

## DPP-4 阻害による腎保護効果とその分子メカニズムの解明\*

高 嶋 悟

秋田大学大学院医学系研究科医学専攻 内分泌・代謝・老年内科学

(平成 29 年 5 月 1 日掲載決定)

Upregulation of SDF-1 by DPP-4 inhibition and its protective roles  
in progressive diabetic nephropathy

Satoru Takashima

Division of Endocrinology, Metabolism and Geriatric Medicine, Akita University Graduate School of Medicine

Key words : SDF-1, DPP-4 inhibition, progressive diabetic nephropathy

## はじめに

DPP-4 (dipeptidyl peptidase-4) 阻害薬は 2009 年に我が国で上市されて以来、糖尿病治療において幅広く使用されている薬剤である。食事を食べると腸管からインクレチンである GLP-1 (glucagon-like peptide-1) と GIP (gastric inhibitory polypeptide あるいは glucose-dependent insulinotropic polypeptide) が分泌されるが、これらは生体内の DPP-4 によって速やかに分解される。DPP-4 阻害薬は、この DPP-4 作用を阻害することによりインクレチンの血中濃度を高め、血糖依存性に膵臓のインスリン分泌を促進させ血糖値を低下させる薬剤である<sup>1)</sup> (図 1)。さらに DPP-4 は GLP-1 以外の様々なペプチドを切断し不活性化することが知られており、ケモカインである SDF-1 (Stromal cell-derived factor-1) もその一つである<sup>2)</sup>。これまでに SDF-1 はその受容体である CXCR4 (C-X-C chemokine receptor type 4) と結合して、幹細胞および骨髄由来前駆細胞の組織障害部位への誘引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、様々な臓器保護作用をもたらすことが期待されている<sup>3)</sup>。しかしながら、腎臓における DPP-4/SDF-1 シグナル伝達系の分子機構および糖尿病腎症に対するその保護的役割については未だ明らかとなっていない。本研究では、糖尿病腎症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 Akita 糖尿病マウスモデル (糖尿病腎症の発症に抵抗性を示す C57BL/6-Akita マウスと進行性糖尿病腎症を発症する KK/Ta-Akita マウス) を用いて、DPP-4 阻害が SDF-1 に与える影響と、それによる糖尿病腎症への保護効果について検討した。

## 1. DPP-4 阻害と SDF-1 について

インクレチンである GLP-1 と GIP は、生体内においていずれも分解酵素である DPP-4 によって、N 末端から 2 番目に位置するアミノ酸 (アラニン) の後ろが切断され不活性化型となる。DPP-4 による不活性化は速やかであり、血中半減期は GLP-1 が 1~2 分、GIP が約 7 分と短い時間で分解されてしまう。この DPP-4 を競合的に阻害し、内在性の活性型インクレチン濃度を上昇させるのが DPP-4 阻害薬であり、DPP-4 により分解されにくい特徴的な構造を有し、生体内で長時間作用するようにつくられたのが GLP-1 受容体作動薬である<sup>1)</sup>。これらは臨床ですでに多数の症例で使用されている。

GLP-1 受容体作動薬は血糖降下作用とは独立して、

Correspondence : Satoru Takashima  
Division of Endocrinology, Metabolism and Geriatric  
Medicine, Akita University Graduate School of Medicine,  
1-1-1 Hondo, Akita 010-8543, Japan  
Tel : 81-18-884-6769  
Fax : 81-18-884-6449  
E-mail : satoru68@gipc.akita-u.ac.jp

\*平成 29 年 2 月 9 日秋田医学会学術奨励賞受賞記念講演

(20)

SDF-1, DPP-4 inhibition, and progressive diabetic nephropathy

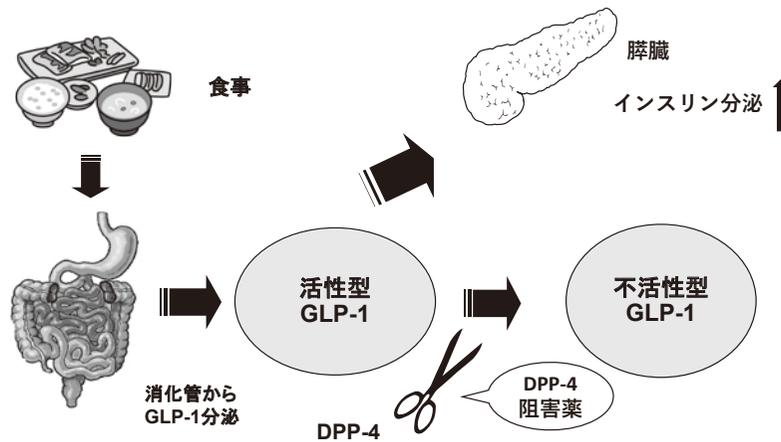


図1. インクレチン分泌と DPP-4 阻害 (文献 1 より引用, 一部改変)

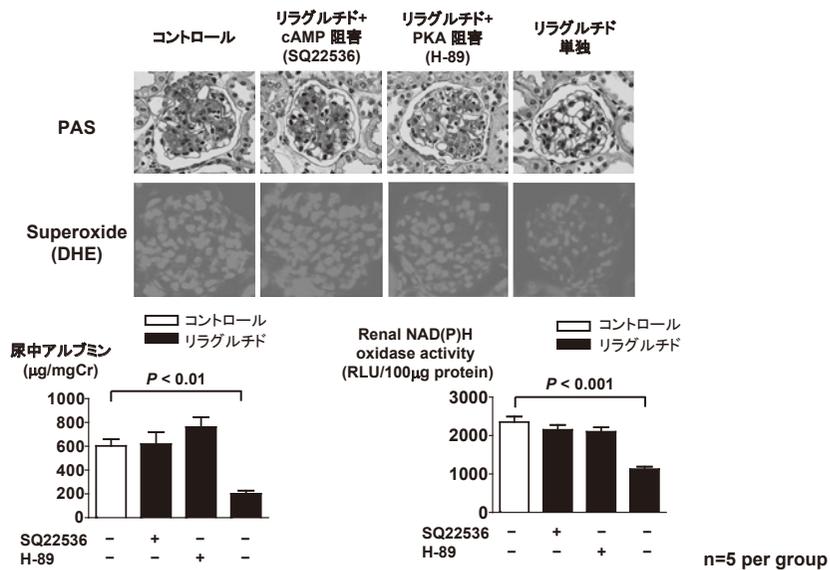


図2. GLP-1 受容体作動薬が腎に与える効果 (文献 4 より引用, 一部改変)

糖尿病腎症に対して酸化ストレスを抑制し腎保護効果をもたらすことを当教室では以前に報告している。GLP-1 受容体作動薬であるリラグルチドを糖尿病腎症モデルマウスに投与するとメサンギウム基質の増殖と superoxide が抑制され、尿中アルブミンが減少する。そして、GLP-1 のセカンドメッセンジャーである cAMP と PKA を阻害すると、この腎保護効果はキャンセルされる。すなわち、糖尿病腎症モデルマウスに

GLP-1 受容体作動薬を投与するとセカンドメッセンジャーの cAMP, PKA を上昇させ酸化ストレスを抑制する。それによりメサンギウム基質の増殖や糸球体上皮細胞の減少を抑制し、糖尿病腎症の進展を抑制する<sup>4)</sup> (図 2)。

一方、DPP-4 阻害薬についても、血糖降下作用とは独立して GLP-1 濃度上昇を介して腎臓などの様々な臓器への保護作用を有することが報告されてい

る<sup>5)</sup>。さらに DPP-4 は GLP-1 以外の様々なペプチドを切断し不活性化することが知られており、ケモカインである SDF-1 もその一つである<sup>2)</sup>。最近の研究では、DPP-4 阻害薬は心筋細胞における SDF-1/CXCR4 シグナル経路の活性化により、心筋梗塞後の心不全に対して心保護効果を有することが指摘されている<sup>6)</sup>。さらにカナダのグループは、正常耐糖能者に比べて 2 型糖尿病患者の腎尿細管で、SDF-1 とその受容体 CXCR4 が強く発現していることを指摘している<sup>7)</sup>。

## 2. 進行性糖尿病腎症モデルマウス KK/Ta-Akita と腎臓での SDF-1 の発現について

Akita マウス (C57BL/6-Akita) は当大学衛生学教室にて開発された非肥満型インスリン分泌低下型糖尿病マウスモデルであり、現在世界中で糖尿病とその合併症の研究のため幅広く用いられている<sup>8)</sup>。しかしながら、C57BL/6-Akita マウスは糖尿病腎症の発症進展に比較的抵抗性を示すという欠点があり、これを補うために当教室ではさらにこのマウスを改良し、進行性の糖尿病腎症を発症する新しい Akita マウスである KK/Ta-Akita マウスの開発に成功している<sup>9)</sup>。

図 3 に KK/Ta-Akita マウスと C57BL/6-Akita マウスを示すが、解剖すると KK/Ta-Akita マウスは C57BL/6-Akita マウスにくらべて腎臓の腫大がみられ

る。また、C57BL/6-Akita マウス、KK/Ta-Akita マウスはともに週数が進むと、血糖値が 600 mg/dl 前後と高値を示す。しかしながら、C57BL/6-Akita マウスの尿中アルブミンは週数が進んでも増加せず、腎症の進行がみられない。一方、KK/Ta-Akita マウスは尿中アルブミンが著明な高値を示すほか、糸球体過剰濾過を反映して GFR が上昇し、病理所見では糸球体のメサンギウム基質の増殖や糸球体上皮細胞の脱落などを示し、進行した腎症の所見を呈する (図 3)。本研究ではこれらの 2 つの Akita マウスをもちいて検討をおこなっている。

はじめにわれわれは、C57BL/6-Akita マウス、KK/Ta-Akita マウスおよびそれぞれの野生型の 4 群のマウスを 15 週齢で血液・尿検査、イヌリンクリアランスによる GFR の測定をおこない、その後解剖し糸球体を単離、腎臓の評価をおこなった。前述のように KK/Ta-Akita マウスは他の群にくらべて血糖高値であり、著明な尿中アルブミン高値、GFR 高値、腎肥大をみとめており、進行した腎症を示している (図 3)。これらのマウスの腎臓において免疫組織化学染色をおこなうと、糸球体上皮細胞に SDF-1 の局在がみとめられた。また、遠位尿細管、集合管においても SDF-1 の局在がみられたが、近位尿細管には発現はみられなかった。これらの部位について、特に進行性糖尿病腎症を示す KK/Ta-Akita マウスにおいて強い染色像がみ

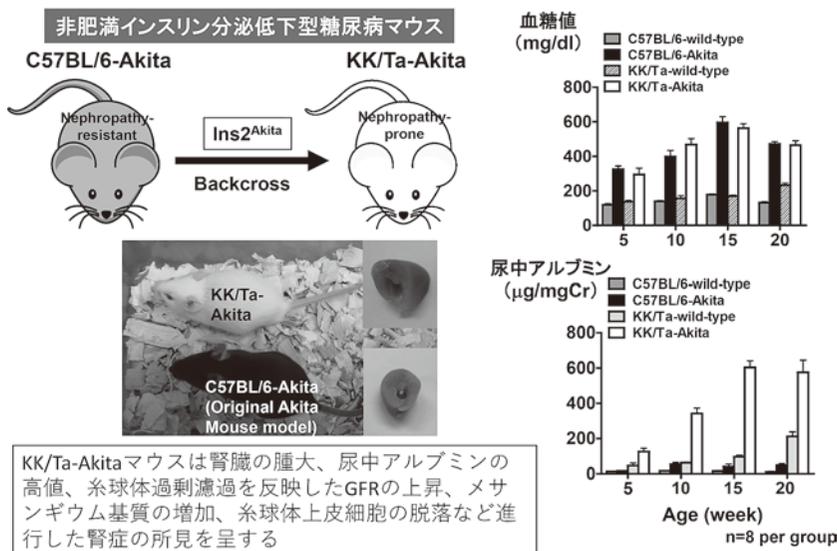


図 3. 進行性糖尿病腎症モデル: KK/Ta-Akita マウス (文献 9 より引用, 一部改変)

(22)

SDF-1, DPP-4 inhibition, and progressive diabetic nephropathy

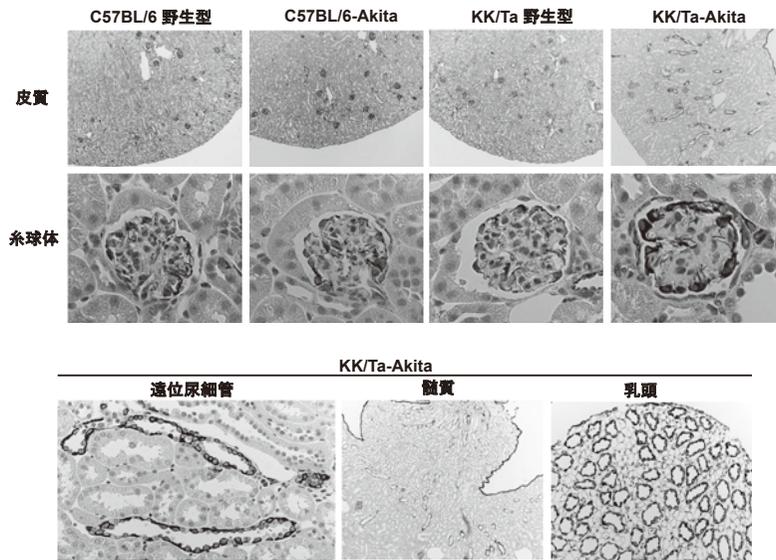


図4. 腎における SDF-1 の局在 (SDF-1 免疫組織化学染色) (文献 10 より引用, 一部改変)

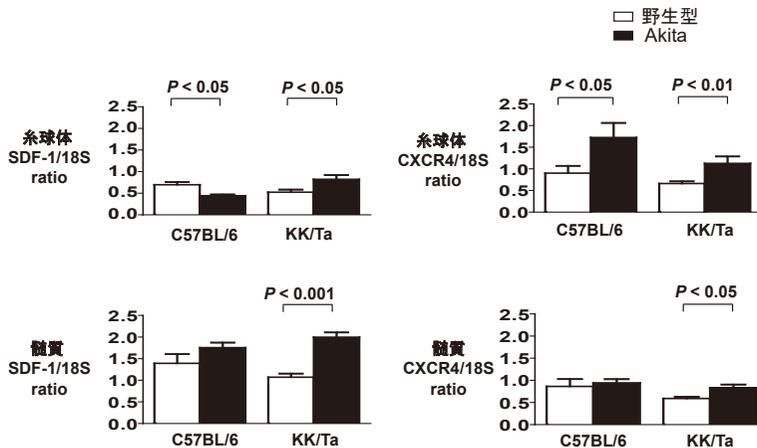


図5. SDF-1 の mRNA の発現は, 糸球体と腎髄質ともに進行性糖尿病腎症をしめす KK/Ta-Akita において上昇がみられる (文献 10 より引用, 一部改変)

られた (図4)。SDF-1 の mRNA の発現は, C57BL/6-Akita マウスでは野生型に比べて上昇がみられなかったが, KK/Ta-Akita マウスにおいては野生型に比べて糸球体と腎髄質ともに有意な増加がみとめられた。また受容体の CXCR4 についても KK/Ta-Akita マウスにおいて有意な増加がみられた (図5)。すなわち, 進行性糖尿病腎症モデルである KK/Ta-Akita マウスでは野生型マウスに比べ, 糸球体上皮細胞や遠位尿管で

SDF-1 の発現の増加が観察された一方, 糖尿病腎症抵抗性モデルである C57BL/6-Akita マウスでは野生型マウスに比べ, SDF-1 の発現増加はみられなかった。このことより, 進行性糖尿病腎症の状態において, SDF-1 の発現が増加する可能性が示唆された。この結果と既報の SDF-1 のさまざまな臓器保護作用の指摘などから, 我々は腎における SDF-1 の発現増加は腎傷害に対する防御反応の可能性を考え, 次の研究を

おこなった。

### 3. DPP-4 阻害が SDF-1 発現と腎臓に与える影響

KK/Ta-Akita マウスに対して、DPP-4 阻害薬であるリナグリプチン、GLP-1 受容体作動薬であるリラグルチドを6週間投与して、その後解剖し腎臓の状態について評価した。各薬剤を投与後、体重、血圧、血糖値などは各群で有意な差はみられなかった。解剖後、免疫組織化学染色をおこなうとリナグリプチン投与群はコントロール群、リラグルチド投与群にくらべて糸球体、遠位尿細管、集合管で SDF-1 の強い発現がみとめられた。また、リナグリプチン投与群は糸球体、腎髄質において、SDF-1 の mRNA の発現増加がみられた (図6)。KK/Ta-Akita マウスのリナグリプチン投与群とリラグルチド投与群ではコントロール群に比べ、PAS 染色ではメサンギウム基質の増加が抑制され、Masson trichrome 染色では糸球体周囲の線維化が抑制、WT1 染色では糸球体上皮細胞の減少が抑制されているのがみとめられた (図7)。酸化ストレスマーカーである MDA 染色をおこなうと、リナグリプチン投与群とリラグルチド投与群は酸化ストレスが抑制さ

れているのが確認された。蛍光免疫染色においてリナグリプチン投与群とリラグルチド投与群はコントロール群にくらべて糸球体の superoxide の減少と NO の増加がみとめられた。さらに線維化マーカーである TSP-1 と fibronectin の有意な減少がみとめられた (図8)。また、リナグリプチンの投与によって、尿中アル

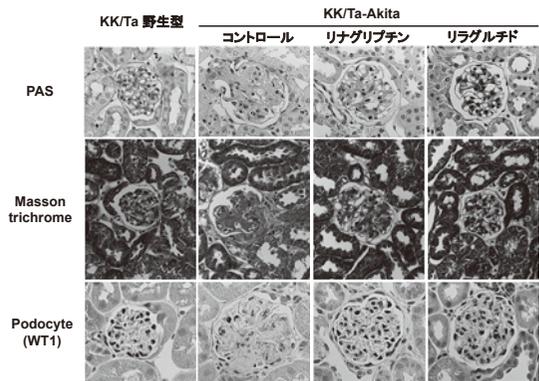


図7. リナグリプチンとリラグルチドは糸球体においてメサンギウム増殖と糸球体上皮細胞脱落を抑制する (文献10より引用、一部改変)

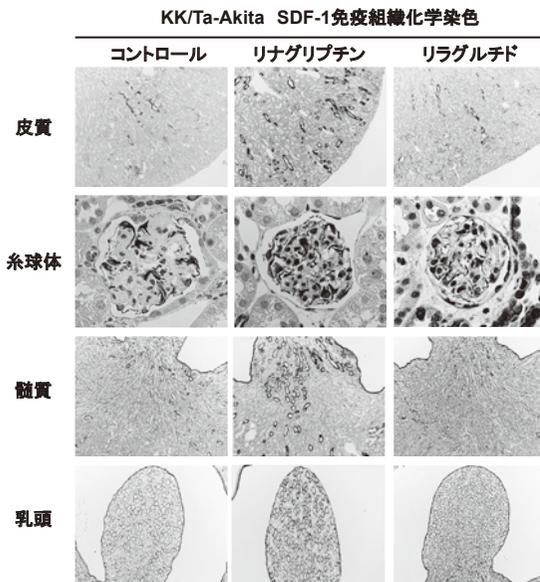


図6. リナグリプチンは腎での SDF-1 の発現を増加させる (文献10より引用、一部改変)

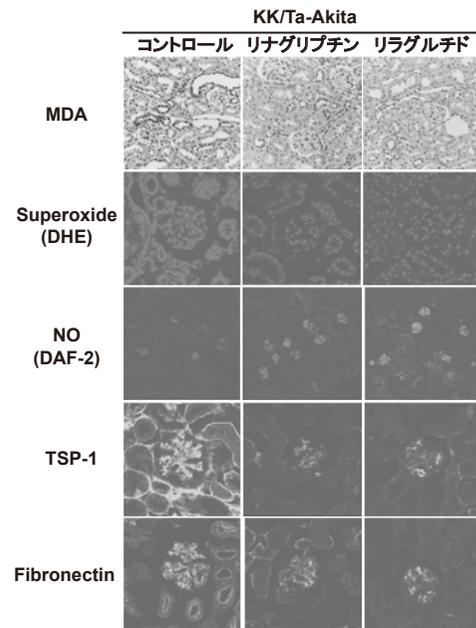


図8. リナグリプチンとリラグルチドは糸球体において酸化ストレスと線維化を抑制する (文献10より引用、一部改変)

(24)

SDF-1, DPP-4 inhibition, and progressive diabetic nephropathy

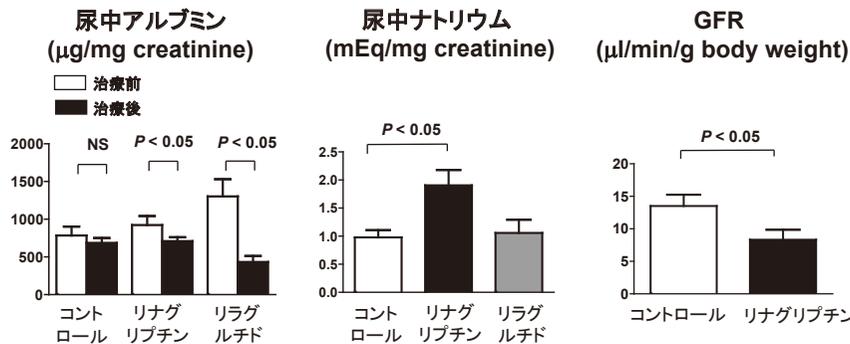


図9. リナグリプチンの投与によって、尿中アルブミンが減少、尿中ナトリウムが増加、糸球体過剰濾過が改善する（文献10より引用、一部改変）

ブミンの減少、尿中ナトリウムの増加、糸球体過剰濾過の改善がみとめられた（図9）。一方、KK/Ta-Akitaマウスへリナグルチドを投与すると、尿中アルブミン減少はみとめられたが、尿中ナトリウムの増加はみられなかった。

上記の結果をまとめると、DPP-4阻害薬投与群とGLP-1受容体作動薬投与群ともに酸化ストレス抑制や線維化の抑制、尿中アルブミン減少などの腎保護効果がみとめられたが、DPP-4阻害薬投与群でのみ腎のSDF-1の発現増加と尿中ナトリウム排泄の増加がみとめられた。

次に、リナグリプチン投与によるSDF-1の発現増加がGLP-1に非依存性であるのかを検査するため、GLP-1受容体欠損KK/Ta-Akitaマウスを作製し、6週齢よりリナグリプチンの投与を6週間おこなった。その結果、GLP-1受容体欠損KK/Ta-Akitaマウスにおいても、リナグリプチン投与群は免疫組織化学染色で遠位尿細管にSDF-1の発現をみとめ、real-time PCRで腎髄質にSDF-1の有意な発現増加がみとめられた（図10）。

以上の結果より、DPP-4阻害はGLP-1の他にSDF-1のupregulationを介した腎保護効果を持つ可能性が示唆された。

#### 4. DPP-4阻害による尿中ナトリウム排泄について

興味深いことに、GLP-1受容体欠損KK/Ta-Akitaマウスにリナグリプチンを投与した場合も、尿中ナトリウムの上昇がみられた。このことから、リナグリプチ

#### Glpr<sup>-/-</sup> KK/Ta-Akita SDF-1免疫組織化学染色

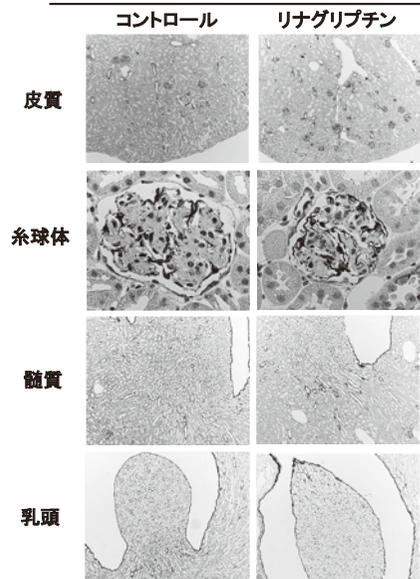


図10. GLP-1受容体欠損マウスにおいても、リナグリプチンは腎髄質のSDF-1の発現を増加させる（文献10より引用、一部改変）

ンはGLP-1非依存性に尿中ナトリウム排泄を促進する可能性が考えられた。そこで、DPP-4阻害による尿中ナトリウムの増加がSDF-1に依存しているかどうかを確認するため、SDF-1受容体拮抗薬であるAMD3100を10日間腹腔内に投与した後に腎症の状態を評価し、GFR、尿中ナトリウム排泄について検討した。その結果、SDF-1の阻害によりメサンギウム

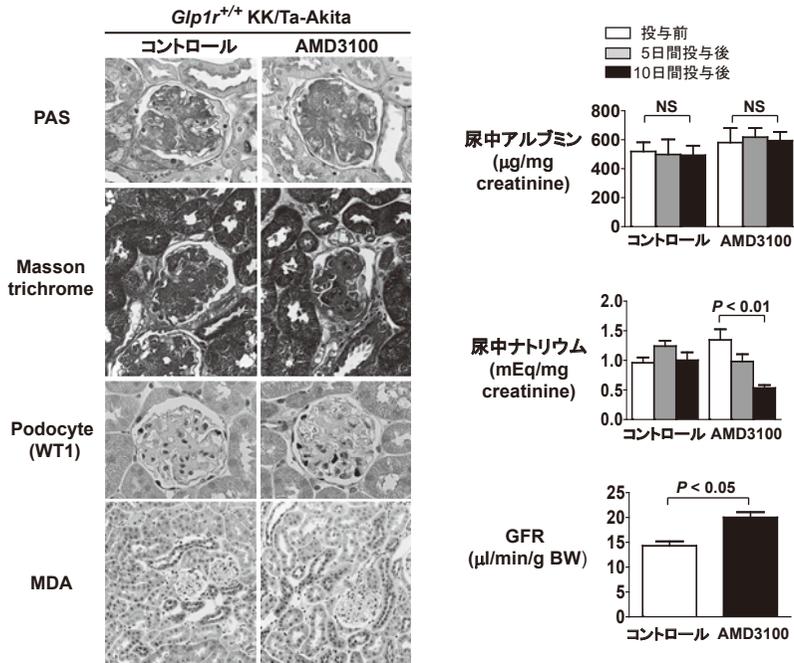


図 11. SDF-1 阻害は糖尿病腎症を増悪させ、尿中ナトリウム排泄を減少させる（文献 10 より引用，一部改変）

基質の増加と糸球体上皮細胞の減少がさらに進行するのが確認された（図 11）。すなわち、SDF-1 を阻害すると腎症が進行することが示唆された。AMD3100 を投与後、尿中ナトリウムは有意に減少がみられ、さらに GFR の上昇がみとめられた（図 11）。前述のように SDF-1 が遠位尿細管に発現している事実と合わせて考えると、遠位尿細管において SDF-1 が活性化すると尿中ナトリウム排泄を促進し、糸球体過剰濾過を改善することが示唆された。

ここまでをまとめると、KK/Ta-Akita マウスにおいてリナグリプチンは GLP-1 非依存性に腎髄質で SDF-1 を活性化し、その結果、尿中ナトリウム排泄を促進、糸球体過剰濾過を改善することが考えられた。

## 5. 結 語

今回の研究結果より、DPP-4 阻害が腎に与える効果として次のようなメカニズムが考えられる。DPP-4 阻害は、糸球体において SDF-1 を活性化することにより酸化ストレスを抑制する。また、遠位尿細管において尿中ナトリウム排泄を促進し、糸球体内圧を低下、

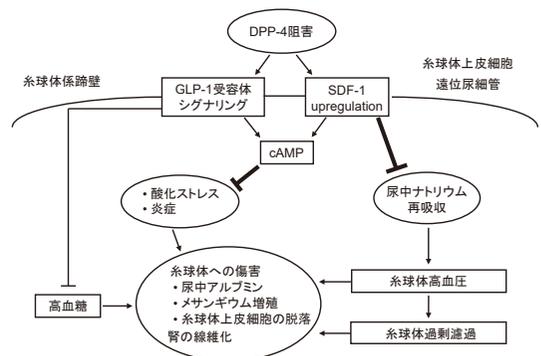


図 12. SDF-1 を介した DPP-4 阻害による腎保護効果のメカニズム（文献 10 より引用，一部改変）

糸球体過剰濾過を改善する。これらの機序によって、尿中アルブミンの減少、メサンギウム増殖の抑制、糸球体上皮細胞の保護などの腎保護効果が発生すると考えられる（図 12）。DPP-4 阻害による糖尿病治療は、血糖降下作用の他に、インクレチン作用の増強による臓器への影響や今回解明された SDF-1 の upregulation を介した腎保護効果などさまざまな臓器保護作用の可

能性が考えられ、今後さらなる解明が必要と考えられる。

### 謝 辞

研究を遂行するにあたり、当教室の山田祐一郎教授、藤田浩樹先生をはじめとする多くの共同研究者の先生方からご指導をいただきました。この場を借りまして深く御礼申し上げます。

### References

- 1). Baggio, L.L. and Drucker, D.J. (2007) Biology of incretins : GLP-1 and GIP. *Gastroenterology*, **132** (6), 2131-2157.
- 2) Broxmeyer, H.E., Hoggatt, J., O'Leary, H.A., *et al.* (2012) Dipeptidylpeptidase 4 negatively regulates colony-stimulating factor activity and stress hematopoiesis. *Nat. Med.*, **18**, 1786-1796.
- 3) Hocher, B., Sharkovska, Y., Mark, M., *et al.* (2013) The novel DPP-4 inhibitors linagliptin and BI 14361 reduce infarct size after myocardial ischemia/reperfusion in rats. *Int. J. Cardiol.*, **167**, 87-93.
- 4) Fujita, H., Morii, T., Fujishima, H., *et al.* (2014) The protective roles of GLP-1R signaling in diabetic nephropathy : possible mechanism and therapeutic potential. *Kidney Int.*, **85**, 579-589.
- 5) Hocher, B., Reichetzeder, C. and Alter, M.L. (2012) Renal and cardiac effects of DPP4 inhibitors—from preclinical development to clinical research. *Kidney Blood Press. Res.*, **36**, 65-84.
- 6) Zhong, J. and Rajagopalan, S. (2015) Dipeptidyl Peptidase-4 Regulation of SDF-1/CXCR4 Axis : Implications for Cardiovascular Disease. *Front Immunol.*, **25** (6), 477.
- 7) Siddiqi, F.S., Chen, L.H., Advani, S.L., *et al.* (2015) CXCR4 promotes renal tubular cell survival in male diabetic rats : implications for ligand inactivation in the human kidney. *Endocrinology*, **156**, 1121-1132.
- 8) Yoshioka, M., Kayo, T., Ikeda, T., *et al.* (1997) A novel locus, Mody4, distal to D7Mit189 on chromosome 7 determines early-onset NIDDM in nonobese C57BL/6 (Akita) mutant mice. *Diabetes*, **46**, 887-894.
- 9) Fujita, H., Fujishima, H., Chida, S., *et al.* (2009) Reduction of renal superoxide dismutase in progressive diabetic nephropathy. *J. Am. Soc. Nephrol.*, **20**, 1303-1313.
- 10) Takashima, S., Fujita, H., Fujishima, H., *et al.* (2016) Stromal cell-derived factor-1 is upregulated by dipeptidyl peptidase-4 inhibition and has protective roles in progressive diabetic nephropathy. *Kidney Int.*, **90** (4), 783-796.