



Orally administered dipeptidyl peptidase-4 inhibitor (alogliptin) prevents abdominal aortic aneurysm formation through an antioxidant effect in rats

Bao, Wulan

(Degree)

博士（医学）

(Date of Degree)

2014-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第6062号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1006062>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



(課程博士関係)

学位論文の内容要旨

Orally administered dipeptidyl peptidase-4 inhibitor (alogliptin) prevents abdominal aortic aneurysm formation through an antioxidant effect in rats

DPP-4 阻害薬（アログリプチン）経口投与は抗酸化作用を介してラットの腹部大動脈瘤形成を抑制する

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻
心臓血管外科学

(指導教員：大北 裕教授)

烏蘭

(背景)

腹部大動脈瘤（AAA）は、一旦破裂すると命にかかわる危険性を有し、AAA破裂は世界中の全死亡率の1%から2%である。AAAの発生率は、過去20年間に増加し、外科手術または血管内治療法を除き効果的な薬物療法はまだない。活性酸素種（ROS）は、アテローム性動脈硬化症および高血圧などの心血管疾患を含む多くの慢性疾患に関与することが示されており、AAAでの関与も報告されている。ROSの産生増加は炎症細胞浸潤および組織の損傷を引き起こし、局部炎症反応と関連しており最終的にAAAの病因につながる。臨床的に応用されていないが、実験的研究ではROSの発現に関する遺伝的および薬物による阻害は、動脈瘤の形成を抑制できることが実証されている。

新規糖尿病治療薬Dipeptidyl peptidase-4 (DPP-4, CD26) は、ROS産生を減少させることで虚血再灌流障害に対する心臓保護効果を有することが報告されている。しかし、AAAに対するDPP-4阻害剤の効果はまだ検討されていない。本研究では、DPP-4阻害薬（アログリプチン）は、ラットAAAモデルにおいてROS阻害によりAAA形成を抑制するという仮説に基づいて以下の実験を行った。

(方法)

ラット腹部AAAモデルを用いて、DPP-4阻害薬のAAA形成抑制効果を検討した。腹部大動脈をクランプした後、大腿動脈から挿入したカテーテルからエラスターを作用させ、同時に塩化カルシウムを外膜から作用させAAAを作成した。Sprague-Dawley ラット（N=36）を使用しAAAモデルを作成、3群にわけた：低用量

アログリブチン群 (LD群: 1mg/kg/日)、高用量群 (HD群: 3mg/kg/日)、コントロール群 (C群: 水)。瘤作成3日前よりDPP-4 阻害薬の1日/1回経口投与を開始した。動脈瘤形成後7日目にROSの発現をジヒドロエチジウム染色により半定量化し、ROSにより誘導されるDNAの酸化生成物 (8ヒドロキシデオキシグアノシン: 8-OHDG) の発現を免疫染色により評価した。また、real-time PCR 法およびGelatin Zymographyにより動脈瘤壁におけるMatrix metalloproteinase (MMP)-2,-9の発現およびその活性を測定した。動脈瘤形成後28日目に大動脈拡大率および病理組織学的検討を行った。

(結果)

瘤作成7日目の瘤壁において、CD26陽性細胞の有意な発現亢進を認めた(正常動脈: 0.0 ± 0.0, C群: 0.6 ± 0.2; p<0.0001)。また、CD26がCD68陽性細胞 (マクロファージ) に発現していることが免疫染色で確認された。7日目の動脈瘤壁におけるROSの発現は、アログリブチン用量依存性に抑制され (LD群: 2.7 ± 0.3, HD群: 1.7 ± 0.5, C群: 4.6 ± 0.6; p< 0.0001)、8-OHDGの陽性細胞数も同様に減少した (LD群: 102.5 ± 4.5, HD群: 66.1 ± 4.5, C群: 138.1 ± 7.4, p<0.0001)。また、MMP-2, -9のmRNA発現は、アログリブチン投与により有意に抑制され (MMP-2: LD群: 1.3 ± 0.3, HD群: 0.9 ± 0.2, C群: 2.1 ± 0.4; P< 0.01, MMP-9: LD群: 0.3 ± 0.3, HD群: 0.3 ± 0.2, C群: 2.0 ± 0.5; P< 0.01)、それらの活性も抑制された(MMP-2: LD群: 78.5 ± 6.6, HD群: 68.6 ± 16.8, C群: 124.3 ± 5.1; P< 0.01、proMMP-2: LD群: 85.3 ± 3.4, HD群: 66.8 ± 17.7, C群: 126.7 ± 10.7; P< 0.01、

MMP-9: LD群: 89.6 ± 8.5, HD群: 81.3 ± 10.1, C群: 133.3 ± 17.2, P< 0.01)。28日後、アログリブチン投与はエラスチン含有率の増加とともに大動脈瘤拡大率を抑制した (LD群: 159.6 ± 2.8 %, HD群: 147.1 ± 1.9 %, C群: 199.2 ± 11.8 %; p<0.0001)。

(考察)

DPP-4阻害薬 (アログリブチン) は、抗酸化作用を介しAAAの形成を抑制することが示された。本研究により、アログリブチンは臨床応用可能な経口薬剤であることが示唆された。

ROSは動脈硬化や高血圧といった心血管障害を含む多くの慢性疾患で中心的な役割を果たすことが示唆されている。ROSの産生増加は炎症細胞の浸潤および組織の損傷を引き起こし、局所の炎症反応と関連しており、AAAの病態とも密接に関与している。また、ROSの過剰な産生は、MMPの活性化および炎症反応を惹起しエラスチンの破壊や大動脈壁の菲薄化をもたらし動脈瘤が形成する。本研究において、動脈瘤形成はROSの発現増加および8-OHDG陽性細胞数と関連していた。そして、MMP-2, -9のmRNAの発現およびその活性も動脈瘤壁において増加していた。

動脈瘤形成は理論的に抗酸化物質により阻害することができる。以前、我々はROSがラットのAAAモデルにおける動脈瘤形成に重要な役割を果たしていることを報告した。DPP-4阻害薬は糖尿病治療薬として使用される一方、虚血再灌流障害の動物モデルにおけるROSの発現を抑制し心臓保護効果有することが認められている。本研究でアログリブチンは、AAA形成過程における強力なROSスケーベンジャーとして作用し抗酸化作用を有することが示唆された。特にAAA初期段階のROSを用量依存性に抑制するだけでなく、エラ

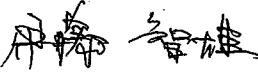
スチンの破壊を抑制し炎症に関するCD68およびCD26陽性細胞の浸潤を抑制した。MMP-2、-9のmRNAの発現および活性もアログリブチン投与によるROS除去を介し効果的に抑制された。MMP-2,-9はAAAの形成に必要とされ、ROSはMMPの活性化において重要な役割を果たしていることがこれまでの研究で示唆されており、アログリブチンは抗酸化作用により大動脈壁の変性を抑制し大動脈の拡張を防止したと考えられる。

AAAに対する薬物治療薬として経口投与可能なアログリブチンは、全身状態の不良な症例にも応用が期待される。動物実験においていくつかの薬剤がAAAの形成を防止することができる事が報告されているが、臨床応用されている薬剤はまだない。最近、我々はAAAに対するエダラボンの効果を報告したが、エダラボンは臨床的に静脈内投与により使用される。また、アログリブチンは耐糖能異常のない症例の血糖値には影響を与えることなく、臨床治療薬として高い可能性を有していると考えられる。

活性酸素はシグナル伝達としての役割を担う一方、過剰な活性酸素による酸化ストレスは動脈瘤形成において重要な役割を果たしていることが報告されている。DPP-4阻害薬（アログリブチン）は、抗酸化作用を介してMMPの発現およびエラスチンの減少を抑制し、その保護効果を発揮したと考えられる。

（結論）

DPP-4 阻害薬（アログリブチン）は、抗酸化作用を介しAAAラットモデルにおいてAAAの形成を容量依存性に抑制した。本薬剤は既に経口糖尿病治療薬として臨床応用されており、有効な薬物治療薬の可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第 2424 号	氏名	鳥 蘭
論文題目 Title of Dissertation	<p>DPP-4 阻害薬（アログリプチン）経口投与は抗酸化作用を介してラットの腹部大動脈瘤形成を抑制する</p> <p>Orally administrated dipeptidyl peptidase-4 inhibitor (alogliptin) prevents abdominal aortic aneurysm formation through an antioxidant effect in rats</p>		
審査委員 Examiner	<p>主査  Chief Examiner</p> <p>副査 林 祥剛 Vice-examiner</p> <p>副査 平井みどり Vice-examiner</p>		

腹部大動脈瘤は、人類にとって生命を脅かす重大な疾患であって、その破裂によって急速な死がもたらされることも多い。外科的治療が行われるが、極めて大きな侵襲を伴う手術である。また、近年、その頻度は増加しており、その予防が大いに求められるところである。

大動脈瘤の原因として、活性酸素種 (ROS) の関与が、粥状硬化や高血圧などの心血管疾患で知られており、大動脈瘤においても同様である。ROS の産生増加により、炎症細胞浸潤や組織損傷が起こるとされ、局部の炎症によって大動脈瘤の形成が惹起されるとされている。過去の報告では実験的に ROS の発現を遺伝的、薬剤的に阻害することによって動脈瘤の形成が抑制されることも知られている。

今回、発表者は新規の糖尿病治療薬 dipeptidyl peptidase-4(DPP-4, CD26)が ROS の産生を減少させ、虚血再灌流障害に対する心臓保護作用を有することに着目し、大動脈瘤の形成に対する抑制効果があるとの仮説をたて、ラット大動脈瘤モデルにおいて、その効果を研究した。

ラットは、腹部大動脈をクランプした後、大腿動脈から挿入したカテーテルからエラスターーゼを作用させ、さらに大動脈外から塩化カルシウムを作用させ、動脈瘤を形成した。ラットは Sprague-Dawley ラット 36 例を用い、以下の 3 群に分けて検討を行った。1) 低用量アログリプチン群 (LD 群:1mg/kg/day)、2) 高用量アログリプチン群 (HD 群:3mg/kg/day)、3) コントロール群 (C 群:水)。瘤形成の 3 日前より 1 日 1 回の投与とした。ROS の発現はジヒドロエチジウム染色にて定量化し、ROS より誘導される DNA の酸化生成物 (8-OHDG) の発現を免疫染色によって評価した。また real-time PCR や gelatin zymography により動脈壁における MMP-2, -9 の発現、活性を評価した。また、瘤の組織学的検討を行い、大動脈拡大率の検討等を行った。

その結果、瘤作成 7 日後の瘤壁において、CD26 陽性細胞の有意な発現亢進を認めた。また、CD26 陽性細胞の分布は CD68 陽性細胞と同一であった。また、ROS の発現はアログリプチン容量依存性に抑制されており、8-OHDG の陽性細胞数も同様に減少していた。MMP-2, -9 の mRNA も投与群で抑制されていた。また、組織学的には、投与群では大動脈壁の弾性線維含有率の低下とともに、大動脈瘤拡大率を抑制していた。

以上、本研究は、腹部大動脈瘤において、新規の糖尿病治療薬 dipeptidyl peptidase-4(DPP-4, CD26)が抑制的な効果を有することを示したものであり、従来ほとんど行われなかつた大動脈瘤の薬物療法に対する糖尿病治療薬の効果に関して重要な知見を得たものとして、価値ある集積であると認める。よって本研究者は、博士(医学)の学位を得る資格があると認める。