

主論文の要旨

**Chronic Psychological Stress Accelerates Vascular
Senescence and Impairs Ischemia-Induced
Neovascularization: The Role of Dipeptidyl
Peptidase-4/Glucagon-Like Peptide-1-Adiponectin Axis**

慢性情動ストレスによる血管老化の促進および虚血性血管新生の
抑制機構: 特にジペプチジルペプチダーゼ-4/グルカゴン
様ペプチド-1-アディポネクチン軸の役割について

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻
発育・加齢医学講座 地域在宅医療学・老年科学分野
(指導: 葛谷 雅文 教授)

朴 麗梅

【緒言】

社会環境の変化と発展に伴い、慢性情動ストレス (chronic psychological stress, CPS) は大きな社会問題になっている。血管を老化させる 3 大リスク因子 (運動不足・不適切な食事・ストレス) はよく知られているが、その中でもストレスは制御し難い因子であり、以前よりストレスが心血管疾患のリスク因子であることは知られていたものの、その機構自体は未だ明らかでなく、早急な解決が望まれる重要な課題である。近年、ストレスによるホルモン (インスリン様成長因子) の発現低下、糖代謝異常、さらには血管老化の促進や血管病の発症との関連性が報告されている。グルカゴン様ペプチド-1 (GLP-1) は、1983 年に同定された消化管ホルモンで、消化管に入った炭水化物を認識して消化管粘膜上皮から分泌され、膵臓 β 細胞からのインスリン分泌を促進する。近年、GLP-1 やその受容体作動薬が、一酸化窒素 (NO) を介する抗炎症作用、心房性ナトリウム利尿ペプチドを介する降血圧作用ならびに心血管保護作用などの多面的効果を有することが明らかにされつつある。一方 Dipeptidyl Peptidase-4 (DPP-4) はインクレチンの不活化に関与する酵素で、細胞膜上をはじめ可溶性タンパク質として血液中にも存在している。さらに、糖尿病動物モデルにおける DPP-4 活性亢進による組織内 GLP-1 低下と心筋障害と血管新生低下との関係が証明されている。しかし、ストレスによる生体内 GLP-1 ホルモン合成・分解のバランスおよびシグナル活性化への影響、さらにそれらの血管への影響については不明であり、本研究では特に血管の老化および虚血組織における新生血管形成への影響にターゲットを絞り検討した。

【方法】

マウス 本研究では、チューブ型拘束ストレスモデルを用い、マウス (C57BL6j) に 4 時間のストレス負荷 (その間絶飲絶食) を週 7 回、4 週間実施した後、下肢虚血モデルを作成し (ストレス群)、非ストレス群 (マウスケージ内自由摂水と摂食) と経時的にサンプルを採集し、血管老化と虚血性血管新生形成の比較を実施した。さらに、上記のストレス負荷 4 週間後に下肢虚血モデルを作成した後、対照群 (ストレス + 溶媒のみ、Stress 群、蒸留水 200 μ L/回)、ストレス + DPP4 阻害剤 (anagliptin) 低用量群 (S-DL 群, 30mg/kg/day 経口投与) とストレス + DPP4 阻害剤高用量群 (S-DH 群, 60mg/kg/day 経口投与) の 3 群に分けて、下肢血流変化を測定するとともに、骨格筋、血液と骨髄を採集して生化学ならびに組織学的検討を行った。また、ストレス負荷 4 週間後に下肢虚血モデルを作成した後、GLP-1 受容体作動薬であるエクセナチド (5 μ g/kg, 2 回/day) 投与による血管保護効果の解析を実施した。さらに、DPP4 遺伝子欠損ラット (F344/DuCrj) と野生型ラット (F344/Jcl) に拘束ストレス負荷 4 週間後に下肢虚血モデルを作成し両群を比較した。すべての動物実験は、名古屋大学における動物実験等に関する取扱い規定に則って実施した。

遺伝子ならびにタンパク質発現の評価 術後 (大腿動脈結紮) 4 日目に両側 (虚血と非虚血) の下肢骨格筋を採取し、mRNA を抽出し、RT-PCR 法を用いターゲット遺伝子発現を定量した (ターゲット遺伝子プライマー配列: Table 1)。内在性コントロール

として GAPDH を用いて補正を行った。1つのサンプルをトリPLICATEで検討した。さらに、骨格筋のタンパク質を抽出し、ウェスタンブロッティングを実施した。

ELISA および生化学分析 術後4日目（もしくは21日目）の末梢血（血漿）を用い、血糖、血中脂質、GLP-1、DPP4、神経ホルモン（コルチコステロン）ならびにアディポネクチン（adiponectin, APN）を測定した。

免疫組織化学分析 術後4日目（炎症細胞浸潤検討：マクロファージ染色）と14日目あるいは21日目に両側の下肢骨格筋（毛細血管密度検討：CD31 と Tomato lectin 染色）の新鮮凍結組織より4 μ m薄切切片を作成し実施した。

血管老化解析 術後14日目（ラット）あるいは21日目（マウス）に大動脈を採取し、 β ガラクトシダーゼ（ β -galactosidase）染色を行い、定量評価を実施した。

骨髄内皮前駆細胞動員解析 術後4日目、実験群から骨髄および末梢血を採取し、赤血球を塩化アンモニウムで溶解し遠心後、得られた細胞を c-Kit および CD31 抗体を用いてフローサイトメトリーにより内皮前駆細胞（CD31⁺/c-Kit⁺）の分析を行った。

ゼラチン・ザイモグラフィ 頸動脈から抽出した蛋白質20 μ gを非還元剤サンプル溶液と反応させ、1 mg/mlのゼラチン含有10%SDS-PAGEにて電気泳動を行った。SDSを除去し、pH7.4の反応液で24時間反応させた後、Coomassie Brilliant Blue 染色と定量を行った。

細胞培養ならびに増殖、遊走、浸潤能の評価 マウスとラット骨髄から c-Kit⁺細胞を単離し、血清下で培養後、細胞の増殖能は MTS 法を用い、遊走、浸潤能はトランスウェルを用い検討した。

統計解析 データは平均 \pm SEMとして表した。2群間の比較は t 検定を用い、3群及びそれ以上の比較には、One-way ANOVA（Tukey post hoc tests）法で、SPSS ソフトウェアバージョン 17.0（SPSS 社、Chicago、IL）を用いて統計解析を行った。P 値<0.05を有意差ありと判断した。

【結果】

ストレス群では非ストレス群に比べて、体重、皮下脂肪ならびに内臓脂肪が有意に低下するとともに、血中と組織内 DPP-4 活性が増加する反面、血中 GLP-1 レベルと脂肪組織における APN 発現の有意な低下、ならびに虚血後下肢の血流回復と毛細血管形成の著明な低下が認められた（Fig.1）。組織学的な解析では、虚血組織における炎症性マクロファージの浸潤亢進、大動脈老化ならびに動脈リング由来血管新生の低下が認められた（Fig.2）。生化学による解析では、虚血骨格筋ならびに血管組織において p-AMPK、PPAR- γ 、PGC-1 α 、血管内皮成長因子（VEGF）、サーチュイン（Sirtuin1）、インスリン受容体基質1（IRS-1）ならびにグルコーストランスポーター（GLUT-4）の蛋白/遺伝子発現が、ストレス群で有意に減少した（Fig.3, Table 2）。また、CD31 抗体（内皮細胞の表面マーカー）と c-Kit 抗体（体性幹細胞の表面マーカー）を用いたフローサイトメトリー解析では、ストレス群で CD31⁺/c-Kit⁺内皮前駆細胞数が骨髄と末梢血において低下していた（Fig.4A）。内皮前駆細胞を解析したところ、細胞機能（運動能、

浸潤能、増殖能および管腔形成能)の低下とアポトーシスの亢進を認めた (Fig.4B)。さらに、虚血骨格筋における炎症性マクロファージの浸潤やマトリックスメタロプロテイナーゼ-2 (matrix metalloproteinase-2, MMP-2) /MMP-9 活性の亢進も認められた (Fig.5)。ストレスが生体内 GLP-1 ホルモン合成・分解バランス破綻および下流のシグナル活性化の減弱と血管老化および血管病発症・増悪との関係を明らかにするために以下の実験を行った。

ストレス単独群 (対照群)、S-DL 群と S-DH 群) 3 群に分けた実験で、S-DL 群と S-DH 群ではマウス血漿 GLP-1 レベルと脂肪組織における APN 発現および分泌が有意に改善した (Fig.6A-D)。これに伴い、両治療群の虚血骨格筋組織と大動脈組織において、炎症性細胞浸潤と上記の蛋白・遺伝子発現低下が有意に改善した (Fig.6E-G)。骨髓ならびに末梢血の CD31⁺/c-Kit⁺内皮前駆細胞数と機能不全についても改善が確認された (Fig.7)。その結果、血管老化および血管新生に著明な改善が認められた (Fig.8)。DPP4 遺伝子欠損ラットにおいても DPP4 阻害剤治療と同様な血管保護効果が示された (Fig.9/10)。

さらに、ストレス負荷と下肢虚血モデルを作成したマウスに、GLP-1 受容体作動薬であるエクセナチドを投与したところ、脂肪組織における APN 遺伝子発現レベル (定量 PCR 解析) が有意な改善を示した (Fig.11A/B)。その結果、虚血骨格筋と大血管においても上記の蛋白・遺伝子発現低下の回復に伴い、悪化した血管老化と血管新生における改善が認められた (Fig.11C-D/12)。

最後に、DPP4 阻害剤介入による血管保護効果の分子メカニズムを探るため、APN 遺伝子欠損マウス (APN^{-/-}) を用いたところ、APN^{-/-}では、非治療群と比較して、DPP4 阻害剤投与群で慢性ストレスによって低下した p-AMPK、PPAR- γ ならびに PGC-1 α 蛋白レベルと骨髓 CD31⁺/c-Kit⁺細胞動員、機能不全における改善が認められなかった (Fig.13/14)。

【考察】

本研究結果により、慢性心理的ストレスによる血管老化と血管新生低下は、DPP-4 活性亢進による GLP-1 分解と APN 発現低下、またそれを介する AMPK-PPAR- γ /PGC-1 α シグナル経路活性化の低下と深く関係することが証明された。また、DPP4 阻害薬あるいは GLP-1 受容体作動薬は、ストレスによって低下した APN 発現低下を改善させ、AMPK-PPAR- γ /PGC-1 α シグナル経路が活性化し、血管老化と血管新生再生不全を著明に改善させた。以上の結果は、上記の薬物療法がストレス性血管障害の治療法となりうる可能性が示唆された。

【結語】

本研究結果により、慢性ストレスに伴う血管老化および血管再生能低下の一つの機序を明らかにすることができた。