

|         |   |     |       |
|---------|---|-----|-------|
| 氏名      | ほりかわ つよし<br>堀川 剛  |     |       |
| 学位の種類   | 博士 (医学)   |     |       |
| 報告番号    | 甲第 1875 号   |     |       |
| 学位授与の日付 | 令和 3 年 3 月 16 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  | Pemafibrate, a PPAR alpha agonist, attenuates neointima formation after vascular injury in mice fed normal chow and a high-fat diet<br>(通常食マウス、高脂肪食マウスにおける PPAR $\alpha$ 作動薬ペマフィブラートによる血管損傷後の新生内膜形成抑制効果の検討) |     |       |
| 論文審査委員  | (主 査) 福岡大学  | 教授  | 松永 彰  |
|         | (副 査) 福岡大学  | 教授  | 小林 邦久 |
|         | 福岡大学  | 准教授 | 上杉 憲子 |

## 内 容 の 要 旨

### 【目的】

糖尿病患者は心血管イベントのリスクが非常に高いことが知られており、冠動脈形成術後の再狭窄も高頻度である (Diabetes Care. 2004 ;27(7):1840-16.)。再狭窄のメカニズムとして血管平滑筋細胞の形質転換や増殖が重要であることが報告されている (Cell Signal. 2018; 52: 48-64)。一方、選択的 PPAR $\alpha$  作動薬ペマフィブラート (Pema) は既存のフィブラート系薬剤と比較し PPAR $\alpha$  への結合が特異的であり、種々の遺伝子発現を介して中性脂肪を低下、HDL-C を上昇される薬剤である。既報では PPAR $\alpha$  の活性化は抗動脈硬化作用を持つ可能性が示唆されていることもあり、Pema でも心血管イベントに関する大規模コホート試験 (PROMINENT study) が現在進行している。そこで今回我々は、血管傷害後の新生内膜形成に対する Pema の作用を検討し、In vitro では血管平滑筋細胞への直接的な作用を検討した。

### 【対象と方法】

6 週令の C57BL/6 マウスに通常食 (N=20)、高脂肪食 (N=20) を与え、それぞれのマウスに vehicle (Control 群)、ペマフィブラート 0.1mg/kg/day (Pema 群) を投与し両群の比較を行った。8 週令で左大腿動脈に血管傷害術を施行し、12 週令に傷害血管を摘出し新生内膜と脂質代謝のプロファイルの評価を行った。新生内膜の評価では傷害血管を *Elastica van*

Gieson 染色を行い、内膜と中膜の面積をアナライザーで算出し比較を行った。In vitro の検討ではラット大動脈血管平滑筋細胞を使用しペマフィブラートの影響を検討した。また既存のフィブラート系の薬剤であるベザフィブラートでも同様の検討(In vitro)を行った。

### 【結果】

通常食マウスと高脂肪食マウスの両群において血管傷害術後の新生内膜形成は、Control 群と比較してPema 群で有意に抑制されていた。傷害術後の血管を用い proliferation cell nuclear antigen (PCNA)で免疫染色したところ両群において、Pema 投与により PCNA 陽性細胞数が有意に低下していた。また血清 TG、VLDL-C、インスリンは Control 群に対し Pema 群で有意な低下を認め、HDL-C は上昇を認めた。また、高脂肪食マウスにおいては Pema 投与により血清 FGF21 の有意な上昇を認めた。体重に関しては、高脂肪食マウスにおいて Pema 群で有意な低下を示した。血管傷害術後の新生内膜形成は血管平滑筋細胞の増殖が主体であることを  $\alpha$  SMA の免疫染色によって確認された。ラット大動脈血管平滑筋細胞を用いて in vitro の検討を行ったところ、Pema は用量依存性に有意に血管平滑筋細胞の増殖を抑制した。BrdU assay によって Pema が DNA 合成を抑制していることが解明されたが、アポトーシスは誘導していないことが TUNEL assay によって分かった。フローサイトメトリーを用いた細胞周期の検討において、Pema 投与が G1 期から S 期への移行を抑制していることが分かった。さらに、定量的 RT-PCR と Western blotting により、Pema がサイクリン D1 の発現を抑制することが解明された。以上の結果から、Pema の投与によりサイクリン D1 の発現が抑制されることで細胞周期の G1→S エントリーを阻害し、細胞増殖を抑制していることが検証された。Pema の血管平滑筋細胞増殖抑制作用は PPAR  $\alpha$  をノックダウンさせることで消失したことから PPAR  $\alpha$  を介していることが確認された。一方、PPAR  $\alpha$  作動薬ベザフィブラートでは血管平滑筋細胞増殖抑制作用は認められず、BrdU assay でも DNA 合成も抑制は認められなかった。

### 【結論】

Pema は血管平滑筋細胞の細胞周期の進行を抑制し、細胞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することが解明された。

## 審査の結果の要旨

本論文では、マウス血管傷害モデルを用いて選択的 peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)・作動薬ペマフィブラートの新生内膜肥厚抑制効果とそのメ

カニズムについて検討がなされた。糖尿病患者は心血管イベントのリスクが非常に高いことが知られており、冠動脈形成術後の再狭窄も高頻度である。再狭窄のメカニズムとして血管平滑筋細胞の形質転換や増殖が重要であることが報告されている。ペマフィブラートは既存のフィブラート系薬剤と比較し PPAR アイソフォームの中でも PPAR  $\alpha$  への結合が特異的であり、種々の遺伝子発現を介して中性脂肪(triglyceride: TG)を強力に低下させ、high density lipoprotein-コレステロール(HDL-C)を増加させる薬剤である。既報では PPAR  $\alpha$  の活性化は抗動脈硬化作用を持つ可能性が示唆されている。

本研究では、マウスにおいてガイドワイヤーを用いた大腿動脈血管内皮障害モデルを作製し、新生内膜肥厚に対するペマフィブラートの作用が検討された。6週齢のマウスを①通常食群、②通常食+ペマフィブラート群、③高脂肪食群、④高脂肪食+ペマフィブラート群、の4群に分け、大腿動脈障害モデルを作製した。血管傷害6週後に解析を行ったところ、通常食および高脂肪食のいずれにおいてもペマフィブラート投与群において非投与群に比して血管傷害後の新生内膜肥厚が有意に抑制されていることが見出された。また、ペマフィブラート投与群では、血清 TG は低下し、low density lipoprotein-コレステロール(LDL-C)、HDL-C は上昇を認めた。Fibroblast growth factor (FGF)21 は糖・脂質代謝の改善作用を持つ因子である。申請者らは、高脂肪食群においてペマフィブラート投与によって血中 FGF21 レベルが上昇することを明らかにした。また、ペマフィブラート投与群では血中インスリン濃度が低下しており、これらの結果から、ペマフィブラートは糖・脂質代謝への好ましい作用を持つこと可能性が示された。

次に、増殖した新生内膜は血管平滑筋細胞が主体であることが確認されたため、培養血管平滑筋細胞を用いてメカニズムの検討が行われた。その結果、ペマフィブラートはサイクリン D1 の発現を抑制することで細胞周期の G1→S エントリーを阻害し、用量依存性に細胞増殖を抑制することが明らかになった。以上の結果から、ペマフィブラートは血管平滑筋細胞に対する直接的な作用を介して血管傷害後の新生内膜抑制に寄与している可能性があるとして申請者らは結論づけた。

## 1. 斬新さ

本論文は、ペマフィブラートが PPAR  $\alpha$  作用により血管傷害モデルにおいて新生内膜増殖を抑制することを示した初めての報告である。また、細胞周期に着目し、ペマフィブラートが血管平滑筋細胞増殖を直接的に抑制するという新規性の高いメカニズムを明らかにしており、斬新さを認める。

## 2. 重要性

2型糖尿病患者ではリポ蛋白リパーゼの活性低下に伴い、血中 TG 昇を伴う脂質異常症を示すことが多く、また我が国のレジストリー研究においても、2型糖尿病患者においては冠動脈疾患のリスク因子として TG が LDL-C 同様に高い位置付けになっており、フィブラート製剤の使用が重要視されている。本論文ではペマフィブラートが血管平滑筋の増殖

を抑制することでマウス血管障害モデルにおいて新生内膜肥厚作用を示す可能性が示された。本邦における糖尿病合併脂質異常患者の心血管疾患予防という観点において、ペマフィブラートの使用意義について、重要な知見をもたらした。

### 3. 研究方法の正確性

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。また、本論文は査読を経て国際誌である Heliyon にすでに掲載されており、研究方法の正確性は担保されていると認められる。

### 4. 表現の明確さ

Abstract, Materials and Methods, Results, Discussion, Figure legends の各項目が理論的かつ正確に記載されている。結果に基づいた考察については、過去の論文を十分に検討し、研究結果に対する妥当性のある考察がなされている。

### 5. 主な質疑応答

Q: 血管傷害術を施行したモデルだが、今回は何故、高脂肪食負荷マウスを作成したのか？どのような意図があったのか？

A: 本研究ではガイドワイヤーを用いた大腿動脈傷害モデルを使用したが、ご指摘の通り動脈硬化モデルとは言えないので高脂肪食負荷の意義については議論の余地がある。しかしながら、糖尿病患者において高頻度にみられる脂質代謝異常をマウスで再現するために必要であると考え、高脂肪食負荷を行った。厳密には、動脈硬化モデルを作製する際に高脂肪食負荷を行うのが最適であり、今後の検討課題としたい。

Q: しかし高脂肪食マウスの方が通常食マウスよりも TG、VLDL-C は低いがこれに関してはどのように考えたらよいのか？またそうなった理由は？

A: ご指摘の通り高脂肪食マウスの方が TG や VLDL-C は低い。理由としては炭水化物の量が高脂肪食よりも通常食の方が 2 倍以上多いことが考えられる。また今回 HFD にラード脂が用いられており、ラードは TG が上がりにくいことが報告されている。改善点として 2 型糖尿病モデルである db/db マウスに通常食を与えるなどの変更が必要である。

Q: 同じフィブラート製剤であるベザフィブラートで血管傷害モデルでの検討はしていないのか？ペマフィブラートとの比較をする上で、新生内膜の形成の結果が非常に重要となるのではないかと予想としてはどのような結果になると思うか？

A: ご指摘の通りベザフィブラートでの検討は行っていない。今後の課題とさせていただく。予想としては *in vitro* の結果だけではあるが、ベザフィブラートでは血管平滑筋の増殖抑制は認めていなかったのが新生内膜の形成抑制効果も限定的である可能性が考えられる。

Q: FGF21 に関して血管平滑筋に対する作用は検討しているのか？

A: *in vitro* で FGF21 を投与したが、血管平滑筋の細胞増殖抑制効果はなかった。FGF21 の作用としては体重抑制作用や脂質・糖代謝の改善作用が報告されているので、新生内膜抑制に対して FGF21 依存性のメカニズムも存在する可能性がある。

Q: Figure 1C における Elastica van Gieson 染色の画像は、大腿動脈の分岐部であり内膜肥厚が正常でも起こりやすい部位である。この部位を選択したのは不適切ではないのか？また  $\alpha$  SMA 染色の figure を見る限り、内膜の平滑筋細胞は少なく中膜の平滑筋がほとんどであると考えられる。内膜ではなく中膜の異常が生じた可能性は考えていなかったのか？

A: 画像に関してはご指摘の通りである。また中膜の異常に関しては今回、検討できていなかった部分である今後の課題にしたい。

Q: PCNA 染色の画像に関して、中膜の平滑筋細胞が PCNA 陽性となることは基本的にないと考えられる。血管傷害術後であり内膜、中膜だけでなく外膜も障害されている可能性がある。この画像の PCNA 陽性細胞は内膜なのか、外膜由来なのか？ $\alpha$ -SMA 染色すればより明確になった可能性もあるのではないかと？

A: ご指摘の通りであり、今後の課題にしたい。

Q: Materials and Methods で血管傷害術の施行は 6 週齢と 8 週齢と二つの記載があるがどちらが正しいのか。

A: 正しい記載は 8 週齢になる。

Q: Cell proliferation assay では Figure 3A と 3B では同じ細胞を使用しているのに増殖曲線がコントロール群の比較で増え方に違いがあるようだが、別の実験だからということか？

A: Figure 3A と 3B は独立して実施された実験であり増殖した環境の違いによるものと血

管平滑筋細胞が再現性を得にくい特徴があることも原因として考えられる。

Q: ベザフィブラートでは血管平滑筋の増殖抑制がない理由は？またその他のフィブラート製剤で同様の実験がされているのか？

A: ベザフィブラートとペマフィブラートとの作用機序の違いが理由として考えられる。ペマフィブラートは PPAR $\alpha$  に選択的に作用するのに対してベザフィブラートは PPAR $\alpha$ 、PPAR $\gamma$  にも作用するためターゲット遺伝子が異なる可能性がある。またフェノフィブラートで今回の同じようにマウスでの検討で血管傷害術後の再狭窄を抑制したという論文は報告されている。

Q: ABCA1 や ApoA-I については測定したのか？

A: 今回測定は行っていないが、ペマフィブラート投与に伴う HDL の動態を知る重要な手掛かりとなるため、今後の課題にしたい。

以上の質疑を中心に活発な討議が行われ、申請者は適切に回答した。今後の重要な検討課題が示されたものの、本論文は、ペマフィブラートが PPAR $\alpha$  作用により血管傷害後の新制内膜肥厚抑制を示したという点で新規性のある研究であり、学位論文に値すると評価された。