

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 4 日現在

機関番号：11401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461209

研究課題名(和文) GLP-1/DPP-4の腎臓内シグナル伝達機構の解明と糖尿病性腎症の治療への応用

研究課題名(英文) The role of GLP-1/DPP-4 signaling in diabetic nephropathy and its therapeutic potential

研究代表者

藤田 浩樹 (FUJITA, HIROKI)

秋田大学・医学部・講師

研究者番号：30333933

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：GLP-1とその分解酵素DPP-4の腎臓内シグナル伝達系とこれらをターゲットとした糖尿病性腎症に対する治療の可能性について検討した。進行性糖尿病性腎症マウスモデルKK/Ta-Akitaを用いた研究から、DPP-4阻害によりその基質の一つであるSDF-1の発現が腎臓の糸球体上皮細胞と遠位ネフロンで増加すること、この発現増加は尿中ナトリウム排泄を促進し糸球体高血圧の改善をもたらすこと、SDF-1からのシグナル遮断による腎保護効果の消失が示された。DPP-4阻害は腎臓内での活性型GLP-1のレベルを高めることに加え、SDF-1の発現増加を惹起することで腎保護に貢献する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：SDF-1 α is an important substrate of DPP-4. We investigated the role of SDF-1 α in the pathogenesis of diabetic nephropathy and its modification by DPP-4 inhibition independent of GLP-1 receptor signaling using nephropathy-prone KK/Ta-Akita diabetic mice. Increased SDF-1 expression was observed in glomerular podocytes and distal nephrons. DPP-4 inhibitor linagliptin, but not GLP-1 receptor agonist liraglutide, further augmented renal SDF-1 expression. The progression of albuminuria, glomerulosclerosis, periglomerular fibrosis, and renal oxidative stress was suppressed by linagliptin treatment. Linagliptin treatment increased urinary sodium excretion and attenuated the increase in GFR which reflects glomerular hypertension. We conclude that DPP-4 inhibition, independent of GLP-1 receptor signaling, contributes to protection of the diabetic kidney through SDF-1-dependent antioxidative effects and amelioration of adverse renal hemodynamics.

研究分野：医歯薬学

キーワード：糖尿病性腎症 インクレチン ケモカイン

1. 研究開始当初の背景

消化管由来の Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) は血糖値依存性にインスリン分泌促進作用を発揮し、グルカゴン分泌抑制作用と体重増加抑制作用を併せ持つインクレチンホルモンである。Dipeptidyl peptidase-4 (DPP-4) はこの GLP-1 を活性型から不活性型に分解する酵素であり、この酵素の阻害は活性型 GLP-1 レベルの増加に貢献する。このような背景から、インクレチン関連薬と呼ばれる GLP-1 受容体作動薬および DPP-4 阻害薬は現在 2 型糖尿病の治療薬として幅広く用いられている。

GLP-1 受容体 (GLP-1R) は膵臓に存在するのみならず、膵臓外のような臓器においても発現していることが報告されている。現在使用可能な GLP-1R に対する多くの市販抗体は非常に非特異的であることが判明しており (Panjwani et al. *Endocrinology* 154: 127-139, 2013)、これらの抗体を使用して腎臓内での GLP-1R の発現・局在について解析した場合、非常に曖昧なデータが示されることが想定される。そこで、最近、我々は世界で初めて In situ hybridization と RT-PCR の手法によるマウス腎臓内 GLP-1R の発現解析を行い、この受容体は腎臓内では糸球体係蹄壁と血管壁に特異的に発現していることを明らかにしてきた (Fujita et al. *Kidney Int* 85: 579-589, 2014)。

さらに、我々の研究グループで確立した糖尿病性腎症の発症進展への感受性の異なる 2 種類の非肥満型インスリン欠乏型 Ins2Akita 糖尿病マウスモデル (Fujita et al. *J Am Soc Nephrol* 20: 1303-1313, 2009) を用いた研究から、糖尿病性腎症発症に比較的抵抗性を示す C57BL/6-Ins2Akita (C57BL/6-Akita と略す) マウスの GLP-1R を欠損させることでアルブミン尿およびメサンギウム基質の増加など糖尿病性腎症の進行がみられ、進行性の糖尿病性腎症を発症する KK/Ta-Ins2Akita (KK/Ta-Akita と略す) マウスに GLP-1R 作動薬 Liraglutide を投与することで糖尿病性腎症の進行が抑制されること、これらの効果は Akita マウスの耐糖能に関係なく、GLP-1 の独立した効果としてもたらされることを明らかにしてきた (Fujita et al. *Kidney Int* 85: 579-589, 2014)。このような GLP-1 による糖尿病状態下での有益な腎保護作用の機序に関しては、GLP-1R シグナルの増加により腎臓内での cAMP/PKA が活性化され、それに伴い抗酸化作用の増強することで腎臓内での酸化ストレスが軽減し、糖尿病性の腎病変の進行が抑制されることが考察された (Fujita et al. *Kidney Int* 85: 579-589, 2014)。しかしながら、GLP-1R シグナル増加による腎保護効果の詳細な分子メカニズムに関しては、今後もさらに解明される余地がある。

GLP-1R シグナル伝達系に関連したもう一つの重要な研究課題は、DPP-4 から派生する

腎臓内シグナル伝達系と糖尿病性腎症におけるその役割を解明することである。最近、DPP-4 阻害薬が心臓をはじめとする様々な臓器保護作用を有することが基礎研究および臨床研究から報告されてきている一方で、腎保護効果およびその分子機構については未だ十分に解明されていない。DPP-4 は GLP-1 以外の数多くの基質 (ペプチド) をターゲットとして分解および不活化することが知られており、その中でも注目すべき点は、DPP-4 がケモカインの Stromal cell-derived factor-1 α (SDF-1 α : 別名 CXCL12) を基質としていることである。SDF-1 α は Stem cell および骨髄由来 Progenitor cell の組織障害部位への誘因作用や抗アポトーシス効果を発揮することが知られており、様々な臓器に対する保護作用をもたらすことが期待される。しかしながら、腎臓における DPP-4/SDF-1 α シグナル伝達系の分子機構および腎症に対するその保護的役割については未だ解明されていない。

2. 研究の目的

消化管由来のホルモンであるインクレチン GLP-1 とその分解酵素 DPP-4 による腎臓内シグナル伝達の詳細な分子機構、特にこれらの腎臓内における相互作用を解明するとともに、GLP-1 および DPP-4 をターゲットとした治療が糖尿病性腎症に対する新しい治療戦略となり得るか明らかにすることを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、はじめに 15 週齢オス C57BL/6-Akita および KK/Ta-Akita マウスの腎臓における SDF-1 α の発現・局在について、免疫組織化学染色および RT-PCR の手法を用いて解析を行った。研究成果の項目で詳細は説明するが、SDF-1 α はマウスの腎臓において糸球体上皮細胞と遠位ネフロンに局在して発現していることが確認されたため、引き続き以下の実験を遂行した。

(1) オス KK/Ta-Akita マウスに対する DPP-4 阻害薬投与による腎への影響: GLP-1R 作動薬の効果との比較

DPP-4 阻害薬投与群には胃ゾンデを用いて DPP-4 阻害薬 Linagliptin (5mg/kg/day) の経口投与、GLP-1R 作動薬投与群には GLP-1R 作動薬 Liraglutide (200 μ g/kg/day) の皮下注射、コントロール群には 0.5% Carboxymethylcellulose (CMC: Linagliptin の溶解に用いた溶液) の投与を行った。6 週齢から 6 週間の薬剤投与後、アルブミン尿、糸球体濾過量 (GFR)、各種臨床的パラメーター (電解質を含む) を測定するとともに腎臓を摘出し、SDF-1 α の腎臓における発現の変化、腎組織病変について解析を行った。

(2) オス GLP-1R 欠損 KK/Ta-Akita マウスに対する DPP-4 阻害薬投与による腎への影響
上記 (1) の実験で観察された DPP-4 阻害

薬投与による SDF-1 α の発現および腎病変の変化が GLP-1R シグナルの上昇から独立してもたらされるものなのかどうかについて検討するため、GLP-1R 欠損 KK/Ta-Akita マウスに対して DPP-4 阻害薬 Linagliptin (5mg/kg/day) の経口投与を 6 週齢から 6 週間行い、上記 (1) の実験と同様に各種臨床的パラメーターの測定とともに腎病変の解析を行った。また、コントロール群には同様に 0.5% CMC の投与を行った。

(3) オス KK/Ta-Akita マウスに対する選択的 SDF-1 α 受容体 (CXC chemokine receptor 4: CXCR4) 拮抗薬投与による腎への影響

上記 (1) の実験で観察された DPP-4 阻害薬投与による尿中電解質の変化および GFR の正常化により示唆される糸球体高血圧の改善が SDF-1 α の発現の変化によりもたらされるものなのかどうかについて検証するため、KK/Ta-Akita マウスに対して 6 週齢から 10 日間胃ゾンデを用いて選択的 SDF-1 α 受容体拮抗薬 AMD3100 (1mg/kg/day) の経口投与を行い、尿中電解質および GFR の変化について調査を行った。

上記 (1) ~ (3) の実験において、遺伝子発現解析は quantitative RT-PCR、SDF-1 α の免疫組織化学染色は R&D 社の抗体を用いて行い、糸球体は Dynabead perfusion 法にて単離した。GFR は FITC-inulin の single injection 法、血圧は tail-cuff 法を用いて測定した。

4. 研究成果

(1) 腎臓における SDF-1 α の発現・局在と高血糖によるその発現への影響

はじめに、15 週齢オス C57BL/6-Akita および KK/Ta-Akita 糖尿病マウスの腎臓における SDF-1 α の発現・局在について、免疫組織化学染色および RT-PCR の手法を用いて解析を行った。図 1 に示すように、免疫組織化学染色による解析から、SDF-1 α はマウス腎臓の糸球体上皮細胞と遠位ネフロン (遠位尿細管、集合管) において特異的に局在して発現していることが判明した。

さらに、進行性糖尿病性腎症マウスモデル KK/Ta-Akita マウスの腎臓ではその非糖尿病野生型コントロールに比して SDF-1 α の発現が増加していることも示された (図 1)。その一方で、糖尿病性腎症の発症に比較的抵抗性を示す C57BL/6-Akita マウスの腎臓での SDF-1 α の発現に関しては、その非糖尿病野生型コントロールに比して有意な増加はみられなかった (図 1)。これらの所見から、進行した糖尿病性腎症の病態において腎障害の修復のため腎臓での SDF-1 α の発現が増加する可能性が考察された。RT-PCR による SDF-1 α の遺伝子レベルでの発現解析においても同様の結果が確認された。

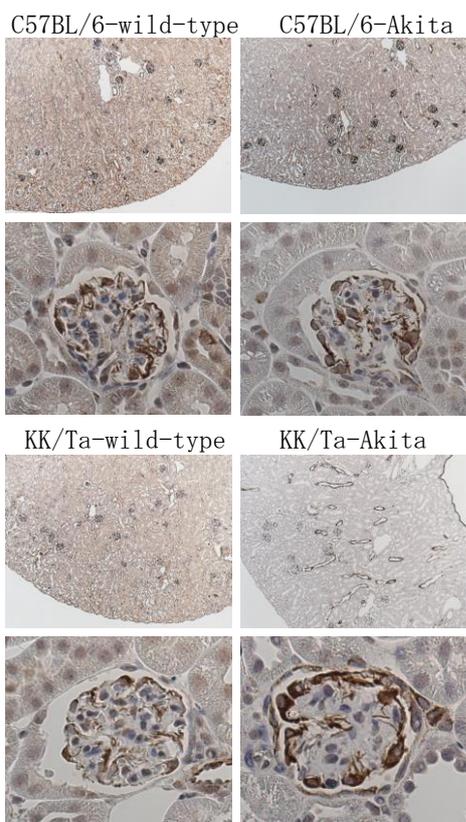


図 1. 腎臓の SDF-1 α 免疫組織化学染色 (Takashima et al. *Kidney Int* 2016 より引用、一部改変)

(2) DPP-4 阻害による腎臓での SDF-1 α の発現への影響と腎病変の変化：進行性糖尿病性腎症マウスモデル KK/Ta-Akita を用いた解析

6 週齢オス KK/Ta-Akita マウスに対し、6 週間の DPP-4 阻害薬 Linagliptin の投与実験を行った。この薬剤投与群との比較のため、コントロール群に加え、GLP-1R 作動薬 Liraglutide 投与群も設定した。期待していたごとく、コントロール群と比較して DPP-4 阻害薬投与群の腎糸球体上皮細胞および遠位ネフロンにおける SDF-1 α のさらなる発現増加が免疫組織化学染色による解析から確認された (図 2)。RT-PCR による SDF-1 α の遺伝子レベルの発現解析においても同様の結果が得られた (図 2)。その一方で、コントロール群と比較して GLP-1R 作動薬投与群での腎臓における SDF-1 α の発現増加は確認できなかった (図 2)。DPP-4 阻害は活性型 GLP-1 の分解を阻害することにより腎臓内での活性型 GLP-1 レベルとそのシグナルを高めることに貢献するが、GLP-1R 作動薬投与による腎臓での SDF-1 α の発現増加が観察されなかったことから、DPP-4 阻害による腎臓内 SDF-1 α upregulation は GLP-1R シグナルから独立してもたらされる作用と考えられる。この考察は、6 週齢オス GLP-1R 欠損 KK/Ta-Akita マウスに対して 6 週間 DPP-4 阻害薬の投与後にもタンパクおよび遺伝子レベルでの腎臓における SDF-1 α の発現増加が観察されたこと

からも支持される。

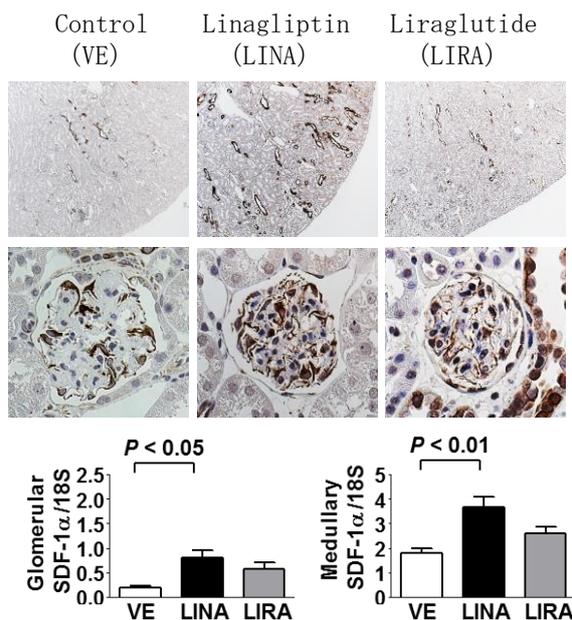


図 2. KK/Ta-Akita マウスに対する 6 週間の治療後の腎臓における SDF-1 α の免疫組織化学染色と定量 RT-PCR 解析 (Takashima et al. *Kidney Int* 2016 より引用、一部改変)

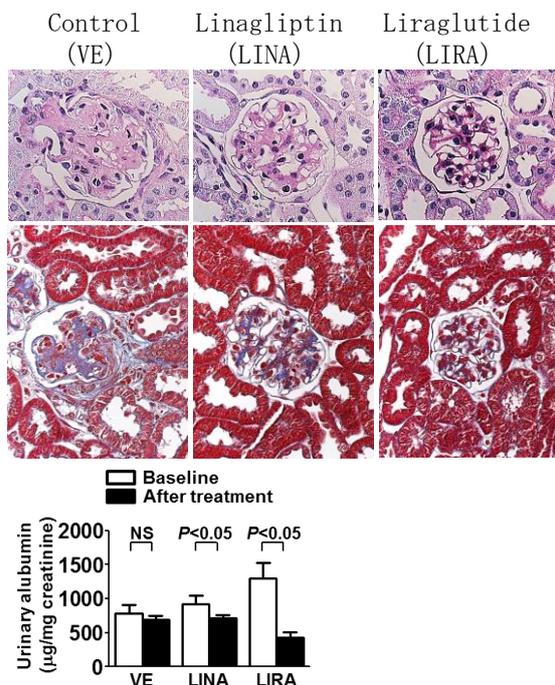


図 3. KK/Ta-Akita マウスに対する 6 週間の治療後の腎糸球体組織病変 (上図: PAS、Masson trichrome 染色) とアルブミン尿の変化 (下図) (Takashima et al. *Kidney Int* 2016 より引用、一部改変)

また、DPP-4 阻害薬投与と GLP-1R 作動薬投与の両群では 6 週間の治療後、アルブミン尿の減少、メサンギウム基質増加および腎間質

線維化の抑制など糖尿病性腎障害進行の抑制が観察された (図 3)。両群では、腎臓における DHE 染色および MDA 染色でのシグナルの減弱が観察されたことから (図 4)、以前の我々の報告 (Fujita et al. *Kidney Int* 85: 579-589, 2014) も考慮した上で、腎臓での cAMP レベルの増加に伴う酸化ストレスの減少が腎病変進行の抑制に貢献したものと考えられた (図 5)。

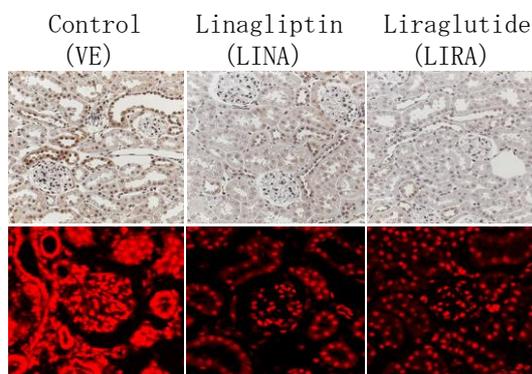


図 4. KK/Ta-Akita マウスに対する 6 週間の治療後の腎臓における酸化ストレスマーカーの変化 (上図: MDA 染色、下図: DHE 染色) (Takashima et al. *Kidney Int* 2016 より引用、一部改変)

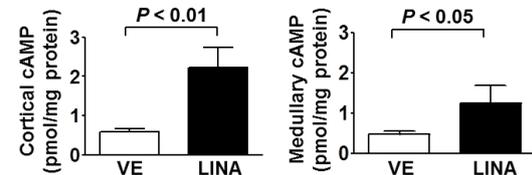


図 5. GLP-1R 欠損 KK/Ta-Akita マウスに対する 6 週間の DPP-4 阻害薬 Linagliptin 治療後の腎臓における cAMP レベルの変化 (Takashima et al. *Kidney Int* 2016 より引用、一部改変)

さらに、この薬剤投与実験においては、コントロール群と比較して DPP-4 阻害薬投与群で尿中ナトリウム排泄の増加 (0.98 ± 0.13 vs. 1.90 ± 0.27 mEq/mgCr; $P < 0.05$) と糸球体高血圧の改善を反映する GFR の正常化も観察された (13.5 ± 1.7 vs. 8.3 ± 1.5 μ l/min/gBW; $P < 0.05$)。一方、GLP-1R 作動薬投与群では尿中ナトリウム排泄の有意な増加は認められなかった。DPP-4 阻害による遠位ネフロンにおける SDF-1 α の発現増加がこの現象に関与しているものと想定され、引き続きこの検証実験を行った。

(3) 選択的 DPP-4 SDF-1 α 受容体 (CXCR4) 拮抗薬投与による尿中ナトリウム排泄および腎血行動態への影響: 進行性糖尿病性腎症マウスモデル KK/Ta-Akita を用いた解析

6 週齢オス KK/Ta-Akita マウスに対し、10 日間の選択的 SDF-1 α 受容体 (CXCR4) 拮抗薬 AMD3100 の投与実験を行った。期待していた

ごとく、選択的 SDF-1 α 受容体拮抗薬投与群では尿中ナトリウム排泄の減少と糸球体高血圧の進行を反映する上昇した GFR を示していた (図 6)。

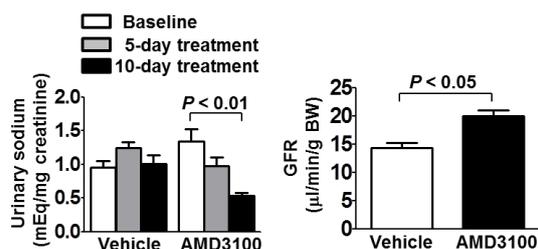


図 6. KK/Ta-Akita マウスに対する 10 日間の選択的 SDF-1 α 受容体拮抗薬 AMD3100 投与後の尿中ナトリウム排泄と GFR の変化 (Takashima et al. *Kidney Int* 2016 より引用、一部改変)

(4) 研究成果のまとめと今後の展望

本研究の結果から、まず SDF-1 α はマウスの腎臓においては糸球体上皮細胞と遠位ネフロン (遠位尿細管、集合管) において特異的に局在して発現しており、高血糖による腎障害のもとではその進行を抑制するよう発現が増加することを明らかにした。さらに、進行性糖尿病性腎症マウスモデル KK/Ta-Akita マウスに対する DPP-4 阻害は、腎臓内 GLP-1R シグナルの増加から独立して腎臓における SDF-1 α のさらなる upregulation を引き起こすこと、この現象に伴い、腎臓内 cAMP レベルの増加を介した抗酸化作用により糸球体を保護するとともに、遠位ネフロンにおける尿中ナトリウム排泄の増加と糸球体高血圧 (糸球体過剰濾過) の改善から糖尿病状態下における腎血行動態の正常化に貢献することを明らかにした。以前我々が報告したように (Fujita et al. *Kidney Int* 85: 579-589, 2014)、腎臓内 GLP-1R シグナルの増加も糖尿病状態下での腎保護に貢献する。本研究の知見から、DPP-4 阻害は腎臓内 GLP-1R シグナル増加に加え、SDF-1 α upregulation の作用も発揮することが示され、これら両面の効果から糖尿病性腎症の発症進展の抑制に大きく貢献することが期待される。しかしながら、DPP-4 阻害が臨床的に糖尿病性腎症に対する新たな治療戦略として確立するためには、今後のさらなる研究が必要とされる。

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 1 件)

Satoru Takashima, Hiroki Fujita, Hiromi Fujishima, Tatsunori Shimizu, Takehiro Sato, Tsukasa Morii, Katsushi Tsukiyama, Takuma Narita, Takamune Takahashi, Daniel J Drucker, Yutaka Seino, Yuichiro Yamada:

Stromal cell-derived factor-1 is upregulated by dipeptidyl peptidase-4 inhibition and has protective roles in progressive diabetic nephropathy. *Kidney Int* 90: 783-796, 2016, 査読有
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.kint.2016.06.012>

[学会発表] (計 3 件)

① Hiroki Fujita: Incretin-based therapies for diabetic nephropathy, Asia Islet Biology & Incretin Symposium (AIBIS)、2017 年 3 月 3 日、Seoul, Korea

② Hiroki Fujita, Satoru Takashima, Yuichiro Yamada: Therapeutic potential of incretin-based drugs in diabetic nephropathy, 第 59 回日本糖尿病学会年次学術集会、2016 年 5 月 20 日、京都

③ 高嶋悟、藤田浩樹、佐藤優洋、加藤俊祐、保泉学、清水辰徳、佐藤雄大、森井幸、成田琢磨、山田祐一郎、DPP4 阻害による SDF1 の upregulation を介した腎保護作用の解明：進行性糖尿病腎症マウスモデル KK/Ta-Akita を用いた解析、第 59 回日本糖尿病学会年次学術集会、2016 年 5 月 19 日、京都

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.akita-u.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤田浩樹 (FUJITA HIROKI)

秋田大学・医学部・講師

研究者番号：30333933

(2) 研究分担者

山田祐一郎 (YAMADA YUICHIRO)

秋田大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：60283610