

臨床ビッグデータ解析及び薬理学的実証による
ジペプチジルペプチダーゼ4阻害薬誘発類天疱瘡
抑制法の創出

2022

野澤 啓輔

目次

1	緒言	2
2	略語表	3
3	第一章	4
3.1	背景	4
3.2	実験方法.....	5
3.2.1	FAERS データベース解析.....	5
3.2.2	IBM [®] MarketScan [®] database 解析.....	6
3.2.3	統計解析.....	7
3.3	実験結果.....	10
3.3.1	FAERS 解析を用いた BP 発症リスク薬剤の探索.....	10
3.3.2	FAERS 解析を用いた DPP4 阻害薬誘発 BP 発症リスク抑制薬の探索	14
3.3.3	IBM [®] MarketScan [®] Research database 解析を用いた DPP4 阻害薬風発 BP 発症とリシノプリル併用の因果関係推定	15
3.4	小括	22
4	第二章	25
4.1	背景	25
4.2	実験方法.....	26
4.2.1	薬剤および試薬.....	26
4.2.2	Primary human cell の単離.....	26
4.2.3	Flow cytometry 解析.....	26
4.2.4	Quantitative RT-PCR 解析.....	27
4.2.5	統計解析.....	28
4.2.6	研究の承認.....	28
4.3	実験結果.....	30
4.3.1	DPP4 阻害薬の T 細胞分化に対する作用検証.....	30
4.3.2	DPP4 阻害薬およびリシノプリルによるマクロファージに対する作用検証.....	34
4.3.3	DPP4 阻害薬およびリシノプリルの単球/マクロファージのレニン-アンジオテンシン系に対する作用検証.....	36
4.4	小括	39
5	総括および結論.....	41
6	参考文献	43
7	発表論文	49
8	謝辞	50

1 緒言

水疱性類天疱瘡(bullous pemphigoid:BP)は最も代表的な表皮下水疱を生じる自己免疫性水疱症であり、2つのヘミデスモソームタンパク質, BP180 及び BP230 に対する自己抗原の産生を特徴とする疾患である(1)。本疾患の発症には乾癬や関節リウマチといった自己免疫疾患, パーキンソン病やアルツハイマー病といった中枢疾患, 高血圧といった心血管疾患, および肝臓がんといった各種がんが関連していることが報告されている(1)。加えて, BP の発症リスクを高める薬剤が 50 以上報告されている(2)。一方で, その発症機序は不明点が多く, また, 治療法もステロイド剤投与等のみと限定的である。そのため, 本疾患の発症機序解明および有用な治療薬の開発は社会的意義が大きいと考えられる。

ジペプチジルペプチダーゼ 4(dipeptidyl peptidase 4: DPP4)阻害薬は 2 型糖尿病治療薬の 1 カテゴリーであり, 2006 年に最初の薬剤であるシタグリプチンが米国において承認されたことを皮切りに複数の薬剤が承認され, 低血糖を生じにくい作用機序であることなどから最も広く用いられている。一方, 近年頻度は低いものの副作用の一つとして BP が発症することが報告され, DPP4 阻害薬の使用数拡大に従いその報告数も増加傾向にある(3, 4)。DPP4 阻害薬は血糖値低下に寄与するインクレチンペプチドの分解阻害作用だけでなく, 各種免疫細胞の機能を変化させることが報告されており, この免疫細胞機能変化が BP 発症に関与していることが示唆されているものの, 未だ不明点が多い(5-7)。

以上の背景より, DPP4 阻害薬による類天疱瘡の発症抑制方法を創出することは, 有用な薬剤の安全使用, 及び副作用発生時の対処法を提供するうえで非常に重要である。また, ここで得られた知見は, 特発性 BP 治療法確立にも新たな知見を与えるものであると考えられる(8)。そこで, この課題を解決するため, 近年医療・創薬において着目されている臨床ビッグデータ解析に従来の薬理学的実験を組み合わせる「リバーストランスレーショナルリサーチ法」を用い, DPP4 阻害薬誘発類天疱瘡の抑制方法を探索した。

第一章では, 2つの臨床ビッグデータ解析により DPP4 阻害薬による BP 発症を抑制可能な薬剤の同定を行った。その結果, リシノプリルが, DPP4 阻害薬による血糖値低下作用に影響せず, DPP4 阻害薬誘発 BP 発症を抑制する薬剤であることを明らかにした。

第二章ではリシノプリルによる DPP4 阻害薬誘発 BP 抑制機序の一端を薬理学的実験により明らかにし, Angiotensin 1-7(Ang1-7)/MasR 軸が重要な役割を果たしていることを示した。

これらの研究成果について, 以下に論述する。

2 略語表

ACE: angiotensin-converting enzyme

Ang1-7: angiotensin 1-7

ATC: Anatomical Therapeutic Chemical

BP: bullous pemphigoid

CI: confidence interval

DDD: defined daily dose

DPP: dipeptidyl peptidase

EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid

FAERS: FDA Adverse Event Reporting System

FBS: fetal bovine serum

FAP: fibroblast activation proteins

HbA1c: hemoglobin A1c

hPBMCs: human peripheral blood mononuclear cells

ICD10: International Classification of Diseases Version 10

IRR: incidence rate ratio

MarketScan: IBM[®] MarketScan[®] Research

MasR: Mas receptor

M-CSF: macrophage colony-stimulating factor

MMP9: matrix metalloproteinase 9

PBS: phosphate-buffered saline

PHA: phytohemagglutinin

PMA: phorbol-12-myristate-13-acetate

RAS: renin-angiotensin system

ROR: reporting odds ratio

Th1: T helper 1

Th17: T helper 17

TNF: tumor necrosis factor

Treg: regulatory T cells

3 第一章

臨床ビッグデータ解析による DPP4 阻害薬誘発類天疱瘡抑制薬の探索

3.1 背景

BP は水疱形成を主とする自己免疫性皮膚疾患である。その発症機序は不明点が多い一方、薬剤がその発症のリスク因子であることが報告されている(2)。このような薬物有害事象に対する有効な治療法を見つけるための一つのアプローチは、臨床ビッグデータを解析し、未知の薬物相互作用を検索することである。FDA Adverse Event Reporting System (FAERS) は、自発報告による有害事象を集めた世界最大のデータベースであり、本アプローチを実施するうえで有用なデータベースの一つである。実際、FAERS データを解析することで、薬物(薬物 A)の有害事象の発生が、別の薬物(薬物 B)の併用によって顕著に抑制されるといった新規の薬物相互作用が発見されている(9, 10)。したがって、FAERS データの解析は、特定の臨床有害事象の交絡因子に関する新たな仮説を生み出す貴重な戦略となり得ると考えられる。

しかしながら、FAERS データは時系列の情報がないことから、薬物 B の併用と有害事象の発生率の変化との間の因果関係を算出することができないという方法論上の問題がある。この課題を解決するため、FEARS データ解析に加え、時系列が明らかな保険請求データベースを用いて有害事象の発生率の変化と各薬剤使用との間の因果関係を算出する手法が報告されている(11, 12)。この手法は、豊富な情報量がある一方で時系列データを有しないという FAERS データベースの特徴と、副作用に関する情報量は限られるものの時系列情報が紐づいているという保険請求データベースの特徴を組み合わせることで、精度の高い新規薬物相互作用を明らかにすることができる非常に有用な手法であると考えられる。

そこで本章では、まず FAERS データ解析により BP 発症を誘発する薬物 A の探索、及び薬物 A 誘発 BP を抑制する薬物 B の探索を行った。続いて、因果関係を算出するため、米国の保険請求データベースである IBM[®] MarketScan[®] Research (MarketScan) databases を用いて薬物 A 誘発 BP に対する薬物 B の時系列的な発生状況を調査した。

3.2 実験方法

3.2.1 FAERS データベース解析

2004 年から 2019 年までの有害事象報告を FDA の Web サイトから入手した(13)。合計 13,632,002 件から重複した報告を既報の通り排除し(14), 残りの 11,438,031 件の報告を解析した。また, FAERS に登録されている薬物名は任意記載形式であるため, ライフサイエンス辞書シソーラスを駆使したテキストマイニングにより薬物名を一般名に統一した。BP の報告は, MedDRA(バージョン 23.0)の「Pemphigoid」で定義した。FAERS データの解析は, 既報に従って行った(10)。Volcano plots 作成においては, P 値の代わりに Z スコアを使用した。

図 1-1 で用いた算出方法を下記に示す。FAERS データに報告されている患者を以下の 4 つのグループに分けた。(a)対象薬物(薬物 A)を投与され, かつ BP を発症した人, (b)薬物 A を投与され, かつ BP を発症しなかった人, (c)薬物 A を投与されず, かつ BP を発症した人, (d)薬物 A を投与されず, かつ BP を発症しなかった人。95%信頼区間(confidence interval: CI)付きの報告オッズ比(reporting odds ratio: ROR)および Z スコアは以下の式に従って算出した。

$$\text{ROR} = \frac{a/b}{c/d}$$

$$95\% \text{ CI} = \exp \left\{ \log(\text{ROR}) \pm 1.96 \sqrt{\left(\frac{1}{a} + \frac{1}{b} + \frac{1}{c} + \frac{1}{d} \right)} \right\}$$

$$Z \text{ score} = \frac{\log(\text{ROR})}{\sqrt{\left(\frac{1}{a} + \frac{1}{b} + \frac{1}{c} + \frac{1}{d} \right)}}$$

なお, a, b, c, d は各グループの例数を示す。

図 1-2 における算出方法を下記に示す。DPP4 阻害薬(ビルダグリプチン, リナグリプチン, シタグリプチン, アログリプチン, テネリグリプチン, アナグリプチン, もしくはサクサグリプチン:薬物 A)を投与された患者を以下の 4 つのグループに分けた。(a1)併用薬(薬物 B)を投与され, かつ BP を発症した人, (b1)薬物 B を投与され, かつ BP を発症しなかった人, (c1)薬物 B を投与されず, かつ BP を発症した人, (d1)薬物 B を投与されず, かつ BP を発症しなかった人。薬物 A による BP の 95% CI 付きの ROR と Z スコアを以下の式に従って算出した。

$$\text{ROR} = \frac{a1/b1}{c1/d1}$$

$$95\% \text{ CI} = \exp \left\{ \log(\text{ROR}) \pm 1.96 \sqrt{\left(\frac{1}{a1} + \frac{1}{b1} + \frac{1}{c1} + \frac{1}{d1} \right)} \right\}$$

$$Z \text{ score} = \frac{\log(\text{ROR})}{\sqrt{\left(\frac{1}{a1} + \frac{1}{b1} + \frac{1}{c1} + \frac{1}{d1} \right)}}$$

なお、 $a1, b1, c1, d1$ は各グループの例数を示す。

3.2.2 IBM® MarketScan® database 解析

2017年1月から2019年12月までの期間に対応するIBM® MarketScan® Commercial and Medicare Supplemental databasesをIBM® Watson Health®より購入した。本データベースはプライマリもしくはメディケアサプリメント適応を受けた米国の43,723,094人の従業員、扶養家族、および退職者のデータで構成されていた。このうち、解析には生年月日および性別が紐づいた外来患者36,399,469件を使用した。

薬物名はDPP4阻害薬をATCコードA10BHで定義し、リシノプリルをATCコードC09AA03で定義した(表1-1)。診断名は国際疾病分類10(International Classification of Diseases Version 10:ICD-10)に基づいて定義した(表1-2)。

データ解析はRソフトウェアv4.1.2およびRStudio(2022.07.1 Build 554 software, R Foundation for Statistical Computing)を用いて実施した。時系列解析にはRパッケージ「survival」(15)および「MatchIt」(16)を用い、既報の方法に従い実施した(11)。DPP4阻害薬の使用に関連したBPの発生率は、ポアソン回帰分析によって評価し、得られた結果は、95% CIおよびZスコアとともに発生率比(incidence rate ratio: IRR)として示した。

DPP4阻害薬が投与された患者をリシノプリル使用群と未使用群の2つのグループに分類し、既報の手法を用いて1:1の傾向スコアマッチングを行い、危険因子を持つ患者数の偏りを解消した(17)。傾向スコアマッチのペアは、0.2キャリパー幅に基づく最近傍法を用いて2群をマッチングすることにより作成した(18)。交絡因子として腎不全(N17-19)、肝障害(K70-77)、高血圧(I10-15)、糖尿病(E10-14)、心臓病(I05-09, I20-52)、脳血管疾患(I60-69, G45、およびG46)、がん(C00-D09)、神経疾患(G20-22, G30-32, F00-03, G35、G40、およびG41)、自己免疫疾患(M05-09, L40-41, L43, L93、およびM32)、ループ利尿薬(ATCコードC03CA01, C03CA02, C03CC01およびC03CA04)、およびステロイド(ATCコードH02A)を用いた。さらに、マッチング後に得られたコホートペアを用いて、DPP4阻害薬とリシノプリルの投与量と累積投与量、および投与期間を比較した。各薬剤の投与量はWHOのウェブサイト記載の1日当たりの投与量(defined daily dosage: DDD)を基に定量化した(19)。

BP の累積発生率をリシノプリル併用群と非併用群で比較し、生存曲線を Kaplan-Meier プロットで表した(20)。統計的有意性は、ログランク検定と Cox 比例ハザードモデルを用いてハザード比を算出して評価した。Number at risk は、毎月 BP が発症する可能性のある患者数を示す。

臨床検査結果は、IBM[®] MarketScan[®] Lab Results Database より取得した。ヘモグロビン A1c (hemoglobin A1c:HbA1c)は Loinc コード「4548-4」(1,388,265 件) および「17856-6」(51,213 件)により定義した。これらのデータのうち、単位が「OF TOTAL HGB」, 「TOTAL HGB」, 「A1C」, 「OF HGB」, 「PERCENT」, 「%」, 「HB」, 「T.HGB」, 「% OF TOTAL HGB」, もしくは「OF T.」のデータ、かつ数値が「0 以上 100 以下」のデータを抽出した。このうち HbA1c 検査を DPP4 阻害薬の初回処方前後で 2 回以上受けた 8,921 名の患者データを解析した。患者を表 1-2 で定義した BP の報告有無で 2 群に分け、処方前後の HbA1c 変化を unpaired *t*-tests with Welch's correction を用いて比較した。さらに、同患者をリシノプリル処方の有無で 2 群に分け、同様に処方前後の HbA1c 変化を解析した。

3.2.3 統計解析

FAERS および MarketScan データの統計解析には、R ソフトウェアバージョン 4.1.2, RStudio (2022.07.1 Build 554 software, R Foundation for Statistical Computing) および Graphpad Prism 9 for macOS version 9.3.1 (350) (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA)を使用した。時系列解析には R パッケージ「survival」を用い、累積罹患率の比較には log-rank test を使用した。1:1 傾向スコアマッチングは R パッケージ「MatchIt」を用いて行い、母集団の特徴を比較するために、Chi-square tests を行った。HbA1cs の変化に関する統計解析は、Wilcoxon matched-pairs signed rank test および unpaired *t*-test with Welch's correction を用いて行った。危険率 5%未満を統計的に有意であるとみなした。

表 1-1: MarketScan®データ解析における DPP4 阻害薬およびリシノプリルの定義
 数値は各製剤の患者数を示す

Drug class	Formulations	Route	No. of patients
DPP4 inhibitor	Sitagliptin Phosphate	Oral	213,357
	Metformin Hydrochloride/Sitagliptin Phosphate	Oral	113,958
	Linagliptin	Oral	42,792
	Empagliflozin/Linagliptin	Oral	12,340
	Saxagliptin Hydrochloride	Oral	11,472
	Linagliptin/Metformin Hydrochloride	Oral	8,762
	Metformin Hydrochloride/Saxagliptin Hydrochloride	Oral	7,092
	Alogliptin Benzoate	Oral	3,468
	Alogliptin Benzoate/Pioglitazone Hydrochloride	Oral	1,503
	Alogliptin Benzoate/Metformin Hydrochloride	Oral	1,240
	Dapagliflozin/Saxagliptin	Oral	542
Ertugliflozin/Sitagliptin	Oral	290	
Lisinopril	Lisinopril	Oral	1,965,744
	Hydrochlorothiazide/Lisinopril	Oral	586,790

表 1-2: MarketScan[®]データ解析における水疱性類天疱瘡の定義
 数値は各 ICD10 コードの患者数を示す

ICD10	Detail	No. of patients
L10	(Non-Billable Dx) Pemphigus	32
L100	Pemphigus vulgaris	1,693
L101	Pemphigus vegetans	101
L102	Pemphigus foliaceus	338
L103	Brazilian pemphigus [fogo selvagem]	18
L104	Pemphigus erythematosus	103
L105	Drug-induced pemphigus	21
L1081	Paraneoplastic pemphigus	25
L1089	Other pemphigus	323
L109	Pemphigus, unspecified	1,258
L12	(Non-Billable Dx) Pemphigoid	6
L120	Bullous pemphigoid	3,326
L121	Cicatricial pemphigoid	1,022
L122	Chronic bullous disease of childhood	36
L1230	Acquired epidermolysis bullosa, unspecified	184
L1231	Epidermolysis bullosa due to drug	22
L1235	Other acquired epidermolysis bullosa	57
L128	Other pemphigoid	319
L129	Pemphigoid, unspecified	729
L270	Generalized skin eruption due to drugs and medicaments taken internally	55,717

3.3 実験結果

3.3.1 FAERS 解析を用いた BP 発症リスク薬剤の探索

まず、不均衡分析を用いて ROR とその Z スコアを計算することで、FAERS データにおける薬物の使用と BP の発生との関連性を調べた。FAERS には報告バイアスがあること、さらに自発報告であるため母数が分からないことから、これらの値は実際の発生率を正確には反映していない(21)。しかしながら、FAERS データベースに報告のある 7 種全ての DPP4 阻害薬が有意に高い ROR を示した(図 1-1)。そこで、以降の解析には 7 種類すべて(ビルダグリプチン, リナグリプチン, シタグリプチン, アログリプチン, テネリグリプチン, アナグリプチン, もしくはサクサグリプチン)の DPP4 阻害薬を「DPP4 阻害薬」として用いた。DPP4 阻害薬と併用の多いメトホルミン(図 1-1), 及び既報(22)において BP 発症リスクを高める薬剤として報告されている 18 種類の薬物も同様に有意に高い ROR を示した(表 1-3)。そこでこれらの 19 種類の薬剤を併用した例を除いて DPP4 阻害薬使用と BP 発生の関連性を調べた結果、有意に高い ROR を示した(表 1-4)。また、性別、年齢ごとに不均衡分析を行った結果、いずれの場合においても DPP4 阻害薬は有意に高い ROR を示し、年齢別では既報(23)と同様に 80 歳以降で 80 歳未満に比べ高い ROR を示した(表 1-4)。

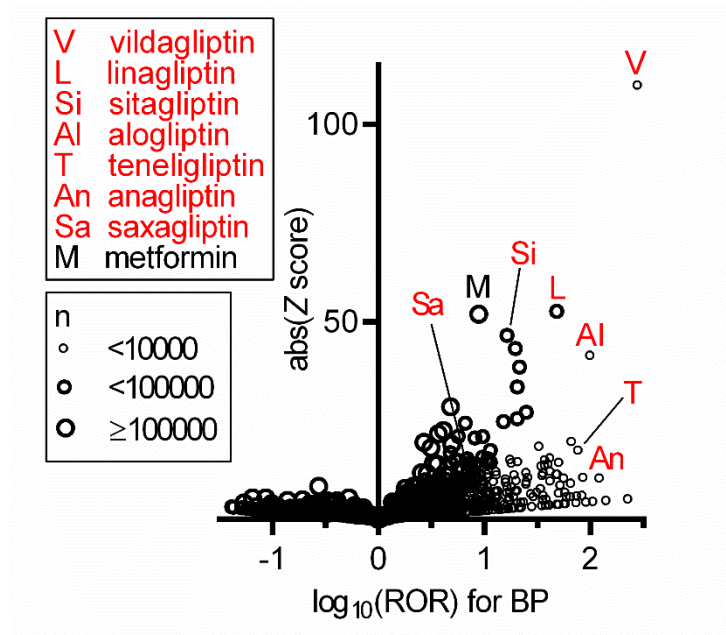


図 1-1 FAERS データにおける DPP4 阻害薬およびメトホルミンによる BP の ROR 増加
 FAERS データの統計解析は、R v4.1.2 および R studio ソフトウェアを用いて行った。Volcano plot 作成においては対数スケールの ROR と有意性の指標 (Z スコアの絶対値) で示した。解析には合計 13,632,002 件から重複した報告を排除した 11,438,031 件のデータを用いた。各丸は個々の薬物を示し、丸の大きさはその薬物を服用している患者の例数を反映している。

表 1-3 BP 発症への関与が報告されている薬剤の ROR
 既報(22)で「Likely」もしくは「Probable」と報告された薬剤の本 FAERS 解析における ROR
 値および 95% CI

Likely association		Probable association	
Drug name	ROR (95% CI)	Drug name	ROR (95% CI)
Aspirin	2.7 (2.4–3.0)	Atezolizumab	3.7 (1.7–7.7)
Furosemide	4.8 (4.3–5.3)	Bumetanide	6.2 (4.3–9.0)
Nivolumab	19.5 (17.0–22.3)	Cephalexin	4.3 (3.0–6.1)
Pembrolizumab	15.0 (12.1–18.6)	Diclofenac	1.6 (1.2–2.2)
		Durvalumab	7.6 (3.4–16.8)
		Fluoxetine	1.5 (1.1–2.0)
		Griseofulvin	23.1 (5.7–92.7)
		Hydrochlorothiazide	4.1 (3.6–4.6)
		Ipilimumab	7.4 (5.5–10.0)
		Losartan	2.0 (1.6–2.4)
		Rosuvastatin	1.9 (1.5–2.4)
		Spironolactone	4.7 (3.9–5.6)
		Terbinafine	2.4 (1.2–4.9)
		Ustekinumab	2.0 (1.3–2.9)

表 1-4 FAERS データに基づく BP の発生と DPP4 阻害薬 (DPP4i) の処方との関係

(+): DPP4 阻害薬を投与されている, もしくは BP を示している患者; (-): DPP4 阻害薬を受けていない, もしくは BP を示さない患者。

Group	DPP4i(+)	DPP4i(+)	DPP4i(-)	DPP4i(-)	ROR	ROR	ROR	Z	
	BP(+)	BP(-)	BP(+)	BP(-)		lower	upper		score
All patients	1,075	103,693	2,359	11,330,904	49.8	46.3	53.5	105.8	
After the exclusion of at-risk drug users	271	35,581	1,294	9,776,664	57.5	50.5	65.6	60.5	
Stratified by sex and age									
Male	< 80 years	331	30,866	731	2,376,389	34.9	30.6	39.7	53.4
	≥ 80 years	216	4,582	248	240,515	45.7	38.0	55.0	40.6
Female	< 80 years	197	28,944	630	3,742,545	40.4	34.4	47.5	45.2
	≥ 80 years	196	5,085	290	352,365	46.8	39.0	56.3	41.1

3.3.2 FAERS 解析を用いた DPP4 阻害薬誘発 BP 発症リスク抑制薬の探索

DPP4 阻害薬を使用した患者集団において、すべての薬物の組み合わせによる BP の ROR への交絡効果を評価した。その結果、リシノプリル、メトプロロール、およびロサルタンといった複数の薬物で DPP4 阻害薬による BP 発症リスクを低下させた。このうち、リシノプリルは単独では BP 発症に影響せず、ROR を低下させ、最も低い Z スコアを示した(図 1-2)

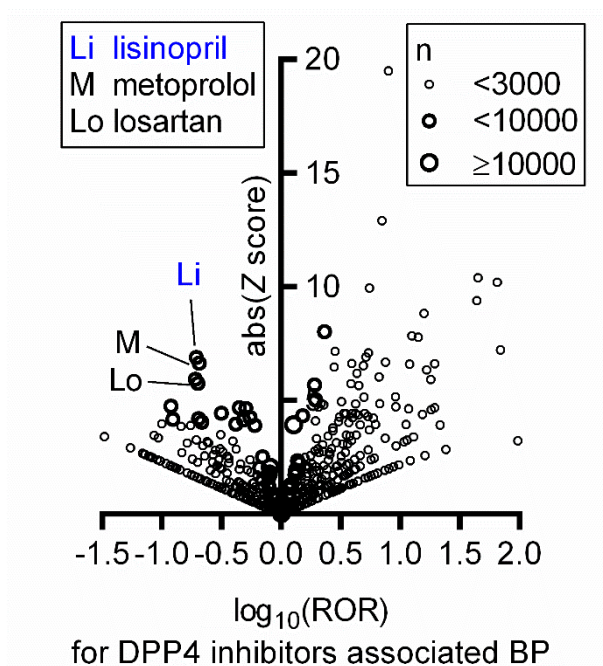


図 1-2 FAERS データにおける併用薬による DPP4 誘発 BP への交絡効果
DPP4 阻害薬を服用している患者集団において、薬剤誘発性ジスキネジアの ROR に対する併用薬の交絡効果を示す。Volcano plot 作成においては対数スケールの ROR と有意性の指標(Z スコアの絶対値)で示した。各丸は個々の薬物を示し、丸の大きさはその薬物を服用している患者の例数を反映している。

3.3.3 IBM[®] MarketScan[®] Research database 解析を用いた DPP4 阻害薬風発 BP 発症 とリシノプリル併用の因果関係推定

DPP4 阻害薬と BP 発生の因果関係, およびリシノプリル使用との因果関係を検証するため, MarketScan データベースを用いた解析を実施した。解析に用いた DPP4 阻害薬およびリシノプリルを成分とする製剤は実験手法の項で表 1-1 に示した。また, BP 関連の症状は実験手法の項で表 1-2 に示したコードで定義した。MarketScan 登録後の初回イベント発生の時間分布を見ると, DPP4 阻害薬(図 1-3A)およびリシノプリル(図 1-3B)を処方された患者は最初の 6 か月間は著しく高く, 7 か月後以降で安定した。このことから, 登録後 6 か月以内に DPP4 阻害薬およびリシノプリルを処方された患者は登録前から処方されていたと考えられた。一方で, BP の報告には顕著な時間分布は認められなかった(図 1-3C)。そこで, 本研究コホートからは MarketScan 登録後 0 日から 180 日以内に BP の診断, DPP4 阻害薬の処方, もしくはリシノプリルの処方を受けた患者は除外した。次に, DPP4 阻害薬の使用と BP 発生の関連性を, BP の IRR を推定することで評価した。その結果, MarketScan コホートでは, DPP4 阻害薬は有意に高い IRR を示した(表 1-5)。

DPP4 阻害薬誘発 BP に対するリシノプリル併用の因果関係を検証するため, DPP4 阻害薬コホートをリシノプリル併用の有無により 2 群に分けた。リシノプリル併用患者は, DPP4 阻害薬処方後にリシノプリル処方があった患者と定義した。次に, BP や各薬剤における既知の交絡因子である腎不全, 肝障害, 高血圧, 糖尿病, 心臓病, 脳血管疾患, がん, 神経疾患, 自己免疫疾患, ループ利尿薬使用, およびステロイド使用の影響を排除するため, 1:1 の傾向スコアマッチングを行った(表 1-6)(24, 25)。スコアマッチング後のコホートを用いた, Kaplan-Meier 曲線および Cox 比例ハザードモデルによると, ハザード比が 0.53 (95% CI: 0.35–0.81, $p = 0.003$ in the log-rank test)であり, リシノプリル併用により DPP4 阻害薬誘発 BP の累積発生が有意に低下した(図 1-4)。

傾向スコアマッチング後コホートにおいて, DPP4 阻害薬の 1 日投与量, 累積投与量, および累積投与期間は, リシノプリル併用群および非併用群間で同等であった(表 1-7)。また, IBM MarketScan[®] Lab Results Database より取得した HbA1c データを用い, DPP4 阻害薬による BP の発症と血糖値変化の関係を検証した。その結果, DPP4 阻害薬による HbA1c 低下作用に, BP 発症の有無で有意な差異は認められなかった(図 1-5A)。同様にリシノプリル併用の DPP4 阻害薬血糖値低下作用に対する影響を検証した結果, リシノプリル併用有無で HbA1c 低下に有意な変化は認められなかった(図 1-5B)。

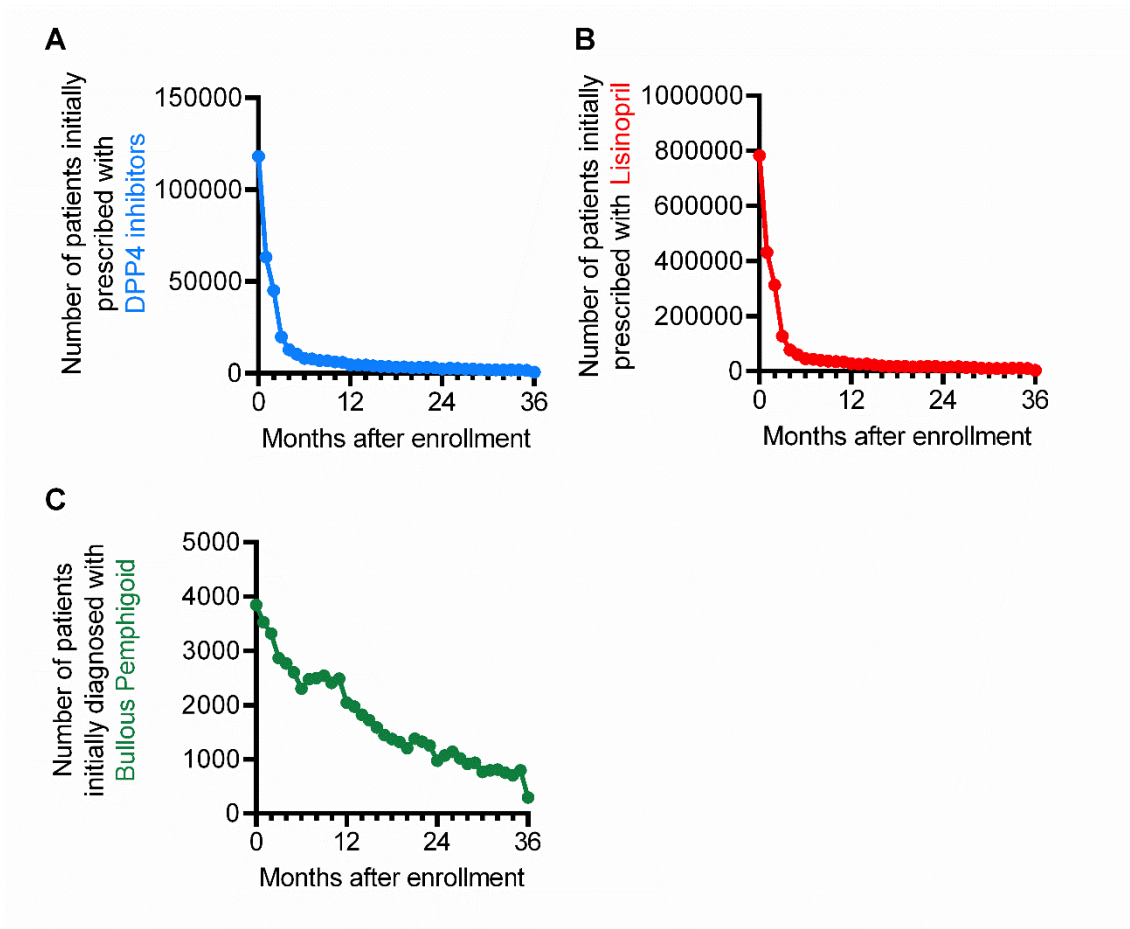


図 1-3 MarketScan データにおける登録後、最初のイベント発生までの時間分布
 患者の MarketScan 登録から (A) DPP4 阻害薬の初回処方, (B) リシノプリルの初回処方,
 (C) BP の初回診断までの期間。患者数は月単位で示した。

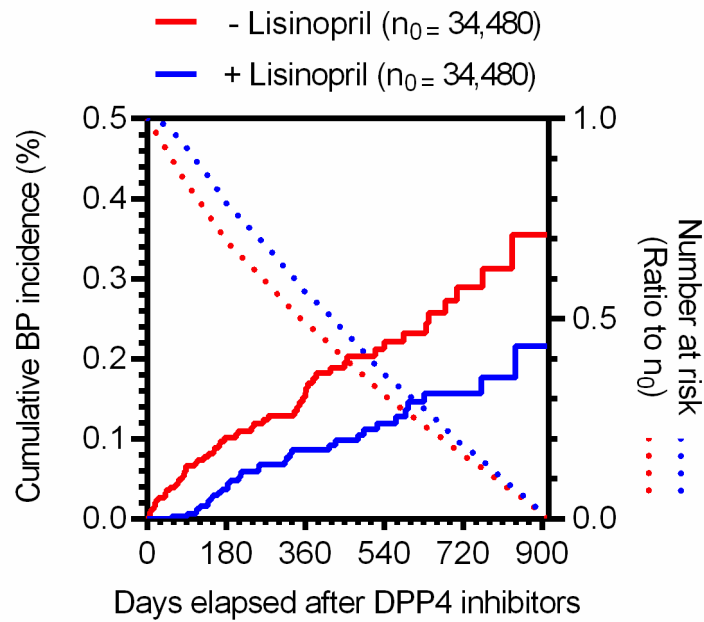


図 1-4 MarketScan データにおける DPP4 阻害薬処方患者の BP 発生率の時間傾向
 MarketScan 登録後 0 日から 180 日以内の患者は、導入期間を設けるために解析から除外した(図 1-3 に示した結果に基づく)。DPP4 阻害薬を投与されている患者における BP の累積発生率のカプラン・マイヤー曲線をリシノプリルなし(赤)とあり(青)の 2 つのグループについて個別に示した。Cox 比例ハザードモデルによると、ハザード比が 0.53 (95% confidence interval [CI]: 0.35–0.81, $p = 0.003$ in the log-rank test)であった。点線は、全体の患者数(両群とも $n_0 = 34,480$)に対するリスクのある患者数の比率を示す。

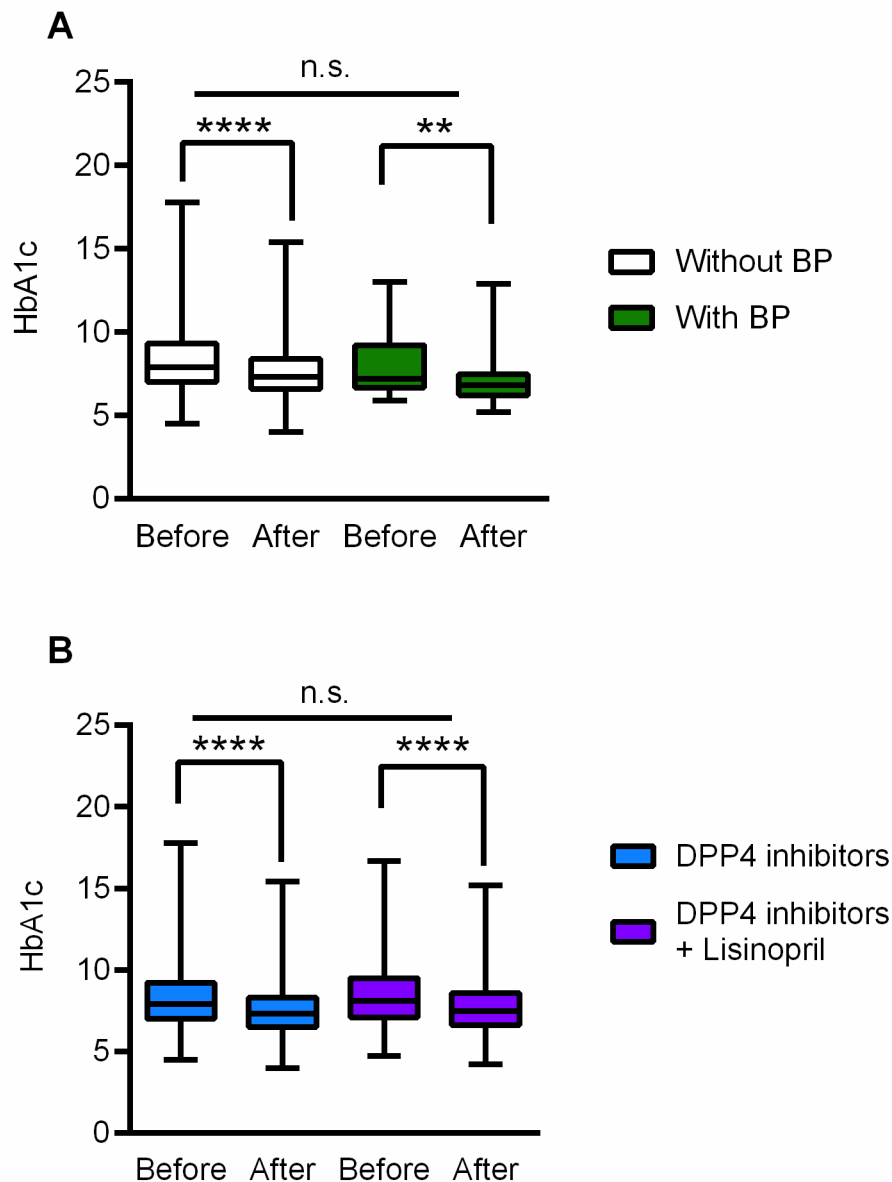


図 1-5 DPP4 阻害薬を投与されている患者の HbA1c レベルの経時変化
 DPP4 阻害薬処方前後の HbA1c 値。(A) DPP4 阻害薬を処方された患者を観察期間内に BP 発症を経験した群と経験しなかった群に分け、DPP4 阻害薬処方前後の HbA1c 値を比較した。(B) DPP4 阻害薬を処方された患者を、リシノプリル併用群と非併用群に分け、DPP4 阻害薬処方前後の HbA1c 値を比較した。統計的有意性は、two-tailed Wilcoxon matched-pair signed-rank test を用いて検定した。 $** p < 0.01$; $**** p < 0.0001$ 。グループ間の HbA1c の変化を比較するための統計分析は、unpaired *t*-test with Welch's correction を用いて検定した。n.s., not significant。

表 1-5 MarketScan データにおける DPP4 処方と BP の発生率比(IRR)

DPP4 inhibitors	BP cases	Incidence rate (% per person-year)	IRR (95% CI)	Z score	$-\log_{10}p$
+	179 / 112,549	0.148	1.68	6.93	11.4
-	40,874 / 31,336,175	0.088	(1.45-1.95)		

表 1-6 MarketScan データにおける DPP4 阻害薬コホートの傾向スコアマッチング
各群における患者数および割合を示す

	Before matching			After matching		
	Without lisinopril (%)	With lisinopril (%)	<i>P</i> value	Without lisinopril (%)	With lisinopril (%)	<i>P</i> value
Total	78,069	34,480	-	34,480	34,480	-
Elderly (≥ 65 years)	11,053 (14.2 %)	3,518 (10.2 %)	< 0.001	3,524 (10.2 %)	3,518 (10.2 %)	0.95
Female	37,489 (48 %)	14,078 (40.8 %)	< 0.001	14,100 (40.9 %)	14,078 (40.8 %)	0.87
Renal failure	9,901 (12.7 %)	4,260 (12.4 %)	0.130	4,238 (12.3 %)	4,260 (12.4 %)	0.81
Liver disorder	10,859 (13.9 %)	4,432 (12.9 %)	< 0.001	4,426 (12.8 %)	4,432 (12.9 %)	0.95
Hypertension	59,160 (75.8 %)	31,392 (91 %)	< 0.001	31,389 (91 %)	31,392 (91 %)	0.98
Diabetes	76,414 (97.9 %)	34,163 (99.1 %)	< 0.001	34,172 (99.1 %)	34,163 (99.1 %)	0.75
Heart diseases	23,037 (29.5 %)	9,922 (28.8 %)	0.013	9,920 (28.8 %)	9,922 (28.8 %)	0.99
Cerebrovascular diseases	7,230 (9.3 %)	2,822 (8.2 %)	< 0.001	2,816 (8.2 %)	2,822 (8.2 %)	0.94
Cancer	9,021 (11.6 %)	3,379 (9.8 %)	< 0.001	3,380 (9.8 %)	3,379 (9.8 %)	1.00
Neurologic diseases	2,975 (3.8 %)	1,120 (3.2 %)	< 0.001	1,076 (3.1 %)	1,120 (3.2 %)	0.35
Autoimmune diseases	4,088 (5.2 %)	1,473 (4.3 %)	< 0.001	1,442 (4.2 %)	1,473 (4.3 %)	0.57
Loop diuretics	8,632 (11.1 %)	3,314 (9.6 %)	< 0.001	3,297 (9.6 %)	3,314 (9.6 %)	0.84
Steroids	26,043 (33.4 %)	10,750 (31.2 %)	< 0.001	10,753 (31.2 %)	10,750 (31.2 %)	0.99

表 1-7 MarketScan データにおける DPP4 阻害薬コホートの傾向スコアマッチング後コホートにおける DPP4 阻害薬およびリシノプリルの 1 日および累積投与量, 累積投与期間

各グループの中央値、四分位範囲 (IQR)、および最小最大範囲を示す。各薬剤の投与量は WHO のウェブサイト記載の 1 日当たりの投与量 (defined daily dosage: DDD) を基に定量化した (19)。*DDD: シタグリプチン 100 mg, サクサグリプチン 5 mg, アログリプチン 25 mg, リナグリプチン 5 mg, リシノプリル 10 mg を 1 とした。

	Without lisinopril		With lisinopril			
	DPP4 inhibitor		DPP4 inhibitor		Lisinopril	
	Median (IQR)	Range	Median (IQR)	Range	Median (IQR)	Range
Average daily dose (DDD*)	1 (1-1)	0.001 -1,000	1 (1-1)	0.005 -1,000	1.5 (0.86-2)	0.05 -2,000
Cumulative dose (DDD*)	180 (90-360)	0.12 -630,000	180 (90-390)	0.15 -390,000	360 (125-810)	1 -720,000
Administration period (day)	180 (90-390)	1 -1,440	210 (90-420)	1 -1,515	270 (120-450)	1 -1,740

3.4 小括

本研究では、独立した臨床ビッグデータセットを用いたデータマイニング解析によって、リシノプリルが DPP4 阻害薬誘発 BP の発症を予防することを初めて明らかにした。

これまでに、複数の症例報告、ファーマコビジランスデータを用いた解析、および各種観察研究により、DPP4 阻害薬が BP 発症に関与することが報告されており、これは近年の無作為化比較臨床研究を用いたメタアナリシスにおいても確認されている(26)。しかしながら、その背景となるメカニズムについてはほとんど明らかになっておらず、治療法も限定的である。そのため、発症メカニズムを明らかにし、予防・治療法を開発することは非常に重要である。

そこで、近年複数の論文でその有用性が報告されている FAERS データベースの有害事象ビックデータを用いた予期しない薬物間相互作用を交絡因子として同定する手法(9-12)により予防に繋がる薬剤の探索を行った。その結果、先行研究(27, 28)で示されていた DPP4 阻害薬による BP 発症の有意な ROR 上昇だけでなく、リシノプリルによってこれを抑制できることが新たに明らかとなった(図 1-1, 図 1-2)。一方で、抗 PD1/PDL1 抗体(ニボルマブ、ペムプロリズマブ、セミリマブ、アテゾリズマブ、アベルマブ、デュルバルマブ)は、DPP4 阻害薬と同様に BP の ROR を有意に上昇させたが(ROR = 16, Z score = 48)、リシノプリルの併用による Odds ratio への影響は認められなかった(ROR=1.6, Z score = 1.2)。これらの結果からリシノプリルによる BP 発症抑制作用は DPP4 阻害薬誘発 BP に特徴的であると考えられた。

DPP4 は II 型の膜型ペプチターゼであり、DPP4 遺伝子ファミリーには DPP8, DPP9 及び fibroblast activation proteins (FAP) が含まれている。DPP4 阻害薬はこれらのファミリー酵素も阻害するため、DPP4 と DPP8/9 および FAP の相対的な選択性の低下が副作用発症に関与している可能性が報告されている(29)。しかしながら、FAERS を用いた著者の解析では、選択性が高いとされるシタグリプチンも含め、FAERS に含まれるすべての DPP4 阻害薬において、その選択性の強弱と無関係に有意な BP の ROR 上昇を示した。この結果は FAERS データ、無作為化比較試験、メタアナリシスに基づく先行研究(27, 30, 31)とも一致するものである。これらの結果は、他の酵素の阻害や化合物の構造に基づく副作用ではなく DPP4 阻害活性に基づき BP の発生を増加させていることを示唆している。

FAERS データ解析において、リシノプリルが DPP4 阻害薬誘発 BP の発症を抑制する一方、他の ACE 阻害薬は有意な抑制作用を示さなかった。この一因として、他の ACE 阻害薬の処方例が少なく、報告頻度の低い BP では統計学的検出力に影響を与えている可能性が考えられる。実際、FAERS データベースでは、リシノプリルの総報告症例は約 24 万例、DPP4 阻害薬との併用例に限っても 8,000 例以上ある一方、他の ACE 阻害薬の総報告症例は 10 万例以下、DPP4 阻害薬併用例では 4,000 例以下である。他の可能性としてはリシノプリルによる非特異的作用により DPP4 阻害薬誘発 BP を抑制していることが挙げられるが、著者の知る限り、リシノプリルが他の ACE 阻害薬とは異なる分子メカニズムを有しているとする報告はなされていない。そのため、リシノプリルのみが DPP4 阻害薬誘発 BP を抑制するのか、

もしくは ACE 阻害に基づいた作用なのかを明らかにするためには、同等のデータ規模を有しかつリシノプリル以外の ACE 阻害薬の情報が豊富なデータセットを用いたさらなる研究が必要であると考えられた。

上記の通り、FAERS データの解析により、リシノプリルの併用が DPP4 阻害薬誘発 BP を抑制しうることが示唆された。しかしながら、FAERS データを用いた解析には、時系列の情報が取得できないことから、リシノプリルの併用と DPP4 阻害薬誘発 BP の発生率変化との間の因果関係を算出することができないという方法論上の問題がある。この課題を解決するため、米国の保険請求データが記載された MarketScan を用いた。MarketScan を含む保険請求データベースは、FAERS とは異なり、データの母数が明らかであるあることに加え、各患者の時系列情報を取得することが可能である。実際、FAERS データの解析で導出した仮説を、保険請求データベースを用いることで検証する手法の有用性が報告されている(11, 12)。本研究では、薬剤使用の地域特性を踏まえ、リシノプリルの使用数が多い米国の情報を用いた。

MarketScan データベースから BP 発症例を抽出する際には、BP が他の類似病名を用いて報告されることが示唆されている(32)ことから、表 1-2 に示す病名を「BP 関連病名」として使用した。その結果、BP の発症率は DPP4 阻害薬使用群で対照群と比較して有意に高かった(0.148% vs. 0.088% per person-years, IRR = 1.68)。この結果は、他のデータベースを用いた過去の報告(33)と同様であり、FAERS 解析の結果を強く支持するものであると考えられた。

DPP4 阻害薬により増加する BP 発症率に対するリシノプリルの作用検証では、交絡因子をできる限り排除するため、BP 発症に関与する因子を補正した傾向スコアマッチングを行った。傾向スコアマッチング後のデータを用いた解析により、リシノプリルの併用は、非併用例と比較してハザード比 0.53 と有意な BP 発症抑制作用を示した。これは FAERS データ解析によって示唆されたリシノプリルによる DPP4 阻害薬誘発 BP 抑制作用を強く支持するものである。また、傾向スコアマッチング後のコホートにおいて、リシノプリル併用の有無は DPP4 阻害薬の 1 日平均投与量、累積投与量、および投与期間に影響を与えなかった。この結果より、BP 発症率抑制作用は、DPP4 阻害薬使用の変化による結果ではなく、リシノプリル自体が抑制作用を有していることを示唆している。

DPP4 阻害薬は、その主作用として、インクレチンペプチドの DPP4 による分解を阻害し、血糖値を低下させる。MarketScan には臨床検査値が記載されており、血糖値の指標である HbA1c の時系列データを取得することができる。そこで著者は本データを用いて、DPP4 阻害薬の薬効強度が BP 発症に関与するか、およびリシノプリルが DPP4 阻害活性に直接影響を与えうるかの検証を行った。その結果、著者の解析では、BP の発症有無で HbA1c の低下に差はなかったことから、DPP4 阻害薬による血糖値低下強度は BP 発症に無関係であること、すなわち、DPP4 阻害作用強度に依存しないことが示唆された。さらに、リシノプリル併用の有無でも HbA1c の低下作用に差はなかったことから、リシノプリルが BP 発症リスクを低

減するメカニズムにも血糖値の変化に寄与する DPP4 阻害活性とは無関係であることが示唆された。

以上, 本章では, 2 つの臨床ビックデータを用いた解析により著者はリシノプリルが DPP4 阻害薬の血糖値低下作用に影響を与えず, DPP4 阻害薬誘発 BP の発症を抑制することを明らかにした。

4 第二章

リシノプリルによる DPP4 阻害薬誘発類天疱瘡抑制機序の解析

4.1 背景

第一章では、ビッグデータ解析を通じて DPP4 阻害薬が BP の発症に関与すること、および DPP4 阻害薬誘発 BP はリシノプリルが抑制することを示した。これは、DPP4 阻害薬誘発 BP に対する治療法確立に重要な仮説を与えるものである。一方で、ビッグデータ解析は後ろ向き観察研究であり、ここから得られた仮説を確固たるものにするためにはさらなる検証が必要である。考えられる検証方法の一つとして、得られた仮説を *in vitro* や *in vivo* で再現し、検証することが挙げられる。この方法のメリットは仮説の検証のみならず、メカニズム解析を通じて病態の発症仮説および新たな創薬ターゲット候補を見出せる可能性があることである (8)。

また、BP は自己免疫性疾患であり、水疱形成には自己抗体の産生に関わる B 細胞だけでなく、T 細胞、単球、好中球、好酸球およびマスト細胞といった各種免疫細胞の関与や補体系の関与が報告されている (34)。加えて、DPP4 は幅広い免疫細胞に発現し、その機能を調整していることが報告されている (7, 6)。そのため、DPP4 阻害薬による BP 発症機序の一部に免疫細胞の関与が疑われている (34)。

そこで本章では、免疫細胞に着目し、DPP4 阻害薬によって生じる変化に対するリシノプリルの作用を検証するとともに、作用機序解析により発症に重要な分子の提示を試みた。

4.2 実験方法

4.2.1 薬剤および試薬

ビルダグリプチンは Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA) から、シタグリプチンは MedChemExpress (Monmouth Junction, NJ, USA) から、リシノプリルニ水和物と A779 は 東京化成工業株式会社 (Tokyo, Japan) から購入した。ビルダグリプチン、シタグリプチン、および A779 はジメチルスルホキシドに溶解し、リシノプリルは ultrapure sterile water に溶解し、その後、各溶液を各実験に応じた緩衝液、培養液で希釈した。

組換えヒト M-CSF は PeproTech (Rocky Hill, NJ, USA) から、phytohemagglutinin (PHA), phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA)、および ionomycin は Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) から購入した。Brefeldin A 溶液は、Thermo Fisher Scientific (leveland, OH, USA) から購入した。

4.2.2 Primary human cell の単離

匿名化された末梢血サンプルは、日本たばこ産業株式会社において、研究に参加するための書面によるインフォームドコンセントを提供・同意した、過去 7 日間服薬をしていない健康ボランティアから取得した。ヒト末梢血単核細胞 (hPBMC) を分離するため、末梢血サンプルを滅菌済 PBS で 1:1 の比率で希釈し、SepMate-50TM (VERITAS Corporation, Tokyo, Japan) 中で、LymphoprepTM (Axis-Shield PoCAS, Oslo, Norway) に重層した。その後 1,200 × g、25 °C で 10 分間遠心分離した。hPBMC を含む上層を回収し、滅菌済 PBS で 2 回洗浄した。単球は Human Pan Monocyte Isolation kit (Miltenyi Biotec Inc., Auburn, CA, USA) を用い、製造元のプロトコルに従い hPBMC から単離した。hPBMC と単球は洗浄後、10% 不活化 FBS (Sigma-Aldrich) および 1% ペニシリン/ストレプトマイシン (Gibco, Carlsbad, CA, USA) を添加した RPMI-1640 (Wako, Osaka, Japan) に懸濁した。その後、細胞は以下の項に示す通りに播種した。

4.2.3 Flow cytometry 解析

hPBMCs を 5×10^5 cells/well で 96 well プレートに播種した。各化合物もしくは媒体を添加し、5% CO₂, 37 °C 条件下で 30 分間、前処置した。その後、PHA (終濃度 5 μg/mL) を添加して細胞を刺激し、5% CO₂ 下、37 °C で 48 時間培養した。表面抗原による標識実験では、細胞を 2 mM EDTA-PBS で洗浄し、400 × g で 1 分間遠心分離した後、50 μL の Human BD Fc BlockTM (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA, 2mM EDTA-PBS を用いて 1:200 に希釈) に再懸濁した。4°C で 15 分間培養した後、2 mmol/L EDTA-PBS で洗浄した。その後、各サンプルを Brilliant Stain Buffer (BD Biosciences) で希釈した Fixable Viability Dye eFluor 780 (Thermo Fisher Scientific) と、表 2.1 に示すモノクローナル抗体を混和した抗体液 50 μL に再懸濁し、4 °C 下で 20 分間静置することで染色した。その後、Stain Buffer (BD Biosciences) で洗浄し、Fixation Buffer (BD Biosciences) で細胞を固定した。次に、洗浄後、

100 μ L の Stain Buffer に再懸濁した。細胞内染色実験では、400 \times g で 1 分間遠心し、10% FBS を添加した RPMI-1640 で希釈した PMA (終濃度 50 ng/mL), ionomycin (終濃度 1 μ g/mL), Brefeldin A 溶液 (終濃度 3 μ g/mL) に再懸濁した。5% CO₂ 下, 37°C で 3 時間培養した後、細胞を洗浄し、FACS buffer (2 mmol/L EDTA および 5% FBS を含む PBS) で 1:200 に希釈した Human BD Fc Block 50 μ L に再懸濁し、4 °C で 15 分間静置した。その後、Foxp3/Transcription Factor Fixation/Permeabilization Concentrate and Diluent (Thermo Fisher Scientific) を用いて各サンプルを固定・透過処理を行った。続いて、Permeabilization buffer で希釈した V500 anti-human CD3 (希釈倍率 1:50, clone: UCHT1, 561416; BD Biosciences), BV421 anti-human CD4 (希釈倍率 1:200, clone: OKT4, 317434; BioLegend, San Diego, CA, USA), APC anti-human IL17A (希釈倍率 1:100, clone: BL168, 512334; BioLegend), および PE anti-Foxp3 (希釈倍率 1:100, clone: 236A/E7, 12-4777-42; Thermo Fisher Scientific) に再懸濁し、4 °C 下で 20 分間染色した。その後、サンプルを洗浄し、Permeabilization buffer に再懸濁した。各サンプルは BD LSRFortessa™ X-20 system (BD Biosciences) を用いた Flow cytometry 解析を実施した。データは FACSDiva ソフトウェア (BD Biosciences) を用いて収集し、FlowJo 10.8.0 (TreeStar, Ashland, OR, USA) を用いて分析した。

4.2.4 Quantitative RT-PCR 解析

Human Pan Monocyte Isolation kit (Miltenyi Biotec Inc.) を用いて hPBMC から分離した単球を 1×10^4 cells/well で 96 well プレートに播種した。各化合物もしくは媒体を添加し、5% CO₂ 下, 37 °C で 30 分間、前処置した。その後、刺激群は終濃度 50 ng/mL M-CSF で刺激し、5% CO₂ 下, 37 °C にて 7 日間培養した。無刺激サンプルは同量の培養液を添加した。Total RNA は RNeasy 96-well Kit (Qiagen, Hilden, Germany) を用いて、製造元のプロトコルに従って細胞から抽出した。その後、製造元のプロトコルに従い、TaqMan® RNA-to-Ct 1-Step Kit (Thermo Fisher Scientific), TaqMan probe (Thermo Fisher Scientific; human MMP9, Hs00957562_m1; human CD163, Hs00174705_m1, human TNF Hs00174128_m1; human ACE2, Hs01085333_m1; human ACE, Hs00174179_m1; human DPP4, Hs00897386_m1; human MasR, Hs00267157_s1; and human GAPDH, Hs02786624_g1), および QuantStudio 7 Flex system (Thermo Fisher Scientific) を用い、Quantitative RT-PCR を実施した。PCR は、48 °C で 15 分間逆転写し、AmpliTaq Gold DNA polymerase を 95 °C で 10 分間活性化した。その後、95 °C を 15 秒間及び 60°C を 1 分間のサイクルを 45 サイクル実施した。Ct 値を決定するために、QuantStudio 6 and 7 Flex Real-Time PCR System software version 1.22 (Thermo Fisher Scientific) を使用してデータを解析した。RNA の発現値はハウスキーピング遺伝子 (*GAPDH*) の発現レベルに正規化した後、 $\Delta\Delta$ Ct 法を用いて算出した。結果は、コントロールまたは M-CSF 刺激サンプルに対する発現レベルで示した。

4.2.5 統計解析

In vitro 試験における統計解析は GraphPad Prism software for Windows version 6.07 (GraphPad Software)による One-way analysis of variance および Tukey's multiple comparison tests を用い, 危険率 5%未満を統計的に有意であるとみなした。

4.2.6 研究の承認

ヒト末梢血サンプルは, 関連ガイドラインおよび規則に従って, 書面でのインフォームドコンセントを提供した健康なボランティアから入手した。研究プロトコルは, 日本たばこ産業株式会社 (Tokyo, Japan) の倫理委員会により承認を得た。

表 2-1 表面抗原による標識実験で用いたモノクローナル抗体

Antibody	Dilution	Fluorophore	Clone	Company	Catalog Number
CCR6(CD196)	1:50	PE	11A9	BD Biosciences	559562
CD127	1:20	Alexa Fluor [®] 647	HIL-7R- M21	BD Biosciences	558598
CD25	1:50	PE-CF594	M-A251	BD Biosciences	562403
CD3	1:5	PerCP-Cy5.5	SK7	BD Biosciences	340949
CD4	1:100	BUV395	RPA-T4	BD Biosciences	564724
CD56	1:100	BV510	NCAM16.2	BD Biosciences	563041
CD8	1:200	BV711	RPA-T8	BD Biosciences	563677
CXCR3 (CD183)	1:50	Alexa Fluor [®] 700	1C6/CXCR3	BD Biosciences	561320
TCR $\alpha\beta$	1:100	BV605	IP26	Biologend	306732
TCR $\gamma\delta$	1:50	BV421	B1	BD Biosciences	562560

4.3 実験結果

4.3.1 DPP4 阻害薬の T 細胞分化に対する作用検証

BP では水疱部位において T helper 17(Th17)細胞の浸潤増加と regulatory T(Treg)細胞の低下といった T 細胞の異常報告されており(35), この T 細胞の不均衡が水疱形成機序の一つであると考えられている。一方, DPP4 阻害薬であるシタグリプチン投与は, ヒトにおいて Th17 細胞や Treg 細胞の血中細胞数を低下させることが報告されており(36), この結果は *in vitro* の報告とも一致する(37)。そこで, ヒト末梢血から単離した hPBMC を用い, PHA による活性化刺激後の T 細胞分化に対する DPP4 阻害薬の作用を検証した。表面抗原マーカーに基づく各 T 細胞サブセットのゲーティングストラテジーは既報を参考にして実施した(図 2-1)(38)。その結果, ビルダグリプチンおよびシタグリプチンは Th1 細胞, Th17 細胞および Treg 細胞いずれのサブセットへの分化にも影響を与えなかった(図 2-2)。これはシタグリプチンに関する既報(37)と異なる結果であった。そこで, 細胞内染色を用いて Th17 細胞と Treg 細胞分化に対する作用を確認した。その結果, 表面抗原を用いた結果と同様, Th17 細胞(IL-17⁺/Foxp3⁻の CD4⁺T 細胞)および Treg 細胞(IL-17⁻/Foxp3⁺の CD4⁺T 細胞)の分化に, ビルダグリプチンおよびシタグリプチンは影響を与えなかった(図 2-3)。

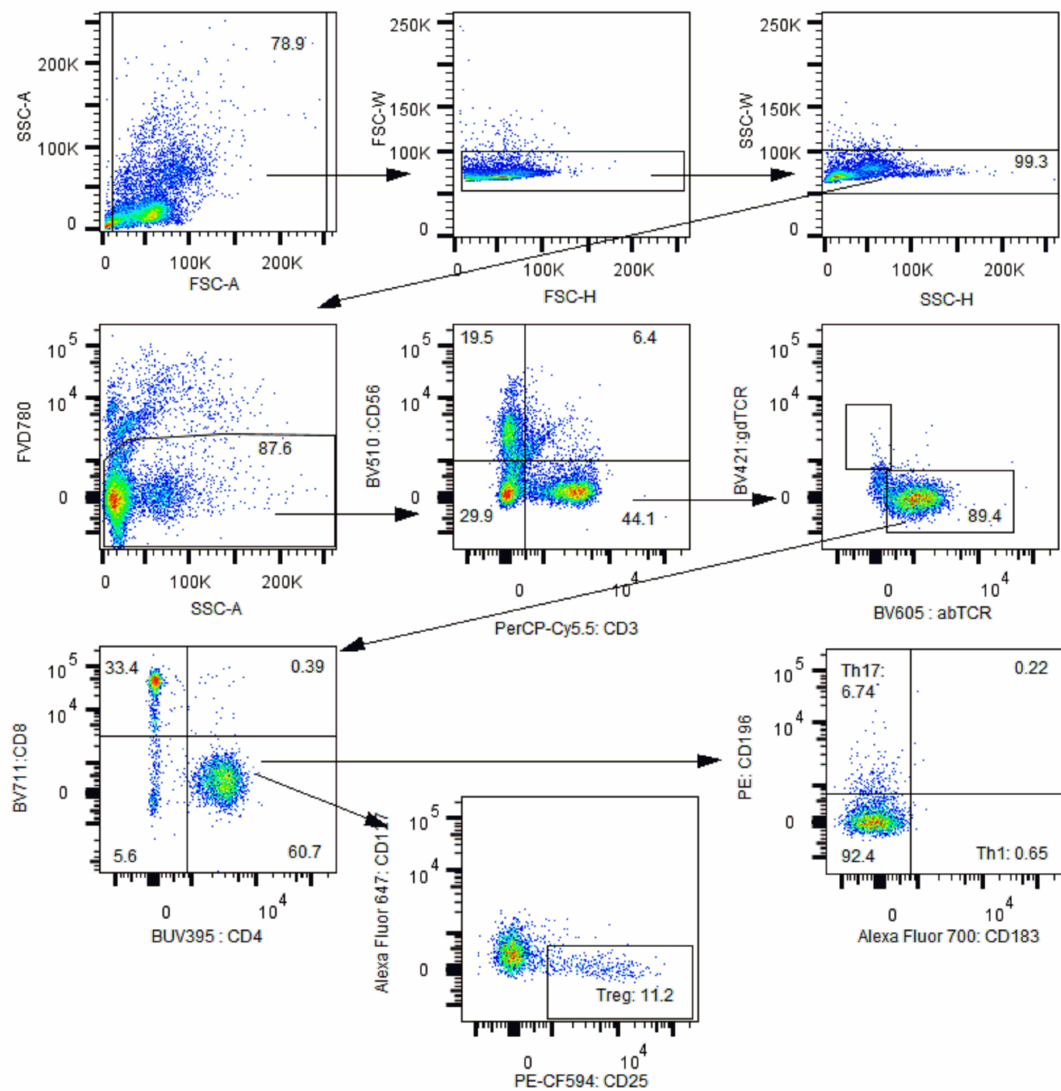


図 2-1 表面抗原マーカーに基づく各 T 細胞サブセットのゲーティングストラテジー
 hPBMCs を用いた試験における Th1, Th17, および Treg 細胞の識別ゲーティングストラテジーの例を示した。まず、 $CD4^+$ T 細胞は $CD3^+/CD56^-/\alpha\beta TCR^+/\gamma\delta TCR^-/CD8^-/CD4^+$ で識別した。この $CD4^+$ T 細胞から $CD196^-/CD183^+$ を Th1 細胞, $CD196^+/CD183^-$ を Th17 細胞, $CD25^+/CD127^-$ を Treg 細胞として同定した。

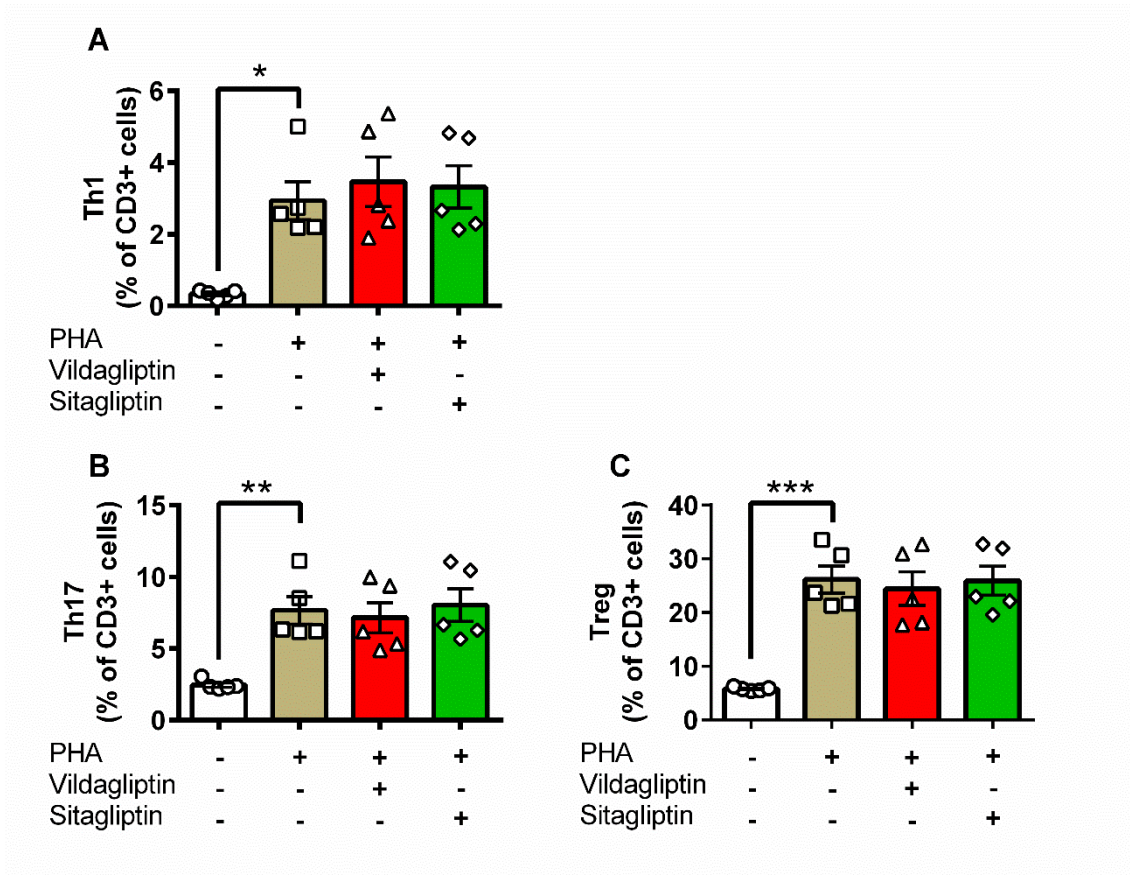


図 2-2 表面抗原マーカーを用いた **DPP4** 阻害薬の T 細胞分化への作用検証
 hPBMCs を DPP4 阻害薬存在下, および非存在下で PHA 刺激し, 48 時間後に各 T 細胞サブセットを図 2-1 で示すゲーティングストラテジーで同定し, サンプルごとに Living CD3⁺細胞数に対する割合として算出した。(A) Th1 細胞の割合。(B) Th17 細胞の割合。(C) Treg 細胞のパーセンテージ。各データは, 平均値±SEM で示した。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

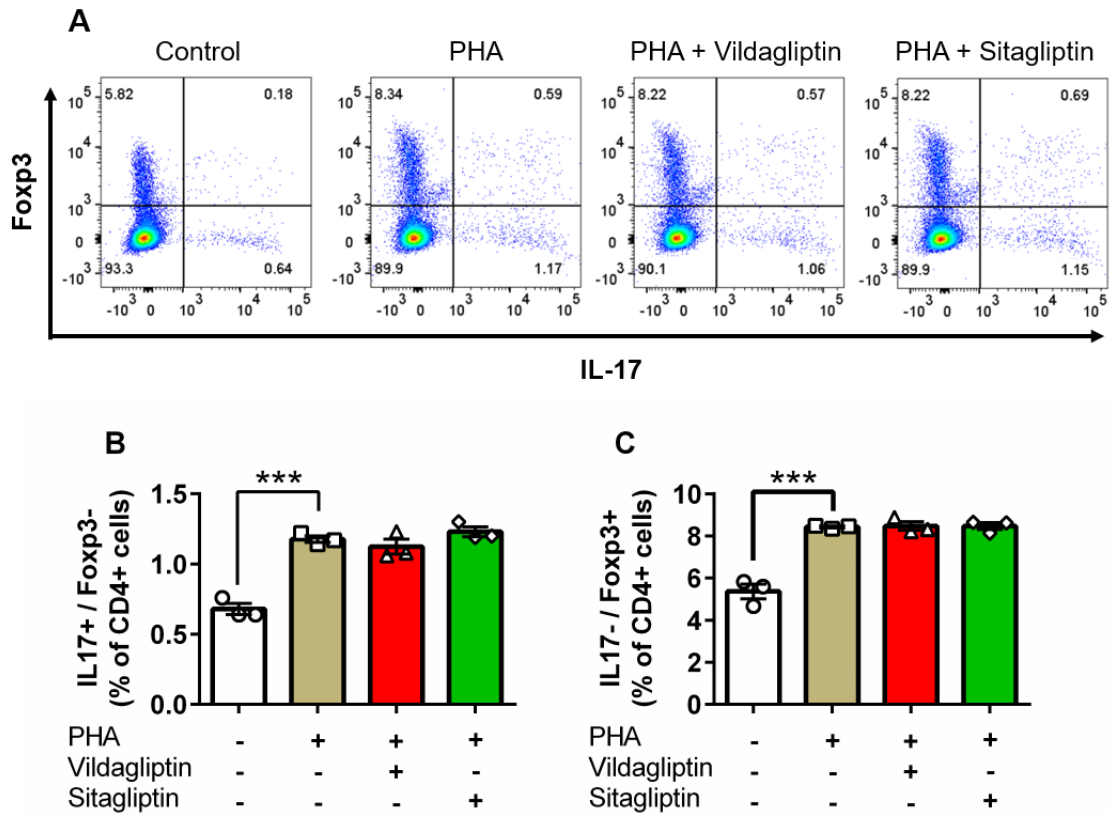


図 2-3 IL-17と Fopx3 発現を用いた DPP4 阻害薬による T 細胞分化に対する作用検証
 (A) 各条件における代表的な Dot plot。 (B) Living CD4⁺細胞に対する IL-17⁺/Fopx3⁻細胞の割合。 (C) Living CD4⁺細胞に対する IL-17⁻/Fopx3⁺細胞の割合。各データは、平均値 ±SEM で示した。 ****p* < 0.001.

4.3.2 DPP4 阻害薬およびリシノプリルによるマクロファージに対する作用検証

いくつかの研究より BP の水疱形成には免疫細胞からのマトリックスメタロペプチダーゼ 9 (matrix metalloproteinase 9: MMP9) の産生が関与していることが報告されている(39)。さらに, ACE 阻害薬が MMP9 の発現を抑制すること, および MMP9 活性を阻害することが示唆されている(40-43)。このような背景より, DPP4 阻害薬による BP 発症と, リシノプリルによる抑制の分子機構には, MMP9 の機能調節が密接に関係していると考えられる。実際, BP の症例では, 単球, マクロファージ, 好中球, 好酸球等が MMP9 の供給源であることが報告されている(44-47)。このうち, 好酸球に関しては, DPP4 阻害薬を投与された BP 患者において DPP4 阻害薬を投与されていない患者に比べ, 皮膚への浸潤が有意に少ないことが報告されている(48)。このような表現型は特に非炎症型を示す DPP4 阻害薬誘発 BP 患者においてより顕著であることも報告されている(49)。これらのデータは, DPP4 阻害薬投与における好酸球の寄与は, 特発性 BP 患者よりも少ないことを示唆している。一方で, 単球は *ex vivo* モデルにおいて, 好中球による水疱形成を促進することが報告されており(45), 単球からの MMP9 産生が BP の水疱形成に重要な役割を担っている可能性が示唆されている。そこで著者は hPBMC を用いて, 単球/マクロファージによる MMP9 産生に対する DPP4 阻害薬の作用を検証した。DPP4 阻害薬は, FAERS データの解析で最も高い ROR を示したビルダグリプチンを代表として用いた。健康なボランティアの hPBMC より単離した単球を, ビルダグリプチン存在下もしくは非存在下において, M-CSF を用いて刺激し, 7 日間培養することでマクロファージへ分化させた。ビルダグリプチンの濃度は, 臨床における血漿中濃度がおおよそ 10 $\mu\text{mol/L}$ 未満(50, 51)であることから 1, 10 $\mu\text{mol/L}$ を選択した。その結果, ビルダグリプチンを処理した細胞は, 未処理の細胞と比較して, 濃度依存的な MMP9 mRNA 発現の上昇を示した(図 2-4A)。

続いて, DPP4 阻害薬による MMP9 mRNA の変化に対するリシノプリルの作用を検討した。リシノプリルの ACE に対する最大阻害効果を評価するため, 臨床使用推奨血漿中濃度の 10 倍以上ではあるものの, MMP9 の活性を直接阻害しない 10 $\mu\text{mol/L}$ を用いた(40, 52)。ビルダグリプチンによって誘導された MMP9 mRNA 発現の増加は, リシノプリルの併用によって抑制された一方, リシノプリル単独では MMP9 mRNA レベルには影響を与えなかった(図 2-4B)。

次に単球が M1 型と M2 型のどちらのマクロファージへ分化したか確認するため, TNF (M1 型)および CD163(M2 型)の mRNA レベルを測定した。その結果ビルダグリプチン添加により M2 型マーカーである CD163 mRNA レベルが増加し, リシノプリル併用はこの増加をした(図 2-4C)。一方, M1 型マーカーである TNF mRNA レベルは, ビルダグリプチンにより減少する傾向があったものの, その効果は有意ではなかった(図 2-4D)。

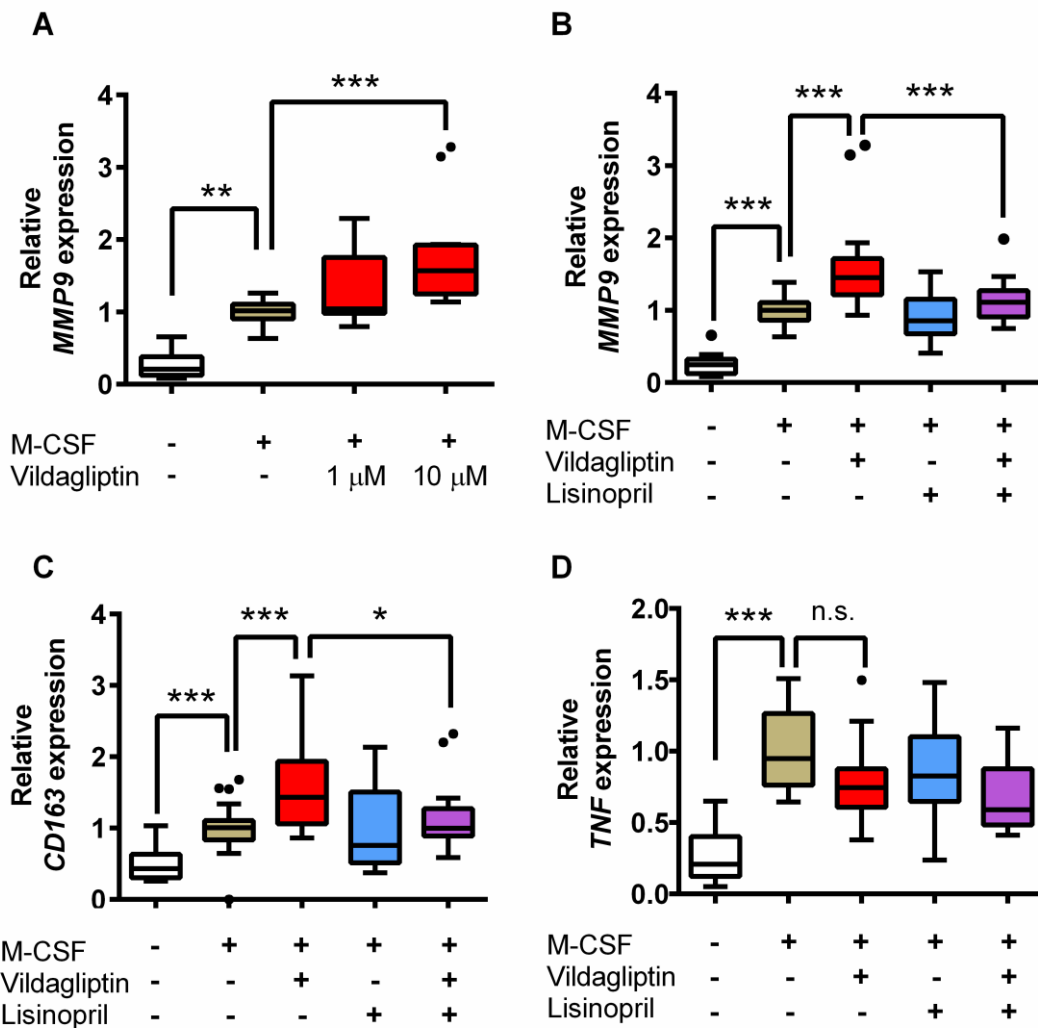


図 2-4 単球/マクロファージに対するビルダグリプチンおよびリシノプリルの作用
 単球は MACS システムを用いて hPBMC から単離し、各化合物を前処置した後、50 ng/mL M-CSF の存在下で 7 日間培養した。各遺伝子は、ドナー(「 n 」で表示)ごとに 3~6 データ取得し、解析した。取得したデータは *GAPDH* mRNA 発現量で標準化し、M-CSF 刺激群(M-CSF+/化合物-)を「1」とした相対値として示した。(A) *MMP9* mRNA 発現に対するビルダグリプチン(1, 10 μ mol/L)の濃度依存的な作用($n = 4$; ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)。 (B-D) 単球/マクロファージに対するリシノプリル(10 μ mol/L)とビルダグリプチン(10 μ mol/L)の併用効果。(B) *MMP9* mRNA 発現($n = 8$; *** $p < 0.001$)。(C) *CD163* mRNA 発現($n = 6$; * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$)。(D) *TNF* mRNA 発現($n = 6$; *** $p < 0.001$; n.s., not significant)。各グラフの箱は 25%と 75%、箱の中の線は中央値、ひげは Tukey's test による上下の隣接値(箱の端から四分位範囲を 3/2 倍した値)を示す。Dot はひげの範囲を超えた外れ値を示す。

4.3.3 DPP4 阻害薬およびリシノプリルの単球/マクロファージのレニン-アンジオテンシン系に対する作用検証

ACE はレニン-アンジオテンシン系(RAS)の酵素であり, ACE2 とともに Angiotensin II, Angiotensin III, Ang1-7, および Ang1-9などを産生し, 各分子に対する受容体を介して免疫細胞を含めた様々な細胞の機能に影響を与えることが知られている(53)。図 2-4 で示した通り, DPP4 阻害薬による単球の M2 型マクロファージへの分化および MMP9 産生はリシノプリルによって抑制されることから, DPP4 阻害薬が単球の RAS に対し影響を与えていることが推定される。そこで, DPP4 阻害薬による単球の RAS に対する作用を検証するため, ビルダグリプチン添加時およびリシノプリル共添加時の ACE および ACE2 の発現変化を DPP4 自体の発現とともに検証した(図 2-5)。その結果, ビルダグリプチンは ACE mRNA および DPP4 mRNA の発現は変化させない一方, ACE2 mRNA の発現を有意に上昇させた。またビルダグリプチンによる ACE2 mRNA 発現上昇はリシノプリルによって抑制された。

近年の研究では ACE および ACE2 によって産生される Ang1-7 と, その受容体である Mas 受容体(MasR)が M1 型マクロファージと M2 型マクロファージへの分化を調節していることが示唆されている(54, 55)。さらに, *in vivo* の慢性腎臓病モデルにおいて, DPP4 阻害薬が ACE2 の発現変化を介して Ang1-7 産生を増強することが報告されている(56)。そこで DPP4 阻害薬による MMP9 産生に対する Ang1-7/MasR 軸の寄与を MasR 阻害薬である A779 を用いて薬理的に検証した。その結果, ビルダグリプチンによる MMP9 mRNA 発現の上昇は A779 との併用により抑制された。一方, A779 単独では MMP9 mRNA 発現に影響しなかった(図 2-6)。また, DPP4 阻害薬およびリシノプリルはいずれも MasR mRNA 発現に対し影響を与えなかった(図 2-5D)。

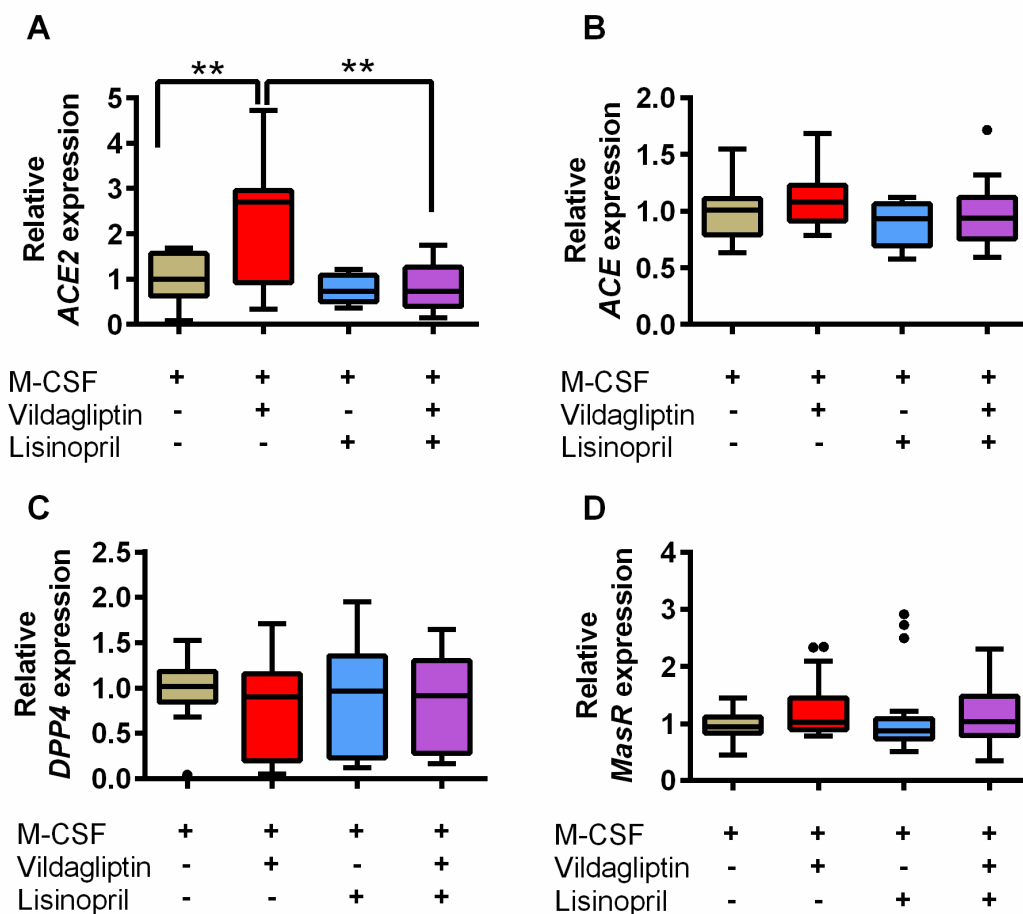


図 2-5 ビルダグリプチンおよびリシノプリルによる単球/マクロファージの ACE, ACE2, および DPP4 発現に対する作用検証

単球は MACS システムを用いて hPBMC から単離し, 各化合物を前処置した後, 50 ng/mL M-CSF の存在下で 7 日間培養した。ビルダグリプチンおよびリシノプリルはともに終濃度 10 μ mol/L を用いた。各遺伝子は, 3~6 ドナーを用い, 各ドナー 3~6 データ取得し解析した。取得したデータは *GAPDH* で正規化し, M-CSF 刺激群 (M-CSF+/化合物-) を「1」とした相対値として示した。*ACE2* (A), *ACE* (B), *DPP4* (C), および *MasR* (D) に対する各化合物の結果を box-and-whisker plot で示した。各グラフの箱は 25%と 75%, 箱の中の線は中央値, ひげは Tukey's test による上下の隣接値 (箱の端から四分位範囲を 3/2 倍した値) を示す。Dot はひげの範囲を超えた外れ値を示す。** $p < 0.01$ 。

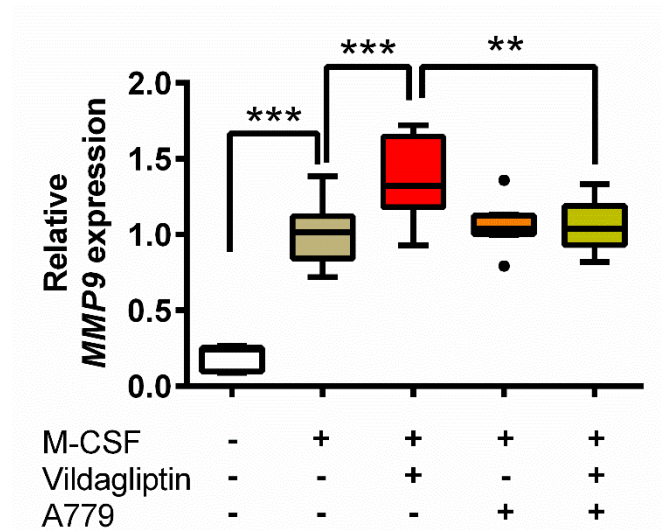


図 2-6 MasR 阻害薬の DPP4 阻害薬による MMP9 発現に対する作用検証
 単球は MACS システムを用いて hPBMC から単離し, 各化合物を前処置した後, 50 ng/mL M-CSF の存在下で 7 日間培養した。ビルダグリプチンおよび A779 はともに終濃度 10 μ mol/L を用いた。3 ドナーを用い, 各ドナー 3~6 データ取得し解析した。取得したデータは GAPDH で正規化し, M-CSF 刺激群(M-CSF+/化合物-)を「1」とした相対値とし, box-and-whisker plot で示した。グラフの箱は 25%と 75%, 箱の中の線は中央値, ひげは Tukey's test による上下の隣接値(箱の端から四分位範囲を 3/2 倍した値)を示す。Dot はひげの範囲を超えた外れ値を示す。** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

4.4 小括

本研究では、第一章で導出された仮説を基に *in vitro* 検証を行うことで、リシノプリルが ACE2 の発現制御と、それに続く Ang1-7/MasR 軸を介して、BP の水疱形成に関与する単球/マクロファージからの MMP9 産生を抑制しうることを初めて明らかにした。

BP 発症への関与が示唆されている Th1 細胞および Th17 細胞の分化に、DPP4 阻害薬が影響を与えていることが報告されている(37)。そこで、本研究ではまずリシノプリルが DPP4 阻害薬による T 細胞分化に影響を与えているとの仮説の元、検証を行った。しかしながら、著者の実施した実験においては、DPP4 阻害薬が Th1 細胞、Th17 細胞および Treg 細胞の分化に影響を与えなかった。細胞の調製方法、刺激条件、検出方法は既報と同等であったことから、異なる結果を得た要因の一つは、用いた化合物の濃度にあると考えられた。著者は臨床において想定される血中濃度(57)から 10 $\mu\text{mol/L}$ のシタグリプチンを用いた。一方で、既報では 50 $\mu\text{g/mL}$ (約 80 $\mu\text{mol/L}$)であり、臨床では想定されづらい濃度のため、BP の発症とは関係が低いと考えられた。また、本作用は DPP4 阻害とは異なる非特異的作用を示している可能性が考えられた。実際、シタグリプチンは DPP4 のファミリー酵素である FAP に対し IC_{50} が約 80 $\mu\text{mol/L}$ であることが報告されており(58)、既報の結果はこのような作用が影響している可能性も考えられる。よって、DPP4 阻害薬が DPP4 阻害に基づいて T 細胞分化に対する作用し、BP 発症に影響するについては、臨床で想定される血中濃度に基づいた条件下におけるさらなる検証が必要であると考えられた。

著者は次に、BP の水疱形成に寄与していることが報告されている単球/マクロファージからの MMP9 産生に着目した(44, 47)。その結果、DPP4 阻害薬がこの病態生理メカニズムを促進することを、ビルダグリプチンを用いて明らかにした。加えて、MMP9 mRNA 発現の上昇は M2 型マクロファージへの分化と関連していることを示した。これは既報の結果とも一致する(47)。M1 型マクロファージのマーカーである *TNF* mRNA は、低下傾向を示したものの、有意性はなかった。この結果の一因は、単球の培養条件にある可能性が考えられる。本研究では、マクロファージへの分化を促進するため、M-CSF 刺激を用いた。本条件は M2 型マクロファージへの分化をより促進することが知られていることから(60)、M1 型マクロファージへの分化に対する作用を検証するには GM-CSF 等を用いた条件でのさらなる評価が必要であると考えられた。さらに、本試験においては、M1 型と M2 型を一遺伝子の発現のみで評価した。そのため、分化に対する作用をより明確にするには他の遺伝子や、Flow cytometry によるさらなる検証が必要であると考えられた。

加えて、著者の単球/マクロファージ用いた試験は、リシノプリルが DPP4 阻害薬による M2 型マクロファージへの分化および MMP9 mRNA 発現亢進を抑制することを明らかにした。これは、第一章で示されたリシノプリルによる DPP4 阻害薬誘発 BP の発症抑制作用を支持するものである。

さらに著者は、リシノプリルによる DPP4 阻害薬の MMP9 産生抑制作用のメカニズム探索のため、ACE が属するレニンアンジオテンシン系に着目した。これまでに、*in vivo* 試験におい

て DPP4 阻害薬は ACE2 の発現を亢進することで Ang1-7 産生を亢進する一方, ACE や MasR の発現に影響しないことが報告されている(54)。さらに, Ang1-7 は MasR を介して M2 型マクロファージへの分化を促進することが報告されていることから(55), 特に Ang1-7/MasR 軸に着目し解析を行った。その結果, DPP4 阻害薬は過去の報告と同様に ACE2 の発現を亢進したことに加え, リシノプリルが DPP4 阻害薬による ACE2 mRNA の発現上昇を抑制することを初めて示した。これは, MMP9 mRNA 発現や M2 型マクロファージへの分化と同様の挙動であったことから, リシノプリルは ACE2 の発現制御を介して Ang1-7/MasR 軸を制御し, BP の発症に繋がる DPP4 阻害薬による MMP9 産生を抑制していると考えられた。

加えて, 著者の行った MasR 阻害薬である A779 を用いた検討において, A779 が DPP4 阻害薬による MMP9 産生亢進を抑制することを示した。この結果は Ang1-7/MasR 軸を介してリシノプリルが MMP9 産生を抑制するという仮説を支持するものであるとともに, Ang1-7/MasR 軸自体が, DPP4 阻害薬誘発 BP 発症に対する予防・治療薬のターゲット候補となり得ることを示唆している。一方で, 本研究では, ELISA を用いて Ang1-7 の検出を試みたものの, 検出限界の関係から Ang1-7 自体の変動を評価できていない。また, ACE 阻害薬が Ang1-7 の産生を亢進させるとする報告もなされている(60, 61)。そのため, DPP4 阻害薬による Ang1-7 産生を ACE 阻害薬が調節しているかを明らかにし, リシノプリルが ACE2 mRNA の発現をどのように阻害するかを解明するためには, レニンアンジオテンシン系成分の産生に焦点を当てたさらなる研究が必要である。

以上のように, 本章では第一章で示されたリシノプリルによる DPP4 阻害薬誘発 BP 抑制作用を, 単球/マクロファージを用いた *in vitro* 試験により支持するとともに, Ang1-7/MasR が本副作用の発症メカニズム解明の上で重要な新規ターゲットとなり得ることを示した。

5 総括および結論

本研究では臨床ビッグデータ解析と薬理学的実証を組み合わせることで、薬剤阻害薬誘発 BP について以下の知見を得た。

第一章では FAERS データ及び MarketScan データを用いることにより、DPP4 阻害薬が BP 発症リスクを増加させること、及び、BP 発症は投与量及び血糖値低下作用の強弱に拠らないことを示した。また、リシノプリルが DPP4 阻害薬の血糖値低下作用に影響を与えず、DPP4 阻害薬誘発 BP の発症を抑制することを新たに示した。

第二章では、BP 発症への寄与が示唆されている単球/マクロファージに着目することで、リシノプリルが DPP4 阻害薬による MMP9 産生を抑制することを新たに示した。また、この作用が Ang1-7/MasR を介していることを示唆し、DPP4 阻害薬誘発 BP の発症メカニズムを解明する上で重要な新規ターゲットとなり得ることを示した。

本研究には、いくつか注意すべき限界がある。例えば、FAERS と MarketScan データベースのデータマイニング解析では、ICD10 ベースのコードを用いた。しかしながら、転帰の誤分類により、BP と他の水疱性疾患を区別が不十分であることが考えられる(32)。BP 発症をより明確に特定するためには BP 報告アルゴリズムのさらなる検証が必要となる。また、BP の発生率が低いことも、コホート研究の成果に影響を及ぼしている。例えば、著者らの FAERS を用いた解析では、総イベント数が少ないため、リシノプリルと各 DPP4 阻害薬との併用効果を解析することができなかった。今後、複数のデータベースを用いた解析を行うことで、これらの問題を克服できる可能性がある。また、本研究では、DPP4 阻害薬による ACE2 mRNA 発現亢進、およびリシノプリルによる ACE2 mRNA 亢進抑制のメカニズムは不明のままである。一方で、転写因子 FOXO1 は ACE2 mRNA 発現制御し、Ang1-7 産生に影響することが報告されている(62)。そのため、FOXO1 経路の検証が本メカニズム解明に有用な可能性がある。また、DPP4 阻害薬とリシノプリルによる他の免疫細胞への作用も、BP 発症に影響を与えている可能性が考えられる。本研究結果を裏付けるためには、*in vivo* 研究を推進し、生体全体での両薬剤の作用を検証するとともに、BP 患部皮膚中の M2 マクロファージ量及び MMP9 産生量をリシノプリル併用の有無で比較するなど、さらなる研究が必要であると考えられた。

以上, 本研究では, 臨床ビッグデータマイニングと *in vitro* での実験的検証に基づき, リシノプリルが DPP4 阻害薬誘発 BP 発症のリスクを低減するために有効であることを示し, MMP9 と ACE2 の発現がその基礎的メカニズムに重要な役割を果たすことを新たに示した。さらに, このメカニズムには Ang1-7/MasR 軸が関与していることを示唆した(図 3)。DPP4 阻害薬誘発 BP の発症メカニズムおよび抑制法を示すこれらの知見を基に, BP 治療薬創出に繋がるさらなる研究が期待される。

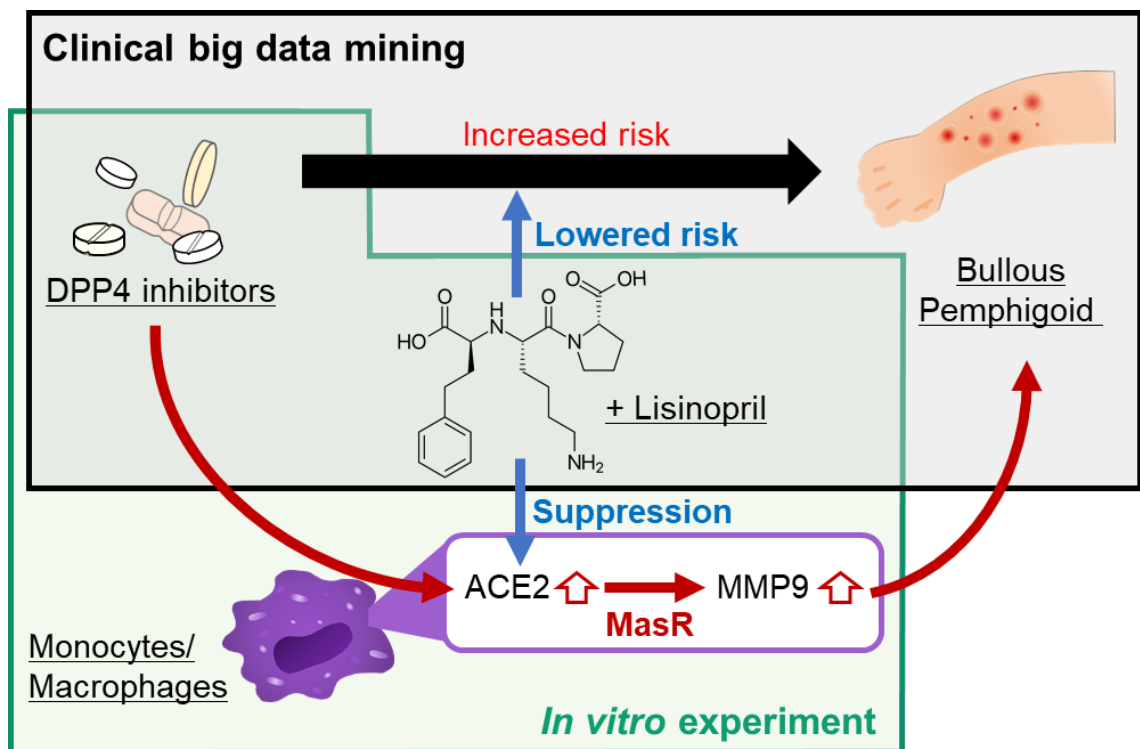


図 3 本研究から得られた知見の概略図

6 参考文献

1. Deotto ML, Spiller A, Sernicola A, Alaibac M. Bullous pemphigoid: An immune disorder related to aging (Review). *Exp Ther Med*. 2022 Jan;23(1):50. doi: 10.3892/etm.2021.10972. Epub 2021 Nov 15. PMID: 34934428; PMCID: PMC8652395.
2. Stavropoulos PG, Soura E, Antoniou C. Drug-induced pemphigoid: a review of the literature. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2014 Sep;28(9):1133-40. doi: 10.1111/jdv.12366. Epub 2014 Jan 10. PMID: 24404939.
3. Tasanen K, Varpuluoma O, Nishie W. Dipeptidyl Peptidase-4 Inhibitor-Associated Bullous Pemphigoid. *Front Immunol*. 2019 Jun 4;10:1238. doi: 10.3389/fimmu.2019.01238. PMID: 31275298; PMCID: PMC6593303.
4. Persson MSM, Harman KE, Vinogradova Y, Langan SM, Hippisley-Cox J, Thomas KS, Gran S. Incidence, prevalence and mortality of bullous pemphigoid in England 1998-2017: a population-based cohort study. *Br J Dermatol*. 2021 Jan;184(1):68-77. doi: 10.1111/bjd.19022. Epub 2020 Apr 27. PMID: 32147814.
5. Thornberry NA, Gallwitz B. Mechanism of action of inhibitors of dipeptidyl-peptidase-4 (DPP-4). *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2009 Aug;23(4):479-86. doi: 10.1016/j.beem.2009.03.004. PMID: 19748065.
6. Wang X, Zheng P, Huang G, Yang L, Zhou Z. Dipeptidyl peptidase-4(DPP-4) inhibitors: promising new agents for autoimmune diabetes. *Clin Exp Med*. 2018 Nov;18(4):473-480. doi: 10.1007/s10238-018-0519-0. Epub 2018 Jul 17. PMID: 30022375.
7. Shao S, Xu Q, Yu X, Pan R, Chen Y. Dipeptidyl peptidase 4 inhibitors and their potential immune modulatory functions. *Pharmacol Ther*. 2020 May;209:107503. doi: 10.1016/j.pharmthera.2020.107503. Epub 2020 Feb 14. PMID: 32061923; PMCID: PMC7102585.
8. Kaneko S, Nagashima T. Drug Repositioning and Target Finding Based on Clinical Evidence. *Biol Pharm Bull*. 2020;43(3):362-365. doi: 10.1248/bpb.b19-00929. PMID: 32115497.
9. Zhao S, Nishimura T, Chen Y, Azeloglu EU, Gottesman O, Giannarelli C, Zafar MU, Benard L, Badimon JJ, Hajjar RJ, Goldfarb J, Iyengar R. Systems pharmacology of adverse event mitigation by drug combinations. *Sci Transl Med*. 2013 Oct 9;5(206):206ra140. doi: 10.1126/scitranslmed.3006548. PMID: 24107779; PMCID: PMC3963511.
10. Nagashima T, Shirakawa H, Nakagawa T, Kaneko S. Prevention of antipsychotic-induced hyperglycaemia by vitamin D: a data mining prediction followed by experimental exploration of the molecular mechanism. *Sci Rep*. 2016 May 20;6:26375. doi: 10.1038/srep26375. PMID: 27199286; PMCID: PMC4873813.

11. Nagaoka K, Nagashima T, Asaoka N, Yamamoto H, Toda C, Kayanuma G, Siswanto S, Funahashi Y, Kuroda K, Kaibuchi K, Mori Y, Nagayasu K, Shirakawa H, Kaneko S. Striatal TRPV1 activation by acetaminophen ameliorates dopamine D2 receptor antagonist-induced orofacial dyskinesia. *JCI Insight*. 2021 May 24;6(10):e145632. doi: 10.1172/jci.insight.145632. PMID: 33857021; PMCID: PMC8262333.
12. Siswanto S, Yamamoto H, Furuta H, Kobayashi M, Nagashima T, Kayanuma G, Nagayasu K, Imai Y, Kaneko S. Drug Repurposing Prediction and Validation From Clinical Big Data for the Effective Treatment of Interstitial Lung Disease. *Front Pharmacol*. 2021 Sep 21;12:635293. doi: 10.3389/fphar.2021.635293. PMID: 34621164; PMCID: PMC8490809.
13. US FDA. Questions and Answers on FDA's Adverse Event Reporting System (FAERS). [Available from: <https://www.fda.gov/drugs/surveillance/questions-and-answers-fdas-adverse-event-reporting-system-faers>]
14. Banda JM, Evans L, Vanguri RS, Tatonetti NP, Ryan PB, Shah NH. A curated and standardized adverse drug event resource to accelerate drug safety research. *Sci Data*. 2016 May 10;3:160026. doi: 10.1038/sdata.2016.26. PMID: 27193236; PMCID: PMC4872271.
15. Borgan Ø. Modeling Survival Data: Extending the Cox Model. Terry M. Therneau and Patricia M. Grambsch, Springer-Verlag, New York, 2000. No. of pages: xiii + 350. Price: \$69.95. ISBN 0-387-98784-3. *Statistics in Medicine*. 2001;20(13):2053-4
16. Ho, D., Imai, K., King, G., & Stuart, E. A. (2011). MatchIt: Nonparametric Preprocessing for Parametric Causal Inference. *Journal of Statistical Software*, 42(8), 1–28. <https://doi.org/10.18637/jss.v042.i08>
17. Olmos, A., & Govindasamy, P. (2015). Propensity Scores: A Practical Introduction Using R. *Journal of MultiDisciplinary Evaluation*, 11(25), 68–88. Retrieved from https://journals.sfu.ca/jmde/index.php/jmde_1/article/view/431
18. Austin PC. Optimal caliper widths for propensity-score matching when estimating differences in means and differences in proportions in observational studies. *Pharm Stat*. 2011 Mar-Apr;10(2):150-61. doi: 10.1002/pst.433. PMID: 20925139; PMCID: PMC3120982.
19. ATC/DDD Index 2022 [Available from: [https://www.whocc.no/atc_ddd_index/.](https://www.whocc.no/atc_ddd_index/)]
20. Yokoyama S, Tanaka Y, Nakagita K, Hosomi K, Takada M. Bleeding Risk of Warfarin and Direct Oral Anticoagulants in Younger Population: A Historical Cohort Study Using a Japanese Claims Database. *Int J Med Sci*. 2018 Nov 22;15(14):1686-1693. doi: 10.7150/ijms.28877. PMID: 30588192; PMCID: PMC6299405.
21. Michel C, Scosyrev E, Petrin M, Schmouder R. Can Disproportionality Analysis of Post-marketing Case Reports be Used for Comparison of Drug Safety Profiles? *Clin Drug Investig*. 2017 May;37(5):415-422. doi: 10.1007/s40261-017-0503-6. PMID: 28224371.

22. Verheyden MJ, Bilgic A, Murrell DF. A Systematic Review of Drug-Induced Pemphigoid. *Acta Derm Venereol.* 2020 Aug 17;100(15):adv00224. doi: 10.2340/00015555-3457. PMID: 32176310; PMCID: PMC9207627.
23. Thorslund K, Seifert O, Nilzén K, Grönhagen C. Incidence of bullous pemphigoid in Sweden 2005-2012: a nationwide population-based cohort study of 3761 patients. *Arch Dermatol Res.* 2017 Nov;309(9):721-727. doi: 10.1007/s00403-017-1778-4. Epub 2017 Sep 5. PMID: 28875235; PMCID: PMC5648739.
24. Lloyd-Lavery A, Chi CC, Wojnarowska F, Taghipour K. The associations between bullous pemphigoid and drug use: a UK case-control study. *JAMA Dermatol.* 2013 Jan;149(1):58-62. doi: 10.1001/2013.jamadermatol.376. PMID: 23324757.
25. Moro F, Fania L, Sinagra JLM, Salemme A, Di Zenzo G. Bullous Pemphigoid: Trigger and Predisposing Factors. *Biomolecules.* 2020 Oct 10;10(10):1432. doi: 10.3390/biom10101432. PMID: 33050407; PMCID: PMC7600534.
26. Silverii GA, Dicembrini I, Nreu B, Monterecci C, Mannucci E, Monami M. Bullous pemphigoid and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Endocrine.* 2020 Sep;69(3):504-507. doi: 10.1007/s12020-020-02272-x. Epub 2020 Mar 31. PMID: 32236820.
27. Huang L, Liu Y, Li H, Huang W, Geng R, Tang Z, Jiang Y. Bullous Pemphigoid and Diabetes medications: A disproportionality analysis based on the FDA Adverse Event Reporting System. *Int J Med Sci.* 2021 Mar 3;18(9):1946-1952. doi: 10.7150/ijms.55421. PMID: 33850463; PMCID: PMC8040401.
28. Jedlowski PM, Jedlowski MF, Fazel MT. DPP-4 Inhibitors and Increased Reporting Odds of Bullous Pemphigoid: A Pharmacovigilance Study of the FDA Adverse Event Reporting System (FAERS) from 2006 to 2020. *Am J Clin Dermatol.* 2021 Nov;22(6):891-900. doi: 10.1007/s40257-021-00625-4. Epub 2021 Jul 21. PMID: 34287770.
29. Gupta V, Kalra S. Choosing a gliptin. *Indian J Endocrinol Metab.* 2011 Oct;15(4):298-308. doi: 10.4103/2230-8210.85583. PMID: 22029001; PMCID: PMC3193779.
30. Phan K, Charlton O, Smith SD. Dipeptidyl peptidase-4 inhibitors and bullous pemphigoid: A systematic review and adjusted meta-analysis. *Australas J Dermatol.* 2020 Feb;61(1):e15-e21. doi: 10.1111/ajd.13100. Epub 2019 Jun 19. PMID: 31215644.
31. Yang W, Cai X, Zhang S, Han X, Ji L. Dipeptidyl peptidase-4 inhibitor treatment and the risk of bullous pemphigoid and skin-related adverse events: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Diabetes Metab Res Rev.* 2021 Mar;37(3):e3391. doi: 10.1002/dmrr.3391. Epub 2020 Aug 28. PMID: 32741073.
32. Persson MSM, Harman KE, Vinogradova Y, Langan SM, Hippisley-Cox J, Thomas KS, Gran S. Validation study of bullous pemphigoid and pemphigus vulgaris recording in

- routinely collected electronic primary healthcare records in England. *BMJ Open*. 2020 Jul 14;10(7):e035934. doi: 10.1136/bmjopen-2019-035934. PMID: 32665386; PMCID: PMC7365488.
33. Guo JY, Chen HH, Yang YC, Wu PY, Chang MP, Chen CC. The association of dipeptidyl peptidase IV inhibitors and other risk factors with bullous pemphigoid in patients with type 2 diabetes mellitus: A retrospective cohort study. *J Diabetes Complications*. 2020 Mar;34(3):107515. doi: 10.1016/j.jdiacomp.2019.107515. Epub 2019 Dec 28. PMID: 31932172.
 34. Genovese G, Di Zenzo G, Cozzani E, Berti E, Cugno M, Marzano AV. New Insights Into the Pathogenesis of Bullous Pemphigoid: 2019 Update. *Front Immunol*. 2019 Jul 2;10:1506. doi: 10.3389/fimmu.2019.01506. PMID: 31312206; PMCID: PMC6614376.
 35. Arakawa M, Dainichi T, Ishii N, Hamada T, Karashima T, Nakama T, Yasumoto S, Tsuruta D, Hashimoto T. Lesional Th17 cells and regulatory T cells in bullous pemphigoid. *Exp Dermatol*. 2011 Dec;20(12):1022-4. doi: 10.1111/j.1600-0625.2011.01378.x. Epub 2011 Oct 20. PMID: 22017210.
 36. Aso Y, Fukushima M, Sagara M, Jojima T, Iijima T, Suzuki K, Momobayashi A, Kasai K, Inukai T. Sitagliptin, a DPP-4 inhibitor, alters the subsets of circulating CD4⁺ T cells in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract*. 2015 Dec;110(3):250-6. doi: 10.1016/j.diabres.2015.10.012. Epub 2015 Oct 20. PMID: 26508675.
 37. Pinheiro MM, Stoppa CL, Valduga CJ, Okuyama CE, Gorjão R, Pereira RM, Diniz SN. Sitagliptin inhibit human lymphocytes proliferation and Th1/Th17 differentiation *in vitro*. *Eur J Pharm Sci*. 2017 Mar 30;100:17-24. doi: 10.1016/j.ejps.2016.12.040. Epub 2017 Jan 5. PMID: 28065853.
 38. Maecker HT, McCoy JP, Nussenblatt R. Standardizing immunophenotyping for the Human Immunology Project. *Nat Rev Immunol*. 2012 Feb 17;12(3):191-200. doi: 10.1038/nri3158. Erratum in: *Nat Rev Immunol*. 2012 Jun;12(6):471. PMID: 22343568; PMCID: PMC3409649.
 39. Cirillo N, Prime SS. A Scoping Review of the Role of Metalloproteinases in the Pathogenesis of Autoimmune Pemphigus and Pemphigoid. *Biomolecules*. 2021 Oct 13;11(10):1506. doi: 10.3390/biom11101506. PMID: 34680139; PMCID: PMC8533820.
 40. Reinhardt D, Sigusch HH, Hensse J, Tyagi SC, Körfer R, Figulla HR. Cardiac remodelling in end stage heart failure: upregulation of matrix metalloproteinase (MMP) irrespective of the underlying disease, and evidence for a direct inhibitory effect of ACE inhibitors on MMP. *Heart*. 2002 Nov;88(5):525-30. doi: 10.1136/heart.88.5.525. PMID: 12381651; PMCID: PMC1767416.

41. Sakata Y, Yamamoto K, Mano T, Nishikawa N, Yoshida J, Hori M, Miwa T, Masuyama T. Activation of matrix metalloproteinases precedes left ventricular remodeling in hypertensive heart failure rats: its inhibition as a primary effect of Angiotensin-converting enzyme inhibitor. *Circulation*. 2004 May 4;109(17):2143-9. doi: 10.1161/01.CIR.0000125741.88712.77. Epub 2004 Mar 29. PMID: 15051632.
42. Yamamoto D, Takai S, Miyazaki M. Prediction of interaction mode between a typical ACE inhibitor and MMP-9 active site. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007 Mar 23;354(4):981-4. doi: 10.1016/j.bbrc.2007.01.088. Epub 2007 Jan 25. PMID: 17275782.
43. Yamamoto D, Takai S, Jin D, Inagaki S, Tanaka K, Miyazaki M. Molecular mechanism of imidapril for cardiovascular protection via inhibition of MMP-9. *J Mol Cell Cardiol*. 2007 Dec;43(6):670-6. doi: 10.1016/j.yjmcc.2007.08.002. Epub 2007 Aug 16. PMID: 17884087.
44. Riani M, Le Jan S, Plée J, Durlach A, Le Naour R, Haegeman G, Bernard P, Antonicelli F. Bullous pemphigoid outcome is associated with CXCL10-induced matrix metalloproteinase 9 secretion from monocytes and neutrophils but not lymphocytes. *J Allergy Clin Immunol*. 2017 Mar;139(3):863-872.e3. doi: 10.1016/j.jaci.2016.08.012. Epub 2016 Sep 13. PMID: 27637385.
45. de Graauw E, Sitaru C, Horn MP, Borradori L, Yousefi S, Simon D, Simon HU. Monocytes enhance neutrophil-induced blister formation in an *ex vivo* model of bullous pemphigoid. *Allergy*. 2018 May;73(5):1119-1130. doi: 10.1111/all.13376. Epub 2018 Jan 17. PMID: 29222810.
46. Amber KT, Valdebran M, Kridin K, Grando SA. The Role of Eosinophils in Bullous Pemphigoid: A Developing Model of Eosinophil Pathogenicity in Mucocutaneous Disease. *Front Med (Lausanne)*. 2018 Jul 10;5:201. doi: 10.3389/fmed.2018.00201. PMID: 30042946; PMCID: PMC6048777.
47. Riani M, Muller C, Bour C, Bernard P, Antonicelli F, Le Jan S. Blister Fluid Induces MMP-9-Associated M2-Type Macrophages in Bullous Pemphigoid. *Front Immunol*. 2019 Aug 7;10:1858. doi: 10.3389/fimmu.2019.01858. PMID: 31440247; PMCID: PMC6692716.
48. Chijiwa C, Takeoka S, Kamata M, Tateishi M, Fukaya S, Hayashi K, Fukuyasu A, Tanaka T, Ishikawa T, Ohnishi T, Watanabe S, Tada Y. Decrease in eosinophils infiltrating into the skin of patients with dipeptidyl peptidase-4 inhibitor-related bullous pemphigoid. *J Dermatol*. 2018 May;45(5):596-599. doi: 10.1111/1346-8138.14245. Epub 2018 Feb 6. PMID: 29411416.
49. Salemme A, Fania L, Scarabello A, Caproni M, Marzano AV, Cozzani E, Feliciani C, De Simone C, Papini M, Satta RR, Parodi A, Mariotti F, Lechiancole S, Genovese G, Passarelli F, Festa F, Bellei B, Provini A, Sordi D, Pallotta S, Abeni D, Mazzanti C, Didona B, Di Zenzo G; Cutaneous Immunology Group of SIDEMaST. Gliptin-associated bullous

- pemphigoid shows peculiar features of anti-BP180 and -BP230 humoral response: Results of a multicenter study. *J Am Acad Dermatol*. 2022 Jul;87(1):56-63. doi: 10.1016/j.jaad.2022.02.036. Epub 2022 Mar 1. PMID: 35240229.
50. He YL, Sabo R, Campestrini J, Wang Y, Riviere GJ, Nielsen JC, Rosenberg M, Ligueros-Saylan M, Howard D, Dole WP. The effect of age, gender, and body mass index on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of vildagliptin in healthy volunteers. *Br J Clin Pharmacol*. 2008 Mar;65(3):338-46. doi: 10.1111/j.1365-2125.2007.03031.x. Epub 2007 Oct 24. PMID: 17961192; PMCID: PMC2291246.
 51. He YL. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of vildagliptin. *Clin Pharmacokinet*. 2012 Mar 1;51(3):147-62. doi: 10.2165/11598080-000000000-00000. PMID: 22339447.
 52. Thomson AH, Kelly JG, Whiting B. Lisinopril population pharmacokinetics in elderly and renal disease patients with hypertension. *Br J Clin Pharmacol*. 1989 Jan;27(1):57-65. doi: 10.1111/j.1365-2125.1989.tb05335.x. PMID: 2539850; PMCID: PMC1379705.
 53. Laghnam D, Jozwiak M, Nguyen LS. Renin-Angiotensin-Aldosterone System and Immunomodulation: A State-of-the-Art Review. *Cells*. 2021 Jul 13;10(7):1767. doi: 10.3390/cells10071767. PMID: 34359936; PMCID: PMC8303450.
 54. Hammer A, Yang G, Friedrich J, Kovacs A, Lee DH, Grave K, Jörg S, Alenina N, Grosch J, Winkler J, Gold R, Bader M, Manzel A, Rump LC, Müller DN, Linker RA, Stegbauer J. Role of the receptor Mas in macrophage-mediated inflammation *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016 Dec 6;113(49):14109-14114. doi: 10.1073/pnas.1612668113. Epub 2016 Nov 21. PMID: 27872279; PMCID: PMC5150410.
 55. Pan H, Huang W, Wang Z, Ren F, Luo L, Zhou J, Tian M, Tang L. The ACE2-Ang-(1-7)-Mas Axis Modulates M1/M2 Macrophage Polarization to Relieve CLP-Induced Inflammation via TLR4-Mediated NF- κ b and MAPK Pathways. *J Inflamm Res*. 2021 May 20;14:2045-2060. doi: 10.2147/JIR.S307801. PMID: 34045880; PMCID: PMC8144186.
 56. Beraldo JI, Benetti A, Borges-Júnior FA, Arruda-Junior DF, Martins FL, Jensen L, Dariolli R, Shimizu MH, Seguro AC, Luchi WM, Girardi ACC. Cardioprotection Conferred by Sitagliptin Is Associated with Reduced Cardiac Angiotensin II/Angiotensin-(1-7) Balance in Experimental Chronic Kidney Disease. *Int J Mol Sci*. 2019 Apr 20;20(8):1940. doi: 10.3390/ijms20081940. PMID: 31010001; PMCID: PMC6515057.
 57. Herman GA, Stevens C, Van Dyck K, Bergman A, Yi B, De Smet M, Snyder K, Hilliard D, Tanen M, Tanaka W, Wang AQ, Zeng W, Musson D, Winchell G, Davies MJ, Ramael S, Gottesdiener KM, Wagner JA. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of sitagliptin, an inhibitor of dipeptidyl peptidase IV, in healthy subjects: results from two randomized,

- double-blind, placebo-controlled studies with single oral doses. *Clin Pharmacol Ther.* 2005 Dec;78(6):675-88. doi: 10.1016/j.clpt.2005.09.002. PMID: 16338283.
58. Zhang B, Liu F, Yang MF, Xu J, Wang Z, Zhang J, Wang R, Yang X. A cell-based fluorescent assay for FAP inhibitor discovery. *Bioorg Med Chem Lett.* 2020 Jul 15;30(14):127253. doi: 10.1016/j.bmcl.2020.127253. Epub 2020 May 11. PMID: 32527554.
59. Buchacher T, Ohradanova-Repic A, Stockinger H, Fischer MB, Weber V. M2 Polarization of Human Macrophages Favors Survival of the Intracellular Pathogen *Chlamydia pneumoniae*. *PLoS One.* 2015 Nov 25;10(11):e0143593. doi: 10.1371/journal.pone.0143593. PMID: 26606059; PMCID: PMC4659546.
60. Chappell MC, Gomez MN, Pirro NT, Ferrario CM. Release of angiotensin-(1-7) from the rat hindlimb: influence of angiotensin-converting enzyme inhibition. *Hypertension.* 2000 Jan;35(1 Pt 2):348-52. doi: 10.1161/01.hyp.35.1.348. PMID: 10642323.
61. Abuohashish HM, Ahmed MM, Sabry D, Khattab MM, Al-Rejaie SS. ACE-2/Ang1-7/Mas cascade mediates ACE inhibitor, captopril, protective effects in estrogen-deficient osteoporotic rats. *Biomed Pharmacother.* 2017 Aug;92:58-68. doi: 10.1016/j.biopha.2017.05.062. Epub 2017 May 19. PMID: 28531801.
62. Dang R, Yang M, Cui C, Wang C, Zhang W, Geng C, Han W, Jiang P. Activation of angiotensin-converting enzyme 2/angiotensin (1-7)/mas receptor axis triggers autophagy and suppresses microglia proinflammatory polarization via forkhead box class O1 signaling. *Aging Cell.* 2021 Oct;20(10):e13480. doi: 10.1111/acer.13480. Epub 2021 Sep 16. PMID: 34529881; PMCID: PMC8520723.

7 発表論文

Lisinopril prevents bullous pemphigoid induced by dipeptidyl peptidase 4 inhibitors via the Mas receptor pathway

Keisuke Nozawa, Takahide Suzuki, Gen Kayanuma, Hiroki Yamamoto, Kazuki Nagayasu, Hisashi Shirakawa, and Shuji Kaneko

2023年1月5日発行, *Frontiers in Immunology*, 13:1084960. doi: 10.3389/fimmu.2022.1084960

8 謝辞

非常に興味深い研究を遂行する機会を与えて頂くとともに、終始御懇篤なるご指導および御鞭撻を賜りました京都大学大学院薬学研究科教授 金子周司 先生に謹んで感謝の意を表します。また、本研究に際しまして終始有益なご助言を頂きました京都大学大学院薬学研究科准教授 白川久志 先生、ならびに助教 永安一樹 先生に心から感謝の意を表します。

本研究の遂行に多大なるご協力を頂きました京都大学大学院薬学研究科生体機能解析学分野 鈴木崇英 さん、栢沼玄 学士、山本浩貴 学士に心から感謝いたします。

また本論文をご精読頂き、貴重なご意見を頂戴しました生田 宏一教授ならびに伊藤 貴浩教授に深謝致します。

最後に、著者のよき理解者であり、博士号取得に向けて背中を押し、常に支えてくださいました妻に深く感謝いたします。