

総 説

PPAR γ リガンドの血管に対する作用

浜松赤十字病院 内科

脇野 修

要旨

Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPAR γ) はステロイドホルモンのレセプターの一種である。PPAR γ に結合するリガンドとしてインスリン抵抗性改善薬であるチアゾリジン誘導体が知られている。PPAR γ リガンドは脂肪細胞の分化を誘導し、脂肪組織より分泌される抵抗性惹起物質のレベルを低下させるなどによりインスリン抵抗性を改善させる。PPAR γ は血管組織にも存在し、そのリガンドは血管内皮細胞、血管平滑筋細胞、単球、マクロファージに直接的に作用する。ラットのバルーン傷害モデル、動脈硬化発症マウス、アンジオテンシンII持続注入マウスにおいてPPAR γ リガンドは抗動脈硬化作用があることが証明された。PPAR γ リガンドは糖尿病患者における頸動脈の内膜中膜厚の増加を抑制する。長期投与の影響、血管選択性の高いリガンドの開発が今後の課題である。

Key words

PPAR γ , チアゾリジン誘導体, インスリン抵抗性, 血管組織, 動脈硬化

1. 緒 言

——PPAR γ および PPAR γ リガンド

Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPAR γ) はステロイドホルモンのレセプターの一種である^{1,2)}。ステロイドホルモンとは周知のようにステロイド骨格を有するホルモンの総称であり、生体内にはそれに属するホルモンが多く存在する。例えばコルチゾール、コルチコステロンといった糖質コルチコイド、さらにはアルドステロンといった鉱質コルチコイド、甲状腺ホルモン、エストロゲン、プロゲステロン、アンドロゲン、テストステロンといった性ホルモン、さらに以前は脂溶性ビタミンに分類されたビタミンD (コレカルシフェロール)、ビタミンA (レチノイン酸) といったものがステロイドホルモンに属する。そしてそれらのホルモンすべてにレセプターつまり受容体というものが生体内の臓器、組織、細胞に存在しており、これらの受容体を介してステロイドホルモンは作用を生体に及ぼす。これから説明をする PPAR γ というのは近年注目されたステロイドホルモン受容体に属するものであり、これは

近年発達した分子生物学の手法を用いて同定 (クローニング) されたものである。ステロイドホルモン受容体はそれぞれその構造 (アミノ酸配列) が類似しており、ある一定の部分 (ドメイン構造) に分かれている。従ってそれらをコードする遺伝子の配列も類似している。そこですでに分かっている遺伝子もしくはタンパク質の遺伝子配列を調べてみると実はステロイドホルモンの受容体であったというものが多く10年ぐらい前から同定されてきた。その一つの例が PPAR γ である。さてステロイドホルモン受容体の一般論として、その受容体に結合すべきホルモンが存在する。これを一般にリガンド (ligand) というが、このリガンドがレセプターに結合することにより受容体が活性化され生体内に作用を発揮する。ここからはやや難しい話であるが、活性化されたレセプターは特定の遺伝子の発現を調節する部位 (調節領域) に結合し、この特定の機能を有するタンパク質の発現を亢進させる (図1)。また、ある受容体は活性化したのち他の機能タンパク質と結合してこの機能タンパク質の作用を打ち消してしまう。こうした受容体の作用を惹起するために受容体にはホルモン、リガンドの結合が不可欠なのである。

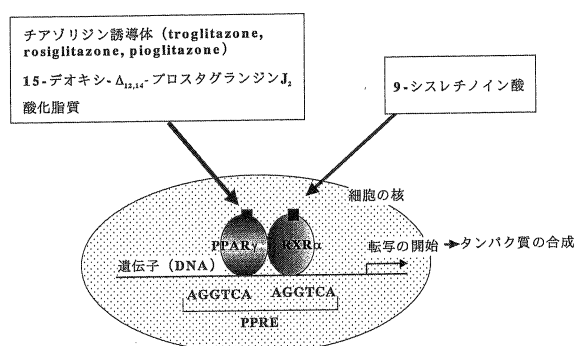


図1 PPAR γ の核内での作用様式

PPAR γ はリガンド(チアゾリジン誘導体など)と結合したのち、別のステロイドホルモン受容体であるRXR α (レチノイドXレセプター)と複合体を形成し、細胞の核内にあるDNAのある特定の配列に結合する。その結果遺伝子(DNA)のスイッチがonとなる。この特定の配列はAGGTCAという塩基(DNAを構成する物質)が2つ並んだ部分であり、これをPPREという。

PPAR γ の場合この活性化された、つまりリガンドが結合したPPAR γ が結合する特定のDNA配列をPPRE(PPAR responsive elements)といい、さらにPPAR γ は別のステロイドホルモン受容体であるRXR α (レチノイドXレセプター)と複合体をつくりPPREに結合するという特徴を有している。PPAR γ のリガンドとしていくつかの合成および自然界にある物質が同定されている。近年インスリン抵抗性改善薬として脚光を浴びているrosiglitazone(ロジグリタゾン、商品名Avandia、日本では未承認)、pioglitazone(ピオグリタゾン、商品名アクトス)、troglitazone(トログリタゾン、発売中止となったが以前の商品名でノスカル)といったthiazolidinedione誘導体(チアゾリジン誘導体)がこのレセプターのリガンドであることが明らかにされている。人体内および自然界に存在するリガンドとしては酸化脂質、プロスタグランジン誘導体などが同定されているが真の内因性リガンドは明らかにされていない。このようなリガンドがまだ明らかにされていない受容体は前述の遺伝子工学的手法により生体内でいくつも発見されており、これらはorphan受容体(孤児の受容体)と言われている。PPAR γ はさしずめ生みの親はまだ見つからないが里親は見つかった

受容体と言うことができよう。本稿ではまずチアゾリジン誘導体本来の作用との関連でインスリン抵抗性そしてそれを改善するPPAR γ リガンドの作用機序、続いて本論として動脈硬化の発生機序と近年注目を浴びているPPAR γ リガンドの血管に対する直接作用、抗動脈硬化剤としての有用性につき自験例も交えて述べたいと思う。

2. インスリン抵抗性とPPAR γ リガンド

日本人に多いⅡ型糖尿病は主として遺伝的背景をもとに肥満、ストレスといった環境因子が引き金となって発症する。このタイプの糖尿病の病態の一つがインスリン抵抗性である。インスリン抵抗性とはインスリンという血糖を下げるホルモンの末梢標的臓器での効きが悪くなる状態をさす。インスリンが血糖を下げる機序とは筋肉、肝臓におけるブドウ糖の取込みを亢進させることであるが、インスリン抵抗性の状態ではインスリンが血液中にあるにもかかわらずこの取込みが悪くなる。つまりチアゾリジン誘導体はこの状態を改善させ、インスリンの効きを良くし血糖を正常化する。Ⅱ型糖尿病患者およびⅡ型糖尿病動物モデルにおいて、チアゾリジン誘導体は血糖レベルを下げさらに血中のインスリンレベルを下げる。これはインスリンの効きが改善されている証拠である。この機序については門脇のグループの研究が有名である³⁾。肥満モデルのZucker fatty ラットにチアゾリジン誘導体であるtroglitazoneを投与すると白色脂肪組織の湿重量は変化しなかったが、TNF α (tumor necrosis factor alpha)の脂肪組織中での発現が有意に低下した。TNF α は生体内においてインスリンの作用を阻害する物質として知られている。さらに脂肪組織中の脂肪細胞を検討すると、troglitazone投与の肥満ラットでは脂肪細胞数の増加と脂肪細胞の平均サイズの減少が認められた。肥満動物での脂肪組織の特徴はこの肥大化した脂肪細胞であり、この脂肪細胞はTNF α 、遊離脂肪酸(FFA, free fatty acid)を過剰に分泌しており、これらの物質がインスリンの作用を阻害すると考えられている。PPAR γ リガンドはこの脂肪細胞の質を変えて、肥大細胞を死なせて(これをアポ

トーシスという), 若い正常の脂肪細胞に転換させる。その結果, インスリン抵抗を惹起する物質の血中レベルが減少し, 間接的ではあるがインスリン抵抗性が改善するわけである。さらに Steven Kliewer らはチアゾリジン誘導体がどのような遺伝子の発現を亢進させるかを DNA chip を用いて検討したところ, 遺伝子の調節領域に先述の PPRE を有する LPL (lipoprotein lipase), CD36, ACS (acyl-Co A synthase) などの脂肪酸の細胞への取込みを亢進させるタンパク質の遺伝子の発現が脂肪組織において亢進していることが明らかとなった⁴⁾。つまり, もう一つの機序としてはチアゾリジン誘導体は脂肪組織における脂肪の取込みを推進させ, 骨格筋や肝臓組織への脂肪の取込みを相対的に減少させ, 骨格筋や肝臓におけるインスリンの効きを良くさせるというものである。ところがここで逆説的であるが PPAR γ を欠損するマウスにおける成績を紹介する。Olefsky のグループは PPAR γ を半分欠損するマウスの作成に成功した⁵⁾。生物の遺伝子は父方由来の遺伝子と母方由来の遺伝子の2つの遺伝子を生まれながらにして持っている。その片方および両方を欠損したマウスを遺伝子工学で作成することができる。これをノックアウトマウスと言ひ, 両方欠損するものをホモ欠損マウス, 片方欠損するものはヘテロ欠損マウスと言ひ。PPAR γ ノックアウトマウスにおいては, ホモ欠損マウスは胎生期で死亡して研究することができないが, ヘテロ欠損マウスは通常に生育し研究の対象となった。このヘテロ欠損マウスにおいては予想に反してインスリン感受性が亢進したのであった。つまりレセプター自身はないほうが, インスリン感受性が良いということになる。これに対しての説明はやや難しくなるが, 生体内の通常上の状態では, 未知の内因性のリガンドが PPAR γ に結合し, このリガンドの働きはチアゾリジン誘導体の作用とは逆にインスリン抵抗性を引き起こしている。そこへ薬剤として投与されたチアゾリジン誘導体がこの内因性のリガンドを取りはらってインスリン感受性を回復させるというものである。また別の説明ではチアゾリジン誘導体といっても様々でレセプターを活性化する(アゴニスト)作用と不活性化する(ア

ンタゴニスト)作用を持ち, アンタゴニスト的な作用が現れるとインスリン抵抗性が改善するといふものである。この検討はその後, PPAR γ リガンドの薬剤設計に有益な情報をもたらすとともに, PPAR γ の転写共役因子についての研究を活性化させた意味で意義深いものであった。

3. 動脈硬化と PPAR γ リガンド

3-1 動脈硬化の発生機序

動脈硬化とは文字どおり動脈が硬くなり弾力の低下した状態をさす。弾力の低下した動脈は脆弱であるのみならずその構造を病理学的に詳しく検討するといくつか特徴を有する⁶⁾。例えば硬化血管には脂質を貪食したマクロファージが集簇しておりこれらは泡沫細胞 (Foam Cell) と呼ばれる。泡沫細胞は死滅すると中に溜め込んでいた脂質, 油が血管の壁に沈着する。これがいわゆるプラークであり, 細胞成分の少ないつまり泡沫細胞が死滅した痕のプラークは血管から剥がれやすくなる。これをプラークの脆弱化といい, 臨床的には剥がれたプラークが血管につまれば脳梗塞, 心筋梗塞が引き起こされるわけである。また硬化血管においては血管平滑筋細胞の過剰増殖が病的に認められる。血管平滑筋とはまさに筋肉細胞であり細胞内に筋繊維を有し, 血管に弾力つまり伸び縮みの性格を与えている。ゴム毯を想像しても明らかのようにゴムの部分が適度にあれば柔らかい弾性にとんだ毯であるが, これが厚くなると硬い弾性の少ない毯になってしまうわけである。硬い血管は弾性がなく伸び縮みできないから血流の圧を逃がすことができない。つまり臨床的には高血圧の原因になる。また, 血管壁の肥厚は血管内腔の狭小化をもたらすゆえ血流障害という事態を引き起こすわけである。糖尿病や透析患者の歩行障害つまり閉塞性動脈硬化症の発端となるわけである。さらに血管の内腔の表面つまり血液に接している部分は血管内皮細胞という細胞群で覆われているが, このきれいに内腔を裏打ちする細胞がバラバラになっていたり欠けたりしていることも硬化血管では認められる。そしてこのような障害を受けた内皮細胞は血管を拡張させる物質の分泌が悪く

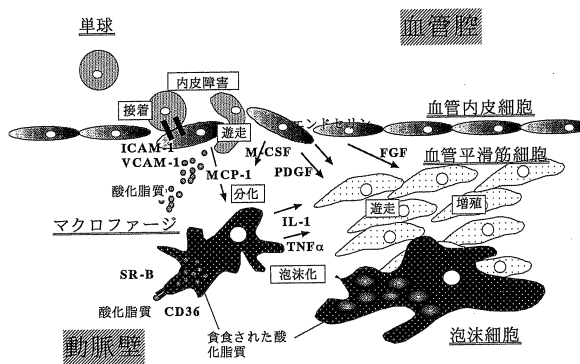


図2 動脈硬化の発生機序

詳細は本文参照。略語の正式名称は以下のとおり。

ICAM-1, intercellular adhesion molecule-1. VCAM-1, vascular cell adhesion molecule-1. MCP-1, monocyte chemotactic protein-1. SR-B, scavenger receptor-B. M-CSF, macrophage-colony stimulating factor. PDGF, platelet derived growth factor. FGF, fibroblast growth factor. IL-1, interleukin-1. TNF α , tumor necrosis factor alpha.

高血圧の原因になるのみならず、血液中の細胞である単球、白血球、Tリンパ球が接着しやすい状態となってしまう。これは生化学的には障害内皮細胞が接着タンパク質であるICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1) VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1), E-selectin, P-selectinなどを細胞表面に発現するためである。硬化血管もしくは硬化し始めのイベントとして単球、白血球、Tリンパ球の内皮細胞への接着ということはよく観察される(図2)。

以上、硬化血管の病理組織的な主たる特徴を挙げたがこれを時系列的にまとめると以下のような。

- 1) 血管内皮細胞の障害、障害内皮細胞からの血管収縮物質の産生の亢進および血管拡張物質の産生の低下、障害内皮細胞からの細胞増殖因子の産生の亢進、障害内皮細胞における細胞接着タンパクの発現。
- 2) 内皮下への単球、白血球、Tリンパ球の侵入、および侵入単球のマクロファージへの分化、分化マクロファージからの細胞増殖因子の産生の亢進、障害内皮下への脂質(コレステロール、中性脂肪)の浸透、浸透した脂質の酸化

(つまり腐ること)。

- 3) 分化マクロファージによる酸化脂質の貪食、取り込んだ脂質の細胞内への沈着、つまりマクロファージの泡沫細胞化、泡沫細胞の死滅、脂質の血管壁への沈着、プラークの形成。
- 4) 障害内皮細胞、分化マクロファージからの細胞増殖因子の産生、血管平滑筋細胞の増殖、血管の硬化。
- 5) 血管平滑筋細胞よりの線維組織(コラーゲン)の産生の低下、プラーク周辺の線維組織(fibrous cap)の減少、マクロファージおよびTリンパ球よりのコラーゲン分解酵素(matrix metalloproteinase, tissue factor)の産生の亢進、プラークの破綻、血管の閉塞。

以上の経過をとって動脈硬化は臨床問題となる事態を引き起こすと考えられている。なおここで指摘したいことはプラークの破綻は硬化動脈に必ず起こる現象ではなくプラークの形成と不安定化が必要な条件となるということである(4)と5)の違い)。硬化血管だけでプラークが線維質に富んだ硬いものであれば梗塞という臨床問題にならないわけで、そこにプラークの安定化という新たな治療上のアプローチがクローズアップされるのである。さらにこれら一連のイベントから想像できるのは動脈硬化とは加齢に伴う退行性の変化(degenerative change)ではなく、炎症性の変化(inflammatory change)であるという指摘である⁶⁾。従来炎症性疾患のマーカーであったCRPやIL-6(interleukin-6), serum amyloid A proteinと心筋梗塞の発症率との関連を検討したり、これらをイベント発症のマーカーにしようという近年の試みもこうした背景に由来しているのである。

3-2 動脈硬化とPPAR γ

先述のとおりPPAR γ は脂肪組織に豊富に発現しており、脂肪細胞の分化を促進する。しかしPPAR γ は血管組織にも発現が認められ細胞レベルでの検討では血管組織を構成する血管内皮細胞、血管平滑筋細胞、および末梢血単球それぞれにPPAR γ の発現が認められる⁷⁾。重要なことは早期の動脈硬化病変においてその発現が増加しており、このことよりPPAR γ が動脈硬化の発現になら

かの役割を果たしていることが示唆される。ラットの血管をバルーンで傷つけるとその後5週間から6週間にかけて血管の内膜が反応性に肥厚する。この推移は臨床的にはカテーテル治療後の再狭窄を再現するモデルとなるが、このモデルにおいてもバルーン傷害2週間後より PPAR γ の発現の亢進が観察され、血管の細胞の異常増殖に PPAR γ がなんらかの役割を果たすことが示唆される。ところが同様の観察をヒトの動脈硬化層において行った検討では泡沫細胞に PPAR γ の発現が認められ特にマクロファージの泡沫化に重要とされる酸化脂質の分布と一致していることが明らかとなった⁸⁾。バルーン傷害モデルでの動脈の変化は動脈硬化発症に重要であり、また実際の動脈硬化層での検討では泡沫化へのなんらかの関与を示唆するデータであり、PPAR γ が実際の動脈硬化の発症および進展を促進するのか (bad guy) それとも生体の代償として動脈硬化を抑えるために発現が亢進している (good guy) かは論争的となった。すなわち近年になって PPAR γ の血管壁での役割がクローズアップされたのである。そこでまず血管壁を構成する、および動脈硬化発症、進展に重要な役割を持つ細胞ごとに PPAR γ リガンドの直接作用を説明したいと思う。

3-3 血管内皮細胞における PPAR γ リガンドの作用

動脈硬化、および血管肥厚のまず始めのイベントは血管内皮の障害である。血管内腔の表層を覆う内皮細胞層はさまざまな刺激 (化学物質、喫煙、物理的圧力、酸化脂質) をうけその性格が変化する。その結果内皮細胞は細胞表面に ICAM-1, VCAM-1 といった細胞接着タンパクを発現する。これらの因子を仲介として末梢血単球は内皮細胞に捕らえられる。捕らえられた単球は血管内皮下に遊走する。PPAR γ リガンドはサイトカインで刺激された内皮細胞における ICAM-1, VCAM-1 の発現を抑制する。さらに内皮細胞はケモカイン (chemokine) という一連のタンパク質を分泌する。これは単球や T リンパ球を引き付ける作用がある。これに属するタンパク質としては MCP-1 (monocyte chemotactic protein-1), IP-10 (gamma

interferon-inducible protein 10), Mig (monokine induced by IFN-gamma) 等が知られている。PPAR γ リガンドは内皮細胞からのこれらタンパク質の産生を低下させることが知られている⁹⁾。この効果で単球の内皮細胞への接着は減少し、内皮下への遊走は減り、恐らく動脈硬化層は減少するものと予想される。また内皮細胞はエンドセリンというタンパク質を産生している。このタンパク質は血管平滑筋細胞に作用して血管収縮作用があると同時に血管平滑筋細胞の増殖を亢進させる。PPAR γ リガンドはトロンピンで刺激された内皮細胞よりのエンドセリンの産生を減少させる作用がある¹⁰⁾。これも PPAR γ リガンドの抗動脈硬化作用と考えられる。内皮細胞はさらに PAI-1 (plasminogen activator inhibitor type 1) というタンパク質を産生している。このタンパク質は血液の凝固を亢進させる作用があり、ある研究では心筋梗塞の発症に関わっていると言われている。PPAR γ リガンドはこのタンパクの内皮細胞よりの産生に影響を及ぼすことが明らかにされた^{11, 12)}。ただしその効果は様々であり、リガンドである 15-デオキシ- $\Delta_{12,14}$ -プロスタグランジン J₂ とある種の酸化脂質は産生を亢進させるが、troglitazone, pioglitazone は産生を低下させる。さらに II 型糖尿病の患者に troglitazone を投与すると血液中の PAI-1 のレベルが低下することも示されている。いずれにせよ PPAR γ リガンドは血管内皮細胞に作用し動脈硬化の発症を抑える作用があることが示唆されている。

3-4 血管平滑筋細胞における PPAR γ リガンドの作用

まず PPAR γ リガンドは血管平滑筋細胞に作用し、その増殖および遊走を抑制する¹³⁾。先述のように平滑筋細胞の増殖、遊走は動脈硬化発症の初期の過程に起こり、その後の過程に不可欠なステップであり、PPAR γ リガンドがこの過程を抑制するということは in vitro のデータではあるが、動脈硬化の進展さらにバルーン傷害後の血管壁の肥厚の抑制に有用であることが示唆される。近年我々は平滑筋細胞の増殖の抑制のメカニズムが、細胞の分裂に必要なステップである細胞周期を

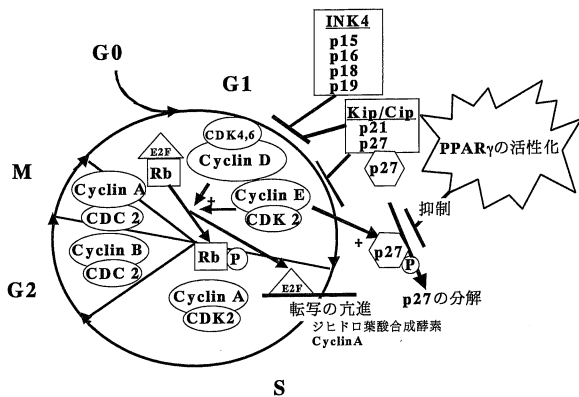


図3 PPAR γ リガンドの細胞周期に対する作用

詳細は本文参照。PPAR γ はリガンドが結合し活性化した後、細胞周期の負の調節因子の CDKI (cyclin dependent kinase inhibitor) 一つである p27 の分解を抑える。その結果 p27 の細胞内の量が増え（負の因子が増え）細胞は S 期に進むことができなくなる。つまり分裂、増殖できなくなる。

PPAR γ リガンドが遮断することであることを明らかにした¹⁴⁾。以下にその点につき詳しく説明したい (図3)。

細胞周期とはあらゆる細胞に普遍的に認められるシステムである¹⁵⁾。簡単にその仕組みを述べれば、あらゆる細胞は増殖する際に遺伝子である DNA を複製しなければならないが、DNA を複製する時期を S 期、実際に分裂する時期を M 期という。この S 期と M 期の間を G 期と呼ぶ。細胞が分裂する前の通常の状態を静止期 G0 期、細胞増殖因子などの刺激が加わってから DNA 合成が始まるまでつまり G0 期から S 期までを G1 期、S 期から実際に細胞分裂が起こる M 期までの期間を G2 期と呼んでいる。分裂が終わると細胞は再び静止期に戻ることになる。この周期は様々なタンパク質で調整されている。G0/G1→S の移行のコントロールの中心的な役割を有するのはレチノブラストーマ蛋白質 (Rb) である。Rb は静止期には E2F という転写因子と結合しているが、リン酸化を受けるとこの E2F が遊離される。遊離した E2F は転写因子としてはたらく DNA 合成に不可欠な機能をもったタンパク質 (Cyclin A, ジヒドロ葉酸還元酵素) の転写を促進させる。Rb をリン酸化させる酵素として同定されたのが

Cyclin dependent kinase (サイクリン依存性キナーゼ, CDK) でありこの酵素の活性化には Cyclin (サイクリン) というタンパク質の結合が必要である。Cyclin には Cyclin D, Cyclin E, Cyclin A といったアイソフォームが、CDK には CDK2, CDK4, CDK6, といったアイソフォームが G0/G1→S の移行を制御している。すなわち Rb, Cyclin, CDK といった因子は G0/G1→S の移行を正に制御しているわけである。一方 G0/G1→S の移行を負に制御する因子もあり、これを CDK 抑制因子 (CDK インヒビター, CDKI) という。CDKI にもいくつかあり、その分子量の大きさで、p27, p21, p15, p16 といったタンパク質などが同定されている。CDKI は cyclin と CDK の複合体に結合して CDK の機能を抑制する。以上のように細胞の分裂、増殖のサイクルである細胞周期は正の調節因子と負の調節因子のバランスにより制御されているのである。

さて PPAR γ リガンドの細胞周期に対する作用であるが、われわれのグループは PPAR γ リガンドである troglitazone および rosiglitazone がともに培養血管平滑筋細胞の細胞周期において負の制御因子である p27 の発現を増加させ、Rb のリン酸化を遮断し、細胞周期を遮断することを明らかにした¹⁴⁾ (図3)。これは恐らく p27 の分解を抑制することによるものと考えているが、このようにして PPAR γ リガンドは血管平滑筋細胞の増殖を抑制すると考えられた。先述のように血管平滑筋細胞の増殖は動脈硬化発症および進展に不可欠な過程であるので PPAR γ リガンドのこの作用は抗動脈硬化作用の一つのメカニズムと考えられる。

さらに PPAR γ リガンドは血管平滑筋細胞の遊走を抑制する^{7) 16)}。血管平滑筋細胞の遊走は血管内膜の肥厚を引き起こし動脈硬化の初期や、バルーン傷害後の内膜増生に重要なステップとなっている。PPAR γ リガンドはこの遊走に中心的な役割を果たす MMP-9 (matrix metalloproteinase-9) という細胞外マトリックスを分解する酵素の発現を抑えることにより細胞の遊走を抑えることが証明された。この効果は血管平滑筋細胞のみならず、単球細胞に対しても認められるとともに、MMP-9 の産生の抑制はプラークの安定化につながる効果で

あり, PPAR γ リガンドの抗動脈硬化作用のみならず心筋梗塞や脳梗塞発症予防の効果として期待がもたれるわけである. また, PPAR γ リガンドは血管平滑筋細胞からの一酸化窒素 (NO) の産生を, その産生酵素の発現を亢進させることにより, 上昇させることも明らかとなった¹⁷⁾. ここ10年でNOの生理的役割の重要性が強調されるようになり抗動脈硬化作用を有するNOの役割も重要視されており, PPAR γ リガンドのこの作用は重要と思われる.

3-5 末梢血単球およびマクロファージにおける PPAR γ リガンドの作用

PPAR γ は末梢血単球にも発現が認められ, マクロファージへの分化とともにその発現が増加する. ヒトの動脈硬化層において PPAR γ の発現は主としてマクロファージに認められ, 単球/マクロファージにおける PPAR γ の役割が重視されるようになった. まず, PPAR γ リガンドは *in vitro* において抗炎症作用を発揮することが以前より明らかにされていた. すなわち, 単球よりのサイトカイン (TNF α , IL-6など) の産生を抑制すること, サイトカインにより誘導される NO 合成酵素 (一酸化窒素合成酵素), 炎症に伴う組織破壊に重要な Gelatinase B1 (MMP-9) などの発現を抑制することが明らかにされている¹⁸⁾. さらに, 炎症性サイトカインの作用を細胞内に伝達する転写因子 AP-1, STAT, NF κ B 等の転写活性を抑制することも明らかにされている. 動脈硬化の進展に炎症性の反応が重要な役割を持っておりこれらの PPAR γ リガンドの抗炎症作用はそのまま抗動脈硬化作用につながることになる. また, 培養単球細胞において, PPAR γ リガンドは TNF α による細胞死 (アポトーシス) を促進させる. これが *in vivo* でも正しければ脂質を含有した泡沫細胞の量を減少させ, 動脈硬化病変の減弱を期待できることとなる. ところがその一方で PPAR γ リガンドは酸化 LDL による単球細胞のマクロファージへの分化を促進することが明らかにされた. さらにこの分化に伴ってマクロファージの細胞表面に CD36 という酸化型 LDL のレセプターが発現され, 細胞内への酸化脂質の取込みが亢進する可能

性が示唆された. さらに酸化型 LDL は PPAR γ を活性化することが明らかになり, 以上の事実より PPAR γ リガンドは酸化型 LDL の取込みを亢進させ泡沫細胞の動脈硬化層での沈着を亢進させる, つまり動脈硬化を促進させる作用もあるのではないかと指摘された¹⁸⁾. しかしこのデータは *in vitro* での現象でありかなり高濃度の PPAR γ リガンドを用いた研究であることが指摘された. 実際の PPAR γ を欠損したマウスでの検討では PPAR γ は単球のマクロファージへの分化に不可欠と言うものではなく, CD36 の発現の亢進も高濃度の PPAR γ リガンドの PPAR γ レセプターを介さない作用であることが明らかとされた¹⁹⁾. しかも PPAR γ リガンドは確かに CD36 という一つの酸化 LDL 受容体の発現の亢進を引き起こすが, 他の酸化脂質の受容体には影響を及ぼさず, したがって, net の脂質の取込み量を評価し直すと増やしも減らしもしないことが明らかとなった. さらにごく最近では PPAR γ リガンドはマクロファージに発現するコレステロール転送分子 ABCA-1 (ATP-binding cassette protein A-1) の発現を誘導し, コレステロールの細胞外への流出を亢進させることが明らかとなった²⁰⁾. 以上現在のところ PPAR γ リガンドは血管へ侵入してきた単球のマクロファージへの分化および酸化脂質の沈着には影響を与えないということが明らかにされた. このことは重要で, もし PPAR γ リガンドが少しでもマクロファージの泡沫化を促進するのであれば, 臨床的に長期に用いられる薬であるが故に心筋梗塞や脳梗塞を起こす率が高くなることとなる. 血管内皮細胞, および血管平滑筋細胞においてどんなに抗動脈硬化作用が証明されても, 先程指摘したようにプラークの形成は別であり, これを促進しては最終目標つまり心血管イベントの減少を満足させることができないのである.

3-6 *in vivo* での研究

以上述べたように *in vitro* ではいくつか解離したデータが報告され PPAR γ リガンドが実際に動脈硬化に効くのかそれとも増悪させるのかが明確ではなかった. この問題点を明らかにするためには実際に PPAR γ リガンドを動物に食べさせて動

脈硬化発症を抑えられるかどうかを検討する必要があった。この *in vivo* のデータは3つの研究室より独立に報告された^{21) 22) 23)}。動脈硬化を起こしやすい LDL レセプター欠損マウスは、高脂肪食下で高血糖、高インスリン血症を発症し、同時に動脈硬化を発症する。これは糖尿病に基づく動脈硬化のモデルとなりうる。PPAR γ リガンドである troglitazone の投与は LDL レセプター欠損マウスにおける動脈硬化病変を 45% 減少させることが証明された。この変化は硬化病変におけるマクロファージの減少に伴うものと考えられた²¹⁾。また、別の動脈硬化を発症しやすいマウスモデルである apolipoprotein E 欠損マウスにおいても PPAR γ リガンド (troglitazone) は動脈における脂肪沈着を 50% 近く減少させることが報告された。興味深いことは酸化脂質の受容体である先述の CD36 の発現は PPAR γ リガンド投与群では *in vitro* の成績と合致して亢進していたことも明らかとなった²²⁾。つまり *in vitro* で認められた一つの動脈硬化促進作用が *in vivo* で認められたにもかかわらず、トータルの動脈硬化抑制に働いたわけである。これについては他の細胞に対する抗動脈硬化作用の方が強く働いたことが考えられた。さらに、rosiglitazone およびチアゾリジン誘導体ではない PPAR γ リガンドである GW7845 も高脂肪食餌下の LDL レセプター欠損マウスの動脈硬化病変を抑制することが証明された²³⁾。以上の検討より PPAR γ リガンドは動脈硬化発症に抑制的に働く good guy であることが証明された。

最近我々の研究室では PPAR γ リガンドが別の動脈硬化発症のマウスモデルに対しても動脈硬化発症に抑制的に働くことを明らかにした。アンジオテンシン II (angiotensin II, Ang II) は血管収縮作用を有するペプチドであるが、このペプチドは心肥大を始め、血管の肥厚、動脈硬化の発症にも重要であることが明らかとなっている。近年 Doughty らは高脂肪食により動脈硬化を自然に発症する apolipoprotein E 欠損マウスに血圧を上げないレベルの Ang II をミニポンプで持続的に注入すると脂肪を貪食したマクロファージに富んだ動脈硬化層が作成され、さらに動脈瘤も出現することを見出した²⁴⁾。これは Ang II による動脈

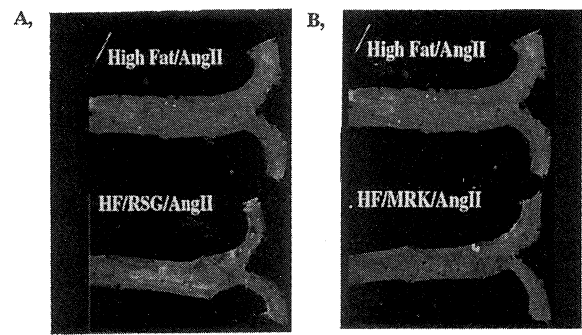


図4 アンジオテンシン II を持続注入した LDL レセプター欠損マウスにおける PPAR γ リガンドの動脈硬化抑制効果

- A, rosiglitazone 投与の効果。上は非投与群のマウス大動脈の内壁をスダン III で染色したもので、下は投与群。濃い灰色（実際は赤色）の動脈硬化層が約 60% 減少した。
- B, 非チアゾリジン誘導体の PPAR γ リガンドである Merck 805,645 を投与した際の効果。上は非投与群のマウス大動脈の内壁をスダン III で染色したもので、下は投与群。薄い灰色（実際は赤色）の動脈硬化層が約 50% 減少した。文献 26) より一部改変して転載した。

硬化促進作用を *in vivo* で直接示すモデルである。われわれはこのモデルを用い、この Ang II により促進された動脈硬化層が PPAR γ リガンドの投与でどのようなになるかを検討した。すると図 4 に示すように Ang II により増加した動脈硬化層はチアゾリジン誘導体である rosiglitazone、さらにチアゾリジン誘導体ではない PPAR γ リガンドである Merck805,645 で 60 から 70% 減少することが認められた。

次に我々は PPAR γ リガンドのこの効果のメカニズムについて分子レベルで検討した。ここで Egr-1 (early growth response gene-1) という転写因子について説明したい。この因子が動脈硬化の発症に関与することが近年明らかにされた。McCaffrey らは頸動脈の血栓内膜除去術を受けた 13 名の患者の動脈硬化病変とその付近の正常領域とで様々な遺伝子の発現の差をくらべ、動脈硬化領域に強く発現される遺伝子を検索した²⁵⁾。これはこのような遺伝子が動脈硬化に強く起因するものと考えられるからである。その結果 Egr-1 の発現量が 5 倍上昇していることが明らかとなった。

この Egr-1 は他の様々な遺伝子の発現を調節する因子（つまり転写因子）であり動脈硬化発症に重要な役割を持つ PDGF（Platelet derived growth factor, 血小板由来増殖因子）, ICAM-1, TNF α , MCP-1 といった因子の発現を調節している. McCaffrey らのデータにおいて Egr-1 の発現の上昇に一致してこれら下流に位置する遺伝子の発現も動脈硬化層において上昇していることが明らかとなった. ではその Egr-1 遺伝子自身の発現は如何にして調節されているか? これまで様々な因子が Egr-1 の発現を誘導することが明らかにされているが我々が注目する Ang II もその一つであることが知られている. そこで Ang II 注入モデルにおいて動脈壁で Egr-1 の発現を調べてみたところ, 確かにその上昇が認められ, さらに PPAR γ リガンドを与えたマウスにおいてはその発現の誘導が完全に抑制されていることを明らかにした. しかも先述の下流の遺伝子においても予想どおりの結果が得られ, Ang II 注入による発現の上昇および PPAR γ リガンド投与によるその誘導の抑制が観察された. 以上のことより我々は Ang II 注入による動脈硬化モデルにおいて PPAR γ リガンドは Egr-1 の発現を抑えることにより動脈硬化発症を抑制すると結論した (Wakino S and Law RE, 未発表データ, 図 5).

このように PPAR γ リガンドは様々な動脈硬化のモデル動物において動脈硬化の発症を抑えることが明らかになっており, 臨床にも用いられている pioglitazone は本来のインスリン抵抗性の改善作用のみならず動脈硬化抑制作用も持ちうると十分期待できるのである.

3-7 ヒトでの検討

ではヒトでの動脈硬化抑制効果はどうであろうか. ヒトの動脈硬化を直接測定することは血栓内膜除去術等施行し血管組織を一部取り出さない限り不可能だが, 頸動脈エコーを用いて IMT (内膜中膜厚, intimal medial thickness) という血管内膜と中膜をあわせた層の厚さを測定し, それが全身の動脈硬化と相関するというに基づいて, しばしば動脈硬化の指標の一つとして用いられている. PPAR γ リガンドの troglitazone²⁶⁾ および

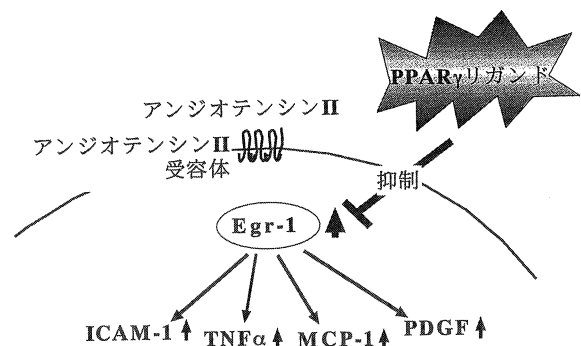


図5 Egr-1の誘導に対する PPAR γ リガンドの作用

アンジオテンシンIIが細胞膜表面にある7回膜貫通型の受容体であるアンジオテンシンII受容体に結合すると, 細胞内の Egr-1 のレベルが上昇する. 上昇した Egr-1 は動脈硬化の発症に重要な物質である, ICAM-1, TNF α , MCP-1, PDGF の産生を亢進させる. これがアンジオテンシンIIによる動脈硬化発症のメカニズムの一つと考えられる. PPAR γ リガンドはこの Egr-1 の上昇を抑えることにより抗動脈硬化効果を示したと考えられる.

pioglitazone²⁷⁾ とともに糖尿病患者の IMT の増加を抑制したとするデータが越山らのグループから報告された. 越山らは53名の2型糖尿病患者に対して pioglitazone 30mg 投与したところ, 6ヵ月で IMT の増加が抑制されたとするデータを報告している. また, 高木らのグループは troglitazone を投与された糖尿病患者においては冠状動脈へのステント挿入後の新生内膜の増生が有意に抑制されることを証明した²⁸⁾. さらに troglitazone, rosiglitazone, pioglitazone すべてがインスリン抵抗性を有する患者において, アセチルコリンに対する上腕動脈の反応性を改善することが示された²⁹⁾. 動脈のアセチルコリンによる血管拡張は血管内皮細胞の機能を示す指標であり, インスリン抵抗性のある患者ではその反応が低下している. つまりチアゾリジン誘導体は血管内皮の機能障害を改善することが示されたわけで, 内皮障害が動脈硬化の最初のステップであることを考えると, 抗動脈硬化作用を持ちうると期待できるわけである. 実際の動脈硬化層およびプラークに対する効果については明らかではなく, また長期の効果についても今後の研究が待たれるところであろう.

4. 結 語

以上 PPAR γ リガンドおよびその血管に対する作用, 特に抗動脈硬化作用について述べた (図6). 今後の研究の方向につきいくつか私見を述べたいと思う. まずやはり重要なのはヒトにおける長期での血管に対する影響である. 動物モデルでは抗動脈硬化作用が明確に証明されたが, やはり in vitro で好ましくない作用が報告されている以上長期での影響が気になるであろう. またここでは述べなかったが PPAR γ の in vivo での成績はみな雄での結果であり, 雌においてはこの作用がないか報告されていない. この原因についても検討を有すると思われる. PPAR γ リガンドは性ホルモンとの相互関係があるのか, あるいは性ホルモンレセプターと PPAR γ とに相互作用があるのかといった問題が提起される. 臨床的に用いられているチアゾリジン誘導体の副作用の一つに下腿浮腫があるがこれはヒトにおいて女性に多いといわれている. 従ってチアゾリジン誘導体の血管作用についても性差があるかも知れず, いずれかの性において先に指摘した動脈硬化促進作用が出現するかも知れない. 次に重要と思われるのは本論中にも述べたアゴニスト, アンタゴニストの問題である. PPAR γ 自身はインスリン抵抗性を引き起こすということがわかり, レセプターの活性化か不活性化で生体の反応も変わってくることが判明した. すなわち現存の PPAR γ リガンドよりも強力なしかもそれが抗動脈硬化作用にのみ強い薬の開発が必要と思われる. それと関連して内因性のリガンドの同定も重要であろう. 次に以前より指摘されていたが単球, マクロファージ, 泡沫細胞, 細胞死, プラーク形成といった一連の流れに対する分子生物学的検討がやはり重要であろう. PPAR γ の研究からわかることは, 脂肪細胞の分化を参考にしながらマクロファージの泡沫化を再検討するのがいいアプローチではないかと思われる. これを基礎にして新規の PPAR γ リガンドに限らず, 新たな抗動脈硬化作用を持つ薬剤, さらにプラークを安定化させる薬剤の開発につなげていくことが重要と思われる. 食生活を含めた

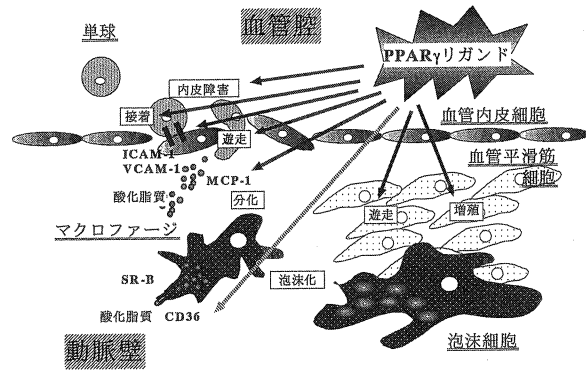


図6 PPAR γ リガンドの抗動脈硬化作用の機序

PPAR γ リガンドは動脈硬化発症および進展の様々な段階を抑制しうることが in vitro のデータで明らかとなっている. ただし, CD36の発現を亢進させる作用は動脈硬化促進作用とも考えられる. 実線の矢印は抑制的に作用すること, 破線の矢印は促進的に作用することを示す.

ライフスタイルの西洋化, 飽食の時代において, 動脈硬化を背景にした疾患の予防の重要性は論を持たない. 従ってこのような薬剤の開発が急務となってくるであろう.

稿を終えるにあたって執筆の機会を与えて下さった浜松赤十字病院の方々, 査読, 校閲の労をとって頂いた早川正勝編集委員長, 飯田育子氏に謝意を示します.

文 献

- 1) Duez H, Fruchart JC, Staels B. PPARs in inflammation, atherosclerosis and thrombosis. J Cardiovasc Risk 2001; 8(4): 187-194.
- 2) Elangbam CS, Tyler RD, Lightfoot RM. Peroxisome proliferator-activated receptors in atherosclerosis and inflammation-an update. Toxicol Pathol 2001; 29(2): 224-231.
- 3) Okuno A, Tamemoto H, Tobe K, et al. Troglitazone increases the number of small adipocytes without the change of white adipose tissue mass in obese Zucker rats. J Clin Invest 1998; 101(6): 1354-1361.

- 4) 山内敏正, 門脇孝. PPAR γ とインスリン抵抗性. ホルモンと臨床 2001 ; 49(3) : 217-225.
- 5) Miles PD, Barak Y, He W, et al. Improved insulin-sensitivity in mice heterozygous for PPAR-gamma deficiency. J Clin Invest 2000 ; 105(3) : 287-292.
- 6) Plutzky J. Inflammatory pathways in atherosclerosis and acute coronary syndromes. Am J Cardiol 2001 ; 88(8A) : 10K-15K.
- 7) Law RE, Goetze S, Xi XP, et al. Expression and function of PPARgamma in rat and human vascular smooth muscle cells. Circulation 2000 ; 101(11) : 1311-1318.
- 8) Ricote M, Huang J, Fajas L, et al. Expression of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) in human atherosclerosis and regulation in macrophages by colony stimulating factors and oxidized low density lipoprotein. Proc Natl Acad Sci USA 1998 ; 95(13) : 7614-7619.
- 9) Marx N, Mach F, Sauty A, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activators inhibit IFN-gamma-induced expression of the T cell-active CXC chemokines IP-10, Mig, and I-TAC in human endothelial cells. J Immunol 2000 ; 164(12) : 6503-6508.
- 10) Delerive P, Martin-Nizard F, Chinetti G, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor activators inhibit thrombin-induced endothelin-1 production in human vascular endothelial cells by inhibiting the activator protein-1 signaling pathway. Circ Res 1999 ; 85(5) : 394-402.
- 11) Kruszynska YT, Yu JG, Olefsky JM, et al. Effects of troglitazone on blood concentrations of plasminogen activator inhibitor 1 in patients with type 2 diabetes and in lean and obese normal subjects. Diabetes 2000 ; 49(4) : 633-639.
- 12) Marx N, Bourcier T, Sukhova GK, et al. PPARgamma activation in human endothelial cells increases plasminogen activator inhibitor type-1 expression : PPARgamma as a potential mediator in vascular disease. Arterioscler Thromb Vasc Biol 1999 ; 19(3) : 546-551.
- 13) Law RE, Meehan WP, Xi XP, et al. Troglitazone inhibits vascular smooth muscle cell growth and intimal hyperplasia. J Clin Invest 1996 ; 98(8) : 1897-1905.
- 14) Wakino S, Kintscher U, Kim S, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands inhibit retinoblastoma phosphorylation and G1 \rightarrow S transition in vascular smooth muscle cells. J Biol Chem 2000 ; 275(29) : 2235-2241.
- 15) Sherr CJ. Cancer cell cycles. Science 1996 ; 274(5293) : 1672-1677.
- 16) Marx N, Schonbeck U, Lazar MA, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma activators inhibit gene expression and migration in human vascular smooth muscle cells. Circ Res. 1998 ; 83(11) : 1097-1103.
- 17) Ikeda U, Shimpo M, Murakami Y, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligands inhibit nitric oxide synthesis in vascular smooth muscle cells. Hypertension 2000 ; 35(6) : 1232-1236.
- 18) Ricote M, Li AC, Willson TM, et al. The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation. Nature 1998 ; 391(6662) : 79-82.
- 19) Moore KJ, Rosen ED, Fitzgerald ML, et al. The role of PPAR-gamma in macrophage differentiation and cholesterol uptake. Nat Med 2001 ; 7(1) : 41-47.
- 20) Chinetti G, Lestavel S, Bocher V, et al. PPAR-alpha and PPAR-gamma activators induce cholesterol removal from human macrophage foam cells through stimulation of the ABCA1 pathway. Nat Med 2001 ; 7(1) : 53-58.
- 21) Collins AR, Meehan WP, Kintscher U, et al. Troglitazone inhibits formation of early atherosclerotic lesions in diabetic and nondiabetic low density lipoprotein receptor-deficient mice.

- Arterioscler Thromb Vasc Biol 2001 ; 21(3) : 365-371.
- 22) Chen Z, Ishibashi S, Perrey S, et al. Troglitazone inhibits atherosclerosis in apolipoprotein E-knockout mice : pleiotropic effects on CD36 expression and HDL. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2001 ; 21(3) : 372-377.
- 23) Li AC, Brown KK, Silvestre MJ, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands inhibit development of atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice. J Clin Invest 2000 ; 106(4) : 523-531.
- 24) Daugherty A, Manning MW, Cassis LA. Angiotensin II promotes atherosclerotic lesions and aneurysms in apolipoprotein E-deficient mice. J Clin Invest 2000 ; 105(11) : 1605-1612.
- 25) McCaffrey TA, Fu C, Du B, et al. High-level expression of Egr-1 and Egr-1-inducible genes in mouse and human atherosclerosis. J Clin Invest 2000 ; 105(5) : 653-662.
- 26) Minamikawa J, Tanaka S, Yamauchi M, et al. Potent inhibitory effect of troglitazone on carotid arterial wall thickness in type 2 diabetes. J Clin Endocrinol Metab 1998 ; 83(5) : 1818-1820.
- 27) Koshiyama H, Shimono D, Kuwamura N, et al. Rapid communication : inhibitory effect of pioglitazone on carotid arterial wall thickness in type 2 diabetes. J Clin Endocrinol Metab 2001 ; 86(7) : 3452-3456.
- 28) 高木力, 吉田清, 赤阪隆史ほか. Troglitazone はⅡ型糖尿病患者における冠動脈内ステント留置後の新生内膜増殖を抑制する. Japanese Circulation Journal 1999 ; 63 Suppl I : 410.
- 29) Caballero AE, Saquaf R, Lim SC, et al. The effects of troglitazone on the endothelial function of the micro and macrocirculation in patients with early or late type 2 diabetes. Diabetes 2001 ; 50 Suppl 2 : A149.

Vascular Protective Effects of PPAR γ Ligands

Shu Wakino

Department of Internal Medicine, Hamamatsu Red Cross Hospital

Abstract

Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) belongs to a nuclear receptor superfamily which is activated by insulin sensitizer, thiazolidinediones. PPAR γ ligands promote adipocyte differentiation which results in the reduction in circulatory levels of adipocyte-derived substances provoking insulin resistance and the enhanced insulin sensitivity. Another mechanism of insulin sensitizing effects is the decrease in free fatty acid level accumulated in muscle and liver. The expression of PPAR γ is also detected in the vascular tissues and PPAR γ ligands have various effects on all cells which constitute the vasculature including endothelial cells, vascular smooth muscle cells and monocytes/macrophages. The net effect by PPAR γ ligands is proven to be anti-atherosclerosis. In atherosclerogenic mouse models, balloon injury models, and angiotensin II-infused mouse models, PPAR γ ligands attenuate atherosclerotic lesion formation and intimal hyperplasia. In human study, various beneficial effects by PPAR γ ligands were reported in terms of atherogenesis. PPAR γ ligands attenuate the increase in intima-media thickness in diabetic patients. PPAR γ ligands restore the responsiveness of brachial artery to acetylcholine in patients in insulin resistance which suggest PPAR γ ligands block the initial step of atherosclerosis, endothelial dysfunction. However, long-term effects remain to be seen. The development of more potent and vascular-selective ligands is another challenging issue.