

主論文の要旨

Dipeptidyl Peptidase 4 Inhibition Alleviates Shortage of Circulating Glucagon-Like Peptide-1 in Heart Failure and Mitigates Myocardial Remodeling and Apoptosis via the Exchange Protein Directly Activated by Cyclic AMP 1/Ras-Related Protein 1 Axis

蛋白分解酵素 Dipeptidyl Peptidase 4 活性阻害は心不全時の
インクレチンホルモン欠乏の改善を介して、EPAC1/Rap1 依存性に
心臓リモデリングとアポトーシスを改善する

名古屋大学大学院医学系研究科 分子総合医学専攻
病態内科学講座 循環器内科学分野
(指導：室原 豊明 教授)

青山 盛彦

【緒言】

近年糖尿病治療薬の中には糖尿病患者の心臓血管合併症を改善する可能性を示唆した前臨床試験あるいはメタ解析レベルでの報告が散見される。Dipeptidyl peptidase-4 (DPP4)阻害剤は日本国内外で最も使用頻度の高い薬剤であり、その血糖降下作用はインクレチンホルモンの一つである Glucagon-like peptide-1 (GLP-1)の分解抑制を介して血糖低下ホルモンインスリンの分泌を促進することにある。

DPP4 阻害剤および GLP-1 は、前述の通り心臓血管保護作用を有することが前臨床試験あるいは探索的臨床試験の結果から報告されているが、興味深いのは、この効果が糖尿病状態における高血糖改善による間接作用以外の効果を介する可能性が示唆されていることである。

一方で、2013 年 DPP4 阻害剤の一部に心不全症状を悪化させるリスクがあることが無作為大規模臨床試験で報告され物議を醸したが、その病理病態メカニズムは不明のままであった。本研究では、この臨床試験では解明できない clinical question に一石を投じる分子機序を明らかにすべく、DPP4 阻害剤/インクレチンホルモンが心不全状態にどのような効果をもたらすかを非糖尿病状態の心不全モデルを用いて検証した。

【対象及び方法】

非糖尿病 14 週齢オス C57BL6 マウスに対し圧負荷手術を実施し心不全モデルを作成した[大動脈縮窄(transaortic constriction)モデル：以下 TAC]。TAC に対して、DPP4 阻害薬(Alogliptin、以下 ALO)または GLP-1 または GLP-1 の不活型アナログ (Ex9-39)を投与し、心機能・心臓組織変化を生理学的(心臓超音波検査)・組織生化学的手法[線維化染色・心臓リモデリング関連シグナル活性評価(PKA, EPAC, Rap1)・心筋アポトーシス評価(TUNEL 染色)]で評価した。さらに心筋細胞への GLP-1 の直接効果を調べるために、ラット培養心筋細胞を使用して GLP-1 シグナルのセカンドメッセンジャーである cAMP、さらにはその下流制御分子である PKA または EPAC1/Rap1 への効果を各分子の RNA サイレncingを用いて、心筋細胞アポトーシスの点において評価した。

【結果】

圧負荷心不全モデルでは、既出の報告通り、4 週間の圧負荷により心肥大ならびに心臓線維化(すなわち心臓リモデリング)と収縮機能低下が誘発された。ALO 投与により、圧負荷心不全において観察される特徴的な心臓リモデリングと心収縮能低下は有意に軽減した (Table1, 2)。心筋リモデリング制御分子[Akt/mTOR/S6K 系、ミオシン重鎖(MYH7)・心臓サルコメア構成蛋白(ホスホランパン)]は圧負荷心不全心筋において異常をきたすが、ALO 投与によりいずれも改善が認められた (Figure1)。心臓リモデリングを免疫組織化学染色により評価したところ、圧負荷により誘発された心筋細胞の肥大と心筋細胞面積あたりの血管内皮細胞数をあらかず毛細血管密度の低下は、ALO 投与により改善を認めた (Figure3 A-C)。また、ピクロシリウスレッド染色に

より心臓線維化を評価したところ、圧負荷により誘導された心臓線維化は、ALO 投与により改善した (Figure3 D-E)。

これらの ALO による心不全改善効果が、ALO 本来の作用である GLP-1 増加作用を介するか否かを検証する為に、上記のモデルマウスにおける循環血漿中の GLP-1 濃度を測定したところ、予想外に、TAC モデルでは循環血漿中の GLP-1 濃度の顕著な低下を認め、これは ALO 投与により改善していた (Figure2 A)。

膵β細胞において GLP-1 は GLP-1 受容体を活性化し、そのシグナルはセカンドメッセンジャー環状 AMP (cAMP)の上昇と cAMP 依存性シグナル分子[プロテインキナーゼ A(PKA)や Exchange Protein Directly Activated by Cyclic AMP 1(EPAC1)]の活性化を介して細胞機能を制御することが知られている。一方、心筋細胞でも同様の制御機構が存在するか否かは不明であった。そこで、本研究において心筋内 cAMP 濃度を測定したところ、GLP-1 の上昇傾向と一致して心筋中の cAMP 濃度の増加を認めた (Figure2 B)。さらに cAMP エフェクターである PKA 活性と EPAC1 の発現変化を評価したところ、ALO 投与により、GLP-1/cAMP 濃度の変化傾向と一致した活性や発現増強が認められた (Figure4 E-F)。

圧負荷心不全のもう一つの特徴として、心筋アポトーシスの増加が知られている。本研究においても心筋組織の TUNEL 染色をおこない心筋アポトーシスへの ALO の効果を評価したところ、圧負荷により増強した心筋細胞アポトーシスは、ALO 投与により抑制された (Figure4 A-B)。心臓組織におけるアポトーシス関連シグナルの変化を調べたところ、圧負荷により増強したアポトーシス制御蛋白 Cleaved-caspase3 は ALO 投与により抑制され、逆に抗アポトーシス制御分子である Bcl-2 の発現は ALO 投与により増強していた (Figure4 C-D)。

このように ALO/GLP-1 系は、cAMP シグナリング活性化を介して心筋の細胞死を抑制し、心機能や心リモデリングの改善作用を示すことが示唆された。従って次に、cAMP の下流にある PKA/EPAC1 のどちらが心筋細胞内シグナリングにおいて重要なのか検証するために、in vitro で GLP-1/cAMP pathway の心筋細胞死への効果を評価した。培養心筋細胞に対して、GLP-1R agonist であるエキセナチドを直接投与し、PKA 阻害剤の有無の条件下で心筋アポトーシス変化を検証したところ、エキセナチドは PKA 阻害には関わらず心筋細胞のアポトーシスを抑制した (Figure5 A)。そこでラットの培養心筋細胞に対して RNA サイレンシング(siRNA)により PKA または EPAC をノックダウンし、GLP-1 の心筋細胞死抑制効果における PKA/EPAC の役割を検証した。エキセナチドの投与により TUNEL 陽性の心筋細胞数の低減を認めたが、これは PKA に非依存的であり、EPACsiRNA による EPAC 発現抑制においてのみ、エキセナチドによる心筋細胞アポトーシス抑制効果が拮抗された (Figure5 B-C)。さらに、同心筋細胞におけるアポトーシス抑制関連蛋白 Bcl-2 の発現変化も、PKA 非依存性/EPAC 依存性であることが確認された (Figure5 D-G)。

EPAC1 は cAMP 依存性 guanine nucleotide exchange factor として特異的に低分子量 G たんぱく質; Rap1 を活性化することが知られている。本研究の EPAC1 活性

変化における下流シグナル活性化の関与を検証するため、上述の培養心筋細胞における Rap1 活性化の変化を Rap1 特異的プルダウンアッセイにて評価した。Rap1 活性は cAMP 濃度依存性で、Rap1 活性が高いほど心筋細胞死は抑制されていた (Figure 6 A-B)。RNA サイレンシングを用いた比較解析の結果、Rap1 の活性化は PKA 非依存性で、cAMP/EPAC1 に依存性であることが明らかとなった (Figure 6 E-F)。

【考察】

DPP4 阻害剤 ALO は非糖尿病状態の圧負荷誘発性心不全における心機能低下ならびに心臓リモデリングを改善した。その機序の一つとして、同心不全状態において観察された循環血漿中の活性型 GLP-1 濃度の病的低下の改善を介した心筋細胞内 cAMP 濃度の正常化が関与することを明らかにした。本研究で初めて、圧負荷誘発性心不全状態では血漿中 GLP-1 濃度が減少すること、この減少が心不全時の心筋細胞死の原因になるという病的意義を有すること、また DPP4 阻害剤は心不全時の病的 GLP-1 濃度低下に対する改善効果を有することを明らかにした。更に GLP-1 には膵細胞における作用と同様に心筋細胞においても cAMP シグナリングを活性化すること、cAMP シグナリングが心不全時に見られる心筋アポトーシスの制御に関与すること、その制御分子は従来想定されていた A キナーゼではなく、EPAC1/Rap1 経路であることを明らかにした。

以上のごとく、本研究において我々は、心不全における心筋細胞死(アポトーシス)を制御する新たな責任メカニズムとして、インクレチンホルモン GLP-1/EPAC1/Rap1 シグナルの役割を明らかにした。この成果は、GLP-1 製剤や DPP4 阻害剤が、糖尿病とは独立して心不全における新たな治療効果を有することを明らかにし、GLP-1 の血中濃度変化が新たな心不全病態診断評価の指標となり得ること、さらには EPAC1/Rap1 シグナルへの介入が、心不全における心筋アポトーシス抑制を目指した新たな治療薬開発へ展開されることを期待する。

【結語】

DPP4 活性阻害は圧負荷誘発性心不全状態におけるインクレチンホルモン欠乏を改善し、環状 AMP/Rap1 分子活性化を介して心筋のリモデリングやアポトーシスを改善した。