

平成29年9月29日

## ストレスによる血管新生低下機序の解明と治療応用

名古屋大学大学院医学系研究科（研究科長・門松健治）地域在宅医療学・老年科学の朴麗梅（ぼく れいめい）大学院生、名古屋大学未来社会創造機構モビリティ部門人間・加齢特性グループの成憲武（せい けんぶ）特任准教授、葛谷雅文（くずや まさふみ）教授、名古屋大学大学院医学系研究科循環器内科学の柴田玲（しばた れい）特任准教授、室原豊明（むろはら とよあき）教授らの研究チームは、実験動物モデルを解析して、慢性情動ストレス（chronic psychological stress, CPS）が血管新生を低下させる機序を明らかにしました。

CPSは、心血管病のリスク・ファクターであることが広く知られています。しかし、CPSが血管新生を悪化させる分子メカニズムは、ほとんど明らかになっていません。

本研究では、ジペプチジルペプチダーゼ-4 (DPP4)<sup>\*1</sup>/グルカゴン様ペプチド-1 (GLP-1) 軸<sup>\*2</sup>の役割に着目し、拘束ストレスモデルを用いて解明を目指しました。

拘束ストレス負荷の状況下では、血中と組織内でジペプチジルペプチダーゼ-4が活性され、グルカゴン様ペプチド-1の分解亢進とアディポネクチン (APN)<sup>\*3</sup>発現低下が起こることにより、虚血骨格筋ならびに血管組織において炎症浸潤亢進と p-AMPK<sup>\*4</sup>-PPRA- $\gamma$ /PGC-1 $\alpha$ <sup>\*5</sup>経路活性化が抑制され、①虚血下肢血流回復と毛細血管密度の低下、②大動脈老化と血管内皮由来血管管腔形成の低下、③骨髄由来内皮前駆細胞<sup>\*6</sup>動員ならびに機能不全惹起が明らかになりました。これらの変化は、DPP4 遺伝子欠損/薬理的抑制あるいは GLP-1 アナログ投与により改善しましたが、APN 遺伝子欠損では、その効果が抹殺されました。

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が明らかとなり、情動ストレス性心血管病発症のメカニズムの解明および予防法の開発が進むものと期待されます。

本研究成果は、「Journal of the American Heart Association」（2017年9月28日の電子版）に掲載されました。

## ストレスによる血管新生低下機序の解明と治療応用

### ポイント

- 慢性情動ストレス（chronic psychological stress, CPS）が、血管老化と虚血性血管新生に対して及ぼす影響およびその機序に関して、マウス拘束ストレスモデルを用いて解明しました。
- CPSによる血管老化と虚血性血管新生低下を認めました。
- CPSによる血管老化と血管新生低下の分子機構として、ジペプチジルペプチダーゼ-4（DPP4）の活性増加によるグルカゴン様ペプチド-1（GLP-1）分解亢進と、これによるアディポネクチン（APN）の発現および分泌の低下に伴う AMPK-PPRA- $\gamma$ /PGC-1 $\alpha$  シグナル経路活性化の低下が深く関与することが明らかになりました。
- DPP4 遺伝子欠損/阻害薬（anagliptin）あるいは GLP-1 受容体作動薬（exenatide）は、CPS ストレスによって増悪する血管老化と血管新生低下を著明に改善させるものの、その効果は APN 遺伝子欠損により、ほぼ完全に抹殺されました。
- 本研究により、血中の DPP4、GLP-1、APN の三者の変化をモニターすることで CPS が存在することを早期から探知し、介入治療を行ってストレス性心血管病を予防・抑制できるという、ストレスを感じることの多い現代人にとってこそ重要な可能性が示されました。

### 1. 背景

社会環境の変化と発展に伴い、CPS は大きな社会問題になっています。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）はよく知られていますが、その中でもストレスは制御し難い因子であり、「ストレス性血管老化およびそれに伴う心血管疾患発症増悪」の解明は、現在、医学と医療においても早急な解決が望まれる重要な課題です。

近年、ストレスによるホルモン（インスリン様成長因子）の発現低下ならびに代謝異常と血管老化、また、それに伴う血管病発症悪化の関連性が報告されています。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  $\beta$  細胞からのインスリン分泌を促進します。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ります。一方 DPP-4 は、インクレチンの不活化を行う酵素で、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ます。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が証明されています。しかし、ストレスによる生体内 GLP-1 ホルモンの合成分解バランスの破綻およびシグナル活性化の減弱が、血管老化および血管病発症増悪を促進させるかに関しては不明のままです。

## 2. 研究成果

研究チームは、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（禁摂水と摂食）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、比較を行いました。その結果、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蔵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 発現および分泌が有意な低下をきたし、虚血下肢血流回復と毛細血管形成が著明に低下することが認められました。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<sup>\*7</sup> 浸潤亢進、大動脈老化ならびに動脈リング由来血管新生低下が認められました。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、PPRA- $\gamma$ 、PGC-1 $\alpha$ 、血管内皮成長因子（VEGF）<sup>\*8</sup>、サーチュイン（Sirtuin1）<sup>\*9</sup>、インスリン受容体基質 1（IRS-1）<sup>\*10</sup> ならびにグルコーストランスポーター（GLUT-4）<sup>\*11</sup> の蛋白/遺伝子発現が、CPS 群で有意に減少することが明らかになりました。また、CD31 抗体（内皮細胞の表面マーカーとして知られています）と c-Kit 抗体（様々な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<sup>\*12</sup>を行ったところ、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ることが明らかになりました。さらに、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）低下とアポトーシス亢進が認められました。そこで、「ストレスが生体内 GLP-1 ホルモンの合成・分解バランス破綻およびシグナル活性化の減弱をきたして、血管老化および血管病発症・増悪を促進させるのではないか」という仮説をたてて、次の介入実験を行いました。

実験では、まず、上記のストレス負荷 4 週間と下肢虚血モデルを作成した後、ストレス+溶媒群（Stress 群、蒸留水 200  $\mu$  L/回）、ストレス+DPP4 阻害剤（anagliptin）低用量群（S-DL 群、30mg/kg/d 経口投与）とストレス+DPP4 阻害剤高用量群（S-DH 群、60mg/kg/d 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検討を行いました。その結果、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ました。これに伴い、両治療群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な改善を示しました。骨髄ならびに末梢血の 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ました。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ました。

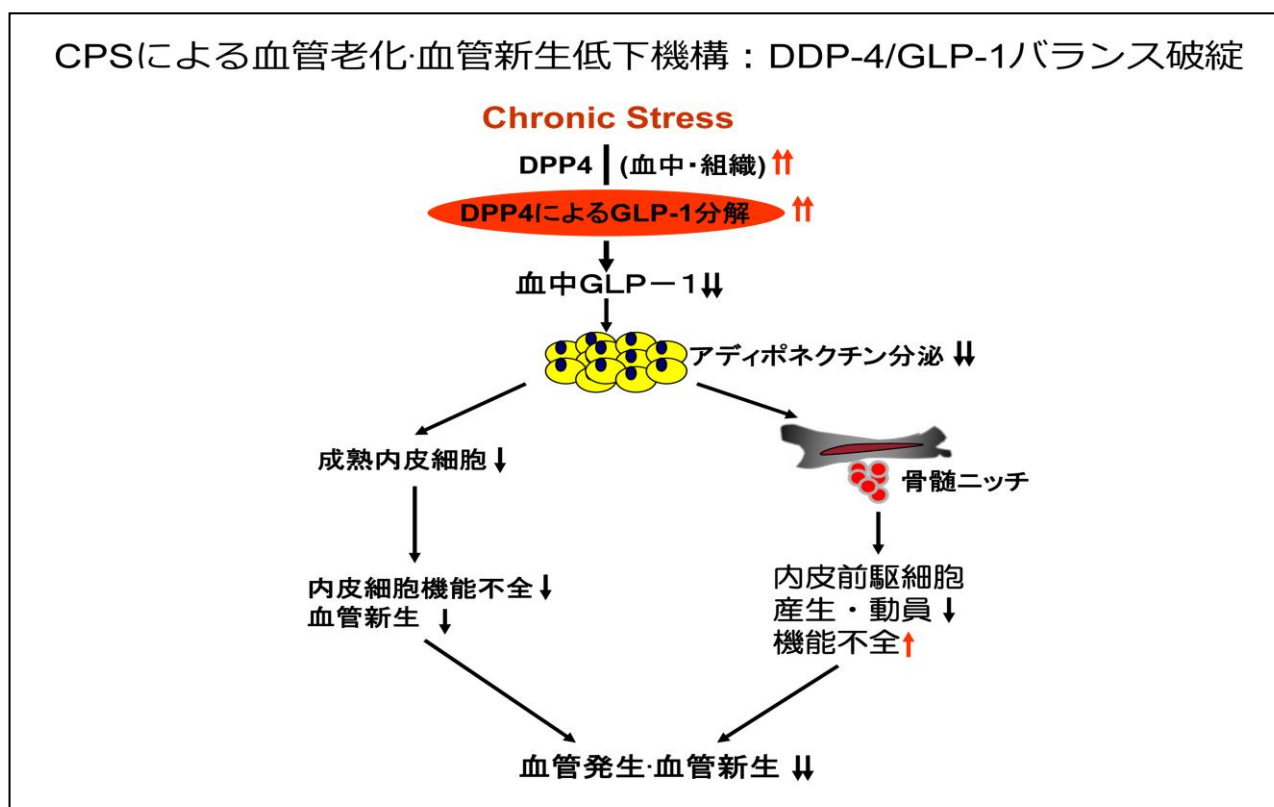
次に、DPP4 遺伝子欠損ラット（F344/DuCrj）と野生型ラット（F344/Jcl）に拘束ストレス負荷 4 週間と下肢虚血モデルを作成し両群を比較したところ、DPP4 遺伝子欠損ラットにおいて DPP4 阻害剤治療と同様な血管保護効果が示されました。

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（5  $\mu$  g/kg/d, 2 回/日）を投与したところ、脂肪組織における APN 発現および分泌が有意な改善を示しました。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ました。

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<sup>-/-</sup>) を用いた実験を行いました。APN<sup>-/-</sup>においては、非治療群と比較して、anagliptin 投与群で慢性ストレスによって低下した p-AMPK、PPRA- $\gamma$  ならびに PGC-1 $\alpha$  蛋白レベルと骨髄 CD31<sup>+</sup>/c-Kit<sup>+</sup>細胞動員、機能不全における改善がみられませんでした。

慢性情動ストレスは血管老化と血管新生低下に関与しており、ストレスを感じることの多い現代社会においてこそ、客観的な指標でストレス存在をより早期に把握することで、それに関連する心血管病（糖尿病、高血圧病、肥満や虚血性心血管病など）をも予防できる可能性があると考えられます。



### 3. 今後の展開

本研究結果により、慢性情動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、さらに、それによる AMPK-PPRA- $\gamma$ /PGC-1 $\alpha$  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ました。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-PPRA- $\gamma$ /PGC-1 $\alpha$  シグナル経路が活性化し、血管老化と血管新再生不全を飛躍的に改善させました。ストレス未然防止や解消療法に加え、上記の薬物療法もストレス性血管病の治療法となりうるという新たな道筋が示唆されました。その研究成果を臨床実践にフィードバックし、ストレス現代社会における健康増進に貢献いたします。

### 4. 用語説明

※1 ジペプチジルペプチダーゼ-4 (dipeptidyl peptidase-4, DPP4)

インクレチンの不活化を行う酵素であり、細胞膜上をはじめ可溶性タンパク質として血液中でも存在している。

## ※2 グルカゴン様ペプチド-1 (glucagon-like protein-1GLP-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。最近、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。

## ※3 アディポネクチン (adiponectin, APN)

アディポネクチンは脂肪細胞から分泌されるホルモンの一種で、炎症性の血管内膜肥厚を抑制し、動脈硬化を抑制することが知られている。アディポネクチンは骨格筋と肝臓において糖取り込みや脂肪酸の燃焼を起こす鍵分子である AMP キナーゼを活性化する。

## ※4 AMPK (AMP-activated protein kinase : AMP 活性化プロテインキナーゼ)

AMPK は、代謝の調節に関与し、肝臓、脂肪組織、骨格筋などにおいてエネルギーセンサーとして作用している。AMPK は細胞内の AMP/ATP 比が増加 (エネルギー枯渇) すると活性化され、糖や脂肪酸の取り込みや蛋白質合成を抑制する。

## ※5 PGC-1α [peroxisome proliferator-activated receptor-γ (PPAR-γ) coactivator -1α]

PGC-1α は肥満やストレスで低下し、IL-6 や TNF-α など炎症性サイトカインの筋肉や血管組織での発現を抑制する。PGC-1α は下流の血管新生関連遺伝子発現を制御し、血管新生に関与する。

## ※6 内皮前駆細胞

骨髄に存在し、内皮細胞の表面マーカーである CD31 と幾つか幹細胞の表面マーカーである c-Kit を発現する未熟な内皮幹細胞である。必要に応じて、骨髄ニッチから循環血液に動員され、虚血部位へのホーミング、分化と増殖を経て、成熟内皮細胞として血管内皮修復や血管発生・血管新生に寄与する。

## ※7 炎症性マクロファージ

動物の組織内に分布する大形のアメーバ状細胞。生体内に浸潤した細菌などの異物を捕らえて細胞内で消化する、炎症物質を産生し組織炎症を惹起する、それらの異物に抵抗するための免疫情報をリンパ球に伝えるなど多彩な機能を有する細胞。別名大食い細胞、貧食細胞。

## ※8 Vascular endothelial growth factor (VEGF)

血管内皮細胞増殖因子。血管発生や血管新生 MuSC は分化・成熟した筋原繊維の辺縁部に筋衛星細胞 (satellite cell) として存在している。骨格筋は再生能力の高い組織であり、筋衛星細胞が筋再生に大きな役割を担っている。筋衛星細胞以外にも独特の分化能や特徴を持った前駆細胞が存在し、骨格筋の恒常性維持に寄与している。

## ※9 サーチュイン(Sirtuin1)

サーチュイン遺伝子は、長寿遺伝子または長生き遺伝子、抗老化遺伝子とも呼ばれ、その活性化により生物の寿命が延びるとされる。肥満や老化細胞において発現が低下する。

## ※10 インスリン受容体基質 1 (insulin receptor substrate-1, IRS-1)

インスリン受容体基質ともいう。インスリンがインスリンレセプターに結合すると、インスリンレセプターのチロシンキナーゼが活性化され、他のタンパク質をチロシンリン酸化するが、その場合の基質となるタンパク質の一つで、IRS-1、IRS-2 などが知られている。

肥満によるインスリン抵抗性発症や老化細胞では発現が低下する。

#### ※11 グルコーストランスポーター (glucose transporter-4, GLUT-4)

インスリンが分泌されると、普段は細胞の内側にある GLUT4 と呼ばれるタンパク質が細胞の表面へ移動する。この GLUT4 が、血液中のブドウ糖を、筋肉組織や脂肪細胞などに送り届ける役割をはたしている。グルコーストランスポーターには、GLUT1 から GLUT4 までが存在するが、肥満によるインスリン抵抗性発症や老化細胞において発現が低下する。

#### ※12 フローサイトメトリー (flow cytometry)

フローサイトメトリーとは、微細な粒子を流体中に分散させ、その流体を細く流して、個々の粒子を光学的に分析する手法のこと。また微粒子を蛍光物質で標識し、レーザー光によって生じた蛍光を検出する蛍光検出器が一つかそれ以上備えられている装置が多い。本方法は、幹細胞を始めとする様々な細胞集団解析に用いられる。

### 5. 本研究について

本研究は、日本学術振興会科学研究費補助金（課題番号 15H04801、15H04802）の支援を受けて行われました。

### 6. 発表雑誌

Limei Piao, Guangxian Zhao, Enbo Zhu, Aiko Inoue, Rei Shibata, Yanna Lei, Lina Hu, Chenglin Yu, Guang Yang, Hongxian Wu, Wenhui Xu, Kenji Okumura, Noriyuki Ouchi, Toyoaki Murohara, Masafumi Kuzuya, Xian Wu Cheng.

Chronic psychological stress accelerates vascular senescence and impairs ischemia-induced neovascularization: The role of dipeptidyl peptidase-4/glucagon-like peptide-1-adiponectin axis

*Journal of the American Heart Association* (2017年9月28日付の電子版に掲載)

DOI : <https://doi.org/10.1161/JAHA.117.006421>

English ver.

[https://www.med.nagoya-u.ac.jp/medical\\_E/research/pdf/American\\_H\\_20170929en.pdf](https://www.med.nagoya-u.ac.jp/medical_E/research/pdf/American_H_20170929en.pdf)