

令和 2 年 5 月 25 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K16596

研究課題名(和文) 糖尿病に着目した腹部大動脈瘤の病態解析～DPP-4阻害薬の瘤形成抑制効果の検討～

研究課題名(英文) Influence of DPP-4 inhibitor on aneurysm formation in murine model

研究代表者

森崎 浩一 (MORISAKI, Koichi)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：30625801

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：マウス動脈瘤モデルにおいて、DPP-4阻害薬による瘤形成抑制効果の機序は明らかになっていない。CD26(DPP-4)はT細胞やマクロファージにも発現しており、DPP-4阻害薬がそれらの増殖、活性化を制御することによって瘤形成を抑制する可能性に着目した。in vitroでは、マクロファージ(RAW264.7)をLPSで刺激して炎症促進型に誘導し、real time PCRでmRNA発現を評価した。M1マクロファージマーカーであるiNOSは上昇していた。一方M2マーカーであるArg-1は変化していなかった。今後は薬剤投与による形質変化、in vivoでの検証を行っていく。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腹部大動脈瘤形成、進展における糖尿病の関与について明らかにすることで、糖尿病に着目した腹部大動脈瘤形成抑制の新たな治療戦略の開発につながる可能性がある。特に糖尿病患者では瘤形成抑制効果をもつ糖尿病薬を内服することで瘤形成予防につながる。また、糖尿病に罹患していない患者でも治療適応の大きさに達していない腹部大動脈瘤患者では、血糖降下作用の弱い糖尿病薬を使用することで瘤形成抑制につながる可能性があり、腹部大動脈瘤に対する新たな内科的治療の提示といった臨床的に意義が深く独創性が高いものと思われる。

研究成果の概要(英文)：Inflammatory cells such as macrophages and T cells infiltrated into media and adventitia of abdominal wall in angiotensin II induced AAA murine model.

RAW 264.7 cells were seeded in 6 well plates at a density of 500,000 cells/well for cell growth synchronization, in serum free DMEM overnight cultured with or without LPS. The expression of M1 marker of iNOS was elevated, while the expression of M2 marker of Arg-1 was not changed. Further study is going to be examined to influence of DPP-4 inhibitor on inflammatory cells in aneurysm formation.

研究分野：血管外科

キーワード：大動脈瘤 糖尿病 DPP-4阻害薬

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

腹部大動脈瘤は破裂すると致命的となりうる疾患である。腹部大動脈瘤は動脈硬化が基盤にあり、高血圧、肥満、高脂血症、喫煙などを危険因子として発症すると考えられているが、その発症の機序はいまだ明らかになっていない。

現時点では腹部大動脈瘤に対しては開腹による人工血管置換術もしくはステントグラフトによる手術しか有効な治療法がないのが現状である。開腹手術は歴史が深く安定した成績を残しているが手術侵襲が大きいという問題点がある。一方でステントグラフトは低侵襲であるが、約10%に追加治療を要することやデバイス費用が高いという医療経済的な問題点を有する。前記問題点を有する現状において、腹部大動脈瘤の形成や進展におけるメカニズムを解明してその原因を明らかとし、その治療法を確立することは、臨床的に大変意義があると考えられる。

2005年に山口大学のグループにより C-Jun aminoterminal kinase(JNK)の活性化を抑制することにより、腹部大動脈瘤の進展抑制の可能性について報告されたことなど、この領域での研究は進められているものの、まだ数も少なく特に分子科学的レベルでのアプローチはまだ新しい領域である。

**腹部大動脈瘤は動脈硬化が基盤にあり発症すると考えられているが、動脈硬化の危険因子の一つである糖尿病は瘤形成のネガティブファクターである可能性を示唆する報告が散見される。ただしその機序は明らかになっておらず、糖尿病自体が腹部大動脈瘤形成の防御因子であるのか、もしくは糖尿病治療薬が瘤形成を抑制するのは不明である。**

近年、チアゾリジン薬など糖尿病薬の pleiotropic effect が着目されているが、**DPP-4 阻害薬の大動脈瘤形成に関する報告は少なく、その機序も明らかになっていないのが現状である。**

DPP-4 阻害薬での動脈硬化抑制、抗炎症作用に関しては下記の報告がある。ERK-MMP1 抑制、マクロファージ抑制(Nagashima M et al. Diabetologia 2011; 54: 2649-2659)、ApoE(-)マウスにおける IL-6、IL-1 の抑制(Nga N et al. J Cardiovasc Pharmacol 2011; 58: 157-66)、monocyte の抑制(Arakawa M et al. Diabetes 2010; 59: 1030-1037)、マウスパルーン障害モデルにおける血管平滑筋細胞増殖抑制(Terawaki Y et al. Cardiovasc Diabetol 2014; 19: 154)の報告がある。腹部大動脈瘤モデルの唯一の報告は DPP-4 阻害薬の一つである sitagliptin が MMP-2、MMP-9 を抑制することにより瘤形成抑制効果の可能性があると報告されている(Lu HY et al. PLoS One 2015; 10: e0121077)。ただし、DPP-4 阻害薬による腹部大動脈瘤抑制効果及びその機序については明らかになっていない。

今回、我々は**大動脈瘤の形成及び進展の抑制を目的とした新しい治療戦略として糖尿病と腹部大動脈瘤の関連、及び糖尿病薬(DPP-4 阻害薬)の pleiotropic effect に着目した。**

### 2. 研究の目的

**腹部大動脈瘤形成及び進展と糖尿病との関連を明らかにし、これらの病態に伴う Dipeptidyl Peptidase-4(DPP-4)阻害薬の抗炎症作用をターゲットとした腹部大動脈瘤形成抑制に対する新たな治療戦略を提示することにある。**

腹部大動脈瘤は動脈硬化が基盤にあり発症すると考えられているが、動脈硬化の危険因子の一つである**糖尿病は瘤形成のネガティブファクターである**可能性を示唆する報告が散見される。ただしその機序は明らかになっておらず、**糖尿病自体が腹部大動脈瘤形成の防御因子であるのか、もしくは糖尿病治療薬が瘤形成を抑制するのは不明**である。

今回、DPP-4 阻害薬による腹部大動脈瘤形成抑制効果について野生型マウスと糖尿病マウスモデルについて検討する。

### 3. 研究の方法

当初の研究計画

マウス腹部大動脈瘤モデルの作製

野生型マウスにミニポンプを皮下に埋め込み、Angiotensin(1000ng/kg/min)を投与する。術後6週目に瘤形成について評価する。

DPP-4 阻害薬による瘤形成抑制効果の検討

コントロール群(Co 群)と DPP-4 阻害薬投与群(DPP 群)に分けて、大動脈瘤抑制効果について検討する。DPP-4 阻害薬は腹部大動脈瘤モデル作製の3日前より混餌投与する。コントロール群は通常の餌を投与する。術後6週目に腹部大動脈を採取し、大動脈組織を HE、EVG 染色にて評価する

瘤形成抑制機序の検討

DPP-4 阻害薬における抗動脈硬化作用、抗炎症作用として、IL-1、IL-6、TNF- $\alpha$ 、シグナル伝達として c-Jun N-terminal protein kinase 1 (JNK1)の抑制の可能性が報告されている。一方で上記炎症性サイトカイン、シグナル伝達は大動脈瘤形成に関与すると考えられており、DPP-4 阻害薬による腹部大動脈瘤抑制効果の機序として同因子について検討する。

血液を採取し、血液中の代謝パラメーター(血糖、中性脂肪、コレステロール、インスリン濃度)を ELISA 法にて測定する。

採取した大動脈組織を用いて、種々のシグナル伝達系物質(JNK, NF- $\kappa$ B)をウエスタンブロッ

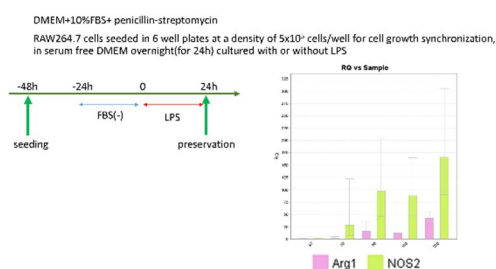
ティング法にて評価する。  
 大動脈組織の炎症性サイトカイン(TNF- $\alpha$ 、IL-1、IL-6 など)について ELISA 法にて検討する

#### 4. 研究成果

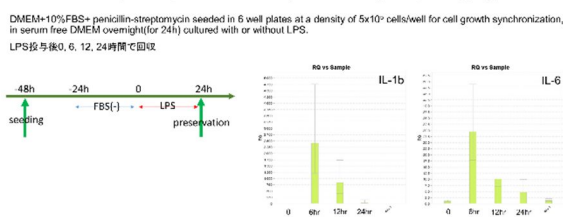
本研究は Dipeptidyl Peptidase-4(DPP-4)阻害薬の抗炎症作用をターゲットとしたマウス腹部大動脈瘤モデルにおける瘤形成抑制効果を検証する内容で採用となった。科研費採択後に DPP-4 阻害薬によるマウス動脈瘤モデルにおける瘤抑制効果が散見されるようになってきた。ただし、その作用機序については明らかになっていない。CD26(DPP-4)はT細胞やマクロファージにも発現しており、DPP-4 阻害薬がそれらの増殖、活性化を制御することによって瘤形成を抑制する可能性について着目した。

in vitro では、マクロファージ (RAW264.7) を LPS で刺激して炎症促進型に誘導し、real time PCR で mRNA 発現を評価した。M1 マクロファージマーカーである iNOS は上昇していた。一方 M2 マーカーである Arg-1 は変化していなかった。炎症性サイトカイン(IL-1, IL-6)は刺激後 6hr で最大濃度に達していた。

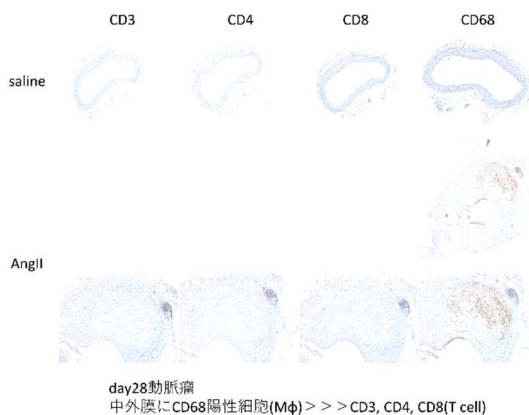
#### LPS刺激によるマクロファージの形質変化



#### LPS刺激後のIL-1b、IL-6の経時的推移



in vivo では、ApoE KO マウスに Angiotensin(1000ng/kg/min) 4 週間皮下投与して腹部大動脈瘤を形成させた。免疫染色で CD68 陽性細胞(マクロファージ)の病変部への浸潤を確認(生食投与群と比較)。T細胞も少数だが浸潤を確認した。



今後は薬剤投与による動脈瘤形成の抑制効果を検証し、T細胞・マクロファージ増殖、活性との関連を検討していく予定である。

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
--	---------------------------	-----------------------	----