

学位論文の要旨

学位の種類	博士	氏名	竹田 安孝
<p>学位論文題目</p> <p>Dipeptidyl peptidase-4 (DPP-4) inhibition suppresses the progression to hyperglycemia in low-dose streptozotocin (STZ)-induced diabetic mice via alleviation of β-cell death and α-cell proliferation.</p> <p>(Dipeptidyl peptidase-4 (DPP-4) 活性の阻害は、低用量streptozotocin (STZ) 誘発糖尿病マウスにおけるβ細胞死およびα細胞増殖を軽減し、高血糖への進展を抑制する。)</p> <p>共著者名</p> <p>藤田征弘，本庄潤，坂上英充，滝山由美，牧野雄一，安孫子亜津子，羽田勝計</p> <p>未公表</p> <p>研究目的</p> <p>インクレチンは食事摂取に伴い消化管から分泌され、膵β細胞において血糖依存性のインスリン分泌を促進するホルモンであり， glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP) と glucagon-like peptide-1 (GLP-1) が同定されている。これらは動物モデルにおいてβ細胞の増殖とアポトーシスの抑制を促進し， β細胞質量の増加をもたらすことが知られている。インクレチンは分泌された後， dipeptidyl peptidase-4 (DPP-4) により速やかに不活性化される。そこでDPP-4抵抗性GLP-1受容体作動薬やDPP-4阻害薬による新たな糖尿病治療が期待されている。</p> <p>動物モデルにおいてDPP-4阻害薬は糖代謝異常の改善効果のみならず， β細胞の保護効果，糖尿病発症の遅延効果も報告されているが，その機序は十分に明らかではない。</p> <p>今回我々は， DPP-4阻害薬の投与が低用量streptozotocin (STZ) 誘発糖尿病マウスの高血糖への進展を抑制し得るか， またその機序を明らかにすることを目的とし本研究を行った。</p>			

材 料 ・ 方 法

6週齢，雄性のC57BL/6マウスに通常食 (N) あるいはDPP-4阻害薬である des-fluoro-sitagliptin (SITA) を混餌 (4g/kg) した特別食 (S) を14日間与えた。第15日よりSITA治療を継続する群 (SS)，新たにSITA治療を開始する群 (NS)，通常食を継続する無治療群 (NN) の3群と対照群 (C) の計4群に分類し，Cを除く3群に低用量STZを連続5日間腹腔内投与した。さらに20日間観察し，経時的に随時血糖値と体重を測定した。経口糖負荷試験を行ったほか，HbA_{1c}値を測定した。観察終了後，膵の免疫組織学的検討，および膵インスリン・グルカゴン含量を測定した。また，DPP-4阻害薬の膵島における保護効果を検証するため，STZ投与終了直後の膵検体を用いて組織学的に検討した。さらに，β細胞株であるMIN6細胞を用い，インクレチンがSTZによるβ細胞死を抑制し得るか検討した。

成 績

STZマウスにおいて，無治療群のNNに比し，SITA治療群，特にSSにおいて随時血糖値，HbA_{1c}値の有意な低下を認め，また糖負荷に対するインスリン分泌の有意な増加を認めた。膵免疫染色ではNNでβ細胞領域の縮小とβ細胞数の減少がみられたのに対し，SITA治療群，特にSSで有意なβ細胞領域の拡大とβ細胞数の増加がみられた。またNNで膵インスリン含量の低下がみられたのに対し，SSでのみ，その有意な増加がみられた。さらにNNではα細胞領域の拡大とα細胞数の増加，膵グルカゴン含量の増加がみられた。これに比しSITA治療群では，有意なα細胞領域の縮小，α細胞数の減少，膵グルカゴン含量の低下がみられた。加えてNNで膵島におけるPCNA陽性α細胞数の増加がみられ，STZマウスにおけるα細胞の増殖が示唆されたのに対し，SITA治療群ではその有意な減少がみられ，DPP-4阻害薬によるα細胞の増殖抑制効果が示唆された。

次に，STZ投与直後のマウスを用い，DPP-4阻害薬による膵島の保護効果を検討した。対照群とSTZマウスで血糖値に差を認めなかった。無治療群のNNではSTZによるβ細胞のアポトーシスが観察されたが，SITA治療群でその有意な抑制がみられた。一方，SITA治療群でPCNA陽性β細胞数の増加はみられず，DPP-4阻害薬によるβ細胞の増殖促進効果はみられなかった。さらに無治療群でPCNA陽性α細胞数の増加がみられたが，SITA治療群ではその有意な抑制がみられた。

MIN6細胞を用いた*in vitro*での検討において、STZによる用量依存性のMIN6細胞のアポトーシスがみられたが、GIPとGLP-1は単独でそれを有意に抑制した。さらに高用量のSTZ暴露に対して、GIPとGLP-1は相加的にMIN6細胞のアポトーシスを抑制した。

考 案

DPP-4活性の阻害、特に早期からの阻害が低用量STZマウスにおける高血糖への進展を抑制し得ることが示された。その機序として、DPP-4活性の阻害による内因性インクレチン作用の増強がSTZによるβ細胞死を抑制し、β細胞数の減少とそれに伴うインスリン分泌の低下を軽減する可能性が考えられた。またSTZマウスにおけるα細胞の増殖を抑制し、糖尿病におけるグルカゴン過剰に起因した高血糖をも抑制する可能性が示された。

DPP-4阻害薬によるβ細胞の保護効果は、β細胞の新生や増殖の促進、アポトーシス抑制による機序が報告されている。しかし本研究では、β細胞の増殖よりむしろアポトーシスの抑制がβ細胞減少の抑制に寄与するものと考えられた。

GIPとGLP-1によるβ細胞のアポトーシス抑制の機序は、両者に共通したcAMPを介する経路のほか、異なる経路の関与も報告されている。MIN6細胞を用いた検討において、GIPとGLP-1の両者による相加的なβ細胞のアポトーシス抑制効果が示されたが、共通の抗アポトーシス経路の増幅に加え、異なる経路を介した相加作用がもたらされている可能性も考えられた。

本研究では、STZマウスにおけるα細胞の増殖がみられ、糖尿病におけるグルカゴン過剰に寄与している可能性が示唆された。さらに、α細胞の増殖はSTZ投与直後において既にみられ、高血糖に起因した増殖ではない可能性が示唆された。糖尿病において、α細胞質量の増加がみられることが以前より知られている。近年の報告において、インスリン、IL-6、グルカゴン、GLP-1が膵島におけるα細胞数と質量の調節に関与する可能性が示されているが、その機序は十分に明らかではない。

本研究においてDPP-4活性の阻害によりα細胞の増殖が抑制されたが、β細胞死の抑制によるインスリン分泌の保持、あるいはGIP、GLP-1によるα細胞数の調節機構の可能性も考えられる。最近の報告では、α細胞においてGIPとGLP-1が分泌され、両者が膵島局所における分泌機構の連関、さらにはβ細胞、α細胞質量の調節へ関与している可能性も示唆されている。DPP-4阻害薬が膵島局所においてもGIPとGLP-1作用を増強し、膵島の保護効果を示す可能性も示唆され、興味深い。




結 論

DPP-4活性の阻害が β 細胞死と α 細胞の増殖を抑制することで低用量STZマウスにおける高血糖への進展を抑制することが示された。早期のDPP-4阻害薬の使用が、ヒト糖尿病患者における高血糖への進展を抑制し得る可能性が期待される。

引 用 文 献

1. **Mu J, Woods J, Zhou YP, Roy RS, Li Z, Zycband E, Feng Y, Zhu L, Li C, Howard AD, Moller DE, Thornberry NA, Zhang BB.** Chronic inhibition of dipeptidyl peptidase-4 with a sitagliptin analog preserves pancreatic β -cell mass and function in a rodent model of type 2 diabetes. *Diabetes* 55: 1695-704, 2006.
2. **Hansen AM, Bødvarsdottir TB, Nordestgaard DN, Heller RS, Gotfredsen CF, Maedler K, Fels JJ, Holst JJ, Karlsen AE.** Upregulation of alpha cell glucagon-like peptide 1 (GLP-1) in *Psammomys obesus*-an adaptive response to hyperglycemia? *Diabetologia* 54: 1379-87, 2011.
3. **Fujita Y, Wideman RD, Asadi A, Yang GK, Baker R, Webber T, Zhang T, Wang R, Ao Z, Warnock GL, Kwok YN, Kieffer TJ.** Glucose-dependent insulinotropic polypeptide is expressed in pancreatic islet α -cells and promotes insulin secretion. *Gastroenterology* 138: 1966-75, 2010.

学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第 号		
学位の種類	博士(医学)	氏 名	竹田 安孝
<p>審査委員長 奥村 利勝 </p> <p>審査委員 渡部 剛 </p> <p>審査委員 羽田 勝計 </p>			
<p>学 位 論 文 題 目</p> <p>Dipeptidyl peptidase-4 (DPP-4) inhibition suppresses the progression to hyperglycemia in low-dose streptozotocin (STZ)-induced diabetic mice via alleviation of β-cell death and α-cell proliferation. (Dipeptidyl peptidase-4 (DPP-4) 活性の阻害は、低用量 streptozotocin (STZ) 誘発糖尿病マウスにおけるβ細胞死およびα細胞増殖を軽減し、高血糖への進展を抑制する。)</p>			
<p>インスリン分泌を促進するインクレチン GIP と GLP-1 は分泌された後、DPP-4 により速やかに不活性化される。この DPP-4 阻害薬は新たな糖尿病治療薬として期待されているが、その機序は十分に明らかではない。本研究は、DPP-4 阻害薬の抗糖尿病効果の作用機序を解明するため、低用量 streptozotocin (STZ) 誘発糖尿病マウスモデルに及ぼす DPP-4 阻害薬 (des-fluoro-sitagliptin (SITA)) の影響を検討した。6 週齢、雄性 C57BL/6 マウスに低用量 STZ を連続 5 日間腹腔内投与して高血糖を誘発した。STZ マウスにおいて、SITA 投与は随時血糖値、HbA_{1c} 値を有意に低下させ、糖負荷に対するインスリン分泌を有意に増加させた。STZ によるβ細胞領域の縮小とβ細胞数の減少と膵インスリン含量の低下が SITA で改善された。</p>			

さらに STZ による α 細胞領域の拡大と α 細胞数の増加, 膵グルカゴン含量の増加も SITA により改善された。血糖値上昇をきたさない時期の STZ 投与直後のマウスで, STZ による β 細胞のアポトーシスは, SITA 投与で有意に抑制された。STZ による PCNA 陽性 α 細胞数の増加は, SITA 治療で有意な抑制がみられた。以上の成績から, DPP-4 活性の阻害が高血糖への進展を抑制し得ることが初めて示された。その機序として, DPP-4 阻害薬は STZ による β 細胞死を抑制し, β 細胞数の減少とそれに伴うインスリン分泌の低下を改善すること, また α 細胞の増殖を抑制し, グルカゴン過剰に起因した高血糖をも抑制する可能性が示された。これらの研究知見は DPP-4 阻害剤の抗糖尿病作用のメカニズムの理解に大きな進展を与える。論文提出者は関連領域に関する質問にも十分な知識を背景に不足なく返答した。以上総合して, 学位論文として必要十分と判断した。