

氏名	のぞこ まさのり 野迫 正則		
学位の種類	博士（薬学）		
報告番号	乙第 1796 号		
学位授与の日付	令和 1 年 10 月 3 日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当（論文博士）		
学位論文題目	<b>コレステロール代謝異常を伴う新規病態モデルに関する病態生理学的ならびに薬理学的研究</b>		
論文審査委員	(主 査) 福岡大学	教授	三島 健一
	(副 査) 福岡大学	教授	岩崎 克典
	福岡大学	教授	山内 淳史
	福岡大学	准教授	佐野 和憲

## 内 容 の 要 旨

動脈硬化は一つの基礎疾患で起こるものではなく様々な要因が関わり病態が進行する。高血圧、高脂血症、肥満、糖尿病などがリスクファクターとして知られ、これら基礎疾患に対する治療薬として降圧剤、高脂血症治療剤、糖尿病治療薬などが多く開発されている。これらの基礎疾患治療薬は広く用いられているが未だに動脈硬化を基礎疾患として起こる脳梗塞、慢性腎疾患を制御する薬剤は開発されておらず、多くの方がこれらの疾患で亡くなっているのが現状である。これらの疾患に対して有効な治療法が開発されていない原因の一つとして、薬効評価に用いる動物モデルが十分ではないことと、病態の理解が乏しいことが考えられる。そこで、本研究では、糖尿病性腎症モデル、動脈硬化モデル、脳梗塞モデルについて高脂肪食負荷の影響を調べ、これらのモデルを用いて脂質低下、酸化ストレス軽減及び抗炎症を作用機序とした治療法の有効性について検討した。

### 動脈硬化惹起性高脂肪食 Paigen Diet 負荷による新規糸球体障害モデル作製とその応用

慢性腎臓病 (CKD) は、腎機能低下が慢性的に続く状態で、腎機能低下が持続すると末期腎不全となり人工透析や腎移植を受けなければ生命を維持できず QOL も低下する。さらに、CKD 患者は、心臓病や脳卒中などの心血管疾患になりやすく、CKD と心血管疾患の病態を解明することは急務である。糖尿病性腎症は、細小血管障害のひとつであり、糖尿病患者における死亡率の主要な決定因子とされる。慢性的な高血糖は糖尿病性腎症の主な原因であるが、血糖低下薬投与では糖尿性腎症の十分な予防はできていない。また、腎障害の一因に高血圧が関わっているため、高血圧治療薬のアンジオテンシン受容体拮抗薬 (Angiotensin II Receptor Blocker, ARB) が使用され、ARB は血圧低下作用のみならず、腎組織中の Renin Angiotensin system (RAS) の活性化を抑制することによる腎保護作用も

期待されている。しかし、その作用は限定的であり、異なる作用を持つ糖尿病性腎症の治療薬開発が望まれている。そのためには、臨床状態を模倣する良いモデルの開発が必要となってくる。

糖尿病性腎症患者はメタボリックな状態にあり高脂血症を併発していることが多く、高脂血症を併発していなくてもアルブミン尿の増加による副次的な変化として高脂血症を発症する。高コレステロール血症は糖尿病患者における腎症の危険因子であり、酸化ストレス及び炎症を誘導し、糖尿病性腎症の進行に影響を与える可能性がある。興味深いことに、酸化ストレスや炎症といった因子は大血管疾患である動脈硬化においても病態の進行に関与することが知られている。そこで、腎症を発症するモデルに対して高脂血症を誘発させると腎症の進展が早まり早期に腎症を発症するモデルを確立できると考えて、糖尿病を自然発症する Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) ラットを用いて、新規糸球体障害モデル作製を試みた。

糖尿病発症前の腎障害がみられていない 8 週齢の OLETF ラットに、動脈硬化惹起性の高脂肪食のひとつである Paigen Diet (15%ココアバター、コレステロール、コール酸)を負荷すると、血漿総コレステロール濃度は高値となり、糸球体障害のマーカーである尿中アルブミン排泄量は経時的に増加した。また、Paigen Diet 負荷 12 週後の糸球体硬化指数は顕著に悪化した。尿中アルブミン排泄量及び糸球体硬化指数と血漿総コレステロール濃度は正相関を示した (図 1)。

次に、Paigen Diet の餌の各組成が腎障害に与える影響を検討した。その結果、高脂肪 (15%ココアバター、コレステロール)とコール酸が相乗的に作用し、腎障害を惹起していることが明らかになり、高脂血症と慢性炎症の共存が腎障害進行を顕著に進行させることが示唆された。

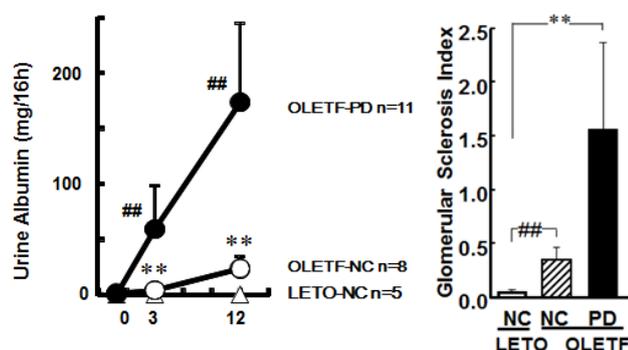


図 1 Paigen Diet 負荷による糸球体障害

次に、Paigen Diet 負荷による糸球体障害の発現機序を解明するために組織学的および分子生物学的検討を行った。免疫染色及び電子顕微鏡観察では糸球体内へのマクロファージ浸潤亢進及び脂肪滴形成が認められた。遺伝子発現量解析及び免疫染色ではマクロファージの活性化に関与する Mrp8/Tlr4 シグナルが亢進していた。また、マクロファージ内のスーパーオキシド産生に関わる Nox2 の発現も増加していた。マクロファージの浸潤が多く、腎障害の病態進行に関与すると言われるが、特に糖尿病性腎症での関りが強いと報告されている。つまり、このモデルの病態進行にマクロファージが重要な役割を果たしていることを示唆している。さらに、このことは、糖尿病性腎症の臨床状態を模倣する有用な病態モデルの開発に成功したことを意味している。

脂質低下薬であるプロブコールは、抗炎症作用と強力な抗酸化作用を有し、マクロファージの活性化を抑制し、抗動脈硬化作用を示すことが知られている。また、高コレステロール食を摂取した糖尿病ラットのアルブミン尿排泄量や糸球体障害を改善し、臨床試験においても糖尿病性腎症の進行を遅らせることが報告されている。一方、抗血小板薬であるシロスタゾールは、抗炎症作用及び血管内皮細胞保護作用を有し、抗動脈硬化作用が報告されている。また、シロスタゾールは OLETF ラットの微量アルブミン尿を改善するとの報告もある。しかし、これらの薬物の併用が糖尿病性腎症にさらに強力な作用を有するかは不明である。そこで、本モデルを用いてシロスタゾールとプロブコールの併用効果について評価した。その結果、尿中タンパク及びアルブミン排泄量の上昇をプロブコールが軽度低下させたのに対して、シロスタゾールとプロブコールの併用は有意に低下させた（図2）。この時、糸球体中へのマクロファージ浸潤が抑制され、糸球体内の酸化ストレスは軽減していた。これらの薬剤の併用はマクロファージ活性化及び糸球体への浸潤を抑制することにより腎症の進展を抑制することが明らかになった（図3）。

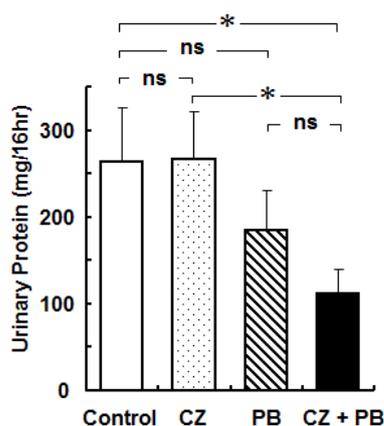
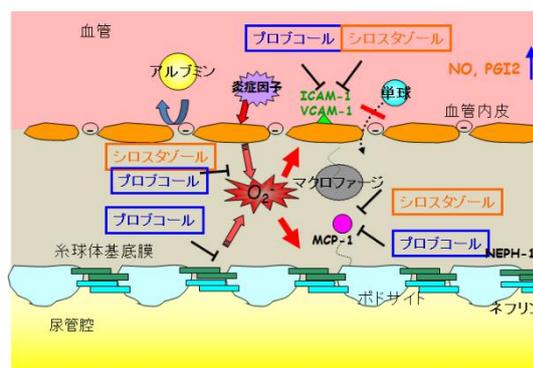


図2 シロスタゾールとプロブコール併用による糸球体障害改善作用

シロスタゾール+プロブコールの作用機序



血中コレステロール低下作用に加えてマクロファージ浸潤・活性化抑制で腎保護作用を示していると考えられる。(論文情報も参考に考察)

図3 シロスタゾールとプロブコール併用による糸球体障害改善機序（仮説）

### 動脈硬化モデルのプラークの量的及び質的变化と治療薬開発への応用

粥状動脈硬化のモデルマウスとして ApoE 欠損マウスと LDL レセプター欠損マウスが広く使われている。今回の検討では、ApoEKO マウス及び LDLRKO マウスに高脂肪食を負荷した条件での血漿脂質及び動脈硬化病変の面積及び病理組織像の経時変化について確認した。いずれの動脈硬化モデルにおいても動脈硬化病変が 20%程度までは血中で生成した酸化コレステロールを取り込んで泡沫化したマクロファージを主成分としたプラークであるが、20%を超えるころから線維化成分が多くなり基質化することが確認された。そこで、LDLRK マウスを用いてマクロファージが主成分である時期におけるシロスタゾールとプロ

ブコールの併用での効果について検討した。シロスタゾールとプロブコールのそれぞれの単剤は少ないながらも抗動脈硬化作用を有していたが、それらを併用することにより相乗的に増加され有意に動脈硬化巣面積を低下させた。また、これらの保護作用が血漿中コレステロール濃度と相関することを示した (図 4)。

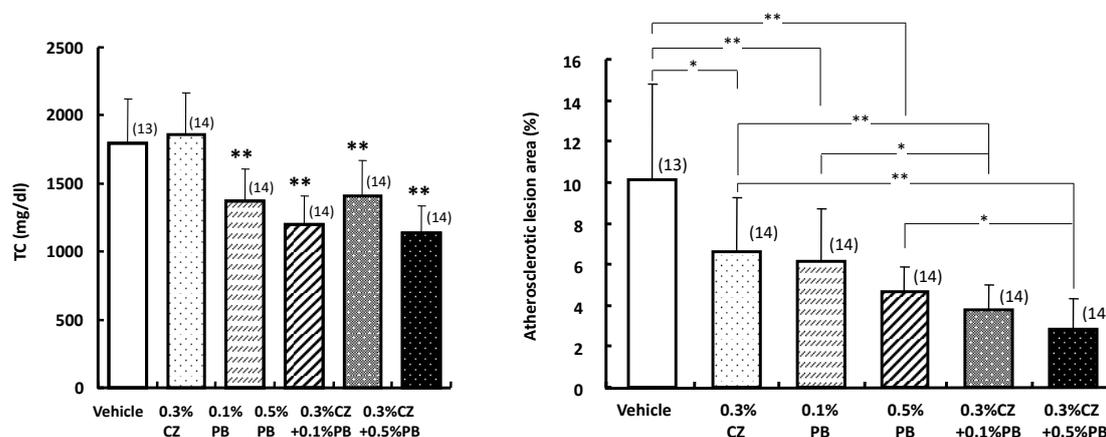


図 4 シロスタゾールとプロブコール併用による動脈硬化改善作用

#### 脳梗塞モデルにおける脳内コレステロール濃度と CB<sub>1</sub> の脳梗塞保護作用

脳梗塞は動脈硬化性疾患の一つであり、高脂血症は脳梗塞を増悪するとされているがその機序については十分に検討されていない。そこで、高脂血症が脳梗塞増悪にどのように寄与するか確認するため、高コレステロール食を給餌したマウスに対して中大脳動脈閉塞を惹起することにより検討した。高コレステロール食を給餌すると高コレステロール血症となるが、大脳皮質及び海馬におけるコレステロール含量は低下し脳梗塞における障害が増悪していた。また、興味深いことに、脳梗塞保護作用を有する CB<sub>1</sub> 受容体は低下していた。これらのことから、高脂肪食、特に高コレステロール食は脳内において細胞膜の安定性に関わるコレステロールを減らすとともに、脳梗塞保護作用を有するカンナビノイド受容体発現量を低下させることで脳梗塞のリスクとなることが示唆された。

本研究では、腎症、動脈硬化、脳梗塞の病態を理解するために高脂肪食を負荷した動物モデルの確立と病態生理学的検討を行った。OLETF ラットに動脈硬化惹起性の高脂肪食を負荷することで早期に且つ他モデルに比べてシビアな糸球体障害が惹起されるモデルを作製し、本モデルの糸球体障害にマクロファージの浸潤が関わっていることを明らかにした。また、動脈硬化モデルにおいては粥状動脈巣形成に関わるマクロファージをターゲットとした創薬の可能性を確認した。脳梗塞モデルにおいては高コレステロール食により脳内コレステロールが変化し、脳梗塞のリスクとなることを示した。今回得られた動物モデルの病態生理の知見をもとに、マクロファージに焦点を当てた創薬ターゲット分子を設定した新規治療薬の開発が望まれる。

## 審査の結果の要旨

動脈硬化は、一つの基礎疾患で起こるものではなく、多くの要因が関わり、病態が進行する。高血圧、高脂血症、肥満、糖尿病などがリスクファクターとして知られているが、未だに動脈硬化を基礎疾患として起こる脳梗塞、慢性腎疾患を制御する薬剤は開発されておらず、多くの方がこれらの疾患で亡くなっている。その原因の一つとして、薬効評価に用いる動物モデルが十分ではないことと、病態の理解が乏しいことが考えられる。そこで、本論文は、3章で構成され、糖尿病性腎症モデル、動脈硬化モデル、脳梗塞モデルにそれぞれ高脂肪食を負荷し、腎臓、血管、脳の機能がどのように変化するか病態生理学的に検討した。さらに、それらの病態生理学的特徴から有効な治療薬の可能性を探索した。

### ①動脈硬化惹起性高脂肪食負荷による新規糸球体障害モデルの作製とその応用

糖尿病発症前の腎障害がみられていない8週齢の Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) ラットに、動脈硬化惹起性の高脂肪食のひとつである Paigen Diet (PD、15%ココアバター、コレステロール、コール酸) を負荷すると、血漿総コレステロール濃度は高値となり、糸球体障害のマーカーである尿中アルブミン排泄量は経時的に増加し、PD 負荷 12 週目の糸球体硬化指数も顕著に悪化した。PD 組成の中で、高脂肪 (15%ココアバター、コレステロール) とコール酸が相乗的に作用し、腎障害を惹起していた。

次に、PD 負荷による糸球体障害の発現機序を解明するために組織学および分子生物学的検討を行った。免疫染色及び電子顕微鏡観察では、糸球体内へのマクロファージ浸潤亢進及び脂肪滴形成が認められた。遺伝子発現量解析及び免疫染色ではマクロファージの遊走、接着、活性因子に関与するシグナルが亢進していた。また、マクロファージ内でのスーパーオキシド産生に関わる Nox2 の発現も増加していた。マクロファージの浸潤が多くの腎障害の病態進行に関与すると言われるが、特に糖尿病性腎症での関りが強いと報告されている。つまり、このモデルの病態進行にマクロファージが重要な役割を果たしていることを示唆している。さらに、このことは、糖尿病性腎症の臨床状態を模倣する有用な病態モデルの開発に成功したことを意味している。

次にこのモデルの有用性を調べるために、マクロファージの浸潤を抑制する脂質低下薬であるプロブコールと抗血小板薬であるシロスタゾールの併用効果について検討した。その結果、尿中タンパク及びアルブミン排泄量の上昇を有意に低下させ、糸球体中へのマクロファージ浸潤が抑制され、糸球体内の酸化ストレスも軽減していた。これらの薬剤の併用は、マクロファージ活性化及び糸球体への浸潤を抑制することにより、腎症の進展を防ぐことを明らかにした。

### ②高脂肪食負荷による動脈硬化モデルの病態進行に関わるプラーク変化とその応用

粥状動脈硬化のモデルマウスの ApoE 欠損マウスと LDL レセプター欠損マウスに高脂肪食を負荷した条件での血漿脂質及び動脈硬化病変の面積及び病理組織像の経時変化について調べた。いずれの動脈硬化モデルにおいても、動脈硬化病変が 20%程度までは血中で生成した酸化コレステロールを取り込んで泡沫化したマクロファージを主成分とした

プラークであるが、20%を超えるころから線維化成分が多くなり、基質化することが分かった。そこで、LDL レセプター欠損マウスを用いて、マクロファージが主原因である時期にシロスタゾールとプロブコールの併用効果について検討した。シロスタゾールとプロブコールのそれぞれの単剤は、少ないながらも抗動脈硬化作用を有していたが、それらを併用することにより、相乗的に有意に動脈硬化巣面積を低下させた。また、これらの保護作用が血漿中コレステロール濃度と相関することを示した。高脂肪食負荷による動脈硬化モデルの病態進行にマクロファージが関与していることを明らかにし、マクロファージが治療薬の標的分子になる可能性を示唆した。

### ③高脂肪食負荷による脳梗塞モデルにおける脳内カンナビノイド受容体の変化

高脂血症が、脳梗塞増悪にどのように寄与するか検討するため、高コレステロール食を給餌したマウスに中大脳動脈を閉塞した。高コレステロール食を給餌すると高コレステロール血症となるが、大脳皮質及び海馬におけるコレステロール含量は低下し、脳梗塞における障害が増悪していた。また、興味深いことに、脳梗塞保護作用を有するカンナビノイド CB<sub>1</sub> 受容体は低下していた。これらのことから、高脂肪食、特に高コレステロール食は脳内において細胞膜の安定性に関わるコレステロールを減らすとともに、脳梗塞保護作用を有する CB<sub>1</sub> 受容体発現量を低下させることで脳梗塞のリスクとなることが示唆された。

本研究では、腎症、動脈硬化、脳梗塞の病態を理解するために高脂肪食を負荷した動物モデルの確立と病態生理学的検討を行った。OLETF ラットに動脈硬化惹起性の高脂肪食を負荷することで早期に且つ他のモデルに比べて重篤な糸球体障害が惹起されること、その障害にマクロファージの浸潤に関わる新規糸球体障害の病態モデルを開発した。また、動脈硬化モデルにおいては、粥状動脈巣形成に関わるマクロファージをターゲットとした創薬の可能性を示した。脳梗塞モデルにおいては高コレステロール食により脳内コレステロールと CB<sub>1</sub> 受容体に変化し、脳梗塞のリスクとなることを示唆した。

今回、得られた動物モデルの病態生理の知見をもとに、マクロファージに焦点を当てた創薬ターゲット分子を設定した新規治療薬の開発が期待できる。

以上、本研究は、高脂肪食を負荷することで腎臓、血管、脳の病態生理学的役割を明らかにし、新規病態モデルを確立した。さらに、それらを利用した薬物開発について新しい知見を得ていることは高く評価できる。また、論文業績ならびに公聴会審査における申請者の質疑応答は、学位を授与するのに適切な能力であると判断した。本論文は、動脈硬化を基盤とした脳梗塞や慢性腎疾患を考えるうえで重要な研究であり、学位論文として十分に評価できるものと判定した。