

内 容 要 旨 目 次

主 論 文

Cilostazol Attenuates Angiotensin II-Induced Abdominal Aortic Aneurysms but Not Atherosclerosis in Apolipoprotein E-Deficient Mice

(シロスタゾールはアポリポプロテイン E 欠損マウスにおいてアンジオテンシン II により惹起される腹部大動脈瘤を改善するが動脈硬化には影響しない)

梅林亮子、内田治仁、垣尾勇樹、Venkateswaran Subramanian、Alan Daugherty、和田 淳
Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology (掲載予定)

平成 25 年 5 月 Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology | Peripheral Vascular Disease Scientific Sessions 2013 で発表

平成 26 年 10 月 第 55 回日本脈管学会総会で発表

主 論 文

Cilostazol Attenuates Angiotensin II-Induced Abdominal Aortic Aneurysms but Not Atherosclerosis in Apolipoprotein E-Deficient Mice

(シロスタゾールはアポリポプロテイン E 欠損マウスにおいてアンジオテンシン II により惹起される腹部大動脈瘤を改善するが動脈硬化には影響しない)

【緒言】

腹部大動脈瘤は通常無症状で経過するが、破裂という転機をとると高率に死に至る重篤な疾患である。しかしながらその治療法は、破裂の切迫した大動脈瘤に対する外科的治療に止まり有効な内科的治療法がない。

腹部大動脈瘤の病態には炎症が関与する事が知られている。一方、高脂血症マウスにアンジオテンシン II(AngII)を持続投与することでヒトの腹部大動脈瘤によく似た大動脈瘤を誘発する事ができる。

シロスタゾールはホスホジエステラーゼ III(PDEIII)阻害薬であり、抗血小板薬として既に臨床で使用されている。この薬剤はさらに抗炎症作用、抗酸化作用を有する事が報告されている。しかしながら、大動脈瘤へのシロスタゾールの効果は検討されていない。そこで我々は腹部大動脈瘤モデルマウスを用いてシロスタゾールの腹部大動脈瘤への効果を検討した。

【材料と方法】

実験プロトコール

8-12 週齢のオスの ApoE 欠損マウスに 0.1%シロスタゾール混餌または対照餌を与え、1 週間後より AngII(1000ng/kg/hr)を浸透圧ポンプで皮下投与し、その後 4 週間で大動脈径、血圧、脂質の評価を行った。実験プロトコールは岡山大学動物実験委員会の倫理審査を受け承認されている。

シロスタゾール血中濃度

シロスタゾールの血中濃度はシロスタゾール 5 週間投与後に日中に血液を採取し血清を用いて HPLC 法で測定した。

動脈瘤と動脈硬化巣の評価

大動脈を採取後、血管周囲の脂肪を除去し腎動脈上部で大動脈径を評価した。生食を投与したマウスの大動脈径の 1.5 倍以上の大動脈径を大動脈瘤と定義した。動脈硬化巣の評価は内膜上にある動脈硬化巣の面積を測定し算出した。

血管内皮細胞の単離と培養

ApoE 欠損マウスより大動脈を採取し、無菌的に 3 mmの長さに切断しマトリゲル上に置くと内皮細胞が伸び出てくる。マトリゲル上に細胞が増殖した状態でディスパーゼ(BD 社)処理後、細胞を継代する。内皮細胞の確認は von Willebrand 因子の染色で行った。

細胞実験条件

内皮細胞は 4-6 継代で実験に使用した。無血漿状態で一晩おきシロスタゾール(0、1、10 μ M)またはフォルスコリンおよび H89 を添加して 30 分後に TNF- α (1ng/ml)を添加し 24 時間後に細胞と培養液を回収した。

【結果】

シロスタゾールの血中濃度、マウスの体重、脈拍、血圧、脂質への影響

シロスタゾールの血中濃度は昼間の測定で $198 \pm 10 \mu$ g/dl であった。シロスタゾールの血中濃度はヒトのシロスタゾール 100 mg単回投与時の 12~24 時間後の血中濃度とほぼ同等であった。AngII 投与群では優位に血圧が上昇したが、シロスタゾール投与による体重、血圧、脈拍、脂質への影響はなかった。(Supplemental Table I、Supplemental Table I)。

シロスタゾールの腹部大動脈瘤、動脈硬化への影響

生食を皮下投与し対照餌を投与したマウス 6 匹を生食群、生食と 0.1%シロスタゾール混餌を投与したマウス 5 匹をシロスタゾール群、AngII を皮下投与し対照餌を投与したマウス 25 匹を AngII 群、AngII とシロスタゾール混餌を投与したマウス 17 匹を AngII+シロスタゾール群とした。試験終了時の腹部大動脈径は生食群で 0.88 ± 0.03 mm、シロスタゾール群で 0.87 ± 0.04 mm であった。これに対し、AngII 群では平均腹部大動脈径 1.94 ± 0.16 mm と動脈径の有意な拡張を認め (Figure1A、Figure1B 左)、AngII+シロスタゾール群では平均腹部大動脈径 1.53 ± 0.17 mm と有意に大動脈径の拡大が抑制されていた ($p=0.049$ 、Figure1A、Figure1B 右)。腹部大動脈瘤の発症率は AngII 群で 79% に対し、AngII+シロスタゾール群では 43% と有意に抑制されていた ($p=0.029$ 、Figure1C)。しかしながら死亡率には両群に有意な差を認めなかった (AngII 群 15% 対 AngII+シロスタゾール群 11%、Figure1D)。さらに動脈硬化面積も 4 群間で有意な差を認めなかった (Supplemental figure D)。

組織学的に AngII 投与により生じた中膜の弾性板の断裂と同部位へのマクロファージの浸潤がシロスタゾール投与により抑制されたことが示された (Figure2)。この所見と一致して大動脈の MMP-2、-9 活性がシロスタゾール投与により抑制されていた (Figure3)。さらに炎症性サイトカインもシロスタゾール投与により発現が抑制されていた (Figure4)。

以上の結果よりシロスタゾールは大動脈の炎症を抑制することで大動脈の拡張を抑制したと考えた。

シロスタゾールの血管内皮細胞への作用の検討

免疫染色により血管内皮細胞に PDEIII が存在することを示した (Supplemental figure II)。TNF- α により炎症を惹起しシロスタゾールの内皮細胞における抗炎症効果を検討した。シロスタゾールは Ccl2/MCP-1、ICAM-1 の発現を容量依存性に抑制した (Figure5)。

血管内皮細胞において cAMP がプロテインキナーゼ A (PKA) を介して抗炎症作用を発揮する事が知られている。そこで、フォルスコリンで細胞内 cAMP を増加させると、シロスタゾール投与時と同様に Ccl2/Mcp-1 と ICAM-1 の発現が抑制され、その効果は PKA 阻害作用を有する H89 投与により消失した (Figure6)。

以上のことからシロスタゾールは cAMP-PKA 経路を介して内皮細胞の炎症性サイトカイン産生と接着分子の発現を抑制する事が示された。

[考察]

他のモデルでの報告

AngII モデルはヒトの腹部大動脈瘤の中膜の断裂、炎症、壁在血栓、破裂、動脈硬化などの特徴をよく再現しているが、その動脈瘤の形成部位が腎動脈上部という事がヒトと異なっている。その他の大動脈瘤モデルであるエラストアーゼモデルと CaCl₂ モデルでは腎動脈下部に動脈瘤が形成される。エラストアーゼモデルにおいて、シロスタゾールが MMP 活性化を抑制することで腹部大動脈瘤の形成を抑制したことが既に報告されている。

シロスタゾールの動脈瘤抑制機序の検討に関して

細胞内の cAMP が増加することで血管内皮細胞の安定化が得られることが知られている。本研究ではマウス血管内皮細胞の初代培養細胞においてシロスタゾールが接着分子と炎症性サイトカインの産生を抑制したことを報告した。このことから、シロスタゾールは血管内皮細胞の炎症による変化を抑制し、マクロファージの血管中膜への遊走を抑制したと考えた。

動脈硬化巣への影響がなかったことに関して

AngII 投与により高脂血症マウスでは動脈瘤と同時に動脈硬化が生じるが、その程度は報告により異なり、また動脈硬化巣の改善と動脈瘤の改善が同時に起こらない事も報告されている。ことは動脈硬化と動脈瘤が発生する機序が異なっていることを示唆している。シロスタゾールの動脈硬化抑制効果は LDL 欠損マウスに高脂肪食を与えたモデルで報告されているが、本実験では高脂肪食を与えておらずモデルが異なることも原因と考えられる。

シロスタゾールの脂質へ影響に関して

高脂血症ではないマウスに **AngII** を投与しても大動脈瘤は発生するが、高脂血症マウスでは発生率が 3-4 倍となる。さらに、アポリポ蛋白 B を含有したりポ蛋白濃度の変化で動脈瘤形成が抑制されることや ω 3 多価不飽和脂肪酸が動脈瘤抑制効果を持つことが示され脂質の重要性が示唆されている。しかしヒトにおいてはコレステロール値と動脈瘤の間に明らかな関係は証明されていない。シロスタゾールは基礎および臨床研究において中性脂肪低下作用と **HDL** コレステロール増加作用が報告されている。しかし、本研究では脂質の変化は認めなかった。シロスタゾールは脂質代謝改善作用以外の作用で動脈瘤形成に抑制的に働いたと考えられる。

抗血小板作用による動脈瘤形成抑制効果

抗血小板薬が動脈瘤の発生、進展、破裂に抑制的に作用すると報告する文献もある。シロスタゾールは他の抗血小板薬とは作用機序が異なるが、抗血小板効果により動脈瘤形成を抑制した可能性は否定できない。さらなる今後の検討によりシロスタゾールが既に発生している動脈瘤に対し瘤の拡大を抑制する効果や破裂を抑制する効果を有するかどうかを明らかにする事が望まれる。

【結論】

シロスタゾールは大動脈血管内皮細胞の **PDEIII** を阻害することにより **cAMP-PKA** 経路を介して動脈壁の炎症を抑制し、大動脈瘤形成に抑制的に作用した。シロスタゾールが腹部大動脈瘤治療の新たな選択肢の一つとなる可能性が示唆された。