

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 1 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860610

研究課題名(和文) DPP-4阻害剤による動脈硬化退縮と内皮機能改善の臨床評価とそのメカニズムの検討

研究課題名(英文) Anti-atherogenic actions of DPP-4 inhibitor

研究代表者

松原 純一 (Matsubara, Junichi)

熊本大学・医学部附属病院・非常勤診療医師

研究者番号：80614669

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：我々は既存の動脈硬化に対するDPP4阻害剤の効果を検討した。マウスに高脂肪食を12週負荷し、DPP4阻害剤投与群と非投与群の2群とし、8週間治療後に大動脈における動脈硬化領域面積を評価した。非投与群に比べてDPP4阻害剤投与群にて動脈硬化領域は有意に減少した。臨床研究として、冠動脈疾患を合併した2型糖尿病患者においてDPP4阻害剤が内皮機能保護効果を示すかどうか検討した。平均6ヵ月の治療にてHbA1cは従来治療強化群、DPP4阻害剤投与群とも同程度に改善したが、血管内皮機能はDPP4阻害剤投与群にてより有意に改善した。DPP4阻害剤が心血管疾患への保護的な作用を示す可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：It have been shown that dipeptidyl peptidase 4 inhibitors (DPP4-I) have anti-atherosclerotic effects on the newly development process of atherosclerosis, however it is unknown whether DPP4-I also have anti-atherosclerotic effects on the established atheroma. Mice were fed by high fat diet (HFD) for 12 weeks, followed by randomized into 2 groups; HFD alone and HFD+DPP4-I for additional 8 weeks. DPP4-I-treatment significantly reduced the progression of established plaque compared to HFD alone. In clinical study, we investigated whether DPP4-I could improve endothelial dysfunction in diabetes mellitus (DM) patients with coronary artery disease (CAD). HbA1c levels significantly improved similarly in both groups (the additional treatment of DPP4-I or aggressive conventional treatment) for 6 months. DPP4-I significantly improved endothelial function in DM patients with CAD. These findings suggest that DPP4-I has beneficial effects on the cardiovascular system in DM patients.

研究分野：循環器内科

キーワード：動脈硬化 内皮機能 炎症 DPP4阻害剤 GLP-1

1. 研究開始当初の背景

(1)糖尿病は心血管イベント発症の大きなリスクであり、糖尿病における心血管イベント抑制を目的とする治療を検討することは臨床的ニーズが高い。Food and Drug Administration (FDA:アメリカ食品医薬品局)は、今後の糖尿病治療薬の認可において、心血管系疾患に対する有害作用のリスクが排除されないものは認可を出さない方向性を打ち出した。そのため、今後の糖尿病治療薬は心血管系疾患、ことに動脈硬化に及ぼす影響がキープポイントとなることが予想される。これから糖尿病治療薬として期待される薬剤が、動脈硬化に対してどのような効果を持つのかを明らかにすることは、臨床使用においても重要な指標となる。

(2)内因性ペプチドのひとつ Glucagon like peptide 1 (GLP-1)は近年2型糖尿病患者において利用可能となった血糖降下剤である(JAMA 2007;298:194-206.)。GLP-1が冠動脈疾患を合併した2型糖尿病患者において、内皮機能障害を改善することが大規模臨床試験において示された(Am J Physiol Endocrinol Metab 2004;287:E1209-15.)。また、急性心筋梗塞患者へのGLP-1投与にて心機能改善効果が示されている(Circulation 2004;109:962-965)。GLP-1はDipeptidyl peptidase-4 (DPP-4)により半減期1-2分という短時間で分解されるが、経口的なDPP-4阻害剤の投与は内因性GLP-1の作用を強化するため、この薬剤による治療アプローチもGLP-1投与と同じく体重増加を起こすことなく、わずかな副作用のみでHbA1cを低下させることが可能である(Horm Metab Res 2006;38:423-8.)。2010年にはGLP-1アナログ製剤にてマウスの動脈硬化抑制を示した研究結果が発表された(Diabetes, 2010;59(4):1030-1037)が、DPP-4阻害剤の動脈硬化抑制効果を含め、心血管系に対する効果を示した研究は十分ではない。また、皮下注製剤であるGLP-1アナログ製剤に比べて、内服薬であるDPP-4阻害剤はコンプライアンスの点や、嘔気や嘔吐といった過剰のGLP-1濃度の上昇によりみられる副作用が少ない(Trends Mol Med 2008;14:161-8)ことから、今後の臨床現場において使用が増加してくると考え、心血管疾患における効果を検討することは重要である。そこで、我々は動脈硬化モデルであるApolipoprotein E欠損マウスにおいて、DPP-4阻害剤を投与することで、動脈硬化が抑制できるかどうか検討している。Apolipoprotein-E欠損マウスを、高脂肪食にDPP-4阻害剤を加えた群(投与群)と加えなかった群(非投与群)に分け、16週間治療後のマウスにて、上行大動脈から大腿動脈分岐部までの動脈硬化領域面積を評価した。結果は空腹時の血糖やインスリン、脂質レベルには有意差を認めなかったが、DPP-4阻害剤投与群にて動脈硬化領域は有意に減少していた。また、DPP-4

阻害剤投与群では空腹時、食後ともに活性型GLP-1は非投与群に比べて有意に上昇していた。また、内皮依存性血管弛緩反応による内皮機能評価においてもDPP-4阻害剤投与群にて高脂肪食による内皮機能障害を有意に改善した。*in-vitro*にてヒト単球由来マクロファージを用いて、DPP-4阻害剤がGLP-1の作用を増強することで、炎症を抑制できるかどうか検討した。ヒトにおける血中濃度と同程度の濃度にて刺激したところ、DPP-4阻害剤単独、GLP-1単独群に比べてDPP-4阻害剤とGLP-1で刺激した群は有意にinterleukin-6などの炎症性サイトカイン産生の減少を認めた。この結果よりDPP-4阻害剤は内因性の活性型GLP-1作用を増強することで、糖尿病患者の治療において心血管系に対する有益な効果を有する可能性があることが示唆された(J Am Coll Cardiol 2012;59:265-276)。内服薬であるDPP-4阻害剤の動脈硬化への治療効果作用を検討することは独創的であり、この作用を証明できれば、動脈硬化への新たな治療戦略を提唱できる事となり、学術的、臨床的な意義は大きいと考えられる。

2. 研究の目的

(1)動脈硬化モデルマウスにおいて形成された動脈硬化性病変に対してDPP-4阻害剤が病変退縮効果を有するか検討する。

(2)*in vitro*の実験系で、血管内皮細胞とマクロファージにおいてDPP-4阻害剤、GLP-1によるAMP-activated protein kinase(AMPK)活性化を検討する。

(3)臨床研究として、DPP-4阻害剤を用いた糖尿病治療とDPP-4阻害剤を使わない糖尿病治療で、心疾患患者の血管内皮機能改善への効果をRH-PAT (Reactive Hyperemia Peripheral Arterial Tonometry)を用いて評価する。

3. 研究の方法

(1)生体内における動脈硬化退縮における効果を検証するために、動脈硬化(Apolipoprotein E欠損)モデルマウスを用いて動物実験を行う。8週齢の雄マウスを高脂肪食で飼育する。12週後、一部のマウスを安楽死させて、動脈硬化性プラーク形成を検証する。動脈硬化性病変は、全大動脈のSudanIVによる染色および、大動脈弁基部をOilRed染色し、その総面積を定量評価し比較する。この時点から高脂肪食群を高脂肪食群、高脂肪食+DPP-4阻害剤混合群に分け、さらに8週間飼育する。マウスを安楽死させて、12週後と比べて動脈硬化性プラークがどれだけ変化(退縮)するかどうか検討する。

(2)高濃度のGLP-1アナログでの刺激にて培養ヒト冠動脈細胞におけるAMPKの活性化が示されている(Dibetologia 2010;53:2256-2263)が、生理的濃度のGLP-1刺激で

AMPK が活性化されるかどうかは不明である。そこで、培養ヒト単球由来マクロファージ、培養ヒト冠動脈細胞を以下の実験系に用い、生理的濃度の DPP-4 阻害薬、GLP-1 の各種薬剤で処理する。DPP-4 阻害剤を前投与することで、GLP-1 単独に比べて、GLP-1 による AMPK のリン酸化が増強されるかどうかを Western Blot 法で検討する。さらに AMPK を介した細胞機能変化について、抗炎症の観点から検討する。抗炎症効果は mRNA の発現 (Interleukin-1beta (IL-1 β)、 intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1)、 vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) など) について、Taq Man probe 法を用いて定量的 real time RT-PCR 法を用いて評価する。内皮機能に関しては、eNOS の発現や eNOS のリン酸化を検討し、これらが AMPK を介した効果かどうかを検討する。

(3)心疾患患者の血管内皮機能障害を評価し、DPP-4 阻害剤による血管内皮機能障害の改善効果を検討する。対象は心精査目的で入院した 20 歳から 80 歳までの患者で、紙面と口頭による説明で理解と同意が得られた患者とする。DPP-4 阻害剤追加療法群と従来治療群に無作為に割り付け、試験登録時の身体所見と血液検査、血管内皮機能を測定する。血管内皮機能は末梢血管トノメトリー(RH-PAT)を用いて評価する。入院中は早朝の朝食前に採血と RH-PAT を測定し、外来では午前中に朝食抜きで来院して頂き同様に検査施行する。薬物療法開始前・開始後 6 ヶ月に血管内皮機能を測定し治療効果を判定する。得られた血管内皮機能のデータを血圧・体重・腎機能・心機能などの臨床パラメーターで補正し、薬剤投与による血管内皮機能の変化を統計ソフトにて解析する。RH-PAT 値は自動計算され、この値は正規分布しないため、Ln で対数変換し、RH index として比較した。今までの報告(J Am Coll Cardiol 2004; 44: 2137-2141)等から RH index が 0.560 未満を血管内皮機能障害と定義した。

4. 研究成果

(1)計 20 週治療後の体重や脂質パラメーター等には 2 群間で有意差を認めなかった。動脈硬化領域は高脂肪食のみ(非投与群)に比べて、DPP4 阻害剤投与群にて有意に減少し(53.3 \pm 4.9% vs. 43.8 \pm 9.0%, P<0.05) DPP4 阻害剤はマウスにおいて、既存の動脈硬化進展を抑制することが示された。また、この大動脈壁から得られたサンプルにて IL-1 β 、ICAM-1、VCAM-1 の mRNA を測定すると、DPP4 阻害剤投与群にて有意に低下しており、DPP4 阻害剤による抗炎症効果が寄与していると考えられた。

(2)新たな抗動脈硬化メカニズムの検証として、AMPK に着目した。上記のマウス大動脈にて AMPK の活性化を Western Blot 法にて評

価すると、DPP4 阻害剤投与群にて有意に活性化していた (P<0.01)。次に、培養細胞における AMPK 活性化を介した抗炎症作用を検討した。ヒト培養マクロファージ、ヒト培養冠動脈内皮細胞において、DPP4 阻害剤は GLP-1 の作用を増強することで AMPK の活性化を有意に増強した。ヒト培養マクロファージにおいて、DPP4 阻害剤は GLP-1 の作用を増強することで炎症マーカーである IL-1 β 発現を有意に抑制し、AMPK 阻害剤である Compound-C を前投与することでその効果は減弱した。ヒト培養冠動脈内皮細胞においても、DPP4 阻害剤は GLP-1 の作用を増強することで ICAM-1、VCAM-1 の発現を有意に抑制し、Compound-C を前投与することでその効果は減弱した。また、eNOS の活性化も Compound-C を投与することにて減弱した。以上から DPP4 阻害剤はマクロファージと血管内皮細胞にて AMPK を活性化し、炎症を抑制し、血管内皮機能にも関与することが示された。

以上の結果から、DPP4 阻害剤は既存の動脈硬化に対しても進展抑制を示し、そのメカニズムには AMPK を介した抗炎症作用が寄与していると考えられた。

(3)冠動脈疾患を合併し、コントロール不十分の 2 型糖尿病患者をスクリーニングし、状態の安定しているときに、血管内皮機能を測定し、血管内皮機能障害のある患者、40 人を対象とした。通常治療強化群と DPP4 阻害薬であるシタグリプチン投与群(シタグリプチン 50mg/日)の 2 群として、開始前と約 6 ヶ月後に血管内皮機能を測定し比較検討した。Baseline の患者背景に 2 群間に有意差は認めなかった。経過中に追加、あるいは増量した薬物にも 2 群間に有意差を認めなかった。平均 6 ヶ月の治療にて HbA1c は両群とも同程度に改善した(シタグリプチン投与群: -0.65 \pm 0.20%、通常治療強化群: -0.67 \pm 0.20%、P=0.95)。血管内皮機能は血糖改善効果により、両群とも有意に改善したが(Figure 1A: シタグリプチン群: P<0.001、Figure 1B: 通常治療強化群: P<0.05)、シタグリプチン投与群にてより有意に改善した(改善率; 62.4 \pm 59.2% vs. 15.9 \pm 22.0%、P<0.001)。

Figure 1A

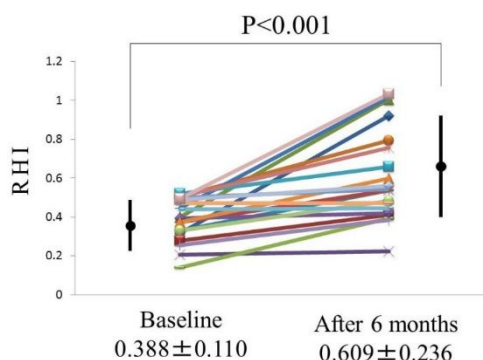
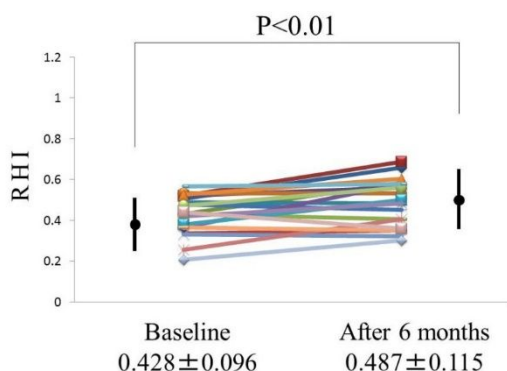


Figure 1B



また、高感度 CRP は通常治療強化群では治療前後で変化を認めなかったが ($P=0.49$) シタグリプチン投与群では有意に低下しており ($P<0.01$) RH-PAT index と高感度 CRP の変化量は有意に相関していた ($r=-0.326$ 、 $P<0.05$)。このように冠動脈疾患合併糖尿病患者において、DPP4 阻害剤による血糖改善効果をこえた血管内皮機能改善効果が示され、DPP4 阻害剤が心血管疾患への保護的な作用を示す可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Decreased plasma levels of active glucagon-like peptide-1 in coronary artery disease.

Eiichi Akiyama, Seigo Sugiyama, **Junichi Matsubara**, Hirofumi Kurokawa, Masaaki Konishi, Toshimitsu Nozaki, Keisuke Ohba, Koichiro Fujisue, Hirofumi Maeda, Kenji Sakamoto, Koichi Sugamura, Hitoshi Sumida, Hideaki Jinnouchi, Kentaro Sakamaki, Satoshi Morita, Kazuo Kimura, Satoshi Umemura, Hisao Ogawa.

J Am Coll Cardiol. 2015 Feb 24;65(7):754-5.

doi: 10.1016/j.jacc.2014.11.043.

査読あり

Dipeptidyl peptidase-4 inhibitor, sitagliptin, improves endothelial dysfunction in association with its anti-inflammatory effects in uncontrolled diabetic patients with coronary artery disease.

Junichi Matsubara, Seigo Sugiyama, Eiichi Akiyama, Satomi Iwashita, Hirofumi Kurokawa, Keisuke Ohba, Hirofumi Maeda, Koichiro Fujisue, Eiichiro Yamamoto, Koichi Kaikita, , Seiji Hokimoto, Hideaki Jinnouchi, Hisao Ogawa.

Circ J. 77(5):1337-44, 2013

<http://doi.org/10.1253/circj.CJ-12-1168>

査読あり

〔学会発表〕(計 3 件)

松原純一、秋山英一、杉山正吾、小川久雄
Decreased Levels of Endogenous Plasma Active Glucagon Like Peptide-1 were Correlated with Endothelial Dysfunction in Patients with Coronary Risk Factors
第 79 回日本循環器学会総会
平成 27 年 4 月 24 日 大阪

黒川博文、杉山正吾、**松原純一**、他
Dipeptidyl Peptidase-4 Inhibitor, Des-Fluoro-Sitagliptin, Prevented the Progression of Established Atheromatous Plaques in ApoE Deficient Mice –Possible Involvement of AMPK-
第 79 回日本循環器学会総会
平成 27 年 4 月 26 日 大阪

松原純一、杉山正吾、小川久雄
The Effects of DPP4 Inhibitors on Atherosclerosis and Vascular Functions
第 78 回日本循環器学会総会
平成 26 年 3 月 22 日 東京

〔図書〕(計 2 件)

松原純一、杉山正吾、小川久雄
インクレチン関連薬と心血管イベント 2 次予防
CARDIAC PRACTICE (メディカルレビュー社) 2013(24) 29-34

松原純一、杉山正吾、小川久雄
DPP4 阻害剤による心血管イベント抑制作用
Angiology Frontier (メディカルレビュー社) 2013(12) 33-38

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松原 純一 (MATSUBARA Junichi)

熊本大学医学部附属病院

大学院生命科学部研究部循環器内科学

非常勤診療医師

研究者番号：80614669