

論文の内容の要旨

論文題目 DPP-4 阻害薬の血管内皮細胞を介した骨格筋インスリン抵抗性改善作用に関する研究

氏名 佐藤寛之

【背景と目的】

現在、わが国における2型糖尿病患者数が急速に増加しており、国民の約4人に1人が糖尿病かその予備軍であることが明らかとなっている。欧米人に比して日本人のインスリン分泌能は半分ほどであるという遺伝因子に加えて、運動不足や食生活の乱れという環境因子による肥満に伴うインスリン抵抗性が進んだ結果、インスリンの相対的な作用不足となり、2型糖尿病患者の増加を引き起こしていると考えられる。

骨格筋はヒトにおける最大のグルコース消費臓器であり、骨格筋におけるインスリン抵抗性は2型糖尿病やメタボリックシンドロームを誘発し、様々な合併症を引き起こす要因と考えられている。血中に存在するインスリンが骨格筋における糖取り込みを行うためには、インスリンが骨格筋に分布する毛細血管に到達後、骨格筋間質へ移行し、骨格筋細胞の表面に発現するインスリン受容体に結合する必要がある。一方で、骨格筋におけるインスリン移行は肝臓に比して緩徐であり、インスリンによる糖取り込みも肝臓に比べて緩やかであると報告されている。つまり、骨格筋のインスリン抵抗性発生メカニズムの一つとして、インスリンの骨格筋間質への移行が通常よりも緩やかとなり、骨格筋における正常なインスリン依存性の糖取り込みが障害されていることが示唆される。しかし、血液中に存在するインスリンの骨格筋への移行がどのように調節されているのかについての詳細なメカニズムは十分に解明されていない。

そこで当研究室では以前、血管内皮細胞において重要な役割を担うインスリン受容体の基質の一つである *insulin receptor substrate* (IRS) 2 を血管内皮細胞で特異的に欠損したマウス (ETIrs2 欠損マウス) を作成した。本マウスでは、インスリンによる eNOS の活性化が弱く、毛細血管の拡張能が障害され、骨格筋間質へのインスリン移行が不足するために、骨格筋におけるインスリン依存性の糖取り込みが減少していた。

近年、食事の刺激により消化管から分泌されるホルモンとして、グルコース依存性インスリン分泌刺激ポリペプチド (GIP) 及びグルカゴン様ペプチド-1 (GLP-1) が確認されている。小腸の K 細胞及び L 細胞からそれぞれ分泌され、GIP 受容体及び GLP-1 受容体を介してグルコース濃度依存的に膵臓からのインスリン分泌を促進することが確認されている。特に GLP-1 が注目されているが、GLP-1 は血中に存在する GLP-1 の分解酵素である *dipeptidyl peptidase 4* (DPP-4) という酵素により速やかに分解されてしまう。そのため、DPP-4 によって不活性化されにくい GLP-1 受容体作動薬及び DPP-4 阻害薬の開発が行われている。

GLP-1 受容体は膵臓だけでなく様々な臓器に発現していることが確認されており、多彩な

作用を有することが確認されている。中でも、GLP-1 受容体作動薬は高脂肪食を負荷したラットの骨格筋に分布する毛細血管の血流量を改善し、骨格筋の糖取り込みを改善した報告がある。さらに、GLP-1 受容体作動薬が血管内皮細胞中でプロテインキナーゼ A (PKA) を介して血管内皮一酸化窒素合成酵素 (eNOS) のリン酸化を亢進することも確認されている。これらのことより、GLP-1 受容体作動薬が血管内皮細胞中で eNOS を活性化することで毛細血管の血流量を増加し、骨格筋における糖取り込みを改善する可能性が示唆される。一方、DPP-4 は多くの組織に存在し、可溶性タンパク質として血液中にも存在しており、GLP-1 及び GIP 以外にも様々なペプチドを基質としている。そのため、DPP-4 阻害薬は GLP-1 以外の作用も期待できる薬剤である。

そこで本研究では、DPP-4 阻害薬の一つであるアナグリプチンが ETIrs2 欠損マウスで認めた毛細血管拡張能の低下、間質へのインスリン移行障害及びインスリン依存性の骨格筋における糖取り込み低下を血管内皮細胞の eNOS を介して改善するかどうか検討した。

【結果】

結果 1. アナグリプチンは ETIrs2 欠損マウスで認めたインスリン依存性の骨格筋の糖取り込み低下を改善する

アナグリプチンを ETIrs2 欠損マウスに 8 週間投与した際の血漿中アナグリプチン濃度は約 1200 ng/ml であり、健康成人にアナグリプチンを投与した際と同程度であった。その時の血漿中 DPP-4 活性は 90% 近く阻害され、血漿中活性型 GLP-1 濃度は有意に増加した。一方、体重や摂餌量等は 3 群間で差はなかった。これらの結果より、アナグリプチンは体重や摂餌量に影響を及ぼすことなく、血漿中活性型 GLP-1 濃度を増加させることが分かった。

続いて、インスリン抵抗性の評価を行うため、インスリン負荷試験を実施した。当研究室で以前報告した通り、ETIrs2 欠損マウスではコントロールマウスに比して、インスリンによる血糖低下作用が弱くインスリン抵抗性を呈したが、アナグリプチンを投与することでコントロールマウスと同程度にまでインスリン抵抗性が改善した。同様に、高インスリン正常血糖クランプ法を実施した際に ETIrs2 欠損マウスで低下していたグルコース注入速度 (GIR) は、アナグリプチンを投与することで有意に改善した。さらに、アナグリプチン投与群ではコントロールマウス群と同程度にまで骨格筋の糖取り込み率 (Rd) が改善した。一方で、肝臓における糖産生量 (EGP) については 3 群間で有意な差はなかった。これらの結果より、アナグリプチンは ETIrs2 欠損マウスで認めたインスリン依存性の骨格筋の糖取り込み低下を改善することが明らかとなった。

結果 2. アナグリプチンは ETIrs2 欠損マウスで認めたインスリンによる毛細血管拡張能や間質のインスリン濃度の減少を改善する

アナグリプチンによるインスリン依存性の骨格筋の糖取り込み低下改善メカニズムを確認するため、高インスリン正常血糖クランプ法を実施後の毛細血管血流量を測定した。その結

果, ETIrs2 欠損マウスで認めたインスリンによる毛細血管拡張能の低下は, アナグリプチンを投与することでコントロールマウスと同程度にまで改善した。さらに, 高インスリン正常血糖クランプ法を実施後の骨格筋間質のインスリン濃度を測定したところ, 血漿中インスリン濃度は3群間で差がなかったにも関わらず, ETIrs2 欠損マウスで認めた骨格筋間質のインスリン濃度低下はアナグリプチンの投与により有意に改善した。

続いて, 骨格筋のインスリンシグナルを確認するため, マウスの下大静脈からインスリンを投与して60分経過後の骨格筋を単離してウェスタンブロット法を実施した。その結果, ETIrs2 欠損マウスで認めた骨格筋のインスリン受容体 (IR β) 及び Akt のリン酸化低下は, アナグリプチン投与により有意に改善した。一方で, 単離後の骨格筋にインスリンを添加した際の IR β 及び Akt のリン酸化は3群間で差はなかった。これらの結果より, アナグリプチンは骨格筋自体に作用するのではなく, 骨格筋に分布する毛細血管の血流量低下を改善し, 骨格筋間質へのインスリンの移行障害を改善することで, 骨格筋におけるインスリンシグナルの活性低下を改善することが明らかとなった。

結果3. アナグリプチンは ETIrs2 欠損マウスで認めたインスリンによる毛細血管拡張能の低下を NO 依存性に改善する

アナグリプチンによる毛細血管拡張能の低下改善作用が一酸化窒素 (NO) 依存的メカニズムかどうか確認するため, 一酸化窒素合成酵素 (NOS) 阻害剤である L-NAME を3群ともに投与した。その結果, インスリン投与前の毛細血管血流量については6群間で差はなかったが, アナグリプチン投与群で認めたインスリン投与60分後の毛細血管血流量低下改善作用は L-NAME 投与によってキャンセルされた。すなわち, アナグリプチンは ETIrs2 欠損マウスで認めたインスリンによる毛細血管拡張能の低下を NO 依存性に改善することが明らかとなった。

結果4. GLP-1 は血管内皮細胞中で PKA を介して eNOS をリン酸化する

血管内皮細胞における GLP-1 の作用を検証するため, まず初めに, 使用した血管内皮細胞の GLP-1 受容体の発現を確認した。続いて, GLP-1 添加10, 30及び60分後の eNOS のリン酸化及び eNOS のタンパク発現量を確認した。その結果, GLP-1 の添加により eNOS のタンパク発現量に変化はなかったが, GLP-1 添加30及び60分後に eNOS がリン酸化されることが分かった。一方, アナグリプチンを細胞に直接添加しても, eNOS のリン酸化及びタンパク発現量に変化はなかった。つまり, アナグリプチンによる直接作用ではなく, アナグリプチンの投与によって増加した GLP-1 が eNOS を活性化する可能性が示唆された。さらに, PKA 阻害剤の存在下では, GLP-1 による eNOS のリン酸化が見られなかった。また, AMP 活性化プロテインキナーゼ (AMPK) のリン酸化を確認したが, 本条件下では GLP-1 による AMPK のリン酸化は見られなかった。

【考察】

本研究において、ETIrs2 欠損マウスで認められた骨格筋に分布する毛細血管拡張能の低下、骨格筋間質へのインスリン移行障害及び骨格筋におけるインスリン依存性の糖取り込み低下をアナグリプチンが有意に改善することを明らかにした。また、アナグリプチンによるこれらの改善作用は、GLP-1 や NO を介した作用であることを示唆する結果を得た。さらに、血管内皮細胞において、アナグリプチンによる直接作用ではなく、アナグリプチンによって増加した GLP-1 が PKA を介して eNOS を活性化する可能性が考えられた。すなわち、アナグリプチンは骨格筋に分布する毛細血管内皮細胞において、GLP-1 を介して eNOS を活性化し、NO 依存的に毛細血管拡張能を改善することで、骨格筋間質へのインスリン移行を増加し、骨格筋におけるインスリン依存性の糖取り込みを改善する可能性が示唆された。