

血管内皮細胞における GLP-1 作動薬の抗動脈硬化作用

奥村 貴子 田辺 節 Nuliguli Aili
今野 一誠 伊藤 禄郎 酒井 裕幸
金澤 昭 小田原 雅人

東京医科大学内科学第三講座（糖尿病・代謝・内分泌内科）

【要旨】 血管内皮細胞において、glucagon-like peptide-1 (GLP-1) 受容体作動薬である liraglutide が、TNF α により誘導された interleukin-6 (IL-6) を抑制するかどうかを検討した。ヒト臍帯静脈内皮細胞 Human umbilical vein endothelial cell (HUVEC) を用いて、① 培養液のみのコントロール C 群、② liraglutide 300 nM 添加した L 群、③ 10 ng/ml TNF- α 添加した T 群、④ 10 ng/ml TNF- α および liraglutide 300 nM 添加した TL 群の 4 群に分類し、検討した。IL-6 mRNA およびタンパクの発現はともに、C 群と比較して T 群で有意に増強し、TL 群で有意に減弱した。cAMP/cAMP-regulated guanine nucleotide exchange factors-1 (EPAC1) および cAMP/cAMP-regulated guanine nucleotide exchange factors-2 (EPAC2) と suppressor of cytokine signaling-3 (SOCS3) の mRNA およびタンパク発現は、C 群と比較して L 群で有意に増強した。SOCS3 ではタンパク発現も T 群と比較して TL 群で有意に増強した。PKA mRNA は各群で有意差を認められなかった。Liraglutide は IL-6 の発現を抑制したが、PKA 非依存性経路である EPAC を介し、SOCS3 を誘導することで IL-6 発現抑制に寄与した可能性が示唆された。

はじめに

インクレチンは食事摂取に伴って消化管から分泌されるホルモンであり、食後の血糖値上昇を抑える重要な膵 β 細胞調節因子である。インクレチンホルモンのひとつである Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) は小腸下部の L 細胞から分泌され、膵 β 細胞の GLP-1 受容体を介してブドウ糖で刺激されたインスリン分泌を増幅する作用を持つ。すでに、GLP-1 受容体作動薬である liraglutide や exenatide は臨床の場に登場しており、2 型糖尿病治療において有用な治療法の 1 つとして使用されている。GLP-1 には膵外作用の存在が知られ、① 胃排泄運動抑制作用、

② 食欲抑制作用、③ グルカゴン分泌抑制作用、④ 血管内皮保護作用などがある。① は胃の蠕動運動抑制による効果として知られ¹⁾、② は胃壁伸展刺激や末梢 GLP-1 刺激の迷走神経求心路を介した摂食抑制²⁾ および中枢神経系への GLP-1 作用に伴う摂食抑制の可能性が示唆されている³⁾。③ に関しては、GLP-1 のソマトスタチン分泌を介したグルカゴン分泌抑制の機序が想定されている。最近では④ の血管内皮保護作用についても知られるようになったが⁴⁾⁵⁾、GLP-1 がどのような機序で血管内皮保護に作用するのかは十分に明らかではない。

糖尿病血管合併症の発症早期において、慢性炎症や酸化ストレスなどは血管内皮細胞障害を惹起し、

平成 24 年 12 月 21 日受付、平成 25 年 1 月 18 日受理

キーワード: human umbilical vein endothelial cell (HUVEC), interleukin-6 (IL-6), cAMP/cAMP-regulated guanine nucleotide exchange factors-1 (EPAC1), suppressor of cytokine signaling-3 (SOCS3), glucagon-like peptide-1 (GLP-1)

(別冊請求先: 〒 160-0023 東京都新宿区西新宿 6-7-1)

TEL: 03-3342-6111 (内線 5904) FAX: 03-5381-6653

動脈硬化進展に影響することが知られている。その機序には Tumor necrosis factor- α (TNF- α)、Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) などの炎症性サイトカインの関与が指摘されている^{6,8)}。また、Interleukin-6 (IL-6) は、ヒトでは急性心筋梗塞患者の血液中で上昇を認め⁹⁾、IL-6 ノックアウトマウスでは動脈硬化を抑制したという報告がある¹⁰⁾。そのため、IL-6 は動脈硬化に促進的に働く重要な因子の一つとして考えられている。我々は、活性型 GLP-1 投与により、ヒト臍帯静脈内皮細胞 (Human umbilical vein endothelial cell: HUVEC) において nuclear factor- κ B (NF- κ B) の遺伝子およびタンパク発現が減弱することを確認している (投稿中)。GLP-1 は細胞内の cyclic AMP (cAMP) を上昇させ、protein kinase A (PKA) 依存性に作用する経路のほか、cAMP/cAMP-regulated guanine nucleotide exchange factors (EPAC) を介して PKA 非依存性に作用する経路も知られている。EPAC は suppressor of cytokine signaling-3 (SOCS3) の発現を調節し、SOCS3 は IL-6 の発現を抑制することが報告されている。

以上より、我々は GLP-1 の血管内皮保護作用に、炎症性サイトカインを介する機序を考えた。今回、我々はヒト臍帯静脈内皮細胞 (Human umbilical vein endothelial cell: HUVEC) を用いて、liraglutide が TNF- α によって誘導される IL-6 を減少させるか否かを検討した。また IL-6 が減少するのであれば、その機序に EPAC および SOCS3 が関与するかを検討した。

研究材料および方法

1. 細胞培養

血管内皮細胞は凍結 HUVEC (クラボウ、大阪) を使用した。培養液は内皮細胞基本培地-2 (EBM2: タカラバイオジャパン、東京) に内皮細胞添加因子セット-2 (EGM2: タカラバイオジャパン) を添加したものを使用した。培養は 37°C、5%CO₂ 環境下で行った。なお、HUVEC は第3~6世代までを使用した。

2. TNF- α による刺激とグループ分類

HUVEC は poly-L-lysine でコーティングされた6穴プレート (旭テクノロジー、兵庫) の各ウェルに、それぞれ 1×10^5 個ずつを均一に散布し、37°C、5%CO₂ 環境下で培養した。GLP-1 受容体作動薬と

して、liraglutide (ノボノルディスクファーマ) を使用した。血管内皮細胞における炎症を惹起するため、最終濃度 10ng/mL の TNF- α (シグマアルドリッチ ジャパン) を用いて HUVEC を刺激した。細胞が 80% コンフルエントの状態、HUVEC をコントロール (C) 群、liraglutide 300 nM (L) 群、10 ng/mL TNF- α 投与 (T) 群、10 ng/mL TNF- α および liraglutide 300 nM (TL) 群に分類した。TNF- α 刺激 2 時間後の遺伝子発現、TNF- α 刺激 24 時間後の培養液上清中のタンパク発現の評価および 2 時間後の HUVEC 細胞質タンパクを以下の実験に供した。

3. RNA 分離および cDNA 合成

TNF- α 刺激の 2 時間後、HUVECs をリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で洗浄し、RNeasy Mini Kit (キアゲン、東京) を用いて添付文書のプロトコールに従い total RNA を抽出した。この total RNA 1 μ g を、cDNA Synthesis with SuperScript[®] III RT (インビトロジェン、東京) を用いて添付文書のプロトコールに従い cDNA 合成を行った。

4. リアルタイム PCR 法

cDNA は Light Cycler1.5 (ロッシュ・ダイアグノスティックス、東京) を用いたリアルタイム PCR 法にて、定量的に遺伝子発現を解析した。IL-6、PKA、EPAC1、EPAC2、SOCS3、18S rRNA のプライマーは、Gene Bank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) を用いて設計した。各プライマーの塩基配列は Table 1 に示した。LightCycler[®] FastStart DNA Master SYBR Green I (ロッシュ・ダイアグノスティックス) を使用して添付文書のプロトコールに従い、各遺伝子の増幅を測定した。内因性コントロールである 18S rRNA 発現量に対する発現量の比で IL-6 および PKA、EPAC1、EPAC2、SOCS3 の mRNA 発現量を評価し、それぞれについて比較検討した (各群 $n=7$)。

5. ELISA 法による細胞培養液上清液中の IL-6 発現量の定量

TNF- α 刺激の 24 時間後に回収した細胞培養液上清中の IL-6 発現量を EIA IL-6 kit (Beckman Coulter、アメリカ合衆国) により測定した。添付文書のプロトコールに従い、測定した標準 IL-6 溶液の実測値から標準曲線を求め、標準曲線に対応させて各サンプルの定量値を算出し、その値を各ウェルの細胞数で補正して比較検討した (各群 $n=5$)。

Table 1 Gene-specific forward and reverse primer sequences for real-time PCR

Target mRNA	Primer	Sequence
18S rRNA	5'	5'-GTAACCCGTTGAACCCCAT-3'
	3'	5'-CCATCCAATCGGTAGTAGCG-3'
IL-6	5'	5'-CAAATTCGGTACATCCTCGACGGC-3'
	3'	5'-GGTTCAGGTTGTTTTCTGCCAGTGC-3'
EPAC1	5'	5'-CGGAGGGGACACTACTCAAC-3'
	3'	5'-GGTCTCGGATGAGGTTTGGG-3'
EPAC2	5'	5'-CACGAACAGGGAATGAACGGCA-3'
	3'	5'-GGAATCCTGTCATTGTTAGAGCCCG-3'
PKA	5'	5'-CATGGAGTACGTGCCCGGCG-3'
	3'	5'-ACGGGCATGGGGCTCACTGA-3'
SOCS3	5'	5'-CTTCAGCTCCAAGAGCGAGT-3'
	3'	5'-CAGTTCTTGGTCCCAGACT-3'

6. 細胞質蛋白の抽出

TNF- α 刺激の2時間後に細胞質タンパクは、NEPER[®] extraction reagent (Pierce、ロックフォード、イリノイ州、アメリカ合衆国)を用いて、添付文書のプロトコールに従って HUVEC から抽出した。

7. ウェスタンブロット法による EPAC1、EPAC2、SOCS3 発現量の比較

細胞質タンパクにおける EPAC1、EPAC2、SOCS3 発現量をウェスタンブロット法にて測定した。抽出した細胞質タンパク濃度を Nanodrop[®] で測定し、各サンプルとも 30 μ g の細胞質タンパクを用いた。サンプルに同容量の 2 \times Tris-Glycine SDS Sample Buffer (インビトロジェン) を加え、100 $^{\circ}$ C の沸騰水で5分間加熱処理を行った。EPAC1 測定用サンプルを 6% Tris-Glycine Gel (インビトロジェン)、EPAC2 測定用サンプルを 10%Tris-Glycine Gel (インビトロジェン)、SOCS3 測定用サンプルを 12%Tris-Glycine Gel (インビトロジェン) のウェルに注入し、XCell II SureLock Mini-Cell system (インビトロジェン) を用いて 100 mV 90 分間の電気泳動後、30 mV、60 分間で PVDF メンブレン (インビトロジェン) に転写した。メンブレンを 5% スキムミルクで一晩ブロッキングし、1 次抗体として 1000 倍希釈ラビット由来抗ヒト EPAC1 モノクローナル抗体 (アブカム、東京)、1,000 倍希釈マウス由来抗ヒト EPAC2 モノクローナル抗体 (アブカム、東京)、1,000 倍希釈ラビット由来抗ヒト SOCS3 モノクロー

ナル抗体(アブカム、東京)および1,000倍希釈ラビット由来抗ヒト β -actin 抗体 (CTS ジャパン、東京) を使用した。2 次抗体として 5 万倍希釈抗ラビット IgG 抗体 (GE ヘルスケア、東京) および 10 万倍希釈抗マウス IgG 抗体 (GE ヘルスケア、東京) を使用した。抗体の希釈には Can Get Signal kit (東洋紡績、大阪) を使用した。可視化には化学発光によるウェスタンブロットティング検出システム (ECL advanced、GE ヘルスケア、東京) を用いた。目的タンパク質の発現は、EPAC1 タンパクは 104 kDa、EPAC2 タンパクは 38 kDa、SOCS3 タンパクは 30 kDa、 β -actin タンパクは 45 kDa で認められ、X 線フィルムで露光後、各バンドの定量化を行った。細胞質タンパクにおいては β アクチンを内因性コントロールとし、それぞれに対する発現量の比で EPAC1、EPAC2、SOCS3 タンパクの発現量を測定した (各群 $n=6$)。

8. 統計処理

各々の測定値は平均値 \pm 標準誤差で表示し、Statcel-2 software (OMS publishing、埼玉) を用いて Bonferoni/Dunn 法で解析した。 $P<0.05$ で有意差ありと判断した。

結 果

1. Liraglutide の IL-6 mRNA 発現に対する抑制効果

HUVEC 中の IL-6 mRNA 発現は、コントロール (C

群)に比し、TNF- α を添加したT群では11倍ほどに有意に増強した (11.25 ± 6.79 , $p < 0.05$)。Liraglutideを添加したTL群のIL-6 mRNA発現はC群に比し5.4倍と増強したが、T群に比べ有意に減弱した (5.42 ± 2.71 , $p < 0.05$) (Fig. 1)。

2. Liraglutideの培養液上清中のIL-6タンパク発現に対する抑制効果

酵素免疫測定法を用いた培養液上清中のIL-6タンパク濃度は、C群に比し、T群で有意に高値であった (3.23 ± 0.36 ng/ml, $p < 0.05$)。TL群のIL-6タンパク濃度は、遺伝子発現同様にC群に比し高値であったが、T群と比べると有意に低値であった (2.05 ± 0.24 ng/ml, $p < 0.05$) (Fig. 2)。

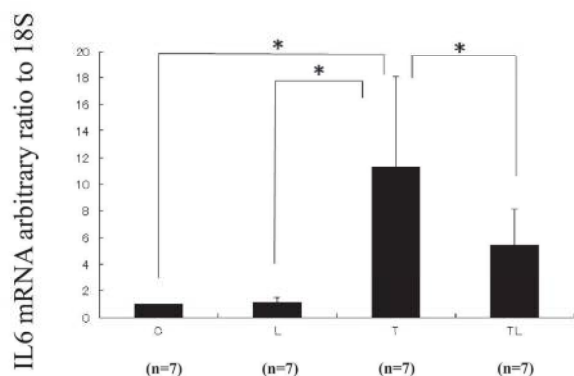


Fig. 1 Inhibition of IL-6 mRNA by liraglutide
Compared with group C, increase in the level of IL-6 mRNA after TNF- α stimulation was eleven-fold higher in group T ($P < 0.05$). This upregulation was attenuated in group TL compared with group T ($P < 0.05$).

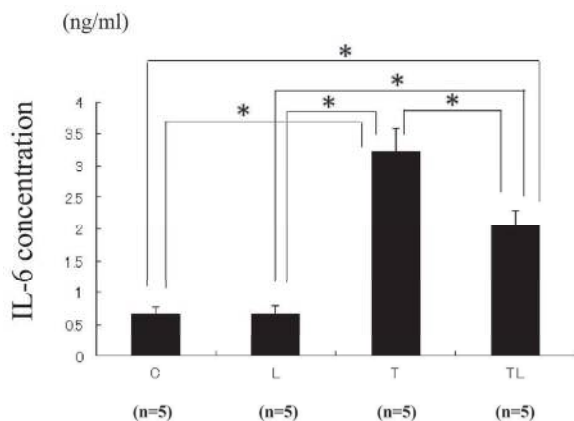


Fig. 2 Inhibition of IL-6 protein level by liraglutide
There was three fold increase of the IL-6 concentration in group T, compared with group C ($P < 0.05$). TNF- α -induced increase in IL-6 concentration was significantly attenuated by liraglutide in group TL ($P < 0.05$).

3. LiraglutideによるEPAC1誘導効果

HUVEC中のEPAC1 mRNA発現は、T群はC群と差を認めない結果であった。Liraglutideのみを添加したL群では、C群、T群、TL群に比し、有意に発現増強を示した (1.76 ± 0.66 , $p < 0.05$) (Fig. 3a)。

EPAC1タンパク発現も遺伝子発現同様に、C群、T群、TL群に比し、L群で有意に発現増強を示した (2.01 ± 0.25 , $p < 0.05$) (Fig. 3b)。

4. LiraglutideによるEPAC2誘導効果

HUVEC中のEPAC2 mRNA発現もEPAC1と同様

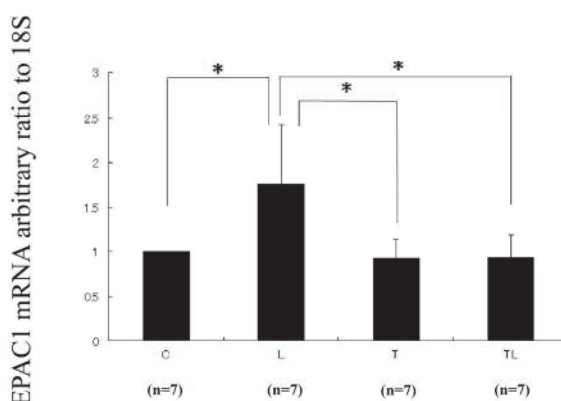


Fig. 3a Up-regulation of EPAC1 mRNA by liraglutide
There was no significant difference between group C and group T. Compared with groups C, T and TL, there was significant increase of EPAC1 mRNA in group L ($P < 0.05$).

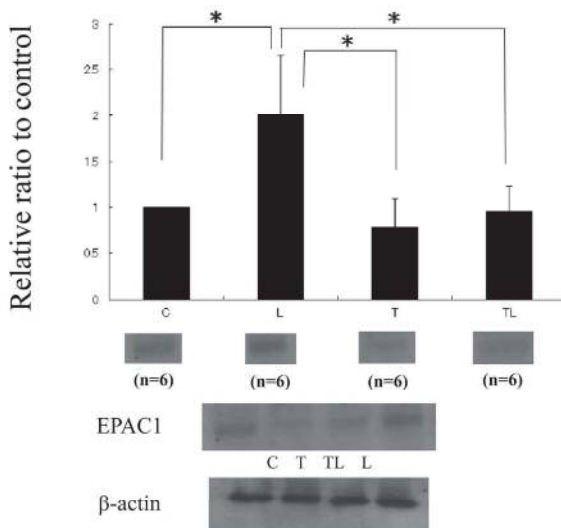


Fig. 3b Up-regulation of EPAC1 mRNA and protein expression by liraglutide
Similarly, there was significant increase of EPAC1 protein expression in group L ($P < 0.05$).

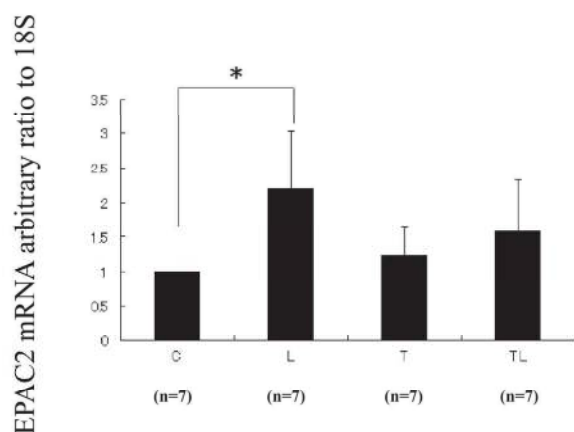


Fig. 4a Up-regulation of EPAC2 protein expression by liraglutide

There was no significant difference between group C and group T in the same way as EPAC1. Compared with group C, there was significant increase of EPAC2 mRNA in group L ($P < 0.05$) (Fig. 4a).

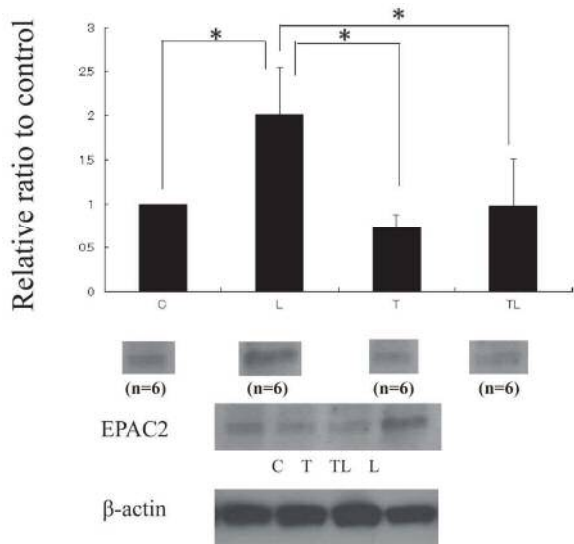


Fig. 4b Up-regulation of EPAC2 mRNA and protein expression by liraglutide

There was significant increase of EPAC2 protein expression in group L compared with groups T and TL ($P < 0.05$) (Fig. 4b).

に、T 群は C 群と差を認めない結果であった。C 群に比し、L 群では有意に発現増強を示した (2.20 ± 0.84 , $p < 0.05$) (Fig. 4a)。

EPAC2 タンパク発現に関しては、L 群は T 群、TL 群に比し、有意に発現増強を示した (2.01 ± 0.25 , $p < 0.05$) (Fig. 4b)。

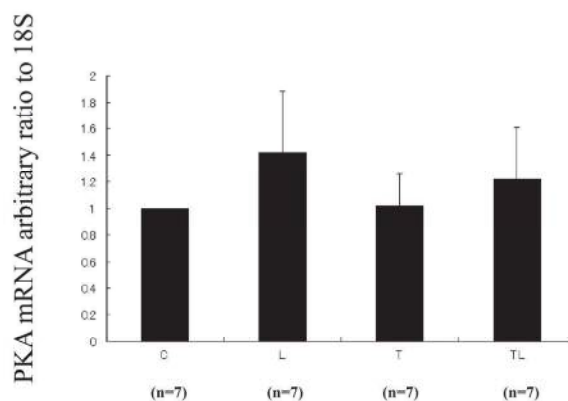


Fig. 5 Up-regulation of PKA mRNA by liraglutide

There was tendency of increase in PKA mRNA expression by liraglutide. However, there was no significant difference among these 4 groups.

5. Liraglutide による protein kinase A (PKA) 誘導効果

HUVEC 中の PKA mRNA 発現に関して、liraglutide を添加した L 群は C 群と、TL 群は T 群とそれぞれ PKA mRNA 発現に関して増強を示す傾向にあったが、各群間で有意な差はなかった (Fig. 5)。

6. Liraglutide による SOCS3 誘導効果

HUVEC 中の SOCS3 mRNA 発現量は TNF- α の添加 (T 群)、TNF- α および liraglutide 添加 (TL 群) に比し、liraglutide 投与 (L 群) で有意に発現増強を示した (1.34 ± 0.44 , $p < 0.05$) (Fig. 6a)。

SOCS3 タンパク発現ではコントロール (C 群)、TNF- α の添加 (T 群) に比し liraglutide 投与群で有意に発現増強を示した (2.85 ± 0.83 , $p < 0.05$) (Fig. 6b)。

考 察

本研究では HUVEC を使用して、GLP-1 受容体作動薬のひとつである liraglutide による膜外作用の抗動脈硬化作用が検討された。活性型 GLP-1 は血管内皮細胞において、高血糖や TNF- α により誘導される plasminogen activator inhibitor type-1 (PAI-1) や vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) の発現を抑制し、抗炎症作用を有すると報告されている⁷⁾。また、GLP-1 受容体作動薬である liraglutide でも TNF α により誘導される血管内皮細胞の接着因子の発現を抑制することが報告されている。Liraglutide が AMP-activated protein kinase (AMPK) を介して endothelial nitric oxide synthase (eNOS) を活性化し、

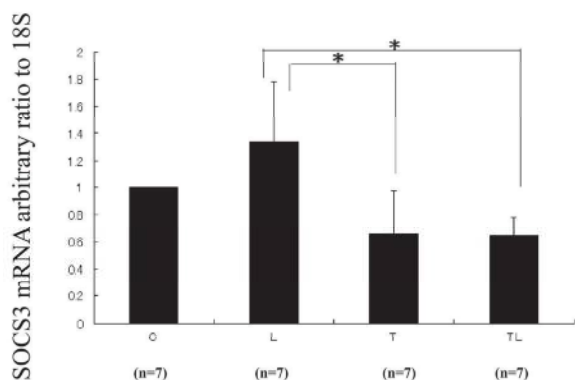


Fig. 6a Up-regulation of SOCS3 protein expression by liraglutide
There was a significant increase of SOCS3 mRNA in group L, compared with groups T and TL ($P<0.05$).

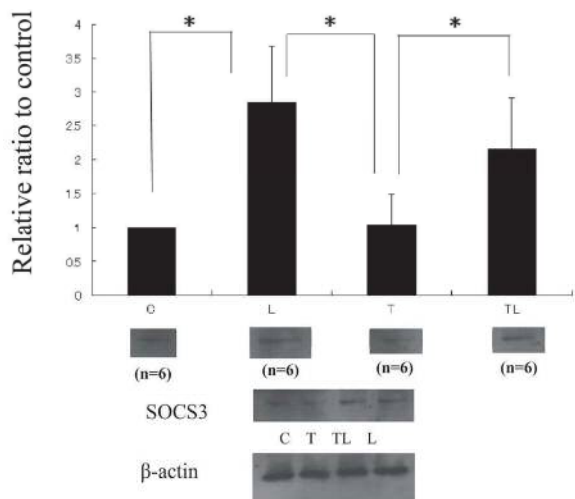


Fig. 6b Up-regulation of SOCS3 mRNA and protein expression by liraglutide
There were significant increases of SOCS3 protein expression in groups L and group TL compared with groups C and T, respectively ($P<0.05$).

Nuclear factor-kappa B (NF- κ B) を抑制することで、TNF- α によって誘導される VCAM-1、intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1)、MCP-1 を抑制するといった機序が想定されている。

我々の検討では、HUVEC において TNF- α の刺激により IL-6 は遺伝子およびタンパクの両方で発現増強し、liraglutide 投与により発現は有意に抑制された。この結果は、IL-6 により活性化される signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) や mitogen-activated protein (MAP) キナーゼなどを介した MCP-1 などの炎症性サイトカイン産生亢進が、

liraglutide 投与により抑制される可能性を示している。我々は、HUVEC において TNF- α の刺激によって MCP-1 産生が亢進し、活性型 GLP-1 の投与によって抑制されることを確認しており (論文投稿中)、liraglutide 投与による IL-6 の発現および産生の抑制が関与した可能性も考えられた。

膵 β 細胞では、GLP-1 が細胞膜表面の G タンパク共役受容体である GLP-1 受容体に結合すると、細胞内 cAMP 濃度の上昇により PKA 依存性経路と EPAC2 などの PKA 非依存性経路を介してインスリン分泌を促進する¹¹⁾。EPAC2 が主に神経細胞や内分泌細胞に発現している一方で、EPAC1 は血管内皮細胞を含め広範な臓器に発現している。血管内皮細胞では EPAC1 が細胞間接着や血管透過性の制御に関わっており、慢性炎症や血管透過性亢進が糖尿病網膜症や動脈硬化などの病態に影響すると考えられている¹²⁾¹³⁾。本研究では liraglutide を投与した L 群で、C 群に比し EPAC1、EPAC2 の mRNA およびタンパク発現が有意に増強していた。しかし、PKA mRNA 発現は C 群と L 群で有意差を認められなかった。本研究では PKA 活性の評価が行われていないため、liraglutide による PKA 依存性経路への評価は不十分と考えられたが、少なくとも血管内皮細胞においては、liraglutide が PKA 非依存性経路である EPAC を介して IL-6 発現抑制に関与することが示唆された。

IL-6 のノックアウトマウスでは動脈硬化病変が抑制されたことから、IL-6 が脂質代謝、血管リモデリング、動脈硬化進展に影響することが示唆されている¹⁰⁾。また、IL-6 は虚血性心疾患のサロゲートマーカーになりうる可能性が指摘されている⁹⁾。今までの知見では、IL-6 は動脈硬化に促進的に作用することが考えられる。それに対して EPAC は、血管内皮細胞において SOCS3 を誘導し IL-6 を抑制することが報告されている¹⁴⁾¹⁵⁾。本研究では、SOCS3 mRNA およびタンパク発現は、C 群に比し L 群で、T 群に比し TL 群でそれぞれ発現増強を認めた。先述のとおり、T 群に比し TL 群では有意に IL-6 mRNA 発現およびタンパク濃度が低く、liraglutide が EPAC を介して SOCS3 の発現増強をもたらし、IL-6 の発現を抑制したものと考えられた。しかし、活性型 GLP-1 とは異なり、liraglutide による血管内皮細胞における抗炎症作用は GLP-1 受容体を介した経路だけではないことも示されており、未知の経

路が存在する可能性も示唆されている⁸⁾。

本研究では EPAC の発現に関して、T 群に比し TL 群では有意な増強が認められなかったにもかかわらず、SOCS3 の発現に関しては有意に増強を認められた。IL-6 は STAT3 や MAP キナーゼを活性化させるほか、SOCS3 も誘導することが知られている。我々は TNF- α 刺激後、いくつかの時間で EPAC の遺伝子およびタンパク発現を検討したが、T 群と TL 群間に有意差を得ることができなかった。そのため、SOCS3 の発現増強に関しては、EPAC のみの経路ではない可能性も残った。また、本研究で使用された liraglutide の投与量は、今までの報告と同程度の用量ではあった。我々の研究では、HUVEC を TNF- α で刺激し MCP-1 mRNA の発現を評価したところ、300 nM の活性化型 GLP-1 を添加することで MCP-1 mRNA の発現を有意に抑制したが、30 nM 以下の用量では有意な発現抑制効果は得られなかった (論文投稿中)。しかし、ヒトの生体内の GLP-1 濃度である 0.01~0.025 nM に比べると明らかに高用量となっており、実際の臨床で使用される用量で本研究と同じ結果が得られるかは不明である。そして、活性化型 GLP-1 と GLP-1 受容体作動薬である liraglutide で作用機序が全くの同一でない可能性も示唆されており、今後もさらなる検討を要する。

結 語

GLP-1 受容体作動薬である liraglutide は、血管内皮細胞 HUVEC において TNF- α 刺激で増強した IL-6 mRNA およびタンパク発現を抑制した。その機序として、liraglutide 投与により、EPAC 発現増強、SOCS3 発現増強が IL-6 発現抑制に関わると考えられた。GLP-1 受容体作動薬は血糖改善作用だけではなく、IL-6 の抑制を介した動脈硬化発症および進展抑制作用をもつ可能性も考えられた。

参 考 文 献

- 1) Edholm T, Degerblad M, Gryback P, Hilsted L, Holst JJ, Jacobsson H, Efendic S, Schmidt PT, Hellstrom PM: Differential incretin effects of GIP and GLP-1 on gastric emptying, appetite, and insulin-glucose homeostasis. *Neurogastroenterol Motil* **22**: 1191-1200, 2010
- 2) Malthew RH, Lauren B, Harvey JG: Endogenous hindbrain glucagon-like peptide-1 receptor activation

contributes to the control of food intake by mediating gastric satiation signaling. *Endocrinology* **150**: 2654-2659, 2009

- 3) Sandoval DA, Bagnol D, Woods SC, D'Alessio DA, Seeley RJ: Arcuate glucagon-like peptide 1 receptors regulate glucose homeostasis but not food intake. *Diabetes* **57**: 2046-2054, 2008
- 4) de Heer J, Rasmussen C, Coy DH, Holst JJ: Glucagon-like peptide-1, but not glucose-dependent insulinotropic peptide, inhibits glucagon secretion via somatostatin (receptor subtype 2) in the perfused rat pancreas. *Diabetologia* **51**: 2263-2270, 2008
- 5) Drucker DJ: Biological actions and therapeutic potential of the glucagon-like peptides. *Gastroenterology* **122**: 531-544, 2002
- 6) Liu H, Hu Y, Simpson RW, Dear AE: Glucagon-like peptide-1 attenuate tumour necrosis factor- α -mediated induction of plasminogen activator inhibitor-1 expression. *Journal of Endocrinology* **196**: 57-65, 2008
- 7) Liu H, Dear AE, Kundsén LB, Simpson RW: A long-acting glucagons-like peptide-1 analogue attenuate induction of plasminogen activator inhibitor type-1 and vascular adhesion molecules. *Journal of Endocrinology* **201**: 59-66, 2009
- 8) Hattori Y, Jojima T, Tomizawa A, Satoh H, Hattori S, Kasai K, Hayashi T: A glucagons-like peptide-1 (GLP-1) analogue, liraglutide, upregulates nitric oxide production and exerts anti-inflammatory action in endothelial cells. *Diabetologia* **53**: 2256-2263, 2010
- 9) Cesari M, Penninx BW, Newman AB, Kritchevsky SB, Nicklas BJ, Sutton-Tyrrell K, Rubin SM, Ding J, Simonsick EM, Harris TB, Pahor M: Inflammatory markers and onset of cardiovascular events results from the Healthy ABC study. *Circulation* **108**: 2317-2322, 2003
- 10) Schieffer B, Selle T, Hilfiker A, Hilfiker-Kleiner D, Grote K, Tietge UJ, Trautwein C, Luchtefeld M, Schmittkamp C, Heeneman S, Daemen MJ, Drexler H: Impact of Interleukin-6 on plaque development and morphology in experimental atherosclerosis. *Circulation* **110**: 3493-3500, 2004
- 11) Ozaki N, Shibasaki T, Kashima Y, Miki T, Takahashi K, Ueno H, Sunaga Y, Yano H, Matsuura Y, Iwanaga T, Takai Y, Seino S: cAMP-GEF II is a direct target of cAMP in regulated exocytosis. *Nat Cell Biol* **2**: 805-811, 2000
- 12) Cullere X, Shaw SK, Andersson L, Hirahashi J, Lusinskas FW, Mayadas TN: Regulation of endothelial barrier function by EPAC, a cAMP-activated exchange factor for Rap GTPase. *Blood* **105**: 1950-1955, 2005
- 13) Kooistra MR, Corada M, Dejana E, Bos JL: Epac1 regulates integrity of endothelial cell junctions through VE-cadherin. *Federation of European Bio-*

- chemical Societies **579** : 4966-4972, 2005
- 14) Sands WA, Woolson HD, Milne GR, Rutherford C, Palmer TM : Exchange protein activated by cyclic AMP (EPAC)-Mediated induction of suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS-3) in vascular endothelial cells. *Ame Society for Microbiology* **26** : 6333-6346, 2006
- 15) Melanie M, Berthouze M, Morel E, Crozatier B, Gomeza AM, Lezoualc'h F : Role of the cAMP-binding protein Epac in cardiovascular physiology and pathophysiology. *European Journal of Physiology* **459** : 535-546, 2010

Inhibition of atherosclerosis by glucagon-like peptide-1 receptor agonist in endothelial cells

Takako OKUMURA, Takashi TANABE, Nuliguli AILI, Kazushige KONNO, Rokuro ITO, Hiroyuki SAKAI, Akira KANAZAWA, Masato ODAWARA

Division of Diabetes, Metabolism and Endocrinology, the Third Department of Internal Medicine, Tokyo Medical University

Abstract

Background : Incretin-based agents, especially glucagon-like peptide-1 (GLP-1) receptor agonist agents, have been used recently to treat type 2 diabetes. Recent reports demonstrated that these agents improved endothelial cell dysfunction in diabetic patients. Interleukin-6 (IL-6) is a potent inducer of the acute phase response, and is associated with endothelial cell dysfunction and formation of atherosclerotic lesions. However, it is not well understood how GLP-1 receptor agonist agents act on endothelial cell dysfunction through IL-6. We investigated whether liraglutide, which is one of the GLP-1 receptor agonist agents, attenuates IL-6 expression induced by tumor necrosis factor α (TNF- α) stimulation.

Methods : Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were divided into four groups, control group (C), L group treated with 300 nM liraglutide (L), T group treated with 10 ng/ml of TNF- α (T), TL group treated with 10 ng/ml of TNF- α and 300 nM liraglutide (TL). We collected HUVECs to evaluate gene expression and protein expression, and culture supernatant to measure the level of IL-6 after TNF- α stimulation.

Result : IL-6 mRNA and protein expression in T group were markedly up-regulated in response to TNF- α stimulation comparing with C group. This up-regulation was attenuated by liraglutide in the TL group. The gene expression and the protein expression of cAMP/cAMP-regulated guanine nucleotide exchange factors-1 (EPAC1) and EPAC2 in L group were up-regulated comparing with C group ($P < 0.05$). The protein expression of the suppressor of cytokine signaling (SOCS3) in L group or TL group was up-regulated compared with C group or T group, respectively ($P < 0.05$). However, there was no significant difference in protein kinase A (PKA) mRNA expression among these 4 groups.

Conclusion : Liraglutide attenuated IL-6 gene expression and protein expression in HUVECs after TNF- α stimulation through PKA-independent pathway.

<Key words> : Human umbilical vein endothelial cell (HUVEC), Interleukin-6 (IL-6), cAMP/cAMP-regulated guanine nucleotide exchange factors-1 (EPAC1), Suppressor of cytokine signaling-3 (SOCS3), Glucagon-like peptide-1 (GLP-1)
