

主論文の要旨

**A novel selective PPAR α modulator, pemafibrate
promotes ischemia-induced revascularization
through the eNOS-dependent mechanisms**

〔新規選択的 PPAR α モジュレーター、ペマフィブラートは、
eNOS を介して虚血後の血流回復を促進する〕

名古屋大学大学院医学系研究科 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)

河西 宏

【緒言】

心血管病は世界的に主要な死因の一つであり、肥満から生じる代謝異常である 2 型糖尿病や脂質異常症は、心血管病の直接の危険因子であるばかりでなく、虚血時の側副血行路生成を障害し、心血管病をさらに増悪させることが報告されている。

ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体 (PPAR) α は、リガンド活性化転写因子の核内受容体スーパーファミリーの一つであり、脂質およびリポタンパク質代謝に重要な影響を及ぼす。PPAR α アゴニストは、血中中性脂肪の低下、HDL コレステロールの上昇だけでなく、血管新生などの心血管ホメオスタシスの調節に様々な役割を果たすことが報告されている。

ペマフィブラートは新規選択的 PPAR α モジュレーター (SPPARM α) であり、既存の PPAR α アゴニストよりも高い PPAR α アゴニスト活性と選択性を持ち、アテローム性動脈硬化症のマウスモデルにおいて、脂質異常症の改善、アテローム性動脈硬化性病変の減少が報告されている。しかし、虚血性血管疾患に対するペマフィブラートの作用は知られておらず、本研究では、マウス下肢虚血モデルにおいてペマフィブラートの血流回復への作用を検討した。

【対象および方法】

6 週齢の雄の野生型 (WT) または内皮型一酸化窒素合成酵素 (eNOS) ノックアウト (eNOS-KO) マウスに、ペマフィブラート (0.12 mg / kg / 日) 含有食、または通常食を 8 週間与えた。10 週齢時に WT または eNOS-KO マウスの左大腿動脈と静脈を除去し、下肢虚血モデルを作成した。手術直前と術後 3、7、14、28 日目にレーザードップラー血流アナライザーで下肢血流を測定した。また大腿内転筋内の毛細血管密度を抗 CD31 抗体で染色し、免疫組織化学的に分析した。一部の実験では FGF21 を発現するアデノウイルスベクター (Ad-FGF21)、もしくはコントロールベクター (Ad- β galactosidase) を WT マウスに静脈内注射し、3 日後に同様に下肢虚血モデルを作成した。

細胞実験としては、ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) を用い、正常酸素または低酸素条件下で、ペマフィブラート、FGF21、対照物質を添加し、その作用を解析した。内皮機能は、マトリゲル上での管腔形成能、トランスウェルを用いた遊走能、MTS アッセイによる細胞増殖能により評価した。低酸素状態は、AnaeroPack を用いて作成した。タンパク発現レベルはウエスタンブロット分析を用いて定量化し、遺伝子発現レベルは定量的 PCR 法を用いて評価した。

統計解析は、Student's t-test もしくは分散分析 (Post-hoc, Tukey's test) で評価し、P 値 < 0.05 を統計的有意差があると判断した。

【結果】

ペマフィブラート食の WT マウスでは通常食のマウスと比較して、レーザードップラーで評価した血流回復が有意に促進していた (Fig. 1A, B)。解剖後に虚血肢の骨格筋

で組織学的検討を行い、CD31 陽性の血管内皮細胞密度の増加も認めた(Fig. 1C)。培養血管内皮細胞 (HUVEC) にペマフィブラートを添加すると、マトリゲル上での管腔形成能、トランスウェルでの遊走能、増殖能とも促進した(Fig. 2)。また虚血肢骨格筋において eNOS のリン酸化亢進を認め(Fig. 3D)、HUVEC でもペマフィブラート添加により、eNOS リン酸化が亢進していた(Fig. 3A)。NOS 阻害剤 NG-ニトロ-L-アルギニンメチルエステル (L-NAME)、及び PPAR α 阻害剤 GW6471 により、HUVEC での管腔形成能と遊走能がキャンセルされ(Fig. 3B, C)、eNOS-KO マウスにペマフィブラート食を与えても、WT マウスで認めた血流改善作用を認めなかったことより(Fig 3E)、ペマフィブラートは、内皮細胞での PPAR α /eNOS シグナルを介して、血管内皮機能を促進することが示唆された。

WT マウスへのペマフィブラート投与により、PPAR α 下流遺伝子である線維芽細胞成長因子 (FGF) 21 の血中濃度、及び肝臓での遺伝子発現が増加し(Fig. 4A, B)、虚血後の血流回復(Fig. 4D)、毛細血管密度(Fig. 4E)、虚血肢の eNOS リン酸化も亢進していた(Fig. 6E)。HUVEC においても、FGF21 タンパク添加により、管腔形成能、遊走能、増殖能が増加し(Fig. 5)、eNOS リン酸化亢進(Fig. 6A)を認めた。これらの作用は L-NAME による eNOS シグナルの阻害により、全てキャンセルされ(Fig. 6B, C, D)、さらに eNOS-KO マウスへの Ad-FGF21 の投与は、WT マウスで認めた虚血肢の血流改善作用を認めなかったことより(Fig. 6F)、ペマフィブラートは血管内皮への直接作用に加え、FGF21/eNOS シグナルを介して血管内皮機能を促進することも示唆された。

【考察】

ペマフィブラートは、WT マウスの下肢虚血モデルにおいて血流回復を促進し、正常または低酸素条件下での HUVEC の管腔形成、遊走、増殖を促進した。HUVEC に対するペマフィブラートの効果は、PPAR α 阻害によりキャンセルされ、ペマフィブラートが PPAR α 依存的に効果発現する事を示している。また、FGF21 は PPAR α の標的遺伝子であるが、ペマフィブラートは HUVEC における FGF21 の発現に影響を与えず、ペマフィブラートが FGF21 誘導とは独立した PPAR α シグナル伝達メカニズムにより、内皮機能を直接調節する事を示唆している。

ペマフィブラートは、FGF21 の肝臓での遺伝子発現、及び血中濃度の有意な増加をもたらした。FGF21 は代謝と心血管機能の多機能レギュレーターとして機能し、インスリン感受性と高中性脂肪血症を改善する。また動脈硬化易発症マウスモデルを用いた検討では動脈硬化抑制作用を示し、心筋梗塞モデルにおける心筋リモデリングを軽減する事が報告されている。本研究においても FGF21 の全身投与は、WT マウスでの虚血後の血流回復を増強し、培養血管内皮細胞においても内皮機能を改善することより、ペマフィブラートは FGF21 血中濃度の上昇を介しても心血管病に有益な作用を及ぼす可能性が示唆される。

eNOS が内皮機能および血管新生反応の調節に極めて重要な役割を果たす事はよく

知られており、本研究でもペマフィブラートと FGF21 の血管新生促進効果が eNOS 依存的である事が示された。しかしペマフィブラートと FGF21 は虚血肢骨格筋組織においてのみ eNOS リン酸化を亢進し、毛細血管密度も虚血肢のみで増加した。一方で、培養血管内皮細胞では、ペマフィブラートが正常酸素状態と低酸素状態の両方で内皮細胞機能を促進する事を示しており、非虚血肢においてペマフィブラートが eNOS リン酸化と内皮機能に影響しない理由については今後の研究課題である。

【結論】

本研究では、新規選択的 PPAR α 作動薬であるペマフィブラートが、血管内皮細胞への直接作用、及び FGF21 を介した作用により、虚血後の血流回復を促進することを世界に先駆けて報告した。これにより、ペマフィブラートは閉塞性動脈硬化症の予防、または治療に有益な薬剤である可能性が示された。