

論文の内容の要旨

論文題目 Dipeptidyl peptidase-4 inhibition attenuates cisplatin-induced acute kidney injury via increasing glucagon-like peptide-1
(Dipeptidyl peptidase-4 阻害薬によるシスプラチン急性腎障害の改善効果の検討)

氏名 片桐大輔

1. 背景

急性腎不全(Acute Renal Failure; ARF)とは、急激な腎機能の低下の結果、体液の恒常性が維持できなくなった状態を指す。窒素老廃物および過剰な体液の貯留に加えて、電解質・酸塩基平衡異常が主な症候である。これまで ARF という病態は、主に外来や一般病棟において発症し、腎毒性物質や外傷などを原因とした急激な腎機能低下が主体であった。障害臓器も比較的腎臓に限局しており、血液透析の臨床応用によって ARF 症例の死亡率は大幅に改善した。その後、高齢者社会の到来、侵襲度の高い医療技術の進歩に伴い、集中治療室 (ICU) において敗血症や多臓器不全とともに生じる急性の腎障害の頻度が増加した。このような病態を Acute kidney injury (AKI) という新たな概念で捉えることが提唱された。AKI という言葉の中に用いられている Injury は、血清クレアチニン上昇に象徴される腎機能低下・不全 (failure) よりも先行して生じた病態を指しており、より早期に腎障害を検出して適切なタイミングで治療介入を試みるのが強く意識されている。2012 年に発表された KDIGO (Kidney Disease : Improving Global Outcomes) の AKI ガイドラインでは重症度に応じたマネージメントの記載があったが、現在高いエビデンスレベルを持って有効性が証明された腎性 AKI に対する治療法はなく、治療の中心となるのは保存的治療である。Cardiorenal syndrome という概念が普及しているように、心臓、あるいは肺や肝臓、脳神経、腸管など遠隔臓器と腎臓は互いに関連していることがこれまで基礎研究を中心に分かってきている。従来報告では AKI に伴って遠隔臓器に障害が及ぶ pathway について検討がなされていることが多く、AKI の状況において遠隔臓器から腎保護的な作用が及ぶ可能性については、Hepatocyte growth factor (HGF) などごく一部のものを除いてはこれまで報告されていない。

グルカゴン様ペプチド 1 (glucagon-like peptide-1: GLP-1) は腸管由来のインクレチンのひとつである。GLP-1 はインスリン分泌を促進して糖代謝に関わるため、糖尿病治療薬として広く用いられている。GLP-1 は生体内に広く分布する Dipeptidyl Peptidase-4 (DPP-4) により速やかに不活化される性質を持つため、血中の活性型 GLP-1 濃度を高く保つために DPP-4 阻害薬あるいは長時間作用型の GLP-1 受容体作動薬が開発されてきた。GLP-1 受容体 (GLP-1R) は 7 回膜貫通型の G 蛋白共役型受容体 (GPCR) であり、その発現部位は膵臓 β 細胞だけでなく、中枢神経系、肺、腎臓、心臓、消化管など多くの臓器に渡る。GLP-1 の糖代謝以外の作用として、膵臓 β 細胞

を中心とした検討で、抗アポトーシス効果が近年注目されている。

シスプラチン (CP) は頭頸部癌、生殖泌尿器系癌、肺癌などで用いられるが、用量依存的に AKI を起こしうる薬剤として知られている。シスプラチンによる AKI (CP-AKI) では急性尿細管壊死 (Acute Tubular Necrosis: ATN) が代表的であり、近位尿細管細胞のアポトーシスを病態の中心として、酸化ストレスの関与などが病態形成に関わることが知られている。我々は上記のような GLP-1 シグナルの持つ抗アポトーシス効果を中心とした潜在的な細胞保護効果に注目し、腎尿細管細胞障害を起こすシスプラチン腎症をモデルとしてその効果を検討した。

2. 研究の要旨

2-1. アログリプチン (AG) は CP-AKI における腎障害、酸化ストレスを軽減する。

25-30 g の C57/B16 雄マウスに選択的 DPP-4 阻害薬であるアログリプチン (AG) 10 mg/kg/日あるいは生理食塩水を連日経口投与し、投与 7 日目に 15 mg/kg のシスプラチンを腹腔内投与する。シスプラチン投与直前 (0)、24、48、72、96 時間後に採血し 96 時間後に採材して腎機能、組織学的所見を評価する。血中尿素窒素 (BUN)、血中クレアチニン (sCre) を測定し機能的な障害を、PAS 染色によって組織学的な尿細管障害を評価した。CP 投与後 72 時間、96 時間で著明な BUN, Cre の上昇がみられたがこれらは AG 投与群では抑制された。PAS 染色では CP 投与に伴う微絨毛の消失や cast 形成などの尿細管障害が AG 投与によって抑制された。AG 投与に伴った有意な体重変化や血糖変動は認めなかった。免疫組織染色では 8-Hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) 染色および 4-hydroxy-nonenal (4-HHE) 染色にて酸化ストレスの程度を評価したところ、CP 投与に伴う 8-OHdG および 4-HHE 陽性集積が AG 投与群では抑制されていた。

2-2. AG は CP-AKI における腎アポトーシスを軽減する。

single stranded DNA (ssDNA) 染色 および cleaved caspase-3 染色を用いて腎尿細管アポトーシスの程度を評価した。CP 注射 96 時間後では ssDNA および cleaved caspase-3 陽性尿細管細胞の著明な増加が見られたが、AG 投与によってこれらは有意に改善された。CP-AKI においてアポトーシス関連因子が重要であり、特にアポトーシス促進因子 (Bax, Bim) とアポトーシス制御因子 (Bcl-2 と Bcl-xL) のバランスが、細胞死を規定すると報告されている。凍結させた Whole kidney homogenates から RNA を回収し、cDNA を得たのち、アポトーシス因子 (Bax, Bim) および抗アポトーシス因子 (Bcl-2, Bcl-xL) の発現に関してリアルタイム PCR を用いて定量化評価したところ CP 注射によってアポトーシス促進/制御因子 mRNA 比が亢進していたが、これらは AG 治療によって有意に低下した。

2-3. DPP-4 活性と CP-AKI における DPP-4 の基質。

DPP-4 活性を血中と腎組織の両方で enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) を用いて検討したところ、AG 投与によって両者とも有意に活性が抑制されていた。昨年、ベルギーのグループより DPP-4 阻害薬によってラットの虚血再灌流モデルで腎障害が改善されたという報告

があったが、その中では DPP-4 のどの基質が腎保護に関与したかの検討はされていなかった。DPP-4 は GLP-1 以外にも代表的な基質として stromal cell-derived factor-1 (SDF-1)、neuropeptide Y (NPY) が知られているため、これらについて評価した。AG の前投与では GLP-1 濃度に変化はなかったものの、CP 注射 48 時間後より血中 GLP-1 濃度の上昇が見られ、非治療群に比べて有意に高値であった。GLP-1 と対照的に、SDF-1 濃度や NPY 濃度は AG 非治療群で AG 治療群に比べて高い傾向を示した。以上より GLP-1 の濃度上昇が CP-AKI における AG の腎保護効果に重要な役割を担っている可能性が示唆された。

2-4. GLP-1 受容体作動薬による CP-AKI での腎保護効果について。

CP-AKI における GLP-1 の役割を明確にすべく、GLP-1 受容体作動薬である Exendin-4 (Ex-4) 100 pmol/kg あるいは生理食塩水を連日経口投与して 7 日目に CP を投与するモデルも検討した。Reverse Transcription (RT)-PCR を用いて正常腎に GLP-1R の発現を確認した。CP 投与あるいは AG, Ex-4 投与によってその発現レベルに変化は認めなかった。Ex-4 投与によって AG と同じように腎保護効果を BUN, Cre, PAS 染色で確認し、ssDNA や cleaved casase-3 陽性細胞の抑制およびリアルタイム PCR を用いての定量化評価でも CP 注射によるアポトーシス促進/制御因子 mRNA 比の亢進は Ex-4 治療によって有意に低下した。

2-5. Small interfering RNA (siRNA) を用いて GLP-1 の役割を検討する。

GLP-1R の発現を改めてウエスタンブロットで検討し、その局在は免疫染色にて腎近位尿細管にあることを確認した。GLP-1R を介した pathway が CP-AKI における AG の腎保護作用に寄与していることを検討するために、in vivo の GLP-1R に対する small interfering RNA (siRNA) を用いた実験を行った。GLP-1R のノックダウンが十分に行われていることを RT-PCR とウエスタンブロットで確認した。in vivo siRNA で GLP-1R を抑制したところ、AG による CP-AKI の腎保護作用はキャンセルされたことを BUN, Cre の測定、および組織学的検討で確認した。

3. 結語

1. アログリプチンによる DPP-4 阻害はマウスのシスプラチンによる急性腎障害モデルにおいて機能的、組織学的な腎障害を軽減した。
2. DPP-4 阻害による腸管由来の GLP-1 シグナルを介した抗アポトーシス効果がシスプラチン腎症に有効である可能性が示唆された
3. AKI における新たな治療ターゲットとしての Gut-kidney Axis の存在が示唆された。