

令和 5 年 5 月 16 日現在

機関番号：31201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07855

研究課題名(和文) DPP-4阻害薬の臨床効果とBDNF遺伝子多型との関連

研究課題名(英文) Association between the clinical effect of DPP-4 inhibitors and the genetic polymorphism of BDNF gene

研究代表者

高橋 義彦 (Yoshihiko, Takahashi)

岩手医科大学・医学部・准教授

研究者番号：80415562

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：脳由来神経栄養因子(BDNF)遺伝子の一塩基多型であるrs6265(G/A)及び身体活動(PA)とDPP-4阻害薬の有効性との関連を検討した。無効例は投薬開始後3-4か月のHbA1c低下が0.2%未満と定義し、活動量は質問票で評価した。メトホルミン内服例を除く99名中、G/*かつ低PA、G/*かつ高PA、A/Aかつ低PA、A/Aかつ高PA各群の無効例は各々56.8%、28.6%、25.0%、20.0%($p = 0.037$)で、多変量解析でも同様であった。活動量依存性BDNF分泌が保持されるG/*遺伝子型患者ではそれが障害されるA/A型患者に比してPAが有効性に重要という仮説を提示する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

BDNFは身体活動量の増加により分泌が増加し、インスリン抵抗性改善やインスリン分泌改善など糖代謝に有効である。その一塩基多型rs6265は日本人でも頻度の高い遺伝子多型である。一方DPP-4阻害薬は日本人2型糖尿病において最も多く投与され、低血糖などの副作用が低く高齢者などでも安全に使用できる。しかし一部の患者においては無効であることが知られており、どのような患者に投与するべきか、あるいはどのように生活習慣を修飾すれば有効性が高まるかということは、糖尿病治療の上で重要である。遺伝子多型と運動とが薬剤の有効性に関連する可能性を示した点は、個人の特質を考慮した医療という観点で有意義である。

研究成果の概要(英文)：We studied whether or not the effectiveness of DPP-4 inhibitors is associated with a single nucleotide polymorphism of the BDNF gene, rs6265(G/A), and physical activity (PA). Non-responders were defined as patients who showed less than 0.2% improvement of HbA1c 3 or 4 months after starting the medication, and PA was evaluated using a questionnaire. Among 99 patients after exclusion of metformin users, the non-responder rates of G/* with lower PA, G/* with higher PA, A/A with lower PA, and A/A with higher PA, were 56.8%, 28.6%, 25.0%, and 20.0%, respectively ($p=0.037$). This finding was similarly observed in a multivariate model. We propose a hypothesis that, in G/* patients who preserve activity-dependent secretion of BDNF, PA might be more important for the effectiveness of DPP-4 inhibitors than in A/A patients who are defective for that type of secretion.

研究分野：糖尿病学

キーワード：脳由来神経栄養因子 DPP-4阻害薬 遺伝子多型 2型糖尿病

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

日本人 2 型糖尿病の治療において、Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) を増加させることによってインスリン分泌を促進するジペプチジルペプチダーゼ 4 (DPP-4) 阻害薬は最も頻用されているが、一部の患者においては効果が乏しいことが指摘されている。我々は DPP-4 阻害薬の有効性に影響する因子として、生活習慣のうち身体活動量に着目し、運動負荷によって筋肉細胞から分泌されるサイトカインのうち主要な因子であるインターロイキン 6 の遺伝子プロモーター領域の遺伝子多型 (SNP) に関して過去に研究を行った。その結果中等度以上の身体活動を持つ患者群においては、日本人に頻度の高い SNP である rs1800796 G アリルと rs2097677 A アリルとの組み合わせを持つ場合 (G/* -A/*) に、最も頻度の高い遺伝子座組み合わせ (ハプロタイプ) である rs1800796 C アリルと rs2097677 G アリル (C-G) のホモ接合患者 (C/C-G/G) に比べて DPP-4 阻害薬無効例が有意に減少することを報告した (Journal of Diabetes Investigation 2015 Mar;6(2):173-81)。我々は身体活動と DPP-4 阻害薬の有効性との関連についてさらに研究を進めるため、身体活動によって脳や筋肉において分泌が促進される脳由来神経栄養因子 (BDNF) に注目した。脳細胞において BDNF 分泌は GLP-1 によって分泌が促進されることが動物実験で報告されており、ヒトにおいても BDNF は糖代謝などにより影響をもたらすことが複数報告されていた。

2. 研究の目的

運動による脳からの BDNF 分泌量を障害することの確立している、66 番目のアミノ酸 Val が Met に置換される遺伝子多型 Val66Met (rs6265) は日本人においても遺伝子頻度が十分高いものである。この遺伝子多型と身体活動量とが DPP-4 阻害薬の臨床的有効性と関連するかどうかを検討する。

3. 研究の方法

上述の J Diabetes Investigation に報告した先行研究 (本学倫理審査承認番号 HGH24-9) 参加者のなかから対象を選択した。先行研究においては、日本人 2 型糖尿病患者で 2009 年 12 月 1 日から 2013 年 5 月 31 日までに、DPP-4 阻害薬の初回投与を受けた岩手医科大学外来患者 426 名のうち、1) DPP-4 阻害薬開始から半年以内に入院したもの 2) 中等度以上の慢性肝疾患のあるもの 3) 慢性腎不全のあるもの 4) ステロイド投与中のもの 5) 最近糖尿病薬物治療を再開したもの 6) 抗癌治療を受けている最中であるものを除外した。ただし DPP-4 阻害薬のいずれであるかは問わなかった。最終的に先行研究で 331 名を解析したが、その中から岩手医科大学に 2020 年 7 月 1 日時点で継続して定期通院している患者 185 名を候補とし、口頭及び文書で研究参加への自署名による同意取得を行った。同意を得られた患者について DNA 研究用末梢血検体を得て、連結可能匿名化処理をしたうえで rs6265 遺伝子多型を株式会社ボックスに委託して解析した。解析後送付した血液検体は同社内で破棄した。なお本研究はヘルシンキ宣言に則って実施し、2020 年 7 月 10 日に岩手医科大学倫理委員会の承認を得た (承認番号 HG2020-012)。

2 型糖尿病の診断は糖尿病専門医が行い、高血圧・脂質異常症・肥満の定義は日本国内の各学会診断基準によった。本研究は後ろ向きの観察研究であり、糖尿病治療については担当医の判断で行われ、併用される糖尿病薬についてはインスリンも含めていずれの併用も除外しなかった。なお日本糖尿病学会により DPP-4 阻害薬開始時には重症低血糖を避けるためにスルホニル尿素 (SU) 薬を減量したものも含めた。体重、血圧などの臨床データは先行研究に用いたものをそのまま流用した。

DPP-4 阻害薬に対するノンレスポonder は開始後 3 か月目またはそれが得られない場合 4 か月目の HbA1c が、開始直前のベースラインの値から 0.2% 未満の改善 (減少) であったものと定義した。身体活動の評価についても先行研究で得たものを流用した。すなわち、国際化身体活動質問票の日本語短縮版を用いて metabolic equivalents (METs、分/週) を算出した。特に夏季と冬季とでは身体活動が大きく異なる社会背景を考慮して、質問票はこの 2 つの時期にそれぞれ 1 回ずつ行い、実際に投与開始された季節と最も近い方を採用して内服開始時の身体活動を後ろ向きに推定した。

統計解析には R-3.5.3 を用い、 $p < 0.05$ を統計的に有意と定義した。連続変数については変数の分布に応じて Student の t 検定または Mann-Whitney の U テストを用いた。頻度の差は Fisher の正確確率検定を用いた。多変量調整にはロジスティック回帰を用いた。

4. 研究成果

(1) 解析結果について

最終的に研究対象となったのは 173 名であり、レスポonder は 120 名 (男性 74 名女性 46 名)、ノンレスポonder は 53 名 (男性 36 名女性 17 名)、平均年齢はレスポonder が 60.3 歳、ノンレスポonder が 59.7 歳であった。単変量解析において、性・年齢・肥満度・糖尿病の家族歴・生活習慣・高血圧の有無・脂質異常症の有無・推定身体活動度などの開始時の要因のうちでノンレ

スポンダーとレスポナーとの間に有意な差があったのは、開始時 HbA1c (レスポナーの中央値 7.5% に対してノンレスポナー 7.0%、 $p=0.001$)、飲酒歴 (レスポナー 55% に対してノンレスポナー 77.4%、 $p=0.006$)、そしてメトホルミンの併用 (併用率はレスポナー 49.2%、ノンレスポナーでは 28.3%、 $p=0.012$)、糖尿病薬そのものが初回投与でかつ単剤投与であること (レスポナー 13.3%、ノンレスポナー 1.9%、 $p=0.024$) であった (詳細データ省略)。なお本研究における使用された DPP-4 阻害薬は、シタグリプチン 77.5%、アログリプチン 12.7%、ビルダグリプチン 8.1%、リナグリプチン 1.1%、テネリグリプチン 0.6% で、ノンレスポナー割合はこれらの薬剤の間で有意な差はなかった ($p=0.373$)。

BDNF 遺伝子多型とレスポナー・ノンレスポナーの割合については、正常ホモ接合体 G/G ではレスポナー 44 名、ノンレスポナー 21 名でノンレスポナー割合 32.3%、正常と変異とのヘテロ接合体 G/A ではそれぞれ 57 名と 29 名でノンレスポナー割合 33.7%、変異のホモ接合体 A/A ではそれぞれ 19 名と 3 名でノンレスポナー割合は 13.6% であった。このことから A アリルはノンレスポナーという表現型に対して劣性であることが示唆されたため、これ以降の解析においては G/G 群と G/A 群とをまとめて G/* 群とし、G/* 群と A/A 群とで比較することとした。また、173 名の身体活動度 (METs) の中央値 990 分/週より小さい群を低身体活動群、それ以外の高身体活動群の 2 群に分けた。これらの 2 群間比較では、いずれにおいても最も強力なノンレスポナー因子であった開始時 HbA1c には有意差はなかった (中央値は G/* 群 7.4% に対し A/A 群 7.6%、 $p=0.922$ 、また低身体活動群で 7.4% に対し高身体活動群で 7.4%、 $p=0.992$)。また G/* 群と A/A 群との間には身体活動の有意差はなかった (METs 中央値: G/* 群 990 分/週、A/A 群 1035 分/週、 $p=0.771$)。

遺伝子型 G/* 群のノンレスポナー割合は 33.1%、A/A 群のそれは 13.6% で統計学的有意差はなかった (表 1)。また低身体活動群と高身体活動群の間ではそれぞれ 37.2%、24.1% で有意差はなかった。さらにこれらを組み合わせる 4 つの群を作成してノンレスポナー割合を検討したが、有意差はなかった (表 1)。さらに遺伝子多型 2 群 (G/* と A/A)、身体活動度 (低/高)、メトホルミン併用の有無の 3 つの因子について 2 つずつ取り上げてノンレスポナー割合を従属変数として交互作用を検討したが、遺伝子多型と身体活動度・身体活動度とメトホルミン併用との間には有意な交互作用はなかった (データ省略)。遺伝子多型とメトホルミン併用との間の検討では不定解となり評価不能であった。本研究は糖尿病薬の他剤併用を許容しているが、メトホルミンは BDNF 分泌を促進することが報告されており、実際上述のようにメトホルミン内服群では非内服群に比較してノンレスポナー割合が有意に低かった ($p=0.012$)。さらに A/A 群のメトホルミン内服者ではノンレスポナーが 0 名であった。このことが解析に大きく影響すると考えられたため、最終解析としては、メトホルミン内服者を除いた 99 名で解析することとした (表 1 下段)。その結果、メトホルミン非内服者においては身体活動が高い方がノンレスポナー割合は有意に低いことが明らかとなり、さらに遺伝子型との組み合わせで 4 群として比較すると G/* かつ低身体活動群でもっともノンレスポナー率が高く 56.8% で、残る 3 群は 20 - 28.6% とほぼ同様の割合で、有意な違いを認めなかった ($p=0.037$)。

患者	rs6265 遺伝子型と 身体活動 (PA)	レスポナー (n)	ノンレスポナ (n)	ノンレスポナ ダー割合 (%)	p
すべて (173 名)	G/* (G/G または G/A)	101	50	33.1	0.083
	A/A	19	3	13.6	
	低身体活動群	54	32	37.2	0.071
	高身体活動群	66	21	24.1	
	G/* かつ低身体活動	45	30	40.0	0.083
	G/* かつ高身体活動	56	20	26.3	
A/A かつ低身体活動	9	2	18.2		
A/A かつ高身体活動	10	1	9.1		
メトホ ルミン 非内服 群 99 名	G/* (G/G または G/A)	51	35	40.7	0.359
	A/A	10	3	23.1	
	低身体活動群	22	23	51.1	0.023
	高身体活動群	39	15	27.8	
	G/* かつ低身体活動	16	21	56.8	0.037
	G/* かつ高身体活動	35	14	28.6	
A/A かつ低身体活動	6	2	25.0		
A/A かつ高身体活動	4	1	20.0		

表1 遺伝子多型、身体活動と DPP-4 阻害薬に対するノンレスポonder割合

なお、メトホルミン使用者を除外した場合、G/*群の身体活動中央値は990分/週、A/*群のそれは594分/週であったが統計学的有意差はなかった(p=0.115)。同様にHbA1cについてもG/*群の中央値7.3%、A/A群のそれは7.5%で有意差はなかった(p=0.630)。

さらにロジスティック回帰モデルにより多変量調整を行った結果を表2に示す。G/*かつ低身体活動群との比較において、G/*かつ高身体活動群ではノンレスポonderリスクが有意に低いことが示唆された。習慣的飲酒がノンレスポonderリスクを増加させるという結果も認められ、これは173名全体での単変量解析と合致していたが、高血圧がある場合にノンレスポonderリスクが低くなるという結果は単変量解析と合致しなかった。本研究では降圧薬は種類を問わず併用を許容しており、サンプルサイズも小さいため詳細な原因解析は実施できなかった。

変数	オッズ比	95% 信頼区間	p
性 (男性)	2.856	0.718-11.360	0.136
年齢 (年)	0.963	0.913-1.016	0.172
体格指数 (BMI, kg/m ²)	1.021	0.867-1.202	0.804
糖尿病の家族歴 (有)	1.091	0.368-3.234	0.875
高血圧(有)	0.318	0.108-0.937	0.038
脂質異常症 (有)	1.451	0.509-4.138	0.486
喫煙			
禁煙歴なし		(参照)	
禁煙後	1.859	0.476-7.258	0.372
現在喫煙	0.613	0.142-2.642	0.512
習慣的飲酒 (有)	3.865	1.161-12.866	0.028
インスリン治療 (有)	2.172	0.689-6.841	0.185
開始時 HbA1c (%)	0.571	0.350-0.930	0.024
遺伝子多型と身体活動			
G/* かつ低身体活動		(参照)	
G/* かつ高身体活動	0.326	0.112-0.951	0.040
A/A かつ低身体活動	0.330	0.041-2.640	0.296
A/A かつ高身体活動	0.173	0.013-2.282	0.183

表2 多変量調整モデルによる遺伝子多型、身体活動度4群とノンレスポonderリスク

(2) 考察

以上の解析結果をまとめると、メトホルミン内服症例を除外してそのBDNF分泌への影響のない患者で検討した場合、BDNF遺伝子のうち少なくとも一方は正常である群(G/*)においては高い身体活動量がDPP-4阻害薬に対するノンレスポonderを減少させることが示唆された。一方で正常なBDNF遺伝子を持たない群(A/A)においては身体活動量の高低の効果は明らかでなく、また予想に反して正常遺伝子を持つ群と比較してノンレスポonderは増加しなかった。

BDNFは脳や筋肉において、身体活動によって産生が増加することが知られているが、特に脳において産生されたBDNFは末梢血に分泌されることが報告されている。このBDNF分泌は神経活動依存性の分泌と恒常的分泌とに分かれ、66番目のValがMetに置換したProBDNFペプチドはプロセシングの障害により神経活動制御性の分泌顆粒に挿入されないために、神経活動依存性に分泌されない。しかし神経脱分極非依存性の恒常的分泌については、正常なProBDNFと同様に細胞外に分泌され、末梢での蛋白分解酵素によって正常な構造のBDNFペプチドに変換される。脳からのBDNF分泌は大部分が神経活動依存性であると報告されているが、ヒトにおける末梢血のBDNF濃度と今回解析したrs6265遺伝子多型との関連に関するこれまでの報告においては、A/Aの遺伝子型を有する場合においてG/G遺伝子型の場合よりも有意に血中濃度が低いものの大きな違いがあるとは言えず、末梢血でのBDNF濃度を決定する要因はまだよくわかっていないという点には注意する必要がある。

糖代謝とBDNFとの関連については、例えばヒトにおいては血中BDNF濃度とインスリン抵抗性とが逆相関するという報告があり、動物実験においては肥満モデル動物であるdb/dbマウスにおいて、BDNFの全身投与によって糖代謝が改善したという報告もある。さらにごく最近のNature Communication 2020年の論文においては、ヒト由来の豚ランゲルハンス島がBDNF応答性インスリン分泌を呈することが報告されている。本研究で取り上げたDPP-4阻害薬のうちビルダグリプチンとアログリプチンは、動物実験において中枢神経系のBDNF分泌を増加させるこ

とが報告され、特に前者に関しては PI3-キナーゼ・Akt キナーゼ系を介することが報告されている。また GLP-1 受容体作動薬においても中枢神経系の BDNF 分泌を増加させることが報告されている。DPP-4 阻害薬は GLP-1 の分解を抑制することで持続的に血中 GLP-1 濃度を維持する薬剤であり、神経活動非依存性の恒常的 BDNF 分泌を促進する可能性がある。

以上の考察から、G/* においては神経活動性 BDNF が大きな障害を受けておらず、したがって身体活動依存性 BDNF 分泌に差が生じて、G/* 群では身体活動量の高い方が低い方よりもノンレスポonderが少なかったすなわ BDNF の代謝作用の差が顕在化した可能性を考えた。一方 A/A 群においては神経活動依存性の BDNF 分泌は期待されず、したがって身体活動の高低によってノンレスポonderの割合は差がなかったと考えられた。

一方、神経活動分泌依存性の脳からの BDNF 分泌が期待されないにもかかわらず A/A 群のノンレスポonder割合は G/* かつ身体活動度の高い群と明らかな違いがなかったことについて、DPP-4 阻害薬による GLP-1 の持続的濃度上昇によって恒常的な BDNF 分泌が促進され、もともと BDNF レベルが低かった A/A 群においては BDNF 分泌上昇によって有意な代謝改善が得られやすいためではないかという仮説を立てた。

(3) 本研究の限界について

本研究にはいくつかの限界点がある。主たる結果は研究当初には計画されていなかったサブグループ解析であるため、偽陽性所見である可能性がある。またサンプル数が少なく、後ろ向き観察研究であるため患者背景がコントロールされていない。またその結果遺伝子多型それ自体の効果については十分な解析ができていない。糖尿病薬の併用が許容されているため、メトホルミンを除外したがそれ以外の薬剤の影響を除外できていない。身体活動量は薬剤投与開始時点ではなくあとから推定したものであり、また質問票での推定のため不正確である可能性がある。そして BDNF の末梢血濃度を測定できなかったという問題がある。

本研究の結果は一つの仮説を提示するものであって証明ではない。しかし、遺伝子型が G/* の群では運動を推奨することで有効率が上昇すること、A/A 群では DPP-4 阻害薬を治療選択肢として優先することなど、薬剤の有効性向上に遺伝子多型を考慮することの有用性が示唆されるものであり、さらに研究を推進することがこの仮説の検証に必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yoshihiko Takahashi, Yutaka Hasegawa, Hirofumi Kinno, Yasushi Ishigaki	4. 巻 75
2. 論文標題 Val66Met single nucleotide polymorphism in brain-derived neurotrophic factor and physical activity might influence responsiveness to dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in type 2 diabetes	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 岩手医学雑誌 (Journal of Iwate Medical Association)	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------