

## 論文の内容の要旨

論文題目 Anti-inflammatory role of DPP-4 inhibitors in a non-diabetic model of glomerular injury.

(非糖尿病性糸球体腎炎モデルにおける DPP-4 阻害薬の腎保護効果に関する検討)

氏名 東島佳毅

【背景】我々生体は食事刺激に応じて消化管からインクレチンホルモンである glucagon-like peptide-1 (GLP-1) および glucose-dependent insulintropic polypeptide を分泌する。インクレチンは膵β細胞に発現する受容体に作用し、インスリン分泌を促進することで血糖依存性に血糖値を低下させる。通常インクレチンは dipeptidyl peptidase-4 (DPP-4) という酵素によって速やかに分解される。現在 GLP-1 受容体作動薬および DPP-4 阻害薬が新規糖尿病治療薬として広く使用されるようになってきている。これらインクレチン関連薬は血糖依存性に血糖値を低下させるため、従来の糖尿病治療薬と比較して低血糖のリスクが少ないという点から注目されている。さらに様々な糖尿病モデルにおいてインクレチン関連薬による GLP-1 受容体の活性化が細胞増殖促進および抗アポトーシス作用を介して膵β細胞の機能を改善する可能性が報告されており、この効果はヒト臨床試験においても認められている。

GLP-1 受容体は膵β細胞だけでなく、脳、肺、心臓、腎臓など様々な臓器で発現しており、GLP-1 の膵外臓器での保護作用についても注目されている。腎臓ではインクレチン関連薬が血糖降下作用とは独立して腎保護作用を示す可能性が数多く報告されている。また実際に2型糖尿病患者におけるランダム化比較試験において DPP-4 阻害薬が血糖降下作用とは独立してアルブミン尿を改善することも示されている。しかしながら、非糖尿病性腎症モデルについて検討した報告は限られており、糸球体疾患モデルについて検討した報告は未だない。そこで私は今回、ラット Thy-1 腎炎モデルを用いて DPP-4 阻害薬の糸球体腎炎モデルにおける腎保護効果について検討した。

【結果】本研究では DPP-4 阻害薬として alogliptin または anagliptin を用い、GLP-1 受容体作動薬として exendin-4 を用いた。メサンギウム細胞に発現する Thy-1.1 抗原に対するモノクローナル抗体 (OX-7) を尾静脈投与 (1.2 mg/kg) することでラット Thy-1 腎炎を

誘導した。本モデルでは OX-7 投与後数時間以内にメサンギウム細胞の変性や細胞死が起こり、第 2-3 病日にメサンギウム融解と呼ばれる特徴的病変が認められる。その後メサンギウム増殖、半月体の形成が認められ、第 7 病日が病態のピークとなる。まず始めに本モデル病態早期における DPP-4 阻害薬の腎保護効果について病理学的に検討したところ、第 3 病日において alogliptin 投与による糸球体障害の軽減は認められなかった。次に第 7 病日について調べたところ alogliptin 投与による糸球体障害およびタンパク尿の改善傾向が認められた。

ストレプトゾトシン誘発 1 型糖尿病モデルにおいて DPP-4 阻害薬が糸球体へのマクロファージ浸潤抑制を介してアルブミン尿およびメサンギウム増殖を改善する可能性が報告されている。そこで本モデルにおける DPP-4 阻害薬のマクロファージ浸潤に対する影響について調べた。本モデルにおいて alogliptin 投与は CD68 陽性マクロファージの腎臓への浸潤を有意に抑制した。さらにこのマクロファージ浸潤抑制効果は anagliptin 投与によっても同様に認められたことから、マクロファージ浸潤抑制は DPP-4 阻害薬に共通した効果であると考えられた。次に DPP-4 阻害薬のマクロファージ極性に対する影響について検討した。CD169 (M1 マーカー) の免疫組織学的検出が技術的に困難であったため、CD163 (M2 マーカー) および CD206 (M2 マーカー) 陽性マクロファージについて評価を行ったところ、CD163 および CD206 陽性マクロファージ数は alogliptin 投与によって変化しなかった。このことから本モデルにおいて alogliptin は主に炎症性の M1 様マクロファージ浸潤を抑制する可能性が示唆された。さらにマクロファージ浸潤に関わるいくつかのケモカインおよびサイトカインの腎臓での遺伝子発現を定量 PCR 法にて調べたところ、alogliptin 投与は monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) および regulated on activation, normal T cell expressed and secreted (RANTES) の発現に影響を与えなかった。一方、alogliptin 投与による chemokine (C-C motif) receptor 2、chemokine (C-C motif) receptor 5、interleukin-1 beta および interleukin-6 の発現低下傾向が認められた。

DPP-4 阻害薬による上記マクロファージ浸潤抑制効果が GLP-1 シグナルを介しているかどうかについて検討するために、同モデルを用いて exendin-4 投与実験を行った。exendin-4 投与は糸球体障害およびタンパク尿を改善しなかったが、興味深いことに腎臓への CD68 陽性マクロファージ浸潤を有意に抑制した。この時 CD163 陽性マクロファージ数の増加が認められた。さらに exendin-4 投与によって、腎における tumor necrosis factor-alpha 遺伝子発現は有意に低下し、RANTES、chemokine (C-C motif) receptor 2、chemokine (C-C motif) receptor 5、interleukin-1 beta、および interleukin-6 遺伝子については発現低下傾向が認められた。

最後に DPP-4 阻害薬および GLP-1 受容体作動薬のマクロファージ浸潤に対する直接の影響について調べるために ex vivo 細胞遊走試験を行った。マクロファージ様細胞株 RAW264 において DPP-4 および GLP-1 受容体の遺伝子発現が認められなかったため、マウス腹腔マクロファージを用いて実験を行った。その結果、exendin-4 は MCP-1 誘導性マ

クロファージ浸潤を用量依存性に抑制した。一方でこの効果は alogliptin では認められなかったことから、ラット Thy-1 腎炎モデルにおける DPP-4 阻害薬のマクロファージ浸潤抑制効果は GLP-1 を介した可能性が示唆された。

【考察】近年、インクレチン関連薬が糖尿病性腎症モデルにおいて腎保護作用を示す可能性が数多く報告されており、その作用機序としてインクレチンの抗アポトーシス、抗炎症、抗酸化ストレス作用が想定されている。非糖尿病モデルにおける報告は少ないものの、急性腎不全モデルでは GLP-1 受容体作動薬が抗アポトーシス作用を介してシスプラチン腎症を改善することや DPP-4 阻害薬が抗炎症作用を介して腎虚血再灌流障害を軽減することが示されている。本研究において私は未だ報告がない糸球体腎炎モデルにおける DPP-4 阻害薬の腎保護効果について検討を行った。

篠崎らは過去にラット Thy-1 腎炎モデルにおいて抗 DPP-4 抗体投与が糸球体障害およびタンパク尿を劇的に改善することを報告した。しかしながら今回の私の研究では DPP-4 阻害薬による糸球体障害およびタンパク尿の軽減は軽微なものであった。DPP-4 は基質分解酵素として重要な機能を持つ一方で、表面抗原 CD26 とも呼ばれ、受容体や共刺激分子としても重要な働きを担っている。例えば T 細胞に発現する DPP-4/CD26 は T 細胞活性化抗原として知られるが、T 細胞の活性化に酵素活性は関与しない。ラット Thy-1 腎炎モデルでは CD4 陽性 T 細胞から産生される Th1 サイトカインが腎障害の進展に関与することや Th1 サイトカインの抑制が腎障害を改善することが報告されている。従って本モデルでは酵素としての DPP-4 ではなく表面抗原としての DPP-4/CD26 を介した Th1 シグナルが腎障害の進展に重要である可能性が考えられた。DPP-4 阻害薬による糸球体障害およびタンパク尿の軽減が軽微であった理由として、DPP-4 阻害薬では Th1 シグナル抑制が不十分であった可能性が示唆された。

本研究では2つの異なる DPP-4 阻害薬においてマクロファージ浸潤抑制効果が認められた。さらに GLP-1 受容体作動薬もマクロファージ浸潤を抑制した。DPP-4 阻害薬および GLP-1 受容体作動薬どちらを用いた実験においても MCP-1、RANTES などのケモカイン遺伝子の発現に変化は認められなかった。また ex vivo 細胞遊走試験においてマクロファージ浸潤抑制効果は GLP-1 受容体作動薬でのみ認められ、DPP-4 阻害薬では認められなかった。以上よりラット Thy-1 腎炎モデルにおいて DPP-4 阻害薬は GLP-1 シグナルを介してマクロファージ浸潤を抑制する可能性が考えられた。

一般的にマクロファージ浸潤は糸球体腎炎の増悪因子と考えられている。nephrotoxic serum モデルにおいて MCP-1 中和抗体がマクロファージ浸潤抑制を介して糸球体障害およびタンパク尿を改善することが報告されている。また、ループス腎炎モデルにおいて MCP-1 遺伝子を欠損させると糸球体障害およびタンパク尿の減少が認められ、この腎保護効果にマクロファージ浸潤抑制が関与していることも示されている。ラット Thy-1 腎炎モデルでも macrophage-stimulating protein 中和抗体によるタンパク尿の改善が報告されている。本研究において DPP-4 阻害薬はマクロファージ浸潤を有意に抑制し、糸球体障害お

よびタンパク尿を軽減した。従って本モデルにおいて認められた DPP-4 阻害薬の腎保護効果はマクロファージ浸潤抑制を介している可能性が考えられた。

近年、マクロファージは炎症性の M1 様マクロファージおよび抗炎症性の M2 様マクロファージに大別されると考えられている。しかしながら、M2 様マクロファージが腎疾患の進行に保護的に働くかどうかについては未だ議論の最中である。Thy-1 腎炎モデルにおいてプレドニゾロンは M2 様マクロファージを増加してメサンギウム増殖および糸球体硬化を悪化させるが、一方でミゾリビンは M2 様マクロファージを減少して糸球体障害を改善することが報告されている。さらにエリスロポエチン製剤による Thy-1 腎炎の軽減に M2 様マクロファージの減少が関与することも報告されている。このことから Thy-1 腎炎モデルにおいて M2 様マクロファージは病態悪化に関与している可能性が考えられる。本研究において DPP-4 阻害薬、GLP-1 受容体作動薬どちらもマクロファージ浸潤を抑制したにも関わらず、DPP-4 阻害薬のみが糸球体障害に対して改善傾向を示した。一方、DPP-4 阻害薬は M2 様マクロファージに影響を与えなかったのに対して、GLP-1 受容体作動薬は M2 様マクロファージ数を増加した。このことから GLP-1 受容体作動薬による M2 様マクロファージの増加が DPP-4 阻害薬では認められた腎保護効果を打ち消した可能性が示唆された。

以上より、ラット Thy-1 腎炎モデルにおいて DPP-4 阻害薬は GLP-1 シグナルを介してマクロファージ浸潤を抑制することで腎保護効果を示す可能性が示唆された。DPP-4 阻害薬が非糖尿病性糸球体腎炎に対しても有効となる可能性が考えられた。今後 DPP-4 阻害薬の腎保護効果について臨床研究を含めて更なる研究が期待される。