

主論文の要旨

**Metformin stimulates ischemia-induced
revascularization through an eNOS dependent
pathway in the ischemic hindlimb mice model**

〔 マウス下肢虚血モデルにおけるeNOS活性経路を介した
メトフォルミンの血管新生促進作用に関する研究 〕

名古屋大学大学院医学系研究科 機能構築医学専攻
病態外科学講座 血管外科学分野

(指導：古森 公浩 教授)

高橋 範子

【緒言】

2型糖尿病は、心筋梗塞や脳梗塞、閉塞性動脈硬化症といった重篤な大血管障害の罹患率を上昇させる危険因子の一つである。メトフォルミンは2型糖尿病の経口治療薬として、世界中で広く用いられている。近年の研究において、メトフォルミンは血糖降下作用以外の機序を介する心血管保護作用を有しており、心血管障害による糖尿病関連死の減少に寄与することが報告されている。その他にも、メトフォルミンが血管内皮細胞機能を促進することや、肥満ラットモデルにおいて血管リモデリングを抑制することも知られている。

これらのメトフォルミンの多面的作用(pleiotropic effects)の機序には、AMPKの活性化が関与していることが、多くの研究報告から分かってきた。メトフォルミンは、肝細胞や内皮細胞においてAMPKを活性化する。一方で、AMPKは生体のエネルギーや代謝恒常性の調節を司っており、eNOSのリン酸化を直接的に促進することが知られている。また、AMPK activator(活性化因子)がeNOSのリン酸化を介して血管内皮細胞機能を促進することも報告されている。しかしながら、メトフォルミンの血管新生促進効果に関しては、未だ報告がない。そこで本研究では、マウス下肢虚血モデルを用いて、メトフォルミン投与が虚血組織における血管新生作用に影響を及ぼすか否かを検討した。

【対象及び方法】

野生型マウス(N=20)とeNOS遺伝子欠損マウス(N=10)を、各々メトフォルミン投与群(強制経口投与, 150 or 300mg/kg/day)と非投与群に分類した。メトフォルミン投与開始翌日に、マウス片側下肢虚血モデルを作製した。モデル作製後も引き続き、メトフォルミン投与を28日間連続して行った。体重、血糖値、血中インスリン値を、各々メトフォルミン投与開始前と術後28日目に測定した。血管新生の効果判定として、①レーザードプラ血流解析を用いて術後3, 7, 14, 21, 28日目に計測、②CD31免疫組織染色を用いて毛細血管密度を測定、 α -SMA免疫組織染色を用いて細動脈密度を測定、③Western blot法を用いてAMPKとeNOSのリン酸化率を測定した。

【結果】

メトフォルミン投与は、体重、血糖値、インスリン値のいずれも影響を与えなかった。野生型マウスのメトフォルミン投与群では、術後28日目に虚血肢/健肢血流比が非投与群と比較して有意に改善した(Figure1A, B)。虚血肢の毛細血管密度(Figure2A, B)と細動脈密度(Figure2C, D)に関しても、メトフォルミン投与群の方が有意に高い結果であった。また、術後7日目のメトフォルミン投与群の虚血筋肉組織において、AMPKとeNOSのリン酸化の増強が確認された(Figure3A, B)。

一方eNOS遺伝子欠損マウスでは、虚血肢/健肢血流比は両群間で有意差を認めなかった(Figure4A)。また野生型マウスと比べて下肢虚血の程度が重症であったこ

とから、臨床スコアを用いた比較評価も行ったが、両群間の差は認めなかった (Figure4B)。虚血肢の毛細血管密度 (Figure4C) と細動脈密度 (Figure4D) に関しても、両群間で差は認めなかった。すなわち、eNOS遺伝子欠損マウスにおいては、メトフォルミン投与による下肢虚血後の血管新生促進作用は認めなかった。一方、AMPKのリン酸化に関しては、メトフォルミン投与群の方が非投与群と比べて有意に増強していた (Figure4E)。

【考察】

野生型マウスのメトフォルミン投与群では、虚血肢の血流が改善し、毛細血管密度と細血管密度が増加することがわかった。また、虚血筋肉組織におけるAMPKとeNOSのリン酸化の増強が確認された。しかし、一方でeNOS遺伝子欠損マウスにおいては、メトフォルミン投与による虚血肢の血流改善や、毛細血管と細血管密度の増加は認めなかった。このことから、メトフォルミン投与による虚血肢の血流改善効果と血管新生効果には、eNOSの活性化が関わっていると考えられた。

2型糖尿病は、心筋梗塞や脳梗塞、閉塞性動脈硬化症といった重篤な大血管障害の罹患率を上昇させる危険因子の一つであり、その機序としては、虚血状態下で細小血管が障害され、側副路血管の発達が抑制される事が知られている。一方、本研究ではメトフォルミン投与により虚血組織における血管新生効果が増強されたことから、メトフォルミンが糖尿病関連血管障害疾患を改善する効果を有する可能性が示唆されたと言えるであろう。

メトフォルミンはAMPKを活性化し、血管内皮細胞におけるeNOSの活性化を促すことがすでに報告されている。また、我々は過去にAMPKの活性化が虚血肢の血管新生を促進するという報告をしている。すなわち今回、eNOS遺伝子欠損マウスの虚血筋肉組織においてAMPKが活性化していたにも関わらず、メトフォルミン投与による血流改善を認めなかったことを考え合わせると、メトフォルミンの血管新生効果は、AMPK/eNOS依存経路の活性化を介していると考えられた。

【結語】

メトフォルミン投与により、野生型マウス下肢虚血モデルにおける虚血肢の血流は改善した。その機序としては、AMPK/eNOS依存経路の活性化により、血管新生効果が増強されることが考えられた。本研究により、メトフォルミンはその血糖降下作用に加えて、虚血組織における血管新生促進作用を有しており、虚血性動脈疾患の病態を改善する効果が期待されることが示唆された。