

学位論文内容要旨

論文題目

血管内皮細胞機能調節におけるシロスタゾールの作用

指導（紹介）教授： 石井 邦明

申請者氏名： 梶本 綾子

【目的】シロスタゾールは、ホスホジエステラーゼ 3 (PDE3) を選択的に阻害し、血小板凝集抑制作用と血管拡張作用を合わせもつ抗血小板剤であるが、近年、シロスタゾールによる血管拡張作用への内皮弛緩因子の関与が報告されてきている。血管機能の恒常性の維持に、内皮細胞より産生される一酸化窒素(NO)やプロスタサイクリン(PGI₂)などの血管弛緩因子が重要な役割を果たしている。そこで、私はヒト培養血管内皮細胞(HAEC)を用い、NOおよびPGI₂産生に対するシロスタゾールの作用とその機序について検討を行った。【方法】NO産生は薬剤刺激1時間後の培養上清中に蓄積される亜硝酸量を Griess 法にて測定した。cAMPの測定は薬剤刺激15分後の細胞を溶解し、EIA法にて測定した。シグナル伝達は、薬剤刺激1時間の細胞よりタンパクを調製し、eNOS及びAktのリン酸化タンパクに対する抗体を用い、ウエスタンブロットを行った。PGI₂産生は薬剤刺激後の培養上清中の6-keto-Prostaglandin F_{1α}をEIA法にて測定した。細胞内カルシウム濃度([Ca²⁺]_i)は、Fluo-4AMを細胞に取り込ませ薬剤刺激による蛍光強度の変化を測定した。血管新生に対する作用は、HAECを3次元培養する事によって形成される管腔の長さを測定した。【結果】シロスタゾールは濃度依存的かつ有意に内皮細胞からのNO産生を促進し、cAMPを上昇させた。他のcAMPを上昇させる薬剤もNO産生を促進した。また、シロスタゾールはeNOSのSer¹¹⁷⁷のリン酸化およびThr⁴⁹⁵の脱リン酸化を促進したが、これらの作用はPKA阻害剤によって完全に阻害された。また、シロスタゾールによるNO産生もPKA阻害剤によって完全に阻害された。シロスタゾールによって内皮細胞の管腔形成が促進されたが、この作用はPKA阻害剤やNOS阻害剤によって完全に阻害された。また、シロスタゾールは濃度依存的かつ有意に内皮細胞からのPGI₂産生を促進した。この作用は、カルシウムキレーターやカルシウム依存性PLA₂阻害剤で完全に抑制された。一方、他のcAMPを上昇させる薬剤は、PGI₂産生を促進しなかった。また、シロスタゾールによるPGI₂産生もPKA阻害剤により抑制されなかった。シロスタゾールは[Ca²⁺]_iを上昇させたが、他のcAMPを上昇させる薬剤は、[Ca²⁺]_iには影響しなかった。【結論】ヒト培養血管内皮細胞においてシロスタゾールはNO産生を促進し、その作用は、cAMP/PKA依存的であった。また、シロスタゾールはNO依存的に血管新生を促進した。一方で、シロスタゾールはPGI₂産生を促進し、同時に[Ca²⁺]_iを増加させたが、これらの作用はcAMP/PKA非依存的であった。

平成 20 年 1 月 28 日

山形大学大学院医学研究科長 殿

学位論文審査結果報告書

申請者氏名： 橋本 綾子

論文題目： 血管内皮細胞機能調節におけるシロスタゾールの作用

論文審査員： 主審査委員 久保田 功 印

副審査委員 藤井 順逸 印

副審査委員 貞弘 光章 印

審査終了日： 平成 20 年 1 月 28 日

【 論文 審査 結果 要 旨 】

シロスタゾールは抗血小板薬として使用されている薬剤で、作用機序は血小板のホスホジエステラーゼ 3 (PDE3) 阻害によるとされる。近年、摘出ラット大動脈においてシロスタゾールが内皮依存性の血管拡張作用を有することが報告されたが、内皮細胞に対する直接作用は未だ検討されていない。一方、内皮細胞から産生される一酸化窒素 (NO) やプロスタサイクリン (PGI₂) が血管機能の恒常性の維持に重要な役割を果たしており、これらの産生障害が動脈硬化の進展に深く関与していることが知られている。

本研究では、ヒト大動脈由来内皮細胞 (HAEC) に対するシロスタゾールの作用を検討した。シロスタゾールは濃度依存的に、1) HAEC からの NO 産生を促進し (培養上清中の亜硝酸量を Griess 法で測定)、2) HAEC の管腔形成を促進し (三次元培養による定量評価)、3) HAEC からの PGI₂ 産生を促進させた (培養上清中の 6-keto-PGF_{1α} で評価)。またシロスタゾールは細胞内サイクリック AMP (cAMP) 濃度を上昇させ、内皮型一酸化窒素合成酵素 (eNOS) のリン酸化を促進し、細胞内カルシウム濃度を上昇させた。NO 産生及び管腔形成の促進効果はプロテインキナーゼ A (PKA) 阻害薬や eNOS 阻害薬によって完全に阻害された。PGI₂ 産生亢進は PKA 阻害薬では抑制されず、カルシウムキレーターやカルシウム依存性ホスホリパーゼ A₂ 阻害薬により完全に抑制された。従って、シロスタゾールの NO 産生及び管腔形成作用は cAMP/PKA 依存的であり PDE3 阻害作用に基づくものであることが示唆された。一方、PGI₂ 産生亢進作用は cAMP/PKA 非依存的であり PDE3 阻害作用では説明できなかった。

従来シロスタゾールの効能は抗血小板作用に基づくものとされていた。本研究によってシロスタゾールが血管内皮細胞の NO 産生と PGI₂ 産生を亢進させ、管腔形成を促進することが明らかになった。血管内皮からの NO と PGI₂ 産生促進は動脈硬化の進展抑制や退縮効果につながり、さらに管腔形成の促進は虚血組織の血流改善をもたらす可能性がある。これらの作用がシロスタゾールの抗動脈硬化作用の一端を担っていることが示唆された。研究方法も適切であり学問的貢献度は高く、本審査会は学位論文に値するものと結論した。