

氏 名	坂 中 太 輔
(ふ り が な)	(さ か な か た い す け)
学 位 の 種 類	博士 (医学)
学 位 授 与 番 号	甲 第 号
学 位 審 査 年 月 日	平成 27 年 1 月 14 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学 位 論 文 題 名	The effects of a TGR5 agonist and a dipeptidyl peptidase IV inhibitor on dextran sulfate sodium-induced colitis in mice (マウス DSS 腸炎における TGR5 アゴニストと DPP-4 阻害薬の腸炎抑制効果)
論 文 審 査 委 員	(主) 教授 内 山 和 久 教授 朝 日 通 雄 教授 高 井 真 司

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

《背 景》

近年、本邦でも潰瘍性大腸炎やクローン病などの炎症性腸疾患が急速に増加しており、新たな治療戦略が望まれている。消化管の内分泌細胞である L 細胞には種々の G protein-coupled receptors(GPCRs)が発現しており、それらの役割解明に関する研究が盛んに行われている。このうち胆汁酸がリガンドとして作用する Takeda G-Protein-Coupled Receptor 5(TGR5)受容体の活性化は L 細胞から消化管ホルモン glucagon-like peptidase-2(GLP-2)分泌を促進することが報告され注目されている。GLP-2 は intestinotrophic 作用を有し、外因性に投与されると消化管の粘膜傷害に対して予防および治癒促進効果を示すことが知られているが、一方で dipeptidyl peptidase-4(DPP-4)によって速やかに不活化されるため、GLP-2 分泌刺激を介した TGR5 活性化の粘膜保護作用

は DPP-4 阻害剤によって促進される可能性が考えられる。そこで今回我々は TGR5 アゴニストと DPP-4 阻害剤の腸炎に対する効果をマウス dextran sulfate sodium(DSS)腸炎モデルを用いて検討した。

《方 法》

腸炎は 5% dextran sulfate sodium(DSS)を非絶食のマウスに 7 日間自由飲水させて作製した。TGR5 アゴニスト、DPP-4 阻害剤にはそれぞれ betulinic acid(BTA)と sitagliptin (STG)を用いた。マウスは 6-7 週齢の雄性 C57BL/6 マウス(20-25g)を用い、normal control 群、disease control 群、BTA 低用量投与群(15mg/L 自由飲水)、BTA 高用量投与群(50mg/L 自由飲水)、BTA 高用量+STG(3mg/kg/day,i.g.)投与群の 5 群を作製した。腸炎の臨床的活動度は Murthy らの Disease Activity Index (DAI)を用いて評価し、粘膜内の炎症性サイトカイン(TNF- α 、IL-1 β 、IL-6)および DPP family member (DPP-4、8、9、fibroblast activation protein; FAP)mRNA の発現を real-time PCR で、DPP の蛍光基質を用いて粘膜内 DPP 活性を、粘膜内 GLP 濃度については ELISA 法でそれぞれ定量的に測定した。更に選択的 GLP-2 受容体のアンタゴニストである GLP-2(3-33)を投与し、BTA の腸炎抑制における GLP-2 の関与について評価した。

《結 果》

BTA 投与群では濃度依存性に DAI が低下し、大腸粘膜内における炎症性サイトカイン(IL-1 β ,IL-6,TNF- α)の発現が抑制されていた。しかし、BTA 高用量群と BTA 高用量+ STG 投与群との間では、DAI、TNF- α 、IL-1 β に有意差を認めなかった。DSS を投与した disease control 群では粘膜内 DPP 活性が normal control 群に比べて有意に上昇しており、BTA 投与群では炎症抑制効果とともに DPP 活性も低下していたが、BTA 高用量+STG 投与群との間に有意差を認めなかった。PCR の結果、disease control 群では、DPP family member である FAP の mRNA の発現が有意に増加しており、他の DPP family member (DPP-4、8、9)の発現に変化を認めなかった。Disease control 群では粘膜内の活性型 GLP-1 濃度が

有意に低下し、BTA 投与群、BTA 高用量+STG 投与群ではいずれも有意に上昇していた。一方 total GLP-2(1-33、3-33)は BTA 投与群で低下する傾向にあり、BTA 高用量+ STG 投与群では有意に低下していた。GLP-2 受容体のアンタゴニストである GLP-2(3-33)を併用した群では BTA の腸炎抑制効果が部分的に阻害された。

《考 察》

TGR5 レセプターの選択的アゴニストである BTA のマウス DSS 腸炎における炎症抑制効果が今回の検討で示された。また、GLP-2 受容体のアンタゴニストである GLP-2(3-33)の投与により、BTA の腸炎抑制効果が減少したことから、BTA の腸炎抑制作用に内因性 GLP-2 が関与していることが示唆された。しかしながら DPP-4 選択的阻害剤である STG の併用投与は BTA の腸炎抑制効果に影響を及ぼさなかった。小腸や大腸において、TGR5 は腸管の筋層間神経叢、粘膜下神経叢や、絨毛および陰窩の L 細胞に存在する。L 細胞上の TGR5 受容体は、主に遠位小腸や近位結腸に多く存在し、Gs サブユニット活性化により cAMP 合成を介して GLP-1 を分泌する。TGR5 受容体の活性化が L 細胞からの GLP-1 分泌を刺激するため、TGR5 は代謝性疾患の治療への応用に期待されている。TGR5 と GLP-2 の関係は、これまで TGR5 アゴニストが GLP-2 分泌を介してラットの十二指腸から重炭酸を分泌させること、更に DPP-4 阻害剤がこれらの作用を促進させることが示されており、これらの結果は TGR5 と DPP-4 阻害剤の併用療法が内因性 GLP-2 の作用を介し腸粘膜傷害への新たな治療のアプローチになりうることを示唆している。TGR5 が発現し GLP-2 分泌させる L 細胞が遠位小腸や結腸に存在することから、今回我々は TGR5 アゴニストの DSS 腸炎に対する作用について注目した。これまで、DPP-4 阻害剤の腸炎における有用性について検討された報告は少ない。DPP-4 ノックアウトマウスを用いた検討では、腸炎抑制効果が少なかったと報告されているが、これには他の DPP family member の up-regulation を介した DPP 活性の維持機構が関与しているのではないかと考えられている。今回の検討でも、STG 投与群で粘膜内 DPP 活性は有意に抑制されておらず、粘膜内の GLP-1 (7-36)および GLP-2 (1-33、3-33)濃度も非投与群との間で有意な差を認めなかつ

た。DSS 投与群では FAP の up-regulation を介したと考えられる粘膜内 DPP 活性の有意な上昇を認めており、他の DPP family member の発現に変化を認めなかったこと、大腸粘膜内においては DPP-4 発現が極めて少なかったことから、大腸においては DPP-4 阻害剤の GLP-2 を介した炎症抑制効果への影響は少ないものと考えられた。しかし一方で GLP-2 受容体のアンタゴニストである GLP-2 (3-33)併用投与により、TGR5 の腸炎抑制効果が部分的に阻害された結果から、大腸においても内因性の活性型 GLP-2 は粘膜保護に重要な役割を果たしていることが推察された。L 細胞が主として遠位小腸や結腸に多く存在することも併せると、TGR5 の活性化は炎症性腸疾患の治療への応用に期待できると考えられた。

論文審査結果の要旨

潰瘍性大腸炎やクローン病などの炎症性腸疾患が近年急速に増加しており新たな治療戦略が望まれている。本研究では、Takeda G- Protein-Coupled Receptor 5 (TGR5)アゴニストと dipeptidyl peptidase-4(DPP-4)阻害剤の腸炎に対する効果を潰瘍性大腸炎のモデルであるマウス dextran sulfate sodium (DSS)腸炎を用いて検討した。その結果、TGR5 アゴニストである betulinic acid (BTA)投与群では濃度依存性に disease activity index(DAI)が低下し、大腸粘膜内における炎症性サイトカイン(IL-1 β ,IL-6,TNF- α)の発現が抑制されたことから、BTA のマウス DSS 腸炎における炎症抑制効果が今回の検討で示された。また glucagon-like peptidase-2 (GLP-2)受容体のアンタゴニストである GLP-2(3-33)の投与にて、BTA の腸炎抑制効果が減少したことから、BTA の腸炎抑制作用に内因性 GLP-2 の関与が示唆された。しかしながら DPP-4 選択的阻害剤である sitagliptin (STG)の併用投与は BTA の腸炎抑制効果に影響を及ぼさなかった。これまで DPP-4 阻害剤の腸炎に対する有用性についての報告は少ない。DPP-4 ノックアウトマウスを用いた検討では、腸炎抑制効果が少なかったと報告されているが、これには他の DPP family member の up-regulation を介した DPP 活性の維持機構の関与が考えられている。今回の検討でも、STG 投与群で粘膜内 DPP 活性は有意に抑制されず、粘膜内の GLP-1 (7-36)及び GLP-2 (1-33、3-33)濃度も非投与群との間で有意な差を認めなかった。DSS 投与群では fibroblast activation protein (FAP)の up-regulation を介したと考えられる粘膜内 DPP 活性の有意な上昇があり、他の DPP family member の発現に変化を認めなかったこと、大腸粘膜内では DPP-4 発現が極めて少なかったことから、大腸においては DPP-4 阻害剤の GLP-2 を介した炎症抑制効果への影響は少ないものと考えられた。一方、GLP-2 受容体のアンタゴニストである GLP-2(3-33)併用投与により、TGR5 の腸炎抑制効果が部分的に阻害された結果から、大腸においても内因性の活性型 GLP-2 は粘膜保護に重要な役割を果たしていることが推察された。L 細胞が主に遠位小腸や結腸に多く存在することからも、TGR5 の活性化は炎症性腸疾患の治療への応用に期待できると考えられた。

以上により、本論文は本学大学院学則第 11 条第 1 項に定めるところの博士（医学）の学

位を授与するに値するものと認める。

(主論文公表誌)

Journal of Gastroenterology and Hepatology 30(Suppl 1): 60-65, 2015