

氏名	たかはし ひろゆき 高橋 弘幸		
学位の種類	博士（医学）		
報告番号	甲第 1767 号		
学位授与の日付	平成 31 年 3 月 14 日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当（課程博士）		
学位論文題目	GLP-1 Receptor Agonist Exendin-4 Attenuates NR4A Orphan Nuclear Receptor NOR1 Expression in Vascular Smooth Muscle Cells (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)		
論文審査委員	(主 査) 福岡大学	教授	柳瀬 敏彦
	(副 査) 福岡大学	教授	三浦 伸一郎
	福岡大学	教授	廣瀬 伸一
	福岡大学	講師	池 周而

内 容 の 要 旨

【目的】

糖尿病性動脈硬化の進行は内皮機能障害や炎症のみならず、血管平滑筋細胞の増殖・遊走が重要な役割を担っている。一部の Nuclear hormone receptor superfamily は、細胞の増殖や炎症の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。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り、ヒトの動脈硬化病変において、内膜へ遊走してきた血管平滑筋に強発現しており、血管平滑筋細胞の増殖や動脈硬化形成に重要な役割を担っている。一方で、Exendin-4 (Ex-4) は主に 2 型糖尿病に対する治療薬として用いられている GLP-1 受容体作動薬である。血糖降下作用のみならず、様々な臓器や組織に対して多面的に作用することが報告されており、血管平滑筋細胞の増殖や遊走を抑制することが示されており、また、大規模臨床試験でも心血管イベントを抑制することが報告されている。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】

7 週令の 129X1/SvJ マウスに通常食もしくは高脂肪食 (60% fat) を投与し、浸透圧ポンプを用いて PBS (Control 群)、Ex-4 300pmol/kg/day (Low dose 群)、Ex-4 24nmol/kg/day (High dose 群) の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。Elastica van Gieson 染色を用いて新生内膜を

測定し、また蛍光免疫染色を用いて新生内膜における血管平滑筋細胞数の測定と、NOR1陽性細胞の測定をおこなった。またヒト大動脈血管平滑筋細胞 (VSMC) を用いて、Ex-4 の VSMC 増殖に対する作用を、Bromodeoxyuridine incorporation assay と Cell cycle distribution analysis で評価した。更に、Ex-4 の NOR1 と細胞周期調節因子発現に及ぼす作用について、蛍光免疫染色、Western blotting、qRT-PCR、Luciferase assay を用いて調査した。

【結果】

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 投与群で抑制される傾向にあった。新生内膜形成の程度に一致して、Ex-4 投与群では濃度依存的に血管平滑筋細胞数と NOR1 陽性細胞が減少することが示された。これらは通常食、高脂肪食投与に関わらず同様の傾向が得られた。In vitro では、Ex-4 は濃度依存的に VSMC における NOR1 蛋白の発現、NOR1 mRNA 発現を抑制し、また Ex-9(39)、PKI の投与によりその作用はキャンセルされた。Ex-4 による NOR1 発現抑制の機序として、extracellular signal-regulated kinase-mitogen-activated protein kinase (ERK-MAPK) と cAMP-responsive element-binding protein (CREB) のリン酸化抑制が考えられた。更に、Cell cycle distribution analysis では、Ex-4 投与によって血清誘導性の G1-S phase entry が有意に抑制された。同様に、Ex-4 投与により細胞周期阻害因子である p27 の発現増加が認められ、一方で S-phase kinase-associated protein 2 (Skp2) は抑制されることが示された。

【結論】

Ex-4 は NOR1 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、VSMC 増殖を抑制することが示唆された。更に、VSMC 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。

審査の結果の要旨

本論文は GLP-1 受容体作動薬の Exendin-4(Ex-4)がマウス血管障害モデルで惹起された動脈硬化を血管平滑筋細胞における Neuron-derived orphan receptor 1 (NOR1) の発現抑制を介して抑制することを *in vivo* および *in vitro* において解明した研究である。

糖尿病性動脈硬化症の進行は内皮機能障害や炎症のみならず、血管平滑筋細胞の増殖・遊走が重要な役割を担っている。一部の Nuclear hormone receptor superfamily

は、細胞増殖や炎症の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。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り、ヒトの動脈硬化病変において、内膜へ遊走してきた血管平滑筋に強発現しており、血管平滑筋細胞の増殖や動脈硬化形成に重要な役割を担っている。一方、Ex-4 は主に 2 型糖尿病に対する治療薬として用いられている GLP-1 受容体作動薬である。血糖降下作用のみならず、様々な臓器や組織に対して多面的な作用の一つとして血管平滑筋細胞の増殖や遊走を抑制することが示されており、また、大規模臨床試験でも心血管イベントを抑制することが報告されている。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した。

まず、129X1/SvJ マウスに通常食もしくは高脂肪食 (60% fat) を投与し、浸透圧ポンプを用いて PBS (Control 群)、Ex-4 300pmol/kg/day (Low dose 群)、Ex-4 24nmol/kg/day (High dose 群) の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。Elastica van Gieson 染色を用いて新生内膜を測定し、また蛍光免疫染色を用いて新生内膜における血管平滑筋細胞数の測定と、NOR1 陽性細胞の測定をおこなった。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 投与群で抑制される傾向にあった。新生内膜形成の程度に一致して、Ex-4 投与群では濃度依存的に血管平滑筋細胞数と NOR1 陽性細胞が減少することが示された。これらは通常食、高脂肪食投与に関わらず同様の傾向がみられ、Ex-4 の血糖非依存的な平滑筋増殖抑制作用と NOR1 発現抑制作用が認められた。*In vitro* では、ヒト大動脈平滑筋細胞 (VSMC) を用いて、Ex-4 の NOR1 発現・VSMC 増殖に対する作用を検討した。VSMC を 0.1~10nM の Ex-4 存在下で培養し、その後 FBS 刺激を行うと、Ex-4 は濃度依存的に VSMC における NOR1 蛋白の発現、NOR1 mRNA 発現を抑制した。また Ex-9 (39)、PKI の投与によりその作用はキャンセルされ、Ex-4 の NOR1 発現抑制作用は GLP-1R を介したものであることが示唆された。また、Ex-4 で前処置した VSMC では FBS 誘導性の、extracellular signal-regulated kinase-mitogen-activated protein kinase (ERK-MAPK) と cAMP-responsive element-binding protein (CREB) のリン酸化抑制が認められ、Ex-4 による NOR1 発現抑制の機序と考えられた。その他の growth signal の検討では、Ex-4 は FBS 誘導性の AKT リン酸化には影響を与えない一方、mTOR のリン酸化は抑制することが明らかとなった。更に、Cell cycle distribution analysis では、Ex-4 投与によって血清誘導性の G1-S phase entry が有意に抑制された。同様に、Ex-4 投与により細胞周期阻害因子である p27 の発現増加が認められ、一方で S-phase kinase-associated protein 2 (Skp2) は抑制されることが示された。

以上より、Ex-4 が NOR1 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、血管平滑筋細胞増殖を抑制することを明らかにした。

1. 斬新さ

本研究は GLP-1 受容体作動薬 Ex-4 の平滑筋細胞増殖抑制作用に NOR1 発現が関与していることを立証し、詳細な分子メカニズムも解明した世界で最初の報告である。

2. 重要性

糖尿病患者は非糖尿病患者と比較して、心血管死のリスクや冠動脈形成術後の再狭窄リスクが高いことが知られており、糖尿病治療薬の選択としてはより血管合併症を抑制する治療選択が望まれる。本研究の重要な点は、糖尿病治療薬である Ex-4 が NOR1 発現抑制に作用することで、血糖降下作用とは独立して平滑筋増殖を抑制することが認められる点である。Ex-4 が糖尿病患者における冠動脈形成術後の平滑筋細胞増殖を主体とした re-stenosis を抑制する可能性を見出しており、糖尿病性動脈硬化症の発症進展を抑制するための糖尿病治療ストラテジー確立に大きく貢献するとともに、平滑筋増殖を主体とした動脈硬化性疾患の治療ターゲットとして NOR1 の重要性を示唆する報告である。

3. 実験方法の正確性

細胞培養、細胞や組織の免疫染色、Cell cycle distribution analysis、シグナル伝達経路の解析、動物実験といった複数の実験系を確立された方法に従い、正確な手技で施行されている。

4. 表現の明確さ

糖尿病および動脈硬化性疾患に対する十分な専門的知識や研究方法の正確さを背景に、論文は Abstract, Materials and Methods, Results, Discussion, Figure legends の各項目が理路整然と正確かつ明確に記載されている。

5. 主な質疑応答

Q1. Ex-4 の細胞増殖抑制作用について、正常細胞にも及ぼす可能性はあるか。

A1. 通常投与量では正常細胞の増殖に影響を及ぼすことはないと考える。

Q2. ヒト VSMC でルシフェラーゼアッセイがおこなえなかったのはどういったことが原因か。

A2. ヒト VSMC では導入効率が悪く、更に飢餓培地を用いて Phenotype switch を起こすと、導入されていない細胞がメインで増殖し実験系として work しなかったためである。

Q3. 内皮細胞にも GLP-1R は発現しているか？

A3. 内皮細胞で発現は確認していないが、発現している可能性が高いと考える。

Q4. 冠動脈形成術後の re-stenosis に GLP-1R agonist が有用であることが報告されているが、内皮細胞への影響がメインと考察されていた。GLP-1 は内皮細胞と血管平滑筋どちらにより強く作用しているか。

A4. 血管形成術後の再狭窄は内皮の炎症も血管平滑筋増殖の双方が関与していることが

考えられる。どちらにより強く作用しているかについては今後検討の必要があるが、本研究では血管平滑筋の増殖にターゲットとした。

- Q5. ヒト由来の GLP-1 でも同様の作用が起こりうるか。
A5. 生理的に分泌される範疇では同様の作用は起こりにくいと考ええる。
- Q6. 血管傷害術では血管径によって傷害の程度に誤差が生じるか。
A6. 血管傷害術ではマウスの週令は同一であり、作成した組織切片もワイヤー刺入部からの距離を同一にして作成しているため、血管径に大きな誤差は生じないと考える。
- Q7. 通常状態の VSMC では NOR1 は発現しているか。
A7. Contractile phenotype の VSMC でも NOR1 発現はみられるが proliferative phenotype の状態の VSMC により強く発現がみられる。
- Q8. 血糖非依存的な作用であるが、糖尿病以外での動脈硬化性疾患に対する作用はどうか。また臨床に応用することは可能か。
A8. 高血圧や脂質代謝異常による粥状動脈硬化においても血管平滑筋の増殖・遊走がおこっており、GLP-1R agonist による平滑筋増殖抑制作用は発揮されることが期待される。実際の臨床の場合においては、非糖尿病状態の患者に GLP-1R agonist を投与することは嘔気などの副作用の観点から現時点では難しく、今後検討が必要なものと考ええる。
- Q9. 今回の Ex-4 投与量は臨床で用いられる投与量とどのくらい異なるか。
A9. Ex-4 300pmol/kg/day は臨床で用いた際の血中濃度と同程度であり、24nmol/kg/day はおよそ 80 倍の投与濃度となっている。
- Q10. NOR1 のリガンドについて
A10. NOR1 は Orphan receptor であり、現在でもその Ligand は明らかになっていない。CREB や AP-1、NF- κ B といったもので発現は誘導され、目標遺伝子のプロモーター領域にある NBRE に直接結合し、その遺伝子の発現を調節している。
- Q11. NOR1 とその他の疾患についての関連は？
A11. ザルコーマなどの腫瘍性疾患との関連が報告されている。

上記の何れの質問にも適切に回答した。

以上、審査の結果、本論文は学位論文に値すると判断された。