

令和 2 年 6 月 10 日現在

機関番号：37604

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K10646

研究課題名(和文) GLP-1製剤による糖尿病患者の冠動脈バイパスグラフト血管攣縮抑制作用の検討

研究課題名(英文) Study of the inhibitory effect of GLP-1 preparation on coronary artery bypass graft vasospasm in patients with diabetes mellitus

研究代表者

蒲生 修治 (GAMOH, Shuji)

九州保健福祉大学・薬学部・准教授

研究者番号：20273930

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：糖尿病患者から採取されたグラフト血管は、移植後に攣縮を引き起こしやすいため、予後不良となりやすい。そこで本研究では糖尿病治療薬として用いられるGLP-1アナログ製剤(Exendin-4)によるグラフト血管の攣縮抑制効果を検討した。Exendin-4で前処理したヒト伏在静脈では、未処理の血管と比較して、セロトニンによって誘発される血管収縮反応が有意に低下した。さらに、その抑制効果はアデニル酸シクラーゼ阻害薬SQ225361により減弱した。これらの結果から、Exendin-4はヒト伏在静脈においてcAMPの産生を介して収縮を抑制するため、移植した伏在静脈の血管攣縮を予防する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糖尿病患者は、冠動脈バイパス手術の予後が不良となりやすいことが知られるが、その有効な解決策はいまだ見出されていない。一方、糖尿病患者では非糖尿病患者よりも冠動脈バイパス手術が適応となる重症の動脈硬化をきたしやすい。本研究の結果は、糖尿病の治療薬としてGLP-1製剤を使用することにより、バイパス手術において移植血管のスパズムを抑制できる可能性を示唆していることから、本研究をさらに発展させることにより、糖尿病患者に対するバイパス手術の成功率を上げ、予後を改善する方法の開発につながる。

研究成果の概要(英文)：Bypass grafts harvested from Diabetes mellitus (DM) tends to contraction causing to spasm after implantation. In this study, we investigated the effect of Exendin-4, one of the GLP-1 analogues used as a treatment for DM, on serotonin-induced vasoconstriction in human saphenous vein. Pretreatment with Exendin-4 significantly suppressed 5-HT-induced vasoconstriction in human saphenous vein. Moreover, SQ225361, an inhibitor of adenylate cyclase, diminished the suppressing effect of Exendin-4. These results suggest that Exendin-4 may suppress vasospasm in human saphenous vein, used as bypass graft, via activation of adenylate cyclase.

研究分野：心臓血管外科学

キーワード：CABG vasospasm diabetes mellitus serotonin angiotensin-II membrane receptor

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

冠動脈バイパス手術は、重症の虚血性心疾患に適用される外科的療法の一つである。冠動脈バイパス手術には、グラフト血管(移植用血管)として、内胸動脈や大伏在静脈が汎用されている。ところが、グラフト血管は周術期にしばしば激しい攣縮を引き起こし、手術成績の低下をもたらす原因となっている。特に、糖尿病患者から摘出・移植されたグラフト血管は、非糖尿病患者の血管と比べて攣縮を生じやすいため、糖尿病患者への冠動脈バイパス手術の適用はリスクが高いことが指摘されてきた。しかしながら、糖尿病患者で攣縮が生じやすい原因やそのメカニズムについて、ヒト血管サンプルを用いた詳細な検討は国内外を通じてほとんど行われてこなかった。グラフト血管の攣縮には、移植部位で活性化した血小板から放出されるセロトニンが関与することが知られている。そこで申請者は、セロトニンにより誘発される血管収縮反応を糖尿病患者および非糖尿病患者から摘出された血管サンプルを用いて比較したところ、糖尿病患者で有意に収縮反応が増大していることを見出し報告した<sup>1)</sup>。糖尿病は虚血性心疾患の有力なリスクファクターであるため、冠動脈バイパス手術を受ける患者には基礎疾患として糖尿病を持つ人が多い。そのため、糖尿病患者のグラフト血管における攣縮増大のメカニズムを解明し、有効な予防薬の開発につなげることは、飽食の我が国にとって極めて重要である。

### 2. 研究の目的

これまでの研究で申請者は、糖尿病患者のグラフト血管においてセロトニン誘発性の血管収縮反応が増大するメカニズムを明らかにしてきた。本研究では、糖尿病患者のグラフト血管において攣縮を予防する薬物を探索し、その作用を詳細に解析する。申請者はすでに、摘出ヒト血管を用いて、効果が期待できる薬物のスクリーニングを行っている。このスクリーニングにより、グルカゴン様ペプチド-1 (GLP-1) アナログ製剤である Exendin-4 が、セロトニン誘発性血管収縮を抑制する可能性を見出した。GLP-1 は、膵臓からのインスリン分泌を促す消化管ホルモン(インクレチン)の1種であり、そのアナログ製剤は、糖尿病の治療薬として使用されている。しかしながら、GLP-1 アナログ製剤のヒト血管に対するについては全く検討されていない。そこで今回の研究では、糖尿病患者のグラフト血管攣縮予防薬として、GLP-1 アナログ製剤に着目し、実際に糖尿病の患者から摘出されたグラフト血管をサンプルとして、セロトニン誘発性血管収縮反応に対する抑制効果を、その分子メカニズムを含めて解明する。

### 3. 研究の方法

#### 血管サンプル

本研究では、冠動脈バイパス手術のために摘出されたグラフト血管のうち手術に使用されなかった余剰部位をサンプルとして使用する。手術の前に、担当医が患者に研究内容を説明し、書面にて本人(本人が意思を表明できない場合は親族)の同意が得られた場合にのみ血管の提供を受ける(本学ならびに血管提供元病院倫理委員会承認済み)。余剰グラフト血管は、手術担当医により保存液中に浸漬され、速やかに当研究室に輸送される。その際、手術担当医より血管提供者の性別、年齢、嗜好品や併用薬、併発している他の疾患の有無および状態などが、患者の特定につながる個人情報隠して提供されるため、糖尿病歴の有無や病態を確認することができる。

#### (1) 糖尿病患者のグラフト血管のセロトニン誘発性血管収縮反応に対する GLP-1 アナログ製剤 Exendin-4 の効果

血管サンプルの血管内皮細胞の状態は、移植手術の前処理の過程でまちまちであるため、血管内皮細胞の影響を除くために血管内皮除去操作を施してから研究に使用する。血管の収縮張力の測定は、現有のマグナス装置を用いて行う。2 mm 幅に調製した血管サンプルのリング状標本を、37 °C の Tyrode 液で満たしたオルガンバス中に懸垂し、2.0 g の初期張力をかける。静止張力が安定したところで、検討対象の薬物である Exendin-4 による前処置を 30 分間行い、その後セロトニンを累積添加 ( $10^{-9}$  M ~  $10^{-5}$  M) して発生する血管収縮張力を、アナログ・デジタル変換器 (PowerLab) を用いて等尺性に記録する。

#### (2) Exendin-4 による血管収縮抑制作用の発現メカニズムの解明

血管平滑筋における Exendin-4 による収縮抑制作用が、GLP-1 受容体および Gs タンパクの活性化を介しているかを確認する。具体的には、アデニル酸シクラーゼ阻害剤 SQ22536 でグラフト血管を処理した後に Exendin-4 を作用させ、セロトニン誘発性血管収縮の抑制作用への影響を検討する。さらに、受容体下流の細胞内シグナル伝達経路を明らかにするために、ターゲットとなる細胞内シグナル分子の阻害薬を用いて検討する。

Exendin-4 で処理した血管サンプルを液体窒素により凍結後破碎し、市販のキットを用いて細胞膜画分と可溶性画分とに分画する。関連する受容体やシグナル分子の発現量および活性化(主としてリン酸化)の程度、または発現誘導を、ウエスタンブロット法により検討する。

#### 4. 研究成果

(1) 本研究では冠動脈バイパス手術のグラフト血管としてよく用いられる大伏在静脈をサンプルとして使用した。非糖尿病患者から摘出された大伏在静脈を Exendin-4  $10^{-8}$ M で前処理すると、未処理の血管と比較してセロトニン  $10^{-6}$ M により誘発される血管組織の収縮反応が有意に減弱した。一方、非糖尿病患者から摘出された内胸動脈では、Exendin-4 による前処理によって弱く持続的な収縮反応が観察され、セロトニン  $10^{-5}$ M により誘発される血管組織の収縮反応も未処理の血管と比較して増強される傾向が見られた。

大伏在静脈をグラフト血管として用いる場合には、前処理の過程で血管内皮細胞は脱落してしまうため、移植周辺部では血小板凝集が生じやすい。活性化された血小板からはセロトニンが放出され、これがグラフト血管のスパズムを引き起こす主要な原因と考えられている。Exendin-4 は大伏在静脈におけるセロトニン誘発性の血管収縮を抑制することから、大伏在静脈におけるスパズム発生を抑制する可能性が示唆された。

#### (2) GLP-1 アナログ製剤による血管収縮抑制作用の発現メカニズムの解明

GLP-1 受容体は Gs タンパク質共役型受容体であることから、アゴニストで刺激されるとアデニル酸シクラーゼとそれに引き続く細胞内シグナル伝達が惹起される。そこで非糖尿病患者の大伏在静脈サンプルを  $10^{-5}$ M の SQ225361 (アデニル酸シクラーゼ阻害薬) で 30 分間前処理した後で Exendin-4 処理を行い、セロトニン誘発性収縮反応を観察したところ、Exendin-4 による収縮抑制作用が低下することを見出した。この結果は、Exendin-4 はアデニル酸シクラーゼにより生成される cAMP を介して収縮反応を抑制している可能性を示唆している。

非糖尿病患者の大伏在静脈では、Exendin-4 処理を行っても血管平滑筋細胞膜上のセロトニン 5-HT<sub>2A</sub> 受容体の発現量は変化しなかった。この結果から、Exendin-4 による収縮抑制作用は、受容体の発現量の変化を伴わないと考えられた。

#### 参考文献

- 1) Matsuo Y, Gamoh S, et al. The defective protein level of myosin light chain phosphatase (MLCP) in the isolated saphenous vein, as a vascular conduit in coronary artery bypass grafting (CABG), harvested from patients with diabetes mellitus (DM). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 412: 323-327 (2011)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Gamoh S, Shiba T, DiPette DJ, Yamamoto R.	4. 巻 46
2. 論文標題 Differences in the response to periarterial nerve stimulation or exogenous noradrenaline infusion in the mesenteric vascular bed with the intestinal tract harvested from commonly used rat models of hypertension	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology	6. 最初と最後の頁 427, 434
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1440-1681.13068	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Shiba T, Yokota A, Gamoh S, Tanaka-Totoribe N, Kuwabara M, Nakamura E, Hayase T, Nakamura K, Yamamoto R	4. 巻 41
2. 論文標題 Diabetes Mellitus Induces Hyperreactivity of 5-Hydroxytryptamine (5-HT)-Induced Constriction in Human Internal Thoracic Artery and Is Associated with Increase in the Membrane Protein Level of 5-HT2A Receptor.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biol Pharm Bull	6. 最初と最後の頁 820, 823
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yokota A, Gamoh S, Tanaka-Totoribe N, Shiba T, Kuwabara M, Nakamura E, Hayase T, Hisa H, Nakamura K, Yamamoto R	4. 巻 6
2. 論文標題 Angiotensin II, as well as 5-hydroxytryptamine, is a potent vasospasm inducer of saphenous vein graft for coronary artery bypass grafting in patients with diabetes mellitus	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Biochemistry and Biophysics Reports	6. 最初と最後の頁 82 ~ 87
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrep.2016.03.008	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Tatsuo Shiba, Atsuko Yokota, Shuji Gamoh, Naoko Tanaka-Totoribe, Masachika Kuwabara, Eisaku Nakamura, Takahiro Hayase, Kunihide Nakamura, Hiroaki Hisa, Ryuichi Yamamoto
2. 発表標題 In patients with diabetes mellitus (DM), but not in patients without DM, angiotensin II is a vasospasm inducer in both venous and arterial conduits under coronary artery bypass grafting.
3. 学会等名 18th WORLD CONGRESS OF BASIC AND CLINICAL PHARMACOLOGY (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 鳥取部 直子, 蒲生 修治, 日高 宗明, 比佐 博彰, 山本 隆一
2. 発表標題 ラット摘出腸管血管灌流標本において、麻薬拮抗薬であるナロキソンは血管平滑筋 extrajunctional 1 受容体を抑制するが intrajunctional 1 受容体には作用しない
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 芝達雄, 鳥取部直子, 蒲生修治, 横田敦子, 中村栄作, 桑原正知, 比佐博彰, 山本隆一
2. 発表標題 慢性動脈閉塞症治療薬 サルボグレラート（選択的5-HT <sub>2</sub> 受容体拮抗薬）の主要代謝産物 M-1の血管収縮抑制効果
3. 学会等名 第92回日本薬理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鳥取部直子, 芝達雄, 蒲生修治, 横田敦子, 中村栄作, 桑原正知, 比佐博彰, 山本隆一
2. 発表標題 下肢静脈瘤の進展メカニズム -血管内径と収縮力の関係-
3. 学会等名 日本薬学会第138年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 横田敦子, 新名克彦, 早瀬崇洋, 芝達雄, 鳥取部直子, 蒲生修治, 桑原正知, 山本隆一
2. 発表標題 糖尿病患者におけるアンギオテンシンII誘発性血管収縮反応増強メカニズムについて-摘出ヒト大伏在静脈での検討-
3. 学会等名 第69回日本胸部外科学会定期学術集会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 芝達雄, 蒲生修治, 鳥取部直子, 横田敦子, 桑原正知, 比佐博彰, 山本隆一
2. 発表標題 ヒト伏在静脈および内胸動脈におけるセロトニン誘発性収縮に対する糖尿病の影響
3. 学会等名 第90回日本薬理学会年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 芝達雄, 蒲生修治, 鳥取部直子, 横田敦子, 桑原正知, 比佐博彰, 山本隆一
2. 発表標題 ヒト内胸動脈および伏在静脈におけるアンギオテンシン 誘発性収縮反応に対する糖尿病の影響
3. 学会等名 日本薬学会第137年会
4. 発表年 2017年

〔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
研究 分担 者	山本 隆一  (YAMAMOTO Ryuichi)  (10094111)	九州保健福祉大学・薬学部・教授    (37604)	

## 6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	芝 達雄  (SHIBA Tatsuo)  (00634958)	九州保健福祉大学・薬学部・助教     (37604)	