

博士論文要約

博士論文名

GLP-1 Receptor Agonist Exendin-4 Attenuates NR4A Orphan Nuclear
Receptor NOR1 Expression in Vascular Smooth Muscle Cells

日本語訳

GLP-1 受容体作動薬 Exendin-4 は血管平滑筋細胞における核内受容体 NOR1
の発現を抑制する

掲載誌名 (巻、頁、発行年)

Journal of Atherosclerosis and Thrombosis (26 巻 2 号、p. 183-197、2019 年)

【背景】

糖尿病患者は高い心血管疾患のリスクをもつことが知られており¹⁾、薬剤溶出性ステントを用いた冠動脈形成術施行後も高頻度にステント再狭窄が認められる²⁾。糖尿病治療の目的がただ血糖値を低下させるのみならず、患者の QOL の維持や血管合併症を予防することであることを考慮すると、血管保護作用をもつ抗糖尿病薬を見出すことは非常に重要なことである。GLP-1 受容体作動薬や DPP-4 阻害薬といったインクレチン関連薬は、血糖降下作用こえた臓器保護作用に注目が集まっており、心血管保護作用³⁾や肝保護作用⁴⁾などが報告されている。

我々はこれまで、GLP-1 受容体作動薬である Exendin-4(Ex-4)がマクロファージの NF- κ B を阻害することで apoE-deficient マウスの粥状動脈硬化形成を抑制すること⁵⁾や、血管傷害術後の血管平滑筋増殖を抑制することで新生内膜形成を抑制すること⁶⁾を報告し、Ex-4 の血糖非依存的な動脈硬化抑制作用を報告した。

一方で、一部の Nuclear hormone receptor superfamily は、粥腫形成や血管病変における炎症の調節や細胞増殖における重要な転写因子として作用していることが報告されている⁷⁾。Neuron-derived orphan receptor 1 (NOR1)は NR4A サブファミリーに属する核内オーファン受容体である。NOR1 はヒトの動脈硬化病変において、遊走してきた血管平滑筋細胞に強発現しており、増殖刺激によって Extracellular signal-regulated kinase (ERK)-mitogen-activated protein kinase (MAPK)と cAMP-responsive element-binding protein (CREB) のリン酸化を介して NOR1 発現が誘導される⁸⁾。NOR1 は血管平滑筋細胞増殖に関わっており、我々は NOR1 欠損マウスでは血管平滑筋細胞における G 1 -S phase entry を阻害することで、血管傷害術後の新生内膜形成が抑制されることを報告した⁹⁾¹⁰⁾。しかし、血管平滑筋細胞における GLP-1 受容体作動薬と NOR1 発現に関する報告はされておらず、本研究は、Ex-4 の血管保護作用と NOR1 発現との関連について検討をおこなった。

【対象と方法】

Animals

本研究のプロトコールは福岡大学動物実験委員会による審査と許可を得ておこなわれている。6 週令の 129X1/SvJ マウスに通常食(20% protein, 70% carbohydrate, and 10% fat; D12450B, Research Diet, New Brunswick, NJ)を投与した。7 週令で PBS-Control 群(n=9)、Ex-4 low-dose 群(300pmol/kg/day, n=10)、Ex-4 high-dose 群(24nmol/kg/day, n=10)に割付し、浸透圧ポンプ(ALZEST, model 1004; DURECT, Cupertino, CA)を用いて持続皮下投与を行った。8 週令で大腿動脈血管傷害術を施行し、12 週令で傷害血管を摘出した。

Animals fed high-fat diet

6 週令の 129X1/SvJ マウスに高脂肪食(20% protein, 20% carbohydrate, and 60% fat, D12492, Research Diet)を投与した。7 週令で PBS-Control 群(n=5)、Ex-4 low-dose 群(300pmol/kg/day, n=5)、Ex-4 high-dose 群(24nmol/kg/day, n=5)に割付し、浸透圧ポンプを用いて持続皮下投与を行った。8 週令で大腿動脈血管傷害術を施行し、12 週令で傷害血管を摘出した。

Guidewire-induced endothelial denudation injury

マウス大腿動脈血管傷害術は既報と同様の手順でおこなった⁶⁾⁹⁾¹¹⁾。簡潔に記載すると、マウス的大腿動脈を露出させ、0.25mm SilverSpeed-10 hydrophilic guidewire (Micro Therapeutics Inc., Irvine, CA, USA)を大腿動脈へ挿入する。4 週間後にマウスは安楽死させ、組織学的解析のため大腿動脈を摘出した。

Tissue preparation and morphometry

摘出したマウス大腿動脈はパラフィン処理をおこなったあとに切片を作成し、Elastica van Gieson 染色と免疫蛍光染色に用いた。ガイドワイヤー挿入部より 0.5mm の部位の切片を、Elastica van Gieson stain kit (ab150667, Abcam, Cambridge, UK)を用いて染色し、顕微

鏡(BZ9000; Keyence, Tokyo, Japan)で観察した。血管内膜と中膜の面積は、BZ-II analyzer software (Keyence, Tokyo, Japan)を用いて測定した。

Immunohistochemistry

パラフィン切片を Cy-3-conjugated α -smooth muscle actin 抗体(C6198, Sigma-Aldrich)を用いてインキュベートした。また、その連続切片を anti-NOR1 抗体(HPA043360, Sigma-Aldrich)、anti-PCNA 抗体(sc-9857; Santa Cruz, CA)でインキュベートし、各々2次抗体として、Alexa Fluor 647 goat anti-rabbit IgG (A21246, Life technologies)と Alexa Fluor 488 donkey anti-goat IgG (A11055, Life technologies)を用いた。全ての切片は DAPI で対比染色をおこない、共焦点顕微鏡で観察した。

Cell culture

ヒト大動脈平滑筋細胞(Lonza, Allendale, NJ)は、5% fetal bovine serum(FBS)、hEGF、insulin、hFGF-B、gentamicin/amphotericin-B (SmGM-2 SingleQuots; Lonza)を添加した Smooth muscle basal medium で培養した。ラット大動脈平滑筋細胞は 10%FBS 含有 D-MEM で培養した。実験では、FBS 無添加培地で少なくとも 12 時間培養し、PBS もしくは Ex-4 0.1-10nM で 12 時間前処置をおこない、その後 10%FBS で細胞刺激をおこなった。

Western blot analysis

既報と同様の手順でおこなった¹²⁾¹³⁾。1次抗体として次の抗体を使用した。NOR1 (TA804872, ORIGENE), phospho-p44/42 MAPK (Thr202/Tyr204) (#9101; Cell Signaling), p44/42 MAPK (#9102; Cell Signaling), phospho-CREB (Ser133) (#9198; Cell Signaling), CREB (#9197; Cell Signaling), phospho-Akt (Ser473) (#4058; Cell Signaling), Protein kinase B (Akt) (#9272; Cell Signaling), phospho-mTOR (Ser2448) (#2971; Cell Signaling), mTOR (#2983; Cell Signaling), p27 Kip1 (#3686; Cell Signaling), and GAPDH (sc-20357; Santa Cruz).

Reverse transcription (RT) and quantitative real-time PCR

既報と同様の手順でおこなった¹²⁾¹³⁾。プライマーは次のものを使用した。

human TBP, 5' -TGCTGCGGTAATCATGAGGATA-3' (forward),

5' -TGAAGTCCAAGAAGCTTAGCTGGAA-3' (reverse);

human NOR1, 5' -CCCCTCCAGGTTCCAGTTAT-3' (forward),

5' -ATTTGGTACACGCAGGAAGG-3' (reverse);

human Skp2, 5' -ACACTGCAAAGCCAGTTG-3' (forward),

5' -TGCAGAATGAAGGCAAAGGG-3' (reverse).

Plasmids, transient transfections, and luciferase assay

大動脈平滑筋細胞に pGL3-MMTV もしくは NOR1-LUC reporter construct を一時的に導入し、NOR1 の転写活性に関して検討をおこなった。ラット大動脈平滑筋細胞に FuGENE HD Transfection Reagent (Roche)を用いて reporter DNA を導入した。FBS 無添加培地で 36 時間培養し、PBS もしくは Ex-4 10nM で 12 時間の前処置をおこない、FBS 投与 12 時間後に Dual-Luciferase Reporter Assay (Promega, Madison, WI, USA)を用いてルシフェラーゼ活性を測定した。NOR1 promoter construct は大倉永也先生(大阪大学)よりご提供頂いた。

Cell cycle analysis using flow cytometry

ヒト大動脈平滑筋細胞を FBS 無添加培地で 36 時間培養し、PBS もしくは Ex-4 10nM で 12 時間前処置をおこない、FBS 刺激をおこなった。Cycletest™ Plus DNA reagent kit (BD Biosciences)と、BD FACSVerser (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA)をもちいて Cell cycle analysis をおこなった。データの解析には FlowJo (Tree Star, Inc., OR,

USA)を用いた。

Statistical analysis

統計学的解析は、すべて GraphPad Prism software (version 7.0; GraphPad Software, SD, USA)を用いておこなった。P-value<0.05 を統計学的有意とみなした。

【結果】

129X1/SvJ マウスに7週令から12週令にかけて Control(生理食塩水)、Ex-4 low-dose、Ex-4 high-dose の投与をおこない、8週令で血管傷害術を施行し、12週令で新生内膜形成(内膜、中膜、内膜/中膜比)を測定した。血管傷害術後の新生内膜形成はコントロール群と比し、Ex-4 投与によって濃度依存的に抑制されることが示唆された(Fig 1A、1B)が、統計学的有意差には至らなかった。一方で、Ex-4 high-dose 群では有意な体重減少がみられたが、糖尿病モデルマウスではないため、血糖、血清インスリン濃度に差はみられなかった(Table 2)。したがって、Ex-4 による新生内膜形成は糖代謝に及ぼす作用とは独立したものであることが示唆された。

血管傷害術後の新生内膜は主に α -smooth muscle cell actin 陽性の血管平滑筋細胞により構成されていることを免疫蛍光染色で確認した(Fig.2A)。新生内膜と中膜の細胞数を測定したところ、Ex-4 濃度依存的に細胞増殖の抑制がみられ、特に Ex-4 high-dose 群で Control 群と比し有意な細胞増殖抑制がみられた(Fig.2B)。次に遊走した血管平滑筋細胞における NOR1 発現を調査するため、傷害血管を用いて免疫蛍光染色を施行した。Control 群では新生内膜に顕著な NOR1 発現が認められたが、Ex-4 投与により NOR1 陽性の血管平滑筋細胞は濃度依存的に減少がみられた(Fig.2D)。また NOR1 発現低下と同様に、細胞増殖マーカーである PCNA 陽性細胞も減少がみられた(Fig.2C、2E)。これらの結果から、Ex-4 は血管平滑筋細胞における NOR1 発現を抑制し、血管平滑筋細胞の増殖を抑制することで、血管傷害術後の新生内膜形成を抑制していることが示唆された。

次に、培養した血管平滑筋細胞を用いて、NOR1 発現に及ぼす Ex-4 の作用について研究をおこなった。ラットやマウスの血管平滑筋細胞をもちいた既報⁸⁾⁹⁾と一致して、FBS 非含有の飢餓培地で培養したヒト血管平滑筋細胞では NOR1 発現は著明に抑制され、その後 FBS 刺激をおこなうと、劇的に NOR1 蛋白(Fig.3A)と NOR1 mRNA(Fig.3B)の発現がみられた。飢餓培地で培養したヒト血管平滑筋細胞に Ex-4 で前処置を行った場合、FBS 誘導性の NOR1 発現は蛋白、mRNA とともに Ex-4 濃度依存性に発現抑制がみられた(Fig.3A、3B)。次にルシフェラーゼアッセイを用いて、Ex-4 の NOR1 プロモーター活性への作用を調査した。FBS 誘導性の NOR1 プロモーター活性は、Ex-4 10nM 投与によって有意に抑制され(Fig.2C)、Ex-4 は NOR1 プロモーター活性を抑制することで NOR1 発現を抑制することが示唆された。また、GLP-1R antagonist である Exendin 9-39(Ex9-39)と PKA inhibitor である PKI によって、Ex-4 による NOR1 mRNA 発現抑制作用は阻害され(Fig.3D)、Ex-4 の FBS 誘導性の NOR1 発現抑制作用は GLP-1R とその下流の PKA pathway を介したものであることが示唆された。

また以前の研究で、NOR1 の発現には extracellular signal-regulated kinase-mitogen-activated protein kinase (ERK-MAPK)と cAMP-responsive element-binding protein (CREB)のリン酸化を介していることを見出し報告した⁸⁾。そこで、次に ERK-MAPK と CREB のリン酸化に及ぼす Ex-4 の作用について Western blotting を用いて検討をおこなった。ヒト血管平滑筋細胞に Ex-4 10nM で前処置をおこなったところ、FBS 誘導性の ERK-MAPK のリン酸化は抑制され(Fig.4A)、同様に CREB のリン酸化も有意に抑制された(Fig.4B)。また、同様に血管平滑筋細胞の増殖シグナルとして mammalian target of rapamycin (mTOR)のリン酸化に対する Ex-4 の作用について検討をおこなったところ、Ex-4 の前処置により FBS 誘導性の mTOR リン酸化は有意に抑制された(Fig.4C)。NOR1 は細胞周期において G1-S 期を促進して血管平滑筋細胞の増殖を調整する⁹⁾ため、ヒト血管平滑筋細胞においても Ex-4 が細胞周期に及ぼす作用について検討をおこなった。

FBS 刺激により G1-S 期と G2/M 期へ誘導されるが、Ex-4 10nM の前処置により細胞周期進行は有意に抑制された(Fig.5A、5B)。この結果から、Ex-4 は細胞周期進行を抑制することで、平滑筋増殖を抑制することが示唆された。次に、細胞周期調節因子に及ぼす Ex-4 作用について検討をおこなった。細胞周期を負に制御する p27 Kip は FBS 刺激により分解され細胞周期進行がおこるが、Ex-4 前処置により分解抑制がみられ(Fig.5C)、そのユビキチンリガーゼである S-phase kinase-associated protein 2 (SKP2)の FBS 誘導性の遺伝子発現は、Ex-4 前処置により有意に抑制がみられた(Fig.5D)

Ex-4 は 2 型糖尿病の治療に用いられる薬剤であるため、次に高脂肪食を負荷したインスリン抵抗性主体の 2 型糖尿病モデルマウスにおいて、Ex-4 が血管傷害術後の新生内膜形成を抑制するか検討をおこなった。血管傷害術後の新生内膜形成はコントロール群と比し、Ex-4 投与によって濃度依存的に抑制されることが示唆された(Fig.6B)が、統計学的有意差には至らなかった。一方で、体重、血糖は Ex-4 の濃度依存性に低下がみられ(Table.5)、Ex-4 による糖代謝への作用と考えられた。非糖尿病モデルマウスを用いた際と同様に、新生内膜は α -smooth muscle cell actin 陽性の血管平滑筋細胞を主体に構成されており(Fig.7A)、内膜と中膜の細胞数を測定したところ、有意差には至らなかったが Ex-4 濃度依存的に細胞増殖の抑制がみられた(Fig.7B)。更に新生内膜における NOR1、PCNA 発現について検討したところ、NOR1 陽性細胞、PCNA 陽性細胞は Ex-4 濃度依存性に減少がみられた(Fig.7D、7E)。これらの結果から、糖尿病モデルマウスにおいても Ex-4 は血管平滑筋細胞における NOR1 発現を抑制し、血管平滑筋細胞の増殖を抑制することが示唆された。

【考察】

本研究は GLP-1R アゴニストである Ex-4 が、血管傷害術後の新生内膜形成と血管平滑筋細胞増殖を抑制し、それは NOR1 発現の抑制が関与していることを示唆するものである。更に、Ex-4 は FBS 誘導性の Skp2 遺伝子発現を抑制することで細胞周期進行を阻害し、平滑筋細胞増殖を抑制することが明らかとなった。我々が以前報告したように⁸⁾⁹⁾、近年インクレチン関連薬の直接的な血管保護作用が注目されている。その他の研究機関からも GLP-1 を含むインクレチン関連薬の血糖降下作用とは独立した抗動脈硬化作用や血管保護作用が報告されている¹⁴⁾¹⁵⁾。また、近年では基礎研究のみならずヒト 2 型糖尿病患者を対象とした大規模臨床試験でも、GLP-1 の血管保護作用が報告されている¹⁶⁾¹⁷⁾。血管平滑筋細胞の増殖は初期の動脈硬化形成のみならず、血管形成術後の血管再狭窄にも寄与している。また、糖尿病状態では血管平滑筋細胞増殖が亢進していることが報告されている¹⁸⁾。従って、血管平滑筋細胞の増殖を抑制しうる抗糖尿病薬を用いることは、2 型糖尿病患者にとって有益であると考えられる。血管を構成する細胞において、平滑筋細胞では GLP-1R が豊富に発現⁶⁾¹⁵⁾しており、GLP-1 による血管保護作用の重要なターゲットである。GLP-1 が血管平滑筋細胞増殖を抑制するメカニズムとして、RAS-related C3 botulinus toxin substrate 1 (Rac1)の活性化阻害¹⁹⁾、小胞体-ミトコンドリアカップリングの増強²⁰⁾や、アディポネクチンがインクレチン関連薬の分子学的ターゲットであること²¹⁾²²⁾が報告されているが、本研究では血管平滑筋細胞における GLP-1 による NOR1 発現抑制という新しい機序を見出した。NOR1 は血管平滑筋増殖を調節する核内オーファン受容体である²³⁾。近年の研究では血管平滑筋細胞における NOR1 発現は後成的修飾²⁴⁾や microRNA-638²⁵⁾により調節されていることが報告されている。NOR1 発現を調節する機序については報告されているが、降圧薬や抗糖尿病薬などの臨床で用いられる治療薬によって、血管平滑筋細胞における NOR1 発現へ作用するかについてはこれまで報告がなされていない。本研究は抗糖尿病薬である GLP-1R アゴニストが血管平滑筋細胞における NOR1 発現を減弱したという初の報告である。本研究でもちいた Ex-4 は、臨床の場ではエキセナチドとして用いることができる。エキセナチドを用いた大規模臨床試験(EXSCEL study)では、プラセボと比較して優位性を示すことはできなかった、同じ GLP-1R アゴニストであるリラグルチドをもちいた大規模臨床試験(LEADER trial)と比較して、試験期間が短く開始時の HbA1c が高値であったことが指摘されている。本研究の結果から、Ex-4 の臨床的な心血管への保護的作用についても期待される

が、更なる臨床研究と基礎研究が必要であると考えます。

【結語】

Ex-4 は NOR1 発現と Skp2 発現を抑制することで、血管傷害術後の新生内膜形成や、血管平滑筋細胞の増殖を抑制することが示唆された。更に、血管平滑筋細胞において、Ex-4 投与によって ERK-MAPK のリン酸化や CREB のリン酸化は抑制され、細胞分裂における G1-S phase entry を抑制することが示された。インクレチン関連薬による NOR1 発現抑制は、糖尿病患者における心血管イベント抑制や動脈硬化進展抑制のために重要な役割をもつ可能性が示唆された。

【参考文献】

1. Haffner SM, Lehto S, Ronnema T, Pyorala K, Laakso M: Mortality from coronary heart disease in subjects with type 2 diabetes and in nondiabetic subjects with and without prior myocardial infarction. *N Eng J Med* 1998, 339:229-234.
2. Scheen AJ, Warzee F: Diabetes is still a risk factor for restenosis after drug-eluting stent in coronary arteries. *Diabetes Care* 2004, 27:1840-1841.
3. Pujadas G, Drucker DJ: Vascular biology of glucagon receptor superfamily peptide: Mechanistic and clinical relevance. *Endocr Rev* 2016, 37:554-583.
4. Ding X, Saxena NK, Lin S, Gupta NA, Anania FA: Exendin-4, a glucagon-like protein-1 (GLP-1) receptor agonists, reverses hepatic steatosis in ob/ob mice. *Hepatology* 2006, 43:173-181
5. Arakawa M, Mita T, Azuma K, Ebato C, Goto H, Nomiya T, Fujitani Y, Hirose T, Kawamori R, Watada H: Inhibition of monocyte adhesion to endothelial cells and attenuation of atherosclerotic lesion by a glucagon-like peptide-1 receptor agonist, exendin-4. *Diabetes* 2010, 59:1030-7.
6. Goto H, Nomiya T, Mita T, Yasunari E, Azuma K, Komiya K, Arakawa M, Jin WL, Kanazawa A, Kawamori R, Fujitani Y, Hirose T, Watada T: Exendin-4, a glucagon-like peptide-1 receptor agonist, reduces intimal thickening after vascular injury. *Biochem Biophys Res Commun* 2011, 405:79-84.
7. Kurakura K, Hamers AA, deWaard V, de Vries CJ. Nuclear receptors in atherosclerosis: a superfamily with many 'Goodfellas'. *Mol Cell Endocrinol* 2013, 368:71-84.
8. Nomiya T, Nakamachi T, Gizard F, Heywood EB, Jones KL, Ohkura N, Kawamori R, Conneely OM, Bruemmer D: The NR4A orphan nuclear receptor NOR1 is induced by platelet-derived growth factor and mediates vascular smooth muscle cell proliferation. *J Biol Chem* 2006, 281:33467-33476.
9. Nomiya T, Zhao Y, Gizard F, Findeisen HM, Heywood EB, Jones KL, Conneely OM, Bruemmer D: Deficiency of the NR4A neuron-derived orphan receptor-1 attenuates neointima formation after vascular injury. *Circulation* 2009, 119:577-586.
10. Gizard F, Zhao Y, Findeisen HM, Qing H, Cohn D, Heywood EB, Jones KL, Nomiya T, Bruemmer D: Transcriptional regulation of S phase kinase-associated protein 2 by NR4A orphan nuclear receptor NOR1 in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 2011, 286:35485-35493.
11. Terawaki Y, Nomiya T, Kawanami T, Hamaguchi Y, Takahashi H, Tanaka T, Murase K, Nagaishi R, Tanabe M, Yanase T. Dipeptidyl peptidase-4 inhibitor linagliptin attenuates neointima formation after vascular injury. *Cardiovasc Diabetol* 2014, 13:154.

12. Nomiya T, Kawanami T, Irie S, Hamaguchi Y, Terawaki Y, Murase K, Tsutsumi Y, Nagaishi R, Tanabe M, Hidetaka Morinaga, Tanaka T, Mizoguchi M, Nabeshima K, Tanaka M, Yanase T: Exendin-4, a glucagon-like peptide-1 receptor agonist, attenuates prostate cancer growth. *Diabetes* 2014, 63:3891-3905.
13. Tsutsumi Y, Nomiya T, Kawanami T, Hamaguchi Y, Terawaki Y, Tanaka T, Murase K, Motonaga R, Tanabe M, Yanase T, Combined treatment with Exendin-4 and metformin attenuates prostate cancer growth. *PLoS ONE* 2015, 10:e0139709.
14. Nagashima M, Watanabe T, Terasaki M, Tomoyasu M, Nohtomi K, Kim-Kaneyama J, Miyazaki A, Hirano T: Native incretins prevent the development of atherosclerotic lesions in apolipoprotein E knockout mice. *Diabetologia* 2011, 54 :2649-2659.
15. Hirata Y, Kurobe H, Nishio C, Tanaka K, Fukuda D, Uematsu E, Nishimoto S, Soeki T, Harada N, Sakaue H, Kitagawa T, Shimabukuro M, Nakaya Y, Sata M: Exendin-4, a glucagon-like peptide-1 receptor agonist, attenuates neointimal hyperplasia after vascular injury. *Eur J Pharmacol* 2013, 699 :106-111.
16. Marso SP, Daniels GH, Brown-Frandsen K, Kristensen P, Mann JF, Nauck MA, Nissen SE, Pocock S, Poulter NR, Ravn LS, Steinberg WM, Stockner M, Zinman B, Bergenstal RM, Bise JB; LEADER Steering Committee; LEADER Trial Investigators: Liraglutide and cardiovascular outcomes in type 2 diabetes. *N Engl J Med* 2016, 375 :311-322.
17. Marso SP, Bain SC, Consoli A, Eliaschewitz FG, Jodar E, Leiter LA, Lingvay I, Rosenstock J, Seufert J, Warren ML, Woo V, Hansen O, Holst AG, Petterson J, Visvoll T; SUSTAIN-6 Investigators: Semaglutide and cardiovascular outcomes in patients with type 2 diabetes. *N Engl J Med* 2016, 375 :1834-1844.
18. Bruemmer D: C-peptide in insulinresistance and vascular complications : teaching an old dog new tricks. *Circ Res* 2006, 99 :1149-1151.
19. Zhao L, Li AQ, Zhou TF, Zhang MQ, Qin XM: Exendin-4 alleviates angiotensin II-induced senescence in vascular smooth muscle cells by inhibiting Rac1 activation via a cAMP/PKA-dependent pathway. *Am J Physiol Cell Physiol* 2014, 307 :C1130-C1141.
20. Morales PE, Torres G, Sotomayor-Flores C, Pena-Oyarzun D, Pivera-Mejias P, Paredes F, Chiong M: GLP-1 Promotes mitochondrial metabolism in vascular smooth muscle cells by enhancing endoplasmic reticulum-mitochondria coupling. *Biochem Biophys Res Commun* 2014, 446 :410-416.
21. Yang G, Lei Y, Inoue A, Piao L, Hu L, Jiang H, Sasaki T, Wu H, Xu W, Yu C, Zhao G, Ogasawara S, Okumura K, Kuzuya M, Cheng XW: Exenatide mitigated diet-induced vascular aging and atherosclerotic plaque growth in ApoE-deficient mice under chronic stress. *Atherosclerosis* 2017, 264 :1-10.
22. 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, Chen XW: Chronic psychological stress accelerates vascular senescence and impairs ischemia-induced neovascularization: the role of dipeptidyl peptidase-4/glucagon-like peptide-1-adiponectin axis. *J Am Heart Assoc* 2017, 6 :e006421.
23. Zhao Y, Bruemmer D. NR4A orphan nuclear receptors: transcriptional regulators of gene expression in metabolism and vascular biology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010, 30 :1535-1541.
24. Zhao Y, Nomiya T, Findeisen HM, Qing H, Aono J, Jones KL, Heywood EB,

- Bruemmer D: Epigenetic regulation of the NR4A orphan nuclear receptor NOR1 by histon acetylation. *FEBS Lett* 2014, 588 :4825-4830.
25. Li P, Liu Y, Yi B, Wang G, You X, Zhao X, Summer R, Qin Y, Sun J: MicroRNA-638 is highly expressed in human vascular smooth muscle cells and inhibits PDGF-BB-induced cell proliferation and migration through targeting orphan nuclear receptor NOR1. *Cardiovasc Res* 2013, 99 :185-193.