HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	短期高脂肪食負荷はグルコキナーゼおよびIRS-2非依存的経路を介して膵β細胞増殖を誘導する
Author(s)	北尾, 直之
Description	配架番号：2375
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第12996号
Issue Date	2018-03-22
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k12996
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/70274
Type	doctoral thesis
File Information	Naoyuki_Kitao.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学　位　論　文

短期高脂肪食負荷はグルコキナーゼおよびIRS-2非依存的経路を介して膵β細胞増殖を誘導する

(Glucokinase- and insulin receptor substrate-2 independent pathway was involved in pancreatic beta cell replication induced by short-term high-fat diet feeding in mice)

2018年3月

北　海　道　大　学

北　尾　直　之

目　次

発表論文目録および学会発表目録　1 頁

1.　緒言　2 頁

2.　略語表　3 頁

－第 1 章－

短期高脂肪食負荷はグルコキナーゼおよび IRS-2 非依存的経路を介して膵 β 細胞増殖を誘導する　5-51 頁

3.　緒言　5 頁

4.　実験方法

4.1　実験に用いた動物　6 頁

4.2　実験に用いた飼料　6 頁

4.3　血糖および脂質の測定　7 頁

4.4　インスリン抵抗性の評価　7 頁

4.5　経口ブドウ糖負荷試験　7 頁

4.6　グルコキナーゼ活性化薬と rapamycin の投与　8 頁

4.7　膵 β 細胞の組織学的評価　8 頁

4.8　膵島単離　9 頁

4.9　グルコース応答性インスリン分泌反応の測定　9 頁

4.10　遺伝子発現解析　10 頁

4.11　蛋白発現解析　11 頁

4.12　統計学的解析　13 頁

5.　実験結果

5.1　8 週齢の C57BL/6J マウスにおける

短期高脂肪食負荷による代謝への影響　14 頁

5.2　8 週齢の C57BL/6J マウスにおける

短期高脂肪食負荷による膵 β 細胞増殖への影響　20 頁

5.3　8 週齢のグルコキナーゼヘテロ欠損マウスにおける

短期高脂肪食負荷による膵 β 細胞増殖への影響　24 頁

5.4　8 週齢の IRS-2 欠損マウスにおける

短期高脂肪食負荷による膵 β 細胞増殖への影響　28 頁

5.5　グルコキナーゼ活性化薬による

短期高脂肪食負荷への影響　31 頁

5.6　短期高脂肪食負荷による膵島の遺伝子発現変化　35 頁

5.7　Rapamycin による短期高脂肪食負荷への影響　40 頁

5.8　48 週齢の C57BL/6J マウスにおける

短期高脂肪食負荷による代謝への影響　44 頁

6.　考察　48 頁

－第 2 章－

2 型糖尿病患者におけるビルダグリプチンとメトホルミンの

併用投与による血管内皮機能及び代謝に及ぼす影響の検討　52-66 頁

7.　緒言　52 頁

8.　実験方法　54 頁

9.　実験結果　57 頁

10.　考察　65 頁

11.　総括および結論　67 頁

12.　謝辞　68 頁

13.　引用文献　69 頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は下記の論文として投稿中である。

1. Kitao N, Nakamura A, Miyoshi H, Nomoto H, Takahashi K, Omori K, Yamamoto K, Cho K Y, Terauchi Y, Atsumi T “The role of glucokinase and insulin receptor substrate-2 in the proliferation of pancreatic beta cells induced by short-term high-fat diet feeding in mice”

本研究の一部は下記の学会で発表した。

1. Kitao N, Nakamura A, Miyoshi H, Takahashi K, Yamamoto K, Nomoto H, Cho KY, Terauchi Y, Atsumi T “Glucokinase- and insulin receptor substrate-2 independent pathway was involved in pancreatic beta cell replication induced by short-term high-fat diet feeding in mice” The 53rd Annual Meeting of the European Association for the Study of Diabetes in Lisbon-Portugal 11-15 September 2017

1. 緒　言

日本糖尿病学会の「糖尿病の分類と診断基準に関する委員会」の報告によれば、糖尿病は「インスリン作用の不足に基づく慢性の高血糖を主徴とする代謝疾患群である」と定義される。すなわち、糖尿病は慢性の高血糖を主徴とする疾患群であり、その慢性高血糖の成因は様々である。糖尿病の成因に基づいて本邦では 1 型、2 型、その他の特定の機序・疾患によるもの、妊娠糖尿病と大別されている。このうちのほとんどを 2 型糖尿病が占めており、近年増加の一途を辿っている。2 型糖尿病は、末梢組織におけるインスリン抵抗性および膵 β 細胞からのインスリン分泌障害という 2 つの主要な病態を特徴とする [1]。この状態は、膵 β 細胞が末梢組織におけるインスリン抵抗性に対するインスリンの代償性増加を補うことができない場合に起こる [2]。したがって、インスリン分泌低下は、1 型糖尿病のみならず 2 型糖尿病の病態においても重要であると考えられる [3]。インスリン分泌低下の主な原因の 1 つが膵 β 細胞量の減少であることが報告されていることから [4,5]、膵 β 細胞量を増加させることは糖尿病における理想的な治療戦略となりうる。膵 β 細胞増殖の機序に関して、さまざまなモデルマウスなどを用いて日々研究されている。

また、2 型糖尿病において、膵 β 細胞増殖を誘導することによる疾患の予防や治療の試みも重要であるが、臨床的には発症した糖尿病による合併症を抑制することは mortality / morbidity においてより直接的な問題であり、糖尿病では総合的な管理が求められる。動脈硬化性疾患は糖尿病合併症で問題とされる重要な疾患であり、糖尿病治療薬は血糖降下作用だけでなく抗動脈硬化作用の有無についても検討されている。

2. 略　語　表

本文中及び図中で使用した略語は以下の通りである。

ANCOVA	analysis of covariance
apoA1	apolipoprotein A1
apoB	apolipoprotein B
AUC	area under the curve
Aurkb	aurora kinase B
BAP	biological antioxidant potential
BMI	body mass index
BrdU	Bromodeoxyuridine
Ccna2	cyclin A2
Ccnb1	cyclin B1
Ccnd1	cyclin D1
Ccnd2	cyclin D2
Ccnd3	cyclin D3
Cdc20	cell division cycle 20
Cenpa	centromere protein A
Cenpb	centromere protein B
Cenpf	centromere protein F
CI	confidence interval
cSBP	centric systolic blood pressure
DBP	diastolic blood pressure
DPP-4	dipeptidyl-peptidase-4
d-ROMs	reactive oxygen metabolites-derived compounds
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
FBS	fetal bovine serum
FMD	flow-mediated dilation
Foxm1	forkhead transcription factor M1
FPG	fasting blood glucose
GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
Gck	glucokinase

GKA	glucokinase activator
GLP-1	glucagon-like peptide-1
HDL	high-density lipoprotein
HF	high-fat
HOMA-IR	Homeostasis model assessment of insulin resistance
HRP	horseradish peroxidase
hsCRP	high-sensitivity C-reactive protein
IMT	intima media thickness
IRI	immunoreactive insulin
IRS-2	insulin receptor substrate-2
KRBH	Krebs-Ringer's solution bicarbonate /Hepes
LDL	low-density lipoprotein
Mafa	v-maf avian musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene
mTOR	mammalian target of rapamycin
mTORC1	mammalian target of rapamycin complex 1
NT-proBNP	N terminal prohormone of brain natriuretic peptide
PCNA	proliferating cell nuclear antigen
Pdx-1	pancreatic and duodenal homeobox 1
Plk1	polo-like kinase 1
PRESTO	prevention of restenosis with tranilast and its outcome
RHI	reactive hyperemia index
SBP	systolic blood pressure
SC	standard chow
TBS	tris buffered saline
TBST	tris buffered saline with Tween 20
TNF-α	tumor necrosis factor alpha
UKPDS	United Kingdom prospective diabetes study

－第１章－
短期高脂肪食負荷はグルコキナーゼおよびIRS-2非依存的経路を介して膵β細胞増殖を誘導する

3. 緒　言

膵β細胞増殖は、高脂肪食摂取、膵部分切除術および妊娠[6-10]を含むいくつかの方法によって、マウスにおいて実験的に誘導することができる。高脂肪食負荷誘導性膵β細胞増殖のマウスモデルは、研究で広く使用されている[11]。既報において、高脂肪食を20週間与えた野生型マウスは膵β細胞増殖による顕著な膵β細胞過形成およびinsulin receptor substrate (IRS) -2の発現上昇を示したが、膵β細胞特異的グルコキナーゼヘテロ欠損（glucokinase (Gck)$^{+/-}$）マウスは野生型マウスと同程度のインスリン抵抗性を有するにもかかわらず、膵β細胞増殖、過形成およびIRS-2発現上昇が欠如していた。これらの結果は、グルコキナーゼとIRS-2が、20週間という長期の高脂肪食負荷誘導性膵β細胞増殖に重要な役割を果たしていることを示唆している[12,13]。しかしながら、このモデルにおける膵β細胞増殖が、高脂肪食そのものによって引き起こされるのか、または高脂肪食で誘導されるインスリン抵抗性に関連する持続的な代謝変化によって誘発されるのかは明らかではない。

近年、短期の高脂肪食負荷による膵β細胞の増殖が報告されている[14-16]。 Stamateris ら[14]は、代謝変化の開始と同時に、高脂肪食負荷7日以内に膵β細胞増殖が始まることを見出した。 Mosser ら[15]は、高脂肪食が負荷3日目という早期に膵β細胞増殖を誘導し、そしてこの増殖がインスリン抵抗性の発症なしに起こることを示した。これらの知見から、我々は短期の高脂肪食負荷で誘導される膵β細胞増殖の機序と長期の高脂肪食負荷で誘導される膵β細胞増殖の機序とは異なる可能性があると考えた。本

研究では、短期の高脂肪食で誘導される膵β細胞増殖におけるグルコキナーゼと IRS-2 の役割について検討した。

4. 実　験　方　法

4.1　実験に用いた動物

7 週齢の雄の C57BL/6J マウスを CLEA Japan, Inc.（Tokyo, Japan）から購入し普通食を与え、8 週齢以降、2、4 または 7 日間、普通食または高脂肪食を与えた。$Gck^{+/-}$マウスおよび IRS-2 欠損（$Irs2^{-/-}$）マウスは、東京大学大学院医学系研究科糖尿病・代謝内科教授　門脇孝先生ならびに横浜市立大学大学院医学研究科分子内分泌・糖尿病内科学教授　寺内康夫先生より提供を受けた。コントロールとして遺伝子型が野生型の同腹の雄に、8 週齢まで普通食を与え、その後、普通食または高脂肪食のいずれかを 1 週間与えた。さらに、48 週齢の雄の C57BL / 6J マウスを用いて同様の実験を行った。マウスの飼育環境は、室温 25℃の空調のもと 7 時～19 時までを明期とした明暗サイクルで自由運動および水道水・餌の自由摂取のもとで飼育した。実験動物の取り扱いについては、国立大学法人北海道大学動物実験に関する規定に従って行い、遺伝子組換え実験については北海道大学遺伝子組換え実験等安全管理規定に従って行った。

4.2　実験に用いた飼料

普通食として MF（Oriental Yeast Co., Tokyo, Japan）、高脂肪食として High Fat Diet 32（CLEA Japan, Inc., Tokyo, Japan）を使用した。

4.3　血糖および脂質の測定

採血は尾静脈より行い、血糖はグルコース分析装置である Glutestmint（Sanwa Chemical Co., Nagoya, Japan）を用いて測定した。 血漿の遊離脂肪酸、総コレステロールおよびトリグリセリドは、酵素法（Wako Pure Chemical Industries Ltd., Osaka, Japan）を用いて測定した。

4.4　インスリン抵抗性の評価

自由摂食下において速効型インスリン(Humarin®R; Eli Lilly, IN, USA)を 0.75 U/kg で腹腔内投与を行い、投与前(0 分)・30 分・60 分・90 分・120 分における血糖値を測定した。各測定時間における血糖値を投与前(0 分)の血糖値で除して得た値を percentage of basal blood glucose としてインスリン抵抗性の評価を行った。

4.5　経口ブドウ糖負荷試験

経口ブドウ糖負荷試験として､前日 17 時より 16 時間の絶食後に 1.5 g/kg のブドウ糖水溶液をゾンデを用いて経口投与し、投与前(0 分)・10 分・30 分・60 分・90 分・120 分における血糖値を測定した。各測定値を、縦軸を測定した血糖値(mmol/L)、横軸を測定した時間(min)としてグラフにプロットして直線でつなぎ、0 mmol/L を縦軸の底として台形の面積の算出法を用いて 0 分～120 分までの各曲線下面積の総和を area under the curve (AUC (mmol/L x min))として算出した。

4.6　グルコキナーゼ活性化薬および rapamycin の投与

グルコキナーゼ活性化薬（glucokinase activator (GKA)）は Tsukuba Research Institute, Banyu Pharmaceutical Co. Ltd. (Tsukuba, Japan）より提供を受けた。GKA は 5.6mg/ml の濃度になるように 0.5%メチルセルロース（Wako Pure Chemical Industries Ltd. Osaka, Japan）で溶解し、8 週齢の雄の C57BL / 6J マウスに、溶媒または GKA（56mg/kg・体重）を 1 日 2 回、屠殺前の 3 日間のみ経口投与した。Rapamycin（LC Laboratories Inc., Woburn, MA）は 20mg/ml となるようにエタノールで溶解し、10% Tween-80（Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis, MO）および 10%PEG-400（Hampton Research Co., Aliso Viejo, CA）で 0.4mg/ml となるように調整した。8 週齢の雄の C57BL / 6J マウスに rapamycin（4mg/k・体重）を隔日で腹腔内投与した。

4.7　膵 β 細胞の組織学的評価

単離した膵臓を 4%パラホルムアルデヒドで浸漬固定し、パラフィン包埋を行った。5μm のパラフィン切片をスライドガラス上にマウントし、脱パラフィンし、水洗後、0.3%過酸化水素加メタノールにて内因性ペルオキシダーゼ活性を阻止し、ヤギ血清(Invitrogen)をもちいて 10 分ブロッキングを行った後、tris buffered saline with Tween 20 (TBST)で 1：1000 に希釈した一次抗体（ウサギ抗ヒトインスリン抗体; Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA）を 4℃ overnight でインキュベートした。その後、TBST で洗浄し、二次抗体(ビオチン標識抗ウサギ IgG 抗体; Nichirei, Tokyo, Japan)、horseradish peroxidase (HRP)標識ストレプトアビジン(Nichirei)を各々1 時間で反応させ、洗浄後に検鏡しながら diaminobenzidine (DAB)で発色させ、ヘマトキシリンで対比染色を行った。

光学顕微鏡 BIOREVO BZ-9000 (Keyence Japan, Osaka, Japan)にて BZ-II 観察アプリケーション ver.1.40 (Keyence)を用いて標本の写真を撮影・取り込みし、BZ-II analyzer ver.1.41 (Keyence)を用いて写真の解析を行った。BZ-II analyzer 上にて手動的に膵組織を囲んで膵切片全体の面積(A)を

計測し、次に同一切片のインスリン陽性細胞を BZ-II analyzer 上で色調・濃度の選択を用いて抽出し、その面積(B)を測定した。膵β細胞面積比は(B)を(A)で除して 100 を乗じ、%単位として算出した。膵β細胞量は切離した膵の総重量(mg)にこの膵β細胞面積比(%)を乗じ、膵β細胞量(mg)とした。
式：膵β細胞量(mg) = 膵β細胞面積比(%) × 膵重量(mg)

膵β細胞の増殖の評価として、酵素抗体免疫染色法にて Bromodeoxyuridine (BrdU)染色を行った。同時に上述のインスリン抗体を用いてインスリン陽性細胞の免疫染色も施行し、各膵島における BrdU 陽性細胞数/膵β細胞数を%比として算出し、その平均値を BrdU 陽性率(%)とした。BrdU 染色には BrdU In-Situ Detection Kit（BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ,USA）を添付文章の通りに使用した。

4.8 膵島単離

飼育したマウスを屠殺し、開腹したのち総胆管を露出させた。十二指腸を鉗子でクランプしたのち、注射針を総胆管にカニュレーションし、超純水で33.3 mg/mlに希釈したcollagenase (Sigma-Aldrich)を注入した。膨張した膵臓を切離し上記のcollagenaseの入ったシリンジに移し、37℃で24分間温振した。その後、複数回に分けて反応停止液((Hanks' balanced salt solution: Sigma-Aldrich)にfetal bovine serum (FBS)(Gibco BRL, Paisley, UK)を添加して使用)を加え撹拌・上清の吸引を繰り返し、最終的に沈殿した膵組織を10 cm dishに播種し、実体顕微鏡下にて膵島を回収して各実験に使用した。回収した膵島は、即時の処理を行わないものは実験まで-80℃にて保存した。

4.9 グルコース応答性インスリン分泌反応の測定

上記の方法で採取した膵島を 1.5ml のエッペンドルフチューブに 10 個ずつ分注し、2.8 mM の glucose を含有する Krebs-Ringer's solution bicarbonate /Hepes (KRBH) buffer (129 mM NaCl, 10 mM HEPES, 5.0 mM $NaHCO_3$, 4.7 mM KCl, 2.0 mM $CaCl_2$, 1.2 mM KH_2PO_4, 1.2 mM

$MgSO_4$, pH7.4)で 5%CO_2、37 度の条件下で 30 分間 pre-incubation を行い、その後 glucose 5.6 mM、glucose 22.2 mM を含む KRBH buffer に交換し、更に 60 分間培養した。その後、上清を静かに採取しインスリンの測定まで -20℃で保存した。また、チューブに残存した膵島は残存した上清を慎重に吸引した後に、500 µl の Acid ethanol (0.4 M HCl in 74 % ethanol)を加えて振盪・溶解し、膵島のインスリン含量を測定した。上清のインスリン値を同一検体のインスリン含量で除し、グルコース応答性インスリン分泌反応として算出した。インスリンの測定には enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)法(Morinaga Institute of Biological Science, Yokohama, Japan)を用いて添付文書に従い測定を行った。

4.10 遺伝子発現解析

4.10.1 Real-time PCR 法による解析

各マウスの膵島から、RNeasy Mini Kit (Qiagen, Tokyo, Japan)を添付文章の通りに用いて total RNA を抽出した。抽出した RNA は濃度を調節後に random primer、10mM dNTP (以上 Promega, WI, USA), Superscript® III, RNaseOUT, 5x Fast Standard Buffer (以上 Life Technologies)を用いて cDNA を作製し、SYBR Green (Takara Bio, Shiga, Japan)を用いたリアルタイム定量 real-time PCR 法で各種遺伝子発現量を定量した。内因性コントロールとして、glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)を用いた。測定には 7500 Fast PCR system (Applied Biosystems, CA, USA)を用いた。目的とする遺伝子発現量はΔΔCT 法によって各遺伝子と GAPDH との平均の差を計算し、コントロールを 1 とした場合の比率として遺伝子発現量を算出した。

4.10.2　DNA マイクロアレイ法による解析

マウス単離膵島からの全RNAをRNeasy Mini Kit（Qiagen）で抽出した。GeneChip Mouse Gene 2.0 ST array（Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA）を用いてmRNA発現プロファイルを決定し、得られた結果を、解析ソフトウェア：MicroArray Data Analysis Tool Ver3.2 (Filgen, Inc., Nagoya, Japan)を用いてGene Ontology法と解析ソフトウェア：MeV version 4.9.0　(Filgen, Inc., Nagoya, Japan)を用いて階層型クラスタリング法によって分析した。

4.11　蛋白発現解析

4.11.1　蛋白抽出と蛋白量調整

各マウスの膵島を単離したのち、蛋白抽出まで-80℃で保存した。各組織に ELB 緩衝液(150mM HEPES (pH7.0), 250mM NaCl, 0.1% Nonidet P-40, 5mM EDTA, 50mM sodium fluoride, 0.2mM sodium orthovanadate)に 0.5mM dithiothreitol, 1mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1μg/ml leupeptin, 1μg/ml aprotinin を加えたものを蛋白抽出用緩衝液として添加し、氷冷下で MICROSON XL2000 (MISONIC, NY, USA)を用いて 10 秒間ずつ 2 回ホモジナイズを行った。ホモジナイズ後、4℃、15,000×*g*, 10 分間の遠心分離を施行し、上清を試料として使用した。Nanodrop (LMS, Tokyo, Japan)を用いて ELB 緩衝液を control として蛋白定量を行い、Novex® Tris-SDS Sample Buffer (2X) (Invitrogen, CA, USA)を用いて等濃度に希釈調節したのち、100℃、10 分間で熱変性させ、抽出蛋白サンプルとして電気泳動に用いた。

4.11.2　SDS-PAGE　ウエスタンブロッティング

SDS サンプルバッファーで調節しボイルした上記のサンプルを、作製した 12%アクリルアミドゲルにアプライした。電気泳動で分離したゲル中の蛋白を転写するため、ブロッティング装置に Immobilon®-P PVDF メンブレン（Millipore, MA, USA）とゲルを重ね、同じ大きさの濾紙ではさみ、定電流で通電した。メンブレンは疎水性のため、使用に際しメタノールに浸し親水化処理を行った。転写したメンブレンを洗浄のうえ、5%スキムミルクを含む TBST にて 1 時間ブロッキングを行った。次に TBST で 3 回洗浄した後、一次抗体反応(4℃ overnight)および二次抗体反応(HRP 標識抗体、室温 1 時間)を行った。さらに TBST で 3 回洗浄後、発光基質を加えて発光させ、Luminescent Image Analyzer, LAS-4000 (FujiFilm, Tokyo, Japan)にて、ソフトウェア Image Reader LAS-4000 mini Ver.2.0 (FujiFilm)を用いて撮影し保存した。本研究において使用した抗体は下記に列挙した。また内因性コントロールとしてβアクチンを 2000 倍希釈として使用した。HRP の検出には ImmunoStar LD (Wako Pure Chemical Industries Ltd., Osaka, Japan)を用いた。

4.11.3　使用抗体

ウエスタンブロッティングで用いた抗体と希釈倍率を下記に列挙する。ポリクローナルウサギ抗 IRS-2 抗体(CST) x1000、ポリクローナルウサギ抗 Actin 抗体(Santa Cruz) x2000、HRP 標識抗ウサギ IgG ヤギポリクローナル抗体(CST) x2000、HRP 標識抗ヤギ IgG ロバポリクローナル抗体(Santa Cruz) x10000

4.12　統計学的解析

本研究では、二群間のみの比較の際には対応のない *t* 検定を、四群間の比較の際には一元配置分散分析を用いて解析した。Post-hoc 解析には Tukey-Kramer 法を用いた。また解析の前に Bartlett 検定を行い、分散の均一性を確認した。P 値が 0.05 未満をもって有意差とした。データ値は平均±標準偏差で表記した。統計解析にはエクセル統計 2012 (Social Survey Research Information, Tokyo, Japan)を用いた。

5. 実験結果

5.1　8 週齢の C57BL/6J マウスにおける短期高脂肪食負荷による代謝への影響

高脂肪食負荷が負荷開始後最初の 7 日以内に膵β細胞増殖を誘導したという報告に基づいて、代謝および膵β細胞増殖における短期高脂肪食負荷の影響を、8 週齢の雄の C57BL / 6J マウスにおいて検討した。体重および随時血糖値は、負荷 6 日目において普通食群よりも高脂肪食群で有意に高かった（Figure 1a, 1b)。負荷 7 日目の内臓脂肪量は、普通食群よりも高脂肪食群で有意に高かったが、肝臓および膵臓の重量は 2 群間で有意差は認めなかった（Figure 2)。2 群間で血漿中の中性脂肪に有意差は認められなかったが（Figure 3a)、遊離脂肪酸および総コレステロールは高脂肪食群で普通食群より有意に低かった（Figure 3b, 3c)。インスリンによる血糖低下効果は両群間で差を認めなかった（Figure 4)。ブドウ糖負荷試験の AUC における評価では両群間に差を認めなかった（Figure 5b)

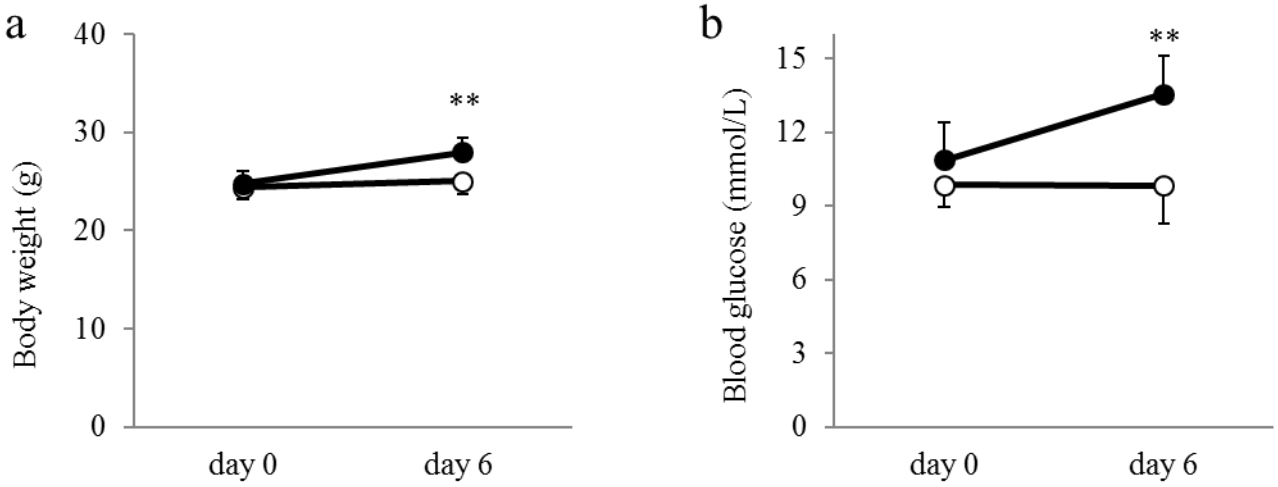


Figure 1 体重および随時血糖値の推移

8 週齢まで普通食を与え、それ以後、普通食群と高脂肪食群に別け、1 週間飼育し、体重(a)および随時血糖値(b)を比較した。

普通食群：○、高脂肪食群：●、各群 n=10、平均値±SD、**p<0.01 vs 普通食群。

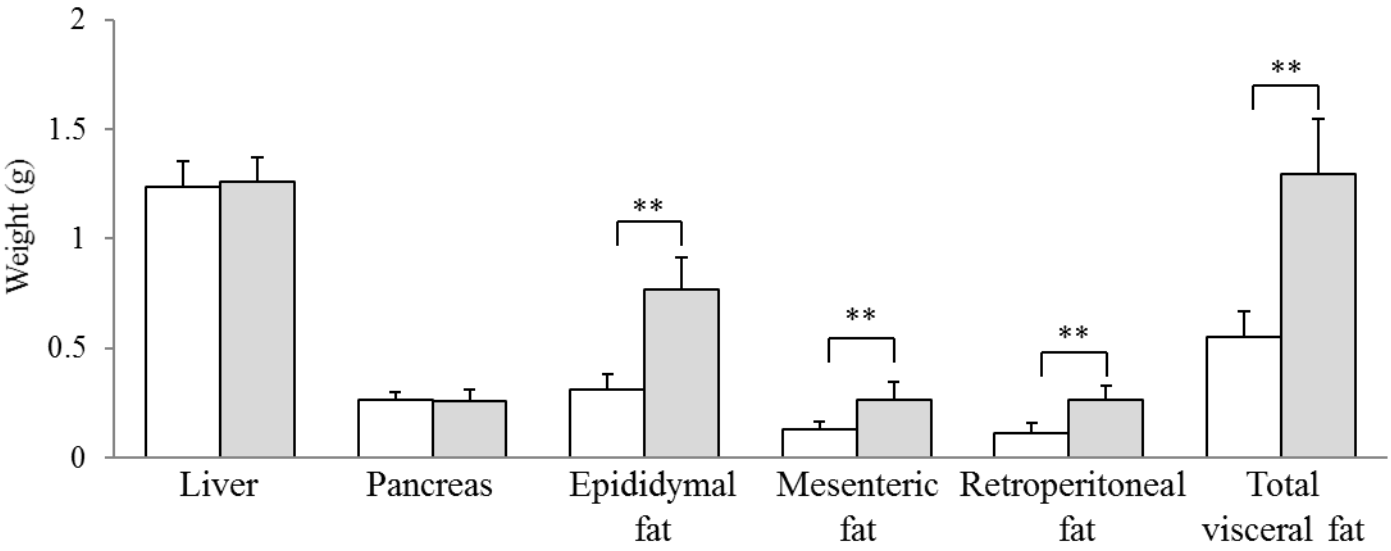


Figure 2 臓器重量

普通食群と高脂肪食群に別け、1 週間飼育後、臓器重量を比較した。

普通食群：□、高脂肪食群：□、各群 n=10、平均値±SD、**p<0.01。

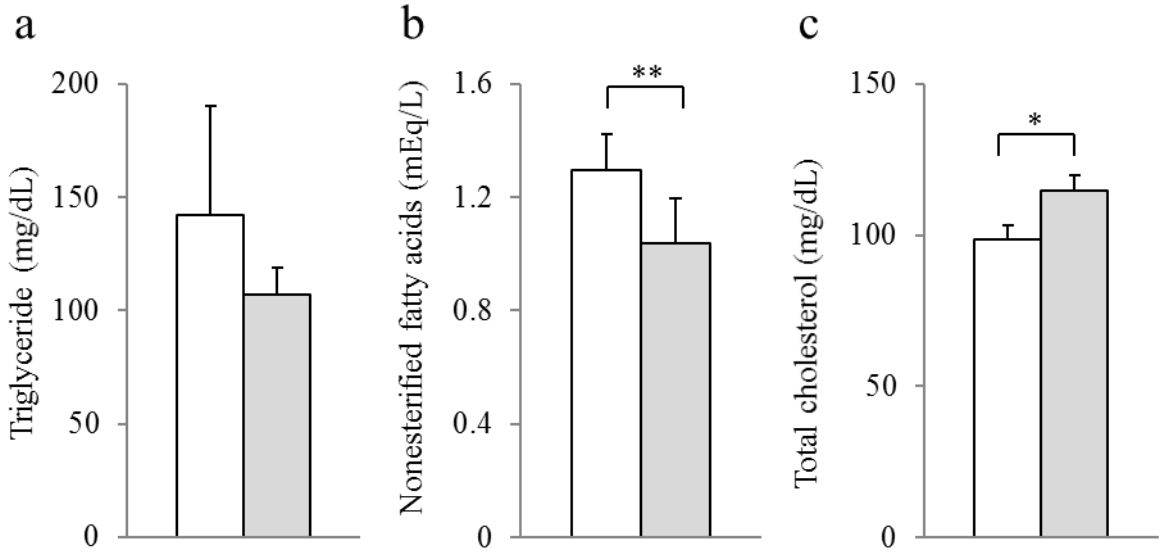


Figure 3 脂質代謝

普通食群と高脂肪食群に別け、1 週間飼育後、中性脂肪(a)、遊離脂肪酸(b)、総コレステロール(c)を比較した。

普通食群:□、高脂肪食群:□、各群 n=10、平均値±SD 、*p<0.05、**p<0.01。

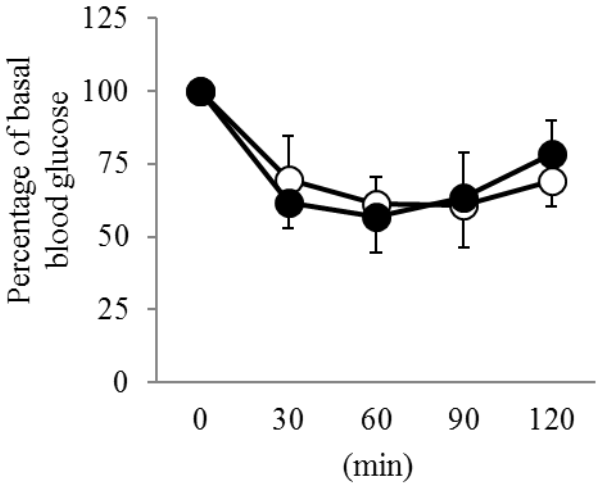


Figure 4 インスリン低血糖試験

普通食群と高脂肪食群に別け、1 週間飼育後、速効型インスリン 0.75U/kg の腹腔内投与を行い、30 分毎に尾静脈より採血し、血糖値を測定し、前値との比を測定した。普通食群：○、高脂肪食群：●、各群 n=10、平均値±SD。

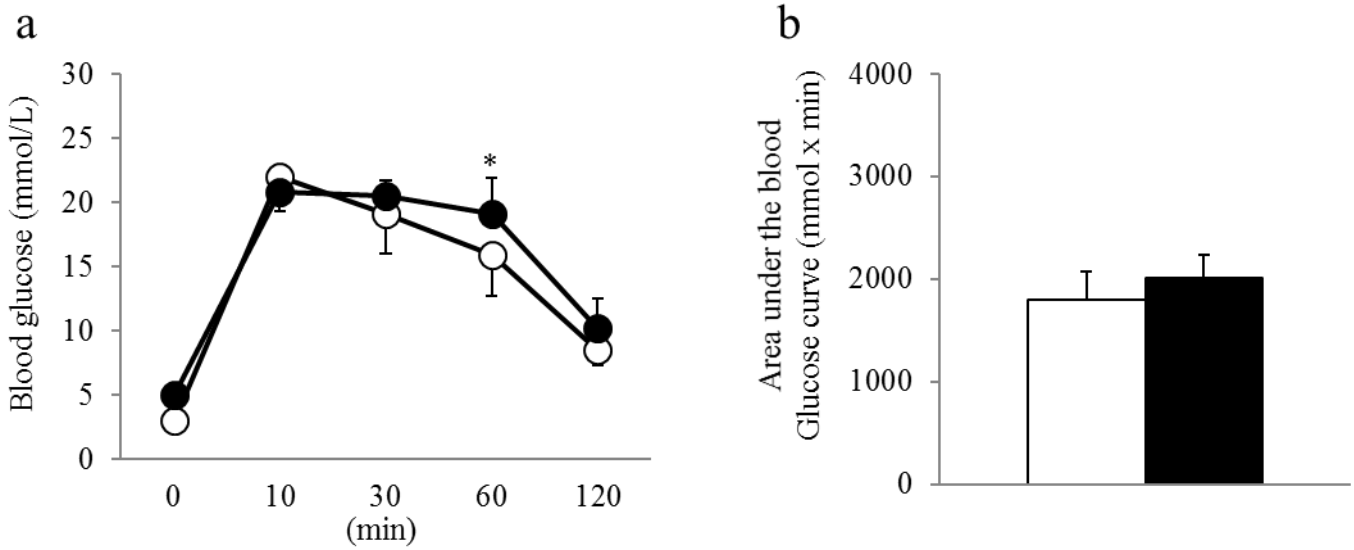


Figure 5 経口ブドウ糖負荷試験

普通食群と高脂肪食群に別け、1 週間飼育後、経口的に 1.5 g/kg のブドウ糖水溶液を投与し、各時間毎に尾静脈より採血し、血糖値を測定した (a)。各時間の血糖値を 0mmol/L を縦軸の底とした台形として各時間間の曲線下面積を求め、0 分～120 分までの総和を OGTT の AUC として評価した (b)。普通食群 : ○, □、高脂肪食群 : ●, ■、各群 n=10、平均値±SD 、*p<0.05 vs 普通食群。

5.2　8 週齢の C57BL/6J マウスにおける短期高脂肪食負荷による膵 β 細胞増殖への影響

免疫組織化学的分析において、BrdU 陽性細胞率は負荷 2 日目において 2 群間で有意差を認めなかったが、負荷 4 日目では普通食群と比較して高脂肪食群で増加傾向が認められ、負荷 7 日目では高脂肪食群で有意に増加した（Figure 6)。負荷 7 日目に単離した膵島の遺伝子発現は、普通食群と比較して高脂肪食群で細胞増殖のマーカーである *Ki67* の発現が有意に増加していたが、一方で、*Irs2* の遺伝子および蛋白の発現は 2 群間で有意差を認めなかった（Figure 7a, 7b)。また、2 群間で、*Pdx1, Gck, Glut2, Ins1, Ins2, Mafa* といった膵 β 細胞機能に関する遺伝子発現には有意差を認めなかった（Figure 7c)。膵 β 細胞機能を調べる目的で、負荷 7 日目の膵島を用いてグルコース応答性インスリン分泌反応を測定したが、2 群間には有意差を認めなかった（Figure 8)。これらの結果は、膵 β 細胞増殖が Irs2 の発現上昇の関与なく 7 日間の高脂肪食負荷によって誘導されたことを示している。

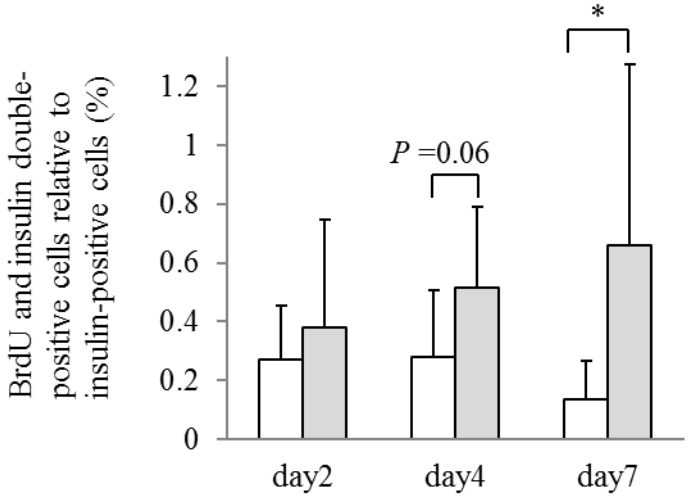


Figure 6　BrdU 陽性細胞率の経過

負荷 2 日目、4 日目、7 日目に膵切片に対して抗インスリン抗体、抗 BrdU 抗体にて免疫染色を行った。膵島における BrdU 陽性β細胞数を、膵島内の全β細胞数で除し 100 を乗じて BrdU 陽性細胞率(%)として評価した。

普通食群：□、高脂肪食群：□、各群 n=10、平均値±SD 、*p<0.05。

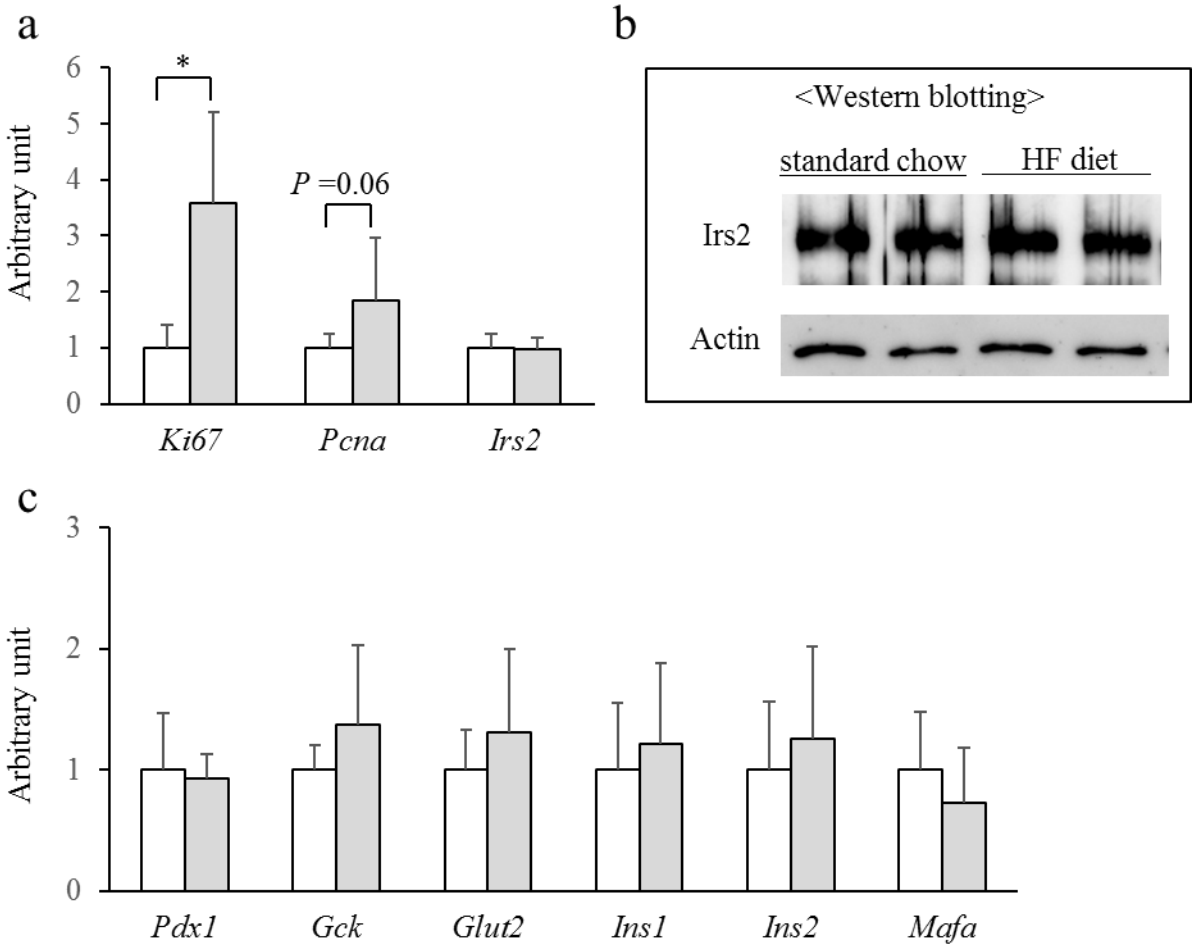


Figure 7 膵島での遺伝子および蛋白発現

負荷 7 日目に単離した膵島における *Ki67, Pcna, Irs2* の遺伝子発現 (a) および *Pdx1, Gck, Glut2, Ins1, Ins2, Mafa* の遺伝子発現 (c) を real-time PCR 法で測定した。内因性コントロールとして GAPDH を用いた。また、負荷 7 日目の膵島における Irs2 の蛋白発現を比較するために等量の蛋白抽出物を抗 Irs2 および抗アクチン抗体を一次抗体としてウエスタンブロット法を施行した (b)。

a, c; 普通食群：□、高脂肪食群：□、各群 n=9、平均値±SD 、*p<0.05。

b; 普通食群：standard chow (SC)、高脂肪食群：high-fat (HF) diet

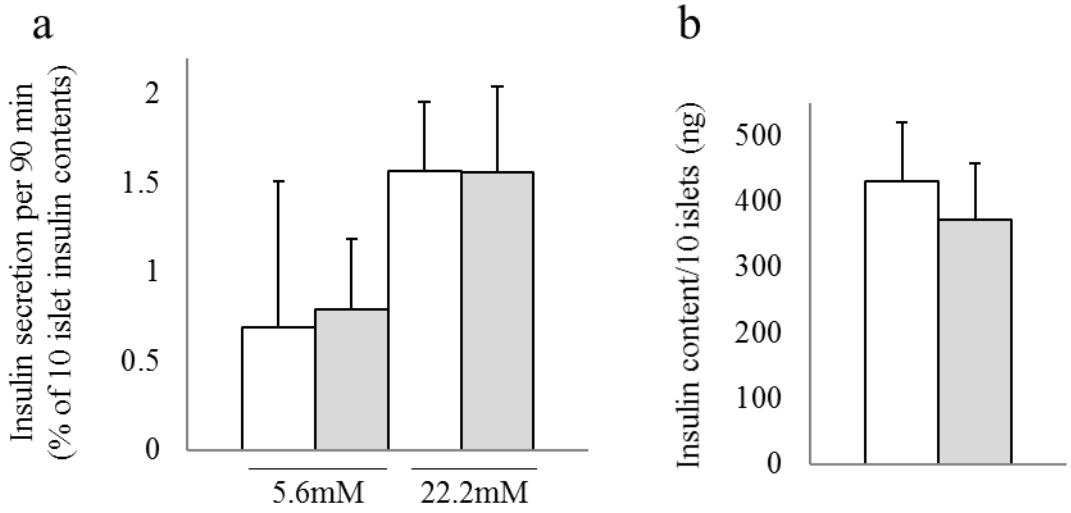


Figure 8 膵島におけるグルコース応答性インスリン分泌反応
普通食群と高脂肪食群に別け、1 週間飼育後、膵島を単離し、10 膵島/well を 5.6mM または 22.2mM のグルコース濃度下で 60 分 incubation し、上清を採取し、インスリン濃度を測定した(a)。well 内に残存した膵島は酸酒精で溶解し、インスリン含量を測定し(b)、インスリン濃度の補正に用いた。普通食群：□、高脂肪食群：□、各群 n=11-12、平均値±SD。

5.3　8 週齢のグルコキナーゼヘテロ欠損マウスにおける短期高脂肪食負荷による膵 β 細胞増殖への影響

短期高脂肪食負荷によって誘導される膵 β 細胞増殖にグルコキナーゼが必要であるかを検討した。8 週齢の雄の野生型マウスおよび $Gck^{+/-}$ マウスを、普通食または高脂肪食のいずれかを与えて 1 週間飼育した。野生型および $Gck^{+/-}$ マウスのいずれにおいても、普通食群と比較して高脂肪食群でわずかに体重が増加した（Figure 9a)。随時血糖値は、普通食群において野生型マウスよりも $Gck^{+/-}$ マウスにおいて高値であったので、高脂肪食による血糖値の上昇は、$Gck^{+/-}$ マウスにおいて統計的有意差を認めなかった（Figure 9b)。BrdU 陽性細胞率は、野生型マウスおよび $Gck^{+/-}$ マウスのいずれにおいても普通食群と比較して高脂肪食群で有意に増加した（Figure 10)。単離膵島を用いた遺伝子発現に関しては、野生型マウスの結果と同様、$Gck^{+/-}$ マウスにおいても普通食群と比較して高脂肪食群で Ki67 の発現が有意に増加した (Figure 11a)。一方、$Gck^{+/-}$ マウスにおいても普通食群と高脂肪食群の間で Irs2 の遺伝子発現に有意差は認めなかった（Figure 11b)。

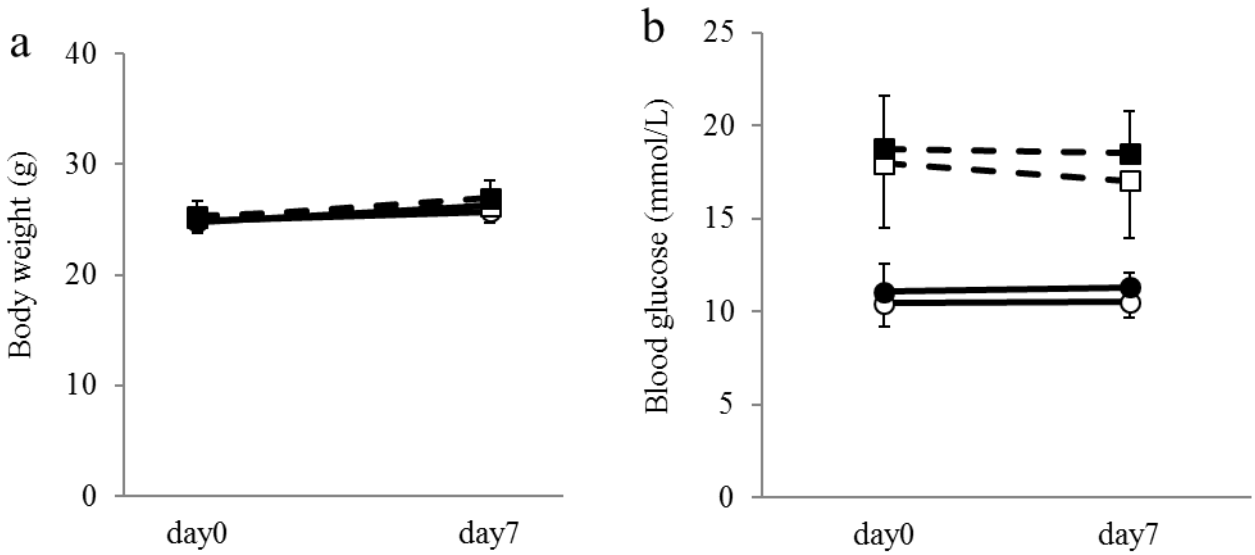


Figure 9 体重および随時血糖値の推移

8 週齢まで普通食を与え、それ以後、普通食群と高脂肪食群に別け、1 週間飼育し、体重(a)および随時血糖値(b)を比較した。

野生型+普通食群：○、野生型+高脂肪食群：●、$Gck^{+/-}$ +普通食群：□、$Gck^{+/-}$ +高脂肪食群：■、各群 n=10、平均値±SD。

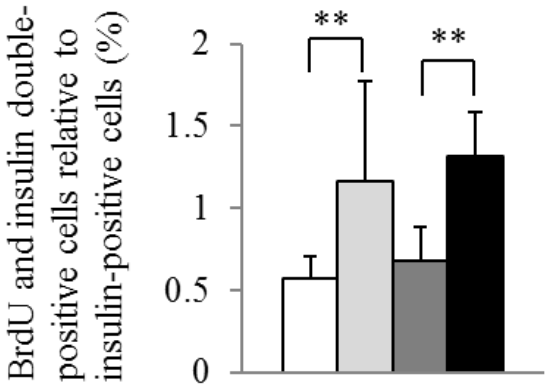


Figure 10　BrdU 陽性細胞率

負荷 7 日目に膵切片に対して抗インスリン抗体、抗 BrdU 抗体にて免疫染色を行った。膵島における BrdU 陽性β細胞数を、膵島内の全β細胞数で除し 100 を乗じて BrdU 陽性細胞率(%)として評価した。

野生型+普通食群：□、野生型+高脂肪食群：□、$Gck^{+/-}$ +普通食群：■、$Gck^{+/-}$ +高脂肪食群：■、各群 n=10、平均値±SD、**p<0.01。

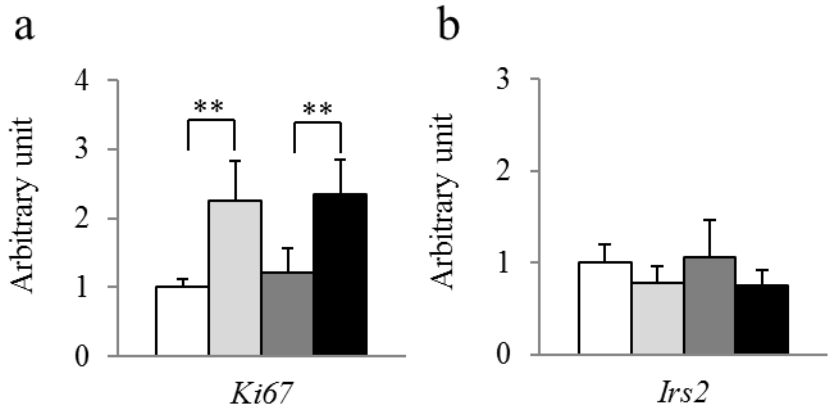


Figure 11　膵島での遺伝子発現

負荷 7 日目に単離した膵島における *Ki67* (a), *Irs2* (b)の遺伝子発現を real-rime PCR 法で測定した。内因性コントロールとして GAPDH を用いた。野生型+普通食群：□、野生型+高脂肪食群：▨、$Gck^{+/-}$ +普通食群：▩、$Gck^{+/-}$ +高脂肪食群：■、各群 n=7-8、平均値±SD、**p<0.01。

5.4　8 週齢の IRS-2 欠損マウスにおける短期高脂肪食負荷による膵 β 細胞増殖への影響

短期高脂肪食負荷によって誘導される膵 β 細胞増殖に IRS-2 が必要であるかを検討した。8 週齢の雄の野生型マウスおよび $Irs2^{-/-}$ マウスを、普通食または高脂肪食のいずれかを与えて 1 週間飼育し、体重、随時血糖値、BrdU 陽性細胞率について検討した。$Irs2^{-/-}$ マウスは、$Gck^{+/-}$ マウスとほぼ同様の結果を示した（Figure 12, 13)。これらの所見は、1 週間の高脂肪食負荷がグルコキナーゼおよび IRS-2 とは独立した機序で膵 β 細胞増殖を誘導したことを示唆する。

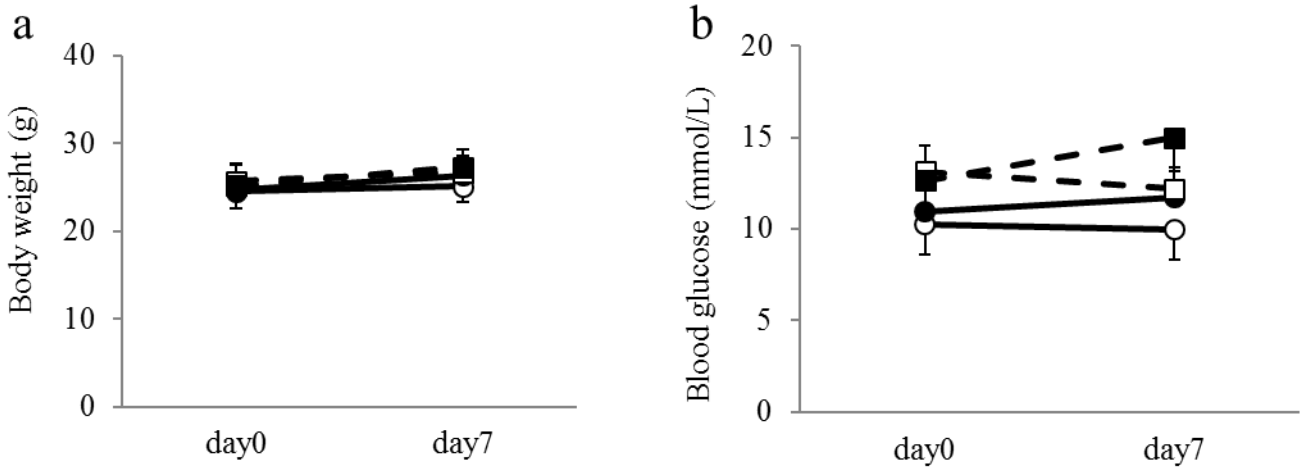


Figure 12 体重および随時血糖値の推移

8 週齢まで普通食を与え、それ以後、普通食群と高脂肪食群に別け、1 週間飼育し、体重(a)および随時血糖値(b)を比較した。

野生型+普通食群：○、野生型+高脂肪食群：●、$Irs2^{-/-}$ +普通食群：□、$Irs2^{-/-}$ +高脂肪食群：■、各群 n=10、平均値±SD。

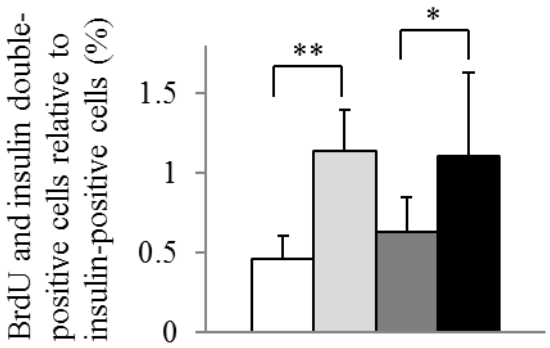


Figure 13　BrdU 陽性細胞率

負荷 7 日目に膵切片に対して抗インスリン抗体、抗 BrdU 抗体にて免疫染色を行った。膵島における BrdU 陽性β細胞数を、膵島内の全β細胞数で除し 100 を乗じて BrdU 陽性細胞率(%)として評価した。**p<0.01。

野生型+普通食群：□、野生型+高脂肪食群：□、$Irs2^{-/-}$ +普通食群：■、$Irs2^{-/-}$ +高脂肪食群：■、各群 n=10、平均値±SD。

5.5　グルコキナーゼ活性化薬による短期高脂肪食負荷への影響

グルコキナーゼ活性化薬は膵β細胞増殖を亢進させるため[17,18]、短期高脂肪食負荷に加えてグルコキナーゼ活性化薬を投与し膵β細胞増殖への影響を検討した。Figure 14 に示す通り、我々は 8 週齢の雄の C57BL/6J マウスを、普通食群と高脂肪食群に別け 1 週間飼育、さらにそれぞれ群において 1 週間の飼育の最後の 3 日間にグルコキナーゼ活性化薬を投与する群とプラセボを投与する群に群別した。体重は 4 群間で差を認めなかったが、7 日目に HF および HF + GKA 群で体重はわずかに増加した（Figure 15a）。血糖値は、GKA 処置開始後 7 日目に SC + GKA および HF + GKA 群で低下した（Figure 15b）。 HF および SC + GKA 群における BrdU の取り込み率は、SC 群におけるものと比較して増加した。さらに、HF + GKA 群では、他の 3 群と比較して BrdU 取り込み率の顕著な増加を認めた（Figure 16）。

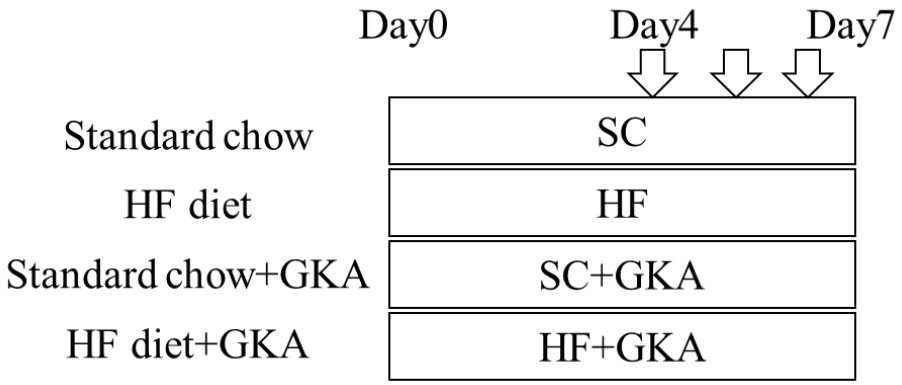


Figure 14　実験プロトコール

SC：普通食＋プラセボ、HF：高脂肪食＋プラセボ、SC+GKA：普通食＋GKA、HF＋GKA：高脂肪食＋GKA、各群 n=10。⇩: GKA 投与。

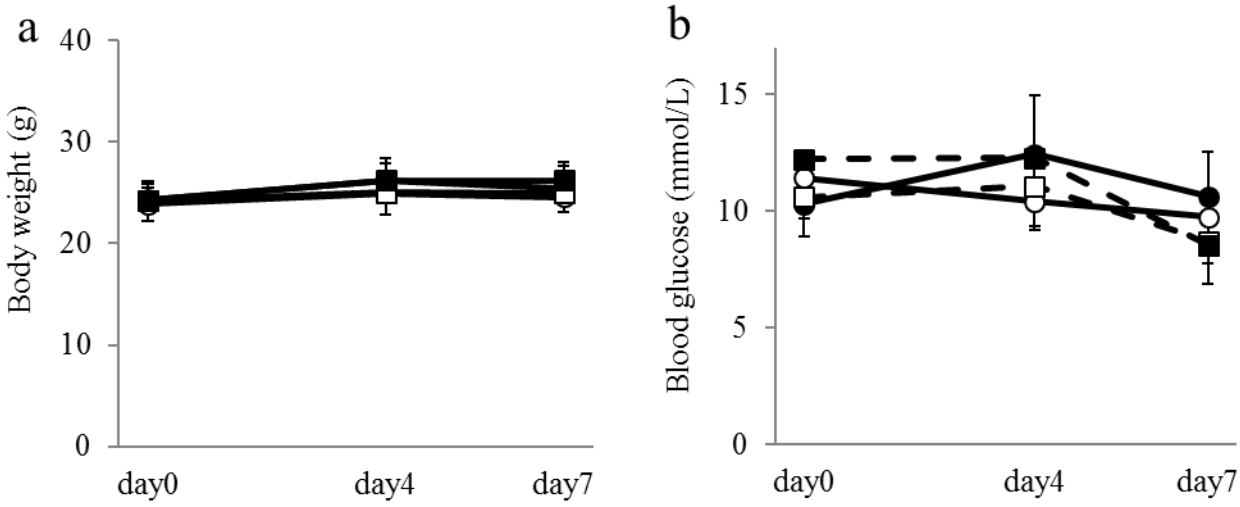


Figure 15 体重および随時血糖の推移

8 週齢まで普通食を与え、それ以後、4 群に別け、1 週間飼育し、体重(a)および随時血糖値(b)を比較した。

SC : ○、HF : ●、SC+GKA : □、HF+GKA : ■、各群 n=10、平均値±SD。

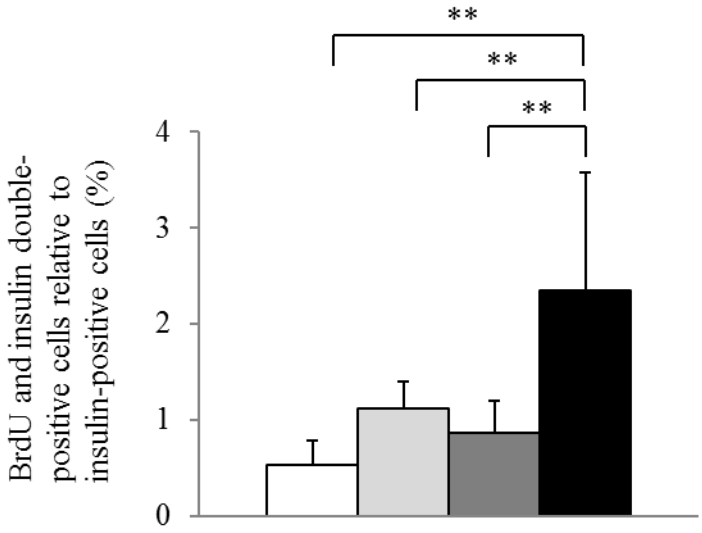


Figure 16　BrdU 陽性細胞率

負荷 7 日目に膵切片に対して抗インスリン抗体、抗 BrdU 抗体を用いて免疫染色を行った。膵島における BrdU 陽性β細胞数を、膵島内の全β細胞数で除し 100 を乗じて BrdU 陽性細胞率(%)として評価した。

SC：□、HF：■、SC+GKA：▣、HF+GKA：■、各群 n=10。

平均値±SD、**p<0.01。

5.6　短期高脂肪食負荷による膵島の遺伝子発現変化

網羅的な遺伝子発現の差異を検討する目的に、普通食または高脂肪食を 8 週齢の C57BL/6J マウスに 1 週間与え単離した膵島を用いてマイクロアレイ解析を行った。普通食群に対して高脂肪食群での発現が 1.5 倍以上であった 62 個の遺伝子について、まず Gene Ontology 解析を行ったところ、これらは主に細胞周期に関連していたことが明らかになった（Table 1)。次に、階層型クラスタリング解析を行い、遺伝子発現プロファイルが類似する遺伝子を検討したところ、*Ccna2, Ccnb1, Cenpa* の 3 つが、互いに比較的近傍に位置していた（Figure 16)。Real-time PCR 法を用いた mRNA 発現の検討では、*Ccna2, Ccnb1, Cenpa* に加え、*Foxm1* およびその下流遺伝子の発現が、普通食群と比較して高脂肪食群で有意に増加していた（Figure 18a, 18b)。一方で、*Ccnd1, Ccnd2, Ccnd3* の遺伝子発現は 2 群間で有意差を認めなかった（Figure 18b)。さらに、Foxm1 の遺伝子発現に関して、Gck $^{+/-}$ マウスにおいても同様の検討で普通食群と比較して高脂肪食群で有意な増加を認めた（Figure 19)。

Table 1　Gene Ontology 解析

短期高脂肪食負荷によって有意な発現増加が認められた 62 個の遺伝子による Gene Ontology 解析を行い、p 値による上位 10 term を示した。

Rank	Term	*P* value
1	Cell cycle process	8.12E-16
2	Condensed chromosome	1.43E-14
3	Mitosis	1.65E-13
4	Nuclear division	1.65E-13
5	Organelle fission	4.83E-13
6	Cell cycle	5.85E-13
7	Cell division	8.26E-13
8	Chromosome segregation	6.01E-11
9	Condensed chromosome kinetochore	2.09E-10
10	Sister chromatid segregation	3.49E-10

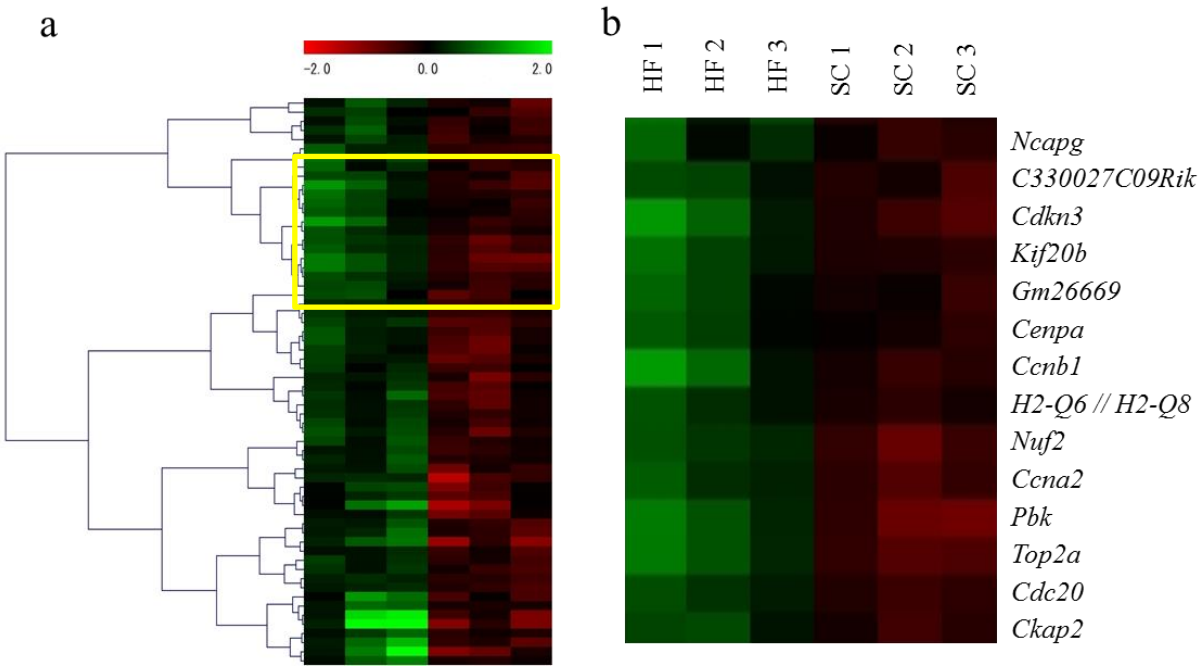


Figure 17　階層型クラスタリング解析

8 週齢の雄の C57BL/6J マウスに普通食または高脂肪食を 1 週間与え、単離した膵島を用いた階層型クラスタリング解析。高脂肪食群で普通食群と比較して発現が 1.5 倍以上あった 62 個の遺伝子（a)。そのうち *Ccna2, Ccnb1, Cenpa* を含む 14 個の遺伝子（黄枠内）を抜粋（b)。

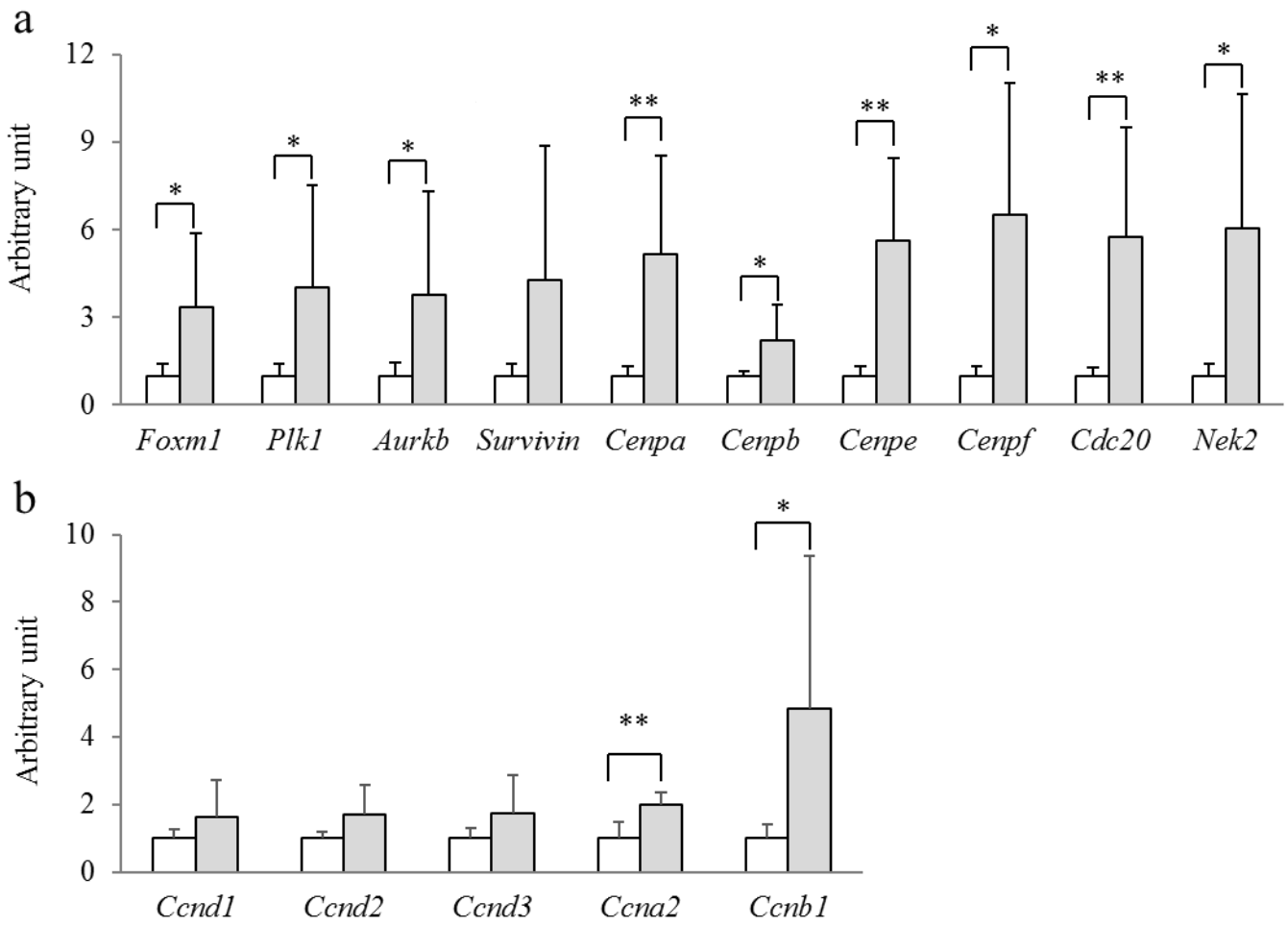


Figure 18 単離膵島での遺伝子発現

負荷 7 日目に単離した膵島における *Foxm1* およびその下流遺伝子群の発現 (a) および *Ccnd1, Ccnd2, Ccnd3, Ccna2, Ccnb1* の遺伝子発現 (b) を real-time PCR 法で比較検討した。内因性コントロールとして GAPDH を用いた。

普通食群：□、高脂肪食群：▨、各群 n=9、平均±SD、*p<0.05, **p<0.01。

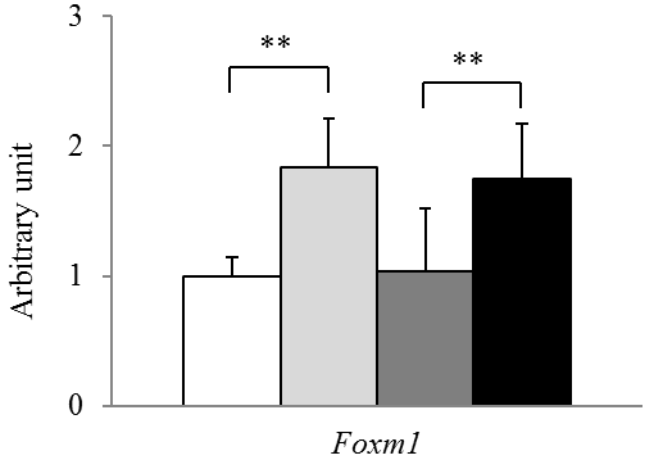


Figure 19　膵島での遺伝子発現

負荷 7 日目に野生型および Gck$^{+/-}$マウスから単離した膵島における *Foxm1* の遺伝子発現を real-time PCR 法で比較検討した。内因性コントロールとして GAPDH を用いた。

野生型+普通食群：□、野生型+高脂肪食群：▨、Gck$^{+/-}$ +普通食群：▩、Gck$^{+/-}$ +高脂肪食群：■、各群 n=6-7、平均±SD、**p<0.01。

5.7　Rapamycin による短期高脂肪食負荷への影響

mammalian target of rapamycin (mTOR)が、短期高脂肪食負荷の膵β細胞増殖に与える影響を検討するために、mTOR 阻害薬である rapamycin を投与する検討を行った。8 週齢の雄の C57BL/6J 雄マウスを普通食とプラセボ（SC)、高脂肪食とプラセボ（HF)、普通食と rapamycin（SC+Rapa)、高脂肪食と rapamycin（HF+Rapa）の 4 群に群別し比較検討を行った(Figure 20)。 体重は 4 群間で有意差を認めず(Figure 21a)、負荷 7 日目において、HF 群、SC+Rapa 群、HF+Rapa 群の血糖値は、SC 群の血糖値より高値であった（Figure 21b)。HF 群の BrdU 陽性細胞率は SC 群と比較して有意に増加したが、SC + Rapa 群と HF + Rapa 群との間に BrdU 陽性細胞率に有意差は認めなかった（Figure 22)。

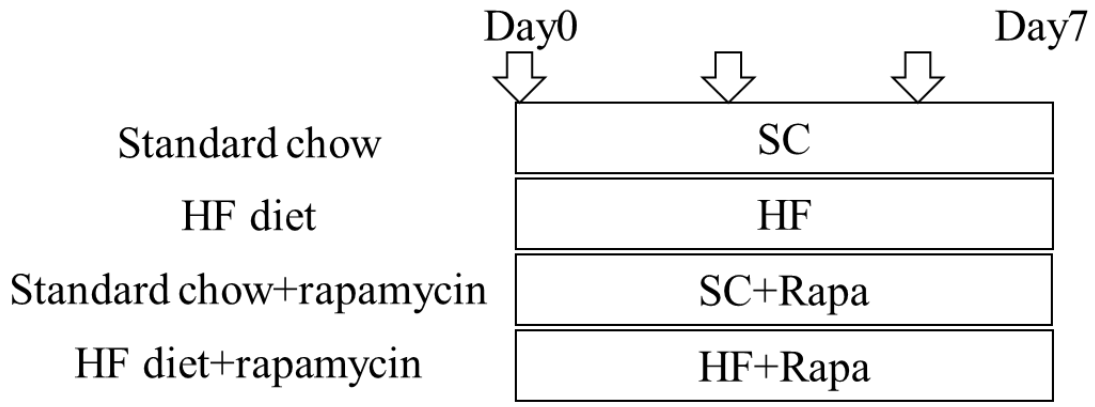


Figure 20　実験プロトコール

SC：普通食＋プラセボ、HF：高脂肪食＋プラセボ、SC+Rapa：普通食＋rapamycin、HF＋Rapa：高脂肪食＋rapamycin、⇩：rapamycin 投与。
各群 n＝10。

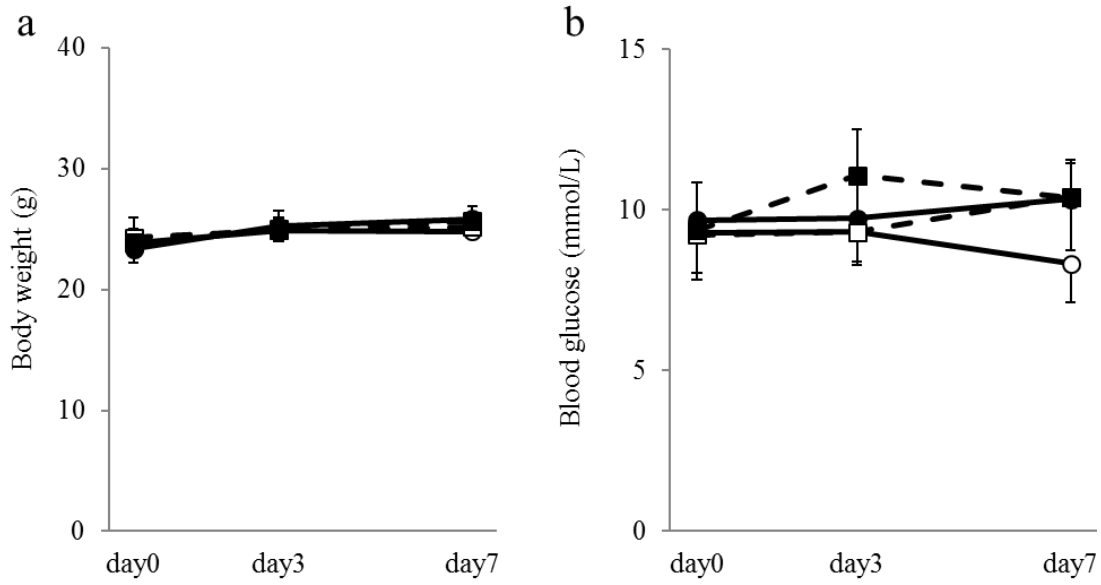


Figure 21 体重および随時血糖の推移

8 週齢まで普通食を与え、それ以後、4 群に別け、1 週間飼育し、体重(a)および随時血糖値(b)を比較した。

SC : ○、HF : ●、SC+Rapa : □、HF+Rapa : ■、各群 n=10、平均±SD。

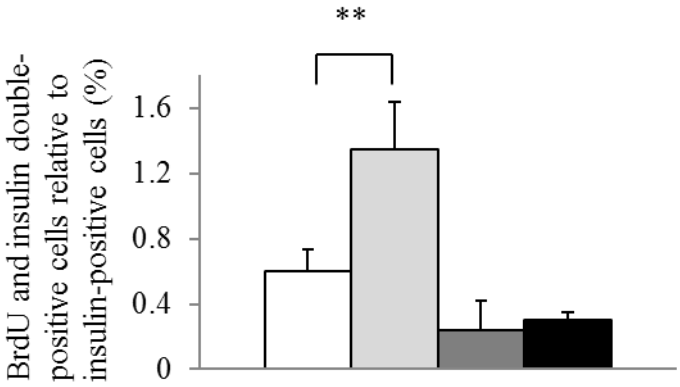


Figure 22　BrdU 陽性細胞率

負荷 7 日目に膵切片に対して抗インスリン抗体、抗 BrdU 抗体を用いて免疫染色を行った。膵島における BrdU 陽性β細胞数を、膵島内の全β細胞数で除し 100 を乗じて BrdU 陽性細胞率(%)として評価した。

SC : □、HF : □、SC+Rapa : ■、HF+Rapa : ■、各群 n=10、平均±SD、**p<0.01。

5.8　48 週齢の C57BL/6J マウスにおける短期高脂肪食負荷による膵 β 細胞増殖への影響

短期高脂肪食負荷が高齢マウスの膵 β 細胞増殖を亢進させるかどうかを検討するために、48 週齢の雄の C57BL/6J マウスに普通食または高脂肪食を 1 週間与えた。体重および随時血糖値は、普通食群と比較して高脂肪食群で有意に増加した（Figure 23a, 23b)。普通食群と比較して高脂肪食群では BrdU 陽性細胞率が有意に増加した（Figure 24)。普通食群と比較して高脂肪食群では *Ki67, Foxm1, Ccna2, Ccnb1* の遺伝子発現が有意に高かったが、Irs2 の発現には 2 群間で有意差を認めなかった（Figure 25)。これらの結果から、短期高脂肪食負荷は 8 週齢マウスだけでなく、48 週齢マウスにおいても膵 β 細胞増殖を刺激するとことが示された。

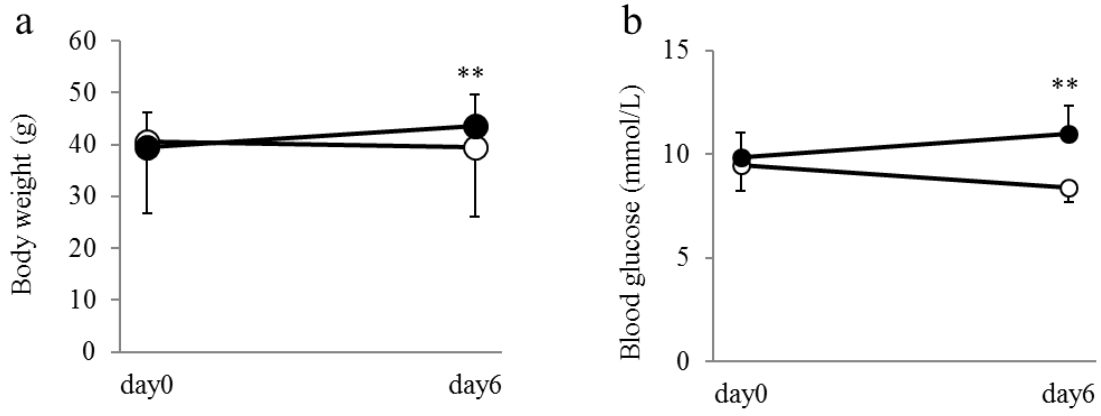


Figure 23 体重および随時血糖値の推移

48 週齢まで普通食を与え、それ以後、普通食群と高脂肪食群に別け、1 週間飼育し、体重(a)および随時血糖値(b)を比較した。

普通食群：○、高脂肪食群：●、各群 n=10、平均±SD、**p<0.01 vs 普通食。

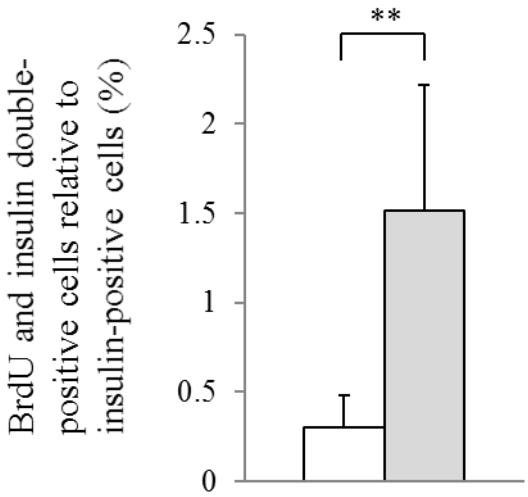


Figure 24　BrdU 陽性細胞率の経過

負荷 7 日目に膵切片に対して抗インスリン抗体、抗 BrdU 抗体にて免疫染色を行った。膵島における BrdU 陽性β細胞数を、膵島内の全β細胞数で除し 100 を乗じて BrdU 陽性細胞率(%)として評価した。

普通食群：□、高脂肪食群：■、各群 n=10、平均±SD 、*p<0.05。

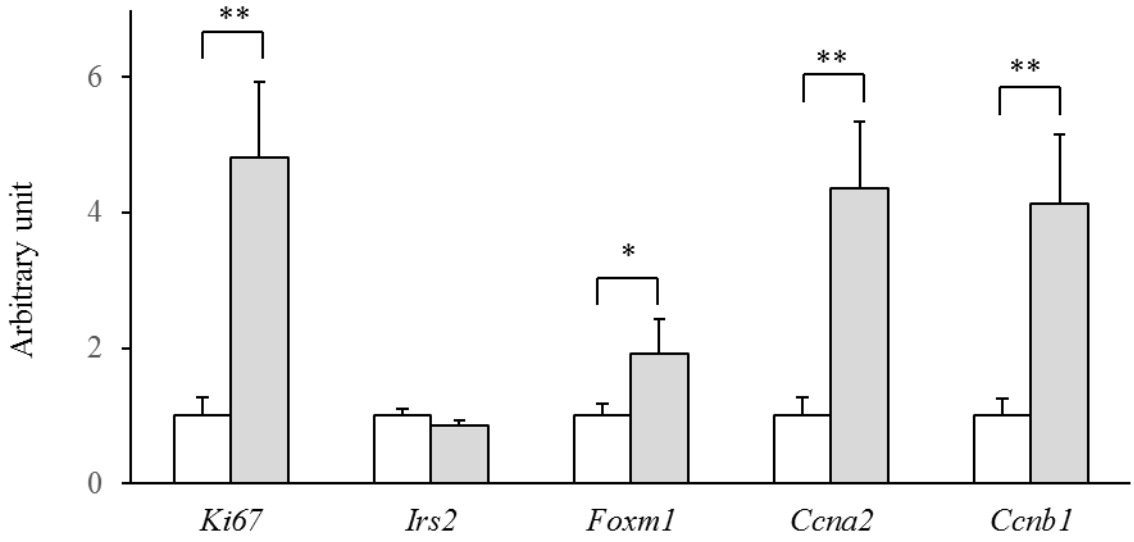


Figure 25 膵島での遺伝子および蛋白発現

負荷 7 日目に単離した膵島における *Ki67, Irs2, Foxm1, Ccna2, Ccnb1* の遺伝子発現を real-time PCR 法で比較検討した。内因性コントロールとして GAPDH を用いた。

普通食群 : □、高脂肪食群 : ■、各群 n=9、平均±SD 、*p<0.05、**p<0.01。

6. 考　察

今回の研究では、8 週齢の雄の C57BL/6J マウスにおいて、1 週間の高脂肪食負荷によって膵 β 細胞の増殖が誘導されることを見出した。体重、随時血糖値および内臓脂肪重量は、普通食を与えたマウスよりも高脂肪食を 1 週間与えたマウスでより高値であった。しかし、腹腔内へのインスリン投与による血糖低下効果は両群で同等であった。つまり、この実験モデルにおける膵 β 細胞増殖は、体重、内臓脂肪重量および高血糖の増加と一致したが、インスリン抵抗性の発症とは一致しなかった。本研究におけるインスリン抵抗性の評価は、短期高脂肪食誘導性膵 β 細胞増殖に関する検討を行っている既報の 1 つ [14] と同様にインスリン負荷試験を用いて行われたが、Mosser ら [15] は高インスリン正常血糖クランプ法及び α-ヒドロキシ酪酸の測定を用いて、より詳細に評価している。本検討における結果は、これらの既報と一致していた [14,15]。したがって、この実験モデルにおける膵 β 細胞増殖は、高脂肪食負荷によって誘導されるインスリン抵抗性への代償応答によるものではないと考えられた。

我々の研究の主な目的は、グルコキナーゼおよび IRS-2 が、短期間の高脂肪食負荷によって誘発された膵 β 細胞増殖に必要であるかどうかを検証することであった。グルコキナーゼは、解糖系の律速生化学反応を触媒することによって血糖値を調節するのに重要な役割を果たす [19,20]。膵 β 細胞において、グルコキナーゼによるグルコースのリン酸化は、インスリン分泌の律速段階である。したがって、Gck $^{+/-}$マウスは、グルコース応答性インスリン分泌能が低下するため、軽度の糖尿病を示すことが報告されており [21]、これは我々の実験でも確認された（Figure 9）。さらに、高脂肪食を 20 週間与えた Gck $^{+/-}$マウスは、野生型マウスと比較して膵 β 細胞増殖の減少することが示されており [12]、Porat らは後天的誘導性 Gck $^{+/-}$マウスにおいて膵 β 細胞の増殖能が劇的に低下することを報告した [22]。以前の報告 [23,24] と併せて、これらの知見は、膵 β 細胞においてグルコキナーゼを介するグルコースシグナルが膵 β 細胞増殖に重要な役割を果たすことを示している。しかし、我々の研究では、高脂肪食を 1 週間与えた野生型マウスおよび Gck $^{+/-}$マウスの両群において、膵 β 細胞増殖能の有意な上昇を認めた（Figure 10）。これは、短期間の高脂肪食負荷で誘導される膵 β 細胞増殖の機序が、グルコキナーゼ非依存的経路であることを意味する。

グルコキナーゼによるグルコース代謝はIRS-2の発現を増加させ、膵β細胞増殖を導くシグナル伝達カスケードを活性化する[13]。既報では、高脂肪食を20週間与えたGck$^{+/-}$マウスは野生型マウスと比較して膵β細胞増殖の低下およびIRS-2の発現上昇の欠如を示し、一方でGck$^{+/-}$マウスにIRS-2を過剰発現すると高脂肪食負荷後の膵β細胞増殖が回復した[12]。最近、*in vivo*および *ex vivo*でグルコース誘導性膵β細胞増殖にIRS-2が必要であることが報告されている[25]。遺伝子改変マウスの研究[26-28]から得られた既報と合わせて、これらの知見は、IRS-2もまた膵β細胞増殖において重要な役割を果たすことを示している。しかし、我々の研究は1週間の短期高脂肪食負荷において、IRS-2の発現上昇なしに膵β細胞増殖が誘導されること明らかにし、野生型マウスおよびIrs2$^{-/-}$マウスの両群において膵β細胞増殖能の有意な増加をみとめた（Figure 13)。これらの結果は、短期間の高脂肪食負荷による膵β細胞増殖の機序がIRS-2非依存的な経路であることを示唆している。

GKAによるグルコキナーゼ活性化はIRS-2の発現を増加させることが示され、GKAによるIRS-2の発現増加は膵β細胞増殖に影響することが報告されている[17,18]。したがって、長期高脂肪食負荷による膵β細胞増殖とGKAによるグルコキナーゼ活性化による膵β細胞増殖は、増殖シグナルの経路が共通していると考えられる。 短期間の高脂肪食負荷によって誘導される膵β細胞増殖の機序が上記のグルコキナーゼおよびIRS-2に非依存的な経路であるという仮説を探究するために、我々は、短期高脂肪食負荷およびGKA投与の膵β細胞増殖に対する併用効果を調べた。この併用投与は膵β細胞増殖を著しく増加させ（Figure 16)、短期高脂肪食負荷によるグルコキナーゼおよびIRS-2非依存的な経路とGKAによるグルコキナーゼおよびIRS-2を介する経路は膵β細胞増殖において相加的に作用することが示唆された。

この「短期高脂肪食誘導性膵β細胞増殖メカニズムはグルコキナーゼおよびIRS-2非依存的経路である」という知見は、短期高脂肪食負荷による何の要因が膵β細胞増殖を誘導するのかという問題を提起する。高脂肪食を1週間与えたマウスから単離した膵島の網羅的遺伝子解析は、Foxm1とその下流に位置する遺伝子群が協調的に発現上昇していることを明らかにした（Figure 17, 18)。 Foxm1は細胞周期制御に関わる転写因子で細胞増殖を誘導する[29]。また膵β細胞においても増殖に重要な役割を果たしており、実際、膵臓切除術、妊娠および肥満で誘導される膵β細胞増殖に必要であることが報告されている[30-32]。Foxm1は、有糸分裂を調節するため

に、Plk1、Aurkb、Survivin、Cenpa、Cenpb、Cenpf、および Cdc20 を含む多くの有糸分裂遺伝子の転写を調節する [32]。これらの遺伝子発現レベルは、我々の研究において real-time PCR 法による mRNA 発現上昇によって確認した。

Foxm1 は、G1 / S 期および G2 / M 期を含む細胞周期の全段階において重要な役割を果たすと考えられている。我々の研究では、Ccna2 および Ccnb1 の遺伝子発現が普通食を与えたマウスと比較して高脂肪食を与えたマウスの膵島で有意に増加していたが Ccnd には変化が認められなかった（Figure 18）。以前より Foxm1 による Cyclin family に対する影響は報告されており、Foxm1b を過剰発現させたマウスの単離膵島において Ccnd1、Ccnd2 および Ccnd3 の発現には影響を与えず、Ccna2 および Ccnb1 発現増加を認めた [32]。さらに、膵部分切除後のマウスの単離膵島において Foxm1、Ccna2 および Ccnb1 の発現は増加したが、Ccnd2 は増加しなかった [8,30]。これらの結果は、我々の結果と一致している。対照的に、グルコキナーゼによって増強される IRS-2 を介するシグナル伝達は Ccnd2 と関連しており [18]、高脂肪食を 1 週間与えたマウスの膵島における Cyclin 発現プロファイルは、グルコキナーゼおよび IRS-2 依存的経路の増強によって誘導されるものとは異なることを示している。したがって、短期と長期の高脂肪食負荷によって誘導される膵 β 細胞増殖は、異なる経路を介すると考えられる。

短期の高脂肪食負荷による Foxm1 の発現上昇の機序は明らかではない。Rapamycin は、Wister ラットにグルコースおよび Intralipid を 72 時間の同時注入する検討において、Foxm1 シグナル伝達および膵 β 細胞増殖を抑制することが示されており [33]、我々の検討でも rapamycin は短期高脂肪食負荷誘導性膵 β 細胞増殖を抑制した（Figure 22）。mTOR 複合体 1 のシグナル伝達経路が成長因子および栄養素からのシグナルを調節することが報告されており [34]、この mTOR 複合体 1 / Foxm1 経路を増強する因子を同定するさらなる研究が必要であり、現在進行中である。

膵 β 細胞の増殖は、マウスモデル [35,36] ならびにヒト [37] において加齢とともに減少する。さらに、マウスにおいて、代償的な膵 β 細胞の増殖は加齢とともに著明に低下する [36]。我々の研究は、1 週間の高脂肪食負荷が 8 週齢のマウスだけでなく、48 週齢のマウスにおいても、Foxm1、Ccna2 および Ccnb1 の発現上昇を伴って膵 β 細胞が増殖することを示した。この知見を支持する報告として、Galson らは、老化した膵 β 細胞において Foxm1 の発現を高めることで細胞周期を活性化し、膵 β 細胞増殖を導くこ

とを示している[38]。臨床的観点から、2 型糖尿病の発症がヒトの加齢とともに増加することを考えると、老化した膵島の β 細胞増殖を増加させる作用は特に重要である。

－第 2 章－

2 型糖尿病患者におけるビルダグリプチンとメトホルミンの併用投与による血管内皮機能及び代謝に及ぼす影響の検討

7. 緒　言

糖尿病患者では、冠動脈疾患の頻度は非糖尿病患者の 2～4 倍であり[39]、脳梗塞発症リスクは約 2 倍高く[40]、動脈硬化の抑制は、糖尿病治療の重要な目標であると考えられている。消化管ホルモンであるインクレチンを治療ターゲットにした Dipeptidyl-peptidase-4 (DPP-4) 阻害薬は、内因性の glucagon-like peptide-1 (GLP-1)を増加させることによって血糖依存的なインスリン分泌増加とグルカゴン分泌抑制作用により血糖降下を来し、膵β細胞に対して保護的に作用することが報告されている[41,42]。他のいくつかの糖尿病治療薬とは異なり、低血糖のリスクが低く、体重増加が少ないという利点を有する[43,44]。GLP-1 は一酸化窒素を介して血管内皮を弛緩させ[45]、2 型糖尿病患者において GLP-1 の短時間（105 分間）注入により血管内皮機能が改善したという報告がある[46]。血管内皮機能障害は、動脈硬化の初期段階にあり[47]、その改善効果は、動脈硬化の進行を阻害することが期待されていた。しかし、DPP-4 阻害薬の心血管イベントの二次予防に及ぼす影響を明らかにする目的で、プラセボを対象に行われた最近の DPP-4 阻害薬の各種大規模臨床試験では、いずれも心血管イベント二次予防効果における優越性を示すことはできなかった[48-50]。そのため、動脈硬化のすでに進行した糖尿病患者での DPP-4 阻害薬による抗動脈硬化作用は、未だ明らかになったとは言えない。ビグアナイド薬であるメトホルミンは糖尿病治療薬がそれほどない時代において、大血管症を抑制することを証明した糖尿病治療薬であり、血糖降下作用は大きいうえに低コストであり、欧米では 2 型糖尿病の第一選択薬として推奨されている[51-53]。一方、DPP-4 阻害薬は、安全性が高く痩せ型の 2 型糖尿病患者において有効

であることが示されており[54]、日本を含むアジアで頻繁に処方されている。前述のとおりDPP-4阻害薬による心血管イベントの二次予防効果は明らかではなかったが、動脈硬化の初期段階を最適に予防するために、メトホルミンまたはDPP-4阻害薬のどちらを選択すべきなのかは不明であり、血管内皮機能に対するDPP-4阻害薬を含むインクレチン関連薬の効果については一定の見解はなく未だ議論されている。2型糖尿病患者において、DPP-4阻害薬であるシタグリプチンを投与し、血管内皮機能をflow-mediated dilatation（FMD）を用いて評価したところ、改善を認めなかったとの報告があるが[55]、同じDPP-4阻害薬であるビルダグリプチンは1日2回投与であり、1日1回投与であるシタグリプチンと比較して1日の血糖変動をより改善することで、酸化ストレスおよび炎症マーカーが改善したという報告もある[56]。同様の結果が2型糖尿病のアジア患者でも報告されている[57,58]。これらの知見に基づいて、今回、低用量のメトホルミンにて血糖コントロールが不十分である2型糖尿病患者においてビルダグリプチンの追加またはメトホルミンの増加による血管内皮機能改善効果について検討した。

8. 実験方法

8.1 対象

札幌市にある 13 の糖尿病を専門とする医療機関から、血圧および脂質管理の安定した 97 人の 2 型糖尿病患者が登録された。登録基準は以下の通りであった：スルホニルウレア薬またはグリニド薬以外に糖尿病治療薬を使用していないこと、食事療法および運動療法に加えてメトホルミン（500-750mg /日）を 4 週間以上内服している 20～75 歳の 2 型糖尿病で血糖コントロールが不十分（HbA1c 7.0～8.5%）であること。一方で、アテローム性動脈硬化疾患（狭心症、心筋梗塞、脳梗塞、末梢動脈疾患）を有する患者、登録時にインスリン療法を受けている患者、妊娠中の女性、慢性的な血清トランスアミナーゼ高値や腎機能障害を有する患者は除外した。

8.2 研究プロトコール

本研究は、多施設共同、前向き無作為化非盲検並行群間比較試験であった。試験期間中、食事療法および運動療法は継続し、ビルダグリプチンおよびメトホルミン以外の薬物の用量および頻度の変更は行わなかった。しかし、スルホニルウレア薬またはグリニド薬は、低血糖のリスクのある患者では減量することは許容した。主要評価項目は、試験前後での治療群間の FMD の変化量の比較であった。

ビルダグリプチンとメトホルミンまたは高用量のメトホルミンとの併用療法のサンプルサイズは、以前のシタグリプチンまたはメトホルミンを用いたシングルアームの研究の結果に基づいて[59-62]、FMD をそれぞれ 1.5%（SD = 1.8%）および 0.5%改善すると仮定して計算した。2 標本 t 検定に基づいて、群間で不等分散があると仮定して、検出力 80%および有意水準 5%の下に必要な症例数を計算すると各群 52 例となり、脱落・中止を考慮して 55 例、両群で計 110 例と設定した。副次評価項目は、膵 β 細胞機能の代謝パラメータおよびサロゲートマーカーの変化とした。インフォームド・コンセントを行った後、年齢、body mass index（BMI）、HbA1c、お

よび FMD の各因子に従って、患者をビルダグリプチンおよびメトホルミン併用療法群（Vilda）または高用量のメトホルミン治療群（高 Met）に割り付けた。Vilda 群では、メトホルミン（500-750mg /日）を服用している患者にビルダグリプチン（100mg /日）を追加投与し、高 Met 群では、メトホルミンを試験開始前の用量（500-750mg /日）を倍量（1000-1500mg /日）にした。12 週間の観察期間中、各医療施設で厳密な血糖コントロールを実施した。試験前後に行う FMD 検査に関しては、全ての対象者に対して、北海道大学病院内の同一環境下で、同一の技術者が患者背景を知らない状況で盲検的に行われた。被験者登録期間は 2013 年 4 月から 2016 年 3 月までとした。

8.3　血管内皮機能

血管内皮機能はガイドラインに従って上腕動脈を用いて FMD で評価を行った[57-59]。すなわち、FMD 検査は一晩絶食後の翌朝に実施し、検査日の朝から、被験者は薬剤、喫煙、カフェイン、抗酸化ビタミンを控えた。患者は、右腕の上腕動脈のベースライン血管径を測定する前に、静穏な温度制御室（23～26℃）で少なくとも 15 分間仰臥位安静を保った。右前腕をカフで圧迫（収縮期血圧に対して 50mmHg）し、5 分後にカフを弛緩させ、血管径を連続的に測定した。FMD は、ベースラインからピーク拡張までの変化率として評価した。FMD 測定後、Endo-PAT 装置（Itamar Medical Ltd.、Cesarea、Israel）を用いて reactive hyperemia index（RHI）を測定した。

8.4　血生化学

空腹時血液サンプルを採取直後に氷上に置き、4℃で遠心分離し、得られた上清を測定するまで-20℃で保存した。low-density lipoprotein（LDL）-コレステロールは Friedewald 式を用いて計算した。血漿アディポネクチン、high-sensitivity C-reactive protein（hs-CRP）、グルカゴン、tumor necrosis factor alpha（TNF-α）、N terminal prohormone of brain natriuretic peptide（NT-proBNP）およびプロインスリンはそれぞれラテックス凝集、比濁分析、ラジオイムノアッセイ、酵素結合イムノソルベントアッセイ、電

気化学発光イムノアッセイ、およびラジオイムノアッセイ（SRL、Inc、Tokyo、Japan）で測定した。

8.5　その他の評価項目

膵β細胞機能は、プロインスリン/インスリン比を用いて評価した。インスリン抵抗性の指標である Homeostasis model assessment of insulin resistance（HOMA-IR）は、空腹時血糖値およびインスリン濃度から、以下の式に従って計算した：HOMA-IR =（空腹時血糖値[mg / dl]×インスリン濃度[μU/ ml]）/ 405。酸化ストレスの指標として reactive oxygen metabolites-derived compounds（d-ROM）を、抗酸化力の指標として biological antioxidant potential（BAP）を測定した。

8.6　統計学的解析

結果は平均±SD、中央値（範囲）または数（%）として示した。両群間の背景因子の差は、連続変数には Welch の t 検定または Mann-Whitney U 検定を、離散変数にはカイ二乗検定を用いて評価した。正規性の評価に Kolmogorov-Smirnov 検定を行い、連続変数において適切な統計検定を選択した。主要評価項目の解析は、intention-to-treat 解析にて行い、Vilda 群の FMD に対する効果を高 Met 群をコントロールとして評価し、結果は analysis of covariance（ANCOVA）にてベースラインの FMD 値で補正した。副次評価項目は、欠損データの存在しない症例集団において両群の血管内皮機能および代謝パラメータなどについてベースラインおよび治療後変化について分析した。P 値<0.05 を統計的に有意であるとした。主要評価項目のデータ分析には SAS version 9.4 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) を用いて、その他のデータ分析には Ekuseru-Toukei 2012（Social Survey Research Information、Tokyo、Japan）を用いた。

9. 実験結果

9.1　背景因子

全部で 97 人の被験者が登録されたが、そのうちの 1 人は、研究基準を満たさないことが判明し、除外された。96 人が初回の FMD 検査をうけ、研究の終わりまでに 8 人の被験者が脱落した。脱落の理由には、外来訪問の中断（n = 6)、試験薬の副作用（n = 2）が含まれていた（Figure 26)。96 人のうち男性が 57 人、女性が 39 人で、平均年齢 58.7±11.0 歳、BMI 25.9±4.4 kg / m2、HbA1c 7.3±0.5%であった。ベースラインでは、年齢、性別、BMI、血圧、生物学的パラメータ、現在の喫煙率、糖尿病合併症、使用薬剤（レニン-アンギオテンシン系阻害薬、スタチン、メトホルミンなど）の割合に有意差はなかった　(Table 2)。

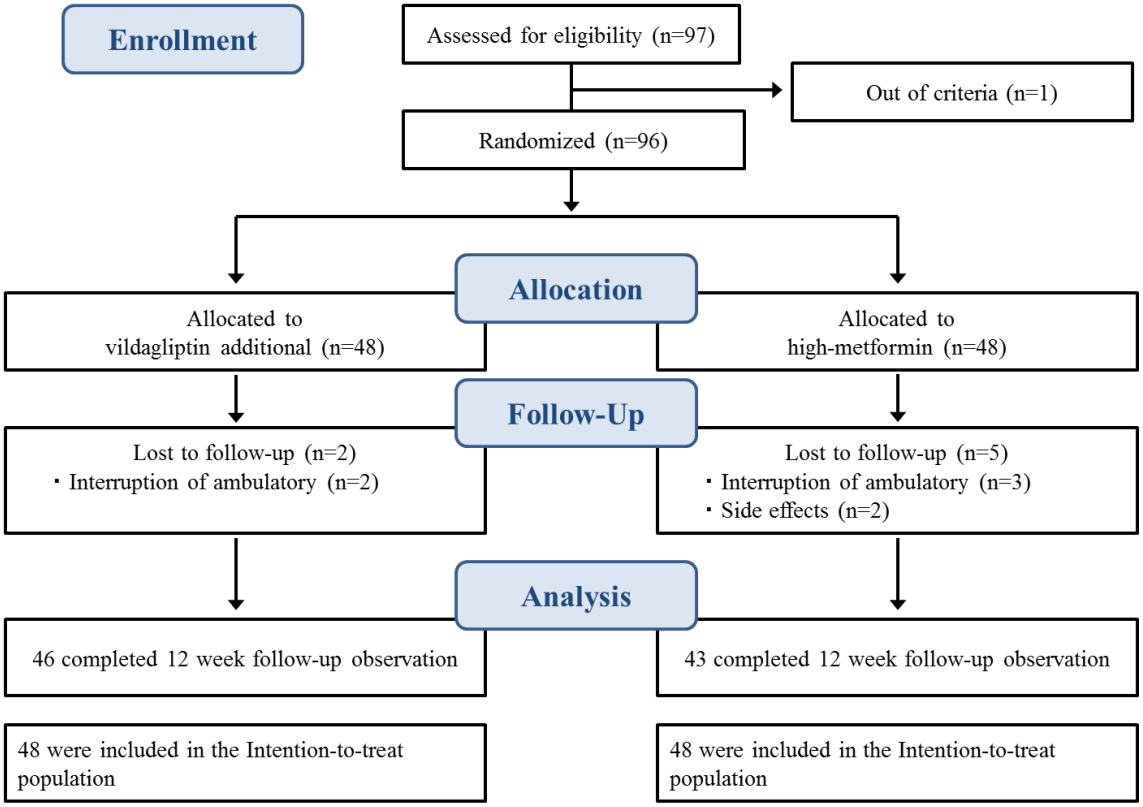


Figure 26 CONSORT 2013 Flow Diagram

Table 2　背景因子の比較

Variables	Vilda (n=48)	High Met (n=48)	*P* value
Age (years)	62 (31 to 74)	60 (20 to 74)	0.50*
Male sex (%)	54.2	64.6	0.43
Body mass index (kg/m^2)	25.7 ± 4.1	26.1 ± 4.7	0.59
Flow mediated dilatation (%)	5.5 ± 2.0	6.1 ± 3.0	0.20
FPG (mM/L)	7.8 ± 1.3	8.1 ± 1.3	0.20
Hemoglobin A1c (%)	7.3 (6.6 to 8.4)	7.2 (6.4 to 8.7)	0.23*
SBP (mmHg)	129.0 ± 13.0	126.6 ± 12.2	0.35
DBP (mmHg)	75.0 ± 9.2	75.5 ± 10.2	0.83
LDL-cholesterol (mg/dL)	112.4 ± 30.0	110.6 ± 28.7	0.76
Current smokers (%)	29.2	27.1	0.90
Hypertension (%)	41.7	43.8	0.89
Dyslipidemia (%)	77.1	68.8	0.43
Angiotensin-converting enzyme inhibitors/ angiotensin II receptor blockers (%)	31.3	27.1	0.81
Statin (%)	39.6	35.4	0.80
Diabetic nephropathy (%)	20.8	20.8	1.00
Metformin (mg)	559.5±107.8	595.2±122.9	0.16
Sulfonylureas (%)	18.8	27.1	0.65
Glinides (%)	0	0	1.00

Vilda, vildagliptin+metformin group; High Met, high dose metformin group; FPG, fasting blood glucose; SBP, systolic blood pressure; DBP, diastolic blood pressure. Values are mean ± SD or median (range).
P value of Vilda vs high Met groups.
*Mann–Whitney U test was applied to the factors age and HbA1c.

9.2　血管内機能および動脈硬化

ベースラインの FMD は Vilda 群で 5.48%、高 Met 群で 6.14%であった。FMD は治療後両群で減少傾向を示したが有意ではなく、FMD の変化量は両群間で有意差を認めなかった。ANCOVA でベースラインの FMD 値を用いて補正しても結果は変わらなかった（p = 0.854）（Table 3）。どちらの群においても FMD と HbA1c に相関は認められなかったが、Vilda 群において apolipoprotein（apo）B / apoA1 比の低下は FMD の上昇と有意に相関していた（Table 4）。Centric systolic blood pressure（cSBP）、augmentation index、および RHI のような他の心血管パラメータに変化は認めなかった（Table 5）。

Table 3　試験前後での FMD 変化量の比較

	Vilda (n=48)	High Met (n=48)	*P* value
Baseline FMD (%)	5.48±2.03	6.14±2.99	
12 weeks FMD (%)	5.14±2.27	5.39±2.29	
ΔFMD (%)	-0.51 (-1.08 to 0.06)	-0.58 (-1.20 to 0.04)	
Comparison of ΔFMD in ANCOVA	0.08 (-0.74 to 0.89)	reference	0.854

Vilda, vildagliptin+metformin group; High Met, high dose metformin group; ANCOVA, analysis of covariance; CI, confidence interval.
Values are expressed as mean ± SD or the least square means (95% CI).
The least square means were calculated by ANCOVA adjusted for baseline FMD.

Table 4　試験前後での FMD と各種パラメータとの相関

Variables	r	*P* value for the Spearman's rank-correction	r	*P* value for the Spearman's rank-correction
Medication	Vilda		High Met	
BMI	0.038	0.803	0.013	0.932
HbA1c	-0.131	0.386	-0.053	0.735
cSBP	-0.069	0.651	0.050	0.751
Proinsulin/IRI ratio	-0.060	0.694	-0.046	0.770
LDL-cholesterol	-0.249	0.095	0.101	0.521
ApoB/ApoA1 ratio	-0.326	0.026	-0.069	0.659
Adiponectin	0.049	0.746	0.124	0.432

IRI, immunoreactive insulin.

9.3　糖脂質および代謝マーカー

12 週間の治療後、高 Met 群では BMI が有意に低下したが、Vilda 群と高 Met 群との間の BMI の変化量に有意差はなかった。HbA1c は Vilda 群で高 Met 群と比較して有意に改善し（p <0.01）、HOMA-IR も Vilda 群で有意に改善した（p = 0.01）。高 Met 群では血清グルカゴン濃度、TNF-α、hsCRP が有意に低下し（それぞれ p = 0.04, 0.02, 0.03）、プロインスリン/インスリン比は治療後に両群で有意に改善したが両群の変化量に有意差は認めなかった。また、酸化ストレスに関して、d-ROM および BAP の変化は両群ともに認められなかった。脂質プロファイルに関して、LDL-コレステロールが両群において改善したが、その変化量は両群間で有意差は認めなかった。ApoB / apoA1 比は、Vilda 群において試験前後で有意に減少したが、その変化量は高 Met 群と比較しても有意差は認めなかった（p = 0.27）。アディポネクチンは、高 Met 群と比較して Vilda 群で有意に増加した（0.01 μg/ mL vs 0.75 μg/ mL; p <0.01）（Table 5）。

Table 5　Vilda 群と高 Met 群における各種パラメータの比較

Variables	Vilda (n=46)		High Met (n=43)		*P*-value
	Baseline	After 12 weeks	Baseline	After 12 weeks	
BMI (kg/m^2)	25.8 ± 4.1	25.6 ± 4.3	25.8 ± 4.6	25.4 ± 4.6**	0.25
SBP (mmHg)	127.5 ± 11.3	126.4 ± 9.9	127.2 ± 12.5	127.8 ± 11.1	0.51
DBP (mmHg)	74.7 ± 9.1	73.1 ± 8.2	76.0 ± 10.6	75.8 ± 9.4	0.51
Cardiovascular functions					
†cSBP (mmHg)	138.2 ± 17.2	134.0 ± 16.5**	136.8 ± 20.3	131.0 ± 16.7**	0.52
Augmentation index (%)	26.5 (-38.0 to 88.0)	24.0 (-19.0 to 69.0)	17.0 (-9.0 to 68.0)	20.0 (-12.0 to 57.0)	0.83
†RHI	1.74 (1.16 to 3.52)	1.77 (1.15 to 4.32)	1.73 (0.86 to 3.16)	1.73 (0.95 to 3.99)	0.37
Biochemical parameters					
FPG (mM/L)	7.8 ± 1.3	6.6 ± 0.9**	8.0 ± 1.2	7.2 ± 1.0**	0.09
Hemoglobin A1c (%)	7.25 (6.60 to 8.40)	6.45 (5.70 to 7.20)**	7.20 (6.40 to 8.70)	6.80 (6.00 to 8.20)**	<0.01
IRI (μU/mL)	5.8 (1.1 to 17.3)	6.1 (1.3 to 21.5)	5.0 (1.0 to 18.8)	5.1 (1.0 to 16.7)	0.92
Proinsulin/IRI ratio	0.66 (0.19 to 2.12)	0.50 (0.20 to 0.98)**	0.63 (0.24-2.20)	0.56 (0.07-2.04)**	0.19
†HOMA-IR	1.88 (0.32 to 5.81)	1.74 (0.33 to 6.00)*	1.80 (0.28 to 9.19)	1.64 (0.22 to 6.72)	0.45
Glucagon (pg/mL)	164 (114 to 337)	155 (112 to 290)	170 (105 to 325)	158 (105 to 275)*	0.73
LDL-cholesterol (mg/dL)	107.9 (55.6 to 185.0)	100.5 (42.2 to 160.4)*	105.8 (53.2 to 180.2)	99.2 (40 to 170.3)*	0.64
HDL-cholesterol (mg/dL)	52.0 (28.0 to 87.0)	49.5 (28.0 to 85.0)	55.0 (35.0 to 105.0)	52.0 (35.0 to 98.0)	0.75
Triglyceride (mg/dL)	102.5 (46.0 to 289.0)	106.0 (48.0 to 241.0)	104.0 (27.0 to 369.0)	102.0 (24.0 to 565.0)	0.38
ApoB (mg/L)	91 (49 to 148)	87 (32 to 131)**	92 (47 to 145)	89 (52 to 146)	0.06
ApoB/ApoA1 ratio	0.66 (0.29 to 1.13)	0.62 (0.21 to 1.29)**	0.60 (0.31 to 1.13)	0.60 (0.30 to 1.15)	0.27
††Adiponectin (μg/mL)	6.25 (1.90 to 13.10)	6.80 (1.90 to 15.50)**	6.45 (1.60 to 16.90)	5.90 (1.90 to 16.90)	<0.01
NT-proBNP (pg/mL)	31 (6 to 294)	26 (6 to 414)	26 (5 to 209)	24 (5 to 169)	0.27
††TNF-α (pg/mL)	1.10 (0.70 to 2.10)	1.10 (0.60 to 2.40)	1.25 (0.60 to 1.90)	1.05 (0.60 to 2.10)*	0.15
log hsCRP (ng/mL)	2.88 ± 0.54	2.86 ± 0.54	2.74 ± 0.48	2.63 ± 0.48*	0.19
log albuminuria (mg/g.Cre)	1.04 (0.32 to 2.51)	0.93 (0.41 to 2.67)	0.98 (0.53 to 2.38)	0.85 (0.45 to 2.59)*	0.18
Oxidative stress					
d-ROMs	334.5 (230 to 525)	344.0 (197 to 527)	319 (205 to 488)	318 (143 to 494)	0.69
BAP	2369 (1853 to 3085)	2410 (1806 to 4201)	2447 (1470 to 4622)	2445 (1113 to 3676)	0.30

† Data from 88 patients (Vilda, N=45; high-Met, N=43).

†† Data from 88 patients (Vilda, N=46; high-Met, N=42).

Values are mean ± SD or median (range). P value: mean changes between baseline and the end of the study (Welch's t-test or Mann–Whitney U test). * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ between baseline and the end of the study (paired-sample t-tests or Wilcoxon signed rank test).

10. 考　察

インクレチン関連薬がアテローム性動脈硬化疾患に対して有益な効果を有するとの報告がされているが[45,46]、いくつかの無作為臨床試験では、DPP-4 阻害剤が 2 型糖尿病患者のプラセボと比較して心血管イベントを減少させることができなかったと報告されている[48-50]。欧米では、ビグアナイド薬であるメトホルミンが体重にかかわらず第一選択薬として処方され、DPP-4 阻害薬はメトホルミンの併用薬として第二選択薬の中の一剤として使用されている[63]。日本では、最近になって高用量のメトホルミンが保険適応になり、処方数および用量が徐々に増加している状況にある。United Kingdom prospective diabetes study（UKPDS）34 試験[51]や Prevention of restenosis with tranilast and its outcome（PRESTO）試験[64]では、メトホルミンによる心血管イベントのリスク低下が報告されており、これらの報告を支持するように、血管内皮機能の改善[61]、GLP-1 濃度の増加[65]、マウス研究では、膵島における GLP-1 受容体の増加[66]がメトホルミンについて報告されている。つまり、メトホルミンと GLP-1 製剤との併用療法は、GLP-1 効果の増強において臨床的に有効であり、血管内皮機能に有益な影響を及ぼすと考えられる。しかし、血管内皮機能検査 FMD に対するこれまでのシタグリプチンによる改善効果については、相反する様々な報告があり一定の見解が得られていない[60,67,68]。FMD の結果は、患者の背景[69]、気温[70]、および併用薬物[71-74]などの要因によっても変動することが報告されているが、本研究では、12 週間にわたってビルダグリプチンまたはメトホルミンを投与しても FMD の改善は認めず、これらの交絡因子のいずれについてもその関与を認めなかった。

LDL-コレステロールは、動脈硬化性疾患の発症に寄与する主要なリポタンパク質であり、現在、心血管疾患の予防および治療のための脂質管理における主な標的になっている[75,76]。ApoB は、動脈硬化惹起性リポ蛋白の量を反映するアポタンパクである[77,78]。ApoA1 は、high-density lipoprotein（HDL）に関連する主要なアポタンパクで、抗動脈硬化作用と関連しており[79]、ApoB / apoA1 比は、将来の心血管疾患のリスクマーカーとして利用されている[80]。本研究では、Vilda 群において、apoB / apoA1 比は有意に改善され、その変化量は FMD の変化量と負の相関があった。このことから、12 週間のビルダグリプチンの投与は全体として評価した血管内皮機能改善効果は明らかではなかったが、脂質代謝改善を介した血管

内皮機能改善作用は内在していることが示唆された。また、本研究では、ビルダグリプチンとメトホルミンを併用することで、高用量メトホルミンと比較して血清アディポネクチンが有意に改善した。両群の HbA1c とアディポネクチンの変化量の間に有意な相関は認められなかったので、アディポネクチンの改善は HbA1c とは無関係であると考えられた。アディポネクチンは、抗炎症作用、抗動脈硬化作用および耐糖能改善作用を有する多面的効果を発揮することが知られており[81,82]、さらに、シタグリプチンまたはビルダグリプチンによる治療は、酸化ストレスまたは内臓脂肪の減少を介してアディポネクチンを増加させることが示されている[83]。本研究では酸化ストレスマーカーに変化を認めず、内臓脂肪量の評価はしていないため、このメカニズムの関与を確認することはできなかった。

最近、血管内膜中膜複合体の厚さ（intima media thickness: IMT）に対して糖尿病治療薬による改善効果が報告され、DPP-4 阻害薬であるアログリプチンとシタグリプチンは 12 ヶ月間の投与では IMT に変化なく、24 ヶ月の投与で初めて有意な改善効果を認めた[84,85]。本研究では、12 週間のビルダグリプチン治療後に収縮期血圧、HOMA-IR、apoB / apoA1 比、およびアディポネクチンが改善したことを考慮すると、より長期間でのビルダグリプチン治療では FMD が改善する可能性がある。

本研究の主な限界点として、最後に、12 週間の試験期間は、考察に記載されているように、FMD または動脈硬化の改善を評価するには不十分であった可能性がある。これらの潜在的な問題を解決するために、今回の知見は、より長い期間にわたって、二重盲検試験で検証されるべきである。

11. 総括および結論

短期高脂肪食負荷による膵β細胞増殖およびその機序について、グルコキナーゼおよびIRS-2との関連を含めて考察した。本研究において明らかとなった知見は以下の通りである。

1) インスリン抵抗性の生じない1週間という短期の高脂肪食負荷においても膵β細胞増殖が誘導されることを見出した。
2) その増殖機序はグルコキナーゼおよびIRS-2非依存的な経路と考えられ、短期間の高脂肪食負荷による膵β細胞増殖の機序と、慢性的な長期間の高脂肪食負荷による膵β細胞増殖の機序は異なる可能性がある。
3) Foxm1を介する短期高脂肪食負荷誘導膵β細胞増殖は高齢のマウスでも同様に観察された。

これまで、長期の高脂肪食負荷で膵β細胞増殖が誘導されることについて、インスリン抵抗性が関与することが示唆されていたが、今回の検討によりインスリン抵抗性を介さない膵β細胞増殖の機序を新たに確認することができた。短期高脂肪食負荷による膵β細胞増殖は高齢のマウスでも認められ、このことは細胞増殖能の低下した高齢者に対する膵β細胞増殖の可能性を示唆している。

これらの知見は、膵β細胞量を増加させ、それにより2型糖尿病の発症予防または進展抑制に導く新しい治療のアプローチを提供し得る。
高脂肪食を1週間摂取するという実験モデルはヒトへは応用が難しいため、短期高脂肪食による膵β細胞増殖の機序をさらに詳しく解明し、治療ターゲットを探求する必要がある。

また、2型糖尿病患者を対象とした検討において、12週間にわたるビルダグリプチンとメトホルミンの併用療法は、高用量のメトホルミンと比較して、血管内皮機能をより改善するものではなかった。しかしながら、ビルダグリプチンとメトホルミンの併用療法はapoB / apoA1比を改善し、血清アディポネクチンを増加させており、より長期間の投与によって動脈硬化抑制効果が明らかとなる可能性を有している。

12. 謝　辞

稿を終えるにあたり、本研究の機会を与えて頂いた、北海道大学大学院医学研究院・医学院　免疫・代謝内科学教室教授　渥美達也先生、研究の運営・統括をしていただいた、同診療准教授　三好秀明先生に謝意を表します。そして、本研究全般にわたり直接のご指導ご鞭撻を賜りました同教室助教　中村昭伸先生に深く感謝いたします。

東京大学大学院医学系研究科糖尿病・代謝内科教授　門脇孝先生ならびに横浜市立大学大学院医学研究科分子内分泌・糖尿病内科学教授　寺内康夫先生にはグルコキナーゼヘテロ欠損マウスおよびIRS-2欠損マウスのご提供ならびに実験に対する温かい励ましとご助言を賜りました。ここに深謝の意を表します。

本教室客員臨床講師　永井聡先生には、終始適切なご指導、ご助言を賜りました。ここに深く感謝の意を表します。

本教室助教　Olga Amengual先生には論文の作成や学会発表におけるプレゼンテーションなど多大なるご指導を賜りました。ここに深く感謝の意を表します。

実験助手の渡邊真理華さん、藤森なつみさん、妹尾智里さんのご協力なしに実験を遂行することは不可能でした。感謝を申し上げます。この他にも、この論文作成にあたり、多くの諸先輩方よりご協力、ご助言、ご支援をいただきましたことに、心より感謝を申し上げます。

最後に、本研究を陰になり支えていただきました、免疫・代謝内科学教室の全ての皆様に心より御礼を申し上げます。

13. 引用文献

1 Polonsky, K. S., Sturis, J. & Bell, G. I. Seminars in Medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. Non-insulin-dependent diabetes mellitus - a genetically programmed failure of the beta cell to compensate for insulin resistance. *The New England journal of medicine* **334**, 777-783 (1996).

2 Prentki, M. & Nolan, C. J. Islet beta cell failure in type 2 diabetes. *The Journal of clinical investigation* **116**, 1802-1812 (2006).

3 Rhodes, C. J. Type 2 diabetes-a matter of beta-cell life and death? *Science (New York, N.Y.)* **307**, 380-384 (2005).

4 Wang, P., Fiaschi-Taesch, N. M., Vasavada, R. C., Scott, D. K., Garcia-Ocana, A. & Stewart, A. F. Diabetes mellitus--advances and challenges in human beta-cell proliferation. *Nature reviews. Endocrinology* **11**, 201-212 (2015).

5 Vetere, A., Choudhary, A., Burns, S. M. & Wagner, B. K. Targeting the pancreatic beta-cell to treat diabetes. *Nature reviews. Drug discovery* **13**, 278-289 (2014).

6 Hull, R. L., Kodama, K., Utzschneider, K. M., Carr, D. B., Prigeon, R. L. & Kahn, S. E. Dietary-fat-induced obesity in mice results in beta cell hyperplasia but not increased insulin release: evidence for specificity of impaired beta cell adaptation. *Diabetologia* **48**, 1350-1358 (2005).

7 Peshavaria, M., Larmie, B. L., Lausier, J., Satish, B., Habibovic, A., Roskens, V., Larock, K., Everill, B., Leahy, J. L. & Jetton, T. L. Regulation of pancreatic beta-cell regeneration in the normoglycemic 60% partial-pancreatectomy mouse. *Diabetes* **55**, 3289-3298 (2006).

8 Togashi, Y., Shirakawa, J., Orime, K., Kaji, M., Sakamoto, E., Tajima, K., Inoue, H., Nakamura, A., Tochino, Y., Goshima, Y., Shimomura, I. & Terauchi, Y. beta-Cell proliferation after a partial pancreatectomy is independent of IRS-2 in mice. *Endocrinology* **155**, 1643-1652 (2014).

9 Karnik, S. K., Chen, H., McLean, G. W., Heit, J. J., Gu, X., Zhang, A. Y., Fontaine, M., Yen, M. H. & Kim, S. K. Menin controls growth of pancreatic beta-cells in pregnant mice and promotes gestational diabetes mellitus. *Science (New York, N.Y.)* **318**, 806-809 (2007).

10 Kim, H., Toyofuku, Y., Lynn, F. C., Chak, E., Uchida, T., Mizukami, H., Fujitani, Y., Kawamori, R., Miyatsuka, T., Kosaka, Y., Yang, K., Honig, G., van der Hart,

M., Kishimoto, N., Wang, J., Yagihashi, S., Tecott, L. H., Watada, H. & German, M. S. Serotonin regulates pancreatic beta cell mass during pregnancy. *Nature medicine* **16**, 804-808 (2010).

11 Golson, M. L., Misfeldt, A. A., Kopsombut, U. G., Petersen, C. P. & Gannon, M. High Fat Diet Regulation of beta-Cell Proliferation and beta-Cell Mass. *The open endocrinology journal* **4** (2010).

12 Terauchi, Y., Takamoto, I., Kubota, N., Matsui, J., Suzuki, R., Komeda, K., Hara, A., Toyoda, Y., Miwa, I., Aizawa, S., Tsutsumi, S., Tsubamoto, Y., Hashimoto, S., Eto, K., Nakamura, A., Noda, M., Tobe, K., Aburatani, H., Nagai, R. & Kadowaki, T. Glucokinase and IRS-2 are required for compensatory beta cell hyperplasia in response to high-fat diet-induced insulin resistance. *The Journal of clinical investigation* **117**, 246-257 (2007).

13 Weir, G. C. & Bonner-Weir, S. A dominant role for glucose in beta cell compensation of insulin resistance. *The Journal of clinical investigation* **117**, 81-83 (2007).

14 Stamateris, R. E., Sharma, R. B., Hollern, D. A. & Alonso, L. C. Adaptive beta-cell proliferation increases early in high-fat feeding in mice, concurrent with metabolic changes, with induction of islet cyclin D2 expression. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* **305**, E149-159 (2013).

15 Mosser, R. E., Maulis, M. F., Moulle, V. S., Dunn, J. C., Carboneau, B. A., Arasi, K., Pappan, K., Poitout, V. & Gannon, M. High-fat diet-induced beta-cell proliferation occurs prior to insulin resistance in C57Bl/6J male mice. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* **308**, E573-582 (2015).

16 Woodland, D. C., Liu, W., Leong, J., Sears, M. L., Luo, P. & Chen, X. Short-term high-fat feeding induces islet macrophage infiltration and beta-cell replication independently of insulin resistance in mice. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* **311**, E763-e771 (2016).

17 Nakamura, A., Terauchi, Y., Ohyama, S., Kubota, J., Shimazaki, H., Nambu, T., Takamoto, I., Kubota, N., Eiki, J., Yoshioka, N., Kadowaki, T. & Koike, T. Impact of small-molecule glucokinase activator on glucose metabolism and beta-cell mass. *Endocrinology* **150**, 1147-1154 (2009).

18 Nakamura, A., Togashi, Y., Orime, K., Sato, K., Shirakawa, J., Ohsugi, M., Kubota, N., Kadowaki, T. & Terauchi, Y. Control of beta cell function and proliferation in mice stimulated by small-molecule glucokinase activator under various conditions. *Diabetologia* **55**, 1745-1754 (2012).

19 Matschinsky, F. M., Magnuson, M. A., Zelent, D., Jetton, T. L., Doliba, N., Han, Y., Taub, R. & Grimsby, J. The network of glucokinase-expressing cells in glucose homeostasis and the potential of glucokinase activators for diabetes therapy. *Diabetes* **55**, 1-12 (2006).

20 Nakamura, A. & Terauchi, Y. Present status of clinical deployment of glucokinase activators. *Journal of diabetes investigation* **6**, 124-132 (2015).

21 Terauchi, Y., Sakura, H., Yasuda, K., Iwamoto, K., Takahashi, N., Ito, K., Kasai, H., Suzuki, H., Ueda, O., Kamada, N. & et al. Pancreatic beta-cell-specific targeted disruption of glucokinase gene. Diabetes mellitus due to defective insulin secretion to glucose. *The Journal of biological chemistry* **270**, 30253-30256 (1995).

22 Porat, S., Weinberg-Corem, N., Tornovsky-Babaey, S., Schyr-Ben-Haroush, R., Hija, A., Stolovich-Rain, M., Dadon, D., Granot, Z., Ben-Hur, V., White, P., Girard, C. A., Karni, R., Kaestner, K. H., Ashcroft, F. M., Magnuson, M. A., Saada, A., Grimsby, J., Glaser, B. & Dor, Y. Control of pancreatic beta cell regeneration by glucose metabolism. *Cell metabolism* **13**, 440-449 (2011).

23 Dadon, D., Tornovsky-Babaey, S., Furth-Lavi, J., Ben-Zvi, D., Ziv, O., Schyr-Ben-Haroush, R., Stolovich-Rain, M., Hija, A., Porat, S., Granot, Z., Weinberg-Corem, N., Dor, Y. & Glaser, B. Glucose metabolism: key endogenous regulator of beta-cell replication and survival. *Diabetes, obesity & metabolism* **14 Suppl 3**, 101-108 (2012).

24 Bernal-Mizrachi, E., Kulkarni, R. N., Scott, D. K., Mauvais-Jarvis, F., Stewart, A. F. & Garcia-Ocana, A. Human beta-cell proliferation and intracellular signaling part 2: still driving in the dark without a road map. *Diabetes* **63**, 819-831 (2014).

25 Stamateris, R. E., Sharma, R. B., Kong, Y., Ebrahimpour, P., Panday, D., Ranganath, P., Zou, B., Levitt, H., Parambil, N. A., O'Donnell, C. P., Garcia-Ocana, A. & Alonso, L. C. Glucose Induces Mouse beta-Cell Proliferation via IRS2, MTOR, and Cyclin D2 but Not the Insulin Receptor. *Diabetes* **65**, 981-995 (2016).

26 Withers, D. J., Gutierrez, J. S., Towery, H., Burks, D. J., Ren, J. M., Previs, S., Zhang, Y., Bernal, D., Pons, S., Shulman, G. I., Bonner-Weir, S. & White, M. F. Disruption of IRS-2 causes type 2 diabetes in mice. *Nature* **391**, 900-904 (1998).

27 Kubota, N., Tobe, K., Terauchi, Y., Eto, K., Yamauchi, T., Suzuki, R., Tsubamoto, Y., Komeda, K., Nakano, R., Miki, H., Satoh, S., Sekihara, H., Sciacchitano, S.,

Lesniak, M., Aizawa, S., Nagai, R., Kimura, S., Akanuma, Y., Taylor, S. I. & Kadowaki, T. Disruption of insulin receptor substrate 2 causes type 2 diabetes because of liver insulin resistance and lack of compensatory beta-cell hyperplasia. *Diabetes* **49**, 1880-1889 (2000).

28 Kubota, N., Terauchi, Y., Tobe, K., Yano, W., Suzuki, R., Ueki, K., Takamoto, I., Satoh, H., Maki, T., Kubota, T., Moroi, M., Okada-Iwabu, M., Ezaki, O., Nagai, R., Ueta, Y., Kadowaki, T. & Noda, T. Insulin receptor substrate 2 plays a crucial role in beta cells and the hypothalamus. *The Journal of clinical investigation* **114**, 917-927 (2004).

29 Wierstra, I. The transcription factor FOXM1 (Forkhead box M1): proliferation-specific expression, transcription factor function, target genes, mouse models, and normal biological roles. *Advances in cancer research* **118**, 97-398 (2013).

30 Ackermann Misfeldt, A., Costa, R. H. & Gannon, M. Beta-cell proliferation, but not neogenesis, following 60% partial pancreatectomy is impaired in the absence of FoxM1. *Diabetes* **57**, 3069-3077 (2008).

31 Zhang, H., Zhang, J., Pope, C. F., Crawford, L. A., Vasavada, R. C., Jagasia, S. M. & Gannon, M. Gestational diabetes mellitus resulting from impaired beta-cell compensation in the absence of FoxM1, a novel downstream effector of placental lactogen. *Diabetes* **59**, 143-152 (2010).

32 Davis, D. B., Lavine, J. A., Suhonen, J. I., Krautkramer, K. A., Rabaglia, M. E., Sperger, J. M., Fernandez, L. A., Yandell, B. S., Keller, M. P., Wang, I. M., Schadt, E. E. & Attie, A. D. FoxM1 is up-regulated by obesity and stimulates beta-cell proliferation. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)* **24**, 1822-1834 (2010).

33 Zarrouki, B., Benterki, I., Fontes, G., Peyot, M. L., Seda, O., Prentki, M. & Poitout, V. Epidermal growth factor receptor signaling promotes pancreatic beta-cell proliferation in response to nutrient excess in rats through mTOR and FOXM1. *Diabetes* **63**, 982-993 (2014).

34 Blandino-Rosano, M., Chen, A. Y., Scheys, J. O., Alejandro, E. U., Gould, A. P., Taranukha, T., Elghazi, L., Cras-Meneur, C. & Bernal-Mizrachi, E. mTORC1 signaling and regulation of pancreatic beta-cell mass. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* **11**, 1892-1902 (2012).

35 Teta, M., Long, S. Y., Wartschow, L. M., Rankin, M. M. & Kushner, J. A. Very slow turnover of beta-cells in aged adult mice. *Diabetes* **54**, 2557-2567 (2005).

36 Rankin, M. M. & Kushner, J. A. Adaptive beta-cell proliferation is severely

restricted with advanced age. *Diabetes* **58**, 1365-1372 (2009).

37 Meier, J. J., Butler, A. E., Saisho, Y., Monchamp, T., Galasso, R., Bhushan, A., Rizza, R. A. & Butler, P. C. Beta-cell replication is the primary mechanism subserving the postnatal expansion of beta-cell mass in humans. *Diabetes* **57**, 1584-1594 (2008).

38 Golson, M. L., Dunn, J. C., Maulis, M. F., Dadi, P. K., Osipovich, A. B., Magnuson, M. A., Jacobson, D. A. & Gannon, M. Activation of FoxM1 Revitalizes the Replicative Potential of Aged beta-Cells in Male Mice and Enhances Insulin Secretion. *Diabetes* **64**, 3829-3838 (2015).

39 Haffner, S. M., Lehto, S., Ronnemaa, T., Pyorala, K. & Laakso, M. Mortality from coronary heart disease in subjects with type 2 diabetes and in nondiabetic subjects with and without prior myocardial infarction. *The New England journal of medicine* **339**, 229-234 (1998).

40 Iso, H., Imano, H., Kitamura, A., Sato, S., Naito, Y., Tanigawa, T., Ohira, T., Yamagishi, K., Iida, M. & Shimamoto, T. Type 2 diabetes and risk of non-embolic ischaemic stroke in Japanese men and women. *Diabetologia* **47**, 2137-2144 (2004).

41 Ahren, B., Landin-Olsson, M., Jansson, P. A., Svensson, M., Holmes, D. & Schweizer, A. Inhibition of dipeptidyl peptidase-4 reduces glycemia, sustains insulin levels, and reduces glucagon levels in type 2 diabetes. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **89**, 2078-2084 (2004).

42 Chon, S. & Gautier, J. F. An Update on the Effect of Incretin-Based Therapies on beta-Cell Function and Mass. *Diabetes & metabolism journal* **40**, 99-114 (2016).

43 Barnett, A. DPP-4 inhibitors and their potential role in the management of type 2 diabetes. *International journal of clinical practice* **60**, 1454-1470 (2006).

44 Foley, J. E. & Jordan, J. Weight neutrality with the DPP-4 inhibitor, vildagliptin: mechanistic basis and clinical experience. *Vascular health and risk management* **6**, 541-548 (2010).

45 Anagnostis, P., Athyros, V. G., Adamidou, F., Panagiotou, A., Kita, M., Karagiannis, A. & Mikhailidis, D. P. Glucagon-like peptide-1-based therapies and cardiovascular disease: looking beyond glycaemic control. *Diabetes, obesity & metabolism* **13**, 302-312 (2011).

46 Nystrom, T., Gutniak, M. K., Zhang, Q., Zhang, F., Holst, J. J., Ahren, B. & Sjoholm, A. Effects of glucagon-like peptide-1 on endothelial function in type 2

diabetes patients with stable coronary artery disease. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* **287**, E1209-1215 (2004).

47 Henderson, A. Endothelial dysfunction: a reversible clinical measure of atherogenic susceptibility and cardiovascular inefficiency. *International journal of cardiology* **62 Suppl 1**, S43-48 (1997).

48 White, W. B., Cannon, C. P., Heller, S. R., Nissen, S. E., Bergenstal, R. M., Bakris, G. L., Perez, A. T., Fleck, P. R., Mehta, C. R., Kupfer, S., Wilson, C., Cushman, W. C. & Zannad, F. Alogliptin after acute coronary syndrome in patients with type 2 diabetes. *The New England journal of medicine* **369**, 1327-1335 (2013).

49 Scirica, B. M., Bhatt, D. L., Braunwald, E., Steg, P. G., Davidson, J., Hirshberg, B., Ohman, P., Frederich, R., Wiviott, S. D., Hoffman, E. B., Cavender, M. A., Udell, J. A., Desai, N. R., Mosenzon, O., McGuire, D. K., Ray, K. K., Leiter, L. A. & Raz, I. Saxagliptin and cardiovascular outcomes in patients with type 2 diabetes mellitus. *The New England journal of medicine* **369**, 1317-1326 (2013).

50 Green, J. B., Bethel, M. A., Armstrong, P. W., Buse, J. B., Engel, S. S., Garg, J., Josse, R., Kaufman, K. D., Koglin, J., Korn, S., Lachin, J. M., McGuire, D. K., Pencina, M. J., Standl, E., Stein, P. P., Suryawanshi, S., Van de Werf, F., Peterson, E. D. & Holman, R. R. Effect of Sitagliptin on Cardiovascular Outcomes in Type 2 Diabetes. *The New England journal of medicine* **373**, 232-242 (2015).

51 Group, U. P. D. S. U. Effect of intensive blood-glucose control with metformin on complications in overweight patients with type 2 diabetes (UKPDS 34). *Lancet (London, England)* **352**, 854-865 (1998).

52 Selvin, E., Bolen, S., Yeh, H. C., Wiley, C., Wilson, L. M., Marinopoulos, S. S., Feldman, L., Vassy, J., Wilson, R., Bass, E. B. & Brancati, F. L. Cardiovascular outcomes in trials of oral diabetes medications: a systematic review. *Archives of internal medicine* **168**, 2070-2080 (2008).

53 Saenz, A., Fernandez-Esteban, I., Mataix, A., Ausejo, M., Roque, M. & Moher, D. Metformin monotherapy for type 2 diabetes mellitus. *The Cochrane database of systematic reviews*, Cd002966 (2005).

54 Kim, Y. G., Hahn, S., Oh, T. J., Kwak, S. H., Park, K. S. & Cho, Y. M. Differences in the glucose-lowering efficacy of dipeptidyl peptidase-4 inhibitors between Asians and non-Asians: a systematic review and meta-analysis. *Diabetologia* **56**, 696-708 (2013).

55 Nomoto, H., Miyoshi, H., Furumoto, T., Oba, K., Tsutsui, H., Inoue, A., Atsumi, T., Manda, N., Kurihara, Y. & Aoki, S. A Randomized Controlled Trial Comparing the Effects of Sitagliptin and Glimepiride on Endothelial Function and Metabolic Parameters: Sapporo Athero-Incretin Study 1 (SAIS1). *PloS one* **11**, e0164255 (2016).

56 Rizzo, M. R., Barbieri, M., Marfella, R. & Paolisso, G. Response to Comment on: Rizzo et al. Reduction of oxidative stress and inflammation by blunting daily acute glucose fluctuations in patients with type 2 diabetes: role of dipeptidyl peptidase-IV inhibition. Diabetes Care 2012;35:2076-2082. *Diabetes care* **36**, e13 (2013).

57 Koyanagawa, N., Miyoshi, H., Ono, K., Nakamura, A., Cho, K. Y., Yamamoto, K., Takano, Y., Dan-Noura, M. & Atsumi, T. Comparative effects of vildagliptin and sitagliptin determined by continuous glucose monitoring in patients with type 2 diabetes mellitus. *Endocrine journal* **63**, 747-753 (2016).

58 Nomoto, H., Kimachi, K., Miyoshi, H., Kameda, H., Cho, K. Y., Nakamura, A., Nagai, S., Kondo, T. & Atsumi, T. Effects of 50 mg vildagliptin twice daily vs. 50 mg sitagliptin once daily on blood glucose fluctuations evaluated by long-term self-monitoring of blood glucose. *Endocrine journal* **64**, 417-424 (2017).

59 Suzuki, K., Watanabe, K., Suzuki, T., Ouchi, M., Futami-Suda, S., Igari, Y., Nakano, H. & Oba, K. Sitagliptin improves vascular endothelial function in Japanese type 2 diabetes patients without cardiovascular disease. *Journal of Diabetes Mellitus* **02**, 338-345 (2012).

60 Kubota, Y., Miyamoto, M., Takagi, G., Ikeda, T., Kirinoki-Ichikawa, S., Tanaka, K. & Mizuno, K. The dipeptidyl peptidase-4 inhibitor sitagliptin improves vascular endothelial function in type 2 diabetes. *Journal of Korean medical science* **27**, 1364-1370 (2012).

61 Mather, K. J., Verma, S. & Anderson, T. J. Improved endothelial function with metformin in type 2 diabetes mellitus. *Journal of the American College of Cardiology* **37**, 1344-1350 (2001).

62 Naka, K. K., Papathanassiou, K., Bechlioulis, A., Pappas, K., Kazakos, N., Kanioglou, C., Kostoula, A., Vezyraki, P., Makriyiannis, D., Tsatsoulis, A. & Michalis, L. K. Effects of pioglitazone and metformin on vascular endothelial function in patients with type 2 diabetes treated with sulfonylureas. *Diabetes & vascular disease research* **9**, 52-58 (2012).

63 Giaccari, A., Giorda, C. B., Riccardi, G., De Micheli, A., Bruno, G., Monge, L. &

Frontoni, S. Comment on: Inzucchi et al. Management of hyperglycemia in type 2 diabetes: a patient-centered approach. Position statement of the American Diabetes Association (ADA) and the European Association for the Study of Diabetes (EASD). Diabetes Care 2012;35:1364-1379. *Diabetes care* **35**, e71; author reply e72-73 (2012).

64 Kao, J., Tobis, J., McClelland, R. L., Heaton, M. R., Davis, B. R., Holmes, D. R., Jr. & Currier, J. W. Relation of metformin treatment to clinical events in diabetic patients undergoing percutaneous intervention. *The American journal of cardiology* **93**, 1347-1350, a1345 (2004).

65 Mannucci, E., Ognibene, A., Cremasco, F., Bardini, G., Mencucci, A., Pierazzuoli, E., Ciani, S., Messeri, G. & Rotella, C. M. Effect of metformin on glucagon-like peptide 1 (GLP-1) and leptin levels in obese nondiabetic subjects. *Diabetes care* **24**, 489-494 (2001).

66 Maida, A., Lamont, B. J., Cao, X. & Drucker, D. J. Metformin regulates the incretin receptor axis via a pathway dependent on peroxisome proliferator-activated receptor-alpha in mice. *Diabetologia* **54**, 339-349 (2011).

67 Ayaori, M., Iwakami, N., Uto-Kondo, H., Sato, H., Sasaki, M., Komatsu, T., Iizuka, M., Takiguchi, S., Yakushiji, E., Nakaya, K., Yogo, M., Ogura, M., Takase, B., Murakami, T. & Ikewaki, K. Dipeptidyl peptidase-4 inhibitors attenuate endothelial function as evaluated by flow-mediated vasodilatation in type 2 diabetic patients. *Journal of the American Heart Association* **2**, e003277 (2013).

68 Nakamura, K., Oe, H., Kihara, H., Shimada, K., Fukuda, S., Watanabe, K., Takagi, T., Yunoki, K., Miyoshi, T., Hirata, K., Yoshikawa, J. & Ito, H. DPP-4 inhibitor and alpha-glucosidase inhibitor equally improve endothelial function in patients with type 2 diabetes: EDGE study. *Cardiovascular diabetology* **13**, 110 (2014).

69 Benjamin, E. J., Larson, M. G., Keyes, M. J., Mitchell, G. F., Vasan, R. S., Keaney, J. F., Jr., Lehman, B. T., Fan, S., Osypiuk, E. & Vita, J. A. Clinical correlates and heritability of flow-mediated dilation in the community: the Framingham Heart Study. *Circulation* **109**, 613-619 (2004).

70 Iwata, M., Miyashita, Y. & Kumagai, H. Seasonal variation of endothelium-dependent flow-mediated vasodilation measured in the same subjects. *American journal of cardiovascular disease* **2**, 111-115 (2012).

71 Li, S., Wu, Y., Yu, G., Xia, Q. & Xu, Y. Angiotensin II receptor blockers improve

peripheral endothelial function: a meta-analysis of randomized controlled trials. *PloS one* **9**, e90217 (2014).

72 Takagi, H., Yamamoto, H., Iwata, K., Goto, S. N. & Umemoto, T. Low-density lipoprotein-independent improvement of flow-mediated dilatation with atorvastatin: a meta-analysis and meta-regression of randomized controlled trials. *International journal of cardiology* **158**, 285-289 (2012).

73 Papathanassiou, K., Naka, K. K., Kazakos, N., Kanioglou, C., Makriyiannis, D., Pappas, K., Katsouras, C. S., Liveris, K., Kolettis, T., Tsatsoulis, A. & Michalis, L. K. Pioglitazone vs glimepiride: Differential effects on vascular endothelial function in patients with type 2 diabetes. *Atherosclerosis* **205**, 221-226 (2009).

74 Wascher, T. C., Schmoelzer, I., Wiegratz, A., Stuehlinger, M., Mueller-Wieland, D., Kotzka, J. & Enderle, M. Reduction of postchallenge hyperglycaemia prevents acute endothelial dysfunction in subjects with impaired glucose tolerance. *European journal of clinical investigation* **35**, 551-557 (2005).

75 Nissen, S. E., Tuzcu, E. M., Schoenhagen, P., Crowe, T., Sasiela, W. J., Tsai, J., Orazem, J., Magorien, R. D., O'Shaughnessy, C. & Ganz, P. Statin therapy, LDL cholesterol, C-reactive protein, and coronary artery disease. *The New England journal of medicine* **352**, 29-38 (2005).

76 Sharma, R. K., Singh, V. N. & Reddy, H. K. Thinking beyond low-density lipoprotein cholesterol: strategies to further reduce cardiovascular risk. *Vascular health and risk management* **5**, 793-799 (2009).

77 Walldius, G. & Jungner, I. Apolipoprotein B and apolipoprotein A-I: risk indicators of coronary heart disease and targets for lipid-modifying therapy. *Journal of internal medicine* **255**, 188-205 (2004).

78 Cromwell, W. C. & Barringer, T. A. Low-density lipoprotein and apolipoprotein B: clinical use in patients with coronary heart disease. *Current cardiology reports* **11**, 468-475 (2009).

79 Hoang, A., Murphy, A. J., Coughlan, M. T., Thomas, M. C., Forbes, J. M., O'Brien, R., Cooper, M. E., Chin-Dusting, J. P. & Sviridov, D. Advanced glycation of apolipoprotein A-I impairs its anti-atherogenic properties. *Diabetologia* **50**, 1770-1779 (2007).

80 Sierra-Johnson, J., Fisher, R. M., Romero-Corral, A., Somers, V. K., Lopez-Jimenez, F., Ohrvik, J., Walldius, G., Hellenius, M. L. & Hamsten, A. Concentration of apolipoprotein B is comparable with the apolipoprotein B/apolipoprotein A-I ratio and better than routine clinical lipid measurements

in predicting coronary heart disease mortality: findings from a multi-ethnic US population. *European heart journal* **30**, 710-717 (2009).

81 Kishida, K., Funahashi, T. & Shimomura, I. Molecular mechanisms of diabetes and atherosclerosis: role of adiponectin. *Endocrine, metabolic & immune disorders drug targets* **12**, 118-131 (2012).

82 Kishida, K., Funahashi, T. & Shimomura, I. Adiponectin as a routine clinical biomarker. *Best practice & research. Clinical endocrinology & metabolism* **28**, 119-130 (2014).

83 Hibuse, T., Maeda, N., Kishida, K., Kimura, T., Minami, T., Takeshita, E., Hirata, A., Nakagawa, Y., Kashine, S., Oka, A., Hayashi, M., Nishizawa, H., Funahashi, T. & Shimomura, I. A pilot three-month sitagliptin treatment increases serum adiponectin level in Japanese patients with type 2 diabetes mellitus--a randomized controlled trial START-J study. *Cardiovascular diabetology* **13**, 96 (2014).

84 Mita, T., Katakami, N., Yoshii, H., Onuma, T., Kaneto, H., Osonoi, T., Shiraiwa, T., Kosugi, K., Umayahara, Y., Yamamoto, T., Yokoyama, H., Kuribayashi, N., Jinnouchi, H., Gosho, M., Shimomura, I. & Watada, H. Alogliptin, a Dipeptidyl Peptidase 4 Inhibitor, Prevents the Progression of Carotid Atherosclerosis in Patients With Type 2 Diabetes: The Study of Preventive Effects of Alogliptin on Diabetic Atherosclerosis (SPEAD-A). *Diabetes care* **39**, 139-148 (2016).

85 Mita, T., Katakami, N., Shiraiwa, T., Yoshii, H., Onuma, T., Kuribayashi, N., Osonoi, T., Kaneto, H., Kosugi, K., Umayahara, Y., Yamamoto, T., Matsumoto, K., Yokoyama, H., Tsugawa, M., Gosho, M., Shimomura, I. & Watada, H. Sitagliptin Attenuates the Progression of Carotid Intima-Media Thickening in Insulin-Treated Patients With Type 2 Diabetes: The Sitagliptin Preventive Study of Intima-Media Thickness Evaluation (SPIKE): A Randomized Controlled Trial. *Diabetes care* **39**, 455-464 (2016).