

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 29 日現在

機関番号：17102

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25893149

研究課題名(和文) SK-0403によるDPP4阻害を媒介した抗炎症作用の分子機序の解明

研究課題名(英文) A investigation into anti-inflammatory effect of SK-0403 via DPP4-inhibition.

## 研究代表者

新城 尊徳 (Shinjo, Takanori)

九州大学・大学病院・その他

研究者番号：20711394

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：種々の炎症性疾患においてDPP4発現が増加することから、DPP4が慢性炎症状態に何らかの役割を果たすと仮定し、新規DPP4阻害薬SK-0403を用いて検討を行った。SK-0403は、脂肪細胞-マクロファージ共培養系におけるLPS誘発性炎症性遺伝子発現および炎症性サイトカイン産生を抑制した。また、SK-0403はマクロファージのLPS-NF- $\kappa$ B/AP-1活性化経路を抑制した。マウスにLPS投与することで肝臓・脂肪組織内の炎症性遺伝子発現は顕著に亢進するが、SK-0403を同時に投与することで減弱した。さらに、肝臓におけるLPS誘導性NF- $\kappa$ B活性化がSK-0403投与によって抑制されていた。

研究成果の概要(英文)：DPP-4 expression is reportedly increased in inflammatory disease patients, suggesting an association of DPP-4 with inflammation. In this study, first, lipopolysaccharide (LPS)-induced elevations of inflammatory cytokine mRNA expressions in RAW264.7 macrophages were shown to be significantly suppressed by co-incubation with a DPP-4 inhibitor, SK-0403, in the RAW264.7 cells. Regarding the molecular mechanism, LPS-induced NF- $\kappa$ B and AP-1 promoter activities were revealed to be suppressed by incubation with SK-0403. When 3T3-L1 and RAW cells were co-cultured and stimulated with LPS, the effects of SK-0403 on the suppression of cytokine expressions in 3T3-L1 adipocytes were more marked. Anti-inflammatory effects of SK-0403 were also observed in vivo on the elevated hepatic and adipose expressions and serum concentrations of inflammatory cytokines in association with the suppression of hepatic NF- $\kappa$ B transcriptional activity, in LPS-infused mice.

研究分野：歯周治療系歯学

キーワード：抗炎症効果 DPP4阻害薬 肥満 脂肪細胞 マクロファージ 肝臓

### 1. 研究開始当初の背景

現代社会において、生活習慣の欧米化に伴い 2 型糖尿病患者の罹患率は急増しており、対策が急務である。2 型糖尿病患者はしばしば肥満を伴うことが多く、肥満状態の脂肪組織における慢性炎症状態がインスリン抵抗性を惹起し、高血糖症に寄与することが多くの報告で明らかとなっている。また重度歯周病や、肥満状態に伴う腸管透過性亢進によってグラム陰性菌由来の内毒素 (lipopolysaccharide, LPS) が循環中へ流入し、いわゆる endotoxemia として脂肪組織の炎症反応を増幅させることが知られている。これらの炎症状態を抑制することは、インスリン標的臓器のインスリン感受性改善に繋がり、結果的に糖尿病状態の増悪の回避、ひいては心血管イベントリスクの減少に寄与することとなる。Dipeptidyl peptidase 4(DPP4) は、インスリン分泌促進作用を持つ glucagon-like peptide-1(GLP-1) をはじめとしたインクレチンホルモンを分解する酵素である。DPP4 阻害薬は、DPP4 の活性阻害を介して GLP-1 の血中濃度を上昇させ、膵β細胞からのインスリン分泌を増強することで血糖値コントロールを改善することを企図してつくられた。近年、炎症性腸疾患や粥状動脈硬化症、多発性硬化症などの炎症性疾患および肥満患者での DPP4 発現量の増加が報告されている。また、DPP4 阻害薬を投与した肥満・糖尿病モデルマウスにおいて肝臓、脂肪組織などの炎症反応が抑制されたことを示唆する報告がされている。あわせて、ヒトでも脂肪組織・肝臓などで DPP4 阻害薬による抗炎症効果を示す報告がなされている。このことから、DPP4 は炎症状態において何らかの役割を持つことが考えられる。しかしながら、DPP4 阻害薬による抗炎症効果の機序については、GLP-1 を介した間接的な効果を示唆する報告はあるものの、DPP4 阻害による直接的な抗炎症効果についてはほとんど検討されていない。そこで、我々は DPP4 阻害薬による DPP4 阻害を介した抗炎症効果について検討することとした。

### 2. 研究の目的

DPP4 阻害薬を用いて、DPP4 阻害による炎症状態に及ぼす影響について検討する。

### 3. 研究の方法

(1) マクロファージ、脂肪細胞を用いた in vitro での抗炎症効果の検討

DPP4 阻害薬(SK-0403,sitagliptin) を用いて、マウスマクロファージ由来細胞株(RAW264.7 細胞) の LPS 誘導性炎症性遺伝子発現に及ぼす影響をリアルタイム PCR 法で検討する。具体的には、マクロファージを 12 ウェルプレートに  $1 \times 10^5$ /well で播種し、LPS を 10ng/ml、SK-0403 または sitagliptin を最終濃度 10, 100 $\mu$ M となるように添加し、2, 6, 12, 24 時間後の細胞を回収しサンプル

とする。

SK-0403 が、RAW 細胞の LPS 刺激による炎症性経路活性化に及ぼす影響を検討する。具体的には、と同じく RAW 細胞に LPS 刺激を 10ng/ml で行い、SK-0403 を 100 $\mu$ M で添加し、10, 15, 20, 25, 30, 60, 120, 240 分後の細胞を回収する。続いてウェスタンブロット法で、NF- $\kappa$ B 経路の活性化について I $\kappa$ B $\alpha$  の分解、p65 リン酸化、AP-1 経路の活性化について p38MAPK, JNK のリン酸化について検討した。また、NF- $\kappa$ B、AP-1 プロモーター活性への影響を見るために、特定のプラスミドをトランスフェクションさせた RAW 細胞に上記と同じ条件で LPS 刺激・SK-0403 添加を行い、2, 12 時間後の各プロモーター活性についてルシフェラーゼアッセイを行った。

マウス線維芽細胞由来前駆脂肪細胞株(3T3-L1 細胞)を用いて、SK-0403 が LPS・TNF $\alpha$  誘導性炎症性遺伝子発現へ及ぼす影響をリアルタイム PCR 法で検討した。具体的には、まず通法に従って 3T3-L1 細胞を成熟脂肪細胞へ分化誘導し、誘導開始から 8 日目の細胞を供試細胞として使用した。12 ウェルプレート中の 3T3-L1 細胞に LPS・TNF $\alpha$  をそれぞれ 10ng/ml 濃度で刺激し、そこに SK-0403 を 10, 100 $\mu$ M 濃度で添加して 2, 6, 12, 24 時間後の細胞を回収し、サンプルとする。

(2) 脂肪細胞-マクロファージ共培養系における LPS 誘導性炎症反応に SK-0403 が及ぼす影響の検討

肥満状態の脂肪組織を想定し、液性因子のみ自由に交通できるようにした多孔性メンブレンで区切った Transwell system(Corning 社製)を用いて、下部チャンバーに 3T3-L1 細胞( $1 \times 10^6$ /well) を播種して分化誘導し、上部チャンバーに RAW 細胞( $1 \times 10^5$ /well) を播種し、共培養系とする。ここに LPS を 10ng/ml、SK-0403 を 100 $\mu$ M 濃度で添加して 24 時間後の 3T3-L1 細胞における炎症性遺伝子発現をリアルタイム PCR 法で、培養上清中の炎症性サイトカイン量を ELISA 法で測定する。

(3) マウス肝臓・脂肪組織における LPS 誘導性炎症反応への SK-0403 の影響の検討

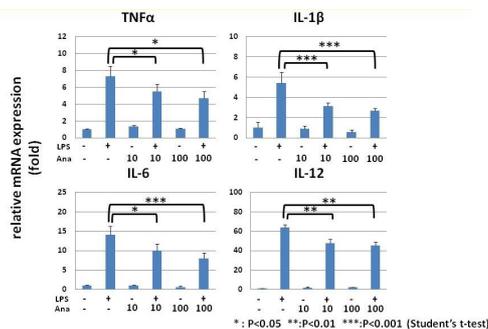
8 週齢の C57/BL6J 雄性マウスに LPS を 5mg/kg 体重で、SK-0403 を 10mg/kg 体重で投与し、2 時間後の肝臓・脂肪組織における炎症性遺伝子発現の変化をリアルタイム PCR 法で検討する。また、血液を採取し、血清中炎症性サイトカインおよび GLP-1 濃度を ELISA 法で測定する。

8 週齢の C57/BL6J 雄性マウスの LPS 誘導性肝臓内 NF- $\kappa$ B 活性化に SK-0403 が及ぼす影響を in vivo imaging 法で検討する。具体的には、NF- $\kappa$ B プロモーターエレメントを持ったアデノウイルスを尾静脈注射することで、肝臓特異的に NF- $\kappa$ B プロモーターを過剰発現

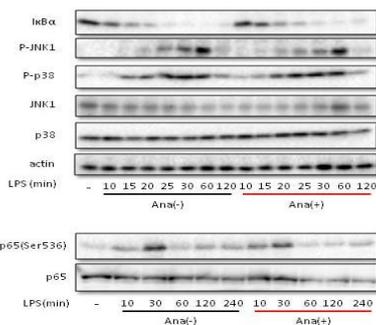
させる。尾静脈投与から 48 時間後に 5mg/kg 体重の LPS と 10mg/kg 体重の SK-0403 を投与し、2, 6, 12, 24 時間後に 150mg/kg 体重のルシフェリンを投与し、麻酔下で肝臓からの蛍光量を測定する。

#### 4. 研究成果

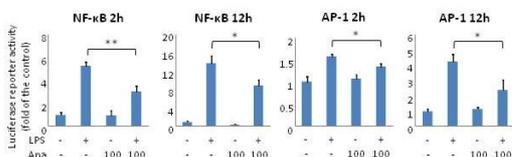
(1) 方法(1) により、RAW 細胞に LPS および各 DPP4 阻害薬を添加し炎症性遺伝子の発現を検討したところ、LPS 刺激により RAW 細胞の TNF $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-12 遺伝子発現はそれぞれ亢進したが、各 DPP4 阻害薬添加により有意に抑制された。その抑制効果は、sitagliptin より SK-0403 の方が顕著であった。また、どちらの抗炎症効果も濃度依存的であった。



また、RAW 細胞における LPS 誘導性の NF- $\kappa$ B/AP-1 経路の活性化は SK-0403 によって有意に抑制された。ウェスタンブロット法の結果より、LPS 刺激による I $\kappa$ B $\alpha$  分解、NF- $\kappa$ B p65 リン酸化および p38MAPK, JNK リン酸化の抑制が認められた。



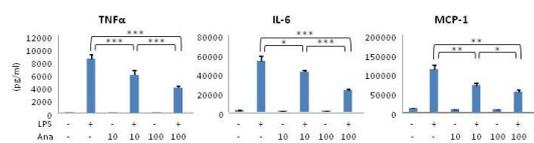
さらに、LPS 誘導性の NF- $\kappa$ B および AP-1 プロモーター活性化は SK-0403 添加により有意に抑制された。



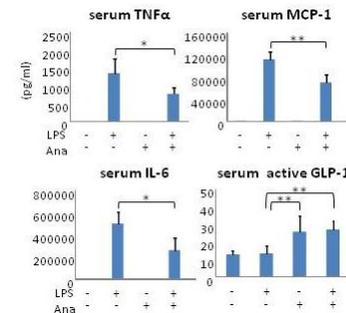
加えて、3T3-L1 細胞における LPS, TNF $\alpha$  刺激による TNF $\alpha$ 、IL-6、IL-12、MCP-1 の遺伝子発現は、LPS より TNF $\alpha$  の方がより顕著に亢進したが、いずれも各 DPP4 阻害薬添加により有意に抑制された。RAW 細胞と同じく、抗炎症効果は SK-0403 の方が sitagliptin より顕著

であり、またどちらの抗炎症効果も濃度依存的であった。以上の結果より、SK-0403 はマクロファージ、脂肪細胞における炎症反応を抑制する効果を有することが分かった。

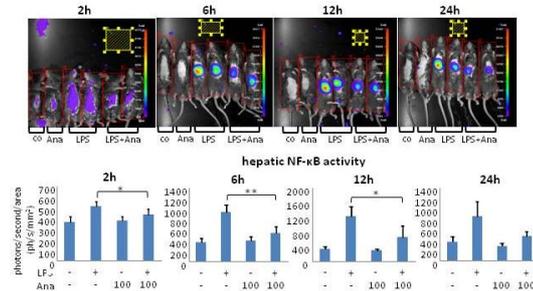
(2) 方法(2) により、3T3-L1・RAW 細胞の共培養系に LPS 刺激を行うことによって 3T3-L1 細胞における TNF $\alpha$ 、IL-6、IL-12、MCP-1 の遺伝子発現は顕著に亢進したが、SK-0403 添加すると濃度依存性に有意に抑制された。また、培養上清中の TNF $\alpha$ 、IL-6、MCP-1 濃度は SK-0403 添加により濃度依存的に有意に抑制された。このことより、脂肪組織内の浸潤マクロファージと脂肪細胞の相互作用による炎症反応増幅に SK-0403 は抑制的に作用することが分かった。



(3) 方法(3) により、マウスに LPS 投与すると肝臓・脂肪組織の TNF $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-12、MCP-1 遺伝子発現は亢進したが、SK-0403 を同時に投与した群では有意に抑制されていた。この結果に一致して血中 TNF $\alpha$ 、IL-6、MCP-1 濃度は SK-0403 添加群で有意に抑制された。また、GLP-1 濃度は SK-0403 添加で有意に上昇していた。



さらに、in vivo imaging 法より、LPS 投与による肝臓内 NF- $\kappa$ B 活性化は SK-0403 投与によって有意に抑制されることが分かった。この結果より、マウス生体内において SK-0403 は、LPS 投与による肝臓・脂肪組織における炎症応答を抑制することが分かった。



#### 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 8 件)

1. Shinjo T, Nakatsu Y, Iwashita M, Sano T, Sakoda H, Ishihara H, Kushiyama A, Fujishiro M, Fukushima T, Tsuchiya Y, Kamata H, Nishimura F, Asano T. DPP-4 inhibitor anagliptin exerts anti-inflammatory effects on macrophages, adipocytes, and mouse livers by suppressing NF- $\kappa$ B activation. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 査読有, 2015 May, doi: 10.1152/ajpendo.00553.2014 [Epub ahead of print]

2. Shinjo T, Nakatsu Y, Iwashita M, Sano T, Sakoda H, Ishihara H, Kushiyama A, Fujishiro M, Nishimura F, Asano T. High-fat diet feeding significantly attenuates anagliptin-induced regeneration of islets of Langerhans in streptozotocin-induced diabetic mice. *Diabetol Metab Syndr*. 査読有, in press, 2015.

3. Sano T, Iwashita M, Nagayasu S, Yamashita A, Shinjo T, Hashikata A, Asano T, Kushiyama A, Ishimaru N, Takahama Y, Nishimura F. Protection from diet-induced obesity and insulin resistance in mice lacking CCL-19-CCR7 signaling. *Obesity*. 査読有, in press, 2015.

4. Okubo H, Nakatsu Y, Sakoda H, Kushiyama A, Fujishiro M, Fukushima T, Matsunaga Y, Ohno H, Yoneda M, Kamata H, Shinjo T, Iwashita M, Nishimura F, Asano T. Interactive roles of gut microbiota and gastrointestinal motility in the development of inflammatory disorders. *Inflammation and Cell Signaling*. 査読有, 2015 Mar; 2:e643. Doi:10.14800/ics.643

5. Okubo H, Nakatsu Y, Kushiyama A, Fujishiro M, Fukushima T, Matsunaga Y, Ohno H, Yoneda M, Kamata H, Shinjo T, Iwashita M, Nishimura F, Asano T. Mosapride citrate improves nonalcoholic steatohepatitis with increased fecal lactic acid bacteria and plasma glucagon-like peptide-1 level in a rodent model. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 査読有, 2015 Jan; 308(2):G151-158. Doi:10.1152/ajpgi.00198.2014

6. Hashikata A, Yamashita A, Suzuki S, Nagayasu S, Shinjo T, Taniguchi A, Fukushima M, Nakai Y, Nin K, Watanabe N, Asano T, Abiko Y, Kushiyama A, Nagasaka S, Nishimura F. The inflammation-lipocalin2 axis may contribute to the development of chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant*. 2014 Mar;29(3):611-618. Doi:10.1093/ndt/gft449.

7. Shinjo T, Zhang J, Nakatsu Y, Guo Y, Sakoda H, Yamamotoya T, Otani Y, Okubo H, Kushiyama A, Fujishiro M, Fukushima T, Tsuchiya Y, Kamata H, Iwashita M, Nishimura F,

Katagiri H, Takahashi S, Kurihara H, Ushida T, Asano T. Par14 protein associates with insulin receptor substrate 1(IRS-1), thereby enhancing insulin-induced IRS-1 phosphorylation and metabolic actions. *J Biol Chem*. 査読有, 2013 Jul 12;288(28):20692-20701. Doi: 10.1074/jbc.M113.485730.

8. Iwashita M, Nakatsu Y, Sakoda H, Fujishiro M, Kushiyama A, Fukushima T, Kumamoto S, Shinjo T, Kamata H, Nishimura F, Asano T. Valsartan restores inflammatory response by macrophages in adipose and hepatic tissues of LPS-infused mice. *Adipocyte*. 査読有, 2013 Jan 1;2(1):28-32.

〔学会発表〕(計 6 件)

1. 新城尊徳 DPP4 阻害薬 anagliptin はマクロファージ-脂肪細胞共培養系およびマウス肝臓のLPS誘導性炎症反応を抑制する. 第29回日本糖尿病合併症学会、2014年10月3日、都市センターホテル、東京

2. Shinjo T. DPP-4 Inhibitor Anagliptin exerts Anti-inflammatory Effects on Macrophages, Adipocytes, and Mouse Liver by suppressing LPS-induced NF- $\kappa$ B Activation. 第74回アメリカ糖尿病学会、2014年6月17日、サンフランシスコ、アメリカ

3. 新城尊徳 DPP4 阻害薬 anagliptin は、活性化マクロファージおよびマクロファージ共培養下脂肪細胞の炎症反応を抑制する. 第57回日本糖尿病学会年次学術集会、2014年5月24日、大阪国際会議場、大阪

4. 新城尊徳 Par14 は IRS-1 と結合することによりインスリン誘発性の IRS-1 リン酸化を増強し、糖・脂質代謝を向上させる. 第56回日本歯周病学会秋季学術大会、2013年9月22日、前橋市民文化会館、群馬

5. 新城尊徳 DPP4 阻害薬 SK-0403 はマクロファージ共培養における脂肪細胞の炎症性遺伝子の発現を抑制する. 第138回日本歯科保存学会春季学術大会、2013年6月27日、福岡国際会議場、福岡

6. 新城尊徳 DPP4 阻害薬 SK-003 はマクロファージ共培養における脂肪細胞の炎症性遺伝子の発現を抑制する. 第56回日本糖尿病学会年次学術集会、2013年5月17日、熊本市現代美術館、熊本

6. 研究組織

(1)研究代表者

新城尊徳 (Shinjo Takanori)

九州大学病院・歯周病科・医員

研究者番号: 20711394

(2)研究分担者 ( )

研究者番号 :

(3)連携研究者 ( )

研究者番号 :