

令和 6 年 5 月 26 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K16885

研究課題名（和文）肺高血圧症の病態におけるインスリン分泌促進ホルモン、その分解酵素の役割は？

研究課題名（英文）What is the role of incretin and its degrading enzyme in the pathology of pulmonary hypertension?

研究代表者

細川 奨 (Hosokawa, Susumu)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・非常勤講師

研究者番号：00737025

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、インスリン分泌促進ホルモンであるGLP-1、その分解酵素DPP-4が、肺高血圧症の病態に果たす役割を検討した。モノクロタリン誘発肺高血圧ラットに対し、GLP-1受容体作動薬、DPP-4阻害薬のいずれか、あるいは併用がその肺高血圧を改善し、生存率を高めた。その機序として、DPP-4阻害薬がその蛋白分解酵素の機能により肺動脈平滑筋細胞内のNF- κ Bを介する炎症経路を抑制することを明らかにした。またDPP-4はT細胞活性化抗原CD26として、肺動脈平滑筋細胞の増殖に関与することが示唆された。一方、GLP-1受容体作動薬については、リアルタイムPCRの結果から組織因子の関与が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肺動脈性肺高血圧症のこれまでの治療は3系統（プロスタサイクリン、エンドセリン、一酸化窒素）が用いられ、いずれも血管拡張作用が主であり、新規治療薬の開発が求められている。本研究では、2型糖尿病治療薬が肺高血圧症動物モデルを改善すること、その機序が炎症に関与するシグナル伝達経路を抑制することで肺血管リモデリングを軽減することを明らかにした。肺高血圧症の新規治療薬の開発へ向けて、多大な貢献をもたらすものとする。

研究成果の概要（英文）：In this study, we investigated the role of GLP-1, which is insulin-stimulating hormone, and DPP-4, which is degrading enzyme, in the pathology of pulmonary hypertension.

In rats with monocrotaline-induced pulmonary hypertension, GLP-1 receptor agonist liraglutide, DPP-4 inhibitor alogliptin, or their combination improved pulmonary hypertension and increased survival rates. As for the mechanism, it was revealed that DPP-4 inhibitor suppresses the inflammatory pathway mediated by NF- κ B in pulmonary artery smooth muscle cells through its proteolytic enzyme function. Furthermore, DPP-4 was suggested to be involved in pulmonary artery smooth muscle cell proliferation as T cell activation antigen CD26. On the other hand, regarding GLP-1 receptor agonists, real-time PCR results suggested the involvement of tissue factor.

研究分野：肺循環

キーワード：肺高血圧症 DPP-4阻害薬 GLP-1受容体作動薬 caveolin-1

1. 研究開始当初の背景

肺高血圧症は、様々な原因により肺動脈圧が持続的に上昇した病態で、予後不良の難治性疾患である。その病態は、(1)肺血管の過収縮、(2)肺血管壁の器質的変化(リモデリング)、(3)血栓形成の3つに分けられる。当初は肺血管の過収縮が主であるが、進展すると、肺小動脈の中膜肥厚、内膜増殖が進行し、リモデリングを生じた血管の占める割合が増加する。現行の肺高血圧症の治療は血管拡張作用が主であり、リモデリングを抑制する治療薬の開発が求められている。

このリモデリングの誘因として「血管壁の炎症—変性—腫瘍性増殖」という概念が背景因子として考えられている。特発性肺動脈性肺高血圧症患者の肺組織では、肺小動脈周囲に様々な炎症細胞(マクロファージ、単球、Tリンパ球、Bリンパ球、樹状細胞など)が浸潤していることが報告されている。しかしながら炎症・免疫反応が肺高血圧症の成立機構にどのように関与しているのか未だ不明な点が多い。

インスリン分泌促進(インクレチン)ホルモンである GLP-1 (glucagon-like peptide-1)、およびその分解酵素ジペプチジルペプチダーゼ 4 (DPP-4)は、2型糖尿病治療の主要な標的分子である。一方で DPP-4 は GLP-1 の他にも多数の基質を有し、その中に炎症反応に関与する物質も含まれる。さらに DPP-4 は、T細胞活性化抗原 CD26 としての役割も有し、これもまた生体の炎症・免疫反応に寄与すると考えられる。

このことから、2型糖尿病治療薬である GLP-1 受容体作動薬、DPP-4 阻害薬が、その炎症抑制作用により肺高血圧症の改善に寄与するという仮説を立てた。

2. 研究の目的

肺高血圧症の肺血管リモデリングの病態に GLP-1、DPP-4 がどのように関与するかを解明し、新規治療標的分子としての可能性を検討することを目的として本研究を計画した。

3. 研究の方法

① *in vivo*での検証

モノクロタリン(MCT)60mg/kg皮下注射によりラット肺高血圧モデルを作成した。これを4群に分けた(A; MCT群、B; MCT+アログリプチン(DPP-4阻害薬)(A)群、C; MCT+リラグルチド(GLP-1受容体作動薬)(L)群、D; MCT+(A)+(L)群)。なおアログリプチン、リラグルチドは、MCT投与2週間後よりそれぞれ連日経口投与、皮下注射を行った。生存率、血行動態の解析、免疫組織化学染色、および肺組織を用いて定量PCRを行った。

② *in vitro*での検証

ヒト肺動脈平滑筋細胞を用いた。炎症のキーとなる分子の一つであるNF κ Bp65の核内移行についてウエスタンブロッティングによる蛋白発現の検討を行った。またFlag

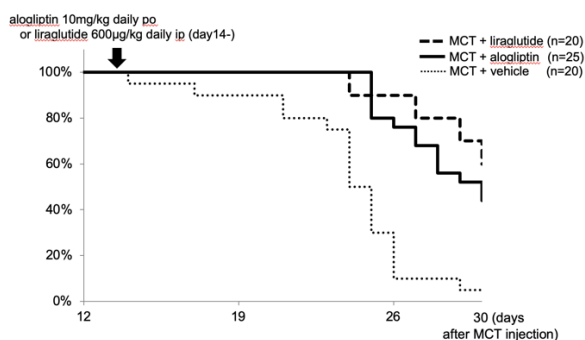
タグ付き DPP-4 プラスミドを HEK293 細胞に遺伝子導入したのち、ヒト肺動脈平滑筋細胞と免疫沈降を行った。

4. 研究成果

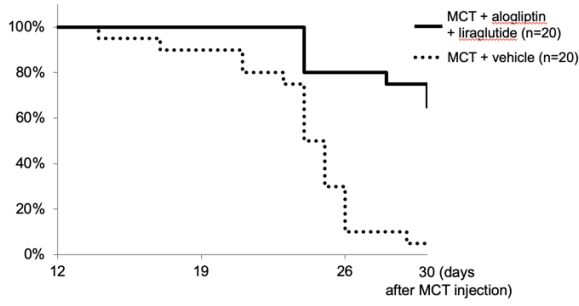
*in vivo*での生存率の検証では、モノクロータリン (MCT)単独投与群に比較して、アログリプチン(A) 投与群、リラグルチド(L)投与群、および(A)+(L)併用群いずれも生存率を有意に改善した。その中でも A+L 群が最も高い生存率を示した (図 1、2)。また血行動態の検査(心臓カテーテル検査)では、右室圧は MCT 群に比較し、A 群、L 群いずれも有意に低下し、また右室/(左室+中隔)重量比も同様の傾向を示した (図3)。次に、肺組織の NF κ B リン酸化 p65 分子の局在を検証した。肺動脈平滑筋細胞での NF κ B リン酸化 p65 陽性細胞数が、MCT 群よりもアログリプチン投与群で減少傾向を示した (図 4)。

*in vitro*では、ヒト肺動脈平滑筋細胞に TGF β 、FGF2 で刺激したときの NF- κ B リン酸化 p65 の蛋白発現量を解析した。いずれの結果も、アログロプチン濃度依存性にリン酸化が抑制される、すなわち核内移行が抑制されることを明らかにした(図 5)。次に肺動脈平滑筋細胞の直接の相互作用の可能性を検討した。HEK293 細胞に Flag タグ付 DPP-4 プラスミドを遺伝子導入したのち、肺動脈平滑筋細胞と免疫沈降を行ったところ、DPP-4 と直接作用するのは、肺動脈平滑筋細胞上の caveolin-1 であることが明らかになった(図 6)。

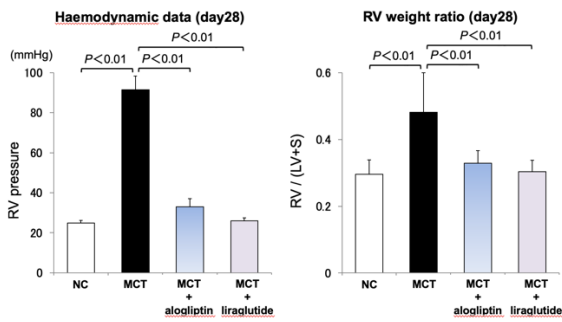
(図 1)生存曲線 (MCT 群、MCT+A 群、MCT+L 群)



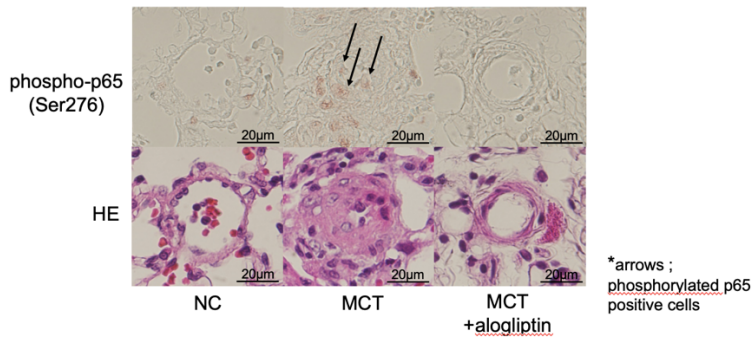
(図 2) 生存曲線 (MCT+A+L 群)



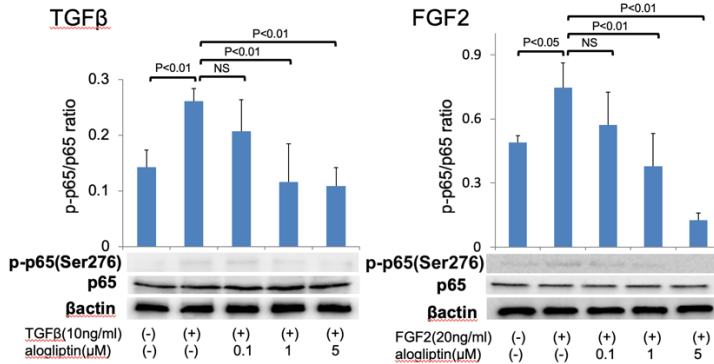
(図3) 血行動態、右室/(左室+中隔)重量比



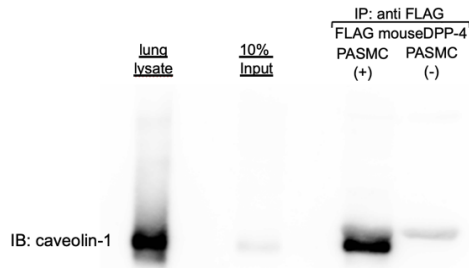
(図4) 免疫組織化学染色(NF-κBリン酸化 p65の細胞局在)



(図5) NF-κB p65の核内移行(ヒト肺動脈平滑筋細胞を用いた検討)



(図 6) 免疫沈降



5. まとめ、今後の方向性

*Iv vivo*の結果から、MCTによるラット肺高血圧モデルでは、DPP-4阻害薬、GLP-1受容体作動薬いずれも肺高血圧症の改善、結果として生存率の上昇が得られた。その機序は、DPP-4阻害薬がその蛋白分解酵素の機能として肺動脈平滑筋細胞内のNF- κ Bを介した炎症の経路を抑制することに起因することを明らかにした。またDPP-4(T細胞活性化抗原CD26として)と肺動脈平滑筋細胞上のcaveolin-1が直接作用していることも明らかにした。その後、肺動脈平滑筋細胞の増殖に、CD26・caveolin-1系の相互作用が関与しているという仮説を立て、T細胞と肺動脈平滑筋細胞(FGF2で刺激した肺動脈平滑筋細胞とJurkat-CD26細胞株)を共培養したところ、Jurkat-parent株との共培養に比べ強い細胞増殖を示す傾向を認めたが有意差を示さなかった。

以上のことから、DPP-4阻害薬は肺動脈平滑筋細胞内の炎症の経路を抑制することにより、結果として細胞増殖を抑制することが考えられたが、その詳細な機序の解明には至らなかった。またCD26とcaveolin-1の相互作用もまた肺動脈平滑筋細胞増殖の関与していることが考えられたが、こちらについても解明には至らなかった。

またGLP-1受容体作動薬については、定量PCRの結果から組織因子の関与を考えたが、こちらについてもその機序の同定には至らなかった。

DPP-4阻害薬、GLP-1受容体作動薬いずれも肺高血圧症動物モデルの肺高血圧症の改善を示したが、上記のようにその機序は複数存在すると考えられる。今後もさらなる検討が必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------