

DPP-4 および DPP-4 阻害薬に関する  
臨床的・基礎的研究（要約）

日本大学大学院医学研究科博士課程  
内科系糖尿病内科学専攻

大塚 雄一郎

修了年 2014 年

指導教員 石原 寿光

## I 緒言・背景

### 1) 2型糖尿病

糖尿病とは『インスリン作用の不足により起こる慢性高血糖を主徴とし、種々の特徴的な代謝異常を伴う疾患群である。その発症には遺伝因子と環境因子がともに関与する。代謝異常の長期間にわたる持続は特有の合併症を来しやすく、動脈硬化症をも促進する。代謝異常の程度によって、無症状からケトアシドーシスや昏睡に至る幅広い病態を示す。』と定義されている<sup>1)</sup>。

1型糖尿病がインスリンの絶対的な不足であるのに対し、2型糖尿病はインスリンの相対的不足、すなわち、インスリン抵抗性とインスリン分泌不全が混在した病態である。ただし、日本人を含めた東アジア人では、インスリン抵抗性が軽度あるいは存在しなくても、インスリン分泌が低下することも多いと考えられている。

2型糖尿病の予防には、環境因子（過食、高脂肪食、運動不足）への取り組みが中心となる。薬物療法に関しては、個々の病態に応じて治療薬の選択が必要である<sup>2)</sup>。

### 2) インクレチン

インクレチンは栄養素摂取に伴って消化管から分泌され、膵β細胞に作用してインスリン分泌を促進するホルモンの総称である。glucagon-like peptide 1 (GLP-1) と glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP) の2つのホルモンが確認されている。

#### ①インクレチンによるインスリン分泌促進作用

グルコース依存性であり、グルコース代謝によるシグナルがなければインクレチン単独でインスリン分泌は刺激されない<sup>3)</sup>。

#### ②その他の作用

GIP は栄養素を脂肪細胞に蓄積する作用や、骨芽細胞の機能を高めて骨へカルシウムを蓄積する作用など、GLP-1 は膵  $\alpha$  細胞のグルカゴン分泌抑制作用、胃排泄遅延作用が、心保護作用が指摘されている<sup>4)</sup>。また、げっ歯類では GIP と GLP-1 により  $\beta$  細胞量が増加することが報告されている<sup>5,6)</sup>。

### 3) DPP-4 (dipeptidyl peptidase-4)

DPP-4 は CD26 として知られ、110 kDa の糖蛋白として腎臓、腸管、肝臓、胎盤、皮膚、リンパ球、内皮細胞などの細胞表面に広く分布する。また、細胞膜から切断された 100 kDa の可溶性 DPP-4 が血中に存在する。様々な生理活性ペプチドの活性調節（抑制または活性化）に係わっている。

DPP-4 の抑制が耐糖能の改善につながることで、DPP-4 の耐糖能に対する影響は GLP-1 と GIP が主体であることが基礎研究により示唆されている<sup>7,8)</sup>。

### 4) グルカゴン

膵島の  $\alpha$  細胞で生合成、分泌され、肝臓のブドウ糖産生を増加させ、血糖値を上昇させる作用がある。そのため、低血糖時のインスリン拮抗ホルモンとして認識されていたが、近年、糖尿病においてグルカゴン分泌の調節異常が注目されている。2 型糖尿病患者の空腹時血中グルカゴン濃度は不適切に上昇していると考えられ、肝からのグルコース放出の原因となっている、さらに糖質負荷後のグルカゴン動態に関して、健常者では食後に一時的に抑制されるのに対し、糖尿病患者では上昇傾向にあり、奇異性分泌を起こしていると考えられる。また、健常者と 2 型糖尿病の患者のインクレチン濃度は両者に差を認めなかった<sup>9)</sup>。したがって、2 型糖尿病患者における奇異性グルカゴン濃度の上昇はインクレチンの作用異常によると考えられる。

### 5) 2 型糖尿病に対するインクレチン療法

2 型糖尿病ではインクレチン作用の減弱がみられ、これは血糖値の上昇によっ

て引き起こされていると考えられている<sup>10,11,12)</sup>。DPP-4 を阻害することで内因性 GLP-1 の作用増強が糖尿病治療法として提唱され、多くの臨床試験での結果を統合すると HbA1c を平均 0.5～1.0%低下させると報告される<sup>13,14)</sup>。

現在、日本国並びに海外の多くの国でインクレチン関連薬が 2 型糖尿病治療の最前線で活躍している。しかし、その作用機序については未だ不明な点も数多く残されている。そこで、2 型糖尿病の治療におけるインクレチン療法、特に DPP-4 阻害薬の役割をより詳細に理解するために、以下に述べる臨床研究と基礎研究を行った。

## II. 臨床研究

### 【目的】

糖尿病治療の大規模臨床試験の結果から、インスリン治療の早期介入の重要性が明らかになっている。しかし、インスリン治療は体重増加を惹起しやすく、治療の悪循環に陥る恐れがある。そのため、メトホルミン併用で肥満を軽減し、インスリン総量を抑えられるという報告がある<sup>15)</sup>。一方、DPP-4 阻害薬に関してはインスリン治療との併用効果に対する研究は少ない。そこで、インスリン単独治療中の 2 型糖尿病患者に対し、DPP-4 阻害薬と、対照薬としてビグアナイド薬を追加投与して、その血糖改善効果および膵島関連ホルモン動態を検討した。

### 【対象及び方法】

血糖コントロール不良でインスリン単独治療中の 2 型糖尿病患者 25 名を無作為に、DPP-4 阻害薬シタグリプチン 50 mg を併用する群 (S 群) およびメトホルミン 750 mg を併用する群(M 群)の 2 群に分け、450 kcal の食事負荷試験を併

用前、併用後 4 週、8 週、12 週に行い、食事開始前から食後 120 分まで計 6 回血糖、C ペプチド、グルカゴン、インクレチンホルモンの項目について測定した。インスリン量は低血糖が出現した際に減量することとした。研究は日本大学医学部附属板橋病院で行われ、倫理委員会から試験実施計画書の承認を得て臨床試験登録システムに登録後(UMIN 000008155)、ヘルシンキ宣言と臨床研究に関する倫理指針に従い実施された。

## 【結果】

### 1. 患者背景

対象となった 2 型糖尿病患者は 25 名で S 群、M 群はそれぞれ 14 例（男性 8 例）、11 例（男性 7 例）であった。S 群、M 群計 4 名が試験中断となった。

### 2. 血糖関連指標の推移

HbA1c は投与前よりも S 群で 0.77%低下、M 群で 0.78%低下した。

### 3. 食事負荷試験

#### 1) インクレチンの変化

活性型 GLP-1、活性型 GIP の AUC に関しては併用前と 12 週後では、S 群では有意に増加していたが ( $p=0.028$ 、 $p=0.0003$ )、M 群では有意な変化を認めなかった。

#### 2) 血糖値の推移

食事負荷後の血糖は S 群では併用後 12 週での食後血糖の低下を認めたが、M 群では 8 週までは低下したが、12 週では変化を認めなかった。

#### 3) CPR の推移

CPR-AUC については、S 群では変化なかったが、M 群では 12 週と投与前を比較すると有意差を以て上昇した( $p=0.035$ )。

#### 4) グルカゴン値の推移

MTT後のグルカゴン抑制量に関してはS群で-14.3%とベースラインより有意に低下し(p=0.0044)、M群で-8.9%とベースラインより低下したものの有意差は認めなかった(p=0.07)。

#### 4. HbA1c とグルカゴン値の関係

HbA1c 低下量とグルカゴンの低下に関して相関分析を施行したところ、S群でグルカゴン抑制量の高い患者ほど血糖コントロールの改善傾向があった。

#### 5. 有害事象

体重に関しては2群間およびベースラインと12週での有意な変化はなかった。低血糖については併用後両群ともに重症低血糖を認めず、軽微な低血糖についてはM群の方が有意差をもって頻度は多かった(p=0.028)。インスリン使用量はS群では変わらず、M群では低血糖のため減少した。

#### 【考察】

インスリン単独療法へのDPP-4阻害薬(シタグリプチン)およびビグアナイド薬(メトホルミン)の併用の有効性が確認された。その改善の機序は両者異なるものであった。シタグリプチンは活性型GLP-1を上昇させ、グルカゴンを抑制することで食後血糖の低下をもたらしたが、一方、メトホルミンは糖新生抑制により糖毒性を解除し、膵β細胞機能を惹起させ、インスリン分泌の増加をもたらし、血糖値を低下させた。そのため、両者の併用は相乗効果をもたらすと考えられる。インスリン製剤とインクレチン薬の併用は、インスリン療法の負の側面を回避し、心血管病変に対する有用性もされ、新たな選択肢の一つとして考えられる。糖尿病治療はインスリンだけではなく、今後はグルカゴン動態についても考慮して取り組む必要がある。

### III. 基礎研究

## 【目的】

DPP-4 は各臓器に分布すると考えられているが、局所での DPP-4 活性の影響は不明である。今回、膵臓に DPP-4 がどのように発現しているかを検討し、さらにマウスインスリノーマ細胞である MIN6 細胞に DPP-4 を過剰発現させ、インスリン分泌に変化が起こるかを検討した。

## 【方法】

正常ヒト膵臓切片に対し DPP-4 (CD26) 染色およびインスリン染色を行った。また、野生型マウスの膵尾部切片に DPP-4、インスリンおよびグルカゴンの蛍光 2 重染色を行い、膵臓での DPP-4 の分布について検討した。

MIN6 細胞に DPP-4 を過剰発現させた細胞株を作成し、それを用いて GLP-1 受容体作動薬投与下でのインスリン分泌の変化を検討した。

## 【結果】

### 1. 膵島における DPP-4 の発現

ヒトではインスリン染色部位と DPP-4 染色部位は一部一致している部分も認めるが、それ以外の多くの細胞でも、DPP-4 の発現が認められた。一方、マウスでは $\beta$ 細胞の大部分と $\delta$ 細胞で、DPP-4 が発現している可能性が示唆された。

### 2. DPP-4 過剰発現 MIN6 細胞の樹立

ドキシサイクリン誘導的に DPP-4 活性を有する細胞株を作成し、その発現が有効であることを確認した。

### 3. DPP-4 過剰発現 MIN6 細胞におけるインスリン分泌

20 mM のグルコースに対する反応は、DPP-4 の過剰発現誘導の有無で変化がなかった。一方、30 nM の GLP-1(7-37)での刺激では、DPP-4 発現が誘導されていない細胞で、増加傾向を認めたが、DPP-4 の過剰発現細胞では、認められなかった。DPP-4 で切断されない exendine-4 あるいは liraglutide で刺激した

場合には、逆に DPP-4 の過剰発現細胞でインスリン分泌の増強が認められた。

#### 【考察】

DPP-4 は膵島細胞に発現していることが確認された。膵島内には DPP-4 の基質となる生理活性物質が発現しており、膵島内において DPP-4 とその基質が局所的なネットワークを形成している可能性が示唆される。

DPP-4 の発現を誘導する前の MIN6 細胞での GLP-1 によるインスリン分泌は増加傾向を認めたが、膵島で報告されているような強力なものではなかった。人工的に DPP-4 を過剰に発現させた MIN6 細胞では、GLP-1(7-37)によるインスリン分泌の増加傾向が打ち消されており、これはβ細胞の GLP-1 受容体に結合する直前で、GLP-1 が不活性化されたためと思われる。一方、DPP-4 の過剰発現により GLP-1 受容体作動薬のインスリン分泌増強効果に対するメカニズムは不明である。

#### IV 全体の総括・結語

DPP-4 阻害薬（シタグリプチン）はビグアナイド薬と同様に強化インスリン治療の 2 型糖尿病患者の血糖コントロールを改善させた。シタグリプチンはグルカゴンの奇異性分泌を改善させることで、食後血糖が低下した。これまで糖尿病治療に対し、インスリン作用に関して治療対象となっていたが、本研究によりグルカゴンを抑制することも糖尿病治療の目標の一つになることが示唆された。また、基礎研究では、膵島に DPP-4 が存在しており、膵β細胞における DPP-4 活性を上昇させると、インスリン分泌が修飾される結果となった。

これらの臨床および基礎の研究の結果より、DPP-4 の薬理作用を検討することは、糖尿病の治療戦略上で重要な鍵であることを示していたが、同時に明らかにすべき課題を照らした結果となった。更なる検討を進めたいと考える。



【引用文献】

- 1) Seino Y, Nanjo K, Tajima N, Kadowaki T, Kashiwagi A, Araki E, Ito C, Inagaki N, Iwamoto Y, Kasuga M, Hanafusa T, Haneda M, Ueki K, The Committee of the Japan Diabetes Society on the diagnostic criteria of diabetes mellitus : Report of the Committee on the classification and diagnostic criteria of diabetes mellitus. *Diabetology International* 1: 2-20, 2010.
- 2) 日本糖尿病学会（編）：糖尿病治療ガイド 2012-2013. 27-30, 文光堂. 2012.
- 3) Seino Y, Yabe D. GIP and GLP-1: Incretin actions beyond pancreas. *Journal of Diabetes Investigation*. 4: 108-130, 2013.
- 4) Kawamori D, Kaneto H. Effects of incretins on the regulation of beta-cell mass, proliferation and survival. *Nihon Rinsho*. 69: 821-825, 2011.
- 5) Mu J, Woods J, Zhou YP, Roy RS, Li Z, Zycband E, Feng Y, Zhu L, Li C, Howard AD, Moller DE, Thornberry NA, Zhang BB. Chronic inhibition of dipeptidyl peptidase-4 with a sitagliptin analog preserves pancreatic beta-cell mass and function in a rodent model of type 2 diabetes. *Diabetes*. 55: 1695-704, 2006.
- 6) Nauck M, Stöckmann F, Ebert R, Creutzfeldt W. Reduced incretin effect in type 2 (non-insulin-dependent) diabetes. *Diabetologia*. 29: 46-52, 1986.
- 7) Marguet D, Baggio L, Kobayashi T, Bernard AM, Pierres M, Nielsen PF, Ribel U, Watanabe T, Drucker DJ, Wagtman N. Enhanced insulin secretion and improved glucose tolerance in mice lacking CD26. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97: 6874-6879, 2000.
- 8) Hansotia T, Baggio LL, Delmeire D, Hinke SA, Yamada Y, Tsukiyama K, Seino Y, Holst JJ, Schuit F, Drucker DJ. Double incretin receptor knockout (DIRKO) mice reveal an essential role for the enteroinsular axis in transducing the glucoregulatory actions of DPP-IV inhibitors. *Diabetes*. 53: 1326-35, 2004.
- 9) Mitrakou A, Kelley D, Veneman T, Jenssen T, Pangburn T, Reilly J, Gerich J. Contribution of abnormal muscle and liver glucose metabolism to postprandial hyperglycemia in NIDDM. *Diabetes*. 39: 1381-1390, 1990.
- 10) Muscelli E, Mari A, Casolaro A, Camastra S, Seghieri G, Gastaldelli A, Holst JJ, Ferrannini E. Separate impact of obesity and glucose tolerance on the incretin effect in normal subjects and type 2 diabetic patients. *Diabetes*. 57: 1340-1348, 2008.
- 11) Hansen KB, Vilsbøll T, Bagger JI, Holst JJ, Knop FK. Reduced glucose tolerance and insulin resistance induced by steroid treatment, relative physical inactivity, and high-calorie diet impairs the incretin effect in healthy subjects. *J Clin Endocrinol Metab*.

95: 3309-3317, 2010.

12) Nauck MA, Heimesaat MM, Orskov C, Holst JJ, Ebert R, Creutzfeldt W. Preserved incretin activity of glucagon-like peptide 1 [7-36 amide] but not of synthetic human gastric inhibitory polypeptide in patients with type-2 diabetes mellitus. *J Clin Invest.* 91: 301-307, 1993.

13) Amori RE, Lau J, Pittas AG. Efficacy and safety of incretin therapy in type 2 diabetes: systematic review and meta-analysis. *JAMA.* 298: 194-206, 2007.

14) Monami M, Iacomelli I, Marchionni N, Mannucci E. Dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in type 2 diabetes: a meta-analysis of randomized clinical trials. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 20: 224-35, 2010.

15) Kooy A, de Jager J, Lehert P, Bets D, Wulffelé MG, Donker AJ, Stehouwer CD. Long-term Effects of Metformin on Metabolism and Microvascular and Macrovascular Disease in Patients With Type 2 Diabetes Mellitus. *Arch Intern Med* 169:616-625, 2009.