

遺伝性高コレステロール血症ウサギ WHHL-MI の動脈
硬化性プラーク進展に対する GLP-1 受容体作動薬リキ
シセナチドの効果

- 血管内エコー法を用いた検討 - (要約)

日本大学大学院医学研究科博士課程

内科系循環器内科学専攻

須藤 晃正

2015年

指導教員 廣 高史

目的

小腸 L 細胞から分泌されるインクレチンホルモンであるグルカゴン様ペプチド-1 (Glucagon-like peptide-1, GLP-1) は、グルコース濃度依存的に膵 β 細胞からインスリンを分泌させる。GLP-1 受容体作動薬は、GLP-1 受容体を介して作用することにより環状アデノシンーリン酸 (cyclic AMP, cAMP) を増加させ、グルコース濃度依存的にインスリン分泌が促進され血糖の降下作用を示す^{1, 2}。GLP-1 は膵臓以外にも脳神経系、胃、腎臓、骨格筋、肺、心血管系など多様な臓器に作用を示す^{3, 4}。しかしながら GLP-1 受容体作動薬による動脈硬化進展抑制の臨床研究はいまだ報告されておらず、動脈硬化モデルである Apo E 欠損マウスを用いた動物実験が報告されているだけである^{5, 6}。マウスを用いた実験は、均一な条件で比較実験を行うことができるが、現時点では一定期間経過した後に剖検病理で効果をみる横断研究のみが可能であるため、同一のプラークを経時的に変化をみることはできない。個体の小ささや、体力などの限界により、血管内イメージングを継時的に繰り返して施行することが困難なためである。しかし、最近のデバイスなどの進歩や動物管理システムの進歩により、著者らの施設では後述のウサギについて血管内超音波法 (Intravascular ultrasound : IVUS) を投与前後において 2 回施行できる安全な飼育がある程度可能となった。そのため、動物実験によりプラークの組織成分の変化を観察することが可能となった。遺伝性高コレステロール血症ウサギ (Watanabe heritable hyperlipidemic rabbit, WHHL ウサギ) は Watanabe によって 1973 年に発見された高脂血症を示す日本白色ウサギに由来し、1980 年に系統交配させて確立された⁷。

WHHL ウサギの高脂血症は LDL 受容体の遺伝子異常に基づいて血中の LDL の異化が遅延することに由来する。その後選抜交配により、28 月齢における心筋梗塞の累積発生率が 98%の WHHL ウサギの一群が作られ、WHHL-myocardial infarction (MI)ウサギと命名された。今回の研究の目的は、WHHL-MI ウサギにおいて、12 週間にわたって、GLP-1 受容体作動薬であるリキシセナチドを投与した群と、生理食塩水を投与したコントロール群の 2 群について、IVUS で投与前後を観察し、動脈プラークの量ならびに組織成分の変化について比較検討することにある。さらに安楽死後に病理標本を作製し、病理組織学的に 2 群間を比較検討することで、リキシセナチドのプラークに対する影響を明らかにすることである。

方法

WHHL-MI ウサギをコントロール群とリキシセナチドを投与する GLP-1 群の 2 群に分け、コントロール群には生理食塩水、GLP-1 群にはリキシセナチドを投与した。WHHL-MI ウサギに対し、IVUS で動脈を観察したのち浸透圧ポンプを用いて 12 週間投与をした。12 週間後、再度 IVUS で同部位を観察した。観察した腕頭動脈のプラークについて、IVUS の画像データよりプラークの組織成分について解析した。2 回の IVUS 観察における変化を、コントロール群、GLP-1 群で比較した。2 回目の IVUS 観察後、安楽死の後に IVUS で観察した部位のパラフィンブロックを作成し、病理組織切片を作成した。作成した切片に対し、Hematoxylin-eosin 染色、Elastica

van Gieson 染色、Masson's trichrome 染色を施行し石灰化成分面積、線維成分面積、壊死+脂質成分面積を比較した。さらにウサギのマクロファージ、平滑筋細胞(Smooth muscle cell, SMC)を識別する為に免疫染色を行い 2 群間で比較検討した。なおこれから動物実験は、日本大学医学部実験指針を遵守し、日本大学動物実験運営内規に準じて行われ、医学部動物実験委員会で認証された。

結果

Baseline において脂質プロフィールはコントロール群と GLP-1 群の 2 群間において有意な差は認めなかった。12 週間後においては中性脂肪を除いて脂質プロフィールは 2 群間に有意な差は認めなかった。随時血糖については Baseline において 2 群間に有意な差は認めず、12 週間後においても 2 群間に有意差は認めなかった。

IVUS 解析の結果は Baseline における Vessel area、Plaque area、Lumen area はいずれも GLP-1 群において大きかったが、%Plaque area に差は認めなかった。iMAP を用いた組織解析では Baseline で、%Fibrotic area、%Lipidic area、%Necrotic area、%Calcified area は 2 群間に有意な差は認めなかった。12 週間後では %Fibrotic area が GLP-1 群において有意に大きかった。一方 %Necrotic area、%Calcified area は GLP-1 群においてコントロール群と比較し有意に小さかった。

次に 12 週間での変化量について 2 群間で検討した結果、コントロール群において Vessel area は変化しないものの、Lumen area は有意に減少し、Plaque area は有意に

増大した。GLP-1 群では Vessel area、Lumen area は有意に減少したが、Plaque area は変化しなかった。結果的に%Plaque area は両群共に増加を認めるものの有意な差は認めなかった。しかし、Plaque area の変化を比較するとコントロール群は GLP-1 群よりも有意に増加した。iMAP を用いた組織成分評価における Baseline と 12 週間後の占有率の変化を評価した。%Fibrotic area はコントロール群において有意に減少し、%Necrotic area、%Calcified area は有意に増加した。一方、%Lipidic area はコントロール群と比較し GLP-1 群において増加傾向を示したが、両群ともに Baseline と 12 週間後の変化については有意な変化ではなかった。

病理学解析の結果では Vessel area、Lumen area、Plaque area、media area、intima+media area、%intima+media area において、IVUS の結果と同様に 2 群間に差は認めなかった。%Macrophage area、%Calcified area はコントロール群において有意に大きく、%SMC area、%Fibrotic area は GLP-1 群において有意に大きく認められた。

考察

本研究では、遺伝性高コレステロール血症ウサギ WHHL-MI に対してリキシセナチドの投与を 12 週間行い、その投与前後における腕頭動脈の動脈硬化病変を IVUS で観察した。その結果、リキシセナチド投与によりプラーク量の増加は抑えられ、%Necrotic area の増加、%Fibrotic area の減少を抑制できた。さらに剖検によ

る病理学的検討の結果として、リキシセナチド投与群はコントロール群に比しマクロファージの浸潤、Calcified area は少なく、SMC、線維成分を多く認めた。このことはリキシセナチド投与により動脈硬化進展抑制ならびにプラークの安定化作用のメカニズムを示唆する。

GLP-1 受容体作動薬の 1 つである Exendin-4 は、血管をバルーン擦過したマウスモデルにおいて内膜の過形成を抑制した^{8, 9}。このモデルはバルーン擦過することで内膜に炎症を起し、その後の新生内膜の修復過程をふむことで動脈硬化の進展を模倣したモデルである。また、Arakawa らの報告した Apo E 欠損マウスを用いた動物実験では、Exendin-4 は大動脈洞の動脈硬化の抑制を示した⁵。これらの報告は動脈硬化の少ない初期のものを対象としているが、GLP-1 受容体作動薬に動脈硬化進展抑制作用があることを示した。GLP-1 受容体作動薬による抗炎症作用のメカニズムについてはいくつか報告されている。ヒトにおける報告では GLP-1 受容体作動薬が活性化マクロファージにおける炎症メディエーターである TNF- α と MCP-1 を減少させることが報告された^{10, 11}。Arakawa らの報告では、GLP-1 受容体作動薬が大動脈壁における ICAM-1 と Vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) の発現を抑制し、単球/マクロファージ内におけるアデニル酸を活性化させることで cAMP が産生され、cAMP/Protein kinase A (PKA) 経路を介して cAMP が PKA を活性化し、NF- κ B p65 を抑えることで、マクロファージの炎症反応を抑えることを示した。Gaspari らによる報告では GLP-1 受容体作動薬は TNF- α 関連 ICAM-1、VCAM-1 を減少させ

endothelial nitric oxide synthase (eNOS)を増加させる。また、TNF- α 関連 NF κ B を抑制することも報告された¹²。更に Liu らは、GLP-1 受容体作動薬は TNF- α 関連 Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1)、ICAM-1、VCAM-1 を抑制することを報告した¹³。このような機序により GLP-1 受容体作動薬は抗炎症作用を示し、動脈硬化の進展予防を示すと考えられる。本実験では動脈硬化が進んでおり、実臨床で遭遇する病態により相似する実験モデルと考えられる。Panjwani らによるとストレプトゾトシンを用いて糖尿病モデルを作った Apo E 欠損マウスでは、動脈硬化が進行した時点から GLP-1 受容体作動薬を投与しても大動脈洞のプラーク面積は減少せず、また、大動脈洞および大動脈弓部のマクロファージ面積を減少させることができなかつたと報告している。しかし、血清 IL-6 はコントロールと比較し有意に減少を示した¹⁴。一方、Gaspari らによると、動脈硬化の進んだ Apo E 欠損マウスでは GLP-1 受容体作動薬は動脈硬化プラークの増大を抑えることはできなかつたが、プラークの安定化がみられたことを示した¹⁵。ただ Panjwani らの実験では GLP-1 受容体作動薬の投与量が少なかったことがマクロファージ浸潤を抑えられなかつた 1 つの原因ではないかと推察されている。本研究において IVUS の観察結果から、GLP-1 受容体作動薬はプラークを縮小させることが困難であったが、病理組織学的、iMAP-IVUS の両アプローチからもプラークの増殖を抑制し、さらにプラーク性状を安定化させることが示された。iMAP-IVUS において、コントロール群と比較し Vessel area および Lumen area が有意に低下していた。ヒトにおける研究では、スタチン投与による

プラーク量の退縮の際には Vessel area もまた Reverse remodeling により減少することが知られている¹⁶。Positive remodeling している血管ほど不安定なプラークを有していることが多いとされ、Reverse remodeling はプラーク安定化の一つの指標として考えられている。本研究では GLP-1 受容体作動薬によって Plaque area の退縮より先に Vessel area の減少がみられ、結果的に Lumen area は減少した。GLP-1 受容体作動薬では、プラークの退縮と安定化は平行していないのかもしれない。

本研究は、過去に報告されている GLP-1 受容体作動薬によるプラークの進展予防とプラークの安定化効果について、WHHL-MI ウサギでもみられることを示した。脂質低下療法によるプラーク安定化・退縮作用の機序については種々の報告がされている¹⁷。HDL によるコレステロールの逆転送系、脂質を含んだマクロファージのリンパ系への逃避助長作用、血中の種々の acceptor による細胞内脂質の直接的な血中流出、いわゆる healthy なマクロファージによる脂質コアの成分の回収などの機序が明らかにされている。GLP-1 のプラーク安定化作用が、これらのメカニズムとどう関与しているかについては今後の検討が待たれる。

結論

遺伝性高コレステロール血症ウサギに対してリキセナチド投与を 12 週間行い、IVUS で観察した結果、動脈硬化の進展を抑制し、動脈硬化病変の安定化にも寄与している可能性が示唆された。

引用文献

1. Greig NH, Holloway HW, De Ore KA, Jani D, Wang Y, Zhou J, Garant MJ, Egan JM. Once daily injection of exendin-4 to diabetic mice achieves long-term beneficial effects on blood glucose concentrations. *Diabetologia*. 1999;42:45-50
2. Kolterman OG, Buse JB, Fineman MS, Gaines E, Heintz S, Bicsak TA, Taylor K, Kim D, Aisporna M, Wang Y, Baron AD. Synthetic exendin-4 (exenatide) significantly reduces postprandial and fasting plasma glucose in subjects with type 2 diabetes. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2003;88:3082-3089
3. Seino Y, Yabe D. Glucose-dependent insulintropic polypeptide and glucagon-like peptide-1: Incretin actions beyond the pancreas. *Journal of Diabetes Investigation*. 2013;4:108-130
4. Cai HY, Holscher C, Yue XH, Zhang SX, Wang XH, Qiao F, Yang W, Qi JS. Lixisenatide rescues spatial memory and synaptic plasticity from amyloid beta protein-induced impairments in rats. *Neuroscience*. 2014
5. Arakawa M, Mita T, Azuma K, Ebato C, Goto H, Nomiya T, Fujitani Y, Hirose T, Kawamori R, Watada H. Inhibition of monocyte adhesion to endothelial cells and attenuation of atherosclerotic lesion by a glucagon-like peptide-1 receptor agonist, exendin-4. *Diabetes*. 2010;59:1030-1037
6. Burgmaier M, Liberman A, Mollmann J, Kahles F, Reith S, Lebherz C, Marx N, Lehrke M. Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) and its split products glp-1(9-37) and GLP-1(28-37) stabilize atherosclerotic lesions in apoE(-/-)

- mice. *Atherosclerosis*. 2013;231:427-435
7. Watanabe Y. Serial inbreeding of rabbits with hereditary hyperlipidemia (WHHLMI-rabbit). *Atherosclerosis*. 1980;36:261-268
 8. Goto H, Nomiya T, Mita T, Yasunari E, Azuma K, Komiya K, Arakawa M, Jin WL, Kanazawa A, Kawamori R, Fujitani Y, Hirose T, Watada H. Exendin-4, a glucagon-like peptide-1 receptor agonist, reduces intimal thickening after vascular injury. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2011;405:79-84
 9. Hirata Y, Kurobe H, Nishio C, Tanaka K, Fukuda D, Uematsu E, Nishimoto S, Soeki T, Harada N, Sakaue H, Kitagawa T, Shimabukuro M, Nakaya Y, Sata M. Exendin-4, a glucagon-like peptide-1 receptor agonist, attenuates neointimal hyperplasia after vascular injury. *European Journal of Pharmacology*. 2013;699:106-111
 10. Gedulin BR, Smith P, Prickett KS, Tryon M, Barnhill S, Reynolds J, Nielsen LL, Parkes DG, Young AA. Dose-response for glycaemic and metabolic changes 28 days after single injection of long-acting release exenatide in diabetic fatty Zucker rats. *Diabetologia*. 2005;48:1380-1385
 11. Kolterman OG, Kim DD, Shen L, Ruggles JA, Nielsen LL, Fineman MS, Baron AD. Pharmacokinetics, pharmacodynamics, and safety of exenatide in patients with type 2 diabetes mellitus. *American Journal of Health-System Pharmacy*. 2005;62:173-181
 12. Gaspari T, Liu H, Welungoda I, Hu Y, Widdop RE, Knudsen LB, Simpson RW, Dear AE. A GLP-1 receptor agonist liraglutide inhibits endothelial cell dysfunction and vascular adhesion molecule expression in an apoe^{-/-} mouse model. *Diabetes and Vascular Disease Research*. 2011;8:117-124
 13. Liu H, Dear AE, Knudsen LB, Simpson RW. A long-acting glucagon-like

- peptide-1 analogue attenuates induction of plasminogen activator inhibitor type-1 and vascular adhesion molecules. *The Journal of Endocrinology*. 2009;201:59-66
14. Panjwani N, Mulvihill EE, Longuet C, Yusta B, Campbell JE, Brown TJ, Streutker C, Holland D, Cao X, Baggio LL, Drucker DJ. GLP-1 receptor activation indirectly reduces hepatic lipid accumulation but does not attenuate development of atherosclerosis in diabetic male apoE(-/-) mice. *Endocrinology*. 2013;154:127-139
 15. Gaspari T, Welungoda I, Widdop RE, Simpson RW, Dear AE. The glp-1 receptor agonist liraglutide inhibits progression of vascular disease via effects on atherogenesis, plaque stability and endothelial function in an apoE(-/-) mouse model. *Diabetes & vascular disease research : official journal of the International Society of Diabetes and Vascular Disease*. 2013;10:353-360
 16. Hirayama A, Saito S, Ueda Y, Takayama T, Honye J, Komatsu S, Yamaguchi O, Li Y, Yajima J, Nanto S, Takazawa K, Kodama K. Qualitative and quantitative changes in coronary plaque associated with atorvastatin therapy. *Circulation Journal*. 2009;73:718-725
 17. Williams KJ, Feig JE, Fisher EA. Rapid regression of atherosclerosis: Insights from the clinical and experimental literature. *Nature Clinical Practice. Cardiovascular Medicine*. 2008;5:91-102