損し、弛緩反応の減弱が起こっている可能性が示唆された。<sup>10)</sup> さらに、PDE は、十数種類知られており、局在・性質が各々異なるが、<sup>11)</sup> 血管においては、PDE3, PDE4 が cAMP を分解する酵素として特に重要であるので、これらの特異的阻害薬存在下における EDHF 様弛緩反応について検討したところ [Fig. 1(D)], PDE4 特異的阻害薬 (Ro 20-1724) においては影響がなかったが、PDE3 特異的阻害薬 (cilostamide) 存在下においては、対照群 (data not shown), 糖尿病群いずれも、EDHF 様弛緩反応が増強し、糖尿病群で特に顕著なものであった。したがって、糖尿病時における EDHF の減弱には PDE3 が関与していることが示唆された。実際に、腸間膜動脈の ACh 刺激による cAMP 産生は糖尿病

群で速やかな cAMP の分解が起こり、これは、PDE3 阻害薬を処置すると抑制されたこと (data not shown), 腸間膜動脈における PDE3 発現が糖尿病群において増加していた [Fig. 1(E)] ことから、糖尿病時においては、PDE3 活性が亢進しており、これによって cAMP が EDHF 促進作用を及ぼす前に素早く分解されてしまう可能性が示唆された。<sup>10)</sup>

cAMP は AC によって産生し、下流に位置する cAMP-dependent protein kinase (PKA) を介して様々な反応を引き起こすが、STZ 誘発糖尿病ラット腸間膜動脈においては、AC5 活性低下、<sup>12)</sup> PKA 活性の低下、<sup>13)</sup> PKA subunit 発現の異常<sup>13)</sup> を見出し、糖尿病時において cAMP/PKA signaling pathway に異常が生じていることが明らかとなった。しかしながら、糖尿病病態時におけるこれらの変調の原因については全く不明であるので、この点については今後の研究に期待したい。

### 3. STZ 誘発糖尿病ラット EDHF 様弛緩反応の減弱に対する cilostazol 慢性投与の影響

STZ ラット腸間膜動脈においては、AC, PDE, PKA といった cAMP 濃度や反応を規定する分子の異常が起こっていることが明らかとなり、cAMP signaling の改善が、糖尿病性血管障害の治療戦略になり得ると考え、PDE3 選択的阻害薬 (cilostazol) を STZ ラットに慢性投与し、腸間膜動脈における EDHF 様弛緩反応が改善するかどうか検討を行った。<sup>14)</sup> 予防効果ではなく、治療効果を検討するため、EDHF 障害が既に起こっている 10 週経過した STZ 動物に対して 2 週間 cilostazol を投与して検討した。対照群と比較し、STZ 群における EDHF 様弛緩反応は減弱していたが、cilostazol 投与群にて改善が認められ [Fig. 2(A)] この反応は PKA 阻害薬で抑制された [Fig. 2(B)]. また、ACh 刺激による cAMP 産生は、STZ 群で速やかに分解されるが、cilostazol 投与群で、持続的な蓄積が認められた (data not shown). cAMP analog による弛緩反応 [Fig. 2(C)], PKA 活性 [Fig. 2(D)] も STZ 群で低下するが、cilostazol 投与群にて改善が認められた。PKA は調節 subunit (R) と触媒 subunit (Cat) から構成され、cAMP が調節 subunit に結合すると、解離して触媒 subunit の活性が出現する。また、これらの subunit の発現異常は PKA 活性に

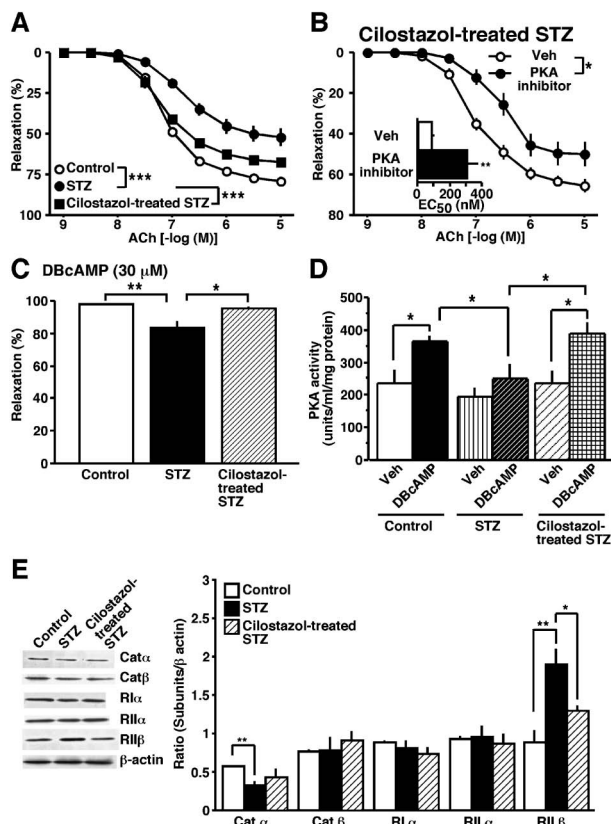


Fig. 2. Cilostazol Improves EDHF-type Relaxation in Mesenteric Arteries from STZ-induced Diabetic Rats via an Increase in cAMP and PKA Signaling

(A) EDHF-type relaxation in mesenteric arteries from control, STZ, and cilostazol-treated STZ rats ( $n=12-14$ ). Data are means  $\pm$  S.E. \*\*\* $p < 0.001$ . (B) Effects of a PKA inhibitor on EDHF-type relaxation. Data are means  $\pm$  S.E. of 8 experiments. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ . (C) cAMP derivative (DBcAMP; 30  $\mu$ M)-induced relaxation in the presence of IBMX. Data are means  $\pm$  S.E. of 6 experiments. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ . (D) Measurement of PKA activity in mesenteric arteries. Data are means  $\pm$  S.E. of 5 experiments. \* $p < 0.05$ . (E) Analysis of protein expression for PKA catalytic (Cat) and regulatory (R) subunits in mesenteric arteries. Data are means  $\pm$  S.E. of 6 experiments. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ . Modified from Matsumoto *et al.*<sup>14)</sup>

影響を与えることが知られている。PKA subunits のタンパク発現に関しては、STZ 群にて触媒 subunit の 1 つである  $Cat\alpha$  が低下し、調節 subunit の 1 つである  $RII\beta$  が増加するといった異常が生じているが、<sup>13)</sup> cilostazol 投与群にて  $RII\beta$  が低下した [Fig. 2(E)]. Cilostazol を慢性投与することにより、糖尿病動物における EDHF 様弛緩反応が cAMP/PKA signaling の増加を介して改善されることが示唆された。EDHF signaling として重要な役割を果たす gap junction の機能は cAMP/PKA signaling によって増強することが知られているので、この機能改善が cilostazol による EDHF 様弛緩反応の改善につながったと考えられる。Cilostazol 慢性投与により、PDE3 活性が持続的に抑制された結

果、糖尿病時において、cAMP の分解が抑制されるのみならず、PKA subunits の発現バランスの改善が起こり、最終的に cAMP/PKA 系の改善につながったと考えられる (作業仮説; Fig. 3). EDHF は血管径が小さくなる程に、寄与が大きくなるので、cilostazol は糖尿病性細小血管障害の治療薬として有用である可能性が示唆された。<sup>7)</sup> これらのことから、cAMP/PKA 系の活性化が EDHF の改善に対して有効であることが示唆されたが、詳細な分子メカニズムに関してはいまだ不明な点が多い。例えば AC に関して、G protein  $\beta\gamma$ -subunit や  $Ca^{2+}$  によって活性化される isozyme が知られており、<sup>15)</sup> ACh や  $Ca^{2+}$  ionophore の A23187 刺激によって血管における cAMP が上昇することがこれまで報告されているが、<sup>12,16)</sup> 具体的にどの AC isozyme が活性化されるのかに関しては現在のところ明らかではなく、また、糖尿病長期罹患によって糖尿病に関連するどの因子が cAMP signaling pathway に係わる酵素の発現や活性を変化させるのかはいまだ不明な点が多く、今後の検討が期待される。

#### 4. 2型糖尿病ラット腸間膜動脈における内皮由来因子のバランス変化

糖尿病は、1型糖尿病と2型糖尿病に大別されるが、本邦では2型糖尿病の患者が圧倒的に多い。2型糖尿病モデル動物は、現在、自然発症あるいは実験的モデル動物が存在するが、2型糖尿病は遺伝的要因と、環境的要因である生活習慣等の後天的な複雑な相互作用により発症するため、2型糖尿病モデル動物は少なく、血管障害に関する報告は少ない。そこで、2型糖尿病モデル動物である Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) ラット腸間膜動脈を用い、まず初めに、長期罹患状態 (60-65 週齢) における内皮依存性の血管反応に関して検討を行った。<sup>17,18)</sup> ACh による弛緩反応を検討したところ、対照動物の LETO 群と比較し、OLETF 群で弛緩反応の低下が観察され [Fig. 4(A)], 高濃度側では、弛緩から収縮に転じるが、この反応は indomethacin により消失した [Fig. 4(B)]. Indomethacin 存在下や、indomethacin + apamin + TRAM34 存在下による NO 弛緩反応 [Fig. 4(C)], L-NNA + indomethacin 存在下による EDHF 様弛緩反応 [Fig. 4(D)] は、いずれも OLETF 群で減弱した。Intact での弛緩反応において、ACh 高濃度側で収縮反応が起こ

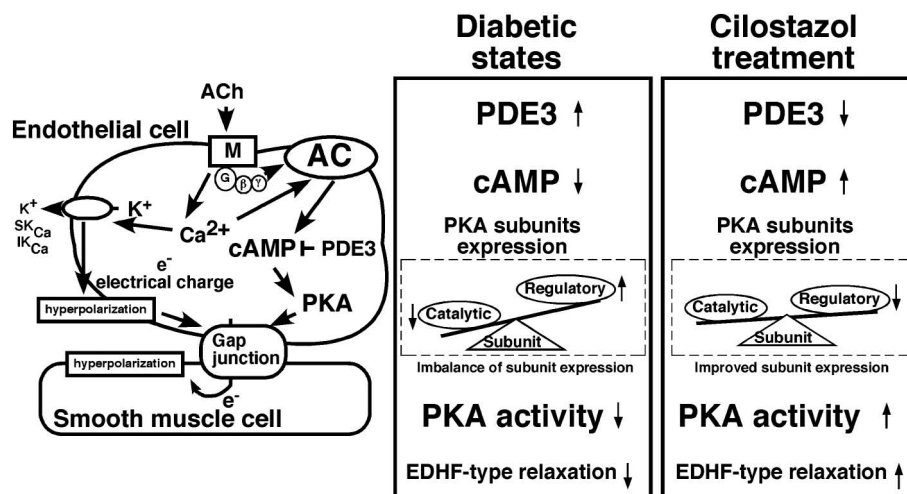


Fig. 3. Potential New Therapeutic Targets for EDHF Signaling in the Diabetic States

ACh-induced muscarinic receptor stimulation leads to G protein activation and elevations in cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$ . Then, activated G protein (including  $\beta\gamma$ -subunits) and/or  $\text{Ca}^{2+}$  may also elevate cAMP levels via AC activation (although it is currently unknown which isozyme of AC is activated), thereby enhancing the electrical conductance of myoendothelial gap junctions. In the holoenzyme state, PKA exists in an inactive form. After an increase in cAMP, the regulatory subunits bind to cAMP, resulting in the dissociation of the holoenzyme into a regulatory dimer and two catalytic monomers. The free C subunits can then phosphorylate various substrates. EDHF signaling may be enhanced by PKA-induced phosphorylation of gap junction component connexin or  $\text{K}^+$  channels. The reduced EDHF-type relaxation present in the diabetic state may be attributable to an increase in PDE3 activity, leading to a reduction in the action of cAMP, and the reduced PKA activity may be due to an imbalance between the expressions of PKA catalytic and regulatory subunits. Cilostazol (PDE3 inhibitor) improves EDHF-type relaxations in diabetic rats via an increase in cAMP/PKA signaling. AC, adenylate cyclase;  $e^-$ , electrical charge; G, G protein; M, muscarinic receptor; PKA, protein kinase A;  $\text{SK}_{\text{Ca}}/\text{IK}_{\text{Ca}}$ , small-/intermediate-conductance  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^+$  channel. Modified from Matsumoto *et al.*<sup>7)</sup>

ることから、EDCF が産生・放出されている可能性が考えられ、ACh 誘発収縮反応 (L-NNA 存在下) について検討を行ったところ、OLETF 群で収縮増大が認められた [Fig. 4(E)]. これは、COX 阻害薬や、TP 受容体拮抗薬で抑制されることから (data not shown), COX 由来の prostanoids が EDCF に寄与していることが示唆され、OLETF 群では、この系が亢進していると考えられた。実際、ACh 刺激における  $\text{TXA}_2$  [Fig. 4(F)] や  $\text{PGE}_2$  産生 (data not shown), 腸間膜動脈における COX1 [Fig. 4(G)], COX2 [Fig. 4(H)] タンパク発現が、OLETF 群で増加しており、これらより、OLETF ラットにおいて、腸間膜動脈においては、COXs 増加に伴った、EDCF 増加が起こっている一方で、EDRFs の低下も生じており、内皮由来因子のバランス異常が起こっていることが明らかとなった。また、EDHF signaling に関しては、STZ ラット腸間膜動脈と同様、gap junction 阻害薬 [Fig. 5(A)], PKA 阻害薬 [Fig. 5(B)] で抑制され、PDE 阻害薬 [Fig. 5(C)] で増強することから、1 型糖尿病ラットと同様の signaling を介していると考えられ、OLETF 群において、PDE3 阻害薬による弛緩反応 [Fig. 5(D)], cAMP analog による弛緩反応 [Fig. 5(E)], 並びに PKA 活性の低下が認められた

[Fig. 5(F)] ことから、OLETF ラットにおいても、EDHF signaling の減弱には、cAMP/PKA 系の障害が関与していると考えられる。実際に、OLETF ラットに cilostazol を慢性投与したところ、EDHF による弛緩反応が改善したことから [Fig. 5(G)], 2 型糖尿病病態時においても、cilostazol が EDHF signaling の改善に有効である可能性が示唆された。<sup>19)</sup> しかしながら、IBMX 存在下の EDHF 様弛緩反応は、依然として OLETF 群で低下しており [Fig. 5(C)], cAMP/PKA 系以外の障害も EDHF の低下に寄与している可能性が考えられた。EDHF signaling において、内皮細胞に局在する  $\text{Ca}^{2+}$  活性化  $\text{K}^+$  チャネル ( $\text{IK}_{\text{Ca}}$ ,  $\text{SK}_{\text{Ca}}$ ) が過分極発生に重要であることが知られており、<sup>5,6)</sup> これらの活性化薬による弛緩反応を検討したところ、いずれの活性化薬においても、OLETF 群にて減弱していたことから (data not shown), OLETF ラットにおいて、EDHF signaling に対する modulator としての cAMP/PKA 系の障害のみならず、EDHF 発生源としての  $\text{Ca}^{2+}$  活性化  $\text{K}^+$  チャネルの障害が起こっていることが示唆された。<sup>18)</sup>

5. 2 型糖尿病ラット腸間膜動脈における内皮由来因子のバランス異常に対する薬物慢性投与の影響  
2 型糖尿病ラットである OLETF ラット腸間膜動

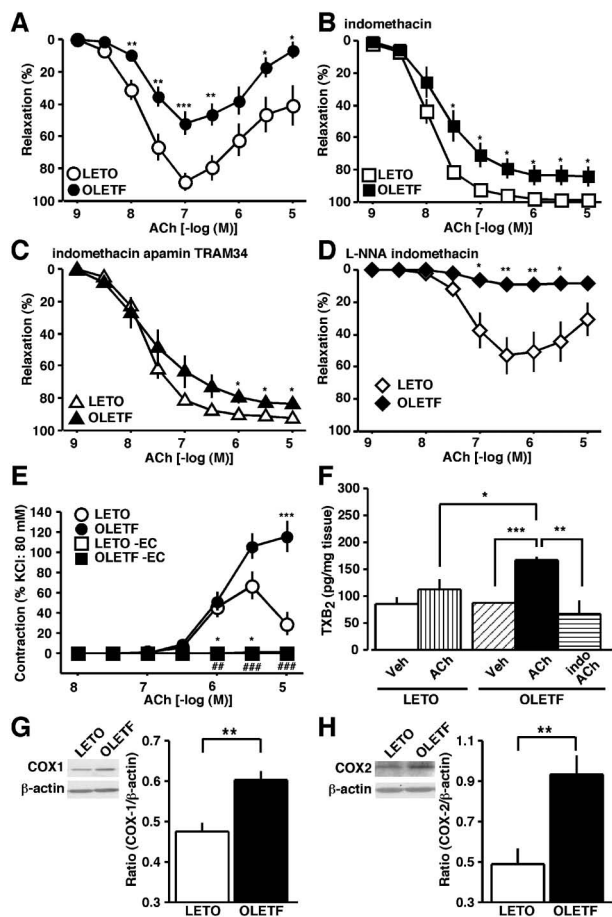


Fig. 4. Imbalance between Endothelium-derived Relaxing and Contracting Factors in Mesenteric Arteries from Aged Type 2 Diabetic OLETF Rats

(A–D) ACh-induced relaxation in mesenteric arteries from Long-Evans Tokushima Otsuka (LETO) and Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) rats. Data were obtained in the absence (A) or presence (B–D) of the following drugs: 10  $\mu$ M indomethacin (B) or 10  $\mu$ M indomethacin in combination either with 100 nM apamin + 10  $\mu$ M TRAM34 (C) or with 100  $\mu$ M L-NNA (D). Data are means  $\pm$  S.E. of 5–11 experiments. \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01, \*\*\* $p$ <0.001 vs. LETO. (E) ACh-induced contractions of rings of isolated mesenteric arteries with or without (-EC) endothelial cells (in the presence of 100  $\mu$ M L-NNA). Data are means  $\pm$  S.E. of 3–10 experiments. \* $p$ <0.05, \*\*\* $p$ <0.001 vs. LETO. \*\* $p$ <0.01, \*\*\* $p$ <0.001 vs. OLETF. (F) Release of TXB<sub>2</sub> (stable metabolite of TXA<sub>2</sub>) evoked by 10  $\mu$ M ACh in mesenteric artery rings, together with the effect of indomethacin (indo; 10  $\mu$ M) on ACh-induced TXB<sub>2</sub> release in mesenteric arteries from OLETF rats. Data are means  $\pm$  S.E. of 3–6 experiments. \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01, \*\*\* $p$ <0.001. (G, H) Analysis of COX1 (G) and COX2 (H) protein expression in mesenteric arteries. Data are means  $\pm$  S.E. of 7 experiments. \*\* $p$ <0.01. Modified from Matsumoto *et al.*<sup>15)</sup>

脈においては、EDCFの亢進、EDRFの減弱といった内皮由来因子の不均衡性が生じていることが明らかとなったため、この障害が起こっている週齢より、種々の薬物を慢性投与して検討した。<sup>20–22)</sup>

経口血糖降下薬ピグアナイド薬のmetforminは、2型糖尿病患者の血圧を下げるといった報告や、動物モデルにおいて抗酸化作用・交感神経抑制作用等、抗糖尿病以外の有益な効果が報告されている。

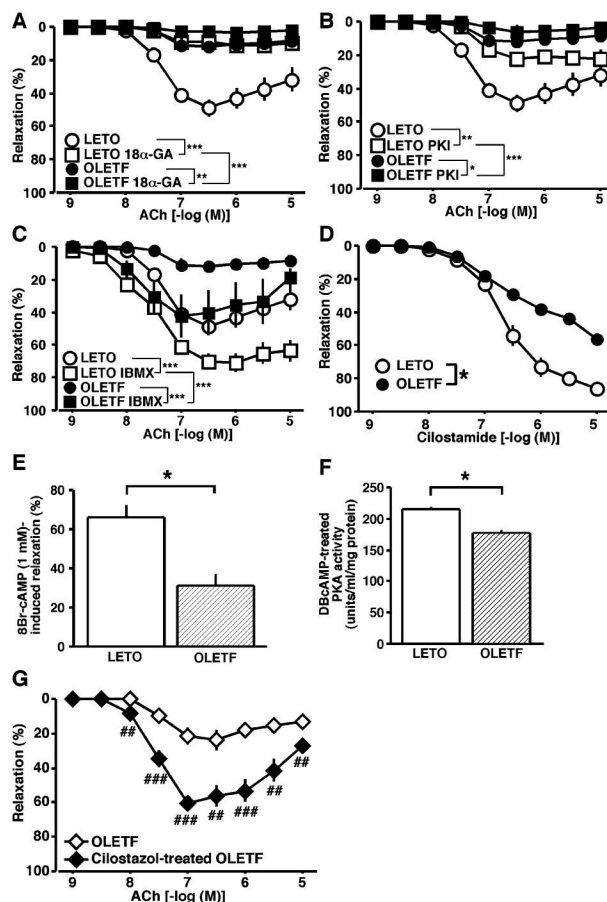


Fig. 5. EDHF Signaling and cAMP/PKA Pathway in Mesenteric Arteries from Type 2 Diabetic OLETF Rats

(A–C) Effects of the gap-junction inhibitor 18 $\alpha$ -GA (A), a PKA inhibitor (B), and the PDE inhibitor IBMX (C) on the EDHF-type relaxations. (D–F) cAMP-mediated relaxation and PKA activity in mesenteric arteries. (D) Concentration-response curves for the relaxations induced by cilostamide. Decreases in cAMP derivative-induced relaxation (E) and PKA activity (F) in OLETF mesenteric arteries. (A–F) Data are means  $\pm$  S.E. of 4–6 experiments. \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01, \*\*\* $p$ <0.001. (G) EDHF-type relaxations in mesenteric arteries obtained from cilostazol (100 mg/kg/d for 4 weeks)-treated and -untreated OLETF rats. Data are means  $\pm$  S.E. of 8 experiments. \*\* $p$ <0.01, \*\*\* $p$ <0.001 vs. OLETF group. Modified from Matsumoto *et al.*<sup>16,17)</sup>

OLETF ラット (36–42 週齢) に対して metformin を 4 週間慢性投与して (OLETF + met 群) 検討したところ、LETO 群と比較して OLETF 群では、ACh による内皮依存性弛緩反応の減弱、EDHF 様弛緩反応の減弱、EDCF 反応の増大が認められたが、OLETF + met 群において、内皮依存性弛緩反応 [Fig. 6(A)], EDHF 様弛緩反応 [Fig. 6(B)] の改善が認められ、EDCF 反応も低下し [Fig. 6(C)], ACh 刺激による TXA<sub>2</sub> (data not shown), PGE<sub>2</sub> 産生 [Fig. 6(D)] も低下した。さらに、OLETF 群において腸間膜動脈における superoxide 産生が増大していたが、これは OLETF + met 群に

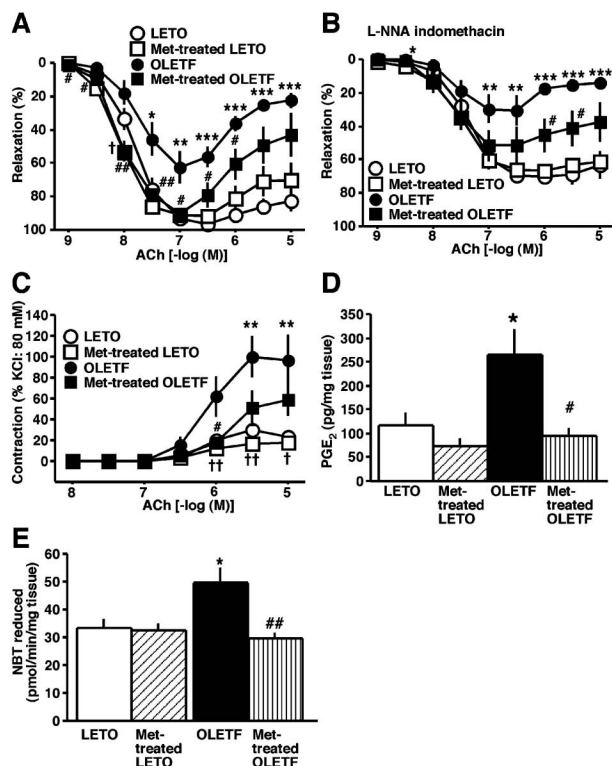


Fig. 6. Metformin (Met) Normalizes Endothelial Function and Reduces Prostanoid Release and Superoxide Generation in Type 2 Diabetic Mesenteric Arteries

(A–C) Concentration response curves for ACh-induced relaxation (A, B) and contraction (C). Data were obtained in the absence (A), presence of 10  $\mu$ M indomethacin + 100  $\mu$ M L-NNA (B), or 100  $\mu$ M L-NNA (C). Data are means  $\pm$  S.E. of 8 experiments. \* $p$  < 0.05, \*\* $p$  < 0.01, \*\*\* $p$  < 0.001, LETO group vs. OLETF group;  $^{\#}p$  < 0.05,  $^{\#\#}p$  < 0.01, untreated OLETF group vs. Met-treated OLETF group;  $^{\dagger}p$  < 0.05,  $^{\dagger\dagger}p$  < 0.01, untreated LETO group vs. Met-treated LETO group. (D) Release of PGE<sub>2</sub> evoked by 10  $\mu$ M ACh in mesenteric artery. (E) Mesenteric superoxide production by measurement of amount of nitro blue tetrazolium (NBT). Data are means  $\pm$  S.E. of 6 (D) or 4 (E) experiments. \* $p$  < 0.05 vs. LETO group.  $^{\#}p$  < 0.05,  $^{\#\#}p$  < 0.01 vs. OLETF group. Modified from Matsumoto *et al.*<sup>18)</sup>

において抑制されていた [Fig. 6(E)]. これらのことから, metformin は血管に直接的に作用して, 血管収縮性 prostanoids や oxidative stress を抑制することによって内皮機能を改善することが明らかとなった. Metformin の作用点と考えられている AMP-activated protein kinase (AMPK) の活性化薬 AICAR を処置することで prostanoid 産生や EDCF による反応が抑制されること (data not shown) から, AMPK の活性化が一部関与しており, metformin が AMPK を活性化することによって内皮機能障害を是正した可能性が示唆されたが, metformin の血管内皮細胞に対する情報伝達系に関しては今後の検討課題である.<sup>20)</sup>

長鎖 n-3 脂肪酸である eicosapentaenoic acid (EPA) は, 心血管障害の発症・進展の抑止に有用であるこ

とが近年示唆されている. OLETF ラット (46–50 週齢) に対して EPA を 4 週間慢性投与して検討したところ, 前述した OLETF ラット腸間膜動脈で観察された異常, すなわち, ACh 誘発内皮依存性弛緩反応, EDHF 様弛緩反応, EDCF の産生・収縮反応が EPA 投与群で改善した (data not shown). EPA 投与群においては, 腸間膜動脈における COX2 発現低下や, ERK 活性の低下を引き起こし, また胸部大動脈において NFkappa B 活性も低下したことから (data not shown), これらの是正が, 内皮機能改善にも関与している可能性が示唆された.<sup>21)</sup>

種々の血管において, EDRFs と EDCF がクロストークしていることが報告されている. 内皮由来因子のバランス異常が起こっている 2 型糖尿病病態下において metformin や EPA を慢性投与した結果, 現在のところ, 詳細な分子メカニズムに関しては未知な部分も多いが, EDCF signal が抑制されると EDHF signal が改善するといった知見を得た.<sup>20,21)</sup> そこで, 実際に EDCF を抑制することが EDHF signal の是正につながるかを検討するため, EDCF の主要成分である TXA<sub>2</sub> 合成酵素阻害薬 ozagrel を慢性投与して腸間膜動脈における EDHF 様弛緩反応について検討したところ, EDHF 様弛緩反応が部分的に改善することが明らかとなった (data not shown).<sup>22)</sup> したがって, これら一連の検討から, 2 型糖尿病を長期的に罹患したような病態下においては, EDRFs と EDCF のクロストークの異常が起こっていることが明らかとなり, EDCF signaling の抑制が EDHF signal を改善させる可能性があることが明らかとなった.

## 6. おわりに

本研究の結果から, 糖尿病病態時における EDHF 障害の機序の一端が明らかとなった. 血管における最も重要な機能である収縮・弛緩反応に関して, 血管径が小さくなればなる程, EDHF の寄与が大きくなるが, 糖尿病病態時においては, EDHF signaling の障害が起こっており, これは cAMP による EDHF に対する調節的な働きが欠損しているために起こるということが明らかとなった. また, 2 型糖尿病を長期的に罹患したモデルにおいては, EDHF の減弱とともに EDCF の亢進が起こっており, これらがクロストークすることで, 更なる悪循

環を生じさせている可能性が明らかとなった。これまで、EDHFが減弱しているいくつかの病態モデルに対して、その病態自体をターゲットとした治療薬などがEDHF signalingを改善させることが報告されてはいたが、その数は少なく、詳細な分子機序に関しては全く不明であった。本研究によって、血管に対してcAMP/PKA系を活性化するような薬物、例えば、PDE3阻害薬(cilostazol)、あるいは、EDCFを抑制するような薬物(prostanoid合成酵素阻害薬やTP受容体 antagonist)、あるいはmetforminやEPAといったものがEDHFをターゲットとした新しい治療戦略になり得ると思われる。しかしながら、これらの知見が、糖尿病という複雑な病態において共通の現象であるのかは现阶段では明らかではなく、糖尿病動物でのEDHFの機能変化やその発生機序に関しては、更なる検討が必要であろう。糖尿病性細小血管障害に対する治療戦略はいまだ、完全に確立されておらず、糖尿病性細小血管障害の発症・進展を阻止することができれば、糖尿病患者のQOLは劇的に改善されるので、本研究が糖尿病性細小血管障害に対する治療戦略の一助になれば幸いである。

**謝辞** 本研究を遂行するにあたり、OLETF及びLETOラットを供与して頂いた大塚製薬(株)徳島研究所に心より感謝致します。本研究は、星薬科大学機能形態研究室で行われた研究であり、本研究の遂行に当たり終始御指導頂きました鎌田勝雄教授に心より感謝申し上げます。また、本研究を行うに当たり御指導、御協力頂きました小林恒雄准教授、並びに同研究室の皆様にも深く感謝致します。

## REFERENCES

- 1) Matsumoto T., Kobayashi T., Kamata K., *J. Smooth Muscle Res.*, **44**, 41–55 (2008).
- 2) Kobayashi T., Matsumoto T., Kamata K., *J. Smooth Muscle Res.*, **41**, 283–302 (2005).
- 3) Kobayashi T., *Yakugaku Zasshi.*, **128**, 1013–1021 (2008).
- 4) Landmesser U., Hornig B., Drexler H., *Circulation*, **109**(Suppl. 1), II27–II33 (2004).
- 5) Busse R., Edwards G., Feletou M., Fleming I., Vanhoutte P. M., Weston A. H., *Trends Pharmacol. Sci.*, **23**, 374–380 (2002).
- 6) Feletou M., Vanhoutte P. M., *Pharmacol. Res.*, **49**, 565–580 (2004).
- 7) Matsumoto T., Kobayashi T., Kamata K., *Curr. Cardiol. Rev.*, **2**, 185–191 (2006).
- 8) Vanhoutte P. M., Feletou M., Taddei S., *Br. J. Pharmacol.*, **144**, 449–458 (2005).
- 9) Griffith T. M., *Br. J. Pharmacol.*, **141**, 881–903 (2004).
- 10) Matsumoto T., Kobayashi T., Kamata K., *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **285**, H283–H291 (2003).
- 11) Matsumoto T., Kobayashi T., Kamata K., *J. Smooth Muscle Res.*, **39**, 67–86 (2003).
- 12) Matsumoto T., Wakabayashi K., Kobayashi T., Kamata K., *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **289**, H2234–H2243 (2005).
- 13) Matsumoto T., Wakabayashi K., Kobayashi T., Kamata K., *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **287**, H1064–H1071 (2004).
- 14) Matsumoto T., Kobayashi T., Wakabayashi K., Kamata K., *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **289**, H1933–H1940 (2005).
- 15) Defer N., Best-Belpomme M., Hanoune J., *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, **279**, F400–F416 (2000).
- 16) Chaytor A. T., Taylor H. J., Griffith T. M., *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **282**, H1548–H1555 (2002).
- 17) Matsumoto T., Kakami M., Noguchi E., Kobayashi T., Kamata K., *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **293**, H1480–H1490 (2007).
- 18) Matsumoto T., Kobayashi T., Kamata K., *Eur. J. Pharmacol.*, **538**, 132–140 (2006).
- 19) Matsumoto T., Noguchi E., Ishida K., Nakayama N., Kobayashi T., Kamata K., *Eur. J. Pharmacol.*, **599**, 102–109 (2008).
- 20) Matsumoto T., Noguchi E., Ishida K., Kobayashi T., Yamada N., Kamata K., *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **295**, H1165–H1176 (2008).
- 21) Matsumoto T., Nakayama N., Ishida K., Kobayashi T., Kamata K., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **329**, 324–334 (2009).
- 22) Matsumoto T., Takaoka E., Ishida K., Nakayama N., Noguchi E., Kobayashi T., Kamata K., *Atherosclerosis*, **205**, 87–95 (2009).