

岐阜薬科大学博士（薬学）学位論文

Dipeptidyl peptidase-4 の動脈硬化および  
脂質代謝異常における役割に関する  
薬理学的研究

後藤守兄

2019年

# 目次

序 論 .....	- 1 -
第 1 章 高コレステロール食負荷ウサギの動脈硬化に及ぼす DPP-4 阻害薬 アナグリプチンの影響	
第 1 節 緒言 .....	- 8 -
第 2 節 実験材料および方法 .....	- 9 -
第 3 節 結果 .....	- 14 -
第 4 節 考察および小括 .....	- 29 -
第 2 章 消化管でのコレステロール輸送に及ぼす DPP-4 阻害薬アナグリプ チンの影響	
第 1 節 緒言 .....	- 34 -
第 2 節 実験材料および方法 .....	- 36 -
第 3 節 結果 .....	- 41 -
第 4 節 考察および小括 .....	- 51 -
第 3 章 肝脂質代謝に及ぼす DPP-4 阻害薬アナグリプチンの影響	
第 1 節 緒言 .....	- 55 -
第 2 節 実験材料および方法 .....	- 55 -
第 3 節 結果 .....	- 60 -
第 4 節 考察および小括 .....	- 66 -

総括および結論 ..... - 69 -

謝 辞 ..... - 71 -

引用文献 ..... - 72 -

略語一覧 ..... - 88 -

## 序 論

世界の糖尿病人口に関する調査(2017)によると、成人の 11 人に 1 人が糖尿病患者で、世界各国における糖尿病患者数は 4 億 2500 万人と推定されており、2045 年には約 7 億人に増加すると言われている(International Diabetes Federation (IDF)/国際糖尿病連合, 2017)。本邦での厚生労働省による平成 28 年国民健康・栄養調査において、糖尿病が強く疑われる人および糖尿病の可能性が否定できない人はいずれも約 1,000 万人と推定され、糖尿病患者数は今後とも増加すると予想されている。

糖尿病はインスリン作用低減に伴う慢性高血糖状態を主徴とする代謝疾患群である。自己免疫等による膵β細胞の破壊が主因である 1 型糖尿病(T1DM)と、遺伝因子に環境因子および加齢などが加わって発症する 2 型糖尿病(T2DM)に分類されている(日本糖尿病学会, 2018)。慢性高血糖は網膜症、腎症、神経障害などの糖尿病細小血管合併症や、虚血性心疾患、脳血管障害、閉塞性動脈硬化症などの動脈硬化性疾患を引き起こす。糖尿病治療の目的は血糖、血圧、血中脂質などの代謝指標を良好に管理することで、細小血管合併症および動脈硬化性疾患の発症・進展を抑制し、健康な人と同様な日常生活の質(quality of life, QOL)を維持し、充実した「健康寿命」を確保することにある。いずれの型の糖尿病においても、病初期からの厳格な血糖コントロールは細小血管障害のみならず、大血管障害の発症・進展を抑制することが示唆されている(Nathan, *et al.*, 2005; Holman, *et al.*, 2008)。しかしながら、動脈硬化性疾患のリスクが集積した T2DM 患者において、血糖コントロールの正常化を目指すことの臨床的意義について検証した ACCORD (Action to Control Cardiovascular Risk in Diabetes), ADVANCE (Action in Diabetes and Vascular Disease: Preterax and Diamicron MR Controlled Evaluation)および VADT (Veterans Affairs

diabetes trial)の各試験では、数年間にわたって厳格な血糖管理を目指しても大血管障害の発症を抑制することができなかったとの報告がある(Gerstein, *et al.*, 2008; Patel, *et al.*, 2008; Duckworth, *et al.*, 2009)。さらに、ACCORDにおいては、厳格な血糖管理を目指した強化療法群では死亡例が上昇するという。その理由として、厳格な血糖コントロールを目指したことによって結果的に生じる低血糖が炎症反応、好中球や血小板の活性化、凝固系の異常、QT 間隔の延長と不整脈ならびに血管内皮機能障害などを引き起こすことで、心血管イベントが増加する可能性を示唆した(Gerstein, *et al.*, 2008)。VADT 終了後、通常療法に移行 4 年後の成績が Hayward ら(2015)によって報告されたが、心筋梗塞、狭心症、脳卒中、うつ血性心不全の新規発症または増悪、虚血性壊疽による下肢切断、心血管関連死などの主要心血管イベントの発症率においては強化療法群でのリスク減少が認められたものの、心筋梗塞、脳卒中、心不全、壊疽による下肢切断のそれぞれの発症頻度には差が認められなかったもので、強化療法の是非について未だ結論は出ていない。このような大規模臨床の成績に鑑みて、2016 年に日本糖尿病学会は、血糖コントロールの目標は、年齢、罹病期間、合併症の状態、低血糖のリスクならびにサポート体制などを考慮して個別に設定すべきと提言した。

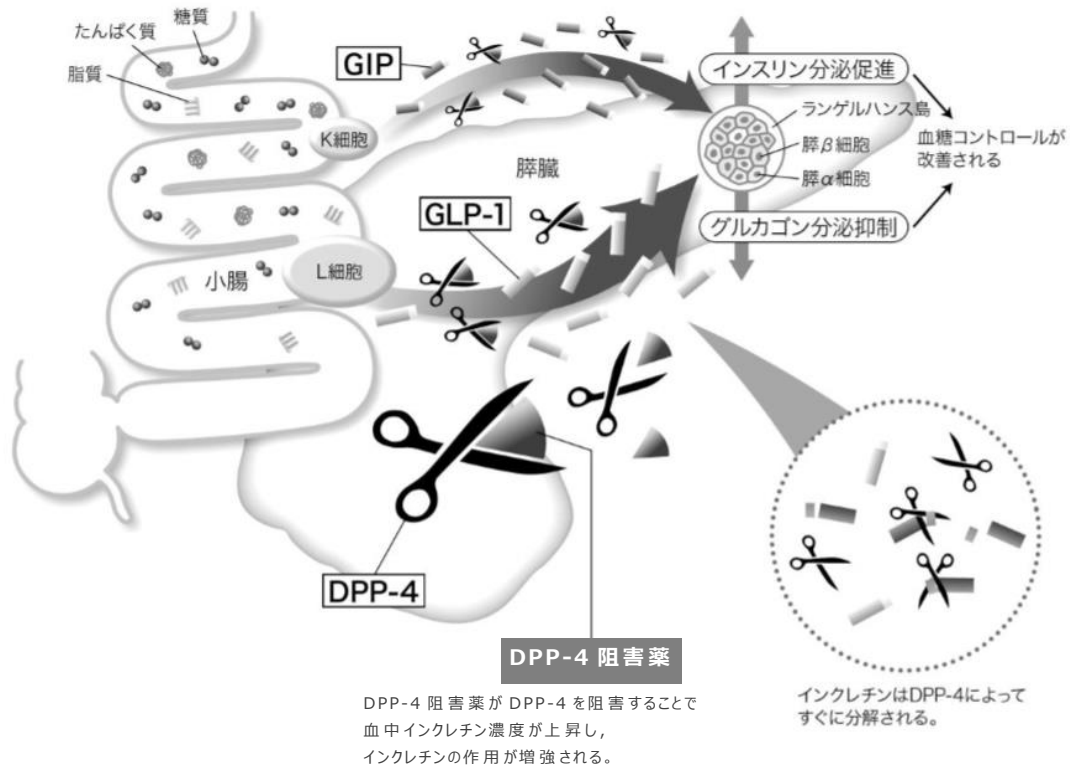
糖尿病による大血管障害発症機序については様々な因子の関与が示唆されている(Huang, *et al.*, 2017)。肥満・インスリン抵抗性によって脂肪細胞からの遊離脂肪酸(FFA)や炎症性メディエーターの放出が亢進するので、活性酸素種(reactive oxygen species, ROS)産生は増加し、全身性炎症が増悪する。インスリン抵抗性による血管内皮細胞でのインスリンシグナルの減弱は、内皮型一酸化窒素合成酵素(endothelial nitric oxide synthase, eNOS)を不活化し、一酸化窒素(nitric oxide, NO)産生が減少する。その結果、内皮細胞機能は低下する。

一方、高血糖自体も心大血管障害の病因に関与する。高血糖による ROS 産生の増加は、プロテインキナーゼ C (PKC)を活性化する。その結果、エンドセリン-1 の産生亢進、シクロオキシゲナーゼ-2 発現亢進、核内因子 nuclear factor-kappa B (NF- $\kappa$ B)の活性化を介して、内皮細胞のアポトーシスおよび透過性亢進、細胞外マトリックス合成やサイトカイン産生に影響し (Geraldes, *et al.*, 2010), 血管恒常性の変化および血管合併症の発症に寄与するものと考えられている。さらに、polyol 経路や終末糖化産物 (advanced glycation end-products, AGEs)の産生、ヘキソサミン経路の活性化なども高血糖による大血管障害発症の原因として知られている。また、Masuda ら(1999)は、動脈硬化病変のフェノタイプの一つである、内皮障害後の血管内膜肥厚形成が高血糖によって増悪し、その増悪が NOS の内因性阻害因子、L-NMMA (N<sup>G</sup>-monomethyl-L-arginine)および ADMA (asymmetric dimethylarginine)の内皮細胞内での増加による NO 産生抑制に起因することを報告した。そこで、著者らは高血糖による内因性 NOS 阻害因子の増加と内膜肥厚の増悪に polyol 経路が関与するか否かについて検討した。Aldose reductase 阻害薬フィダレスタットは alloxan 誘発糖尿病ウサギにおいて、頸動脈内皮障害後の血管内膜肥厚を顕著に抑制し、その抑制は血糖低下に非依存的で、内因性 NOS 阻害因子の低下による NO 産生増加、ひいては cyclic guanosine monophosphate (cGMP) 産生増加と強力なミトジェン、エンドセリン-1 の低下を伴っていた。すなわち、aldose reductase 阻害薬による polyol 経路の阻害が、血糖コントロールとは独立した機序を介して、高血糖に伴う動脈硬化発症・進展の抑制に寄与する可能性を示唆した。

Dipeptidyl peptidase-4 (DPP-4)阻害薬はインクレチンと呼ばれる消化管ホルモン、glucagon-like peptide-1 (GLP-1)や glucose-dependent insulinotropic

polypeptide (GIP)の分解を抑制することにより、グルコース依存性インスリン分泌を促進する結果、血糖低下作用を発揮する新しいタイプの T2DM 治療薬である(Drucker, *et al.*, 2006)。本邦において 2009 年 12 月、シタグリプチンが登場して以来、ビルダグリプチン、アログリプチン、リナグリプチン、テネリグリプチンなど、次々と臨床使用されるようになってきている。DPP-4 阻害薬の作用機序を Fig. 1 に示す。DPP-4 は生体内に広く分布するセリンプロテアーゼであり、インクレチンを含む種々の生理活性ペプチドに作用し、N 末端から 2 番目のアラニンまたはプロリンの C 末端側ペプチド結合を特異的に切断する(Mentlein, *et al.*, 1999; Lambeir, *et al.*, 2003)。インクレチンは消化管から分泌され、膵β細胞からのインスリン分泌を促進するペプチドホルモンの総称であり、GLP-1 と GIP が主に知られている。インクレチンのインスリン分泌促進作用はグルコース依存的であるため、DPP-4 阻害薬は作用機序的に単独投与では肥満や低血糖を誘発するリスクは極めて低い(Drucker, *et al.*, 2006)。また、高血糖の改善のみならず、膵β細胞の保護作用を有することが動物試験レベルで示されている(Wang, *et al.*, 2002)。DPP-4 阻害薬の使用頻度は急速に増加し、現在では T2DM の第一選択薬の一つになっている。

インクレチン (GLP-1, GIP) は糖質や脂質など  
食事由来の刺激によって、小腸や大腸から分泌される。



**Fig. 1 Mechanisms for the action of DPP-4 inhibitors**

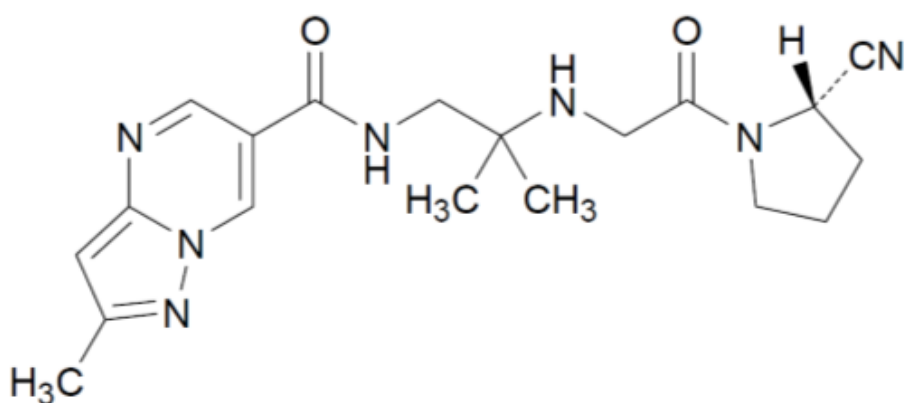
スイニー錠 100mg インタビューフォームより一部改変



DPP-4 阻害薬はその血糖低下作用に加え、GLP-1 依存のおよび／または非依存的に種々の膵外作用を有し、糖尿病腎症、網膜症、神経症などの細小血管合併症に対する臨床的な有効性を示唆する報告がある (Kang, *et al.*, 2017; Kawanami, *et al.*, 2016; Avogaro, *et al.*, 2014)。例えば、DPP-4 阻害薬は、インクレチン増強作用を介して、血糖非依存的に、NF- $\kappa$ B 活性化抑制などの抗炎症作用、PKC-nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate (NADP(H)) oxidase シグナル抑制などの抗酸化ストレス作用およびアポトーシス調節タンパク質 Bax/bcl2 比の減少などの抗アポトーシス作用を発揮し、細小血管合併症の発症を抑制することが、臨床的ならびに非臨床的に検証されている。さらに、DPP-4 はヒト白血球における CD 抗原の一つである CD26 として T リンパ球の活性化に寄与する (Tanaka, *et al.*, 1993) など、炎症に対する DPP-4/CD26 の直接的な作用も示唆されている。したがって、DPP-4 阻害薬は上述のような複数の作用を発揮することで、動脈硬化などの大血管合併症に対しても有効性を示すこと、また、aldose reductase 阻害薬などの糖尿病合併症治療薬を併用することなく、心血管イベントリスクを有する T2DM の治療に貢献し得ると期待される。

アナグリプチンは株式会社三和化学研究所(名古屋)において創製され、2012 年から T2DM 治療薬として販売されている選択的 DPP-4 阻害薬である (Fig. 2, 鏑本ら, 2013)。以上の知見に基づいて、本研究では DPP-4 の多面的作用、とくに動脈硬化発症・進展に関連する作用について、DPP-4 阻害薬アナグリプチンを用いて検討した。第 1 章では高コレステロール食負荷ウサギ動脈硬化モデルを用い、大動脈および冠状動脈のアテローム性動脈硬化に対する作用について、第 2 章では動脈硬化発症の主要なリスク因子の一つであるコレステロール代謝に及ぼす影響、特に消化管におけるコレステロール輸送に及ぼす影響につ

いて自然発症高脂血症 apolipoprotein E (ApoE)欠損マウスを用いてそれぞれ検討した。また、第3章では肝臓における脂質代謝、特にコレステロール合成および脂肪酸・トリグリセリド合成に及ぼす影響について、low-density lipoprotein (LDL)受容体(LDLR)欠損マウスを用いて検討し、それぞれの結果を以下に記述した。



N-[2-((2S)-2-Cyanopyrrolidin-1-yl)-2-oxoethyl]amino)-2-methylpropyl]-2-methylpyrazolo[1,5-a]pyrimidine-6-carboxamide

**Fig. 2 Chemical structure and chemical name of anagliptin**

## 第 1 章 高コレステロール食負荷ウサギの動脈硬化に及ぼす DPP-4 阻害薬アナグリプチンの影響

### 第 1 節 緒言

T2DM 患者において、心筋梗塞、脳梗塞などの心血管疾患(cardiovascular diseases, CVD)のリスクが高い(Haffner, *et al.*, 1998)。糖尿病における高血糖が、肥満、高血圧、脂質異常症などの併存疾患と相まって CVD リスクの増加と密接に関連している。DPP-4 阻害薬は、インクレチンと呼ばれるグルコース恒常性の維持にかかわるホルモン GLP-1 および GIP を分解する酵素である DPP-4 を選択的に阻害することで、活性型インクレチン濃度を上昇させる。DPP-4 阻害薬は血糖値依存的にインスリン分泌促進作用ならびにグルカゴン濃度低下作用の増強を介して高血糖を改善し得る新しいタイプの T2DM 治療薬として、近年、臨床診療において広く使用されている。DPP-4 阻害薬は、低血糖あるいは体重増加をきたすことなく、空腹時および食後の高血糖を改善するので、CVD リスク回避に有用であると期待されている(Ussher, *et al.*, 2012; Zhong, *et al.*, 2015)。さらに、DPP-4 阻害薬は、血糖非依存的な多面的作用を有することが報告されている(三田ら, 2013)。中でも、アテローム性動脈硬化に対する DPP-4 阻害薬の効果を動物実験で検証した研究については種々の報告があり、apolipoprotein E (ApoE)欠損マウス(Matsubara, *et al.*, 2012; Terasaki, *et al.*, 2012)あるいは low-density lipoprotein (LDL)受容体(LDLR)欠損マウス(Shah, *et al.*, 2011)などの非糖尿病性高脂血症マウスにおいて抗動脈硬化作用を示すので、血糖非依存的な DPP-4 阻害薬の血管保護作用が示唆されている。本研究では、古典的なアテローム性動脈硬化症動物モデルである高コレステロール食負荷高コレステロール血症ウサギを用い、冠状動脈および大動脈の動脈硬化プラーク形成に及ぼす DPP-4 阻害薬アナグリプチンの影響を

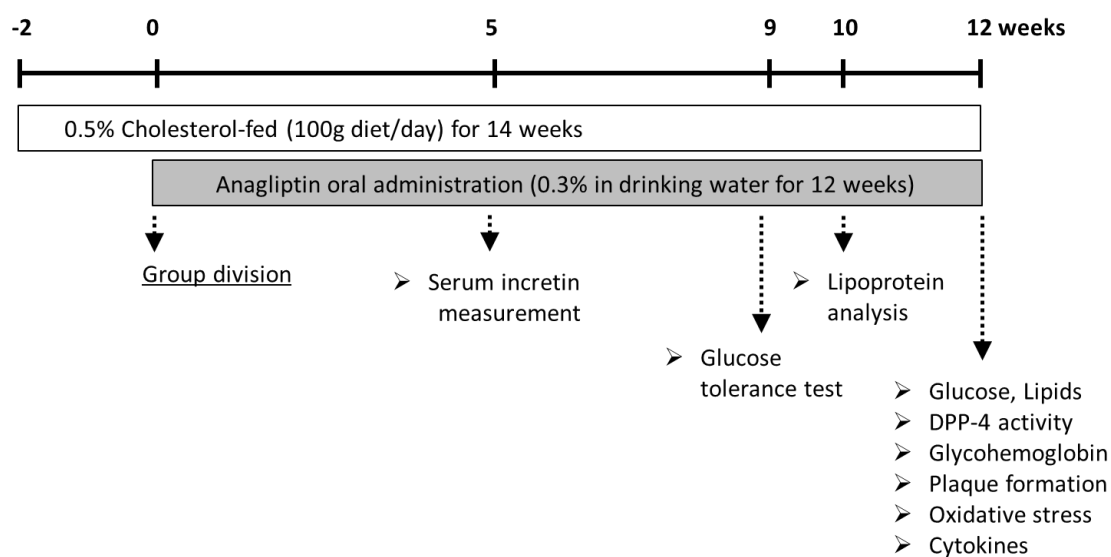
検討した。

## 第 2 節 実験材料および方法

### 2.1. 使用動物

12 週齢の雄性日本白色在来種ウサギ(Japanese white rabbits) を北山ラベス株式会社(長野)から入手し, 実験に供した。通常飼料(n=8)あるいは 0.5% コレステロール含有飼料(高コレステロール食, HCD, n=34)をいずれも 14 週間与えた。コレステロール負荷 2 週間後に 34 羽のコレステロール負荷ウサギを 2 群に分け, 16 羽のウサギには通常の飲用水を, 残りの 18 羽のウサギにはアナグリプチンを 0.3% の濃度で飲水に溶解し, それぞれ 12 週間, 自由摂取させた。飲水量より求めた投与量は約 300 mg/kg/day であった。投与開始から 12 週間後にペントバルビタール麻酔下にて放血致死させ, 心臓, 胸腹部大動脈および頸動脈を摘出し, 以下の検討に使用した。なお, 本研究は, 三和化学研究所の動物倫理委員会によって承認された後に実施した。

実験の概略を Fig. 3 に示した。



**Fig. 3 Experimental protocol for evaluating the effects of anagliptin in the cholesterol-fed atherosclerosis rabbits**

## 2.2. 実験方法

### 2.2.1. 測定

血清脂質およびグルコース濃度は、自動分析装置(7180, Hitachi, 茨城)を用いて生化学的に測定した。グリコヘモグロビン値はグリコヘモグロビン自動分析計(HLC-723G8, 東ソー, 東京)を用いて測定した。血漿 GLP-1 濃度は市販キット (EGLP-35K, Merck Millipore, Burlington, MA, USA)を用いて enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)法にて測定し、血漿 GIP 濃度は、Miyachi ら(2013)の方法に従い、Ultimate 3000 Series Nano LC System (Dionex Softron GmbH, Germering, Germany)および API QTRAP 5500 Hybrid Triple Quadrupole/Linear Ion Trap Mass Spectrometer (QQ/LIT-MS, MDS Sciex, Ontario, Canada)にて構成される液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析(LC-MS/MS)法によって測定した。静脈内グルコース負荷試験 (intravenous glucose tolerance test, IVGTT)では、0.6 g/kg のグルコースをウサギに静脈内投与し、血糖値の経時変化を測定した。血漿および血管組織の

DPP-4 活性は， Nakaya ら (2013) の方法に準じ， 合成基質である glycyl-L-proline 4-methylcoumaryl-7-amide (Gly-Pro-MCA, ペプチド研究所, 大阪)を用いた蛍光法にて測定した。 血清のリポタンパク画分中に含まれる脂質濃度は， Usui ら(2002)の方法に従い， 高速液体クロマトグラフィー(HPLC)にて， 80 nm, 30~80 nm, 16~30 nm, および 8~16 nm の粒子サイズに分離し， それぞれカイロミクロン(CM), 超低密度リポタンパク(VLDL), 低密度リポタンパク(LDL), および高密度リポタンパク(HDL)画分のコレステロール濃度として算出した。 コレステロール吸収マーカーである血清シトステロールおよびカンペステロール濃度は， Honda ら(2008)の方法に従い， LC-MS/MS 法を用いて測定した。 血清酸化ストレスマーカーである 8-ヒドロキシ-2'-デオキシグアノシン(8-OHdG)およびマロンジアルデヒド(MDA)は市販キット(KOG-HS10E, 日本老化制御研究所, 静岡)を用いた ELISA 法およびチオバルビツール酸反応基質(TBARS, NWKMDA01, Northwest Life Science Specialties, LLC. WA, USA)を用いた比色法でそれぞれ測定した。

#### 2.2.2. 大動脈および冠状動脈における動脈硬化病変の病理組織学的解析

胸腹部大動脈は採取後速やかに氷冷下のリン酸緩衝生理食塩水(PBS)で洗浄後， 縦走切開し， 未染色のままシリコン板上に張り付けた。 デジタルカメラ(EOS 5D, キヤノン, 東京)にて大動脈表面全体を撮影し， 画像解析プログラム(WinROOF, 三谷商事, 東京)を用いて， 総表面積およびプラーク陽性面積を測定し， 総表面積に対するプラーク陽性面積比を算出し， aortic plaque ratio とした。 単離した冠状動脈を含む心臓を PBS にて還流洗浄後に 10%中性緩衝液ホルマリン溶液で還流固定し， methacarn 固定液に浸漬させた後にパラフィン包埋標本を作製した。 薄切標本を作製し， 長軸径が 150 $\mu$ m を超える 4 つの主

要冠状動脈(右冠状動脈, 左冠状動脈, 前下行枝および左回旋枝)を対象に組織学的, 免疫組織化学的解析を行った。冠状動脈のプラーク形成の評価として, 脱パラフィン後の薄切標本にヘマトキシリン・エオジン(HE)染色およびエラスチカ・ワンギーソン(EVG)染色を行い, 顕微鏡画像取り込み装置ならびに画像解析プログラム(BZ-II, Keyence, 大阪)にて冠状動脈横断面の総面積, 内膜および中膜面積を算出した。免疫組織化学的解析では, 薄切標本を抗ウサギマクロファージ抗体(RAM-11, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)および抗平滑筋( $\alpha$ -smooth muscle actin,  $\alpha$ -SMA)抗体(1A4, Agilent Technologies), ならびにビオチン標識 2 次抗体(VECTASTAIN ABC kit, Vector Laboratories, Burlington, ON, Canada)および DAB 基質(DAB substrate kit, Vector Laboratories)を用いて染色し, 同様に顕微鏡画像取り込み装置ならびに画像解析プログラム(BZ-II)にて冠状動脈横断面の染色陽性面積を算出した。

### 2.2.3. 炎症性サイトカインの遺伝子発現解析

炎症性サイトカインの遺伝子発現はリアルタイム定量 polymerase chain reaction (PCR)法によって定量的に解析した。単離した頸動脈組織を TRIZOL 溶液(Thermo Fisher Scientific)に浸漬し, ホモジナイズした。RNeasy ミニキット(QIAGEN, 東京)を用いて total RNA を精製し, 精製した total RNA から, High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA)を用いて cDNA を調製した。リアルタイム PCR 装置(Light Cycler 480)および TaqMan Gene Expression Master Mix (いずれも Thermo Fisher Scientific) を用い, ターゲット遺伝子(tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin-6 (IL-6), monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), CD36, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH))に対する定量 PCR を

行った。DPP-4 のプライマーおよびプローブは、利用可能な市販品がなかったため、NCBI RefSeq (アクセッション番号 : NM\_001082294.1 および XM\_002712160.1) を基に受託合成(Integrated DNA Technologies, IA, USA)したものを使用した。

### 2.3. 統計解析

全てのデータは平均値±標準誤差で表記した。統計解析は、2 群間の比較では F 検定により分散性を確認した後に Student の *t* 検定を、3 群間の比較では、1 元配置分散分析(one-way analysis of variance (one-way ANOVA))後に Bonferroni の多重比較検定をそれぞれ行った。統計解析はいずれも EXSUS ver7.0.0 (CAC EXICARE Corporation, 東京)を用い、検定での有意水準は 5% 未満とした。



### 第 3 節 結果

#### 3.1 体重，血清グルコース，血清脂質，DPP-4 活性，インクレチンおよび耐糖能に及ぼすアナグリプチンの影響

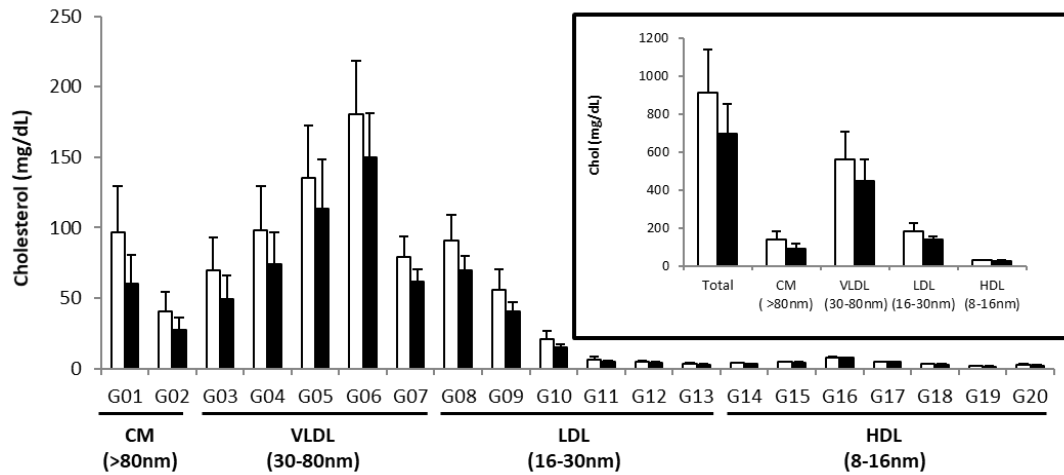
薬物投与開始直後のベースライン値(0 週)および 12 週後における体重，空腹時血清グルコース濃度，および血清脂質濃度の結果を Table 1 に示す。高コレステロール食負荷およびアナグリプチン投与は，いずれもウサギの体重および空腹時血清グルコース濃度に影響しなかった。0 週すなわち高コレステロール食負荷 2 週後での病態対照群(HCD 対照群)の血清総コレステロール，HDL コレステロールおよび non-HDL コレステロール濃度は，いずれも正常対照群に比して有意に増加した。12 週すなわち高コレステロール食負荷 14 週後では HCD 対照群の各画分の血清コレステロール濃度がいずれもさらに増加した。アナグリプチンの 12 週間飲水投与によって，血清総コレステロール，HDL コレステロールおよび non-HDL コレステロール濃度はいずれも HCD 対照群に比べ約 29%減少する傾向を示したが，有意な変化ではなかった。血清トリグリセリド濃度は HCD 対照群において，正常対照群に比べ 0 週で有意な減少が見られたが，12 週では増加傾向を示し，一定の傾向を示さなかった。アナグリプチン投与群では血清トリグリセリド濃度に HCD 対照群との差は認められなかった。血清コレステロール濃度のリポタンパク分析を行ったところ，HCD 対照群での血清コレステロール濃度上昇には，主として VLDL 画分のコレステロールの増加が寄与しており，アナグリプチンは本画分のコレステロール濃度を減少させる傾向を示した(Fig. 4)。消化管からのコレステロール吸収マーカーであるシトステロールおよびカンペステロールの血清中濃度を測定したところ，HCD 対照群において正常対照群のそれぞれ 6.9 倍および 9.2 倍の高値を示し，有意な差が認められた(Table 1)。アナグリプチンは，血清シトステロールおよ

びカンペステロール濃度に対して有意ではないものの低下傾向を示し、血清総コレステロール濃度との間に有意な正の相関が認められた ( $r=0.77-0.80$ ,  $p<0.001$ , Table 1 および Fig. 5)。

**Table 1 Characteristics and serum measurements in cholesterol-fed rabbits at 0 and 12 weeks after anagliptin administration**

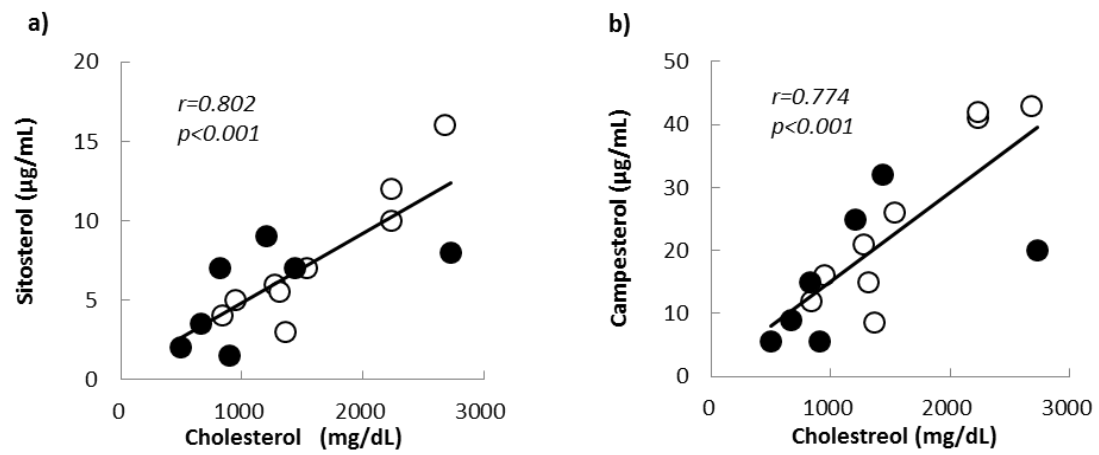
		Normal control (n=8)	HCD control (n=18)	HCD with Anagliptin (n=16)
Body weight (kg)	0w	2.55±0.03	2.54±0.03	2.49±0.04
	12w	3.05±0.05	3.03±0.05	3.00±0.05
Serum glucose (mg/dL)	0w	122±4	117±2	122±3
	12w	113±4	115±2	115±2
Serum total-cholesterol (C) (mg/dL)	0w	30±2	632±53 <sup>###</sup>	611±36 <sup>###</sup>
	12w	22±2	1,464±150 <sup>###</sup>	1,043±153 <sup>###</sup>
Serum HDL-C (mg/dL)	0w	17±2	69±5 <sup>###</sup>	67±4 <sup>###</sup>
	12w	14±2	136±16 <sup>###</sup>	97±13 <sup>##</sup>
Serum Non-HDL-C (mg/dL)	0w	14±1	562±48 <sup>###</sup>	544±32 <sup>###</sup>
	12w	8±1	1,328±136 <sup>###</sup>	946±141 <sup>###</sup>
Serum triglycerides (mg/dL)	0w	51±11	16±3 <sup>###</sup>	16±2 <sup>###</sup>
	12w	22±2	52±12	39±6
Serum sitosterol (μg/dL)	12w	1.1±0.0 (n=5)	7.6±1.4 <sup>##</sup> (n=9)	5.4±1.1 (n=7)
Serum campesterol (μg/dL)	12w	2.7±0.3 (n=5)	24.9±4.6 <sup>##</sup> (n=9)	16.0±3.9 (n=7)

Anagliptin was given as 0.3% of drinking water *ad libitum*. Values are the mean±SEM. ##, ###:  $p<0.01$ ,  $p<0.001$  vs. Normal control, respectively.



**Fig. 4 The effects of anagliptin on lipoprotein fractions in cholesterol-fed rabbits at 10 weeks after treatment**

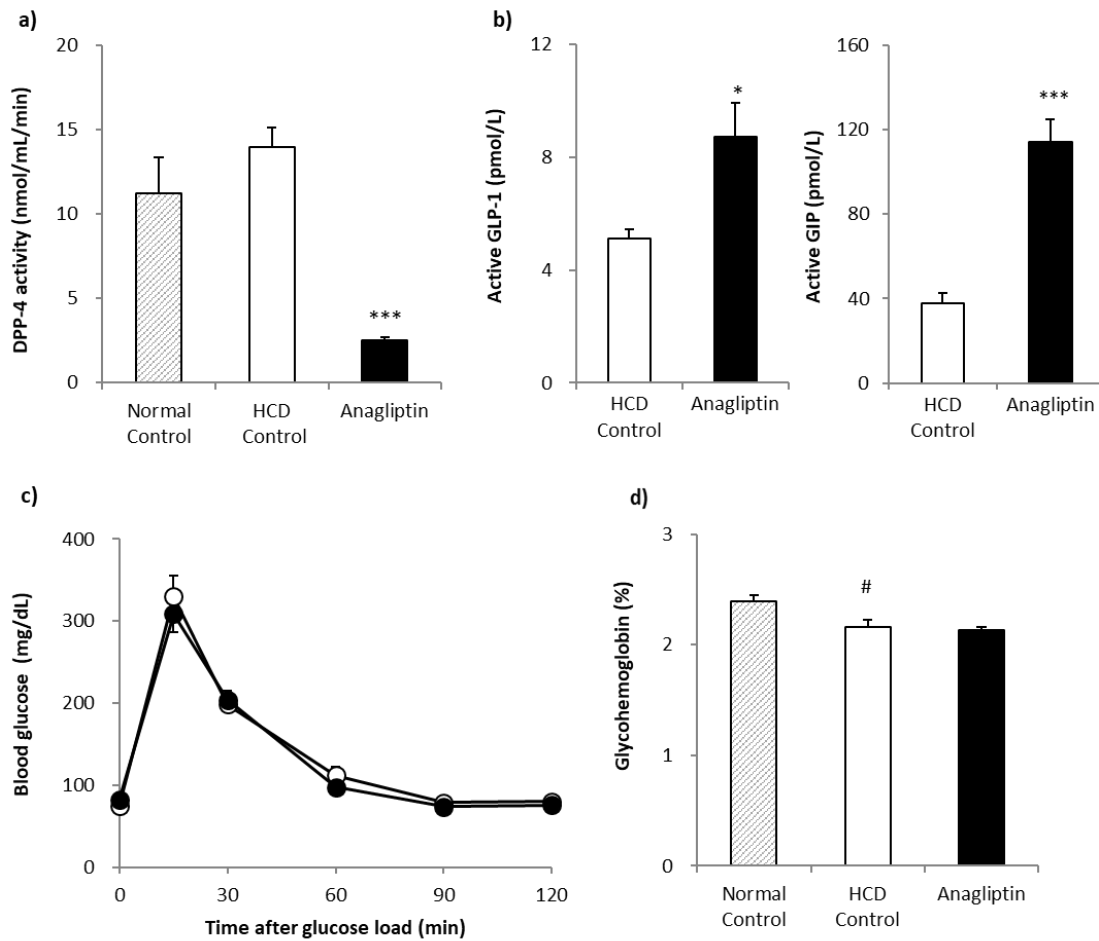
The twenty lipoprotein fractions (G01-G20) were measured by the high-performance liquid chromatography (HPLC). Chylomicrons (CM), very-low-density lipoprotein (VLDL), low-density lipoprotein (LDL), and high-density lipoprotein (HDL) were designated by particle size (greater than 80 nm, 30-80 nm, 16-30 nm, and 8-16 nm, respectively). Open column: cholesterol-fed, closed column: cholesterol-fed with anagliptin. Chol: cholesterol. Data represent the mean  $\pm$  SEM of 6 rabbits. No significant difference was observed with or without anagliptin.



**Fig. 5 Relationships between serum sterol levels in high cholesterol-fed rabbits**

a: Correlation between serum cholesterol and sitosterol, b: correlation between serum cholesterol and campesterol levels. Each symbol represents individual data from 9 high-cholesterol diet control (open circle) or 7 anagliptin-treated (closed circle) rabbits.

血漿 DPP-4 活性, 血漿 GLP-1 および GIP 濃度, グルコース負荷後の血糖値, ならびにグリコヘモグロビン値の成績を Fig. 6 に示した。HCD 対照群での血漿 DPP-4 活性は, 正常対照群でのそれと同等であった。アナグリプチンは反復投与 12 週後において血漿 DPP-4 活性を 82% 阻害した (Fig. 6a)。食後 60 分における血漿インクレチン濃度は GLP-1 および GIP のいずれもアナグリプチンの投与によって 2~3 倍に上昇していた (Fig. 6b)。グルコース負荷後の血糖値推移およびグリコヘモグロビン値にはアナグリプチン投与によっても変化は認められなかった (Fig. 6c および Fig. 6d)。

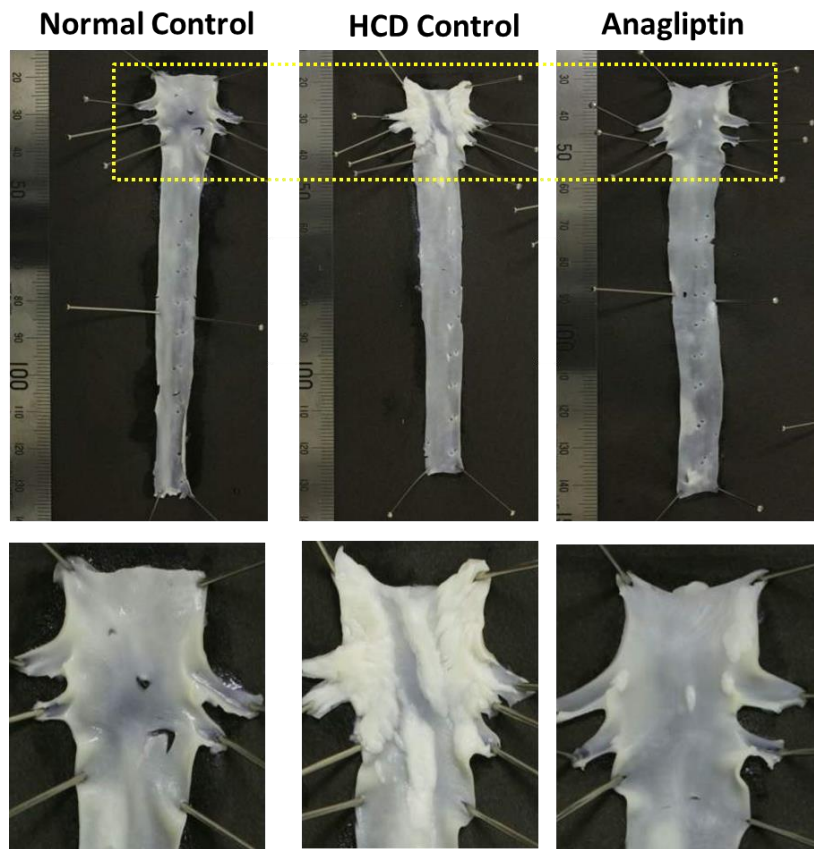


**Fig. 6 Effects of anagliptin on plasma dipeptidyl peptidase 4 (DPP-4) activity, incretin levels, glucose concentrations after glucose challenge and glycohemoglobin levels in cholesterol-fed rabbits**

a: Plasma DPP-4 activity after anagliptin treatment for 12 weeks, b: plasma glucagon-like peptide 1 (GLP-1) and glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP) levels 60 min after meal at 5 weeks after anagliptin treatment, c: blood glucose changes during intravenous glucose challenge in the cholesterol-fed rabbits after 9 weeks of anagliptin treatment, d: glycohemoglobin levels 12 weeks after anagliptin treatment. The open circles represent a high-cholesterol diet (HCD) control, and the closed circles represent anagliptin treatment. The data represent the mean $\pm$ SEM of 6-18 determinations. #:  $p < 0.05$  vs. normal control, \* and \*\*\*:  $p < 0.05$  and  $p < 0.001$  vs. HCD control, respectively.

### 3.2 大動脈病変に及ぼす影響

胸腹部大動脈標本の典型的画像およびプラーク陽性面積比の解析結果を Fig. 7 に示した。正常対照群では全く病変は認められなかったが、HCD 対照群の内腔表面には、未染色で肉眼的観察可能な白色のアテローム性動脈硬化病変が大動脈弓部では特に顕著に、胸部から腹部においても血管分岐部を中心に散在的に認められ、表面積あたりのプラーク陽性面積比は 22%であった。アナグリプチン投与群では、胸腹部大動脈内腔表面の動脈硬化病変は著明に減少し、プラーク陽性面積比は 9%であった。その程度は HCD 対照群に比して有意であり、減少率は 61%に達した( $p < 0.001$  vs. HCD control)。



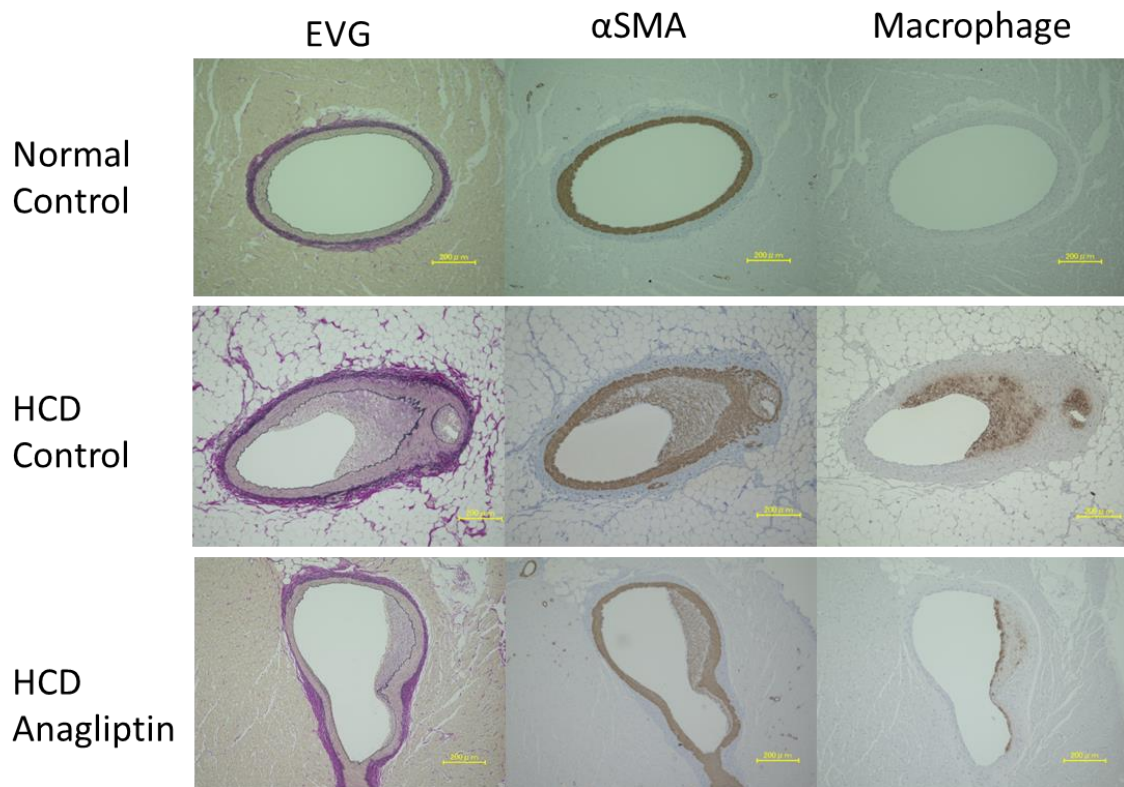
**Fig. 7 Representative pictures of atherosclerotic lesions in the whole aorta, the aortic arch, and the ratio of lesion area to total area (%plaque ratio) 12 weeks after anagliptin treatment**

HCD: high-cholesterol diet. The data represent the mean $\pm$ SEM of 8-18 rabbits. ###:  $p < 0.001$  vs. normal control, \*\*\*:  $p < 0.001$  vs. HCD control, N.D.: not detected.



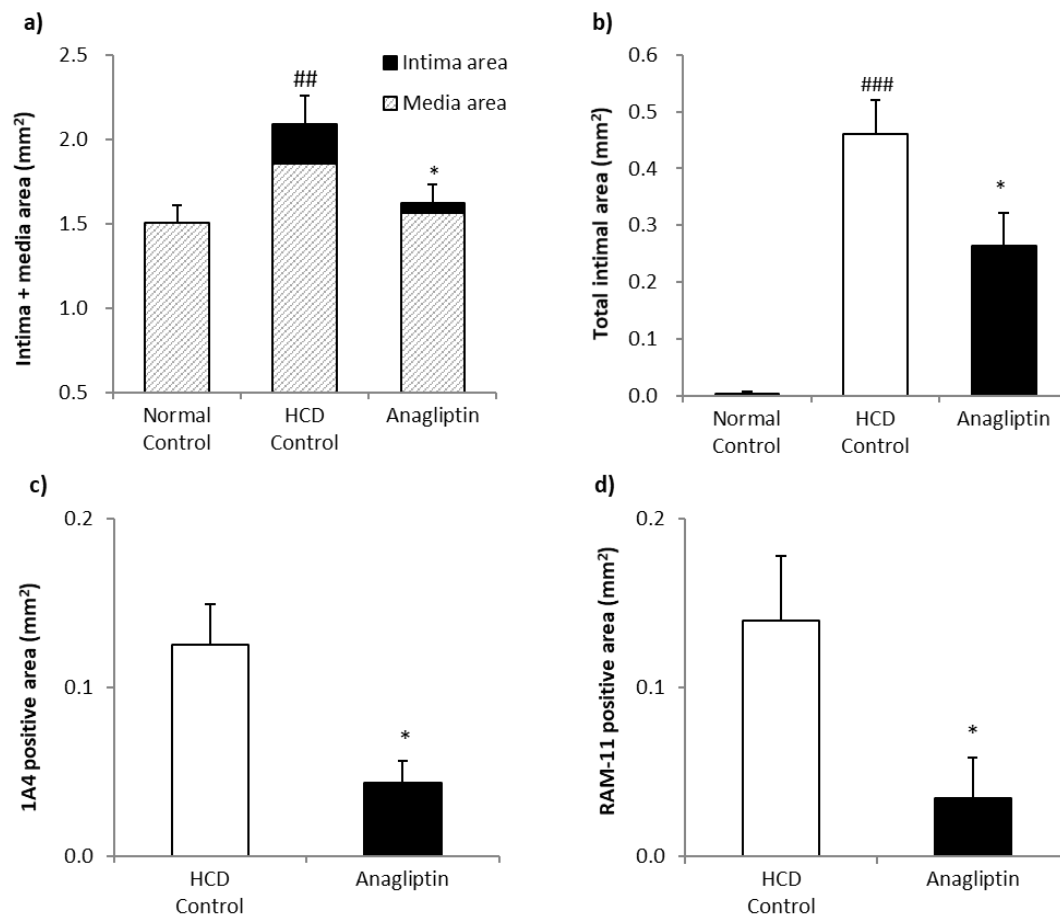
### 3.3 冠動脈病変に及ぼす影響

冠動脈標本の EVG 染色,  $\alpha$ -SMA 染色およびマクロファージ染色の典型画像を, また画像解析により求めた冠動脈主要 4 枝における内膜中膜面積ならびに長径 150  $\mu\text{m}$  以上の分枝を対象として求めた内膜総面積,  $\alpha$ -SMA 陽性面積およびマクロファージ陽性面積の結果をそれぞれ Fig. 8 および Fig. 9 に示した。HCD 対照群の冠動脈内腔表面において, 正常対照群では認められない新生内膜の形成と中膜肥大を特徴とするアテローム性動脈硬化病変が顕著であった(主要 4 枝における内膜中膜面積として 39% の増加 ( $p < 0.01$ ), Fig. 8 および Fig. 9a)。アナグリプチンの 12 週間投与によって, 主要 4 枝の内膜中膜面積を 23%, 冠動脈分枝を含む新生内膜総面積においては 43% のプラーク形成抑制作用が認められた(いずれも  $p < 0.01$ , Fig. 9a および Fig. 9b)。さらに, アナグリプチン投与群では冠動脈における  $\alpha$ -SMA 陽性およびマクロファージ陽性領域が, HCD 対照群に比してそれぞれ 66% および 75% 減少していた (Fig. 9c および Fig. 9d)。



**Fig. 8 Representative pictures of coronary arteries in cholesterol-fed rabbits**

Coronary arteries have been stained overall with Elastic Van Gieson (EVG) and immune-stained with 1A4 for  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ SMA) and RAM-11 for macrophages. HCD: high-cholesterol diet.

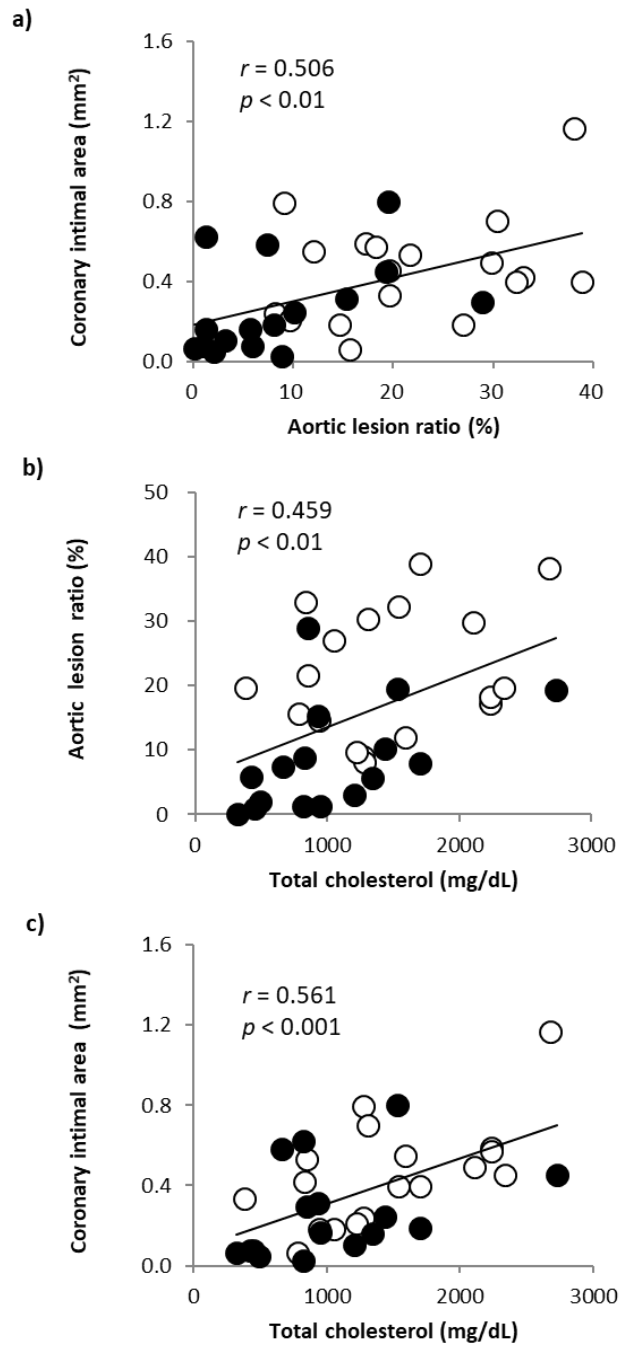


**Fig. 9 Effects of anagliptin on coronary atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits**

a: Intimal and medial area of the four major coronary arteries, b: intimal coronary branch formation with a major axis over 150  $\mu\text{m}$ , c and d: alpha-SMA-positive areas and macrophage-positive areas in the coronary arteries including branches with a major axis over 150  $\mu\text{m}$ . The data represent the mean $\pm$ SEM of 6 to 18 rabbits. ## and ###:  $p < 0.01$  and  $p < 0.001$  vs. normal control, respectively. \*:  $p < 0.05$  vs. HCD control. HCD: high-cholesterol diet.

### 3.4 動脈硬化病変と血清脂質濃度との相関

HCD 対照群ならびにアナグリプチン投与群における、大動脈プラーク形成、冠動脈プラーク形成および血清総コレステロール濃度との相関関係について検討し、その結果を Fig. 10 に示した。冠動脈分枝における内膜面積と大動脈プラーク陽性面積比との間には有意な正相関が認められた( $r=0.506$ ,  $p<0.01$ , Fig. 10a)。大動脈プラーク陽性面積比および冠動脈分枝における内膜面積は、いずれも血清総コレステロール濃度と正相関を示し、共に有意であった(それぞれ、 $r=0.459$ ,  $p<0.01$ ;  $r=0.561$ ,  $p<0.001$ , Fig. 10b, c)。

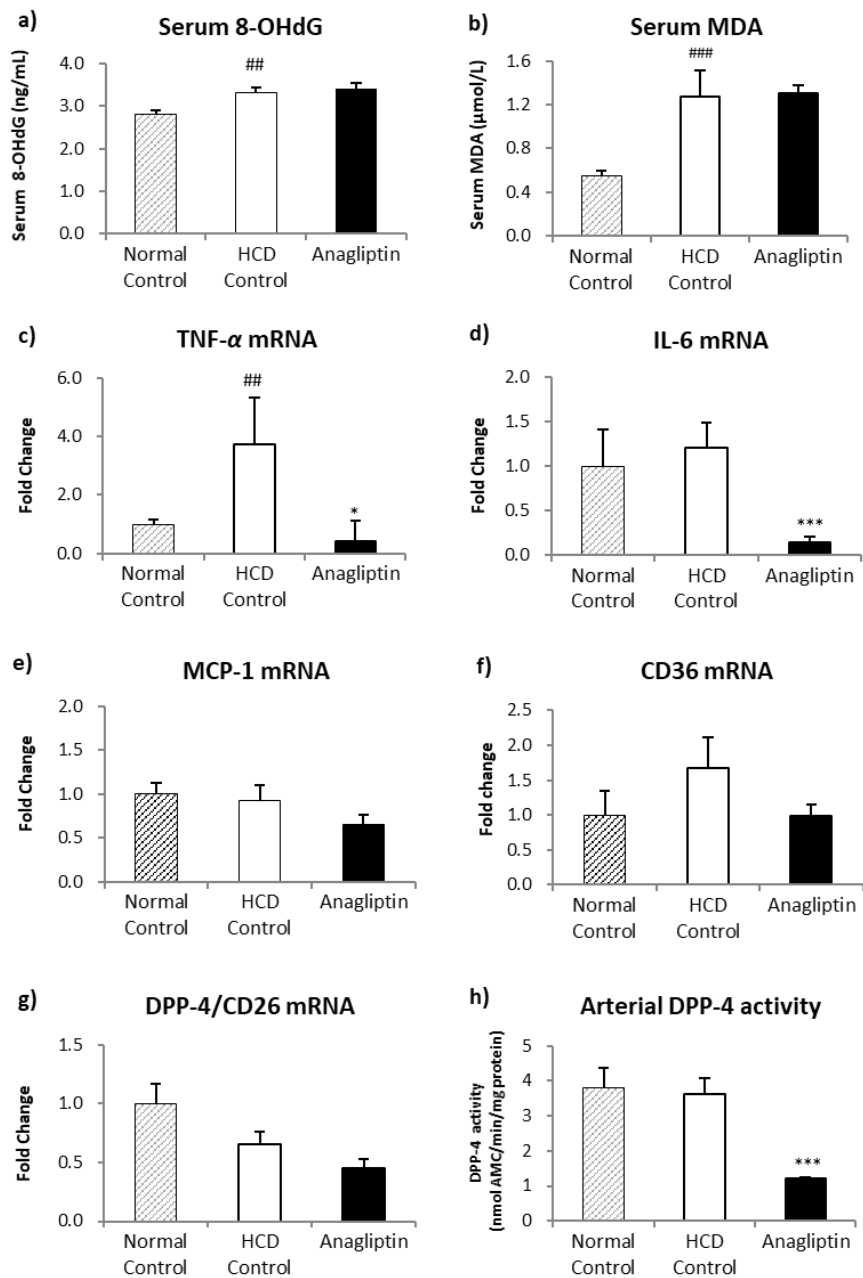


**Fig. 10 Relationships among aortic, coronary atherosclerosis and total cholesterol levels in cholesterol-fed rabbits**

a: Relationship between aortic and coronary lesions in whole cholesterol-fed rabbits, b and c: Relationships between serum total cholesterol levels and lesion area in the aorta and coronary arteries 14 weeks after dietary cholesterol without and with anagliptin for 12 weeks. Each symbol represents the data from 18 high-cholesterol diet control (open circle) or 16 anagliptin-treated (closed circle) rabbits.  $r$  and  $p$  in the figures.

### 3.5 酸化ストレス，炎症性サイトカインおよび DPP-4/CD26 に及ぼす影響

アナグリプチンが抗動脈硬化作用を発揮する機序を明らかにするために，血清酸化ストレスマーカーの濃度および動脈における炎症性サイトカインの遺伝子発現レベルを測定した。なお，動脈の炎症性サイトカイン発現の評価においては，頸動脈を用いて検討した。HCD 対照群では，血清 8-OHdG および MDA レベルはいずれも有意に上昇していた。しかしながら，アナグリプチンの投与によってこれらの酸化ストレスマーカーの上昇に対して明らかな抑制効果を示さなかった(Fig. 11a, b)。頸動脈標本での TNF- $\alpha$  の mRNA 発現は，高コレステロール食負荷において著明に増加したが，アナグリプチン投与は，これに比して 89%の抑制作用を示した。IL-6 mRNA 発現も同様に，アナグリプチンは 88%の発現抑制作用を示したが，MCP-1 および CD36 の mRNA 発現に対しては影響しなかった(Fig. 11c, d, e, f)。また，アナグリプチンの投与は血管における DPP-4/CD26 mRNA 発現にほとんど影響しなかったが，血漿同様，動脈の DPP-4 活性はアナグリプチンの反復投与によって 66%有意に抑制された(Fig. 11 g, h)。



**Fig. 11 Serum oxidative stress markers, proinflammatory cytokine mRNA expression and DPP-4 mRNA/activity in carotid arteries**

a and b: Serum levels of oxidative stress markers 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) and malondialdehyde (MDA) after 8 weeks of anagliptin treatment. Data represent the mean±SEM of 8-10 rabbits. c, d, e, and f: Tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin-6 (IL-6), monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1), and CD36 gene expression in carotid arteries. g and h: DPP-4/CD26 gene expression and DPP-4 activity in carotid arteries. The data represent the mean±SEM of 6-12 rabbits. ## and ###:  $p < 0.01$  and  $p < 0.001$  vs. normal control, respectively. \* and \*\*\*:  $p < 0.05$  and  $p < 0.001$  vs. HCD control, respectively. HCD: high-cholesterol diet.

#### 第 4 節 考察および小括

本研究は、古典的なアテローム性動脈硬化症動物モデルである高コレステロール食負荷高コレステロール血症ウサギを用いて、大動脈および冠状動脈の動脈硬化プラーク形成に関わる各種パラメーターの変動と、DPP-4 阻害薬アナグリプチンによるそれらの修飾を明らかにすることを介して、動脈硬化プラーク形成機序の解明とアナグリプチンの有効性を示すために企図されたものである。

本研究に用いたモデル動物の血糖値は正常で、アナグリプチン投与を 12 週間投与してもグルコース代謝に影響しなかったため、DPP-4 阻害薬による抗動脈硬化作用は当該阻害薬の血糖低下作用に起因するとは考え難い。高コレステロール食の負荷によってウサギの血清コレステロールレベルは著明に上昇し、その結果、重度のアテローム性動脈硬化を惹起する (Duff, 1935; Bocan, *et al.*, 1993)。すなわち、血清コレステロール濃度の上昇は、この動物モデルにおけるアテローム性動脈硬化発症の引き金となる。本研究での病態モデルにおける血清総コレステロール濃度は、大動脈ならびに冠状動脈のアテローム性動脈硬化病変と相関していた。一方、アナグリプチンによる DPP-4 阻害後には、大動脈および冠状動脈のアテローム性動脈硬化の抑制は顕著であった。それにも関わらず、血清総コレステロール濃度ならびに各リポタンパク画分のコレステロール濃度のいずれも DPP-4 阻害による有意な低下は認められなかった。一方、VLDL 画分は、高コレステロール食負荷ウサギの主要なコレステロール保持リポタンパクを含む画分であり、高濃度の酸化リポタンパクが含まれる (Morin, *et al.*, 1989)。そのために VLDL の上昇はマクロファージの泡沫化を促進し、アテローム性動脈硬化症の発症に重要な役割を果たしている (Holvoet, *et al.*, 1997; Staprāns, *et al.*, 1996)。DPP-4 阻害によって VLDL コレステロール濃度は有意に低下しないものの、VLDL 画分を含む各画分のコレステロール濃度



は低下傾向を示すこと、アナグリプチンが粒子サイズを変えずに VLDL の酸化修飾を抑制する可能性は否定できないので、DPP-4 阻害薬による動脈硬化抑制機序の少なくとも一部にコレステロール低下作用が寄与する可能性は残されている。血清コレステロール濃度と大動脈プラーク陽性面積比ならびに冠状動脈内膜面積との間に正の相関関係が認められたことも、この可能性を支持するものである。Nader ら(2014)は、DPP-4 阻害薬であるシタグリプチンが高コレステロール・高メチオニン食負荷ウサギでのアテローム性動脈硬化の発症を抑制し、その作用は血清総コレステロールおよび LDL コレステロール濃度の低下を伴うと報告している。アナグリプチンが血清コレステロール濃度に対して有意な抑制作用を示さなかった理由として、モデル動物の条件、脂質レベルの違い、および/または DPP-4 阻害剤の投与条件の違い(本研究飲水投与、Nadar ら 1 日 2 回の強制経口投与)による可能性が示唆された。一方、両研究における DPP-4 阻害後の総コレステロール濃度は、正常動物のそれに比べて極めて高値であるにも関わらず(本研究 1,043 mg/dL, Nadar ら 370 mg/dL), 共に著明な動脈硬化抑制作用を示していることから、後述のようにコレステロール低下作用に依存しない機序も介在する可能性が高い。

前述のように、大動脈のプラーク形成は DPP-4 の阻害によって著明に抑制された。冠状動脈におけるアテローム性動脈硬化病変は、ウサギ以上の中型動物において容易に観察が可能であるため、冠状動脈についても評価した。アナグリプチンによる DPP-4 の阻害後には、冠状動脈主要 4 枝のみならず、さらに細かい分枝においても著明な抑制作用を示した。さらに、アナグリプチンは冠状動脈分枝でのマクロファージ陽性面積を著明に減少させたので、マクロファージ浸潤に対する強力な抑制作用を有すると考えられる。DPP-4 の阻害によるマクロファージ浸潤抑制あるいはそれに関連する炎症反応の抑制は、他の動脈硬化

モデルである ApoE 欠損マウスの大動脈病変においても認められているが (Matsubara, *et al.*, 2012; Ervinna, *et al.*, 2013; Terasaki, *et al.*, 2013; Shah, *et al.*, 2011), ウサギモデルの, 特に冠状動脈の病変においても共通して認められたことは注目に値する。脂質を豊富に含むマクロファージの浸潤・増殖は, 臨床において, 急性冠症候群の引き金につながる主な病理学的変化である不安定プラークの形成を引き起こす (Schwartz, *et al.*, 1991)。したがって, アナグリプチンによる冠状動脈病変のマクロファージ浸潤抑制作用は, プラーク破綻を防止し, それによる急性冠症候群発症リスクを低下させる可能性が示唆される。

DPP-4 の基質として, GLP-1 および GIP のインクレチンホルモンがよく知られており, DPP-4 阻害薬はそれらインクレチンホルモンの分解を阻害する。本研究においても, アナグリプチンの投与によって, 血漿中の活性型 GLP-1 および GIP 濃度はいずれも増加した。GLP-1 および GLP-1 レセプターアゴニストは, ApoE 欠損マウスにおいて抗動脈硬化作用を示すことが報告されており, 血管内皮への単球の接着抑制や血管内皮細胞機能傷害の抑制が主な機序として示唆されている (Arakawa, *et al.*, 2010; Gaspari, *et al.*, 2013)。また, GIP も同様に抗動脈硬化作用を有することが Nagashima ら (2011) や Nogi ら (2012) により報告されている。さらに, Terasaki ら (2012) は, DPP-4 阻害による抗動脈硬化作用が, インクレチン受容体アンタゴニストとの共投与によって減弱することを見い出しており, DPP-4 阻害薬の抗動脈硬化作用の一部は内因性のインクレチンによる作用である可能性を示唆している。しかしながら, 本研究において, DPP-4 阻害の抗動脈硬化作用が内因性インクレチン濃度の上昇に起因するか否かについてはさらに詳細な検討が必要である。DPP-4 は, インクレチンのみならず, ケモカインの一種である stromal cell-derived factor-1 $\alpha$

(SDF-1 $\alpha$ )の分解にも関与し、DPP-4阻害薬によって血管保護作用が活性化され、血管内皮機能の亢進および抗動脈硬化作用を発揮する可能性を示す報告がある(Brenner, *et al.*, 2014)。さらに、DPP-4はCD抗原の一つであるCD26としても知られているが、アテローム性動脈硬化発症を増強する炎症性サイトカインの一つであるとの仮説があり(Avogaro, 2011)、DPP-4/CD26は、インクレチンなどの基質を介することなく、血管炎症に直接関与する可能性が考えられる。実際に、培養単球/マクロファージを用いた *in vitro* 研究において、細胞刺激後の炎症性サイトカインの遺伝子発現、タンパク質発現およびその分泌を、DPP-4阻害薬が直接抑制することを示した報告がなされている(Ta, *et al.*, 2011; Ervinna, *et al.*, 2013; Ta, *et al.*, 2010)。さらに、可溶性CD26がアディポサイトカインとして脂肪細胞から分泌され、炎症によるインスリン抵抗性、血管平滑筋細胞の増殖および単球/マクロファージ炎症を引き起こすとの報告もある(Lamers, *et al.*, 2011; Ervinna, *et al.*, 2013; Ikeda, *et al.*, 2013)。本研究においても、DPP-4の阻害によって、TNF- $\alpha$ およびIL-6のmRNA発現を強力に抑制した。しかしながら、DPP-4/CD26 mRNAについてはDPP-4阻害による発現変動は見られず、DPP-4酵素活性に対してのみアナグリプチンの阻害作用が認められたので、アナグリプチンによるこれらの炎症性サイトカインの顕著な抑制に、DPP-4/CD26が重要な役割を果たすことを示唆する。一方、DPP-4の酵素活性の阻害あるいはCD26タンパク質としての作用のいずれが深く関与しているかを明らかにするためには、さらなる検討が必要である。また、糖尿病による大血管障害発症機序の一つにROS産生の増大による全身炎症の増悪が関与することが知られていることから(Huang, *et al.*, 2017; Geraldles, *et al.*, 2010)、本研究においても酸化ストレスマーカーである血清8-OHdGおよびMDAレベルを評価した。その結果、モデル動物においてそれらのレベルは増

大したが、アナグリプチン投与はこれら酸化ストレスマーカーに対して作用を及ぼさなかった。したがって、病態モデルの血管炎症亢進に対しては全身での ROS 産生の増大が一部関与するものの、アナグリプチンの作用は直接 ROS 産生の抑制を介したものでなく、別の機序で血管におけるマクロファージの浸潤および炎症性サイトカイン産生を抑制することを示唆する。

小括：DPP-4 の阻害は、高脂血症動脈硬化モデルウサギの大動脈ならびに冠状動脈におけるアテローム性動脈硬化の発症を抑制した。その作用は、インクレチンを含む基質の分解抑制あるいは直接的にマクロファージの浸潤を抑制し、TNF- $\alpha$ 、IL-6 などの炎症性サイトカインの産生を抑制した結果である可能性が示唆された。また、その作用の少なくとも一部に、DPP-4 阻害による血清コレステロール低下作用が関与する可能性が考えられた。

## 第 2 章 消化管でのコレステロール輸送に及ぼす DPP-4 阻害薬アナグリプチンの影響

### 第 1 節 緒言

T2DM 患者において、脂質異常症は高血糖とは独立した重要かつ調節可能な心血管リスクであるため、薬物介入による脂質プロファイルの改善が必要とされている(Niemeijer-Kanters, *et al.*, 2001; Nesto, *et al.*, 2005; Ballantyne, *et al.*, 2005)。現在の T2DM の治療に広く使用されている DPP-4 阻害薬は、セリンプロテアーゼの一種、DPP-4 の酵素活性を阻害することによって GLP-1, GIP などのインクレチンの分解を抑制する(Drucker, *et al.*, 2006)。GLP-1 および GIP は T2DM 患者の膵臓のランゲルハンス島に作用し、グルコース濃度に依存したインスリン分泌促進作用を発揮する(Nauck, *et al.*, 1993; Matsuyama, *et al.*, 1988)。さらに、GLP-1 は肝での糖新生促進ホルモン、グルカゴンの分泌を抑制することが知られている(Matsuyama, *et al.*, 1988)。

DPP-4 阻害薬は、インスリン分泌促進およびグルカゴン分泌抑制による血糖低下作用に加え、糖尿病性腎症、網膜症、神経障害など糖尿病合併症ならびに心血管疾患のリスク低下などの膵外作用を発揮することが最近報告されている(Avogaro, *et al.*, 2014; Tanaka, *et al.*, 2014; Giorgino, *et al.*, 2011; Zhong, *et al.*, 2013; Hirano, *et al.*, 2016; Terasaki, *et al.*, 2013)。また、DPP-4 阻害薬の脂質低下効果についても種々報告されており、とりわけ、Monami ら(Monami, Lamanna, *et al.*, 2012; Monami, Vitale, *et al.*, 2012)による臨床メタ解析の結果、シタグリプチン、ビルダグリプチン、アログリプチン、サクサグリプチン、リナグリプチンなどの DPP-4 阻害薬が、血清コレステロールレベルおよび血清トリグリセリドレベルを低下させることが明らかになった。また、シタグリプチンが、高トリグリセリド血症を呈した患者においてのみ、血清総コレステロ

ール濃度および non-HDL コレステロール濃度を低下させること (Shigematsu, *et al.*, 2014), アログリプチンが新たに糖尿病と診断された薬物未治療の T2DM 患者において, 血清総コレステロール, non-HDL コレステロールおよび LDL コレステロールレベルを有意に低下させることが示されている (Kutoh, *et al.*, 2012)。アナグリプチンにおいても, 高脂血症を合併する T2DM 患者の血清総コレステロールおよび LDL コレステロール濃度を低下させることが報告されており, 抗糖尿病効果に加えて, 直接的なコレステロール低下作用が示唆されている (加来, 2012; Kakuda, *et al.* 2015, Kurozumi, *et al.*, 2017)。

生体内コレステロールレベルは肝臓におけるコレステロール合成と小腸からのコレステロール輸送によって調節されているが, DPP-4 および DPP-4 阻害薬のコレステロール代謝に対する作用機構については未だ十分に研究されていない。また, ウサギの体内ではコレステロールを合成することができないため, 第 1 章において明らかにした DPP-4 阻害薬, アナグリプチンによる血清コレステロール低下作用は, 小腸におけるコレステロール輸送調節に関連している可能性が示唆される。そこで本研究では, 主に自然発症高コレステロール血症モデルマウスを用い, 小腸からのコレステロール輸送に及ぼすアナグリプチンの影響について検討し, DPP-4 阻害によるコレステロール低下のメカニズム解析を企図した。

## 第 2 節 実験材料および方法

### 2.1. 使用動物

#### 2.1.1. ApoE 欠損マウス

6 週齢の雄性 ApoE 欠損マウス(C57BL/6.KOR/StmSlc-*Apoesh1*, B6.SHL)を日本エスエルシー(浜松)から購入した。マウスは通常飼料(CRF-1, オリエンタル酵母, 東京)を自由摂取させ, 12 時間毎の明暗サイクル(7:00/19:00)下で飼育した。8 または 9 週齢のマウスを 2 群に分け, 1 群には 0.3% アナグリプチンを含む飼料を, 他の 1 群は対照群として引き続き通常飼料のみそれぞれ与えた。摂餌量から算出したアナグリプチンの一日当たりの投与量はおよそ 300 mg/kg であった。なお, 本研究は三和化学研究所の動物倫理委員会によって承認された後に実施した。

実験の概略を Fig. 12a に示す。

#### 2.1.2. DPP-4 欠損ラット

6 週齢の雄性 F344/DuCr1Cr1j (DPP-4 活性欠損)ラットをチャールス・リバー(横浜)から購入した。ラットは通常の飼料(CRF-1, オリエンタル酵母)を自由摂取させ, 12 時間の明暗サイクル(7:00/19:00)下で飼育した。11 週齢時に 2 群に分け, 1 群はそのまま通常飼料を自由摂取させて対照群(n = 8)とした。他の 1 群にはアナグリプチン 0.3%を混合した飼料を与えて, 4 週間飼育した(アナグリプチン投与群, n=8)。なお, 本研究は, 三和化学研究所の動物倫理委員会によって承認された後に実施した。

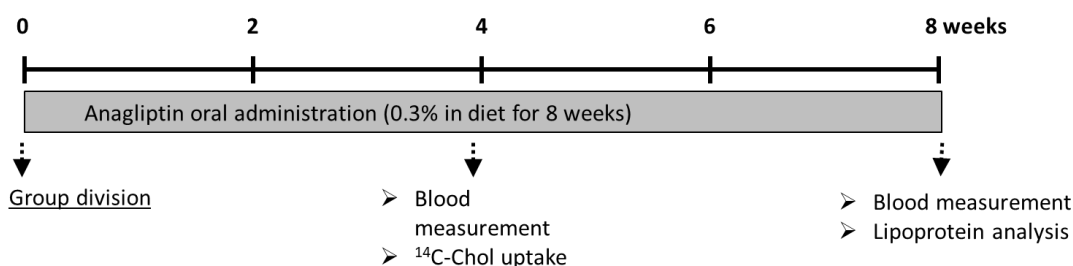
実験の概略を Fig. 12b に示す。

### 2.1.3. 正常(野生型)マウス

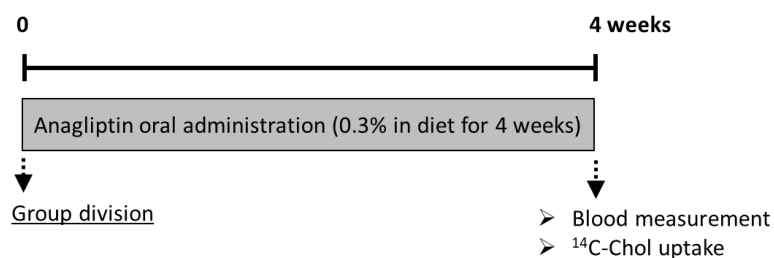
6週齢の雄性 C57BL/6J マウスを日本チャールス・リバーから購入した。マウスは通常飼料(CRF-1)を自由摂取させ, 12時間毎の明暗サイクル(7:00/19:00)下で飼育した。8週齢のマウスを2群に群分けし, 1群には0.3%アナグリプチンを含む飼料を, 他の1群は対照群として引き続き通常飼料を5週間与えた。なお, 本研究は, 三和化学研究所の動物倫理委員会によって承認された後に実施した。

実験の概略を Fig. 12c に示す。

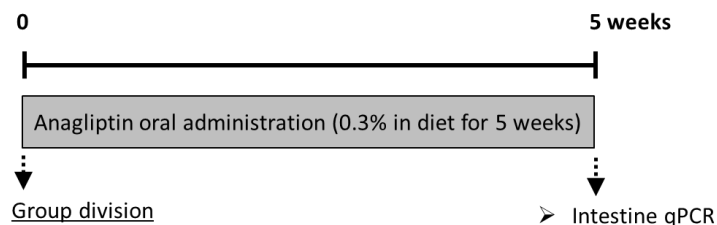
#### a) ApoE deficient mice



#### b) DPP-4 deficient rats



#### c) C57BL/6 mice



**Fig. 12 Experimental protocols for the evaluation of intestinal cholesterol transport**



## 2.2. 実験方法

### 2.2.1. 血漿 DPP-4 活性，血清グルコース濃度および血清脂質濃度の測定

投与開始前(0週),投与開始後4および8週間の B6.SHL マウスより採血し,血漿 DPP-4 活性,血清グルコースおよび血清コレステロール濃度の測定に供した。血漿 DPP-4 活性は,第1章に記載した方法に準拠して測定した。血清グルコース濃度ならびに血清総コレステロールおよび HDL コレステロール濃度は,市販の測定試薬(グルコース CII テストワコー,コレステロール E-テストワコーおよび HDL コレステロール E-テストワコー,いずれも和光純薬,大阪)を用いて測定した。なお,測定は各試薬に同封の添付文書に記載の操作方法に準じて行った。Non-HDL コレステロール濃度は血清総コレステロール濃度から HDL コレステロール濃度を減じることより求めた。血清コレステロール濃度のリポタンパク解析は第1章に記載した方法に準拠した。

### 2.2.2. <sup>14</sup>C 標識コレステロールを用いた小腸でのコレステロール輸送の測定

アナグリプチン4週間投与後の B6.SHL マウスに,コーン油で希釈した <sup>14</sup>C 標識コレステロール(<sup>14</sup>C-Chol, 4 mg/1.85 MBq/kg, American Radiolabeled Chemicals, St. Louis, MO, USA)を経口投与した。<sup>14</sup>C-Chol 負荷2時間および72時間後に,血漿,肝臓および小腸(上,中,下の各部位)における放射活性を液体シンチレーションシステム(AccuFLEX LSC-7400,日立,東京)を用いて測定した。糞中へのコレステロール排泄は既報(Howles, *et al.*, 1996)を参考に,以下のように評価した。アナグリプチン投与4週間後の B6.SHL マウスに,<sup>14</sup>C-Chol および <sup>3</sup>H 標識シトステロール(それぞれ 4 mg/9.25 MBq/kg および 1.6 μg/7.25 MBq/kg, American Radiolabeld Chemicals, St.Louis, MO, USA)

を経口負荷し、負荷 24 時間、48 時間および 72 時間後に糞便を採取した。<sup>14</sup>C-Chol の糞中への排泄は、投与した全放射能に対する排泄率を測定することによって計算した。見かけの <sup>14</sup>C-Chol 吸収率は下記の式によって算出した。

$$^{14}\text{C-Chol 吸収率}(\%) = (1 - ^{14}\text{C-Chol の排泄率} / ^3\text{H-シトステロールの排泄率}) \times 100$$

### 2.2.3. 小腸からのコレステロール輸送に及ぼす exendin-4 の影響

雄性 B6.SHL マウスを 8 週齢で 3 群に分け、GLP-1 受容体アゴニストである exendin-4 (exenatide, (Byetta, AstraZeneca, London, UK)) の 8 または 40  $\mu\text{g}/\text{kg}$  を 1 日 2 回 4 週間反復皮下投与した。他の 1 群は、対照群として生理食塩水を同様に投与した。投与後のマウスに、<sup>14</sup>C-Chol (4 mg/1.85 MBq/kg) を経口負荷し、その 2 時間後に採血して血漿放射活性を測定した。

### 2.2.4. 小腸組織における遺伝子発現解析

小腸における脂質代謝および輸送に関連する標的遺伝子の発現を、リアルタイム定量 PCR (qPCR) によって定量化した。単離した組織を TRIZOL Reagent (Invitrogen, Waltham, MA, USA) でホモジナイズし、RNeasy ミニキット (QIAGEN) を用いて total RNA を精製した。High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) を用いて 0.1  $\mu\text{g}$  の total RNA から cDNA を合成した。リアルタイム PCR は LightCycler 480 システム (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) を用いて行った。なお、使用したすべての標的的特異的プライマーおよびプローブセットは Applied Biosystems から購入した (Table 2)。

**Table 2 TaqMan primers and probes for qPCR analysis**

Name	Assay ID	Name	Assay ID
MTTP	Mm00435015_m1	LDLR	Mm00440169_m1
ACAT2	Mm00448823_m1	FATP4	Mm01327405_m1
ApoA2	Mm04210370_g1	ABCA1	Mm00442646_m1
ApoC2	Mm00437571_m1	SR-B1	Mm00450234_m1
ApoB	Mm01545156_m1	ABCG5	Mm00446241_m1
NPC1L1	Mm01191973_m1	ABCG8	Mm00445970_m1

MTTP: microsomal triglyceride transfer protein, ACAT2: acyl-coenzyme A: cholesterol acyltransferases 2, ApoA2: apolipoprotein A2, ApoC2: apolipoprotein C2, ApoB: apolipoprotein B, NPC1L1: Niemann-Pick C1-like 1, LDLR: low density lipoprotein receptor, FATP4: fatty acid transport protein 4, ABCA1: ATP binding cassette subfamily A member 1, SR-B1: scavenger receptor class B member 1, ABCG5: ATP binding cassette subfamily G member 5, ABCG8: ATP binding cassette subfamily G member 8

#### 2.2.5. DPP-4 欠損ラットを用いたコレステロール輸送に及ぼす影響

アナグリプチン 4 週間投与後の DPP-4 欠損ラットに、コーン油で希釈した  $^{14}\text{C}$ -Chol (4 mg/0.95 MBq/kg) を経口負荷し、負荷 4 時間および 72 時間後に採血し、血漿  $^{14}\text{C}$ -Chol の放射活性を液体シンチレーションシステムで測定した。

#### 2.3. 統計解析

全てのデータは平均値±標準誤差で表記した。統計解析は、2 群間の比較では F 検定により分散性を確認した後に Student の *t* 検定を、3 群間の比較においては、Bartlett の検定により分散性を確認した後に Dunnett の検定をそれぞれ行った。統計解析はいずれも EXSUS ver7.0.0 (CAC EXICARE Corporation, 東京) を用いた。検定での有意水準は 5% 未満とした。

### 第 3 節 結果

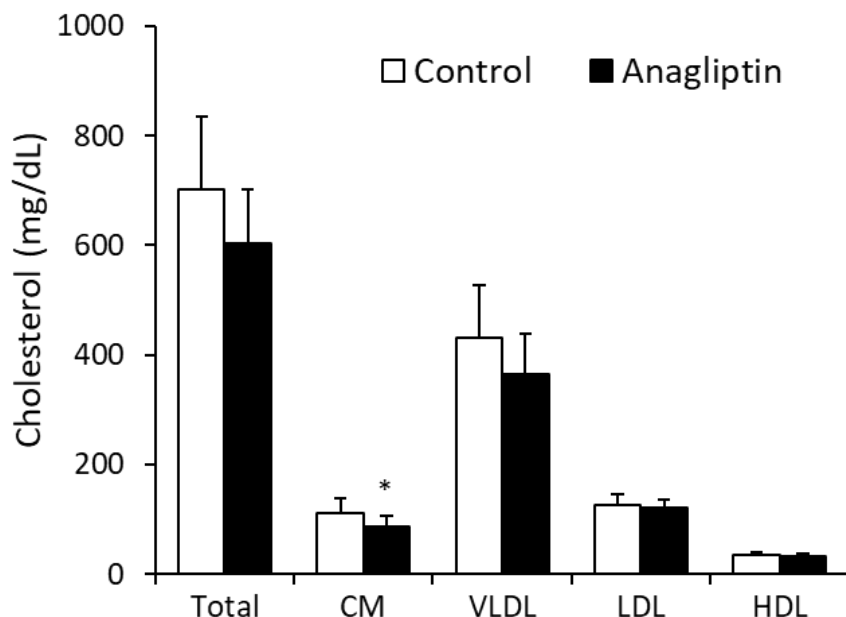
#### 3.1 ApoE 欠損マウスの高脂血症に及ぼすアナグリプチンの影響

Table 3 に ApoE 欠損自然発症高脂血症マウスにおけるアナグリプチン投与前後のベースラインデータを示した。いずれの時点においても，対照群とアナグリプチン投与群との間で体重および血清グルコース濃度に有意な差は認められなかった。一方，血漿 DPP-4 活性はアナグリプチン投与開始 4 および 8 週間後のいずれにおいても対照群に比べ有意な低下が認められた。アナグリプチン投与マウスの血清総コレステロール濃度および non-HDL コレステロール濃度は，投与開始 8 週間後に対照群と比較して有意に低値を示した。さらに，血清コレステロールのリポタンパク分析を行った結果，カイロミクロン画分のコレステロール濃度が有意に低下し，VLDL 画分においても低下傾向が認められた(Fig. 13)。

**Table 3 Effects of anagliptin on body weight, serum glucose, plasma DPP-4 activity and serum cholesterol levels in spontaneously hypercholesterolemic mice**

	0w		4w		8w	
	Control	Anagliptin	Control	Anagliptin	Control	Anagliptin
Body weight (g)	23.5±0.3	23.6±0.4	29.3±0.5	28.7±0.4	32.5±0.7	31.2±0.3
Serum glucose (mg/dL)	167±4	177±5	167±8	149±6	146±5	140±6
Plasma DPP-4 activity (nmol/min/mL)	8.06±0.34	8.07±0.54	5.06±0.40	1.21±0.05 <sup>***</sup>	8.17±0.50	1.24±0.07 <sup>***</sup>
Serum cholesterol (mg/dL)						
Total cholesterol	650±37	628±42	597±24	515±36	811±58	659±42 <sup>*</sup>
Non-HDL cholesterol	631±38	608±42	572±24	492±37	781±56	634±41 <sup>*</sup>
HDL cholesterol	19.4±0.8	19.6±1.2	24.6±1.3	22.8±1.4	29.7±2.4	25.0±1.8

Each value is expressed as the mean±SEM of 12 individuals.  
<sup>\*</sup> and <sup>\*\*\*</sup>:  $p < 0.05$  and  $p < 0.001$  vs. control, respectively



**Fig. 13 Serum lipoprotein profiling by high-performance liquid chromatography in ApoE-deficient mice treated with anagliptin for 8 weeks**

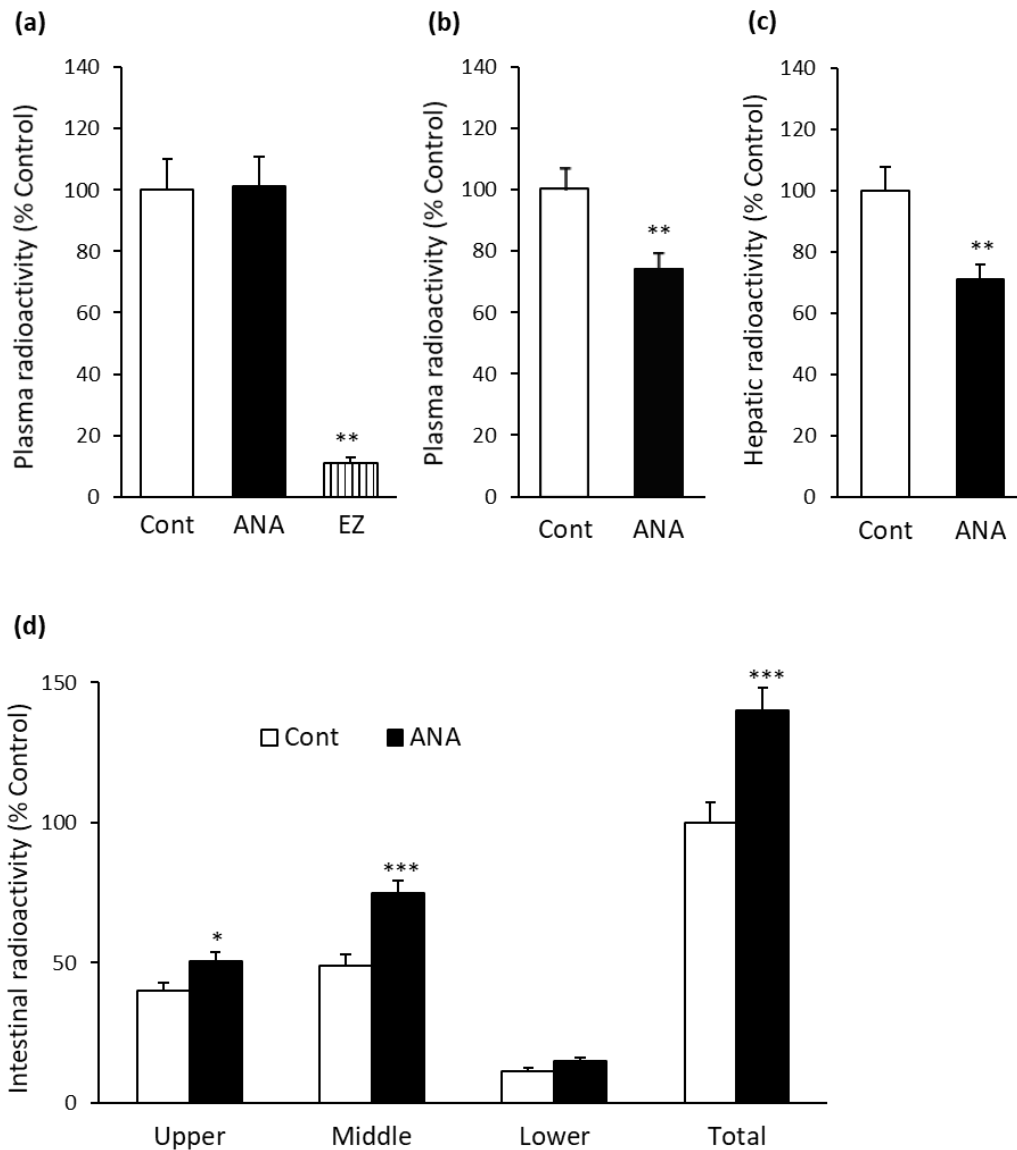
Data represent the mean±SEM for 12 animals. \*:  $p < 0.05$  vs. control. CM: chylomicron, VLDL: very-low density lipoprotein, LDL: low density lipoprotein, HDL: high density lipoprotein.

### 3.2 $^{14}\text{C}$ -コレステロール経口負荷後のコレステロール輸送に及ぼす影響

B6.SHL マウスにアナグリプチンを 4 週間投与した後に、 $^{14}\text{C}$  標識コレステロール( $^{14}\text{C}$ -Chol)を経口負荷した。負荷 2 時間後に採血ならびに肝臓および小腸を摘出し、それぞれの放射活性を測定した。なお、アナグリプチンのコレステロール輸送に対する直接作用の有無と、コレステロール輸送評価系の妥当性を確認するために、アナグリプチンおよび Niemann-Pick C1-like 1 (NPC1L1) 阻害薬エゼチミブをいずれも 10 mg/kg で単回経口投与し、上述同様に  $^{14}\text{C}$ -Chol 負荷した際の血漿への  $^{14}\text{C}$ -Chol 吸収についても検討した。それらの成績を Fig. 14 に示した。

アナグリプチンの単回投与後の血漿中放射活性は対照群と差はなかった。一方、エゼチミブはこれを顕著に抑制したので、アナグリプチン単回経口投与は、小腸から血中への<sup>14</sup>C-Chol輸送には影響しないと考えられた(Fig. 14a)。一方、アナグリプチン4週間反復投与後には、血漿および肝臓での放射活性は対照群に比較してそれぞれ26%および29%有意に低下した(Fig. 14b, c)。また、小腸における<sup>14</sup>C-Chol負荷2時間後の放射活性はそれぞれ26%および53%、全小腸で40%増加していた(Fig. 14d)。<sup>14</sup>C-Chol負荷72時間後の血漿および小腸の放射活性の結果をFig. 15aおよびFig. 15bに示したが、興味深いことに、血漿においては負荷2時間後の結果と同様に<sup>14</sup>C-Chol放射活性は低下していたものの、負荷72時間後の小腸での増加効果は消失していた。

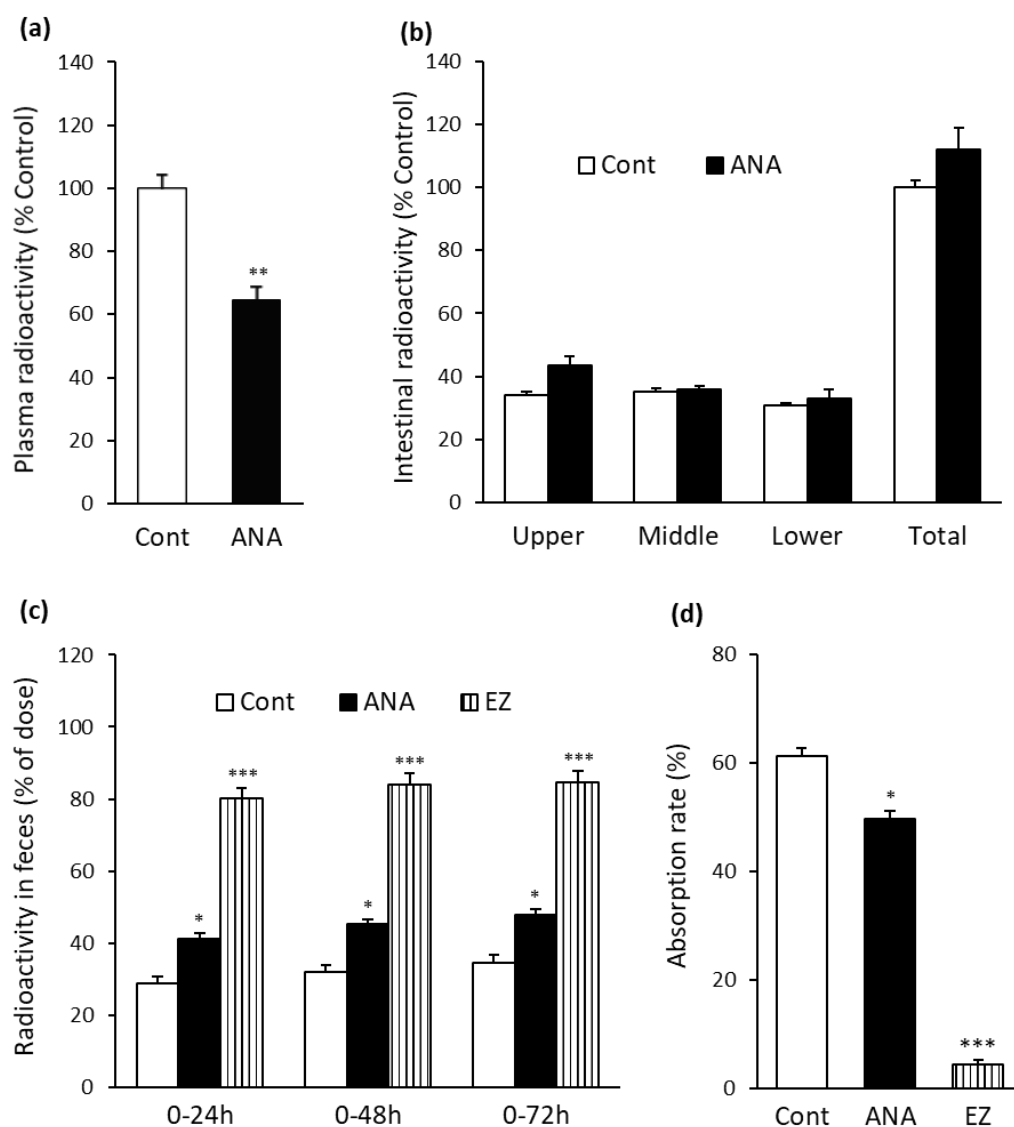
次に、小腸からのコレステロール吸収の評価を行う目的で、経口負荷した<sup>14</sup>C-Cholの糞中排泄について検討した。コレステロールの糞中排泄量は、<sup>14</sup>C-Chol経口負荷24、48および72時間後の糞中放射活性を測定し、投与した総放射活性に対する排泄率として算出した。対照群において、<sup>14</sup>C-Cholの糞中排泄は負荷後24時間でほとんど完了していた。一方、陽性対照として検討したエゼチミブの単回投与は、いずれの測定時間においても約2.5倍増加させた(Fig. 15c)。また、アナグリプチン4週間反復投与群においても各測定時間とも有意に増加していた(Fig. 15c)。また、排泄された糞中<sup>14</sup>C-Cholの放射活性から求めた見かけのコレステロール吸収率は、アナグリプチン投与群で19%低下していた(Fig. 15d)。



**Fig. 14** Effect of anagliptin treatment on cholesterol uptake at 2 hours after oral [ $^{14}\text{C}$ ]-Chol loading in ApoE-deficient mice

Plasma radioactivity of [ $^{14}\text{C}$ ]-Chol (a) after single-dose administration of anagliptin (ANA) or ezetimibe (EZ) and (b) in mice treated daily with ANA for 4 weeks. (c) Hepatic and (d) intestinal radioactivity during repeated ANA treatment for 4 weeks. Data represent the mean $\pm$ SEM for 16 animals. Cont: control. \*, \*\* and \*\*\*:  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$  and  $p < 0.001$  vs. control, respectively.



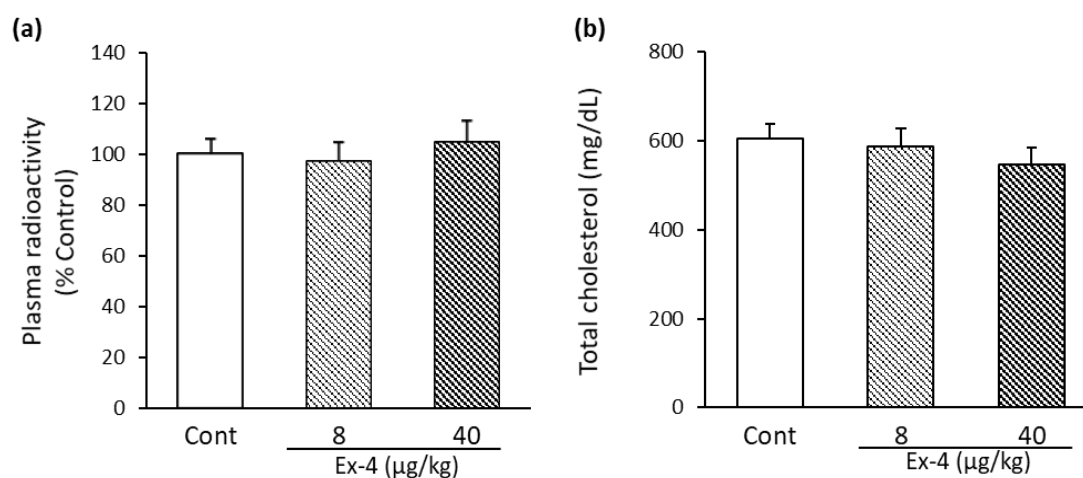


**Fig. 15 Effect of anagliptin treatment on the cholesterol uptake at 72 hours after oral [ $^{14}\text{C}$ ]-Chol loading in ApoE-deficient mice**

(a) Plasma and (b) intestinal radioactivity of [ $^{14}\text{C}$ ]-Chol at 72 hours after oral radiolabeled cholesterol loading in mice treated daily with anagliptin (ANA) for 4 weeks. (c) Fecal excretion and (d) estimated absorption rate of radiolabeled cholesterol after repeated treatment with ANA for 4 weeks. Data represent the mean  $\pm$  SEM for 5 animals. Cont: control, EZ: ezetimibe. \*, \*\* and \*\*\*:  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$  and  $p < 0.001$  vs. control, respectively.

### 3.3 コレステロール輸送に及ぼす GLP-1 受容体作動薬の影響

DPP-4 はセリンプロテアーゼの一種であり、種々のペプチドやタンパク質がその基質になる(Mentlein, 1999)。DPP-4 阻害薬は DPP-4 の基質の一つである GLP-1 の分解抑制を介して血糖低下作用を発揮するので(Drucker, *et al.*, 2006), コレステロール代謝にも GLP-1 が寄与する可能性がある。そこで、コレステロール輸送に及ぼす GLP-1 受容体作動薬 exendin-4 の影響について検討した。B6.SHL マウスに exendin-4 (8 または 40  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) を 1 日 2 回、4 週間にわたって反復皮下注射し、 $^{14}\text{C}$ -Chol 経口負荷後の血漿中放射活性を測定した。Exendin-4 の反復投与はいずれの用量においても  $^{14}\text{C}$ -Chol 経口負荷後の血漿中放射活性ならびに血清総コレステロール濃度に影響しなかった(Fig. 16)。

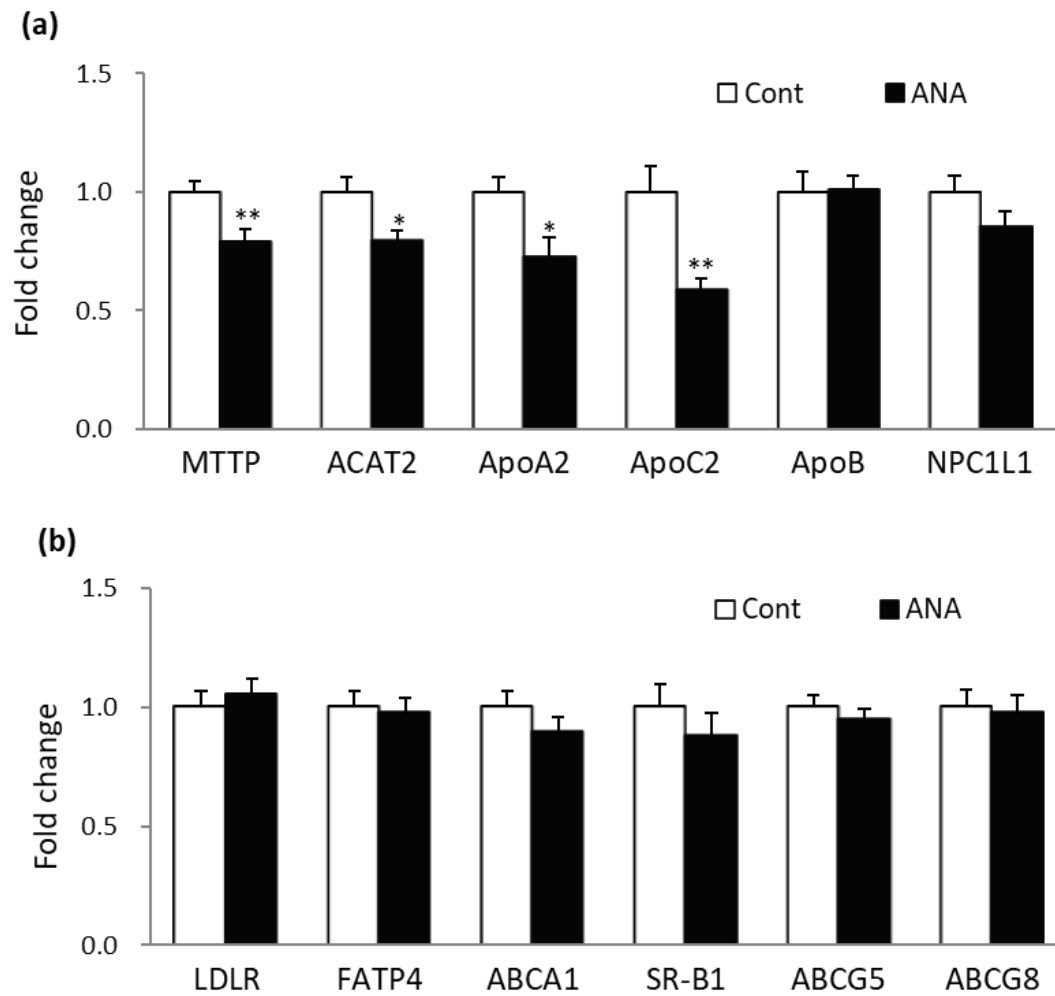


**Fig. 16 Effect of exendin-4 on the cholesterol uptake after oral [ $^{14}\text{C}$ ]-Chol loading in ApoE-deficient mice**

(a) Plasma radioactivity of [ $^{14}\text{C}$ ]-Chol at 2 hours after oral radiolabeled cholesterol loading, and (b) plasma total cholesterol concentration in mice treated twice daily with exendin-4 for 4 weeks. Data represent the mean $\pm$ SEM for 5 animals. Cont: control, Ex-4: exendin-4.

### 3.4 小腸におけるターゲット遺伝子発現解析

本実験には脂質異常を呈さない野生型 C57BL/6 マウスを用いた。0.3%アナグリプチンを5週間反復混餌投与した後に小腸を摘出し、脂質の輸送に関わる種々標的タンパク質の遺伝子発現に及ぼす影響を検討した(Fig. 17)。アナグリプチンはコレステロール輸送、特にリポタンパクの形成および分泌に関与する microsomal triglyceride transfer protein (MTTP), acyl-coenzyme A: cholesterol acyltransferases 2 (ACAT2), apolipoprotein A2 (ApoA2)および apolipoprotein C2 (ApoC2)の mRNA 発現を減少させた。一方, apolipoprotein B (ApoB), Niemann-Pick C1-like 1 protein (NPC1L1), scavenger receptor class B member 1 (SR-B1), および ATP binding cassette (ABC)トランスポーターの遺伝子発現には影響しなかった。

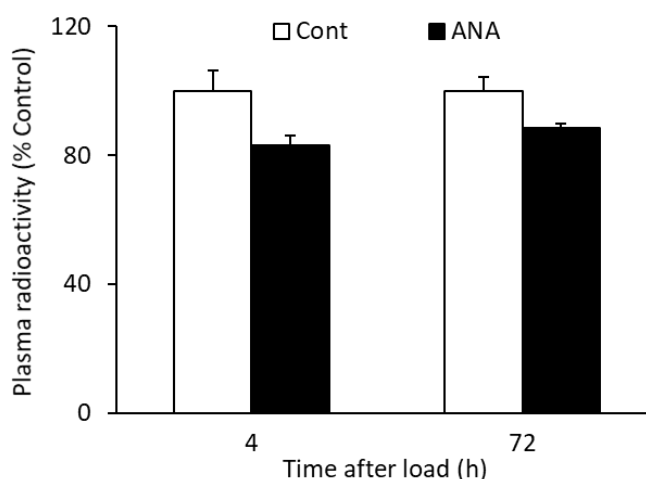


**Fig. 17 Target gene expressions in the small intestines of mice after repeated administration of anagliptin**

Expressions of (a) microsomal triglyceride transfer protein (MTTP), acyl-coenzyme A: cholesterol acyltransferase 2 (ACAT2), apolipoprotein (Apo)A2, C2 and B, and Niemann-Pick C1-like 1 protein (NPC1L1), (b) low-density lipoprotein receptor (LDLR), fatty acid transport protein 4 (FATP4), ATP-binding cassette subfamily A member 1 (ABCA1), scavenger receptor class B member 1 (SR-B1), ATP-binding cassette subfamily G member 5 (ABCG5) and 8 (ABCG8) were examined. Data represent the mean $\pm$ SEM for 8 animals. Cont: control, ANA: anagliptin. \* and \*\*:  $p < 0.05$  and  $p < 0.01$  vs. control, respectively.

### 3.5 DPP-4 欠損ラットのコレステロール輸送に及ぼすアナグリプチンの影響

GLP-1 受容体作動薬がアナグリプチンのコレステロール輸送抑制作用を再現できなかったため、アナグリプチンのコレステロール輸送抑制作用は GLP-1 を介した作用ではない可能性が示唆された。そこで、本作用が DPP-4 阻害に起因するか否かを明らかにするための検討を行った。F344/DuCr1Cr1j ラットは先天性に DPP-4 活性を欠損していることが知られているので(Watanabe, *et al.*, 1987; Natorio *et al.*, 1989), 本ラットを用いて  $^{14}\text{C}$ -Chol の輸送に及ぼすアナグリプチンの影響の有無を検討した。結果を Fig. 18 に示した。DPP-4 欠損動物において、アナグリプチンは  $^{14}\text{C}$ -Chol 経口負荷 4 時間後、72 時間後のいずれにおいても、血漿の  $^{14}\text{C}$ -Chol 由来放射活性に対して有意な低下作用を示さなかった。



**Fig. 18 Effect of anagliptin on cholesterol uptake after oral [ $^{14}\text{C}$ ]-Chol loading in the DPP-4 deficient rats**

Plasma radioactivity of [ $^{14}\text{C}$ ]-Chol at 4 and 72 hours after oral radiolabeled cholesterol loading in F344/DuCr1Cr1j rats treated daily with anagliptin (ANA) for 4 weeks. Data represent the mean $\pm$ SEM for 8 animals. Cont: control.

#### 第 4 節 考察および小括

本研究では DPP-4 阻害によるコレステロール低下機序について、特に消化管におけるコレステロール代謝に着目し、日本産野生由来マウスの近交系化によって作出され、正常マウスに比べ著明な高コレステロール値を呈する自然発症高脂血症モデル動物 ApoE 欠損マウス(Matsushima, *et al.*, 2001)を主に用いて検討した。脂質代謝はグルコース代謝と密接に関連しており、また、DPP-4 阻害薬はグルコース依存的な血糖低下作用を示すので、本研究では血糖値変動の影響を除外するために非糖尿病動物を使用した。アナグリプチンは ApoE 欠損マウスにおいて、血清総コレステロールならびに non-HDL コレステロール濃度を低下し、脂質低下に対する第 1 章の結果および以前の臨床研究の結果が再現された(加来, 2012; Kakuda, *et al.*, 2015; Kurozumi, *et al.*, 2017; Aoki, *et al.*, 2015)。リポタンパク解析の結果、コレステロール濃度の低下は主としてカイロミクロン画分および VLDL 画分に認められることが明らかとなった。本所見も第 1 章の結果と一致し、小腸からのリポタンパク吸収に対するアナグリプチンの作用を強く示唆する結果と考えられた。

ApoE 欠損自然発症高コレステロール血症マウスにおける  $^{14}\text{C}$ -Chol 経口負荷後のコレステロール動態に及ぼすアナグリプチン反復投与の影響について検討した。その結果、アナグリプチンは血漿ならびに肝臓組織内  $^{14}\text{C}$ -Chol レベルの低下、小腸組織での増加ならびに糞中への排泄増加をもたらし、見かけの  $^{14}\text{C}$ -Chol 吸収が低下していたので、小腸から血液へのコレステロール輸送の遅延が示唆された。アナグリプチンの単回投与では上記の作用は認められず、アナグリプチン反復投与群の小腸組織では  $^{14}\text{C}$ -Chol 放射活性が一過性に増加していたので、アナグリプチンの反復投与がコレステロールの小腸管腔から小腸上皮細胞内への取込みを抑制するよりはむしろ、小腸上皮内取込み後のリンパ

を介した輸送を制御している可能性が考えられた。また、DPP-4 欠損ラットおよび GLP-1 受容体アゴニストを用いた検討の結果、上述のアナグリプチンの作用が DPP-4 依存性およびインクレチン非依存性であると考えられた。なお、GLP-1 がカイロミクロンの産生を抑制し、リンパの輸送を抑制するなど、脂質輸送に影響することが明らかにされている(Qin, *et al.*, 2005; Hsieh, *et al.*, 2010)。腸管リンパカニューレーション動物を用いた検討では、GLP-1 受容体作動薬はコレステロール吸収に影響することなく、リンパ輸送の抑制やトリグリセリド吸収およびアポタンパク質(ApoB および ApoA4)産生を抑制することが示されている(Qin, *et al.*, 2005)。GLP-1 受容体作動薬である exendin-4 および DPP-4 阻害剤、シタグリプチンが、トリグリセド-リッチリポタンパクの消化管での産生/分泌低下を介して食後高トリグリセリド血症を抑制すること、GLP-1 受容体拮抗薬 exendin(9-39)あるいは GLP-1 受容体のノックアウトによって GLP-1 受容体シグナル伝達を遮断すると、消化管での ApoB-48 分泌が増加することが示されている(Hsieh, *et al.*, 2010)。すなわち、DPP-4 の阻害は一部、GLP-1 受容体シグナル伝達を介して食後のトリグリセリド吸収を抑制する。しかしながら、コレステロール輸送は必ずしもトリグリセリド輸送と並行するわけではない。十二指腸内投与した放射性標識コレステロールのリンパ吸収に GLP-1 が影響しないとの報告もある(Qin, *et al.*, 2005)。筆者らの結果でも、GLP-1 受容体アゴニストである exendin-4 の 4 週間投与は <sup>14</sup>C-Chol 輸送に影響しなかった。さらに、コレステロール輸送に対するアナグリプチンの作用は DPP-4 の欠損によって解除された。以上のことから、DPP-4 の阻害は GLP-1 非依存的にコレステロール輸送を負の方向に制御すること、また、それは DPP-4 阻害薬に共通の作用であろうと考えられる。

DPP-4 阻害によるコレステロール輸送抑制機序を明らかにするため、マウス

小腸における標的遺伝子発現の定量 PCR 解析を行った。エゼチミブの標的である Niemann-Pick C1-like 1 protein (NPC1L1)は小腸上皮細胞上に発現し、小腸管腔から小腸上皮細胞への食物性コレステロールの取り込みを調節するトランスポーターである(Altmann, *et al.*, 2004; Garcia-Calvo, *et al.*, 2005)が、NPC1L1 の mRNA 発現に対してアナグリプチンは影響しなかった。この結果は小腸組織中の  $^{14}\text{C}$ -Chol 由来放射活性の減少を伴うことなく、見かけの  $^{14}\text{C}$ -Chol 吸収率が抑制された知見と一致する。一方、microsomal triglyceride transfer protein (MTTP), acyl-coenzyme A: cholesterol acyltransferase 2 (ACAT2), apolipoprotein A2 (ApoA2)および apolipoprotein C2 (ApoC2)の mRNA 発現は、アナグリプチンの反復投与によって減少した。これらの mRNA によって翻訳されるタンパク質は、コレステロールの輸送および代謝の過程でリポタンパクの形成および小腸粘膜からリンパへの分泌において役割を果たすことが知られている(Wetterau, *et al.*, 1992; Chang, *et al.*, 1997; Rudel, *et al.*, 2001; Goldberg, *et al.*, 1990)。MTTP は小腸上皮においてトリグリセリド、コレステリルエステルおよびホスファチジルコリンの輸送を促進するため、リポタンパクの形成に寄与する(Wetterau, *et al.*, 1992)。ACAT2 は長鎖脂肪アシル CoA およびコレステロールから細胞内コレステロールエステルを産生する酵素の一つであり、コレステロールエステルの形成およびリポタンパクの分泌に関与することが知られている(Chang, *et al.*, 1997; Rudel, *et al.*, 2001)。ApoC2 は ApoC-II タンパク質をコードする遺伝子で、ApoC-II はトリグリセリドの加水分解酵素、lipoprotein lipase (LPL)を活性化する(Goldberg, *et al.*, 1990)。すなわち、DPP-4 阻害によってコレステロール輸送に関わる種々のタンパク質発現が抑制される結果、リポタンパクの生成および分泌さらには LPL 活性が抑制され、リポタンパク代謝の抑制および腸管リンパへのコレステロー



ル輸送の遅延を惹起する可能性が考えられた。しかしながら、DPP-4の阻害が  
いかなる機序を介して腸管内の標的遺伝子発現に影響したのかについては不明  
であり、さらなる研究が必要である。

小括：DPP-4の阻害は小腸からのコレステロール輸送を抑制する結果、血清  
コレステロール濃度の低下を来す。その作用機序には、小腸組織でのコレス  
テロール輸送に関わるタンパク質の遺伝子発現に対して、GLP-1受容体シグナ  
ル非依存的な抑制が寄与する可能性が示唆された。

## 第 3 章 肝脂質代謝に及ぼす DPP-4 阻害薬アナグリプチンの影響

### 第 1 節 緒言

DPP-4 阻害薬には本来の血糖コントロール改善作用に加え、種々の糖尿病合併症に対する改善作用が報告されている (Kang, *et al.*, 2017; Kawanami, *et al.*, 2016; Avogaro, *et al.*, 2014)。また、DPP-4 阻害薬の脂質代謝に対する臨床的有益性が最近のメタ解析等で報告されている (Monami, *et al.*, 2012; Monami, *et al.*, 2012)。本邦での第 3 相臨床試験のプール解析を含む複数の臨床研究においても血漿総コレステロール、LDL コレステロールおよびトリグリセリド濃度の低下が認められている (加来, 2012, Kakuda, *et al.*, 2015, Nishio, *et al.*, 2015)。しかしながら、DPP-4 阻害薬が血中脂質低下作用を発揮する機序の詳細は不明のままである。本研究では、高脂血症動物モデルあるいは野生型マウスを用いて、肝脂質代謝に及ぼす DPP-4 阻害の影響についてアナグリプチンを用いて確認すると共に、その作用機序の解析を企図した。

### 第 2 節 実験材料および方法

#### 2.1. 使用動物

##### 2.1.1. LDL 受容体欠損マウス

5 週齢の雄性 LDL 受容体 (LDLR) 欠損マウス (B6.129S7-Ldlr<sup>tm1Her</sup>/J) マウスをジャクソン研究所 (Bar Harbor, ME, USA) から購入した。マウスは通常飼料 (CE-2, 日本クレア, 東京) を自由摂取させ、12 時間毎の明暗サイクル (7:00/19:00) 下で飼育した。6 週齢のマウスを 2 群に分け、1 群に 0.3% アナグリプチンを含む飼料を 4 週間与えた。他の 1 群は対照群として引き続き通常飼料を与えた。自由摂餌下、投与開始 2 週間後の夜間 (22:00-02:00) に採血した際の血漿中のアナグリプチン濃度はおよそ 600 ng/mL であり、約 80% の血漿

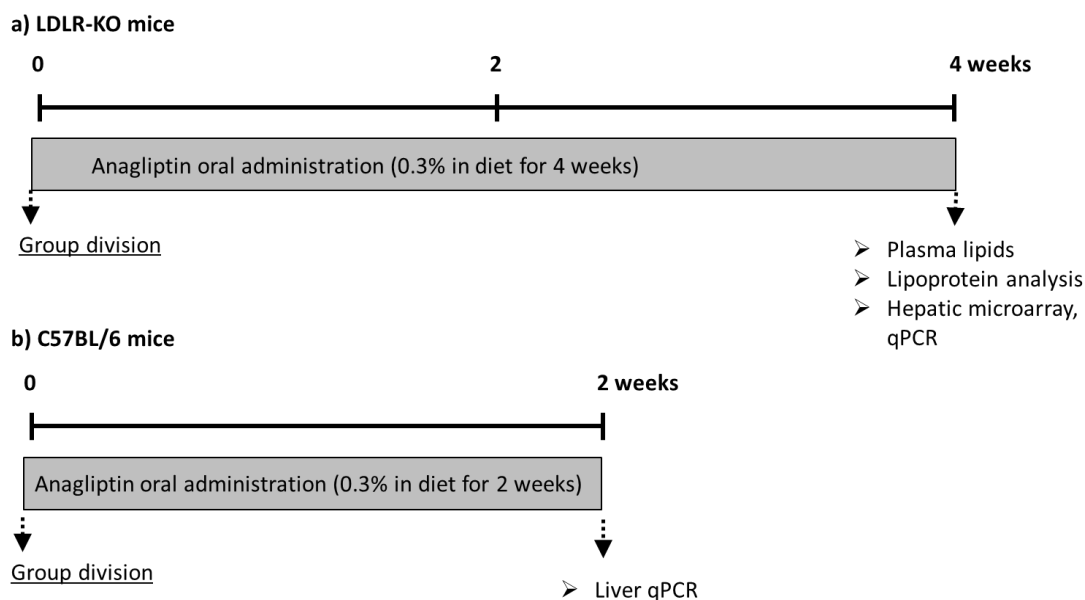
DPP-4 活性の抑制が認められた。なお、以降の研究はいずれも三和化学研究所の動物倫理委員会によって承認された後に実施した。

実験の概略を Fig. 19a に示した。

### 2.1.2. 正常(野生型)マウス

6 週齢の雄性 C57BL/6J マウスを日本チャールス・リバー(横浜)から購入した。マウスは通常飼料(CRF-1)を自由摂取させ、12 時間毎の明暗サイクル(7:00/19:00)下で飼育した。8 週齢のマウスを 2 群に分け、1 群に 0.3% アナグリプチンを含む飼料を 2 週間与えた。他の 1 群は対照群として引き続き通常飼料を与えた。

実験の概略を Fig. 19b に示した。



**Fig. 19 Experimental protocols for the evaluation of hepatic lipid metabolism in hyperlipidemic mice**

## 2.2. 実験方法

### 2.2.1. 血漿コレステロールおよびトリグリセリド濃度の測定

LDLR 欠損マウスより採取した血漿サンプルのグルコース，総コレステロールおよびトリグリセリドの各濃度は，いずれも市販試薬(和光純薬，大阪)を用いて測定した。リポタンパク脂質プロファイルは，既報(Yoshinaka, *et al.*, 2010)に従い，HPLC (LC-20A, 島津，京都)により分析した。すなわち，血漿試料を 1 mM EDTA を含有する PBS で希釈した後にゲル濾過カラム(Superose 6, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK)を用いて分離し，オンラインで脂質濃度測定試薬と反応させた反応生成物を 600 nm の吸光度で検出し，各リポタンパク画分中の脂質濃度を求めた。

### 2.2.2. DNA マイクロアレイおよびリアルタイム定量 PCR による遺伝子発現解析

組織サンプルから total RNA を抽出し，DNA マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析を行った。アレイは Mouse GE 4x44K v2 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)を用い， GeneSpring 13.0 (Agilent Technologies)を用いてパスウェイ解析を行った。なお，解析には 1.2 倍以上の発現変動を示した遺伝子を選択し，パスウェイ解析に供した。リアルタイム定量 PCR は ABI 7900HT Fast Real Time PCR System (Thermo Fisher Scientific)を用いて行った。なお，用いたプライマーおよびプローブは sterol regulatory element binding protein-1c (SREBP-1c)を除き，Applied Biosystems から購入した (Table 4)。SREBP-1c は以下の配列情報を元に委託合成した。forward: ATCGGCGCGGAAGCTGTCGGGGTA GCGTC, reverse: TGAGCTGGAGCA TGTCTTCAA, probe: FAM-ACCACGGAGCCATGGATTGCACATT-TAMRA

(Awazawa, *et al.*, 2009)。

**Table 4 TaqMan primers and probes for qPCR analysis**

Name	Assay ID	Name	Assay ID
SREBP2	Mm01306292_m1	ACAT2	Mm00448823_m1
ACAT	Mm00507463_m1	ACCA	Mm01304257_m1
MVK	Mm01197068_m1	ACADM	Mm00431611_m1
FDFT1	Mm00815354_s1	CPT1	Mm00550438_m1

SREBP2: sterol regulatory element binding protein 2, ACAT: acetyl-CoA acetyltransferase, MVK: mevalonate kinase, FDFT1: farnesyl-diphosphate farnesyltransferase 1, ACAT2: acyl-coenzyme A: cholesterol acyltransferase 2, ACCA: acetyl-CoA carboxylase alpha, ACADM: acyl-CoA dehydrogenase medium chain, CPT1: carnitine palmitoyltransferase 1

### 2.2.3. プラスミドの構築

タンデム配列の sterol responsive element (3×SRE) オリゴ DNA を以下の通り合成した。sense: CCGCTCGAGAAAATCACCCCACTGCAAAAATCACCCCACTGCAAAAATCACCCCACTGCAAACCTCCTCCCCCTGCGAT; antisense: ATCGCAGGGGGAGGAGTTTGCAGTGGGGTGATTTTGCAGTGGGGTGATTTTGCAGTGGGGTGATTTTCTCGAGCGG (Sanchez, *et al.*, 1995)。それら 1 本鎖 DNA オリゴをアニーリングし, pGL4.28 ルシフェラーゼベクター (Promega, Madison, WI, USA) の *EcoRV* サイトおよび *Xho I* サイトに挿入してプラスミドを構築した (SRE-Luc)。

#### 2.2.4. SREBP 転写活性化アッセイ

HepG2 細胞は American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA)から入手した。HepG2 細胞を 96 ウェルプレートで 1 ウェルあたり  $1 \times 10^4$  個の密度で播種・培養した。翌日, 細胞に X-treamGENE HP reagent (Roche, Mannheim, Germany)を用いて, SRE-Luc を保有するプラスミドならびにコントロールベクターとして pRL-SV40 (Promega)を細胞内導入した。24 時間後に 5% リポタンパク質除去血清(LPDS)を含む新鮮な培地に交換し, 種々濃度のアナグリプチンを添加して 24 時間培養した。反応終了後に細胞を溶解し, Dual-Glo ルシフェラーゼアッセイシステム(Promega)を用いて転写活性化を評価した。

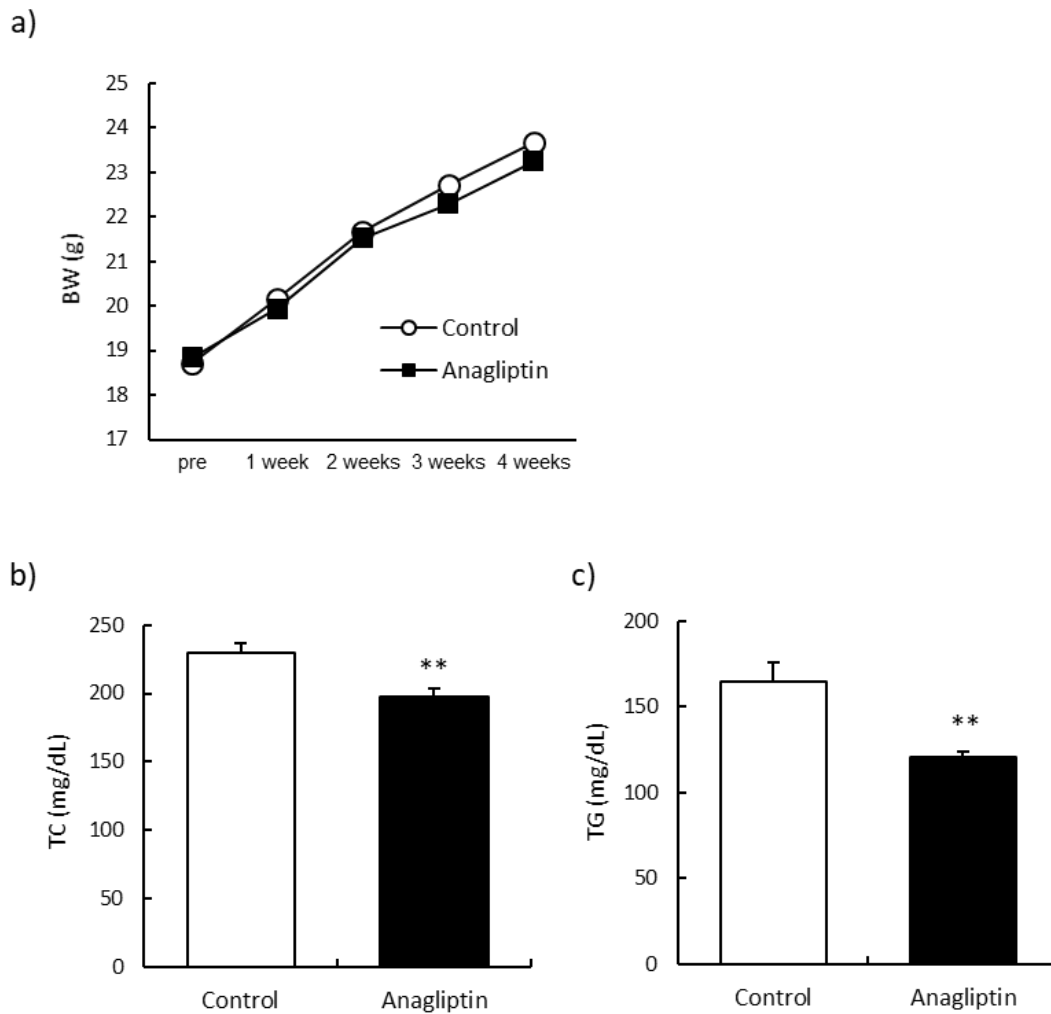
#### 2.3. 統計解析

全ての値は平均値±標準誤差で表記した。統計解析は, 2 群間の比較においては分散性の確認を行った後に Student の *t* 検定を, 3 群以上の比較においては, Dunnett の検定をそれぞれ行い, 検定での有意水準は 5%未満とした。統計解析はいずれも EXSUS ver7.0.0 (CAC EXICARE Corporation, 東京)を用いた。

### 第 3 節 結果

#### 3.1. LDLR 欠損マウス脂質プロファイルに及ぼすアナグリプチンの影響

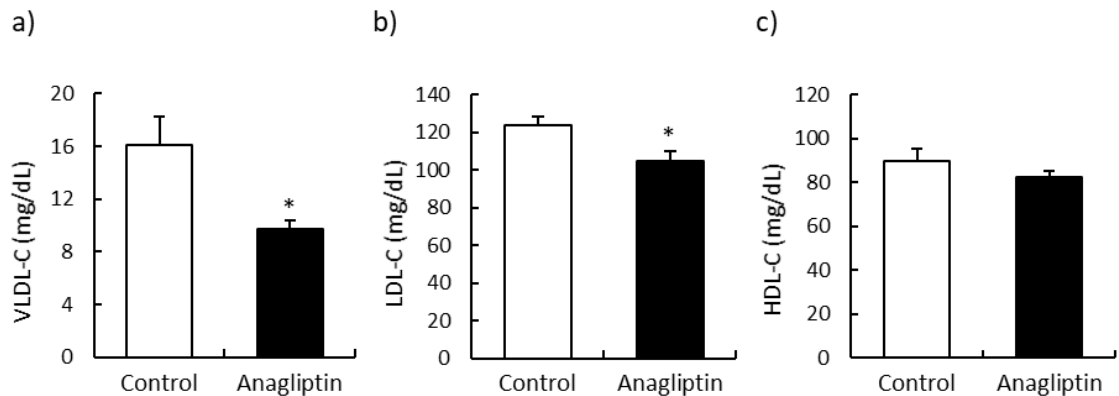
結果を Fig. 20 および Fig. 21 に示した。アナグリプチンを投与しても LDLR 欠損マウスの体重増加は対照群と差はなかった(Fig. 20a)。一方, 血漿総コレステロールならびにトリグリセリドレベルはいずれもアナグリプチン群において有意に低下していた(Fig. 20b, c)。また, HPLC 分析によるリポタンパク解析の結果, VLDL 画分および LDL 画分のコレステロール濃度がアナグリプチン群において有意に減少していたが, HDL コレステロール濃度は低下傾向を示すに過ぎなかった(Fig. 21)。



**Fig. 20 Lipid-lowering effects of anagliptin in the LDLR-deficient mice**

(a) Body weight (BW), (b) plasma concentrations of total cholesterol and (c) triglyceride 4 weeks after treatment with anagliptin. TC: total cholesterol, TG: triglyceride. Data represent the mean $\pm$ SEM (n=10). \*\*:  $p < 0.01$  vs. Control.





**Fig. 21 Plasma lipid profiling by high-performance liquid chromatography in LDLR-deficient mice treated with anagliptin**

a) Plasma very low-density lipoprotein cholesterol (VLDL-C), b) low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C), and c) high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) concentrations 4 weeks after anagliptin treatment (n=10, mean±SEM). \*:  $p < 0.05$  vs. Control.

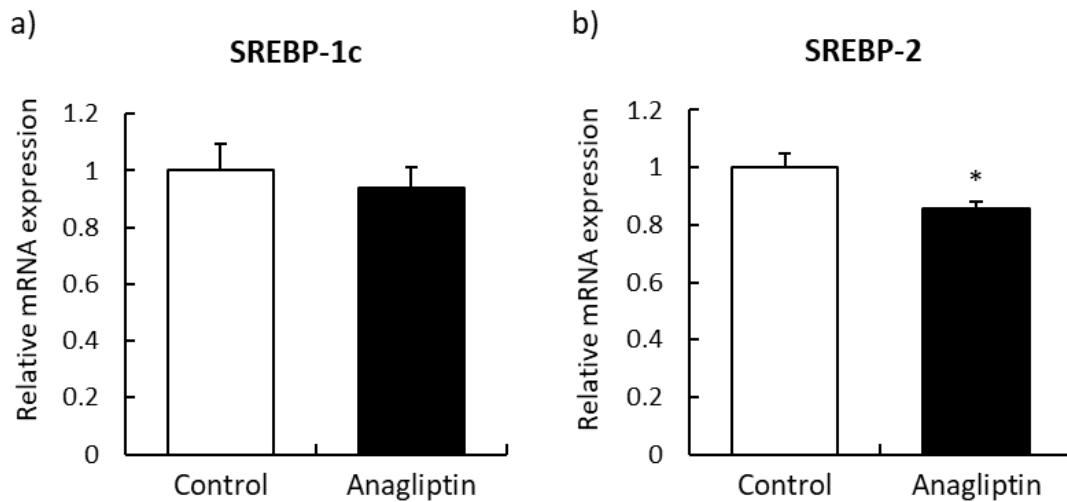
### 3.2. 肝臓における脂質代謝関連遺伝子の発現に及ぼす影響

アナグリプチンの脂質低下作用機序を明らかにする目的で、LDLR欠損マウス肝臓を用いてDNAマイクロアレイとパスウェイ解析を行い、その結果をTable 5に示した。アナグリプチン投与群では、脂質代謝における核内受容体、脂肪酸生合成、スタチン経路およびトリグリセリド合成に関わる遺伝子群に変動が認められた。そこで、脂質合成における重要な因子であるSREBP-1cおよびSREBP-2の遺伝子発現をリアルタイム定量PCRで検討した。その結果、SREBP-1cのmRNA発現レベルには有意な変化は見られないものの、活動期(夜間)のSREBP-2 mRNA発現がアナグリプチン投与群で有意に減少していた(Fig. 22)。

**Table 5 Pathways involved in lipid metabolism**

Pathway list	<i>p</i> -value
Mm_Nuclear_receptors_in_lipid_metabolism_and_toxicity_ WP431_47744	0.0089
Mm_Fatty_Acid_Biosynthesis_WP336_41307	0.0202
Mm_Statin_Pathway_WP1_41296	0.0384
Mm_Triglyceride_Synthesis_WP386_45646	0.0791

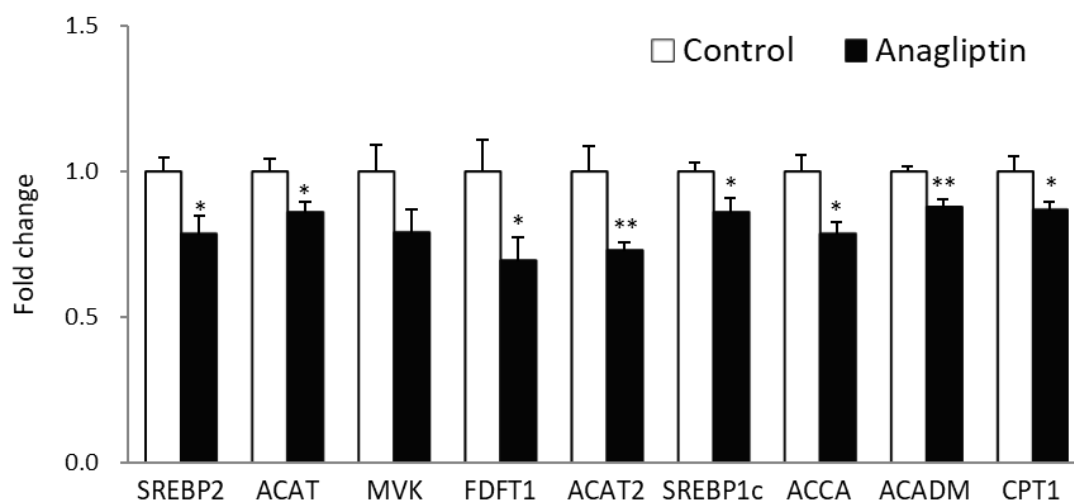
Liver samples from LDLR-deficient mice treated with anagliptin or untreated controls were subjected to DNA microarray analysis (n=4). Associated pathways with differentially expressed genes as determined by DNA microarray analysis are shown.



**Fig. 22 Hepatic gene expression in LDLR-deficient mice after anagliptin treatment**

Hepatic a) SREBP-1c and b) SREBP-2 expression levels at night. Data represent the mean $\pm$ SEM of 10 animals, \*:  $p < 0.05$  vs. control.

野生型マウスにおいても同様に検討し、その結果を Fig. 23 に示した。SREBP-2 のみならず、コレステロール合成に関わる因子 acetyl-coenzyme A acetyltransferase (ACAT), mevalonate kinase (MVK), farnesyl-diphosphate farnesyltransferase 1 (FDFT1), および acyl coenzyme A:cholesterol acyltransferase 2 (ACAT2)の mRNA 発現がアナグリプチン投与群において低下していた。また、トリグリセリド合成に関わる因子 SREBP1c, acetyl-CoA carboxylase  $\alpha$  (ACCA), acyl-coenzyme A dehydrogenase medium chain (ACADM), および carnitine palmitoyltransferase 1 (CPT1)の mRNA 発現の抑制も認められた。

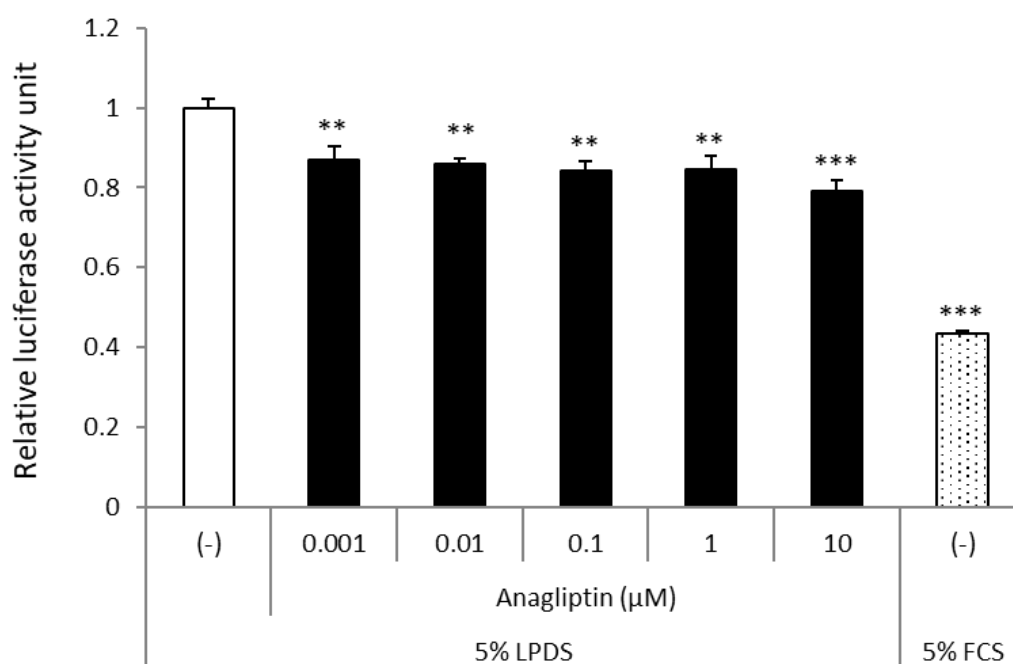


**Fig. 23 Target gene expressions in the liver of mice after repeated-dose administration of anagliptin in C57BL/6 mice**

Sterol regulatory element-binding protein 2 (SREBP2), acetyl-coenzyme A acetyltransferase (ACAT), mevalonate kinase (MVK), farnesyl-diphosphate farnesyltransferase 1 (FDFT1), acyl coenzyme A:cholesterol acyltransferase 2 (ACAT2), sterol regulatory element-binding protein 1c (SREBP1c), acetyl-CoA carboxylase  $\alpha$  (ACCA), acyl-coenzyme A dehydrogenase medium chain (ACADM) and carnitine palmitoyltransferase 1 (CPT1) were examined. Data represent the mean $\pm$ SEM for 8 animals. \* and \*\*:  $p < 0.05$  and  $p < 0.01$  vs. control, respectively.

### 3.3. HepG2 細胞の SREBP 活性に及ぼすアナグリプチンの影響

脂質代謝に対するアナグリプチンの直接作用の有無を検討する目的で、SRE-Luc を保有するプラスミドを細胞内導入した HepG2 細胞を用いて SREBP 転写活性試験を行った。HepG2 細胞の SREBP 活性は、アナグリプチン 24 時間処置で有意に抑制された(Fig. 24)。



**Fig. 24 SREBP transactivation assay *in vitro***

HepG2 cells transfected with luciferase vector with SRE were incubated with anagliptin at various concentrations (0.001–10 μM) in medium containing 5% lipoprotein-deficient serum (LPDS). FCS: fetal calf serum. Data represent the mean ± SEM of 4 determinations. \*\* and \*\*\*:  $p < 0.01$  and  $p < 0.001$  vs. untreated Control in 5% LPDS, respectively.

#### 第 4 節 考察および小括

本研究では DPP-4 の阻害によるコレステロール低下機序, 特に肝臓におけるコレステロール代謝に対する作用の詳細を明らかにする目的で, 自然発症高コレステロール血症モデル動物である LDLR 欠損マウスを用いて検討した。非糖尿病性自然発症高コレステロール血症マウスにおいて DPP-4 阻害薬, アナグリプチンは血漿総コレステロール, トリグリセリド, VLDL コレステロールおよび LDL コレステロール濃度を低下させ, 脂質低下に対する第 1 章, 第 2 章の結果ならびに臨床研究の結果の再現性が確認された(加来, 2012; Kakuda, *et al.*, 2015; Kurozumi, *et al.*, 2017; Aoki, *et al.*, 2015)。DPP-4 の阻害が, 脂質代謝異常に対して有効性を発揮する可能性については疑う余地はなさそうであるが, 機序の詳細については不明である。

第 2 章において, アナグリプチンによる DPP-4 の阻害が DPP-4 依存的・GLP-1 受容体非依存的に腸管からのコレステロール輸送を抑制することを明らかにし, 小腸でのコレステロール代謝への寄与を示唆した。一方, コレステロール代謝は, 小腸のみならず肝臓におけるコレステロール合成によっても調節されている。DPP-4 欠損マウスやラットにおいては, 肝トリグリセリド合成関連因子, SREBP-1c および脂肪酸合成酵素(fatty acid synthase, FAS)の発現が減弱していること(Conarello, *et al.*, 2003; Ben-Shlomo, *et al.*, 2011), DPP-4 阻害薬シタグリプチンアナログおよびビルダグリプチンが肥満動物マウスモデルにおける肝リポジェニック遺伝子の発現を抑制することが報告されている(Shirakawa, *et al.*, 2011; Flock, *et al.*, 2007)ので, 肝でのコレステロール合成に対しても DPP-4 阻害薬アナグリプチンが作用を発揮する可能性が高い。

そこで, LDLR 欠損マウスおよび野生型マウスの肝脂質代謝関連因子の遺伝子発現変動を検討した。LDLR 欠損マウスを用いた DNA マイクロアレイ解析

では、コレステロール合成、脂肪酸合成およびトリグリセリド合成に関わる遺伝子群に変動が認められ、リアルタイム定量 PCR の結果においても、SREBP-2 mRNA 発現が有意に減少していた。SREBP-2 は、肝でのコレステロール合成に重要な役割を担う核内転写因子であり (Horton, *et al.*, 1998), DPP-4 の阻害によるコレステロール低下機序の少なくとも一部に、SREBP-2 の遺伝子発現抑制による肝でのコレステロール合成抑制が関与する可能性が考えられた。同様の結果は、野生型マウスにおいても認められ、SREBP-2 を含むコレステロール合成の制御因子の遺伝子発現が有意に低下した。また、HepG2 を用いた *in vitro* 試験の結果、アナグリプチンは肝細胞に直接作用して、SREBP-2 の転写活性を抑制したことから、本作用はインクレチンなどの DPP-4 の基質を介さない直接作用である可能性が考えられた。さらに、Aoki ら (2015) は T2DM の高脂血症患者において、アナグリプチンの投与が肝でのコレステロール合成マーカーである血清ラソステロール濃度を低下させることを報告し、Kurozumi ら (2018) は肝での LDL リポタンパク産生のマーカーである血清 ApoB100 レベルがアナグリプチンの投与で減少することを明らかにした。以上のことから、臨床においてもアナグリプチンによる DPP-4 の阻害は肝でのコレステロール合成を直接抑制する可能性が示唆された。なお、臨床におけるアナグリプチンの LDL コレステロール低下作用は、hydroxymethylglutaryl-CoA (HMG-CoA) 還元酵素阻害薬であるスタチンとの併用の有無に関わらず認められたことから (加来, 2012), スタチンとは別の機序で作用を発揮している可能性が考えられるが、詳細についてはさらなる検討を要する。

LDLR 欠損マウスにおいて、血漿トリグリセリドレベルはアナグリプチンの投与で低下し、また、脂肪酸合成およびトリグリセリド合成に関わる遺伝子群が変動していたものの、SREBP-1c 発現のレベルには変化がなかった。一方、

野生型マウスにおいては、SREBP-1cのみならず、肝リポジェネシスに関与する因子の遺伝子発現が低下した。SREBP-1cは肝における脂肪酸合成およびトリグリセリド合成の主要な調節因子であるので(島野, 2001), DPP-4の阻害はSREBP-1cの調節を介してトリグリセリド合成の抑制に寄与する可能性が考えられた。肝リポジェネシスに関する作用はシタグリプチンおよびビルダグリプチンにおいても同様に認められている(Shirakawa, *et al.*, 2011; Flock, *et al.*, 2007)。しかしながら、機序の詳細について本研究では明らかにすることができなかった。最近、新規 DPP-4 阻害薬 MK-0626 が AMP-activated protein kinase (AMPK)のリン酸化の促進を介して、SREBP-1cなどの肝リポジェネシス関連因子の遺伝子発現を抑制することが報告された(Ohyama *et al.*, 2014)。示唆に富む報告であり、今後の研究標的としたい。

小括：DPP-4の阻害の結果、肝での脂質合成が抑制されるので血清コレステロール濃度およびトリグリセリド濃度が低下する。その作用機序として肝臓組織の脂質合成に関わる転写因子の遺伝子発現抑制が関与し、その抑制はインクレチンを介さない直接作用である可能性が示唆された。

## 総括および結論

Dipeptidyl peptidase-4 (DPP-4)の多面的役割, とくに動脈硬化発症・進展に関連する役割について, DPP-4 阻害薬アナグリプチンを用いて検討し, その結果を以下のように総括した。

- (1) 大動脈および冠状動脈アテローム性動脈硬化モデルにおける DPP-4 阻害作用の解析: アナグリプチンによる DPP-4 の阻害は高脂血症動脈硬化モデルウサギの大動脈ならびに冠状動脈におけるアテローム性動脈硬化の発症を抑制した。その作用は, インクレチンを含む基質の分解抑制あるいは直接的にマクロファージの浸潤を抑制し, TNF- $\alpha$  および IL-6 など炎症性サイトカインの産生を抑制した結果であることが示唆され, また, その作用の少なくとも一部に, DPP-4 阻害による血清コレステロールの低下が関与すると考えられた。
- (2) コレステロール代謝, とくに小腸でのコレステロール輸送における DPP-4 阻害作用の解析: 主として自然発症高脂血症 ApoE 欠損マウスを用いて検討した。アナグリプチンによる DPP-4 の阻害は小腸からのコレステロール輸送を抑制する結果, 血清コレステロール濃度を低下させた。その作用機序には, 小腸組織でのコレステロール輸送に関わるタンパク質の遺伝子発現に対して, GLP-1 受容体シグナル非依存的な抑制が関与することが示唆された。
- (3) 肝臓での脂質代謝, コレステロール合成および脂肪酸・トリグリセライド合成における DPP-4 阻害作用の解析: 主として LDL 受容体欠損マウスを用いて検討した。アナグリプチンによる DPP-4 阻害の結果, 肝での脂質合成が抑制されるので, 血漿コレステロールおよびトリグリセライド濃度が低下する。その作用機序として, 肝臓組織の脂質合成に関わる転写因子の



遺伝子発現抑制が関与し、その抑制はインクレチンを介さない直接作用である可能性が示唆された。

結論：DPP-4 は脂質代謝異常および動脈硬化形成に密接に関わっており、DPP-4 阻害薬アナグリプチンは脂質代謝異常を併発した心血管イベントリスクの高い 2 型糖尿病の治療に貢献することが期待される。

## 謝 辞

稿を終えるに臨み、本研究に際して、多大なる御指導と御鞭撻、また発表の機会を賜りました岐阜薬科大学機能分子学大講座薬理学研究室 稲垣直樹 教授に深甚なる謝意を表します。

本稿の作成過程において、懇切な御指導と御鞭撻を賜りました東京医科歯科大学 東 洋 名誉教授に深く感謝いたします。また、本稿の御高閲を賜りました岐阜薬科大学生命薬学大講座生化学研究室 五十里彰 教授、岐阜薬科大学医療薬剤学大講座薬物動態学研究室 北市清幸 教授、岐阜薬科大学医療薬剤学大講座臨床薬剤学研究室 原宏和 准教授に深謝いたします。岐阜薬科大学機能分子学大講座薬理学研究室 田中宏幸 准教授、山下弘高 講師には本稿の作成ならびに発表に関して御指導と御鞭撻を賜りました。深く感謝いたします。

動脈硬化の機能評価の遂行に際し、御助言および御指導を賜りました昭和大学医学部内科学講座 糖尿病・代謝・内分泌内科部門 平野勉 教授に深謝致します。また、脂質代謝機能の解析に際し、多大なる御指導を賜りました川崎医科大学 総合内科学 加来浩平 教授に深謝致します。

本研究の機会を頂き、終始御懇篤なる御指導および御指導を賜りました株式会社三和化学研究所 野田倫 取締役常務執行役員、城森孝仁 常務執行役員 研究開発本部副本部長、武田基宏 執行役員 研究開発本部副本部長、古田禎之 医薬研究所長、加藤憲明 博士、松本幸治 博士、中山幸晴 博士に深く感謝致します。さらに、実験に際して、温かい御協力と御助言を賜りました株式会社三和化学研究所の各位に心より御礼申し上げます。

## 引用文献

Action to Control Cardiovascular Risk in Diabetes Study Group, Gerstein HC, Miller ME, Byington RP, Goff DC Jr, Bigger JT, Buse JB, *et al.* Effects of intensive glucose lowering in type 2 diabetes. *N Engl J Med.* 2008; 358(24): 2545-59

ADVANCE Collaborative Group, Patel A, MacMahon S, Chalmers J, Neal B, Billot L, Woodward M, Marre M, *et al.* Intensive blood glucose control and vascular outcomes in patients with type 2 diabetes. *N Engl J Med.* 2008; 358(24): 2560-72.

Altmann SW, Davis HR Jr, Zhu LJ, *et al.* Niemann-Pick C1 Like 1 protein is critical for intestinal cholesterol absorption. *Science.* 2004; 303(5661): 1201-4.

Aoki K, Ijima T, Kamiyama H, *et al.* Anagliptin decreases serum lathosterol level in patients with type 2 diabetes: A pilot study. *Expert Opinion of Pharmacotherapy.* 2015; 16(12): 1749-54.

Arakawa M, Mita T, Azuma K, Ebato C, Goto H, Nomiya T, *et al.* Inhibition of monocyte adhesion to endothelial cells and attenuation of atherosclerotic lesion by a glucagon-like peptide-1 receptor agonist, exendin-4. *Diabetes.* 2010; 59: 1030-7.

Avogaro A. Cardiovascular effects of DPP-4 inhibition: beyond GLP-1. *Vascul Pharmacol.* 2011; 55: 10-6.

Avogaro A and Fadini GP. The effects of dipeptidyl peptidase-4 inhibition on microvascular diabetes complications. *Diabetes Care.* 2014; 37(10): 2884-94.

Awazawa M, Ueki K, Inabe K, *et al.* Adiponectin suppresses hepatic SREBP1c expression in an AdipoR1/LKB1/AMPK-dependent pathway. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009; 382: 51-6.

Ballantyne C, Arroll B and Shepherd J. Lipids and CVD management: towards a global consensus. *Eur Heart J.* 2005; 26(21): 2224-31.

Ben-Shlomo S, Zvibel I, Shnell M, *et al.* Glucagon-like peptide-1 reduces hepatic lipogenesis via activation of AMP-activated protein kinase. *J Hepatol.* 2011; 54: 1214-23.

Bocan TMA, Mueller SB, Mazur MJ, Uhlendorf PG, Brown EQ and Kieft KA. The relationship between the degree of dietary-induced hypercholesterolemia in the rabbit and the atherosclerotic lesion formation. *Atherosclerosis.* 1993; 102: 9-22.

Brenner C, Kränkel N, Kühnlenthal S, Israel L, Remm F, Fischer C, *et al.*

Short-term inhibition of DPP-4 enhances endothelial regeneration after acute arterial injury via enhanced recruitment of circulating progenitor cells. *Int J Cardiol.* 2014; 177: 266-75.

Chang TY, Chang CC and Cheng D. Acyl-coenzyme A: cholesterol acyltransferase. *Annu Rev Biochem.* 1997; 66: 613-38.

Conarello SL, Li Z, Ronan J, *et al.* Mice lacking dipeptidyl peptidase IV are protected against obesity and insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003; 100: 6825-30.

Drucker DJ and Nauck MA. The incretin system: glucagon-like peptide-1 receptor agonists and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in type 2 diabetes. *Lancet.* 2006; 368(9548): 1696-705.

Du X, Edelstein D, Obici S, Higham N, Zou MH and Brownlee M. Insulin resistance reduces arterial prostacyclin synthase and eNOS activities by increasing endothelial fatty acid oxidation. *J Clin Invest.* 2006; 116(4): 1071-80.

Duckworth W, Abraira C, Moritz T, Reda D, Emanuele N, Reaven PD, *et al.*; VADT Investigators. Glucose control and vascular complications in veterans with type 2 diabetes. *N Engl J Med.* 2009; 360(2): 129-39.

Duff GL. Experimental cholesterol arteriosclerosis and its relationship to human atherosclerosis. *Arch Pathol.* 1935; 20: 81-123.

Ervinna N, Mita T, Yasunari E, Azuma K, Tanaka R, Fujimura S, *et al.* Anagliptin, a DPP-4 inhibitor, suppresses proliferation of vascular smooth muscles and monocyte inflammatory reaction and attenuates atherosclerosis in male apo E-deficient mice. *Endocrinology.* 2013; 154: 1260-70.

Flock G, Baggio LL, Longuet C, *et al.* Incretin receptors for glucagon-like peptide 1 and glucose-dependent insulintropic polypeptide are essential for the sustained metabolic actions of vildagliptin in mice. *Diabetes.* 2007; 56: 3006-13.

Garcia-Calvo M, Lisnock J, Bull HG, Hawes BE, Burnett DA, Braun MP, *et al.* The target of ezetimibe is Niemann-Pick C1-Like 1 (NPC1L1). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005; 102(23): 8132-7.

Gaspari T, Welungoda I, Widdop RE, Simpson RW and Dear AE. The GLP-1 receptor agonist liraglutide inhibits progression of vascular disease via effects on atherogenesis, plaque stability and endothelial function in an ApoE(-/-) mouse model. *Diab Vasc Dis Res.* 2013; 10: 353-60.

Geraldes P and King GL. Activation of protein kinase C isoforms and its

impact on diabetic complications. *Circulation Research*. 2010; 106(8): 1319-31.

Giorgino F, Leonardini A, Natalicchio A, *et al*. Multifactorial intervention in Type 2 diabetes: the promise of incretin-based therapies. *J Endocrinol Invest*. 2011; 34(1): 69-77.

Goldberg IJ, Scheraldi CA, Yacoub LK, *et al*. Lipoprotein ApoC-II activation of lipoprotein lipase. Modulation by apolipoprotein A-IV. *J Biol Chem*. 1990; 265(8): 4266-72.

Haffner SM, Lehto S, Rönnemaa T, Pyörälä K and Laakso M. Mortality from coronary heart disease in subjects with type 2 diabetes and in nondiabetic subjects with and without prior myocardial infarction. *N Engl J Med*. 1998; 339: 229-34.

Hayward RA, Reaven PD, Wiitala WL, Bahn GD, Reda DJ, Ge L, *et al*;; VADT Investigators. Follow-up of glycemic control and cardiovascular outcomes in type 2 diabetes. *N Engl J Med*. 2015; 372(23): 2197-20.

平成 28 年国民健康・栄養調査. 厚生労働省健康局. 2017

Hirano T and Mori Y. Anti-atherogenic and anti-inflammatory properties of glucagon-like peptide-1, glucose-dependent insulinotropic polypeptide, and

dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in experimental animals. *J Diabetes Investig.* 2016; Suppl 1: 80-6.

Holman RR, Paul SK, Bethel MA, Neil HA and Matthews DR. Long-term follow-up after tight control of blood pressure in type 2 diabetes. *N Engl J Med.* 2008; 359(15): 1565-76.

Holvoet P and Collen D. Beta-VLDL hypercholesterolemia relative to LDL hypercholesterolemia is associated with higher levels of oxidized lipoproteins and a more rapid progression of coronary atherosclerosis in rabbits. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997; 17: 2376-82.

Honda A, Yamashita K, Miyazaki H, Shirai M, Ikegami T, Xu G, *et al.* Highly sensitive analysis of sterol profiles in human serum by LC-ESI-MS/MS. *J Lipid Res.* 2008; 49: 2063-73.

Horton JD, Shimomura I, Brown MS, Hammer RE, Goldstein JL and Shimano H. Activation of cholesterol synthesis in preference to fatty acid synthesis in liver and adipose tissue of transgenic mice overproducing sterol regulatory element-binding protein-2. *J Clin Invest.* 1998; 101(11): 2331-9.

Howles PN, Carter CP and Hui DY. Dietary free and esterified cholesterol absorption in cholesterol esterase (bile salt-stimulated lipase)



gene-targeted mice. *J Biol Chem*. 1996; 271(12): 7196-202.

Hsieh J, Longuet C, Baker CL, *et al*. The glucagon-like peptide 1 receptor is essential for postprandial lipoprotein synthesis and secretion in hamsters and mice. *Diabetologia*. 2010; 53(3): 552-61.

Huang D, Refaat M, Mohammedi K, Jayyousi A, Suwaidi JA and Khalil CA. Macrovascular complications in patients with diabetes and prediabetes. *BioMed Research International*. 2017, Article ID 7839101, 9 pages.

IDF Diabetes Atlas 8th edition, International Diabetes Federation, 2017.

Ikeda T, Kumagai E, Iwata S and Yamakawa A. Soluble CD26/dipeptidyl peptidase IV enhances the transcription of IL-6 and TNF- $\alpha$  in THP-1 cells and monocytes. *PLoS One*. 2013; 8: e66520.

株式会社三和化学研究所. スイニー錠 100mg インタビューフォーム. 9 (2018)

加来浩平. 日本人 2 型糖尿病患者に対する Anagliptin の血清脂質に及ぼす影響—Anagliptin 長期投与試験に関する併合解析—. 薬理と治療. 2012; 40(9): 771-84.

Kakuda H, Kobayashi J, Kakuda M, *et al*. The effect of anagliptin treatment on glucose metabolism and lipid metabolism, and oxidative stress in fasting

and postprandial states using a test meal in Japanese men with type 2 diabetes. *Endocrine*. 2015; 48: 1005-9.

Kang YM and Jung CH. Effects of incretin-based therapies on diabetic microvascular complications. *Endocrinol Metab*. 2017; 32(3): 316-25.

Kawanami D, Matoba K, Sango K and Utsunomiya K. Incretin-based therapies for diabetic complications: Basic mechanisms and clinical evidence. *Int J Mol Sci*. 2016; 17(8): E1223.

Kurozumi A, Okada Y, Arao T, *et al*. Comparison of effects of anagliptin and alogliptin on serum lipid profile in type 2 diabetes mellitus patients. *J Diabetes Investig*. 2018; 9(2): 360-5.

Kutoh E and Ukai Y. Alogliptin as an initial therapy in patients with newly diagnosed, drug naïve type 2 diabetes: A randomized, control trial. *Endocrine*. 2012; 41(3): 435-41.

Lambeir AM, Durinx C, Scharpé S and De Meester I. Dipeptidyl-peptidase IV from bench to bedside: an update on structural properties, functions, and clinical aspects of the enzyme DPP IV. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2003; 40(3): 209-94.

Lamers D, Famulla S, Wronkowitz N, Hartwig S, Lehr S, Ouwens DM, *et al*.

Dipeptidyl peptidase 4 is a novel adipokine potentially linking obesity to the metabolic syndrome. *Diabetes*. 2011; 60: 1917-25.

Masuda H, Goto M, Tamaoki S and Azuma H. Accelerated intimal hyperplasia and increased endogenous inhibitors for NO synthesis in rabbits with alloxan-induced hyperglycaemia. *Br J Pharmacol*. 1999; 126(1): 211-8.

Matsubara J, Sugiyama S, Koichi S, Taishi N, Yukio F, Eiichi A, *et al*. A dipeptidyl peptidase-4 inhibitor, des-fluoro-sitagliptin, improves endothelial function and reduces atherosclerotic lesion formation in apolipoprotein e-deficient mice. *J Am Coll Cardiol*. 2012; 59: 265-76.

Matsushima Y, Sakurai T, Ohoka A, Ohnuki T, Tada N, Asoh Y, Tachibana M. Four strains of spontaneously hyperlipidemic (SHL) mice: phenotypic distinctions determined by genetic backgrounds. *J Atheroscler Thromb*. 2001; 8(3): 71-9.

Matsuyama T, Komatsu R, Namba M, *et al*. Glucagon-like peptide-1 (7-36 amide): a potent glucagonostatic and insulinotropic hormone. *Diabetes Res Clin Pract*. 1988; 5(4): 281-4.

Mentlein R. Dipeptidyl-peptidase IV (CD26)-role in the inactivation of regulatory peptides. *Regul Pept*. 1999; 85(1): 9-24.

三田智也, 綿田裕孝. DPP-4 阻害薬, 最近の話題 5. 血糖以外の多面的作用.  
糖尿病 2013 ; 56(10) : 741-3.

Miyachi A, Murase T, Yamada Y, Osonoi T and Harada K. Quantitative analytical method for determining the levels of gastric inhibitory polypeptides GIP1-42 and GIP3-42 in human plasma using LC-MS/MS/MS. *J Proteome Res.* 2013; 12(6): 2690-9.

Monami M, Lamanna C, Desideri CM *et al.* DPP-4 inhibitors and lipids: Systematic review and meta-analysis. *Advances in Therapy.* 2012; 29(1): 14-25.

Monami M, Vitale V, Ambrosio ML, *et al.* Effects on lipid profile of dipeptidyl peptidase 4 inhibitors, pioglitazone, acarbose, and sulfonylureas: Meta-analysis of placebo-controlled trials. *Advances in Therapy.* 2012; 29(9): 736-46.

Nader MA. Sitagliptin ameliorates lipid profile changes and endothelium dysfunction induced by atherogenic diet in rabbits. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2014; 387(5): 433-44.

Nagashima M, Watanabe T, Terasaki M, Tomoyasu M, Nohtomi K, Kim-Kaneyama J, *et al.* Native incretins prevent the development of

atherosclerotic lesions in apolipoprotein E knockout mice. *Diabetologia*. 2011; 54: 2649-59.

Nakaya K, Kubota N, Takamoto I, Kubota T, Katsuyama H, Sato H, *et al*. Dipeptidyl peptidase-4 inhibitor anagliptin ameliorates diabetes in mice with haploinsufficiency of glucokinase on a high-fat diet. *Metabolism*. 2013; 62: 939-51.

Nathan DM, Cleary PA, Backlund JY, Genuth SM, Lachin JM, Orchard TJ, *et al*. Diabetes control and complications trial/epidemiology of diabetes interventions and complications (DCCT/EDIC) study research group. Intensive diabetes treatment and cardiovascular disease in patients with type 1 diabetes. *N Engl J Med*. 2005; 353(25): 2643-53.

Natorio Y, Hayakawa I and Shibata S. Role of dipeptidyl peptidase IV (gp 108) in passive Heymann nephritis. Use of dipeptidyl peptidase IV-deficient rats. *Am J Pathol*. 1989; 134(2): 405-10.

Nauck MA, Bartels E, Orskov C, *et al*. Additive insulintropic effects of exogenous synthetic human gastric inhibitory polypeptide and glucagon-like peptide-1-(7-36) amide infused at near-physiological insulintropic hormone and glucose concentrations. *J Clin Endocrinol Metab*. 1993; 76(4): 912-7.

Nesto RW. Beyond low-density lipoprotein: addressing the atherogenic lipid triad in type 2 diabetes mellitus and the metabolic syndrome. *Am J Cardiovasc Drugs*. 2005; 5(6):379-87.

Niemeijer-Kanters SD, Banga JD and Erkelens DW. Lipid-lowering therapy in diabetes mellitus. *Neth J Med*. 2001; 58(5):214-22.

日本糖尿病学会. 糖尿病診療ガイドライン 2016, 南江堂, 2016.

日本糖尿病学会. 糖尿病治療ガイド 2018-2019, P.29, 文光堂, 2018.

Nishio S, Abe M and Ito H. Anagliptin in the treatment of type 2 diabetes: safety, efficacy, and patient acceptability. *Diabetes Metab Syndr Obes*. 2015; 8: 163-71.

Nogi Y, Nagashima M, Terasaki M, Nohtomi K, Watanabe T and Hirano T. Glucose-dependent insulinotropic polypeptide prevents the progression of macrophage-driven atherosclerosis in diabetic apolipoprotein E-null mice. *PLoS One*. 2012; 7: e35683.

Ohyama T, Sato K, Yamazaki Y, *et al*. MK-0626, a selective DPP-4 inhibitor, attenuates hepatic steatosis in ob/ob mice. *World J Gastroenterol*. 2014; 20: 16227-35.

Qin X, Shen H, Liu M, *et al.* GLP-1 reduces intestinal lymph flow, triglyceride absorption, and apolipoprotein production in rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2005; 288: G943-G949.

Rudel LL, Lee RG and Cockman TL. Acyl coenzyme A: cholesterol acyltransferase types 1 and 2: structure and function in atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol.* 2001; 12(2): 121-7.

Sanchez HB, Yieh L and Osborne TF. Cooperation by sterol regulatory element-binding protein and Sp1 in sterol regulation of low density lipoprotein receptor gene. *J Biol Chem.* 1995; 270: 1161-9.

Shah Z, Kampfrath T, Deiuliis JA, Zhong J, Pineda C, Ying Z, *et al.* Long-term dipeptidyl-peptidase 4 inhibition reduces atherosclerosis and inflammation via effects on monocyte recruitment and chemotaxis. *Circulation.* 2011; 124: 2338-49.

Shigematsu E, Yamakawa T, Kadonosono K, *et al.* Effect of sitagliptin on lipid profile in patients with type 2 diabetes mellitus. *J Clin Med Res.* 2014; 6(5): 327-35.

島野 仁. 生体内におけるステロール代謝の制御. 動脈硬化. 2001; 28(6): 133-6.

Shirakawa J, Fujii H, Ohnuma K, *et al.* Diet-induced adipose tissue

inflammation and liver steatosis are prevented by DPP-4 inhibition in diabetic mice. *Diabetes*. 2011; 60: 1246-57.

Staprāns I, Rapp JH, Pan XM, Hardman DA and Feingold KR. Oxidized lipids in the diet accelerate the development of fatty streaks in cholesterol-fed rabbits. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1996; 16: 533-8.

Ta NN, Schuyler CA, Li Y, Lopes-Virella MF and Huang Y. DPP-4 (CD26) inhibitor alogliptin inhibits atherosclerosis in diabetic apolipoprotein E-deficient mice. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2011; 58: 157-66.

Ta NN, Li Y, Schuyler CA, Lopes-Virella MF and Huang Y. DPP-4 (CD26) inhibitor alogliptin inhibits TLR4-mediated ERK activation and ERK-dependent MMP-1 expression by U937 histiocytes. *Atherosclerosis*. 2010; 213: 429-35.

Tanaka T, Kameoka J, Yaron A, Schlossman SF and Morimoto C. The costimulatory activity of the CD26 antigen requires dipeptidyl peptidase IV enzymatic activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993; 90(10): 4586-90.

Tanaka T, Higashijima Y, Wada T and Nangaku M. The potential for renoprotection with incretin-based drugs. *Kidney Int*. 2014; 86(4): 701-11.

Terasaki M, Nagashima M, Watanabe T, Nohtomi K and Hirano T. Effects of



PKF275-055, a dipeptidyl peptidase-4 inhibitor, on the development of atherosclerotic lesions in apolipoprotein E-null mice. *Metab Clin Exp.* 2012; 61: 974-9.

Terasaki M, Nagashima M, Nohtomi K, Kohashi K, Tomoyasu M, Sinmura K, *et al.* Preventive effect of dipeptidyl peptidase-4 inhibitor on atherosclerosis is mainly attributable to incretin's actions in nondiabetic and diabetic apolipoprotein E-null mice. *PLoS One.* 2013; 8: e70933.

鏑本義治および 後藤守兄. DPP-4 阻害薬アナグリプチン(スイニー錠)の薬理学的特性と臨床効果. 日本薬理学雑誌. 2013 ; 141(6) : 339-49.

Ussher JR and Drucker DJ. Cardiovascular biology of the incretin system. *Endocr Rev.* 2012; 33: 187-215.

Usui S, Hara Y, Hosaki S and Okazaki M. A new on-line dual enzymatic method for simultaneous quantification of cholesterol and triglycerides in lipoproteins by HPLC. *J Lipid Res.* 2002, 43, 805-14.

Wang Q and Brubaker PL. Glucagon-like peptide-1 treatment delays the onset of diabetes in 8 week-old *db/db* mice. *Diabetologia.* 2002; 45(9): 1263-73.

Watanabe Y, Kojima T and Fujimoto Y. Deficiency of membrane-bound

dipeptidyl aminopeptidase IV in a certain rat strain. *Experientia*. 1987; 43(4): 400-1.

Wetterau JR, Aggerbeck LP, Bouma ME, *et al*. Absence of microsomal triglyceride transfer protein in individuals with abetalipoproteinemia. *Science*. 1992; 258(5084): 999-1001.

Zhong J, Rao X and Rajagopalan S. An emerging role of dipeptidyl peptidase 4 (DPP4) beyond glucose control: potential implications in cardiovascular disease. *Atherosclerosis*. 2013; 226(2): 305-14.

Zhong J, Gong Q, Goud A, Srinivasamaharaj S and Rajagopalan S. Recent advances in dipeptidyl-peptidase-4 inhibition therapy: Lessons from the bench and clinical trials. *J Diabetes Res*. 2015; 2015: 606031.

Yoshinaka Y, Shibata H, Kobayashi H, *et al*. A selective ACAT-1 inhibitor, K-604, stimulates collagen production in cultured smooth muscle cells and alters plaque phenotype in apolipoprotein E-knockout mice. *Atherosclerosis*. 2010; 213: 85-91.

## 略語一覽

ABC	ATP binding cassette
ACADM	acyl-CoA dehydrogenase medium chain
ACAT	acetyl-CoA acetyltransferase
ACAT2	acyl-coenzyme A: cholesterol acyltransferases 2
ACCA	acetyl-CoA carboxylase alpha
ACCORD	Action to Control Cardiovascular Risk in Diabetes
ADMA	asymmetric dimethylarginine
ADVANCE	Action in Diabetes and Vascular Disease: Preterax and Diamicron MR Controlled Evaluation
AGEs	advanced glycation end-products
AMP	adenosine monophosphate
AMPK	AMP-activated protein kinase
ANOVA	analysis of variance
Apo	apolipoprotein
cGMP	cyclic guanosine monophosphate
Chol	cholesterol
CM	chylomicron
CoA	coenzyme A
CPT1	carnitine palmitoyltransferase 1
CVD	cardiovascular diseases
DNA	deoxyribonucleic acid
DPP-4	dipeptidyl peptidase-4

EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
eNOS	endothelial nitric oxide synthase
EVG	Elastica van Gieson
FAS	fatty acid synthase
FATP4	fatty acid transport protein 4
FCS	fetal calf serum
FDFT1	farnesyl-diphosphate farnesyltransferase 1
GAPDH	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
GIP	glucose-dependent insulintrophic polypeptide
GLP-1	glucagon-like peptide-1
Gly-Pro-MCA	glycyl-L-proline 4-methylcoumaryl-7-amide
HCD	high cholesterol diet
HDL	high-density lipoprotein
HE	hematoxylin and eosin
HMG-CoA	hydroxymethylglutaryl-CoA
HPLC	high performance liquid chromatography
IDF	International Diabetes Federation
IL	interleukin
IVGTT	intravenous glucose tolerance test
LC-MS/MS	liquid chromatography tandem-mass spectrometry
LDL	low-density lipoprotein
LDLR	low-density lipoprotein receptor
L-NMMA	N <sup>G</sup> -monomethyl-L-arginine

LPDS	lipoprotein-deficient serum
LPL	lipoprotein lipase
Luc	luciferase
MCP-1	monocyte chemoattractant protein-1
MDA	malondialdehyde
mRNA	messenger ribonucleic acid
MTTP	microsomal triglyceride transfer protein
MVK	mevalonate kinase
NADP(H)	nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate
NF- $\kappa$ B	nuclear factor-kappa B
NO	nitric oxide
NPC1L1	Niemann-Pick C1-like 1
8-OHdG	8-hydroxy-2'-deoxyguanosine
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PKC	protein kinase C
QOL	quality of life
RNA	ribonucleic acid
ROS	reactive oxygen species
SMA	smooth muscle actin
SR-B1	scavenger receptor class B member 1
SREBP	sterol regulatory element binding protein
TC	total cholesterol
T1DM	type 1 diabetes mellitus

T2DM	type 2 diabetes mellitus
TNF- $\alpha$	tumor necrosis factor- $\alpha$
VADT	Veterans Affairs diabetes trial
VLDL	very low-density lipoprotein

本研究によって得られた成績は以下の雑誌に報告した。

- 1) Goto M., Yamauchi Y., Kurosaki E., Azuma H. Possible involvement of facilitated polyol pathway in augmentation of intimal hyperplasia in rabbits with alloxan-induced hyperglycemia. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2003; 41: 265-75.
- 2) Hirano T., Yamashita S., Takahashi M., Hashimoto H., Mori Y., Goto M. Anagliptin, a dipeptidyl peptidase-4 inhibitor, decreases macrophage infiltration and suppresses atherosclerosis in aortic and coronary arteries in cholesterol-fed rabbits. *Metabolism.* 2016; 65: 893-903 (2016)
- 3) Yano W., Inoue N., Ito S., Itou T., Yasumura M., Yoshinaka Y., Hagita S., Goto M., Nakagawa T., Inoue K., Tanabe S., Kaku K. Mechanism of lipid-lowering action of the dipeptidyl peptidase-4 inhibitor, anagliptin, in low-density lipoprotein receptor-deficient mice. *J Diabetes Investig.* 2017; 8: 155-60.
- 4) Goto M., Furuta S., Yamashita S., Hashimoto H., Yano W., Inoue N., Kato N., Kaku K. Dipeptidyl peptidase 4 inhibitor anagliptin ameliorates hypercholesterolemia in hypercholesterolemic mice through inhibition of intestinal cholesterol transport. *J Diabetes Investig.* 2018; 9: 1261-9.