

機関番号：32620

研究種目：若手研究 B

研究期間：2009～2010

課題番号：21790883

研究課題名（和文） 血糖変動による平滑筋増殖亢進作用のメカニズムの検討

研究課題名（英文） Investigation of vascular smooth muscle proliferation by glucose fluctuation

研究代表者

野見山 崇 (Nomiya Takashi)

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号：10532559

研究成果の概要（和文）：

糖尿病は動脈硬化を促進させる危険因子であり、この動脈硬化の発症進展を抑制するは重要である。我々は糖尿病治療薬である GLP-1 受容体作動薬 (Ex-4) の血管平滑筋細胞に対する効果を検討した。Ex-4 はマウスの血管障害後の血管内膜新生を抑制した。この抑制作用として Ex-4 が血管平滑筋細胞の増殖を直接抑制することを明らかにした。この Ex-4 の作用が 2 型糖尿病患者の動脈硬化発症進展を抑制する可能性がある。

研究成果の概要（英文）：

Diabetes is a risk factor for atherosclerosis and the prevention of atherosclerosis is very important. We investigated the effects of GLP-1 receptor agonists (Ex-4) on vascular smooth muscle cells. Ex-4 attenuated neointimal formation after wire injury in mice. We demonstrated that the decrease in smooth muscle cell proliferation with Ex-4 may contribute the prevention of atherosclerosis. These unique effects of GLP-1R agonist may help design new therapies for cardiovascular disease in patients with type 2 diabetes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	590,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・代謝学

キーワード：エネルギー・糖質代謝異常

1. 研究開始当初の背景

多数の疫学研究の結果、糖尿病が心血管イベントの独立したリスクファクターであることが明らかにされてきた (Kannel WB et al. JAMA 241:2035-2038, 1979; Stamler J, et al. Diabetes Care 1993; Haffner SM et al. N Engl J Med 1998)。動脈硬化病変の形成は内皮の炎症、単球 (マクロファージ) の接着と遊走、

平滑筋細胞の増殖と遊走といった複雑に絡み合ったメカニズムで構成されているが、進行した動脈硬化病変では内膜下に増殖・遊走した平滑筋細胞が主な細胞である事が知られている (Stary HC et al. Circulation 1995)。また、糖尿病患者において平滑筋細胞増殖がプライマリーの動脈硬化形成に重要であるのみならず (Dzau VJ et al. Nat Med 2002)、

冠動脈病変拡張後の再狭窄の重要なメカニズムである事が言われている (Kornowski R et al. Circulation 1997)。すなわち、糖尿病患者における平滑筋細胞増殖亢進は重要な心血管イベントの機序である事が分かる。

2. 研究の目的

糖尿病が血管病変形成に及ぼす影響のメカニズムを解明する為に、高血糖及び血糖変動が血管平滑筋細胞増殖に及ぼす影響を検討する。また、血管平滑筋細胞における PKC δ の役割を検討する。さらに、血管平滑筋増殖抑制の観点から糖尿病治療方法に関して検討した。

3. 研究の方法

1) 高血糖による平滑筋細胞の増殖及び血管障害後の Neointima 形成亢進に PKC δ がどのように関与するか否かを、PKC δ 欠損マウスを用いて検討する。また、糖尿病治療薬である GLP-1 受容体作動薬 (Exendin-4) の Neointima 形成抑制効果を検討する。

① 6 週令の野生型もしくは PKC δ 欠損マウスに STZ もしくは Vehicle を投与し、野生型コントロール群、野生型 STZ 群、PKC δ コントロール群、PKC δ STZ 群にわけ、8 週齢時に左大腿動脈にガイド・ワイヤーを用いて血管内皮障害術を施行する。12 週齢時に各マウスから左右大腿動脈を摘出しパラフィン切片を作成する。ワイヤー挿入部から 0.5mm、1.0mm、1.5mm、2mm、2.5mm、3mm 体側の血管切片を elastic Verhoeff-Van Gieson 染色し、イメージ・アナライザーにて Intima, Media, Intima/Media ratio を定量的に評価する事が可能である。

また、これら切片のシリアル切片を用いて、細胞周期制御因子である Retinoblastoma Protein のリン酸化や Cyclin D, A, E, p27, SKP2 といった各種蛋白の発現を免疫染色にて検出する。

② 同様に 8 週齢の雄 C57BL/6 マウスに持続皮下投与ポンプで高容量の Ex-4

(24nmol/kg/day) を投与した上で 10 週齢時に左大腿動脈に血管障害術を施行し 4 週間後に Neointima formation 評価する。

2) 初代培養された野生型マウスの血管平滑筋細胞を用いて、血糖変動による血管平滑筋増殖作用のメカニズムを解明する。また、GLP-1 受容体作動薬の平滑筋細胞増殖を制御するメカニズムを検討する。

野生型マウスから血管平滑筋細胞を初代培養し GLP-1 受容体作動薬を投与した群とコントロール群で以下の比較を行った。

① BrdU assay で平滑筋細胞の増殖能を検討

する

② 細胞増殖に関わるシグナルの蛋白レベルをウエスタンブロット法で解析することによりメカニズムの検討を行う。

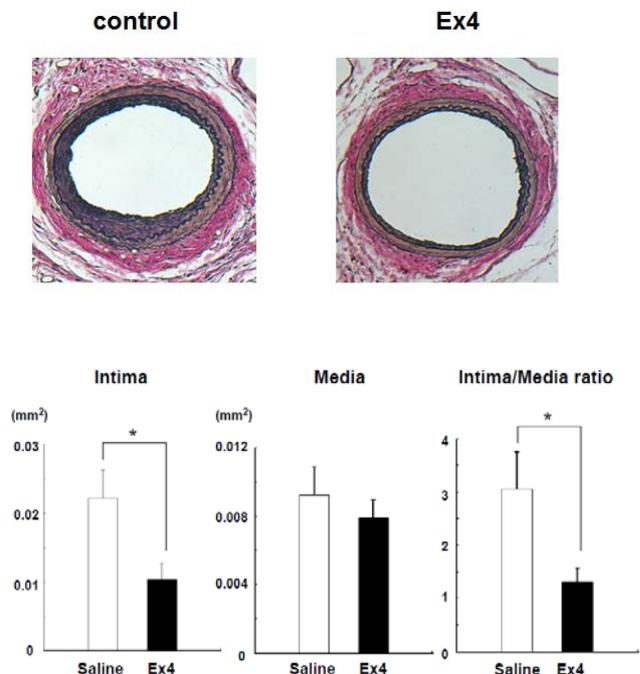
③ 8 週齢の野生型マウスより大動脈血管平滑筋細胞を初代培養する。Passage3~7 において正常血糖群 (ブドウ糖濃度 5.5mmol/l)、高血糖群 (ブドウ糖濃度 20mmol/l)、血糖変動群 (高血糖と正常血糖を 2 日毎に繰り返す) の 3 群を用いて 10 日間血管平滑筋細胞の増殖曲線を検討する。

4. 研究成果

今回我々は、GLP-1 アナログである

Exendin-4 (Ex-4) を用いて GLP-1 作用が血管平滑筋細胞 (SMC) に及ぼす作用を検討した。8 週齢の雄 C57BL/6 マウスに持続皮下投与ポンプで高容量の Ex-4 (24nmol/kg/day) を投与した上で 10 週齢時に左大腿動脈に血管障害術を施行し 4 週間後に Neointima formation 評価した。両群で血糖・脂質・体重に差はないにも関わらず、Ex-4 投与群では対照群に比し有意な Neointima formation の抑制を認めた。(図 1)

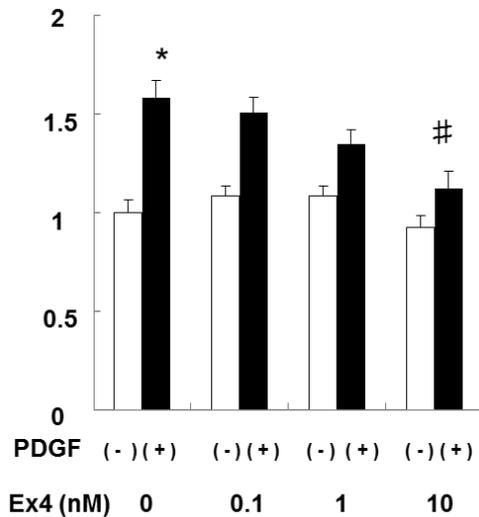
図 1. EX-4 は血管障害後の血管内膜新生を抑制する。



次に 8 週齢の雄 C57BL/6 マウスから初代培養されたマウス SMC において、GLP-1 受容体が膵 β 細胞同様に発現していることをウエスタ

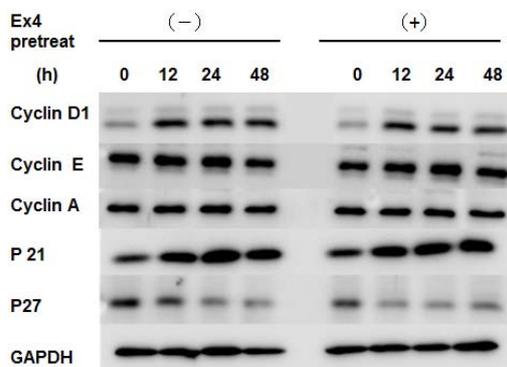
ンブロット法にて確認した。SMC を無血清培地で 12 時間培養した後、Ex-4 の用量を変えて刺激を行ったがいずれも BrdU 取り込みには有意な上昇を認めず、Ex-4 が SMC 増殖に直接的に促進しない事が示唆された。そこで SMC を Ex-4 で 12 時間前処置した後に、Platelet-Derived Growth Factor (PDGF) 誘導性の BrdU 取り込みを検討したところ、Ex-4 群では対照群に比べ有意に BrdU 取り込みを抑制し (P=0.0063)、Ex-4 が競合的に既知である PDGF 誘導性の SMC 増殖を抑制する事が見出された (図 2)。

図 2. Ex-4 は PDGF により誘導される血管平滑筋の増殖を抑制する。



しかし、SMC における PDGF 誘導性の下流シグナルである Akt・Erk-MAPK のリン酸化及び cell cycle は Ex-4 前処置によっても有意な変化を認めず、未知の経路の関与が示唆された。

図 3. Ex-4 は PDGF の下流に位置する既知の cell cycle に影響を与えない。



GLP-1 アナログ・Ex-4 が間接的に SMC 増殖抑制作用を有し、血管狭窄病変や動脈硬化病変の進行を抑制する可能性が示唆された。

今後は、虚血性心疾患で経皮的冠動脈形成術を施行した 2 型糖尿病患者を対象に術後より Ex-4 を投与する。半年後、血管内超音波でリモデリングインデックスなどを評価し、Ex-4 の抗動脈硬化作用を検討したと考えている。

尚、6 週令の野生型もしくは PKC δ 欠損マウスに STZ もしくは Vehicle を投与し、野生型コントロール群、野生型 STZ 群、PKC δ コントロール群、PKC δ STZ 群にわけ、8 週齢時に左大腿動脈にガイド・ワイヤーを用いて血管内皮障害術を施行した実験では、群間の血管内膜新生に大きな差は認めなかった。実験条件などを変えて今後再検討する。

8 週齢の野生型マウスより大動脈血管平滑筋細胞を初代培養する。Passage3~7 において正常血糖群 (ブドウ糖濃度 5.5mmol/l)、高血糖群 (ブドウ糖濃度 20mmol/l)、血糖変動群 (高血糖と正常血糖を 2 日毎に繰り返す) の 3 群を用いて 10 日間血管平滑筋細胞の増殖曲線を検討した。

細胞株を換え、計 5 回の検討を行ったが、高血糖群や血糖変動群が正常血糖群に比して有意な血管平滑筋細胞増殖の亢進を認めたのは 1 度のみで、高血糖及び血糖変動は *in vitro* の状態では直接的に血管平滑筋細胞増殖を促進しない可能性が示唆された。また、各 3 群の培養した血管平滑筋細胞を PDGF で刺激し、その下流のシグナルである Erk-MAPK や CREB リン酸化を検討したが、有意な差は認めなかった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

後藤 広昌、野見山 崇 Exendin-4, a glucagon-like peptide-1 receptor agonist, reduces intimal thickening after vascular injury. *Biochem Biophys Res Commun.* 査読あり。(405) 2011 79-84

[学会発表] (計 1 件)

野見山 崇 GLP-1 受容体作動薬 (Exendin-4) は血管障害後の新生内膜形成を抑制する 日本動脈硬化学会 2010. 7. 16 長良川国際会議場

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野見山 崇 (Nomiya Takashi)

順天堂大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：10532559

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし