

平成 30 年 5 月 23 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04802

研究課題名(和文) ストレス性血管病におけるGLP1/DDP4の新しい作用メカニズム解明と治療応用

研究課題名(英文) Mechanism of GLP 1 / DPP4 in stress vascular disease and its therapeutic application

研究代表者

成 憲武 (Cheng, XianWU)

名古屋大学・未来社会創造機構(医)・特任准教授

研究者番号：30378228

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,750,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、ストレス負荷による血管新生低下や動脈硬化発症におけるDPP4の役割解明を目指した。その結果、慢性ストレス負荷による血中DPP-4活性亢進とともに、血管老化ならびに下肢血流回復・毛細血管形成の低下が認められた。さらに、慢性ストレス負荷による高脂肪食性アテローム性動脈硬化プラークの進行・不安定化が認められた。これらの変化がDPP4遺伝子欠損や薬理的阻害剤により改善することを明らかにした。そこで、DPP4は、慢性ストレス性心血管病の新たな治療ターゲットになりうると思われる。

研究成果の概要(英文)：Exposure to psychosocial stress is a risk factor for cardiovascular disease. Here, we have used dipeptidyl peptidase-4 (DPP4)-deficient mice and its inhibitor as well as glucagon-like peptide-1 (GLP-1) receptor agonist to explore the role of DPP4/GLP-1 axis in ischemia-induced neovascularization and diet-induced atherosclerosis. We demonstrated that stress impaired the recovery of the ischemic/normal blood-flow ratio throughout the follow-up period and capillary formation; and these changes DPP4 inhibition and GLP-1R activation improved these changes; these benefits were abrogated by adiponectin blocking and genetic depletion. Similarly, chronic stress accelerated diet-induced atherosclerotic lesion formation; and this effect was reversed by DPP4 inhibition. Our findings suggest that CatK might be a new therapeutic target for the chronic psychological stress-related neovascularization and cardiovascular diseases.

研究分野：老年医学

キーワード：心理的ストレス 血管新生 血管病 ジペプチジルペプチダーゼ 4

1. 研究開始当初の背景

現代社会では、社会環境の発展と変化に伴い環境ストレスは増え続ける一方である。ストレスはかつて「単純な社会問題」と認識されていたが、近年では人体・器官、特に循環器系疾患の発症・増悪に大きく影響することが知られている。とりわけ、(1)ストレス増加に伴って、ストレスホルモンの分泌亢進(ストレスが強い状態で多く産生されるホルモン)を介して心血管系へ直接悪影響を与える、(2)他の心血管病危険因子との相乗作用を介して間接的に心血管系に働くといった環境ストレスと血管老化・血管病の関連性が明らかになってきている。しかし、ストレス・循環器系相互作用に関する研究は、世界的にもまだ端緒についたばかりであり、その機序はほとんど解明されていない。

一方、ストレスによるインスリン様成長因子の低下・代謝異常と血管老化及びそれに伴う血管病の発症・増悪の関連性が報告されている。GLP-1 は、1983 年に同定された消化管ホルモンで、膵臓細胞からのインスリン分泌を促進する。最近、GLP-1 や GLP-1R 作動薬が NO を介する抗炎症作用、心房性ナトリウム利尿ペプチドを介する降血圧作用ならびに心血管保護作用などの多面的効果を有することが明らかにされつつある。反面、DPP-4 は、GLP-1 など生理活性物質分解酵素であり、細胞膜上や可溶性タンパク質として血中にも存在している。さらに、DPP-4 抑制剤(DPP4-I)も GLP-1R 作動薬と同様な心血管保護効果を有する証拠が、基礎・臨床の両研究で蓄積されつつある。しかし、慢性心理的ストレス(chronic psychological stress, CPS)が GLP-1・DPP-4 軸にどんな影響を与えるかは全く不明である。

近年では、慢性ストレスによる骨髄異常が注目されている。特に Heidt らは、慢性可変性ストレスが β_3 -アドレナリン受容体を介して造血幹細胞ニッチ(造血幹細胞を維持する特別な微小環境)のケモカイン(CXCL12)レベルを低下させ、骨髄幹細胞増殖を促進させるとともに、好中球と単球の動員を促進することを解明した。2012 年に研究代表者らは、糖尿病動物モデルにおける DPP-4 活性亢進による組織内 GLP-1 低下と心筋障害、血管新生低下も証明した。さらに、臨床研究では GLP-1R 作動薬(エクセナチド)が K_{ATP} チャンネルを介して再灌流傷害による内皮機能障害を改善することを明らかにした。以上のことから、『ストレスは、骨髄・組織内マクロファージを過剰な活性化し、GLP-1 ホルモンの合成・分解バランス破綻及びシグナル減弱をきたして血管老化及び血管新生低下・血管病増悪を促進させるのではないかと』という発想に至った。

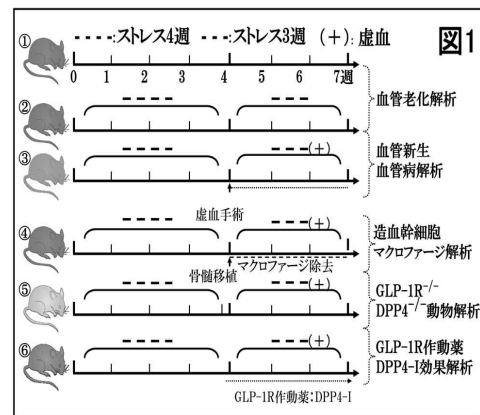
2. 研究の目的

本研究では、ストレスによる過剰な炎症応答が、生体内グルカゴン様ペプチド-1(GLP-1)ホルモンの分解亢進及び GLP-1/GLP-1 受容体(GLP-1R)シグナル減弱化を介して血管老化を引き起こし、さらにそれに伴う血管再生の低下ならびに血管病を発症・増悪させるのではないかと

考えた。そこで本研究では、(1)骨髄造血幹細胞及び血中単球/好中球系細胞活性化とそのストレス性変化、(2)組織内マクロファージ活性化と DPP-4 活性亢進ならびに GLP-1 活性低下の時空間パターンとその関連性を明らかにし、血管老化及再生不全を制御できることを実証したい。これにより、本研究は、GLP-1/DPP-4 系に介入してストレス性血管老化-再生不全(血管病)病態を改善するという新しい治療戦略の提唱につながると思われる。

3. 研究の方法

本研究では、図1のように群分けし、次の検討を行う。



(1) マウス(C57BL)に確立された拘束ストレスモデルを使用してストレスが心血管系、交感神経系と代謝系に与える影響を調べる。

(2) 拘束ストレスモデルを作成し、図1のプロトコールにそって、骨髄、血液、筋肉と血管を採集し、以下の検討を行う。

FACS 解析: 骨髄及び全血を調整し、細胞マーカー(CD11b⁺: 単球・マクロファージ系、CD11c⁺: 樹上細胞、CD3⁺, CD4⁺/CD8⁺: T細胞、B220⁺: B細胞、Gr⁺: 顆粒球、CD45⁺: 白血球、CD31⁺/CD34⁺, CD31⁺/c-kit⁺: 内皮前駆細胞、その他)に対する蛍光抗体を用いて FACS 解析を行う。

免疫染色: 抗体(細胞判定: CD45, Mac-3, CD31)を用いて白血球とマクロファージの浸潤解析を行う。また、TUNEL, picrosirius red, van Gieson の組織染色により、血管細胞成分や細胞増殖、アポトーシス、コラーゲン、エラスチン成分の変化を評価する。

ELISA: 各種 ELISA キット(GLP-1, DPP-4 活性とノルエピネフリン)を用いて定量解析を行う。

ウェスタンブロット法: GLP-1/GLP-1R シグナリング経路リン酸化: Akt1, p-AMPK, PPAR- γ , PGC-1 α , AT1R, gp91phox, p16/p21 等について行う。

-gal 染色: マウス大動脈を採取し、-gal 染色を行い、内皮細胞老化を解析する。

(3) ストレスによる血管新生に与える影響検討するため、4 週間ストレス負荷群マウスに下肢虚血モデルを作成し、次の検討を行う。

レーザードップラー解析: 術前と術後 0, 1, 4, 7,

14, 21 日目にレーザー Doppler 用いて血流回復の解析を行う。

毛細血管形成解析: CD31 抗体を用いた免疫染色により毛細血管形成の解析を行う。

(4) 4週間ストレス負荷群と非負荷群マウスの骨髄細胞と血管細胞を採集し、細胞生存率、アポトーシス、増殖能と運動・浸潤能を評価する。

統計: スチューデント t 検定 (2 群間)、one-way ANOVA-Tukey post hoc tests (3 群以上) ならびに必要に応じて two-way repeated measures ANOVA-Bonferroni post hoc tests (SPSS ソフト) による解析を行う。

4. 研究成果

(1) 本研究は、チューブ型拘束ストレスモデルを用い、マウス (C57BL/6J) に 4 時間のストレス負荷 (禁摂水と摂食) を週 7 回、4 週間実施した後、下肢虚血モデルを作成し (ストレス群)、非ストレス群 (マウスケージ内自由摂水と摂食) と経時的にサンプルを採集し比較を行った。その結果、ストレス群では非ストレス群に比べて、体重、皮下脂肪ならびに内蔵脂肪が有意に低下するとともに、血中と組織内 DPP-4 活性が増加する反面、血中 GLP-1 レベルと脂肪組織における APN 発現および分泌が有意な低下をきたし、虚血下肢血流回復と毛細血管形成が著明に低下することが認められた。組織学的な解析では、虚血組織における炎症性マクロファージ⁶ 浸潤亢進、大動脈老化ならびに動脈リング由来血管新生低下が認められた。生化学による解析では、虚血骨格筋ならびに血管組織において p-AMPK、PPRA-、PGC-1、血管内皮成長因子 (VEGF)⁷、サーチュイン (Sirtuin1)⁸、インスリン受容体基質 1 (IRS-1)⁹ ならびにグルコーストランスポーター (GLUT-4)¹⁰ の蛋白/遺伝子発現が、CPS 群で有意に減少することが明らかになった。また、CD31 抗体 (内皮細胞の表面マーカーとして知られている) と c-Kit 抗体 (様々な体性幹細胞の表面マーカー) を用いたフローサイトメトリー解析¹¹ を行ったところ、CD31+/c-Kit+ 内皮前駆細胞数が骨髄と末梢血において低下していることが明らかになった。さらに、内皮前駆細胞を解析したところ、細胞機能 (運動能、浸潤能、増殖能および管腔形成能) 低下とアポトーシス亢進が認められた。そこで、「ストレスが生体内 GLP-1 ホルモンの合成・分解バランス破綻およびシグナル活性化の減弱をきたして、血管老化および血管病発症・増悪を促進させるのではないか」という仮説をたてて、次の介入実験を行った。

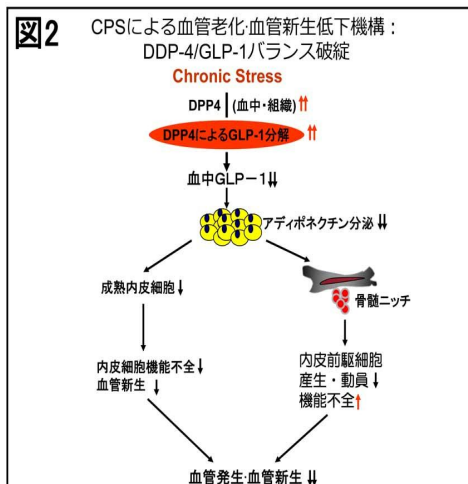
(2) 実験ではまず、上記のストレス負荷 4 週間と下肢虚血モデルを作成した後、ストレス + 溶媒群 (Stress 群、蒸留水 200 μ L/回)、ストレス + DPP4 阻害剤 (anagliptin) 低用量群 (S-DL 群、30mg/kg/d 経口投与) とストレス + DPP4 阻害剤高用量群 (S-DH 群、60mg/kg/d 経口投与) の 3 群に分けて、下肢血流変化を測定するとともに、骨格筋、血液と骨髄を採集して生化学ならびに組織学検討を行った。その結果、S-DL 群と S-DH 群ではマウス血漿 GLP-1 レベルと脂肪組

織における APN 発現および分泌が有意に改善した。これに伴い、両治療群虚血骨格筋組織と大動脈組織において、炎症性細胞浸潤と上記の蛋白・遺伝子発現低下が有意な改善を示した。骨髄ならびに末梢血の CD31+/c-Kit+ 内皮前駆細胞数と機能不全についても改善が確認された。その結果、血管老化および血管新生に著明な改善が認められた。

(3) 次に、DPP4 遺伝子欠損ラット (F344/DuCrj) と野生型ラット (F344/Jcl) に拘束ストレス負荷 4 週間と下肢虚血モデルを作成し両群を比較したところ、DPP4 遺伝子欠損ラットにおいて DPP4 阻害剤治療と同様な血管保護効果が示された。

(4) さらに、ストレス負荷と下肢虚血モデルを作成したマウスに、GLP-1 受容体作動薬であるエクセナチド (5 μ g/kg/d, 2 回/日) を投与したところ、脂肪組織における APN 発現および分泌が有意な改善を示した。その結果、虚血骨格筋と大血管においても上記の蛋白・遺伝子発現低下の回復に伴い、悪化した血管老化と血管新生における改善が認められた。

(5) 最後に、DPP4 阻害剤介入による血管保護効果の分子メカニズムを探るため、APN 遺伝子欠損マウス (APN^{-/-}) を用いた実験を行った。APN^{-/-} においては、非治療群と比較して、anagliptin 投与群で慢性ストレスによって低下した p-AMPK、PPRA- ならびに PGC-1 蛋白レベルと骨髄 CD31+/c-Kit+ 胞動員、機能不全における改善がみられなかった。



従って、本研究結果により、慢性心理的ストレスによる血管老化と血管新生低下は、DPP-4 活性亢進による GLP-1 分解と APN 発現低下、またそれによる AMPK-PPRA- / PGC-1 シグナル経路活性化の低下と深く関係することが証明された (図2)。また、DPP4 阻害薬あるいは GLP-1 受容体作動薬は、ストレスによって低下した APN 発現低下を改善させ、AMPK-PPRA- / PGC-1 シグナル経路が活性化し、血管老化と血管新再生不全を著明に改善させた (図2)。ストレス未然防止や解消療法に加え、上記の薬物療法もストレス性血管病の治療法となりうるという、新たな道筋が示唆された。研究成果を臨床実践にフィードバックし、ストレス現代社会に

おける健康増進に貢献したい。

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 10 件)

- 1) Yisireyli M, Uchida Y, Saitama K, Tanaka T, Cheng XW, Matsushita T, Nakamura S, Murohara T, Takeshita K. Angiotensin receptor blocker irbesartan reduces stress-induced intestinal inflammation via AT1a signaling and ACE2-dependent mechanism in mice. *Brain, Behavior, and Immunity*. 69:167-179. 2018 査読有
DOI: 10.1016/j.bbi.2017.11.010.
- 2) Cheng XW, Lei Y, Piao L, Inoue A, Kuzuya M. DPP-4 inhibition as a therapeutic strategy to ameliorate diabetic metabolic memory. *International Journal of Cardiology*. 256:17. 2018 査読有
DOI: 10.1016/j.ijcard.2017.08.041.
- 3) Piao L, Zhao G, Zhu E, Inoue A, Shibata R, Lei Y, Hu L, Yu C, Yang G, Wu H, Xu W, Okumura K, Ouchi N, Murohara T, Kuzuya M, Cheng XW. Chronic psychological stress accelerates vascular senescence and impairs ischemia-induced neovascularization: The role of dipeptidyl peptidase-4/glucagon-like peptide-1-adiponectin axis. *Journal of the American Heart Association*. 6(10):e006421. 2017 査読有
DOI: 10.1161/JAHA.117.006421.
- 4) Lei Y, Yang G, Hu L, Piao L, Inoue A, Jiang H, Sasaki T, Zhao G, Yisireyli M, Yu C, Xu W, Takeshita K, Okumura K, Kuzuya M, *Cheng XW. Increased dipeptidyl peptidase-4 accelerates diet-Related vascular aging and atherosclerosis in apoE-deficient mice under chronic stress. *International Journal of Cardiology*. 243:413-420. 2017 査読有
DOI: 10.1016/j.ijcard.2017.05.062
- 5) Zhu E, Hu L, Wu H, Piao L, Zhao G, Inoue A, Kim W, Yu C, Xu W, Bando Y, Li X, Lei Y, Hao CN, Takeshita K, Kim WS, Okumura K, Murohara T, Kuzuya M, Cheng XW. Dipeptidyl Peptidase-4 Regulates Hematopoietic Stem Cell Activation in Response to Chronic Stress. *Journal of the American Heart Association*. 6(7):e006394. 2017 査読有
DOI: 10.1161/JAHA.117.006394.
- 6) Yang G, Lei Y, Inoue A, Piao L, Hu L, Jiang H, Sasaki T, Zhao G, Ogasawara S, Xu W, Yu C, Wu H, Okumura K, Kuzuya M, Cheng XW. Exenatide mitigated diet-induced vascular aging and atherosclerotic plaque growth in apoE-deficient mice under chronic stress. *Atherosclerosis*. 264:1-10. 2017 査読有

DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2017.07.014.

- 7) Zhao G, Cheng XW, Piao L, Lu L, Lei Y, Yang G, Inoue A, Ogasawara S, Wu H, Hao CN, Okumura K, Kuzuya M. The Soluble VEGF Receptor sFlt-1 Contributes to Impaired Neovascularization in Aged Mice. *Aging and Disease*. 8(3):287-300. 2017 査読有
DOI: 10.14336/AD.2016.0920.
- 8) Lei Y, Hu L, Yang G, Piao L, Jin M, Cheng XW. Dipeptidyl Peptidase-IV Inhibition for the Treatment of Cardiovascular Disease: Recent Insights Focusing on Angiogenesis and Neovascularization. *Circulation Journal*. 81(7):770-776. 2017 査読有
DOI: 10.1253/circj.CJ-16-1326.
- 9) Yisireyli M, Hayashi M, Wu H, Uchida Y, Yamamoto Y, Kikuchi R, Hamrah MS, Nakayama T, Cheng XW, Matsushita T, Nakamura S, Niwa T, Murohara T, Takeshita K. Xanthine oxidase inhibition by febuxostat attenuates stress-induced hyperuricemia, glucose dysmetabolism, and prothrombotic state in mice. *Scientific Reports*. 7(1):1266. 2017 査読有
DOI: 10.1038/s41598-017-01366-3.
- 10) Yisireyli M, Takeshita K, Hayashi M, Wu H, Uchida Y, Yamamoto K, Kikuchi R, Hao CN, Nakayama T, Cheng XW, Matsushita T, Nakamura S, Murohara T. Dipeptidyl peptidase-IV inhibitor alogliptin improves stress-induced insulin resistance and prothrombotic state in a murine model. *Psychoneuroendocrinology*. 73:186-195. 2016 査読有
DOI: 10.1016/j.psyneuen.2016.08.004.

[学会発表](計 8 件)

一般演題・ポスター発表

- 1) 成 憲武、楊 光、井上愛子、類 延娜、胡麗娜、葛谷雅文. Exenatide Mitigated Diet-induced Vascular Aging and Atherosclerotic Plaque Growth in ApoE-Deficient Mice under Chronic Stress. 第 49 回日本動脈硬化学会総会 学術集会. 2017 年
- 2) Cheng XW, Inoue A, Hu L, Piao L, Kuzuya M. Prevention of muscle wasting with aging in SAMP10 mice by a combination of exercise and intrabone young bone marrow injection. 2nd Asian Conference for Frailty and Sarcopenia. 2016 年
- 3) 井上愛子、成 憲武、胡麗娜、朴麗梅、葛谷雅文. 運動による Adiponectin/ AdipoR1 活性化を介した筋肉幹細胞動員および再生能力の改善. 第 3 回日本サルコペニアフレイル研究会. 2016 年

招待講演

- 4) Cheng XW. Increased Dipeptidyl Peptidase-4 Accelerates Diet-Related Vascular Aging and Atherosclerosis in ApoE-Deficient Mice under Chronic Stress. Myocardial Ischemia Symposium in Korea 2018 (MIS-Korea2018). 2018 年
- 5) Cheng XW. Elevated Dipeptidyl Peptidase-4 Activity Accelerated Stress-Related Insulin Resistance and Atherosclerotic Plaque Growth. Myocardial Ischemia Symposium in Korea 2017 (MIS-Korea2017). 2017 年
- 6) 成 憲武. Role of Cysteinyl Cathepsins in Atherosclerosis-Based Cardiovascular Disease: Focus on Novel Biology and Mechanisms. Kyudai Oral Bioscience 2017 (KOB2017). 2017 年
- 7) Cheng XW. DPP4 Regulates Hematopoietic Stem Cell Activation in Response to Chronic stress. Joint meeting of Coronary Revascularization (JCR2016). 2016 年
- 8) Cheng XW. Dipeptidyl Peptidase-4 (DPP4) Inhibition for the Treatment of Neovascularization: New and Promising, or Not? Kyung Hee University Hospital Cardiology Meeting. 2016 年

〔図書〕(計 1 件)

- 1) 成 憲武、井上愛子. 動脈硬化の新しい分子機構 炎症・免疫からみた最新の知見. 室原企画. 医学のあゆみ. 259(6):590-596. 医歯薬出版株式会社. 2016 年

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

〔その他〕

無

6. 研究組織

(1) 研究代表者

成 憲武 (Cheng XianWu)

名古屋大学・未来社会創造機構・特任准教授
研究者番号：30378228

(2) 研究分担者

佐々木 健 (Sasaki, Takeshi)

浜松医科大学・医学系研究科・技術専門職員
研究者番号：20397433

菊地 良介 (Kikuchi, Ryosuke)

名古屋大学・医学部附属病院・臨床検査技師
研究者番号：30721435

坂東 泰子 (暮石 泰子) (Bandou, Yasuko)

名古屋大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：60452190

竹下 享典 (Takeshita, Kyosuke)

名古屋大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：70444403