

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 21 日現在

機関番号：10107

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K20244

研究課題名(和文)新規アディポカインDPP4に着目した糖尿病網膜症の病態解明と治療法の確立

研究課題名(英文)Elucidation of the pathology of diabetic retinopathy focused on novel adipokine DPP4

研究代表者

大野 晋治(Ono, Shinji)

旭川医科大学・医学部・助教

研究者番号：50571890

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)：本研究の目的は、糖尿病患者において過剰に産生されるDPP4が網膜循環にどのような作用を有するか明らかとすることである。摘出ブタ網膜血管を用いた実験から、DPP4が濃度依存性に網膜血管内皮機能を障害することが明らかとなった。また、DPP4阻害薬であるテネリグリプチンが、DPP4による血管内皮機能障害に保護的に働くことを見出した。さらに、糖尿病患者の血中DPP4濃度と網膜血流量を測定し、DPP4濃度が高い男性患者において網膜血流量が低下していることを明らかとした。以上の結果から、DPP4の過剰産生が血管内皮機能を障害し、網膜血流量低下の原因となっている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The study objective was to examine the role of DPP4 in the retinal microcirculation. Using isolated porcine retinal arterioles, intraluminal DPP4 treatment significantly attenuated the retinal endothelial function in a dose-dependent manner. We also showed that DPP4 inhibitor teneligliptin prevented retinal endothelial dysfunction induced by DPP4. In addition, in patients with type 2 diabetes mellitus, the plasma DPP4 concentrations were correlated negatively with the retinal vessel diameter and retinal blood flow in men. In conclusion, overproduction of DPP4 caused endothelial dysfunction of the retinal arterioles, and may be associated with decreased retinal blood flow.

研究分野：糖尿病網膜症

キーワード：糖尿病 DPP4 アディポカイン 網膜血流量 血管内皮機能

1. 研究開始当初の背景

Dipeptidyl Peptidase-4 (DPP4)は血糖降下に関与するインクレチンの分解酵素として広く知られているが、近年脂肪細胞から分泌されるアディポカインの一種であることが報告され<sup>1</sup>、DPP4がインクレチン分解酵素以外の作用を有するのではないかと注目されている。糖尿病患者では血中DPP4濃度が上昇していることが報告されており<sup>2</sup>、DPP4の過剰産生が糖尿病網膜症を始めとする糖尿病合併症の病態に関与している可能性がある。

2. 研究の目的

本研究の目的は新規アディポカインであるDPP4が、網膜循環においてどのような作用を有するか明らかとすることである。

3. 研究の方法

(1) 摘出ブタ網膜血管を用いたex vivo実験

① ブタ網膜より網膜血管を摘出し、両端をピペットに結紮、加圧して生理的基礎緊張を得た。その後、DPP4を血管外腔および内腔から投与し、網膜血管の収縮・拡張反応の有無を確認した。

② DPP4を血管内腔に投与し、血管内皮機能が障害されるか検討した。血管内皮機能の評価には、網膜における血管内皮依存性血管拡張物質であるブラジキニンに対する反応を用いた。

③ DPP4による血管内皮機能障害の機序を明らかとするため、各種阻害剤や活性酸素除去剤を用い、詳細に検討した。

④ DPP4とDPP4阻害薬を血管内腔に同時投与することにより、DPP4阻害薬の内皮機能保護効果を検討した。

(2) 2型糖尿病患者における臨床研究

2型糖尿病を有する患者の血中DPP4濃度を測定し、網膜血流量との相関を検討した。対象は当院眼科外来通院中の2型糖尿病患者67名(男性37名、女性30名、平均年齢60.1歳)で、

網膜症の程度は網膜症なしか軽症非増殖糖尿病網膜症のみとし、進行した網膜症(中等症～重症非増殖糖尿病網膜症、増殖糖尿病網膜症)を有する患者は対象としなかった。網膜血流量の測定にはレーザードップラー血流計(LDV)を用いた。LDVは網膜血流量の絶対値を測定できるため、患者間の測定値を直接比較可能である。

4. 研究成果

(1) ① DPP4の網膜血管径への直接作用

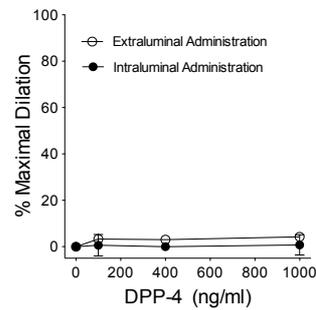


図 1.

ヒトにおける生理的DPP4濃度を参考に、DPP4の最終濃度が200 ng/ml, 400 ng/ml, 1,000 ng/mlになるようにDPP4を血管外腔および内腔から投与した。いずれの投与方法でも網膜血管径は変化せず、DPP4が網膜血管径に直接的な作用を有さないことが明らかとなった。(図 1)

② DPP4の網膜血管内皮機能への作用

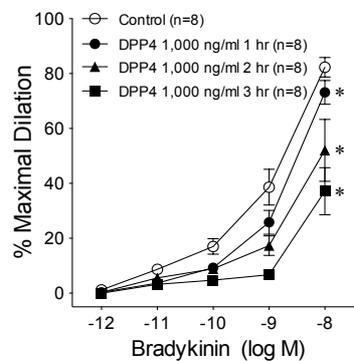


図2. \*P < 0.05 (versus control)

DPP4 1,000 ng/mlを血管内腔に投与し、投与1時間後、2時間後、3時間後のブラジキニンに対する反応をDPP4投与前と比較した。DPP4の内腔投与により、ブラジキニンによる血管拡張反応は時間依存性に減弱した。(図2)

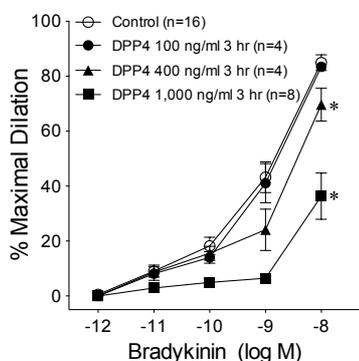


図3. \*P < 0.05 (versus control)

血管内腔に投与するDPP4濃度を100 ng/ml、400 ng/ml、1,000 ng/mlと変え、DPP4投与前と投与3時間後のブラジキニンへの反応を評価した。DPP4による血管内皮機能障害は濃度依存性であり、低濃度のDPP4では障害されなかった。以上の結果からDPP4による血管内皮障害が内腔投与に伴う手技の影響や、単純な時間経過によるものではないことが示唆された。(図3)

### ③ DPP4による網膜血管内皮機能障害の機序

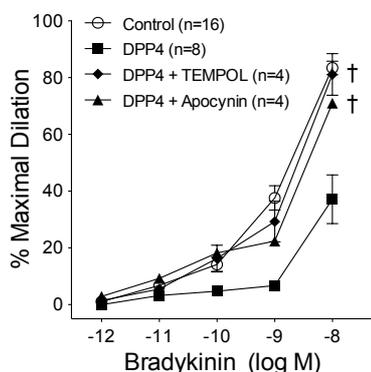


図4. †P < 0.05 (versus DPP4)

DPP4の血管内皮機能障害における活性酸素の関与を検討するため、活性酸素除去剤であるTEMPOL (1 mM)をDPP4 (1,000 ng/ml)と同

時投与し、3時間後のブラジキニンの反応を比較した。TEMPOL同時投与群ではブラジキニンによる拡張反応の減弱は認められず、DPP4による血管内皮機能障害に活性酸素が関与していると考えられた。また、NAD(P)H oxidase阻害薬であるApocynin (100 μM)との同時投与でも、ブラジキニンによる拡張反応は保たれた。

### ④ DPP4阻害薬による血管内皮保護作用

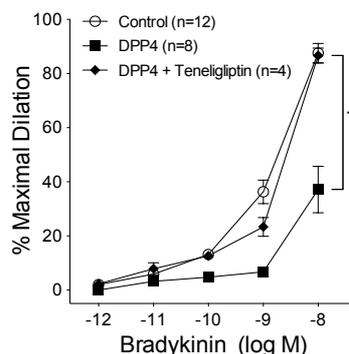


図5. †P < 0.05 (versus DPP4)

DPP4阻害薬の血管内皮保護作用を検討するため、DPP4 (1,000 ng/ml)とDPP4阻害薬であるTenelegliptin (0.5 μM)を同時投与し、3時間後のブラジキニンの反応を比較した。Tenelegliptin同時投与群ではブラジキニンによる拡張反応が保たれており、DPP4阻害薬TenelegliptinがDPP4による網膜血管内皮機能障害に対して保護的に働くことが示唆された。

以上の摘出ブタ網膜血管を用いたex vivo実験から得られた研究結果をまとめると、以下のシエマのような機序が考えられた。

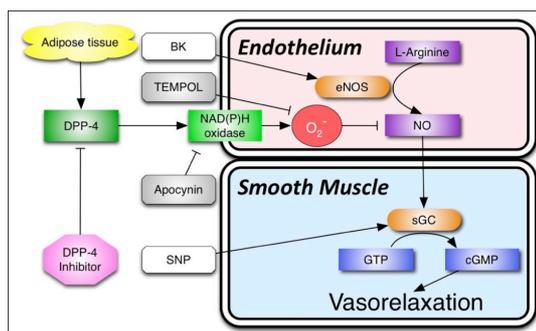


図6. DPP4による血管内皮機能障害の機序

(2) 2型糖尿病患者における臨床研究

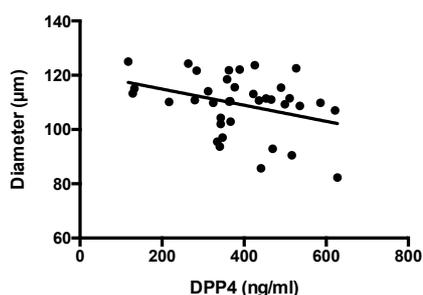


図7. 男性患者における血清DPP4濃度と網膜血管径の相関 ( $r = -0.345$ )

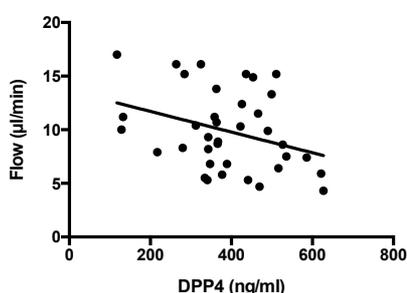


図8. 男性患者における血清DPP4濃度と網膜血流量の相関 ( $r = -0.329$ )

性別をわけて検討を行ったところ、男性のみ血清DPP4濃度と網膜血管径（図7）および網膜血流量（図8）が負の相関を示した。女性では相関は認められなかった。

本研究から2型糖尿病患者において脂肪組織から過剰に分泌されたDPP4が網膜血管内皮機能を障害し、血管内皮依存性血管拡張因子が減少、収縮因子が増加することにより、網膜血管径が細くなり網膜血流量低下の原因の1つとなっている可能性があることが明らかとなった。各種阻害剤を用いた検討から、このDPP4による網膜血管内皮機能障害にNAD(P)H oxidaseを介する酸化ストレスの影響があることが示唆された。さらに、DPP4阻害薬Teneligliptinが網膜血管内皮機能保護に役立つことを見出し、網膜血管において血糖値に依存しない膜外作用を有することを明らか

とした。

以上の研究結果を英語論文として執筆し、学術雑誌に投稿中である。

<引用文献>

- ① Lamers, D. *et al.* Dipeptidyl peptidase 4 is a novel adipokine potentially linking obesity to the metabolic syndrome. *Diabetes* **60**, 1917-1925, (2011).
- ② Mannucci, E. *et al.* Hyperglycaemia increases dipeptidyl peptidase IV activity in diabetes mellitus. *Diabetologia* **48**, 1168-1172, (2005).

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）

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大野 晋治 (ONO, Shinji)  
旭川医科大学・医学部・助教  
研究者番号：50571890

(2) 研究協力者

吉田 晃敏 (YOSHIDA, Akitoshi)  
長岡 泰司 (NAGAOKA, Taiji)  
大前 恒明 (OMAE, Tsuneaki)  
大谷 真一 (OTANI, Shinichi)  
横田 陽匡 (YOKOTA, Harumasa)  
下内 昭人 (SHIMOUCHI, Akito)  
宋 勇錫 (SONG, Young-Seok)  
松本 千恵美 (MATSUMOTO, Chiemi)  
ターナー 晶 (TANNER, Akira)

Lih Kuo