

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K17004

研究課題名(和文)短腸症候群における糖尿病薬DPP4阻害薬による新規治療法開発の基盤研究

研究課題名(英文)The fundamental research to develop novel treatment with DPP-4 inhibitor for

研究代表者

末吉 亮 (Sueyoshi, Ryo)

順天堂大学・医学部・非常勤助教

研究者番号：10724172

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：短腸症候群モデルマウスにおいてDPP4阻害薬による腸管バリア機能増大のメカニズムを解明すべく、タイト結合蛋白・細胞間結合に着目し、本研究を遂行した。RT-PCR法・蛍光免疫染色法による検討において、短腸症候群手術+DPP4阻害薬を投与した群は短腸症候群手術+生食を投与した群と比較し、E-CadherinとOccludinに関して有意差を有して高値を呈していた。本研究の結果は、近年注目されているDPP4阻害薬の抗炎症作用を証明しており、DPP4阻害薬の短腸症候群への有用性を示唆した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

短腸症候群に対して、海外で唯一認可されている薬剤がGLP-2アナログ製剤Teduglutideである。しかし、Teduglutideの欠点は2点ある(皮下注射製剤である投与中止すると薬効が減弱する)。DPP4阻害薬は経口摂取製剤であり、以前の研究にて投与中止後の薬効の持続性を証明しており、これらの欠点を補完し得る。

本研究ではE-CadherinとOccludinに関してDPP4阻害薬による有意な変化を呈していた。この結果はDPP4阻害薬により、短腸症候群モデルマウスの腸管上皮細胞の腸管バリア機能の増強を示唆し、バクテリアルトランスロケーションの低減への可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：Purpose: Bacterial overgrowth commonly occurs and favors bacterial translocation in short bowel syndrome (SBS). Glucagon like peptide-2 (GLP-2) is effective for treating SBS but is rapidly inactivated by dipeptidyl peptidase IV (DPP4). DPP4 inhibitor (DPP4i) is known to be effective for treating SBS. Here, we investigated cell junction protein function following DPP4i administration in a mouse model of SBS. Methods: All control and DPP4i mice had 50% of their proximal small bowel resected. The functions of cell junction proteins were assessed by RT-PCR and immunohistochemistry. Results: E-Cadherin was significantly higher in the DPP4i group than in the control group. Positive staining for E-cadherin and occludin varied widely between the control and DPP4i groups. Conclusion: Up-regulation of E-cadherin and occludin by DPP4 inhibitor may be correlated with the anti-inflammatory action of DPP4 inhibitor. Therefore, DPP4 inhibitor may reduce bacterial translocation in SBS.

研究分野：消化管

キーワード：短腸症候群 DPP4阻害薬 タイト結合 E-Cadherin Occludin

科学研究費助成事業 研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

短腸症候群(以降 本症)に対しての治療法は外科的治療法として腸管吸収面積を増大させるための術式が多数考案されているが、何れの術式も満足できる予後は得られていない。また、本症患児は大量腸管切除により、腸管の吸収面積が著しく低下するため、多くの本症患者が栄養吸収不良に陥り中心静脈カテーテル栄養に依存している。長期間の中心静脈栄養は、胆汁の腸肝循環が滞ることから、うっ滞性の肝障害を呈し、致死的な肝機能障害をきたすことがあるため、小腸・肝臓を同時移植が必要となる場合がある。しかし、小腸移植の予後は **10** 年生存率が **50%** 程度と決して良好とはいえない。

このような背景の中、米国では腸管粘膜増殖作用を有する **GLP-2** アナログ製剤 **Teduglutide** (商品名: **Gattex**[®]) が本症に対して胃酸分泌抑制作用・胃の蠕動抑制作用による腸液分泌の減少を促すため、**2012** 年に本症に対して **FDA** の認可に至っている。しかし、**Teduglutide** は皮下注射製剤であるため、患者にとって侵襲を伴わざるを得ない。また、**Teduglutide** は投与を中止すると薬効が減少することも証明されており、長期投与が必要な薬剤といえる。そこで申請者らは **GLP-2** が体内で **DPP4** により、**7** 分間で不活化される薬理作用を有するため、糖尿病治療薬である **DPP4** 阻害薬によって血中 **GLP-2** 濃度が上昇するのではないかという発想に至り、本症に対する治療効果の研究を行なった。そして、短腸症候群モデルマウスに対しての腸管粘膜の吸収面積の増大・腸管上皮細胞のバリア機能の増強を証明し、**DPP4** 阻害薬の本症に対しての適応疾患拡大に向けた大きな足掛かりを得た。

2. 研究の目的

本症は残存小腸の代償性拡張に伴い、腸内細菌や病原微生物の異常増殖を生じやすく、これら細菌の体内侵入を許しやすい状態にある。上述したように、以前の研究において **DPP4** 阻害薬が本症モデルマウスの腸管バリア機能増強をもたらしたことから、**DPP4** 阻害薬による腸管バリア機能に影響するメカニズム解析を行ない、**DPP4** 阻害薬の抗炎症作用を探索していくこととした。特に腸管上皮細胞の膜透過性に影響を与える要素としてタイト結合蛋白・細胞間結合蛋白に焦点を絞り、**DPP4** 阻害薬投与による変化を分析していく。

3. 研究の方法

本研究には 10-12 週の C57/B6FJ マウスの雄マウスを用いた。研究対象を Naïve 群: 短腸症候群手術(-)・**DPP4** 阻害薬投与(-)。ND 群: 短腸症候群手術(-)・**DPP4** 阻害薬投与(+)
Control 群: 短腸症候群(+)
DPP4 阻害薬投与(-) **DPP4** 阻害薬群: 短腸症候群(+)
DPP4 阻害薬投与(+)
の 4 群に分類した。薬剤は 1 日 2 回、経口投与し、コントロール群の薬剤としては生理食塩水を投与した。本症モデルマウスの術式は以前の研究に従い、50%小腸切除を行い、腸吻合を施行した。マウスは術後 7 日に犠死せしめ、腸管組織・便検体・血液検体などの組織を採取した。腸管組織は吻合の口側の空腸組織、肛門側の回腸組織をそれぞれ採取した。**DPP4** 阻害薬は食欲に係る **GLP-1** についても影響を及ぼすことから、各群のマウスの体重を術後 3 日・7 日で計測した。また、**DPP4** 阻害薬は糖尿病薬であり低血糖も懸念されることから、血糖測定も術後 7 日目に施行した。タイト結合蛋白・細胞間結合蛋白の分析は RT-PCR の定量法と蛍光免疫染色での各蛋白質の陽性細胞数率で評価した。また、各群の腸管粘膜の組織評価については H-E 染色標本を用いて計測を行った。

4. 研究成果

組織学的変化

DPP4 阻害薬群では Control 群と比較して、空腸の絨毛高が有意に増大していた (**DPP4** 阻害薬群: $431.2 \pm 30.6 \mu\text{m}$, Control 群: $384.7 \pm 39.0 \mu\text{m}$, $P < 0.01$)。同様に **DPP4** 阻害薬群では Control 群と比較して、空腸の陰窩の深さは有意に増大していた。 (**DPP4** 阻害薬群: $107.2 \pm 19.0 \mu\text{m}$, Control 群: $92.4 \pm 10.6 \mu\text{m}$, $P < 0.01$)。一方で、回腸の組織変化については各群で有意差のある変化は認められなかった。

体重・血糖値の変化

体重については短腸症候群手術を施行した **DPP4** 阻害薬群と Control 群は短腸症候群手術を施行していない Naïve 群と ND 群とを比較すると有意に体重減少していた ($P < 0.01$)。 **DPP4** 阻害薬投与による有意な体重減少は認められなかった。血糖値については短腸症候群手術を施行した群で低値となる傾向を呈していたが有意差は認めなかった。

RT-PCR 結果

E-Cadherin に関しては回腸にて **DPP4** 群は Control 群と比較し、有意に高値を呈していた (**DPP4** 阻害薬群 2.92 ± 0.87 , Control 群 2.04 ± 0.46)。Occludin に関しては回腸にて **DPP4** 群は Control 群と比較し、有意に高値を呈していた (**DPP4** 阻害薬群 2.47 ± 0.73 , Control 群

1.86±0.49, $P < 0.05$)。その他、Zo-1, Claudin-1, Claudin-4 については各群での比較では有意差は認めなかった。

蛍光免疫染色

E-Cadherin, Occludin 抗体による蛍光免疫染色を施行し、DPP4 阻害薬群と Control 群との比較にて DPP4 阻害薬群の陽性細胞率が有意に高値であった (E-Cadherin: DPP4 阻害薬群 57.6±12.1%, Control 群 31.9±8.0%, $P < 0.01$ / Occludin: DPP4 阻害薬群 48.3±5.1%, Control 群 41.5±3.7%, $P < 0.05$)。

上記の結果から本症モデルマウスにおいて DPP4 阻害薬は、タイト結合蛋白・細胞間結合蛋白の中でも、特に E-Cadherin と Occludin に変化を及ぼして腸管バリア機能を増強させていることが示唆された。これらの結果から、DPP4 阻害薬は本症モデルマウスに対して抗炎症作用を有していることが実証された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Takeda M, Miyahara K, Sueyoshi R, Arakawa A, Lane GJ, Yamataka A.	4. 巻 35
2. 論文標題 Innervation of the entire internal anal sphincter in a mouse model of Hirschsprung's disease: a first report.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Pediatr Surg Int	6. 最初と最後の頁 209-214
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00383-018-4397-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ryo Sueyoshi, Katsumi Miyahara, Nana Nakazawa-Tanaka, Naho Fujiwara, Takanori Ochi, Atsuyuki Yamataka	4. 巻 36
2. 論文標題 DPP4 Inhibitor Reinforces Cell Junction Proteins in Mouse Model of Short Bowel Syndrome	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pediatr Surg Int	6. 最初と最後の頁 49-55
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00383-019-04571-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Ryo Sueyoshi, Katsumi Miyahara, Nana Nakazawa-Tanaka, Naho Fujiwara, Takanori Ochi, Atsuyuki Yamataka
2. 発表標題 DPP4 Inhibitor Reinforces Cell Junction Proteins in Mouse Model of Short Bowel Syndrome
3. 学会等名 The 32nd International Symposium on Paediatric Surgical Research (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	宮原 克 (Miyahara Katsumi)	順天堂大学・研究基盤センター・技術員 (32620)	