

審査の結果の要旨

氏名 佐藤寛之

本研究は糖尿病治療薬である DPP-4 阻害薬の一つアナグリプチンが血管内皮細胞を介して骨格筋インスリン抵抗性を改善するか明らかにするため、遺伝子欠損マウスを用いた系において検討したものであり、下記の結果を得ている。

1. アナグリプチンを血管内皮特異的 insulin receptor substrate (Irs) 2 (ETIrs2) 欠損マウスに 8 週間混餌投与すると、血漿中アナグリプチン濃度は約 1200 ng/ml 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ていた。一方、体重や摂餌量等は 3 群間で差はなかった。
2. 投与終了時にインスリン負荷試験を実施したところ、ETIrs2 欠損マウスではインスリン抵抗性を呈していたが、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ていた。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ていた。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) が改善していた。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示された。
3. 投与終了時に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ところ、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ていた。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ていた。続いて、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示された。
4. 一酸化窒素合成酵素 (NOS) 阻害剤である L-NAME を 3 群に投与したところ、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られたインスリン投与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ていた。すなわち、アナグリプチンはETIrs2欠損マウスで認められ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示された。

5. ヒト冠状動脈内皮細胞にGLP-1受容体が発現していることをpolymerase chain reaction (PCR)により確認した。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ところ、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がリン酸化されていた。一方、アナグリプチンではeNOSのリン酸化及びタンパク発現量は変化していなかった。また、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ていなかった。さらに、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ていなかった。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PKAを介してeNOSを活性化していることが示された。

以上、本論文はDPP-4阻害薬の一つであるアナグリプチンが血管内皮細胞を介して骨格筋インスリン抵抗性を改善することを明らかにした。本研究はDPP-4阻害薬の新たな薬理作用を明らかとし、学位の授与に値するものと考えられる。

よって本論文は博士（医学）の学位請求論文として合格と認められる。