

博士論文

糖尿病マウスモデルにおける インスリン抵抗性発現機序の解析

Age-dependent onset of insulin resistance in a diabetic mouse model.

2016年3月

静岡県立大学大学院 薬学研究科

臨床薬剤学講座

井出直仁

Naohito Ide

博士論文

糖尿病マウスモデルにおける インスリン抵抗性発現機序の解析

本論文は静岡県立大学大学院薬学研究科博士論文である

2016年3月

井出直仁

Age-dependent onset of insulin resistance in a diabetic mouse model.

March, 2016

Naohito Ide

略語一覽

ATP	adenosine triphosphatase
AUC	area under the blood concentration-time curve
BMI	body mass index
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
CMC	carboxymethylcellulose
DEPC	diethyl pyrocarbonate
DPP-4	dipeptidyl peptidase-4
EDTA	disodium ethylenediaminetetraacetate
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
GH	growth hormone
GIP	glucose-dependent insulinotropic polypeptide
GLP-1	glucagon-like peptide- 1
GLUT4	glucose transporter isoform 4
HbA1c	hemoglobin A1c
HDL	high-density lipoprotein
IL-6	interleukin-6
InsR	insulin receptor
IRS-1	insulin receptor substrate-1
IRS-2	insulin receptor substrate-2
MCP-1	monocyte chemoattractant protein-1
mRNA	messenger ribonucleic acid
MSG	monosodium glutamate
PCR	polymerase chain reaction
PI3-K	phosphatidylinositol 3-kinase
RBP-4	retinol-binding protein-4
SGLT-1	sodium glucose co-transporter-1
TNF- α	tumor necrosis factor- α

目次

緒論	1
第 1 章 雄性 ddY-H マウスの糖負荷による血糖値の変動	5
1-1 序論	5
1-2 実験材料と実験方法	5
1-2-1 実験動物と飼育条件	5
1-2-2 試薬および薬剤	5
1-2-3 Glucose を経口投与したマウスの血糖値の測定	5
1-2-4 Glucose を腹腔内投与したマウスの血糖値の測定	5
1-2-5 Glucose を静脈内投与したマウスの血糖値の測定	6
1-2-6 Insulin を腹腔内投与したマウスの血糖値の測定	6
1-2-7 Nateglinide を経口投与したマウスの血糖値の測定	6
1-2-8 Insulin 抵抗性インデックスの算出	6
1-2-9 血糖値の測定	6
1-2-10 血漿 insulin 値の測定	7
1-2-11 統計処理	7
1-3 実験結果	7
1-3-1 Glucose の経口投与量による血糖値の上昇の違い	7
1-3-2 腹腔内投与した glucose に対する耐糖能	9
1-3-3 静脈内投与した glucose に対する耐糖能	10
1-3-4 Insulin 腹腔内投与後の血糖値の変動	12
1-3-5 Nateglinide の経口投与による血糖値の変動	14
1-3-6 Insulin 抵抗性インデックスによる insulin 抵抗性の評価	15
1-4 考察	16
第 2 章 雄性 ddY-H マウスにおける血漿中 insulin 濃度の週齢による変動 ...	19
2-1 序論	19
2-2 実験材料と実験方法	19
2-2-1 実験動物と飼育条件	19
2-2-2 試薬および薬剤	19
2-2-3 Glucose を経口投与したマウスの血漿 insulin 値の測定	19
2-2-4 Sitagliptin を投与したマウスの血糖値の測定	19
2-2-5 Sitagliptin を投与したマウスの血漿 insulin 値の測定	20
2-2-6 Glucose を投与したマウスの血漿 GLP-1 濃度の測定	20
2-2-7 Glucose を投与したマウスの血漿 GIP 濃度の測定	20
2-2-8 Nateglinide を経口投与したマウスの血漿 insulin 値の測定	20

2-2-9	血糖値の測定	20
2-2-10	血漿 insulin 値の測定	20
2-2-11	統計処理	20
2-3	実験結果.....	21
2-3-1	Glucose の経口投与による血漿 insulin 値の上昇	21
2-3-2	Sitagliptin の血糖値および血漿 insulin 値に及ぼす影響	23
2-3-3	Glucose 投与による血漿中の GLP-1 値と GIP 値の上昇.....	26
2-3-4	Nateglinide 投与による血漿 insulin 値の上昇.....	28
2-4	考察.....	29
第3章	雄性 ddY-H マウスにおける insulin シグナル伝達の変動.....	31
3-1	序論.....	31
3-2	実験材料と実験方法	31
3-2-1	実験動物と飼育条件	31
3-2-2	試薬および薬剤	31
3-2-3	肝の総 ribonucleic acid (RNA) の抽出	31
3-2-4	副睪丸脂肪組織の総 RNA の抽出	31
3-2-5	リアルタイム PCR 法	32
3-2-6	副睪丸脂肪組織の InsR、IRS-1 および IRS-2 のタンパク質量の測定	34
3-2-7	統計処理.....	34
3-3	実験結果.....	35
3-3-1	肝における InsR、IRS-1 および IRS-2 の messenger RNA (mRNA) の発現	35
3-3-2	副睪丸脂肪組織での InsR、IRS-1 および IRS-2 の mRNA の発現	37
3-3-3	副睪丸脂肪組織の InsR、IRS-1 および IRS-2 のタンパク質発現量.....	39
3-4	考察.....	41
第4章	ddY-H マウスの雌雄による病態発症の比較.....	43
4-1	序論.....	43
4-2	実験材料と実験方法	43
4-2-1	実験動物と飼育条件	43
4-2-2	試薬.....	43
4-2-3	体重と脂肪組織重量の測定	43
4-2-4	Glucose の経口投与による耐糖能試験	43
4-2-5	Glucose を経口投与したマウスの血漿 insulin 値の測定	43
4-2-6	肝の総 RNA の抽出	44
4-2-7	副睪丸脂肪組織および子宮周辺脂肪組織の総 RNA の抽出	44
4-2-8	リアルタイム PCR 法	44

4-2-9 副睪丸脂肪組織および子宮周辺脂肪組織の InsR、IRS-1 および IRS-2 のタンパク質量の測定	44
4-2-10 尿糖の検査	44
4-2-11 統計処理	44
4-3 実験結果.....	44
4-3-1 雌性マウスの体重および脂肪組織重量.....	44
4-3-2 雌雄マウスの耐糖能の比較	47
4-3-3 雌雄マウスにおける glucose 投与による血漿 insulin 値上昇の比較	48
4-3-4 雌雄マウスの脂肪組織における InsR、IRS-1 および IRS-2 の mRNA 発現の比較	50
4-3-5 雌雄マウスの脂肪組織における InsR、IRS-1 および IRS-2 のタンパク質発現の比較	52
4-4 考察.....	54
総括	56
謝辞	58
参考文献.....	59

緒論

International Diabetes Federation (IDF) の報告 (2015 年 11 月) によると、近年、世界の糖尿病人口は急激に増え続けていて、2015 年現在糖尿病有病者は 4 億人余と推定され、2014 年より 2,800 万人増加した。¹⁾ 厚生労働省の平成 25 年国民健康・栄養調査の報告では、我が国においても 20 歳以上の糖尿病有病者 (HbA1c 値が 6.5% 以上であるか糖尿病の治療を受けている人) の割合は、男性 16.2%、女性 9.2% であった。²⁾ 厚生労働省は 1997 年から糖尿病の実態調査を継続して実施しているが、「糖尿病が強く疑われる者」の人数は増加しつづけていて、特に 50 歳以降にその割合が増えることから、高齢化社会が進行している現状で今後患者数が一層増加することが予想されている。日本人の糖尿病患者の 90% 以上は 2 型糖尿病で、現在増加している糖尿病患者の多くは、2 型糖尿病である。³⁾ 2 型糖尿病は β 細胞からの insulin 分泌能の低下と末梢組織での insulin 感受性低下 (insulin 抵抗性の発現) が発症の原因である。⁴⁾ 2 型糖尿病は、環境因子と遺伝因子が相互に作用し発症する多因子疾患であり、環境因子として生活スタイルの変化が注目されていて、脂肪組織の肥大化とそれに伴う adipocytokine の産生・分泌の異常が主要な要因とされている。⁵⁾ また、2 型糖尿病原因遺伝子として、*KCNQ1* 遺伝子が報告されているが、その他にも多くの遺伝子の関与が指摘されていて、遺伝的背景の詳細は明らかではない。^{6,7)}

2 型糖尿病の治療は、まずは基本治療として、食事療法・運動療法を行う。2~3 ヶ月で血糖値がコントロールできない場合は、薬物治療となる。治療に用いられる薬剤は、状態に応じて insulin 分泌促進薬、insulin 抵抗性改善薬、食後過血糖改善薬、更には insulin 注射薬などの単独或いは組み合わせにより治療を行う。近年、dipeptidyl peptidase-4 (DPP-4) 阻害薬や glucagon-like peptide-1 (GLP-1) 受容体作動薬など incretin 関連薬が開発されるなど糖尿病患者の治療に大きな進歩がみられているが、²⁾ 依然として血糖値を十分にコントロールできない患者も多く、より優れた治療薬の開発が望まれている。また糖尿病の遺伝的な背景をもった人々の発症を回避できるような予防対策を考えていく必要がある。

Insulin は、膵臓の β 細胞から分泌される peptide hormone で、骨格筋、肝、脂肪組織などに作用し、glucose の細胞内への取り込みを促進する。また、骨格筋や肝における glycogen の合成促進・分解抑制や脂肪組織における glucose の代謝促進などの作用もあり、血糖値の恒常性および生体のエネルギー代謝において中心的な役割を果たしている。⁸⁾ Insulin 抵抗性は末梢組織で insulin の作用が発揮されない病態である。糖尿病の治療に insulin が使用され始めた時期に insulin を 1 日 200 単位以上使用しても血糖値の低下が認められない病態を insulin 抵抗性という呼称で初めて表現された。⁹⁾ したがって、主として insulin による血糖値低下作用が減弱化された状態を示すが、insulin の作用が明らかになるにしたがって insulin の作用不足を表す言葉として糖代謝以外でも広く使用されるようになった。骨格筋、肝、脂肪組織などの組織の insulin 抵抗性は、2 型糖尿病患者でみられる共通した病態であるが、insulin の作用は多岐にわたることから insulin 抵抗性と種々の疾患の関わりが次第に明らかになってきた。Ferrannini は本態

性高血圧患者の約 50%に insulin 抵抗性が認められると報告している。¹⁰⁾また、Reavenらは、動脈硬化症患者に高率に高 insulin 血症、低 HDL-コレステロール血症、高血圧、耐糖能障害が合併することを認め、シンドローム X という概念を提唱した。¹¹⁾その後、肥満、脂肪蓄積、糖尿病、高血圧、動脈硬化症、脂質代謝異常などがみられる病態は、insulin 抵抗性症候群、死の四重奏、内臓脂肪症候群など呼称が提案されたが、現在ではメタボリックシンドロームと総称され、その疾患の発症の基盤に、insulin 抵抗性の関与がある。¹²⁾

Insulin 抵抗性の成因は、血液中の insulin 抗体の出現、insulin 受容体の障害、insulin 受容体より下流の情報伝達系の障害に分類される。Insulin 抵抗性を示す一部の疾患は分子レベルでその成因が明らかになっているが詳細は不明である。近年、脂肪組織から分泌される腫瘍壊死因子 (tumor necrosis factor- α : TNF- α)、leptin、adiponectin、遊離脂肪酸などの生理活性物質が、骨格筋や肝臓などの insulin 感受性臓器に影響を与えていることが示されている。^{13,14)} 特に、肥満に伴う脂肪組織の肥大化が、これらの生理活性物質を介して insulin 抵抗性発症に深く関わっていることが明らかにされてきた。¹⁵⁾ Insulin の細胞内の情報伝達は、insulin receptor (InsR) と結合することにより、InsR を自己リン酸化させることから始まる。¹⁶⁾ リン酸化された InsR は、細胞内の insulin receptor substrate (IRS)-1 や IRS-2 をリン酸化し¹⁷⁾、その結果 phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-K) や protein kinase B (Akt) などのタンパクが関与する情報伝達系が活性化され、¹⁸⁻²⁰⁾ 最終的に主として glucose transporter isoform 4 (GLUT4) が細胞内プールから細胞膜へ移動し、glucose の取り込みが促進される。^{21, 22)} 末梢組織における insulin の細胞内情報伝達系の初期段階の障害が insulin 抵抗性の重要な原因となる。²³⁻²⁵⁾ 糖尿病患者の肝での insulin 結合量低下や、²⁶⁾末梢性の insulin 抵抗性を示す Goto-Kakizaki (GK) ラットにおける肝の InsR 数減少、²⁷⁾ 雄性 Sprague-Dawley ラットへの monosodium glutamate (MSG) 投与による脂肪細胞の InsR 数減少、²⁸⁾ growth hormone (GH) 遺伝子を過剰発現させたトランスジェニックマウスでの細胞膜 InsR 量低下による insulin 抵抗性誘発が報告されている。²⁹⁾ このように、細胞膜の InsR の障害は insulin 抵抗性や糖尿病の発症と密接に関係している。同様に、IRS-1 と IRS-2 の遺伝子障害は、insulin の細胞内情報伝達系の機能不全を起こし、insulin 抵抗性の原因となり、³⁰⁻³³⁾ 多くの insulin 抵抗性状態で IRS タンパクの発現やチロシンリン酸化が著明に減少していることが報告されている。³⁴⁾

2 型糖尿病は、病状がゆっくりと進行する疾病であるが、重篤な合併症を伴うのでその治療は疾病の発症早期に開始することが望ましい。また、疾病が発症する前の病的な状態を明らかにすることは、疾病の予防や治療をするうえで重要なことである。動物病態モデルは、そのような疾患の原因や進行状況を把握するための有用な実験系である。近年、トランスジェニック動物は有用な疾患モデル動物となっている。糖代謝に関与する既知の遺伝子のノックアウトや過剰発現させた動物において糖代謝の変化を検討する意義は大きい。Adiponectin 受容体や insulin 情報伝達系の IRS-1、IRS-2 ノックアウトマウスが作製され、insulin 抵抗性の影響について研究されている。³⁵⁾一方、

db/db マウスや *ob/ob* マウスは、単一遺伝子変異によるものである。*db/db* マウスは、2 カ月齢で高血糖となり、その後、糖尿病を呈するようになる。このマウスは、第 4 染色体上の遺伝子 (*db* 遺伝子) に変異があり、*leptin* 受容体が欠損している。³⁶⁾ また、*ob/ob* マウスは、第 6 染色体上の遺伝子 (*ob* 遺伝子) が変異していて正常な *leptin* が産生されず、過食に基づく肥満、高 *insulin* 血症と高血糖を示す。³⁷⁾ しかし、単一遺伝子ではなく、多数の原因遺伝子 (感受性遺伝子) が作用し合って発症する割合が大きいヒトの 2 型糖尿病の発症を、これら既知の遺伝子の作用だけで説明することは難しい。多遺伝子変異による糖尿病病態動物モデルとして多くの動物が知られている。KK マウスは、軽度の肥満と高 *insulin* 血症を呈し、高カロリー飼料の摂取により高血糖となり、強度の尿糖陽性となる。³⁸⁾ 他に、Nagoya-Shibata-Yasuda (NSY) マウス³⁹⁾、Tsumura Suzuki Obese Diabetes (TSOD) マウス⁴⁰⁾、Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) ラット⁴¹⁾、GK ラット⁴²⁾、Spontaneously Diabetic Torii (SDT) ラット⁴³⁾ など多くの糖尿病病態動物モデルが研究に利用されてきた。前述したように、多因子疾患である 2 型糖尿病は、2 型糖尿病発症遺伝子の存在下において食事内容、食事習慣、ストレス、運動不足などの環境因子が加わることにより発症する。ヒトの 2 型糖尿病はその発症が多数の原因遺伝子 (感受性遺伝子) の異常による割合が圧倒的に大きい。そのため、2 型糖尿病の発症原因についての研究は、特定の 2 型糖尿病原因遺伝子 (感受性遺伝子) の異常をもった人のみで行うのは困難で、遺伝的背景と環境因子とを厳密にコントロールできる近交系統の自然発症モデル動物を利用した解析が有用である。

前田らは、*ddY* マウスから 2 系統のマウス、すなわち *insulin* 抵抗性自然発症マウス (*ddY-H* マウス) と *insulin* 抵抗性を発症しないマウス (*ddY-L* マウス) を系統分離した。⁴⁴⁾ *ddY-H* マウスは、一定週齢で軽度の肥満、*insulin* 抵抗性および脂肪肝を発症し、2 型糖尿病患者と同様な病態を呈するが、*ddY-L* マウスはそのような病態を示さない。したがって、病態動物の *ddY-H* マウスと健全な *ddY-L* マウスは、*insulin* 抵抗性の発症機構を研究する有用な実験系である。*ddY-H* マウスは耐糖能試験により 12 週齢から耐糖能が低下し、加齢により糖尿病様症状の発現、脂肪組織の肥大化による *adipocytokine* の産生異常⁴⁵⁾、脂肪肝や脂質異常症⁴⁶⁾ を発症するとされる。また、脂肪組織における *TNF- α* の産生・分泌の低下が認められ、その発症に遺伝的因子の関与が推測されている。⁴⁵⁾ 原因遺伝子は明らかになっていないが、*insulin* 抵抗性の発現機構を検討するうえで有用な実験動物である。

これまでの研究で、雄性 *ddY-H* マウスでは *insulin* 抵抗性の発現とともに血漿中 *insulin* 濃度の上昇が認められた。⁴⁵⁾ 肥満患者では、*insulin* 抵抗性ととも高 *insulin* 血症がみられ、また、食後過血糖がみられる糖尿病患者では血中 *insulin* 濃度の上昇と *insulin* 抵抗性の発現が知られている。本研究では、この雄性 *ddY-H* マウスにおける *insulin* 抵抗性の発現機構を明らかにする目的で、雄性 *ddY-L* マウスを対照として、*insulin* 抵抗性発現と *insulin* 分泌能亢進および *insulin* の情報伝達系との関連性とその性差について検討した。

本論文は、4 章からなり、第 1 章では、種々の週齢の雄性マウスで *glucose* の経口投

与、腹腔内投与および静脈内投与による血糖値の変動と insulin および膵 β 細胞を刺激し insulin を分泌させる nateglinide の血糖値の低下作用を測定し、耐糖能低下の発現時期について検討した。

第 2 章では、種々の週齢の雄性マウスで glucose、nateglinide および DPP-4 阻害薬である sitagliptin の投与による血漿 insulin 値の上昇を測定し、膵からの insulin 分泌能の週齢による変動について検討した。

第 3 章では、種々の週齢の雄性マウスの脂肪組織および肝の insulin 情報伝達系の InsR、IRS-1、IRS-2 の mRNA およびタンパクの発現と insulin 抵抗性発現との関連性について検討した。

第 4 章では、雌雄 ddY-H マウスにおける耐糖能および insulin 情報伝達系について、雄性 ddY-L マウスと比較した。

第1章 雄性 ddY-H マウスの糖負荷による血糖値の変動

1-1 序論

Insulin 抵抗性の発症機構を明らかにするためには、発症初期の現象とその後の経過を正確に把握することが重要である。雄性 ddY-H マウスでは、12 週齢以降で glucose 経口負荷試験における耐糖能の低下がみられ、9 週齢では認められなかったことから、この時期に insulin 抵抗性が発症すると報告されている。⁴⁴⁾ しかし、48 時間絶食後 12 時間摂餌させた場合の血糖値と血漿 insulin 濃度は、9 週齢からわずかではあるが有意に上昇した。⁴⁴⁾ 本章では、雄性 ddY-H マウスの insulin 抵抗性の発症時期とその後の経過を明らかにする目的で、glucose を経口投与、腹腔内投与および静脈内投与した際の血糖値の変動、nateglinide および insulin による血糖値の低下について検討した。

1-2 実験材料と実験方法

1-2-1 実験動物と飼育条件

実験には静岡県立大学動物実験センターのコロニーで繁殖した雄性 ddY-H マウスおよび雄性 ddY-L マウスを使用した。マウスは 4 週齢で離乳し、温度 22~24°C、湿度 50~60%、明暗周期 12 時間（明期 8:00~20:00）の条件下、標準固形飼料（MF 飼料、オリエンタル酵母）を自由に摂餌・摂水させ、一定週齢まで飼育後、実験に供した。

本研究は、静岡県立大学動物実験委員会の承認のもと、すべての動物実験は静岡県立大学が定めた「静岡県立大学動物実験規程」に基づき実施した。

1-2-2 試薬および薬剤

Glucose（試薬特級）、Carboxymethylcellulose (CMC) は和光純薬より購入した。Disodium ethylenediaminetetraacetate (EDTA) は同人化学研究所より購入した。ノボラピッド®注はノボノルディスクファーマ社から購入した。スターシス®錠はアステラス製薬から購入した。

1-2-3 Glucose を経口投与したマウスの血糖値の測定

6、9、12、15 週齢の雄性 ddY-H マウスおよび雄性 ddY-L マウス（各 7 匹）を 4 時間（9:00~13:00）絶食させた後、尾静脈からヘマトクリット毛細管（VC-H075H、テルモ）に約 30 μ L 採血した。次いで蒸留水または 1 mL/50 g 体重の 5、10、15% glucose 溶液（glucose として 1、2 および 3 g/kg 体重）を、胃ゾンデを用いて経口投与し、その 15 分後に尾静脈からヘマトクリット管（テルモ）に約 30 μ L 採血した。採血した血液を遠心分離後、血清の glucose を測定し、血糖値とした。蒸留水または glucose 投与前と投与 15 分後の血糖値の差を算出した。

1-2-4 Glucose を腹腔内投与したマウスの血糖値の測定

6、9、12、15 週齢の雄性 ddY-H マウスおよび雄性 ddY-L マウス（各 10 匹）を 4 時

間（9：00～13：00）絶食させた後、1 mL/50 g 体重 の 15% glucose 溶液（glucose として 3 g/kg 体重）を腹腔内投与した。Glucose 投与前（0 time）と投与 30 分後、60 分後、120 分後に 1-2-3 と同様に採血し、血糖値を測定した。Glucose 投与後の時間を軸に血糖値をプロットした血糖値－時間曲線から、曲線下面積（AUC）を算出した。

1-2-5 Glucose を静脈内投与したマウスの血糖値の測定

6、9、12 週齢の雄性 ddY-H マウスおよび雄性 ddY-L マウス（各 10 匹）を 4 時間（9：00～13：00）絶食させた後、0.2 mL/50 g 体重 の 25% glucose 溶液を（1 g/kg 体重）を 30 秒かけて尾静脈に注射した。Glucose 注射前（0 time）と注射 5 分後、15 分後、30 分後、60 分後に 1-2-3 と同様に採血し、血糖値を測定した。Glucose 注射 5 分後から 30 分後までの血糖値の低下量を算出した。

1-2-6 Insulin を腹腔内投与したマウスの血糖値の測定

6、9、12 週齢の雄性 ddY-H マウスおよび雄性 ddY-L マウス（各 8 匹）を 4 時間（9：00～13：00）絶食させた後、insulin（ノボラピッド®注、ノボノルディスクファーマ）0.2 mL/50 g 体重（1 U/kg 体重）を腹腔内投与した。Insulin 投与前（0 time）と投与 15 分後、30 分後、60 分後に 1-2-3 と同様に採血し、血糖値を測定した。また、insulin 投与前の血糖値を基準とし、15 分後、30 分後、60 分後の血糖値の低下量を算出した。

1-2-7 Nateglinide を経口投与したマウスの血糖値の測定

6、9、12 週齢の雄性 ddY-H マウスおよび雄性 ddY-L マウス（各 7 匹）を 4 時間（9：00～13：00）絶食させた後、nateglinide（スターシス®錠 30mg、アステラス）を 10mL の 1%CMC に懸濁し、0.5 mL/50 g 体重（30 mg/kg 体重）を、胃ゾンデを用い経口投与した。Nateglinide 投与前（0 time）と投与 15 分後、30 分後、60 分後に 1-2-3 と同様に採血し、血糖値を測定した。また、nateglinide 投与前の血糖値を基準とし、15 分後、30 分後、60 分後の血糖値の低下量を算出した。

1-2-8 Insulin 抵抗性インデックスの算出

6、9、12、15 週齢の雄性 ddY-H マウスおよび雄性 ddY-L マウス（各 8 匹）を 4 時間（9：00～13：00）絶食させた後、1-2-3 に準じて採血し、その後直ちに断頭により 30 μ L の 10%EDTA を添加した遠心チューブに採血した。尾静脈から得た血液および断頭により得た血液を遠心分離し、それぞれ血糖値および血漿 insulin 値の測定に用いた。血糖値と血漿 insulin 値から下式に従い insulin 抵抗インデックスを算出した。^{44, 47)}

$$\text{Insulin 抵抗性インデックス} = \text{Glucose (mg/dL)} \times \text{Insulin (ng/mL)} / 100$$

1-2-9 血糖値の測定

血糖値は、グルコース-CII-テストワコー（和光純薬）を用いて測定した。

1-2-10 血漿 insulin 値の測定

血漿 insulin 値は、マウスインスリン測定キット（森永生科学研究所）を用いて ELISA 法で測定した。

1-2-11 統計処理

データは平均値±標準誤差で表示した。各群間の有意差検定は、Bartlett's test で群間の等分散を検定した後、two-way repeated-measure ANOVA 分析を行った。Post hoc 多重比較検定は Tukey's test を使用し、危険率 5%未満を有意差ありと判定した。

1-3 実験結果

1-3-1 Glucose の経口投与量による血糖値の上昇の違い

雄性 ddY-H マウスの耐糖能を検討したこれまでの研究では、glucose の経口投与量を 3 g/kg とした糖負荷試験が行われてきた。その結果雄性 ddY-H マウスは 9 週齢までは耐糖能の低下を示さず、12 週齢以降で有意な低下を示した。⁴⁴⁾ そこで、glucose の経口投与量を 3 段階に分け、血糖値への影響を検討する目的で glucose の投与量を 1 g/kg、2 g/kg、3 g/kg として 15 分後の血糖値の上昇量を測定した。

ddY-L マウスでは、6~15 週齢のいずれの週齢でも 1 g/kg の投与と比較して 2 g/kg の投与により有意な上昇が認められた。しかし、3 g/kg と増量しても一層の上昇は認められなかった。Glucose の各投与量による血糖値の上昇量は各週齢で一定で、週齢による差はなかった (Fig. 1)。

ddY-H マウスでも、6~15 週齢のいずれの週齢でも 1 g/kg の投与と比較して 2 g/kg の投与により有意な上昇が認められたが、3 g/kg と増量しても一層の上昇は認められなかった。

ddY-H マウスと ddY-L マウスを比較すると、6 週齢および 9 週齢では glucose の各投与量による血糖値の上昇量の差は認められなかった (Fig. 1)。しかし、12 週齢および 15 週齢では 1 g/kg、2 g/kg および 3 g/kg のいずれの投与量による血糖値の上昇量も ddY-H マウスで有意に大きかった (Fig.1)。このことから ddY-H マウスの経口投与した glucose に対する耐糖能は、glucose の 1 から 3 g/kg では経口投与量に関係なく 12 週齢から低下することが示唆され、この結果はこれまでの報告と一致していた。

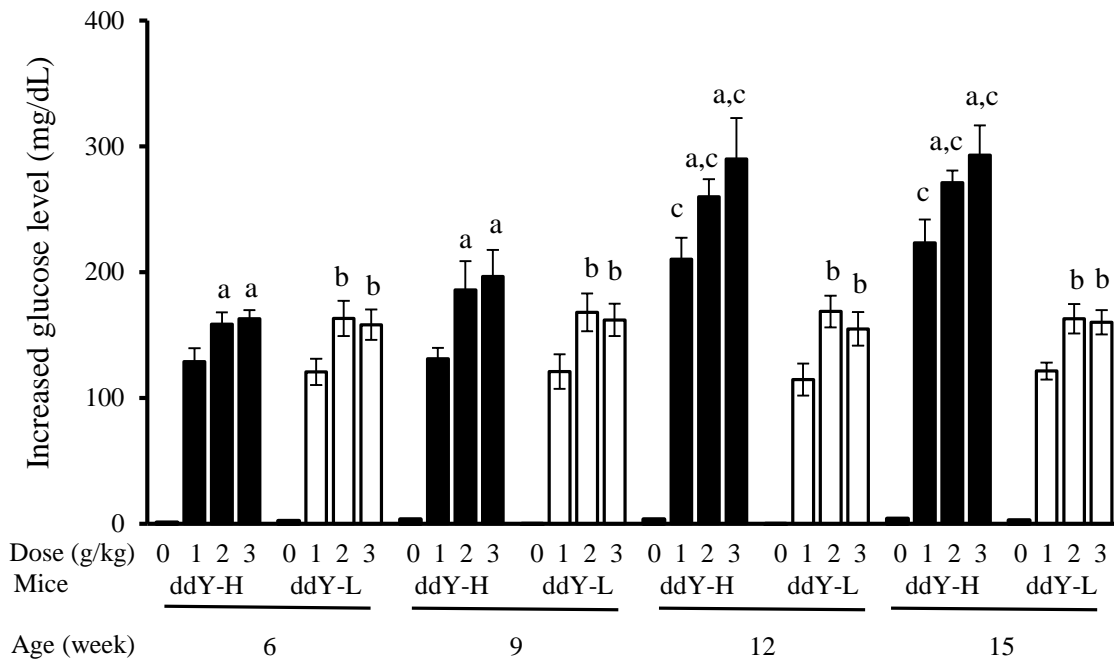


Fig. 1. Increases in serum glucose levels induced by oral administration of glucose.

Glucose (1, 2 and 3 g/kg) or water (0 g/kg) were orally administered to ddY-H mice and ddY-L mice at 6-, 9-, 12- and 15-weeks of age after 4 hr fasting. Blood was taken from caudal vein after 0 and 15 min and the increased glucose level during 15 min was calculated by subtracting glucose level at 0 min. ddY-H: closed column, ddY-L: open column. Each column and bar represents the mean \pm SE of 7 mice. Significantly different from 1 g/kg in ddY-H mice (^a : $p < 0.01$) and in ddY-L mice (^b: $p < 0.01$), and from the corresponding dose in the same-week-old ddY-L mice (^c: $p < 0.01$)

1-3-2 腹腔内投与した glucose に対する耐糖能

Glucose の経口投与による耐糖能試験では、腸管からの glucose の吸収による影響が考えられるため、それを除外する目的で glucose の腹腔内投与による耐糖能試験を行った。Glucose の腹腔内投与 (3 g/kg) のよる血糖値の変動の時間経過およびその AUC をそれぞれ Fig.2A、2B および Fig.2C に示す。血糖値の上昇量は、経口投与 (3 g/kg) の場合と比較していずれのマウスでも大きかった。また、ddY-L マウスでは、6、9、12 および 15 週齢において週齢による耐糖能の変化は認められず、その AUC も差はみられなかった。一方、ddY-H マウスでは、ddY-L マウスと比較して 9 週齢以降で血糖値が高値で推移し、AUC も有意に高値であった。このことから、ddY-H マウスでは、腹腔内投与した glucose に対する耐糖能の低下は 9 週齢から生じていることが示唆された。

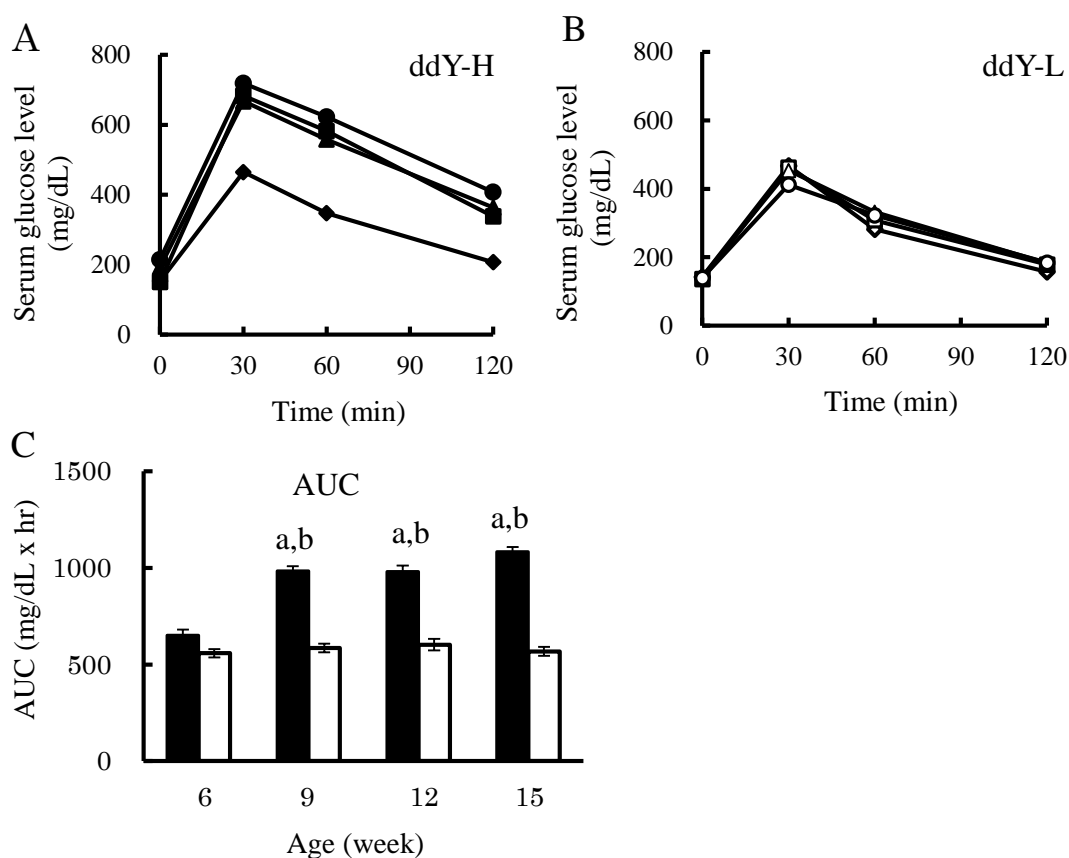


Fig. 2. Intraperitoneal glucose tolerance test

Glucose (3 g/kg) was intraperitoneally administered to ddY-H mice (A) and ddY-L mice (B) at 6- (◆, ◇), 9- (■, □), 12- (▲, Δ) and 15- (●, ○) weeks of age after 4 hr fasting (9:00 – 13:00). Blood was taken from caudal vein after 0, 30, 60 and 120 min and serum glucose was measured. Each symbol represents the mean of 10 mice. AUC in intraperitoneal-glucose tolerance test (C) was calculated (closed column: ddY-H, open column: ddY-L), and each column and bar represents the mean ± SE of 10 mice. Significantly different from ddY-H mice at 6-weeks of age (^a: $p < 0.01$) and from ddY-L mice at the same age (^b: $p < 0.01$).

1-3-3 静脈内投与した glucose に対する耐糖能

雄性 ddY-H マウスの耐糖能の低下は、glucose を腹腔内投与した場合には 9 週齢から認められた。Glucose を経口投与した場合は 12 週齢から低下したことから、glucose の腸管と腹腔からの吸収の違いにより耐糖能の低下の違いがみられた可能性が考えられた。そこで、glucose の吸収能の影響を除外する目的で、glucose を静脈内投与し血糖値の推移を測定した。

Glucose 1 g/kg を静脈内注射すると 5 分後に ddY-H マウスと ddY-L マウスで同程度の血糖値が認められた。6 週齢の ddY-H マウスと ddY-L マウスでは、その後の血糖値推移 (Fig. 3A、3B) および 5 分後から 30 分後の血糖値低下の程度 (Fig. 3C) に差がなかった。また、ddY-L マウスでは、6、9、12 および 15 週齢のいずれにおいても週齢による血糖値の低下の時間経過と血糖値の低下の程度に差がなかった (Fig. 3B、3C)。一方、ddY-H マウスでは、6 週齢のマウスと比較して 9 週齢では血糖値の低下の程度が有意に小さかった (Fig. 3A、3C)。12 週齢では、さらに血糖値の低下の程度が小さくなったことから、ddY-H マウスでは 9 週齢から耐糖能が低下しはじめ、耐糖能の低下は 12 週齢でさらに進行することを示唆している。

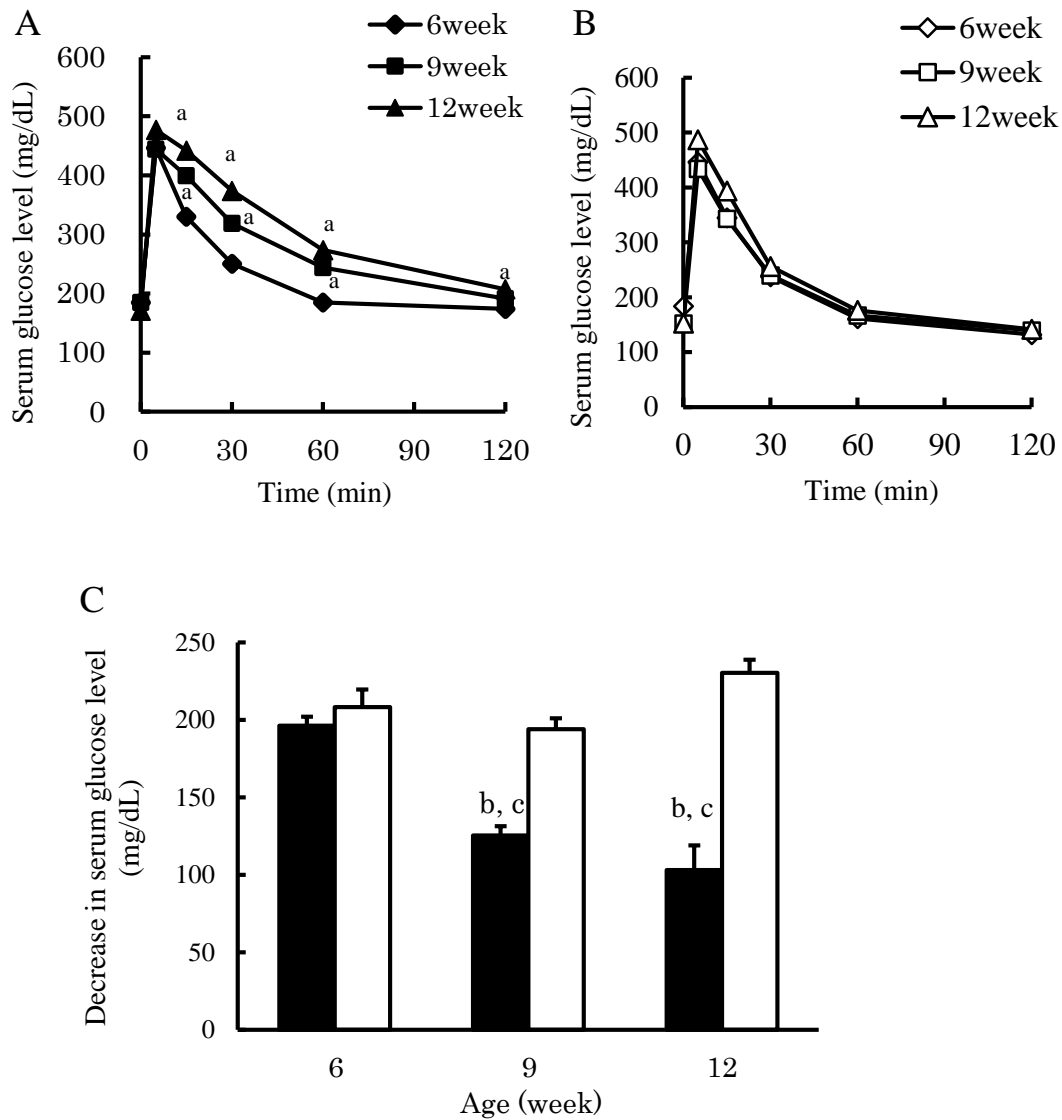


Fig.3. Intravenous glucose tolerance test

Glucose (1 g/kg) was intravenously injected to ddY-H mice (A) and ddY-L mice (B) at 6- (◆, ◇), 9- (■, □), 12- (▲, △) week-old of age after 4 hr fasting (9:00 – 13:00). Blood was taken from caudal vein after 0, 5, 15, 30, 60 and 120 min, and serum glucose was measured. Each symbol represents the mean of 10 mice. (C) Decreased glucose levels from 5 min to 30 min in Fig. 3-A (ddY-H mice: closed column) and Fig. 3-B (ddY-L mice: open column). Each column plus bar represents the mean ± S.E. of 10 mice. Significantly different from 6 week-old ddY-H mice at same time (^a: $p < 0.01$), from ddY-H mice at 6-weeks of age (^b: $p < 0.01$), and from ddY-L mice at the same age (^c: $p < 0.01$).

1-3-4 Insulin 腹腔内投与後の血糖値の変動

ddY-H マウスと ddY-L マウスで insulin の血糖値低下作用を比較する目的で、insulin 1 U/kg を腹腔内投与し、投与前、投与 5 分後、30 分後、60 分後に血糖値を測定した。6 週齢の ddY-H マウスと ddY-L マウスでは insulin による血糖値の低下量は同程度であった (Fig. 4A、4B)。また、6、9 および 12 週齢の ddY-L マウスでは、insulin による血糖値低下の時間経過は週齢による違いはなかった (Fig. 4B)。一方、ddY-H マウスでは、ddY-L マウスと比較して 9 週齢から insulin による血糖値低下量は有意に減弱し、12 週齢、15 週齢と加齢によりさらに減弱した (Fig.4A)。Insulin 投与後 60 分間の血糖値低下量を比較すると、ddY-H マウスでは 9 週齢で ddY-L マウスと比べ有意に insulin の効果が減弱し、12 週齢と 15 週齢ではさらに減弱した (Fig. 4C)。この結果から、ddY-H マウスでは、9 週齢から insulin に対する感受性が減弱化し、加齢により insulin 感受性が低下することが示唆された。

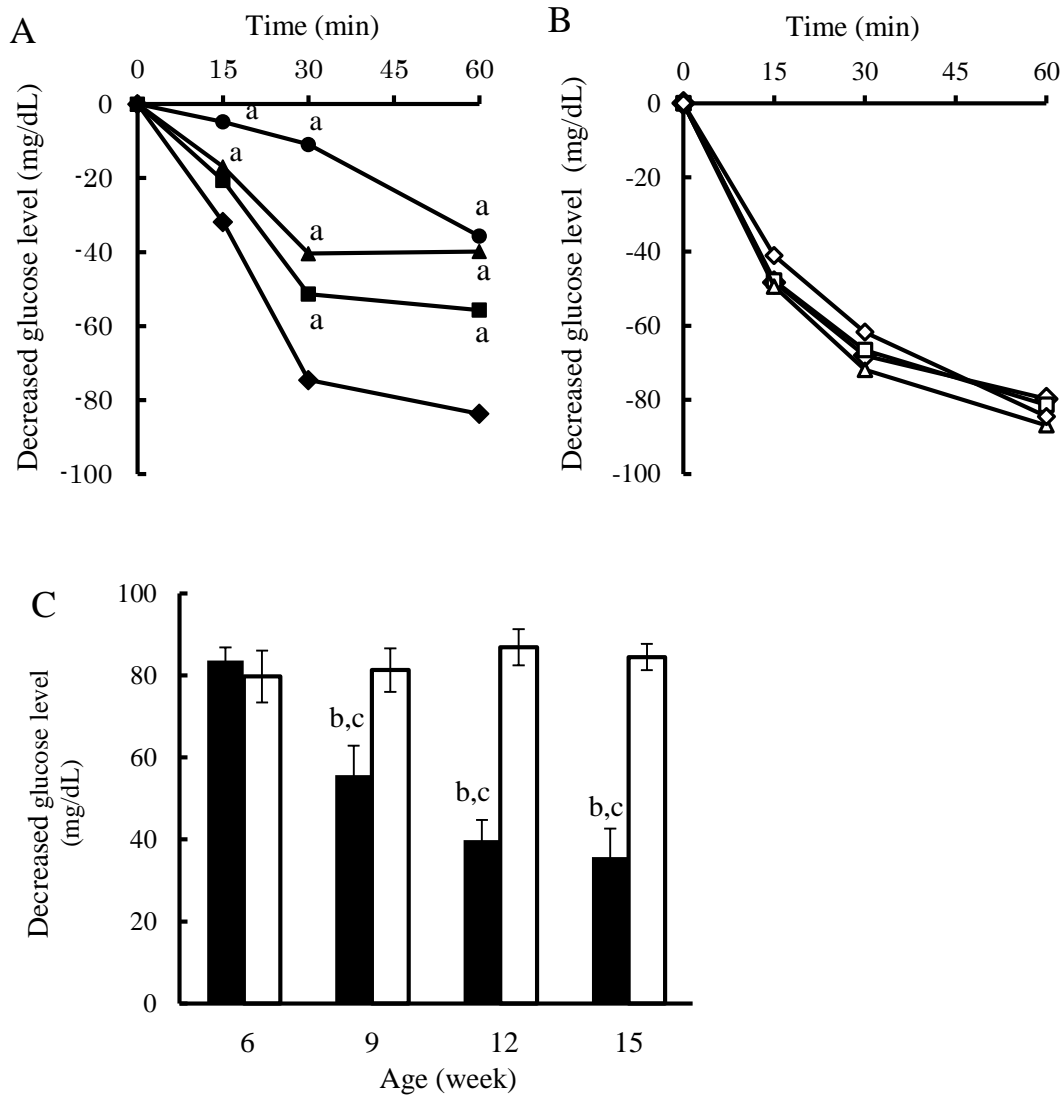


Fig. 4. Decreases in serum glucose levels by intraperitoneal insulin injection.

ddY-H mice (A) and ddY-L mice (B) at 6- (◆, ◇), 9- (■, □), 12- (▲, Δ), and 15- (○, ●) weeks of age were intraperitoneally injected insulin (0.05 U/50 g body weight) after fasting for 4 hr (9:00-13:00) and serum glucose levels were measured after 0, 15, 30 and 60 min. The decreased glucose level was calculated by subtracting glucose level at 0 min from that at the respective time. Each symbol represents the mean of the decreased glucose levels by insulin injection for 8 mice. The decreased glucose level for 60 min was shown in (C). Each column and bar represents the mean \pm SE of 8 mice (closed column: ddY-H mice, open column: ddY-L mice). Significantly different from 6 week-old ddY-H mice at same time (^a: $p < 0.01$), from ddY-H mice at 6-weeks of age (^b: $p < 0.01$), and from ddY-L mice at the same age (^c: $p < 0.01$).

1-3-5 Nateglinide の経口投与による血糖値の変動

Nateglinide は insulin 分泌を促進し血糖を低下させる。そこで ddY-H マウスと ddY-L マウスに nateglinide (30 mg/kg) を経口投与し、15 分後、30 分後および 60 分後に血糖値を測定した。

Fig. 5 に nateglinide 投与による血糖値の低下量を示す。6~12 週齢の ddY-L マウスでは、nateglinide 投与後の各時間において血糖値の低下量は同程度であった。一方、ddY-H マウスでは、6 週齢では ddY-L マウスと血糖値の低下量の違いはみられなかったが、9 週齢では nateglinide による血糖低下作用が有意に減弱し、12 週齢ではさらにその血糖値低下作用は減弱した (Fig. 5)。

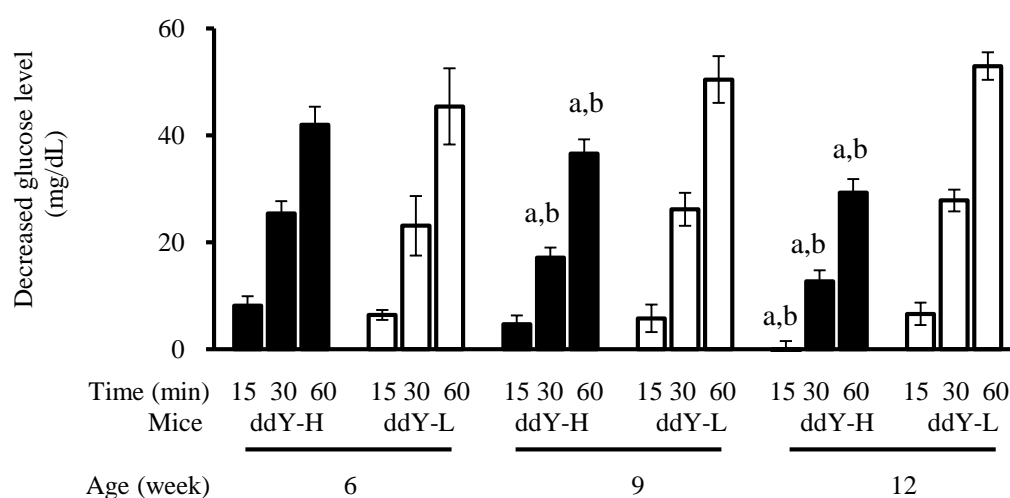


Fig. 5. Decreases in serum glucose levels by nateglinide.

Nateglinide (30 mg/kg) was orally administered after 4 hr fasting (9:00 – 13:00) and blood was taken from caudal vein after 0, 15, 30 and 60 min for measuring serum glucose levels. Decreased glucose level induced by nateglinide was calculated by subtracting glucose level at 0 min from that at the respective time. Each column and bar represents the mean \pm SE for 7 mice. Significantly different from corresponding time point in 6-week-old ddY-H mice (^a: $p < 0.01$) and from ddY-L mice at the same age (^b: $p < 0.01$).

1-3-6 Insulin 抵抗性インデックスによる insulin 抵抗性の評価

1-3-2~1-3-5の結果から、ddY-H マウスにおける insulin 抵抗性は9週齢から生じていることが示唆されたため、空腹時の血糖値と血漿 insulin 値から insulin 抵抗性インデックスを算出し、insulin 抵抗性を評価した。ddY-H マウスでは、ddY-L マウスと比較して12週齢以降で絶食時の血糖値と血漿 insulin 値の有意な上昇がみられた (Fig. 6A, 6B)。これらの値から insulin 抵抗性インデックスを算出したところ、ddY-H マウスは9週齢で65%と有意な上昇がみられた (Fig. 6C)。また、12週齢、15週齢と加齢により血漿 insulin 値が上昇し、それに伴い insulin 抵抗性インデックスが著明に上昇した。この結果からも ddY-H マウスの insulin 抵抗性は9週齢から発現し、加齢とともに進行することが示唆された。

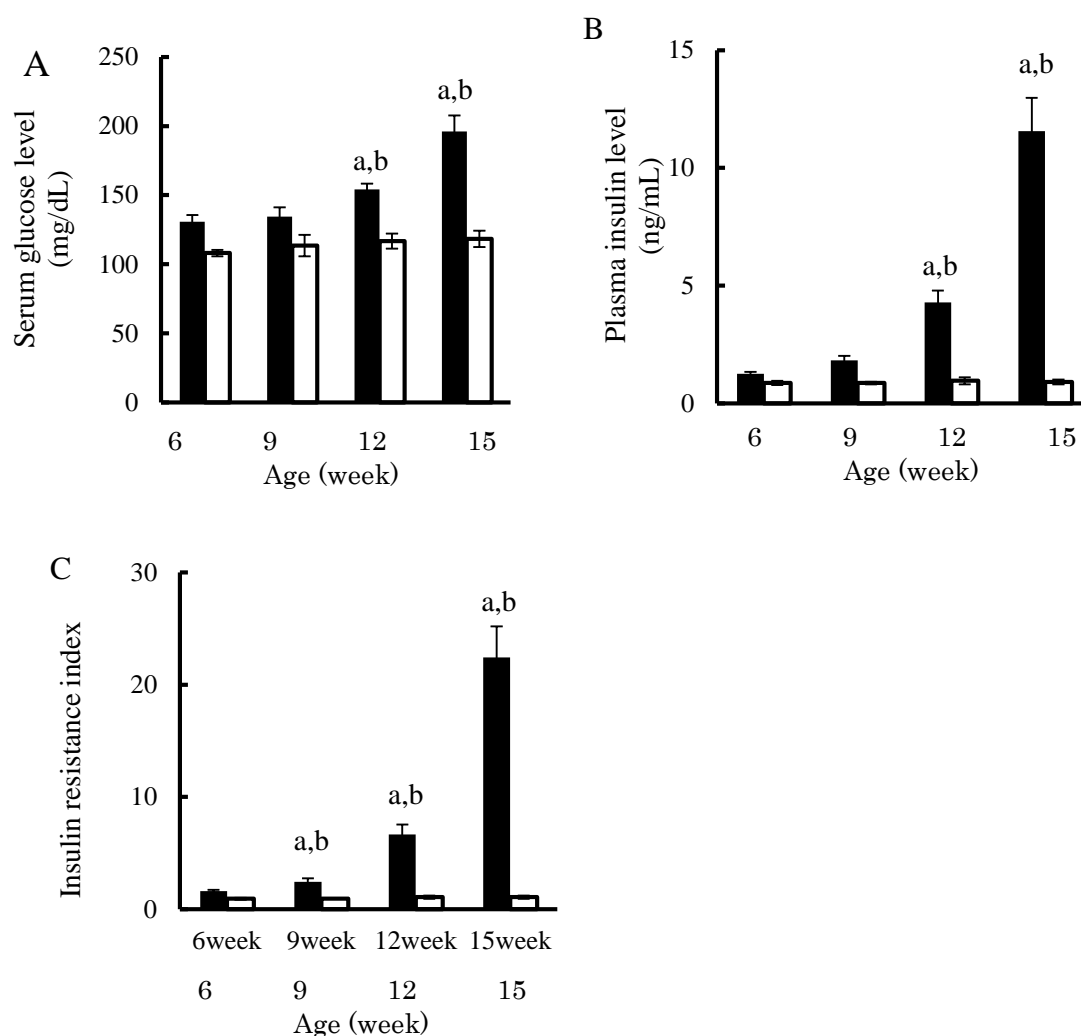


Fig. 6 Serum glucose level, plasma insulin level and insulin resistance index.

Serum glucose levels (A) and plasma insulin levels (B) were measured in mice after fasting for 4 h (9:00-13:00) at 6-, 9-, 12- and 15-weeks of age. Insulin resistance index (C) was calculated as (glucose (mg/dL) x insulin (ng/dL) /100). Each column and bar represents mean \pm SE for 8 mice. Significantly different from 6-week-old ddY-H mice (^a: $p < 0.01$), and from ddY-L mice at the same age (^b: $p < 0.01$).

1-4 考察

Insulin 抵抗性は、2 型糖尿病発症の重要な原因の一つであるが、その詳細な発症機構は明らかではない。⁴⁾ Insulin 抵抗性の発現機構を明らかにするためには、insulin 抵抗性が形成される経過を正確に把握することが重要であるが、実験動物は、その経過を観察する実験系として有用である。Sprague-Dawley ラットや C57BL/6J マウスは高脂肪食や高 fructose 食などの特殊飼料の飼育で血糖値の上昇や耐糖能の低下がみられるようになることが報告されている。^{48, 49)} しかし、ddY-H マウスは標準固形飼料で飼育することにより 12 週齢から耐糖能の低下、15 週齢では空腹時血糖値の上昇がみられ、20 週齢ごろから尿糖が検出され糖尿病様症状を示すことが報告されている。⁴⁴⁾ したがって、雄性 ddY-H マウスは insulin 抵抗性を自然発症する時期の病状を詳細に分析するための有用な病態モデル動物である。前田らは、雄性 ddY-H マウスに glucose を経口投与したときの耐糖能の低下が 9 週齢ではみられず、12 週齢からみられたことから insulin 抵抗性は 12 週齢から発現すると報告している。⁴⁴⁾ しかし、ddY-H マウスを 12 時間絶食後自由に摂餌させると、雄性 ddY-L マウスと比べ 9 週齢でわずかな血糖値の上昇と血漿中 insulin 濃度の上昇を認めており、9 週齢ですでに insulin 抵抗性発症が進行している可能性が考えられた。

Glucose の経口投与と腹腔内投与や静脈内投与といった投与経路の違いにより血糖値や血漿 insulin 値の上昇の程度が異なることが知られており⁵⁰⁻⁵²⁾、耐糖能低下の発現時期は、glucose の経口投与のみで判断することはできない。そこで、本章では、雄性 ddY-H マウスの耐糖能低下の発症時期を明らかにする目的で、glucose の経口投与、腹腔内投与および静脈注射に対する耐糖能および insulin の感受性の週齢による変化を観察した。

ddY-L マウスでは、glucose を経口投与、腹腔内投与および静脈注射のいずれの経路で投与しても週齢による耐糖能の変化は認められなかった。また、nateglinide および insulin の投与による血糖値の低下量においても週齢による変化は認められなかった。さらに、insulin 抵抗性インデックスも週齢による変化はなかった。これまでの研究で、ddY-L マウスの経口投与した glucose に対する耐糖能および insulin 抵抗性インデックスがオリジナルのマウスである ddY マウスと違いがないことが報告されている。⁴⁴⁾ したがって、ddY-L マウスは健全な耐糖能を示す対照マウスとして適切であるといえる。本研究では、ddY-H マウスの週齢による耐糖能の変動を ddY-L マウスと比較することにより検討した。

これまでの ddY-H マウスの経口糖負荷試験では、glucose (3 g/kg) の投与が行われてきた。Glucose の経口投与量による血糖値上昇量の差を検討する目的で、glucose の経口投与量を 1 g/kg、2 g/kg および 3 g/kg とし血糖値の上昇量を測定した。標準飼料と高脂肪飼料を摂取した C57BL/6J マウスにおいて、1 g/kg 以下の経口糖負荷では糖負荷後の血糖値に差は無かったが、2 g/kg の経口糖負荷で血糖値の上昇量に有意な差が生じたとの報告がある。⁵³⁾ 本研究でも、ddY-L マウスと ddY-H マウスでは 1 g/kg の糖負荷と比べ、2 g/kg、3 g/kg の糖負荷で有意な血糖値の上昇がみられた。また、ddY-L マウ

スと 6 週齢、9 週齢の ddY-H マウスでは 2 g/kg と 3 g/kg の糖負荷量で血糖値の上昇に違いは見られなかったことから、経口糖負荷試験における glucose 3 g/kg の投与は適切であったといえる。また、6 週齢と 9 週齢の ddY-H マウスの血糖値の上昇量は ddY-L マウスと有意な差はなかったが、12 週齢以降で血糖値の上昇量が有意に大きくなり、耐糖能の低下が確認された。一方、glucose を腹腔内投与および静脈内投与を行った場合、ddY-H マウスでは既に 9 週齢で耐糖能の低下が認められた。

Glucose を経口投与した場合、小腸における glucose の吸収に Na⁺/glucose 共輸送型トランスポーター (sodium glucose co-transporter: SGLT) が関与している。SGLT は 6 種類のアイソフォームが知られていて、その中でも SGLT1 は小腸に多く分布し Na⁺勾配を利用して glucose を吸収する働きを有している。⁵⁴⁾ また、glucose などの栄養素が消化管から吸収されると、消化管から incretin と呼ばれる消化管ホルモンが血液中に分泌される。十二指腸に局在する K 細胞からは glucose-dependent insulintropic polypeptide (GIP) が、下部小腸の L 細胞からは glucagon-like peptide-1 (GLP-1) が分泌され、これらの incretin は膵 β 細胞に作用し insulin 分泌を促進する。⁵⁵⁻⁵⁷⁾ したがって、glucose を経口投与した場合、SGLT1 や incretin などの影響を受けるため、insulin 抵抗性以外の要因が血糖の変動に表れる可能性がある。Glucose の腹腔内投与では、glucose は拡散により腹膜から吸収され、速やかに血中へ移行する。⁵⁸⁾ この場合、腸管からの吸収とは異なり SGLT1 などの輸送体の影響や incretin の影響が血糖値の変動に大きく影響することはない。⁵¹⁾ また、glucose の静脈内投与の場合、直接血管内に glucose を投与するため、輸送体や incretin などの影響をほとんど受けることなく末梢組織における insulin の効果を評価することが可能となる。⁵²⁾ ddY-H マウスで glucose を経口投与した場合と腹腔内投与あるいは静脈内投与した場合で耐糖能が顕在化した時期が 12 週齢と 9 週齢と異なったことから、glucose を経口投与した場合、末梢組織の insulin の効果の変動が何らかの要因によりマスクされた可能性が考えられた。そこで、insulin を腹腔内に投与したところ ddY-H マウスは 6 週齢では ddY-L マウスと同程度の insulin の血糖降下作用が認められたが、9 週齢以降では insulin の血糖低下作用が減弱した。これらの結果から、ddY-H マウスでは見かけ上の insulin 抵抗性は 12 週齢から顕在化するが、9 週齢から進行していることが示唆された。Insulin 抵抗性は高血糖の原因となるが、発現しても即座に耐糖能の低下はみられない。それは、insulin 抵抗性の発現の代償性効果として膵からの insulin 分泌亢進が生じるためである。⁵⁹⁾ このことから、ddY-H マウスの耐糖能の低下は、9 週齢から誘導されるが、膵からの insulin 分泌の亢進がその顕在化を抑えていることが推察された。

Nateglinide は膵 β 細胞からの insulin 分泌を促進し、血糖値降下作用を示す。^{60, 61)} 膵 β 細胞からの insulin 分泌は、glucose が β 細胞内に取り込まれることにより促進される。Glucose は β 細胞内で代謝され、adenosine triphosphate (ATP) が増加し、ATP 感受性 K⁺チャネルの閉口、細胞膜の脱分極、電位依存性 L 型 Ca²⁺チャネルの開口、細胞外からの Ca²⁺流入、その結果として細胞内 Ca²⁺濃度の上昇を介して insulin が分泌される。⁶⁰⁾ しかし、糖尿病状態では膵 β 細胞内での glucose の代謝が低下しており、insulin 分

泌低下の原因となるとの報告もあるため glucose の投与だけでは insulin 抵抗性発現の評価はできない。Nateglinide は膵 β 細胞の sulfonylurea 受容体に直接結合し ATP 感受性 K^+ チャネルを閉口するため、 β 細胞への glucose の取り込みや代謝を介さないで insulin を分泌させる。⁶²⁾ また、nateglinide は通常、作用発現時間が 15~30 分と非常に早く、投与 2 時間以内に効果が消失することから、nateglinide 投与による血糖値の変動を評価しやすい。⁶³⁾ Insulin 負荷試験の結果では ddY-H マウスは 9 週齢から insulin の血糖降下作用が減弱していた。そこで、insulin 分泌を促進させる nateglinide を経口投与したところ、ddY-H マウスおよび ddY-L マウスのいずれでも血糖値の低下がみられたが、ddY-H マウスでは 9 週齢で nateglinide による血糖降下作用が減弱し、12 週齢ではその血糖降下作用はさらに減弱していた。この結果は、ddY-H マウスでは insulin による血糖値低下が 9 週齢から減弱していることを示唆するもので、insulin 抵抗性は 9 週齢から生じていると考えられる。

前田らは 15 週齢の ddY-H マウスにおいて insulin 抵抗性インデックスが低下していることを明らかにした。⁴⁴⁾ 糖負荷試験や insulin 負荷試験と nateglinide の効果減弱の結果から、ddY-H マウスの insulin 抵抗性は 9 週齢から生じていることが示唆されたため、6~15 週齢における insulin 抵抗性インデックスを測定したところ、ddY-H マウスでは 9 週齢から有意な上昇がみられ、12、15 週齢ではさらに上昇した。

以上の結果から、雄性 ddY-H マウスでは腹腔内投与および静脈内投与した glucose に対する耐糖能の低下、nateglinide の血糖低下作用減弱、insulin 抵抗性インデックスの上昇が 9 週齢からみとめられ、insulin 抵抗性は 9 週齢から生じて、加齢により重篤化することが示唆された。

第2章 雄性 ddY-H マウスにおける血漿中 insulin 濃度の週齢による変動

2-1 序論

Glucose を投与したマウスの血糖値は、膵からの insulin の分泌と肝や脂肪組織、骨格筋などの末梢組織への insulin の作用により大きく影響される。第1章で示したように、雄性 ddY-H マウスでは glucose を経口投与したときの耐糖能の低下は12週齢から認められたが、glucose を腹腔内投与あるいは静脈内投与したときの耐糖能の低下は9週齢から認められ、投与した insulin による血糖値低下作用の減弱化は9週齢から認められた。この耐糖能の発現時期の違いは、glucose の投与経路による膵からの insulin 分泌量の違いの影響によることが考えられる。そこで、本章では雄性 ddY-H マウスの insulin 分泌亢進の発症時期とその後の経過を明らかにする目的で、血漿 insulin 濃度の週齢による変動について検討した。

2-2 実験材料と実験方法

2-2-1 実験動物と飼育条件

第1章の1-2-1に準じた。

2-2-2 試薬および薬剤

ジャヌビア錠[®]はMSDから購入した。DPP4阻害薬NVP-DPP728[®]（細胞生物学用）は和光純薬から購入した。他薬剤は第1章の1-2-2と同様に購入したものを使用した。

2-2-3 Glucose を経口投与したマウスの血漿 insulin 値の測定

6、9、12および15週齢の雄性 ddY-H マウスおよび ddY-L マウス（各8匹）を4時間（9:00～13:00）絶食させた後、15% glucose 溶液 1 mL/50 g 体重（glucose 3 g/kg 体重）を、胃ゾンデを用いて経口投与した。1-2-8に準じ、glucose 投与直前および投与15分後、30分後に断頭により採血した。遠心分離により血漿分離し、血漿 insulin 値を測定した。

また、6、9、12および15週齢の雄性 ddY-H マウスおよび ddY-L マウス（各7匹）を4時間（9:00～13:00）絶食させた後、蒸留水または5、10、15% glucose 溶液 1 mL/50 g 体重（glucose として1、2および3 g/kg 体重）を、胃ゾンデを用いて経口投与し、その15分後に上記と同様に断頭・採血し血漿 insulin 値を測定した。

2-2-4 Sitagliptin を投与したマウスの血糖値の測定

6、9、12、15週齢の雄性 ddY-H マウスおよび ddY-L マウス（各12匹）を4時間（9:00～13:00）絶食させた後、sitagliptin（ジャヌビア錠[®]25 mg、MSD）を粉砕し10mLの1% CMCに懸濁し、0.5 mL/50 g 体重（25 mg/kg 体重）を、胃ゾンデを用いて経口投与した。その1時間後に15% glucose 溶液 1 mL/50 g 体重（glucose として3 g/kg 体重）を経口投与した。Glucose 投与直前および投与30分後、60分後、120分後に1-2-3に準じて採血し、

血糖値を測定した。Glucose 投与後の時間を軸に血糖値をプロットした曲線から AUC を算出した。

2-2-5 Sitagliptin を投与したマウスの血漿 insulin 値の測定

6、9、12、15 週齢の雄性 ddY-H マウスおよび ddY-L マウス（各 7 匹）を 4 時間（9：00～13：00）絶食させた後、1%CMC または sitagliptin（25 mg/kg）を経口投与し、その 1 時間後に glucose（3.0 g/kg）を経口投与した。Glucose 投与直前および投与後 15 分後に断頭・採血し、2-2-3 と同様に血漿 insulin 濃度の測定を行った。

2-2-6 Glucose を投与したマウスの血漿 GLP-1 濃度の測定

9、12、15 週齢の雄性 ddY-H マウスおよび ddY-L マウス（各 6 匹）を 4 時間（9：00～13：00）絶食させた後、2-2-3 と同様に glucose（3.0 g/kg）を経口投与した。Glucose の投与直前および投与 15 分後、30 分後に断頭により 30 μ L の 10%EDTA および 10 μ M NVP-DPP728[®]を添加した遠心チューブに採血した。⁵⁶⁾ 2-2-3 と同様に採血し、血漿分離後 GLP-1 の濃度を YK160 GLP-1 EIA 測定キット（矢内原研究所）を用いて測定した。

2-2-7 Glucose を投与したマウスの血漿 GIP 濃度の測定

6、9、12、15 週齢の雄性 ddY-H マウスおよび ddY-L マウス（各 7 匹）を 4 時間（9：00～13：00）絶食させた後、2-2-3 と同様に glucose（3.0 g/kg）を経口投与した。Glucose 投与直前および投与 15 分後、30 分後に 2-2-6 と同様に採血し、血漿分離後 GIP 濃度を GIP（TOTAL）ELISA KIT（Millipore）を用いて測定した。

2-2-8 Nateglinide を経口投与したマウスの血漿 insulin 値の測定

6、9、12 週齢の雄性 ddY-H マウス及び ddY-L マウス（各 7 匹）を 4 時間（9：00～12：00）絶食させた後、1-2-7 と同様に nateglinide（30 mg/kg）を経口投与した。Nateglinide 投与直前および投与 15 分後、30 分後に 2-2-3 と同様に採血し、血漿 insulin 値を測定した。

2-2-9 血糖値の測定

第 1 章の 1-2-9 に準じた。

2-2-10 血漿 insulin 値の測定

第 1 章の 1-2-10 に準じた。

2-2-11 統計処理

第 1 章の 1-2-11 に準じた。

2-3 実験結果

2-3-1 Glucose の経口投与による血漿 insulin 値の上昇

6~15 週齢のマウスに glucose (3 g/kg) を経口投与し、血漿中 insulin 濃度の推移を測定した (Fig. 2-1)。

ddY-L マウスの血漿 insulin 値は、glucose 投与前はすべての週齢で差はなく低値で、投与 15 分後には高値となり 30 分後には低下した。その血漿 insulin 値の経時推移に週齢による違いはみられなかった。

一方、6 週齢と 9 週齢の ddY-H マウスでの glucose 投与前の血漿 insulin 値は ddY-L マウスと差はなかったが、12 週齢と 15 週齢では有意に高値となった。また、6 週齢の ddY-H マウスでは、glucose 投与 15 分後および 30 分後の血漿 insulin 値は ddY-L マウスと比較して高い傾向は認められたが、有意な差は無かった (Fig. 2-1)。9 週齢以降では、glucose 投与 15 分後の血漿 insulin 値は著明に上昇し、30 分後でも有意に高値だった (Fig. 2-1)。

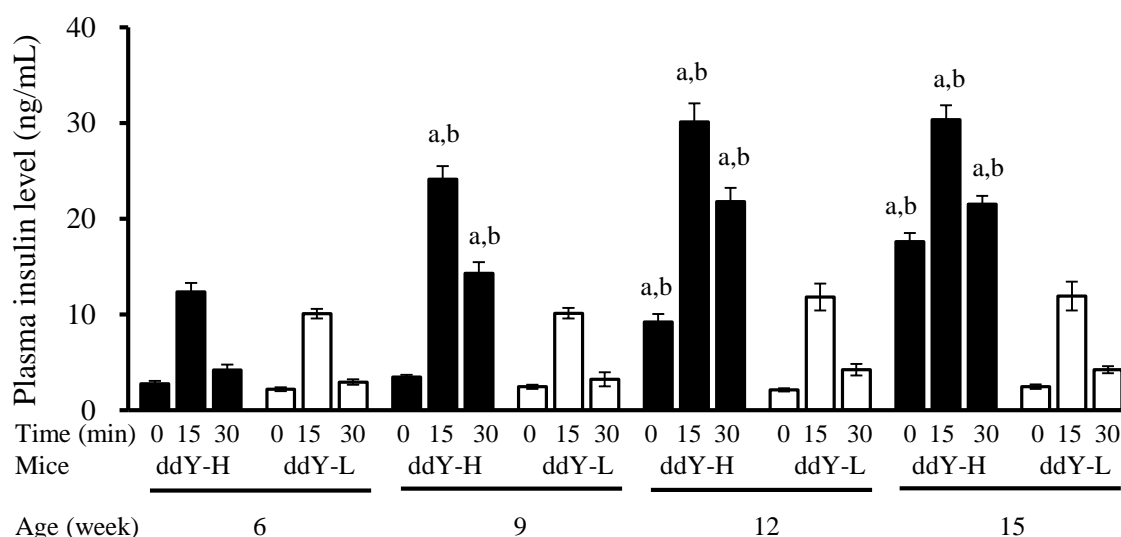


Fig. 2-1 Time course of increases in plasma insulin levels induced by oral glucose administration

Glucose (3 g/kg) was orally administered to ddY-H mice (closed column) and ddY-L mice (open column) at 6-, 9-, 12-, and 15-weeks of age after 4 hr fasting (9:00–13:00). Blood was taken by decapitation after 0, 15, and 30 min for insulin measurement. Each column and bar represents the mean \pm SE of 8 mice. Significantly different from ddY-H mice at 6-weeks of age (^a: $p < 0.01$) and ddY-L mice at the same age (^b: $p < 0.01$) in the corresponding time points.

1-3-1 で示したように、1~3 g/kg の glucose を経口投与した場合、ddY-H マウスでは glucose の投与量の増加に比例した血糖値の上昇がみられた。そこで、マウスに 1~3 g/kg の glucose を経口投与し、1-3-1 で insulin 分泌が最高となった glucose 経口投与 15 分後の血漿 insulin 値を測定した。

ddY-H マウスおよび ddY-L マウスのいずれでも glucose の投与量に比例して血漿 insulin 値が上昇した。ddY-L マウスの血漿 insulin 値の上昇に週齢による差は認められなかった (Fig. 2-2)。 また、6 週齢の ddY-H マウスの血漿 insulin 値の上昇は ddY-L マウスと同程度であった。しかし、9 週齢以降で 6 週齢の ddY-H マウスおよび各週齢の ddY-L マウスと比較して、いずれの投与量においても著しい上昇がみられた (Fig. 2-2)。

Fig. 2-1 および Fig. 2-2 から、ddY-H マウスで glucose の経口投与による血漿 insulin 値の上昇が 9 週齢以降で大きかったこと、そして 12 週齢と 15 週齢で血漿 insulin 値が高濃度で持続することが明らかになった。

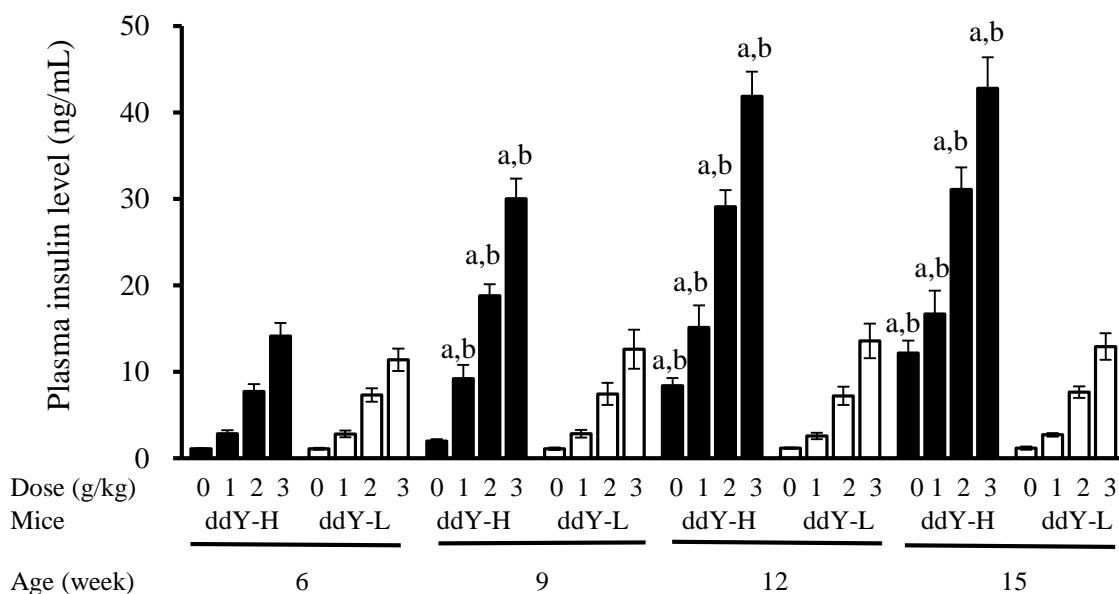


Fig. 2-2 Dose-dependent increases in plasma insulin levels induced by oral glucose administration.

Glucose (1, 2, 3 g/kg) or water (0 mg/kg) were orally administered to ddY-H mice (closed column) and ddY-L mice (open column) after 4 hr fasting (9:00–13:00). Blood was taken by decapitation after 15 min for insulin measurement. Each column and bar represents the mean \pm SE of 8 mice. Significantly different from ddY-H mice at 6-weeks of age (^a: $p < 0.01$) and ddY-L mice at the corresponding age (^b: $p < 0.01$) in the respective dose of glucose.

2-3-2 Sitagliptin の血糖値および血漿 insulin 値に及ぼす影響

2-3-1 で ddY-H マウスにおいて、glucose 経口投与後の血漿 insulin 値が高値となったので、glucose が腸管から吸収される際に分泌される incretin が血漿 insulin 値の上昇に関与していることが考えられた。そこで、incretin の分解を抑制する dipeptidyl-peptidase-4 (DPP-4) 阻害薬 sitagliptin を経口投与し、glucose 投与に対する耐糖能および血漿 insulin 値の上昇を測定した。

Fig. 2-3 は、sitagliptin を投与した 60 分後に glucose 3 g/kg を経口投与し、血糖値の時間経過から算出した AUC を示している。各週齢の ddY-L マウスでは sitagliptin の単独投与による有意な AUC の減少すなわち耐糖能の上昇が認められたが、その効果は小さく、週齢による差はなかった。ddY-H マウスでも sitagliptin の単独投与による有意な AUC の減少が各週齢で認められた。6 週齢および 9 週齢では、その減少は ddY-L マウスと比較して同程度であった。一方、12 週齢および 15 週齢では 6 週齢の ddY-H マウスおよび各週齢の ddY-L マウスと比較して減少の程度が大きい傾向が認められた。

したがって、ddY-H マウスでは DPP-4 阻害薬である sitagliptin の投与によって耐糖能の上昇がみられたが、ddY-L マウスと比較して著明な上昇ではなかった。

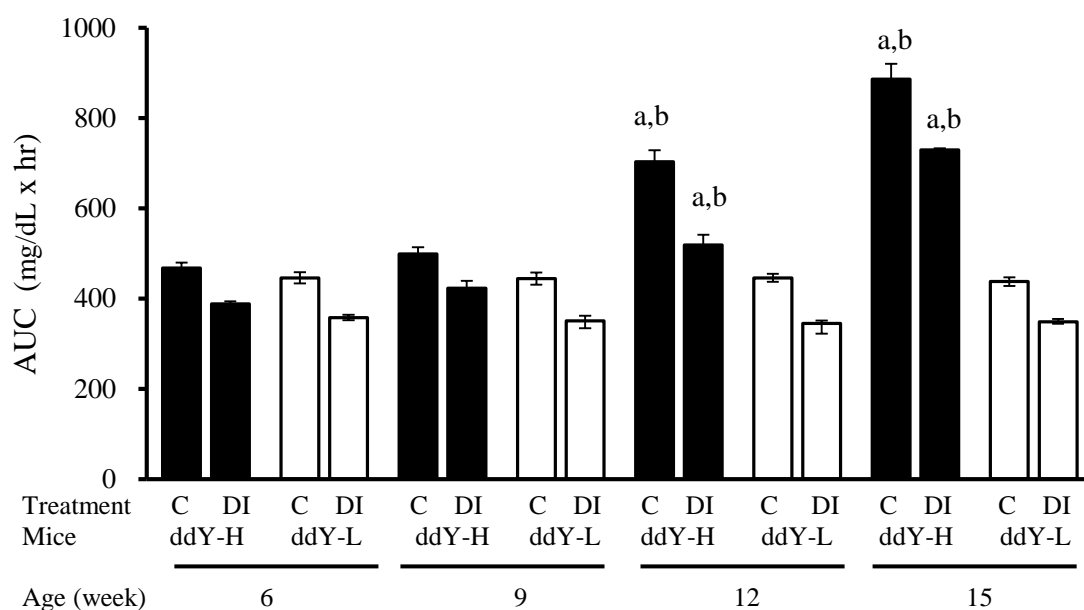


Fig. 2-3 Sitagliptin-induced decrease in AUC in oral glucose tolerance test.

Sitagliptin (25 mg/kg) (DI) or vehicle (C) was orally administered to ddY-H mice (closed column) and ddY-L mice (open column) at 6-, 9-, 12- and 15-weeks of age after 4 hr fasting (9:00 – 13:00). One hour later, glucose (3 g/kg) was orally administered to mice and blood was taken from caudal vein after 0, 30, 60 and 120 min. Serum glucose was measured, and AUC in serum glucose concentration-time curve was calculated. Each column and bar represents the mean \pm SE of 12 mice. Significantly different from ddY-H mice at 6-weeks of age (^a: $p < 0.01$) and from ddY-L mice at the same age (^b: $p < 0.01$).

次に、血漿 insulin 値に及ぼす sitagliptin 投与の影響を検討する目的で、sitagliptin (25 mg/kg) を経口投与し 60 分後の血漿 insulin 値を測定した。各週齢の ddY-H マウスおよび ddY-L マウスにおいて sitagliptin の投与の影響は認められなかった (Fig. 2-4A)。これらのマウスに glucose (3 g/kg) を投与したところ、全ての週齢の ddY-H マウスおよび ddY-L マウスにおいて glucose 投与による血漿 insulin 値の上昇が有意に増強された (Fig. 2-4B)。ddY-L マウスにおいて、sitagliptin による増強の程度に週齢による差はなかった。また、6 週齢の ddY-H マウスでは ddY-L マウスと比較して差がなかったが、9 週齢では大きい傾向がみられ、12 週齢以降で血漿 insulin 値はさらに上昇した (Fig. 2-4B)。

この結果から、ddY-H マウスでは 9 週齢から臍からの insulin 分泌が亢進され、12 週齢および 15 週齢では incretin による insulin 分泌亢進が増強されることが示唆された。また、Fig. 2-3 に示したように sitagliptin の投与による耐糖能の上昇はわずかであったことから、特に 12 週齢以降では、血漿 insulin 値の上昇が insulin 抵抗性に対して十分な代償性効果を示していないことが示唆された。

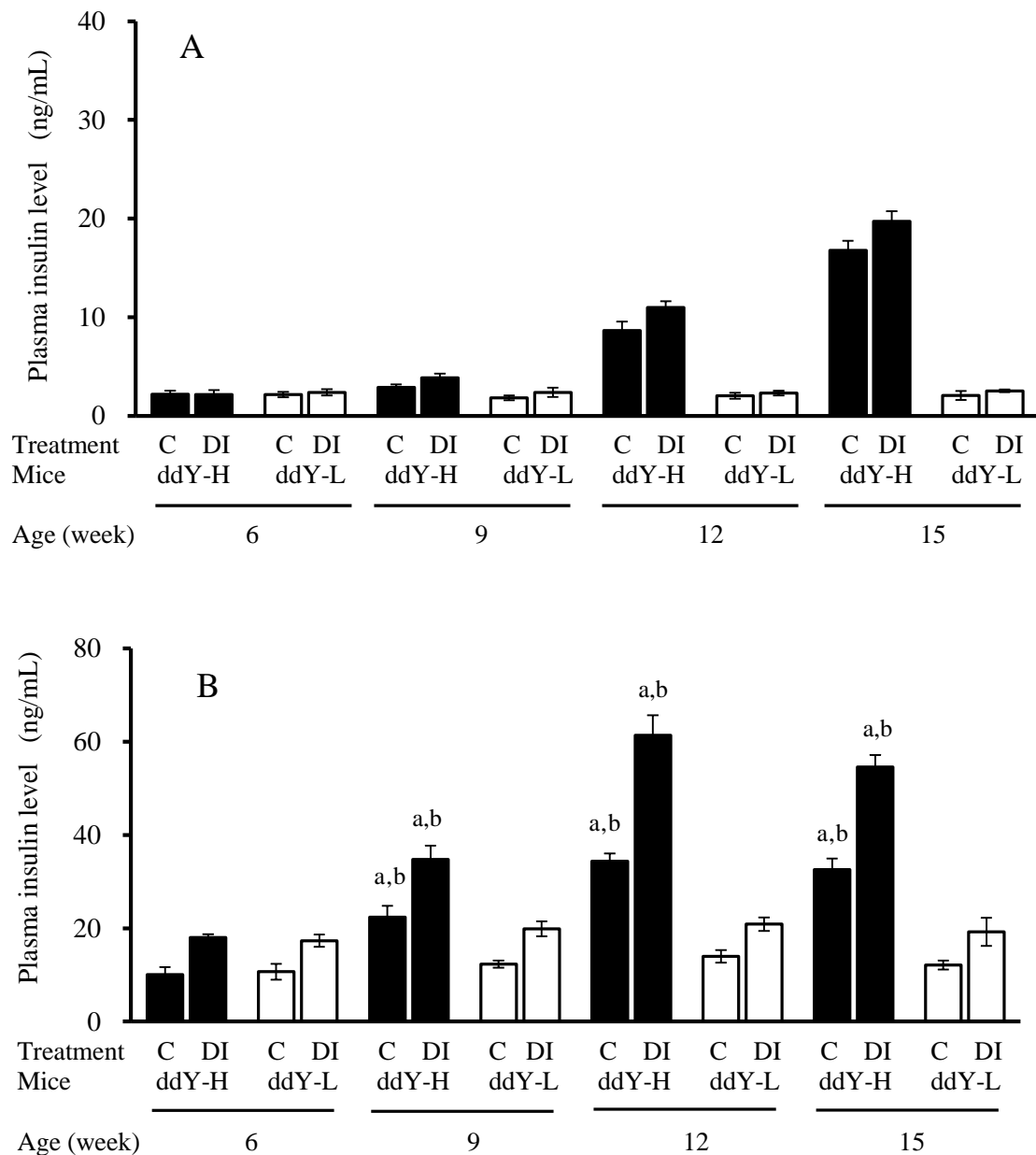


Fig.2-4 Sitagliptin-induced increase in plasma insulin level.

A: Sitagliptin (25 mg/kg) (DI) or vehicle (C) was orally administered to ddY-H mice (closed column) and ddY-L mice (open column) at 6-, 9-, 12- and 15-weeks of age after 4 hr fasting (9:00 – 13:00). One hour later, blood was taken by decapitation for insulin measurement. B: Glucose (3 g/kg) was orally administered to mice at 60 min after the treatment with sitagliptin (DI) or vehicle (C) and, after 15 min, blood was taken by decapitation for insulin measurement. Each column and bar represents the mean \pm SE of 7 mice. Significantly different from ddY-H mice at 6-weeks of age (^a: $p < 0.01$), and from ddY-L mice at the same age (^b: $p < 0.01$).

2-3-3 Glucose 投与による血漿中の GLP-1 値と GIP 値の上昇

ddY-H マウスで sitagliptin による血漿 insulin 値の上昇の増強がみられたので、血漿 incretin 値を測定した。Glucose (3 g/kg) を経口投与し、15 分後および 30 分後にマウスの血漿 GLP-1 値と血漿 GIP 値を測定した。

血漿 GLP-1 値は、ddY-L マウスおよび ddY-H マウスのいずれにおいても glucose 投与 15 分後に上昇し、30 分後には投与前のレベルまで低下した (Fig. 2-5)。ddY-L マウスでは、血漿 GLP-1 値は週齢による差は認められなかった。ddY-H マウスでは、ddY-L マウスと比較して 6 週齢で差はなかったが、9 週齢以降で glucose 投与 15 分後に 24% の有意な上昇が認められた (Fig. 2-5)。

血漿 GIP 値は、ddY-L マウスおよび ddY-H マウスのいずれにおいても glucose 投与 15 分後および 30 分後に高値であった (Fig. 2-6)。この血漿 GIP 値の上昇は、各週齢の ddY-L マウスと ddY-H マウスで差はなかった (Fig. 2-5)。

以上、ddY-H マウスでは同週齢の ddY-L マウスと比べ血漿 GLP-1 値の上昇が認められたが、わずかな上昇で、血漿 GIP 値の上昇は認められなかった。このことから ddY-H マウスにおける glucose による血漿中 insulin 値の上昇の亢進に incretin の関与は考えにくいことが示唆された。

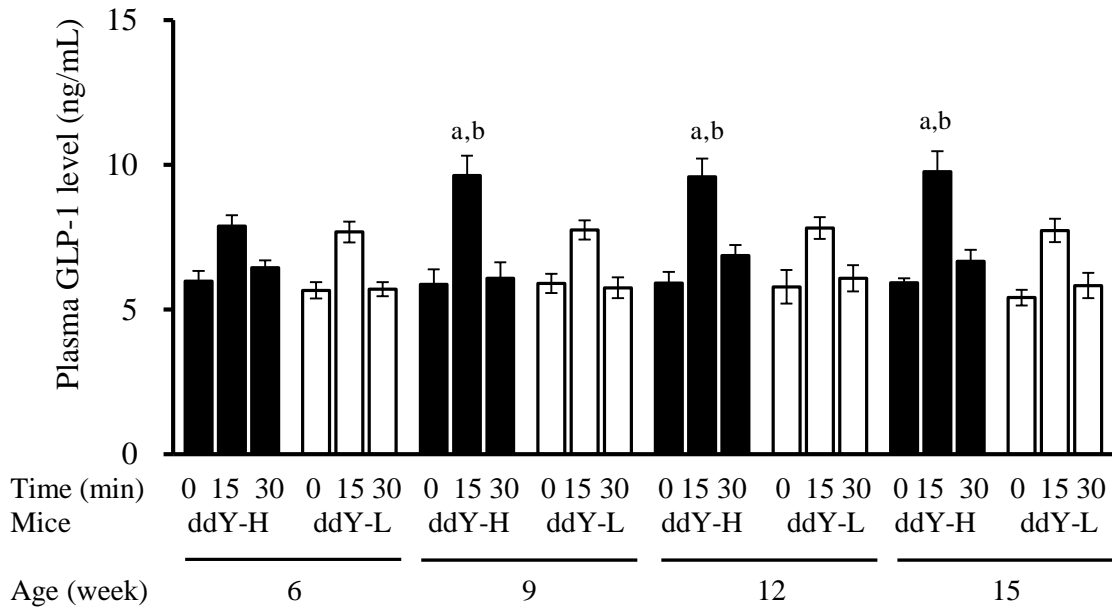


Fig.2-5 Glucose-induced increase in plasma GLP-1 level.

Glucose (3 g/kg) were orally administered to ddY-H mice (closed column) and ddY-L mice (open column) at 6-, 9-, 12-, and 15-weeks of age after 4 hr fasting (9:00 – 13:00). Blood was taken by decapitation after 0, 15, and 30 min for GLP-1 measurement. Each column and bar represents the mean \pm SE of 7 mice. Significantly different from the corresponding time points in ddY-H mice at of 6-weeks of age (^a: $p < 0.05$) and in ddY-L mice at the same age (^b: $p < 0.05$)

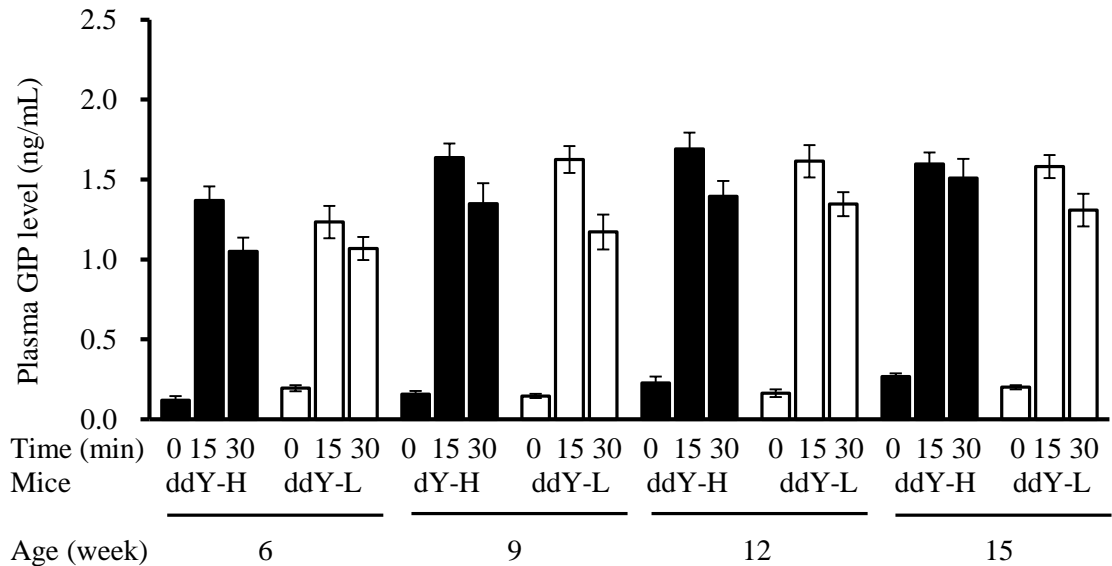


Fig.2-6 Glucose-induced increase in plasma GIP levels.

Glucose (3 g/kg) were orally administered to ddY-H mice (closed column) and ddY-L mice (open column) at 6, 9, 12 and 15 weeks of age after 4 hr fasting (9:00 – 13:00). Blood was taken by decapitation after 0, 15, and 30 min for GIP measurement. Each column and bar represents the mean \pm SE of 7 mice.

2-3-4 Nateglinide 投与による血漿 insulin 値の上昇

2-3-3 に示したように、ddY-H マウスの血漿 insulin 値の上昇に incretin の関与は大きくないと思われたので、膵に直接作用し insulin の分泌を促進することが知られている nateglinide (30 mg/kg) をマウスに投与し、血漿中 insulin 値を 15 分後および 30 分後に測定した。

ddY-L マウスでは、各週齢で nateglinide による血漿中 insulin 濃度の上昇が認められたが、週齢による上昇の差はなかった (Fig. 2-7)。6 週齢の ddY-H マウスでは、ddY-L マウスと差はなかったが、9 週齢および 12 週齢で nateglinide 投与による血漿 insulin 値の上昇が増加した (Fig. 2-7)。

ddY-H マウスでは、nateglinide による血漿中 insulin 値の上昇作用は 9 週齢以降で亢進することが認められたが、1-3-5 で示したように、nateglinide による血糖値の低下作用は、9 週齢以降で低下していた。このことから、ddY-H マウスでは insulin 抵抗性が 9 週齢から生じ、その代償性効果により insulin 分泌が亢進することが示唆された。

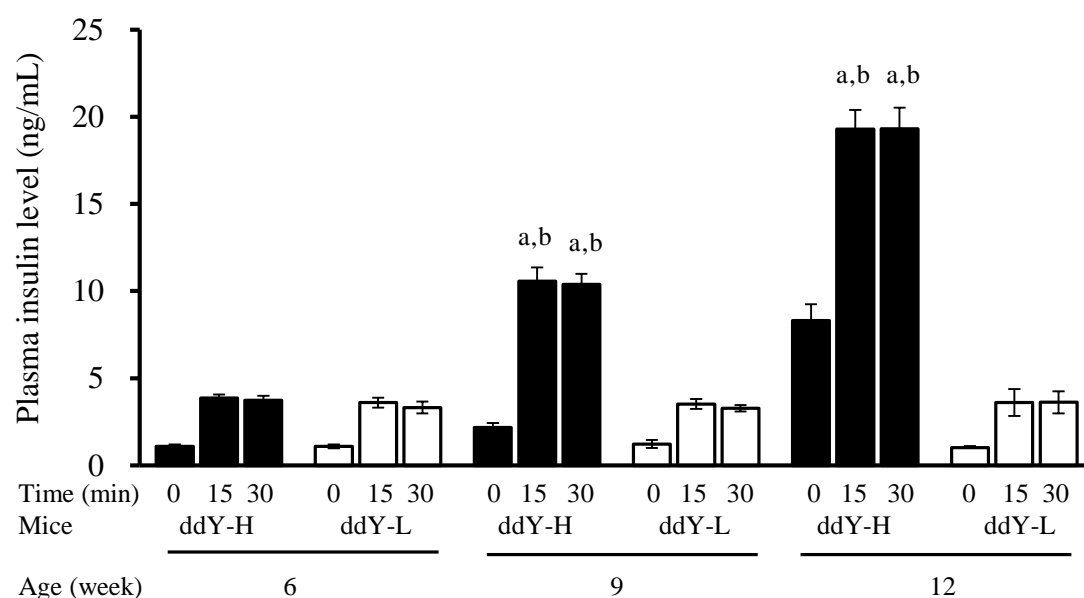


Fig. 2-7 Nateglinide-induced increase in plasma insulin levels

Nateglinide (30 mg/kg) was orally administered after 4 hr fasting (9:00 – 13:00) and blood was taken by decapitation after 0, 15 and 30 min for insulin measurement. Each column and bar represents the mean \pm SE for 7 mice. Significantly different from the corresponding time points in ddY-H mice at 6-weeks of age (^a: $p < 0.01$) and ddY-L mice at the respective age (^b: $p < 0.01$).

2-4 考察

第1章で、雄性 ddY-H マウスでは9週齢から insulin 抵抗性が発現し、12週齢、15週齢と加齢によりさらに insulin 抵抗性が増強されることを示した。血糖値の調節には血漿中 insulin 濃度が深く関わっている。そこで、第2章では様々な条件下における血漿 insulin 値を測定し、雄性 ddY-H マウスの insulin 抵抗性発現との関連性について検討した。

前田らは12時間絶食した ddY-H マウスの血漿 insulin 値は15週齢から上昇したが、絶食再摂餌後の血漿 insulin 値は9週齢から上昇したと報告している⁴⁴⁾。本研究では、直前の摂食の影響を避けて定常状態の血漿 insulin 値を測定するために4時間の絶食を行った。4時間絶食後の血漿 insulin 値は9週齢までは ddY-L マウスと ddY-H マウスで差はなかったが、12週齢以降で有意に上昇した。一方、glucose (1~3 g/kg) の経口投与により ddY-L マウスと ddY-H マウスのいずれでも血漿 insulin 値が投与量依存的に上昇した。しかし、ddY-L マウスではいずれの週齢でも血漿 insulin 値の上昇は同程度であったが、ddY-H マウスでは9週齢からその上昇は有意に大きくなり、12週齢以降ではさらに増強された。また、12週齢と15週齢では、高い血漿 insulin 値がより長く持続していた。第1章で示したように、9週齢の ddY-H マウスでは insulin 抵抗性が低下していたが、経口投与した glucose に対する耐糖能の低下はみられなかった。これは、glucose に反応して分泌される insulin 量が代償的に増加し、血糖値の上昇が抑制され、見かけ上の耐糖能の低下がマスクされたためと考えられる。さらに、12週齢から15週齢になると、insulin 抵抗性がさらに進行し、insulin の分泌亢進によっても血糖値の上昇が十分に抑制されず、耐糖能の低下が顕在化すると考えられる。

食事あるいは glucose の摂取に伴い消化管から incretin が分泌され、膵 β 細胞に作用して insulin 分泌を促進することが知られている。^{55, 56)} 代表的な incretin である GLP-1 と GIP は、摂取した食事由来の栄養素が腸管に作用して、それぞれ下部小腸の L 細胞と十二指腸の K 細胞から血液中に分泌される。しかし、分泌された GLP-1 と GIP はタンパク分解酵素である DPP-4 により数分以内に不活性化される。DPP-4 により不活性化された GLP-1 と GIP は膵 β 細胞に対して insulin 分泌促進作用を有さないため、DPP-4 の阻害薬が開発され臨床現場でも糖尿病の治療に頻用されている。9週齢の ddY-H マウスで経口投与と腹腔内投与、静脈内投与した glucose に対する耐糖能に違いがみられた原因として、incretin の影響があると考えられた。そこで、incretin の影響を検討する目的で、DPP-4 阻害薬である sitagliptin を経口投与したマウスに glucose を経口投与し、血糖値と血漿 insulin 値の変動に及ぼす影響を検討した。Sitagliptin は本邦で初めて発売された DPP-4 阻害薬であり、作用時間も長く1日1回投与が可能な薬剤として使用されている。⁶⁴⁾ Sitagliptin の単独投与では ddY-L マウスと ddY-H マウスのいずれにおいても血漿インスリン値に対する影響は認められなかった。しかし、sitagliptin は glucose の経口投与による血漿インスリン値の上昇を ddY-L マウスと ddY-H マウスのいずれにおいても増強した。ddY-L マウスではその増強の週齢による差はなかったが、ddY-H マウスでは9週齢から増強が大きくなる傾向がみられ、12週齢および15週齢ではさらに大きくなった。この結果から、ddY-H マウスでは ddY-L

マウスと比較して経口投与した glucose による incretin 分泌が亢進され、血漿 insulin 値が上昇した可能性が考えられた。しかし、ddY-H マウスでは、9 週齢以降で血漿 GLP-1 値のわずかな上昇がみられたが、血漿 GIP 値は有意な差がなかった。Sitagliptin の経口投与により ddY-L マウス、ddY-H マウスともに有意な耐糖能の上昇がみられたが、ddY-H マウスの耐糖能の上昇は ddY-L マウスと比べ著明な上昇ではなかったことと考え合わせると、ddY-H マウスにおける glucose による血漿 insulin 値の上昇の亢進に incretin は大きな影響を与えていないと考えられる。

Glucose による血漿 insulin 値の上昇が増強される原因として、膵からの insulin 分泌亢進が考えられる。膵 β 細胞からの insulin 分泌は、 β 細胞における glucose の代謝が関連した情報伝達系により促進される。 β 細胞内に取り込まれた glucose は代謝され、ATP の産生、ATP 感受性 K^+ チャンネルの閉口、細胞膜の脱分極、電位依存性 L 型 Ca^{2+} チャンネルの開口、細胞外からの Ca^{2+} 流入による細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇を介して insulin が分泌される。⁶⁰⁾ ddY-H マウスでは 1~3 g/kg の glucose の経口投与により、血漿 insulin 値は投与量依存的に上昇し、その上昇は 9 週齢から有意に大きくなり、12 週齢以降ではさらに増強された。このことから、ddY-H マウスでは glucose 代謝による insulin 分泌の亢進が 9 週齢から生じているという仮説が想定された。Nateglinide は膵 β 細胞の sulfonylurea 受容体に直接結合し ATP 感受性 K^+ チャンネルを閉口するため、 β 細胞への glucose の取り込みや代謝を介さないで insulin を分泌させる。⁶²⁾ この仮説を証明するために、膵 β 細胞への glucose の取り込みや代謝の障害を除外する目的で nateglinide を経口投与し血漿 insulin 値を測定した。第 1 章で示したように、ddY-H マウスでは 9 週齢以降で nateglinide の血糖降下作用が減弱していたが、血漿 insulin 値は 9 週齢で ddY-L マウスと比べ上昇し、12 週齢ではさらに上昇した。このことから、ddY-H マウスの insulin 抵抗性と刺激による insulin 分泌の増加は 9 週齢から始まっていることが強く示唆された。Nateglinide は glucose の代謝に関係なく β 細胞の ATP 感受性 K^+ チャンネルに作用し、insulin 分泌を促進することから、ddY-H マウスでは ATP 感受性 K^+ チャンネルよりも下流の刺激伝導系が刺激に対し過剰に反応すると考えられる。Interleukin-6 (IL-6) は phospholipase C inositol trisphosphate 依存性インスリン伝導系を促進し glucose の刺激による insulin 分泌を増加させることが知られている。⁶⁵⁾ ddY-H マウスの insulin 分泌の亢進の原因解明には、insulin 分泌に関わる情報伝達系のさらなる研究が必要である。

2 型糖尿病は末梢での insulin 作用の低下、すなわち insulin 抵抗性が原因である。その発症初期や発病前は代償性に insulin が過剰分泌されているが、その代償性 insulin 分泌の破綻により糖尿病を発症すると考えられている。⁵⁹⁾ 本章の結果より、雄性 ddY-H マウスは 9 週齢で刺激による insulin 分泌が増加することで insulin 抵抗性がマスクされ、12 週齢以降では摂餌による insulin 分泌がさらに亢進していることが示唆された。また、その原因の一つとして β 細胞における insulin 分泌の刺激伝達系の ATP 感受性 K^+ チャンネルよりも下流で刺激に対する反応性が亢進していることが示唆された。

第3章 雄性 ddY-H マウスにおける insulin シグナル伝達の変動

3-1 序論

第1章および第2章において雄性 ddY-H マウスでは glucose 投与による血漿 insulin 値の上昇が増強されているが、insulin 抵抗性が発現し、血糖値が上昇することを示した。Insulin 抵抗性は、末梢組織における insulin の細胞内情報伝達系の障害により生じることが知られている。そこで、本章では insulin 抵抗性発現機構の解明を目的として、insulin 感受性組織である肝および副睾丸脂肪組織において、insulin の情報伝達に重要な役割を果たしている insulin 受容体 (InsR)、insulin 受容体基質-1 (IRS-1) および insulin 受容体基質-2 (IRS-2) の mRNA とタンパク質発現について解析した。

3-2 実験材料と実験方法

3-2-1 実験動物と飼育条件

第1章の 1-2-1 に準じた。

3-2-2 試薬および薬剤

ISOGEN[®]、3M sodium acetate はニッポンジーンから購入した。DEPC (diethyl pyrocarbonate) は Sigma-Aldrich から購入した。Chloroform、isopropyl alcohol、ethanol は和光純薬の特級試薬を購入した。

3-2-3 肝の総 ribonucleic acid (RNA) の抽出

4 時間 (9:00~13:00) 絶食させたマウスを断頭後、肝を摘出し、液体窒素で凍結した。凍結した肝 100 mg から ISOGEN[®]を用いマニュアルにしたがって総 RNA の抽出・精製を行った。肝 100 mg を 1 mL の ISOGEN[®]でホモジナイズし、4℃、5,000 rpm で 15 分間遠心分離した。上清を chloroform 200 μL と攪拌・混和した後、4℃、13,000 rpm で 15 分間遠心分離した。上清を chloroform 600 μL と攪拌・混和した後、同様に遠心分離した。その上清を isopropyl alcohol 500 μL と攪拌・混和した後、4℃、13,000 rpm で 10 分間遠心した。沈殿に氷冷 75% ethanol 500 μL を加え、ペッスルで混和した後、4℃、13,000 rpm で 5 分間遠心した。沈殿を風乾した後、0.1%DEPC 水 200 μL に溶解した。その溶液に 3M sodium acetate 20 μL と 100% ethanol 550 μL を加え、混和した後 -30℃で一晩 ethanol 沈殿を行った。4℃、13,000 rpm で 5 分間遠心した後、沈殿を氷冷 75% ethanol 500 μL で 2 回洗浄した。沈殿を風乾した後、0.1%DEPC 水を加えて溶解し、260 nm 及び 280 nm の吸光度を測定して RNA 量を算出した。吸光度の測定は、Spectrophotometer UV-2100 (Shimadzu) で行った。

3-2-4 副睾丸脂肪組織の総 RNA の抽出

4 時間 (9:00~13:00) 絶食させたマウスを断頭後、副睾丸脂肪組織を摘出し、液体窒素で凍結した。凍結した副睾丸脂肪組織から RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (QIAGEN)

を用いマニュアルに従っての総 RNA の抽出を行った。副睾丸脂肪組織 200 mg を 1.5 mL の QIAzol Lysis Reagent でホモジナイズした後、ホモジネートに chloroform 300 μ L を添加し、攪拌した。2~3 分間放置後、4 $^{\circ}$ C、12,000 rpm で 15 分間遠心分離し、上清の水層を 70% ethanol 500 μ L と混和した。混和液を RNeasy mini Spin Column に添加し、15~25 $^{\circ}$ C、9,700 rpm で 15 秒間遠心した。カラムを Buffer RW1 700 μ L で 1 回、ついで Buffer RPE 500 μ L で 2 回洗浄した後、15~25 $^{\circ}$ C、13,000 rpm で 1 分間遠心分離し、カラムを乾燥させた。次に、カラムに RNase free water 50 μ L を添加し、15~25 $^{\circ}$ C、9,700 rpm で 15 秒間遠心した。溶出液を再度 RNeasy mini Spin Column に添加し、15~25 $^{\circ}$ C、9,700 rpm で 15 秒間遠心した。この溶液の一部を用い、260 nm および 280 nm の吸光度を Spectrophotometer UV-2100 (Shimadzu) で測定し、RNA 量を算出した。

3-2-5 リアルタイム PCR 法

RT-PCR による総 RNA からの complementary deoxyribonucleic acid (cDNA) の作製は、RNA PCR kit (AMV) Ver.3.0 (TaKaRa) を用いてマニュアルに従って行った。3-2-3 および 3-2-4 で抽出した総 RNA 0.5 μ g を用い、表 3-1 の反応系で、30 $^{\circ}$ C 10 分、55 $^{\circ}$ C 20 分、95 $^{\circ}$ C 1 分、5 $^{\circ}$ C 5 分、1 サイクルの逆転写反応を行った。機器は iCyclerTM Thermal cycler (BIO-RAD) を使用した。

リアルタイム PCR は、表 3-2 に示した反応系でプライマーと SYBR Premix Ex Taq GC (TaKaRa) を用い、マニュアルに従って Applied BiosystemTM 7500 Real-Time PCR System (Life Technologies) で行った。プライマーは、表 3-3 に示したものを Life Technologies から購入して使用した。PCR 条件は、95 $^{\circ}$ C 30 秒、60 $^{\circ}$ C 15 秒の 1 サイクルの反応後、95 $^{\circ}$ C 15 秒、60 $^{\circ}$ C 1 分を 40 サイクルとした。²⁷⁾ Ct 値から InsR、IRS-1、IRS-2 の相対発現量を算出し、 β -actin の発現量で補正した後、9 週齢の ddY-L マウスを基準として比較した。

表 3-1 逆転写反応系

試薬 (濃度)	使用量 (μL)
MgCl ₂ (25 mM)	2
10x RT buffer (100 mM Tris-HCl (pH 8.3) , 500 mM KCl)	1
RNase free dH ₂ O	3.75
dNTP mixture (10 mM)	1
RNase inhibitor (40 U/μL)	0.25
AMV reverse transcriptase XL (5 U/μL)	0.5
Random 9 mers (50 pmol/μL)	0.5
Experimental sample	1

Random 9 mers: dp (5'-NNNNNNNNN-3')

表 3-2 リアルタイム PCR 反応系

試薬 (濃度)	使用量 (μL)
SYBR [®] Premix Ex Taq GC (2x)	10
PCR forward primer (20 μM)	0.4
PCR reverse primer (20 μM)	0.4
dH ₂ O	7.2
cDNA	2

表 3-3 プライマー

cDNA		塩基配列	参考文献
β-actin	Forward	5'-TGG AAT CCT GTG GCA TCC ATG AAAC-3'	66
	Reverse	5'-TAA AAC GCA GCT CAG TAA CAG TCCG-3'	
InsR	Forward	5'-GTA TGG TGT ATG AAG GCA ATG-3'	67
	Reverse	5'-CAG AGA ACG GAG GTG ACT-3'	
IRS-1	Forward	5'-TGA TGT CAC CCA GTG GTA GTT GCT-3'	67
	Reverse	5'-TGG CAT GAG GAA GGG CAT GAG TAT-3'	
IRS-2	Forward	5'-AAA GTG GCC TAC AAC CCT TAC CCA-3'	67
	Reverse	5'-TCA TCG CTC TTG CAG CTA TTG GGA-3'	

3-2-6 副睪丸脂肪組織の InsR、IRS-1 および IRS-2 のタンパク質量の測定

4 時間 (9:00~13:00) 絶食させたマウスを断頭後、副睪丸脂肪組織を摘出し、氷冷した phosphate buffer saline (PBS: 10 mM, pH7.2) で洗浄した。0.2g を氷冷下で 5 mL の PBS でホモジナイズした後、超音波装置 US-50 (日本精機製作所) で 15 秒間 2 回超音波処理した。ホモジネートを 5,000 g で 5 分間遠心分離し、上清を InsR、IRS-1、IRS-2 の測定に用いた。InsR、IRS-1 および IRS-2 の測定は、それぞれ Enzyme-linked Immunosorbent Assay Kit For Insulin Receptor (ISR) (Cloud-Clone Corp.)、Mouse Insulin Receptor substrate 1 (IRS1) Elisa kit (MyBioSource com)、Mouse Insulin Receptor substrate 2 (IRS2) Elisa kit (MyBioSource com) を用い、マニュアルに従って行った。ホモジネート中のタンパク質量を Pierce Coomassie (Bradford) Protein Assay Kit (Thermo Scientific) を用いて測定し、InsR、IRS-1 および IRS-2 の濃度をタンパク質 1 mg あたりの値として示した。

3-2-7 統計処理

第 1 章 1-2-11 に準じた。

3-3 実験結果

3-3-1 肝における InsR、IRS-1 および IRS-2 の messenger RNA (mRNA) の発現

6~20 週齢のマウスの肝における InsR、IRS-1 および IRS-2 の mRNA の発現量を Fig. 3-1 に示す。

肝の InsR の mRNA 発現量は、ddY-L マウスおよび ddY-H マウスのいずれでも週齢による有意な差はみられず、各週齢の ddY-L マウスと ddY-H マウスを比較しても差がなかった (Fig.3-1A)。

肝の IRS-1 の mRNA 発現量は、ddY-L マウスの 15 週齢と 20 週齢で増加する傾向がみられたが、すべての週齢で有意な差はなかった。ddY-H マウスでも週齢による有意な差はみられず、各週齢で ddY-L マウスと比較しても差がなかった (Fig.3-1B)。

肝の IRS-2 の mRNA の発現量は、ddY-L マウスでは週齢による違いはなかったが、ddY-H マウスでは、6 週齢と比較して 9 週齢以降で有意に発現量が低下した。同週齢の ddY-L マウスと比較して 6 週齢では差がなかったが、9 週齢では 29%低下し、12 週齢、15 週齢、20 週齢ではそれぞれ 34%、53%、53%の著明な低下が認められた (Fig.3-1C)。

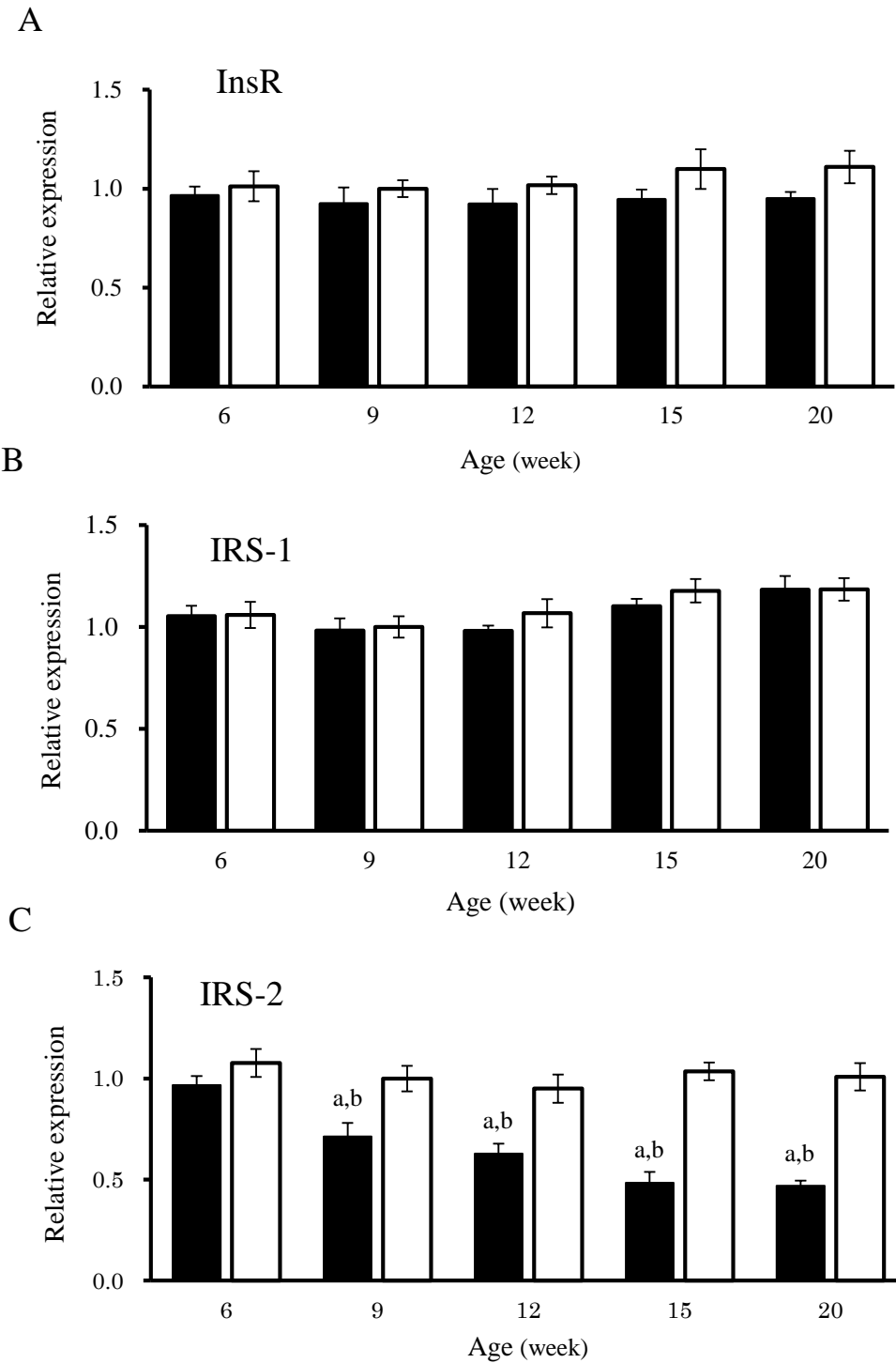


Fig.3-1 mRNA expression of InsR, IRS-1 and IRS-2 in livers of ddY-H or ddY-L mice. Total RNA was extracted from liver of mice after fasting for 4 hr (9:00-13:00) and the quantitative real-time PCR analysis of InsR (A), IRS-1 (B) and IRS-2 (C) was carried out. Each mRNA expression was normalized to β -actin and was expressed as relative ratio to that of ddY-L mice at 9-weeks of age. ddY-H: closed column, ddY-L: open column. Each column and bar represents the mean \pm S.E. for 6 mice. Significantly different from ddY-H mice at 6-weeks of age (^a : $p < 0.01$) and from ddY-L mice at the same age (^b : $p < 0.01$).

3-3-2 副睪丸脂肪組織での InsR、IRS-1 および IRS-2 の mRNA の発現

6~20 週齢のマウスの副睪丸脂肪組織における InsR、IRS-1 および IRS-2 の mRNA の発現量を Fig. 3-2 に示す。

脂肪組織の InsR の mRNA 発現量は、ddY-L マウスでは週齢による有意な差はなかったが、ddY-H マウスでは、6 週齢と比較して 9 週齢でわずかな発現量の低下がみられ、12 週齢以降では著明に低下した。同週齢の ddY-L マウスと比較して 6 週齢では差がなかったが、9 週齢、12 週齢、15 週齢、20 週齢ではそれぞれ 19%、60%、57%、61%の低下が認められた (Fig.3-2A)。

脂肪組織の IRS-1 の mRNA 発現量は、ddY-L マウスでは週齢による有意な差はなかった。ddY-H マウスでは、同週齢の ddY-L マウスと比較して 6 週齢では差がなかったが、9 週齢、12 週齢、15 週齢、20 週齢ではそれぞれ 24%、64%、70%、70%低下した (Fig.3-2B)。

脂肪組織の IRS-2 の mRNA の発現量は、ddY-L マウスでは週齢による違いはなかったが、ddY-H マウスでは 6 週齢と比較して 9 週齢以降で有意な発現量の低下がみられた。同週齢の ddY-L マウスと比較して 6 週齢では差がなかったが、9 週齢、12 週齢、15 週齢、20 週齢ではそれぞれ 24%、60%、62%、68%低下した (Fig.3-3C)。

ddY-H マウスの副睪丸脂肪組織では、InsR、IRS-1 および IRS-2 の mRNA の発現量が 9 週齢から徐々に低下し、12 週齢以降で著明な低下を示すことが明らかとなった。

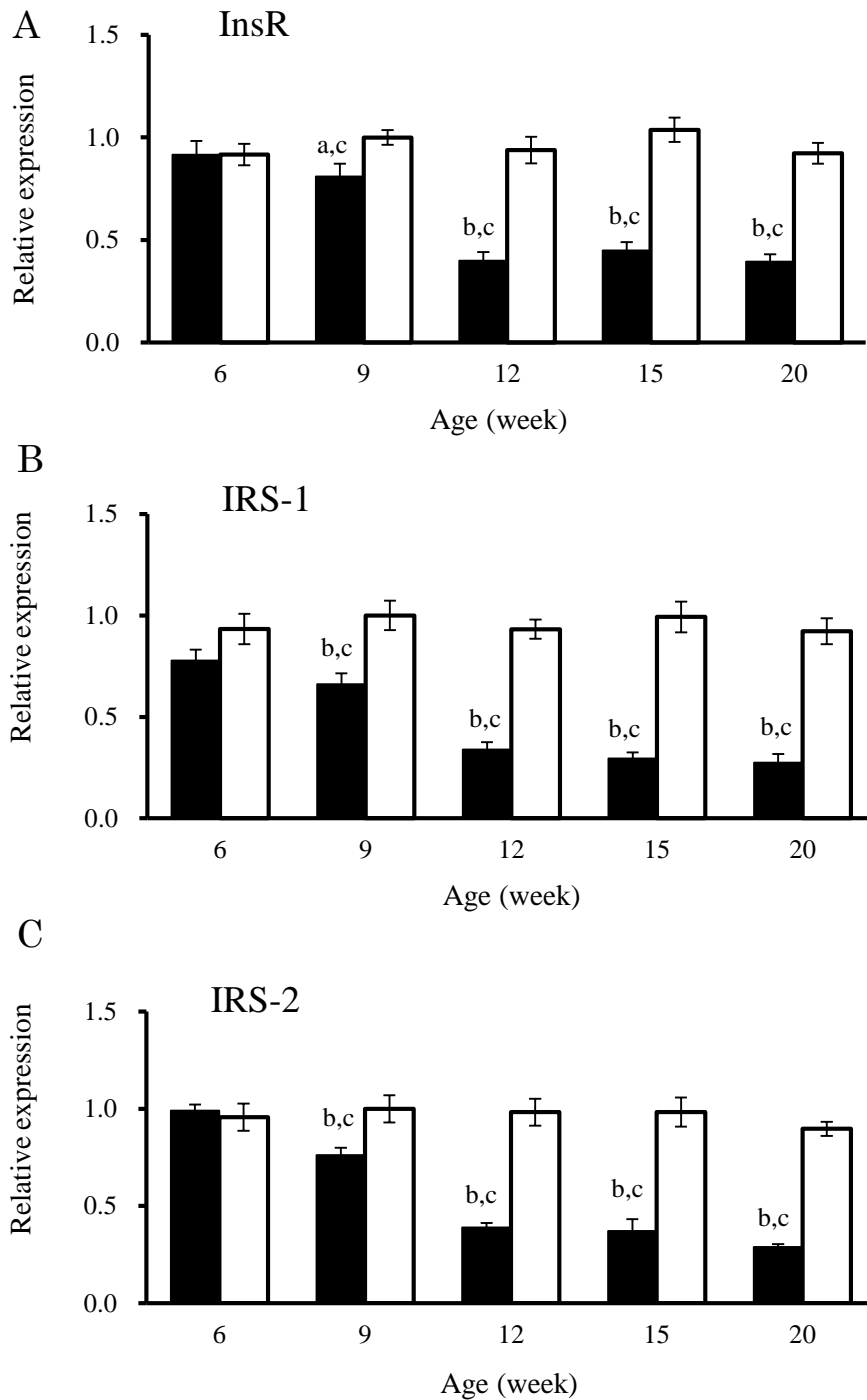


Fig. 3-2 mRNA expression of InsR, IRS-1 and IRS-2 in epididymal adipose tissues of ddY-H or ddY-L mice.

Total mRNA was extracted from epididymal adipose tissue of mice after fasting for 4 hr (9:00-13:00) and the quantitative real-time PCR analysis of InsR (A), IRS-1 (B) and IRS-2 (C) was carried out. Each mRNA expression was normalized to β -actin and was expressed as relative ratio to that of ddY-L mice at 9-weeks of age. ddY-H: closed column, ddY-L: open column. Each column and bar represents the mean \pm S.E. for 6 mice. Significantly different from ddY-H mice at 6-weeks of age (^a: $p < 0.05$, ^b: $p < 0.01$) and from ddY-L mice at the same age (^c: $p < 0.01$).

3-3-3 副睪丸脂肪組織の InsR、IRS-1 および IRS-2 のタンパク質発現量

3-3-2 で示したように、ddY-H マウスの副睪丸脂肪組織では、9 週齢以降で InsR、IRS-1 および IRS-2 の mRNA 発現が低下したため、6~20 週齢のマウスの副睪丸脂肪組織における InsR、IRS-1 および IRS-2 のタンパク質を ELISA により測定し、それぞれの発現量を総タンパク質 1 mg あたりの値として算出した。

ddY-L マウスでは、週齢による単位タンパク質あたりの InsR タンパク質量に有意な変化はみられなかった (Fig.3-3A)。ddY-H マウスでは、InsR タンパク質量は 6 週齢と 9 週齢では差がなかったが、12 週齢から低下し始めた。また、同週齢の ddY-L マウスと比較して 12 週齢、15 週齢、20 週齢ではそれぞれ 27%、48%、52%の低下が認められた (Fig.3-3A)。

ddY-L マウスの単位タンパク質あたりの IRS-1 タンパク質量は、週齢による有意な差は見られなかった (Fig.3-3B)。ddY-H マウスでは、6 週齢と比較して 9 週齢から低下した。ddY-L マウスと比較して 9 週齢、12 週齢、15 週齢、20 週齢ではそれぞれ 30%、37%、42%、60%の著明な低下が認められた (Fig.3-3B)。

ddY-L マウスの単位タンパク質あたりの IRS-2 タンパク質量では、週齢による違いは見られなかった (Fig.3-3C)。ddY-H マウスでは、6 週齢と比較して 9 週齢から低下した。同週齢の ddY-L マウスと比較して 9 週齢では 15%低下し、12 週齢、15 週齢、20 週齢ではそれぞれ 44%、49%、58%と著明な低下が認められた (Fig.3-3C)。

ddY-H マウスの副睪丸脂肪組織では、InsR、IRS-1 および IRS-2 の mRNA の発現低下とともに、それらのタンパク質発現量も 12 週齢以降で著明な低下を示すことが明らかとなった。

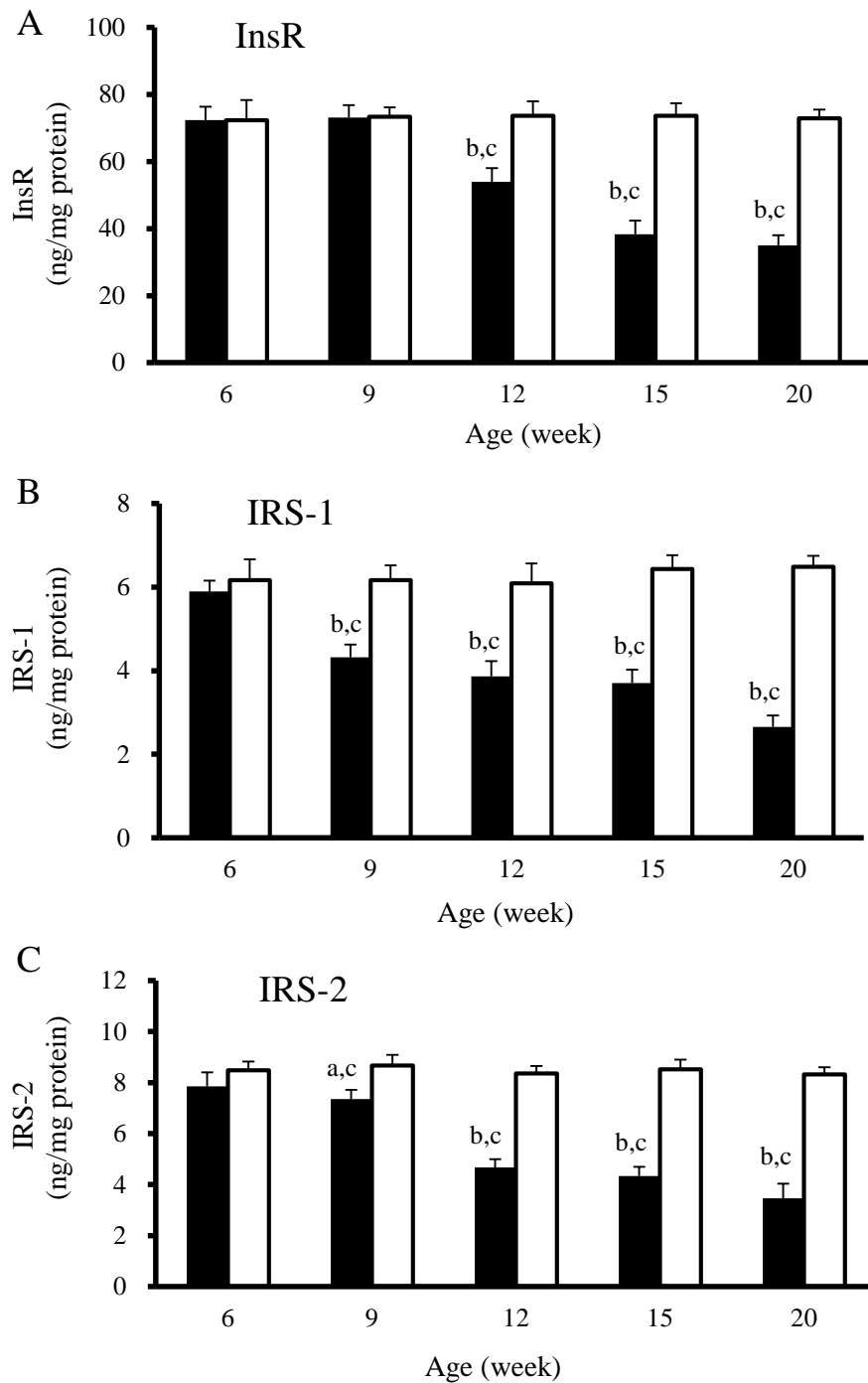


Fig. 3-3 Contents of InsR, IRS-1 and IRS-2 in adipose tissue of ddY-H or ddY-L mice. Epididymal adipose tissue of ddY-H mice (closed column) and ddY-L mice (open column) were homogenized in 10 mM PBS, and InsR (A), IRS-1 (B) and IRS-2 (C) in homogenate were assayed by ELISA. Each column and bar represents mean \pm S.E. for 6 mice. Significantly different from ddY-H mice at 6-weeks of age (^a: $p < 0.05$, ^b: $p < 0.01$) and from ddY-L mice at the same age (^c: $p < 0.01$).

3-4 考察

Insulin 抵抗性は、末梢組織における InsR や IRS-1、IRS-2 の発現量の減少など insulin の細胞内情報伝達系の障害により生じる。^{23, 24)} 多くの insulin 抵抗性状態で、IRS タンパク質の発現やチロシンリン酸化が著明に減少していることが報告されており、³⁴⁾ これらのエビデンスは、insulin の細胞内情報伝達系の初期の段階の障害が insulin 抵抗性発現と密接に関連することを示している。そこで、本章では雄性 ddY-H マウスにおける insulin 抵抗性発現と、副睾丸脂肪組織と肝の InsR、IRS-1 および IRS-2 の発現変動との関連性を検討した。

第1章および第2章で示したように雄性 ddY-L マウスでは、耐糖能および血漿 insulin 値の週齢による変動は認められず、副睾丸脂肪組織の InsR、IRS-1 および IRS-2 の mRNA 発現量の週齢による変動もなかった。一方、加齢により耐糖能の低下および血漿 insulin 値の上昇がみられた ddY-H マウスでは、脂肪組織の InsR、IRS-1 および IRS-2 の mRNA 発現量が、9 週齢から有意に減少し始め、12~20 週齢では著明に減少した。ddY-H マウスにおける脂肪組織の InsR、IRS-1 および IRS-2 の mRNA 量の週齢による減少経過は、耐糖能の週齢による低下経過と相関していた。

一方、ddY-H マウスの肝では IRS-2 の mRNA 発現量が同様な週齢による減少経過を示したが、InsR および IRS-1 の変化は認められなかった。IRS-1 と IRS-2 は、insulin の情報伝達において重要な役割を担っているが、肝特異的に IRS-1 あるいは IRS-2 のいずれかをノックアウトしたマウスでは、肝の insulin の情報伝達にほとんど影響はみられないが、再摂餌時には IRS-1 が、空腹時と摂食直後時には IRS-2 の作用が代謝調節に重要であり、時間的な役割分担があるとされている。³⁵⁾ したがって、ddY-H マウスの肝でみられた IRS-2 の mRNA の発現量低下は、これだけで insulin の情報伝達の障害の原因になるとは考えられない。一方、ddY-H マウスの脂肪組織では、InsR、IRS-1 および IRS-2 の mRNA がいずれも同様な時間経過で減少し、さらにそれぞれのタンパク質量は9週齢の InsR に減少がみられなかったことを除けば、mRNA の発現量の減少とほぼ一致していた。この脂肪組織における InsR、IRS-1 および IRS-2 の mRNA とタンパク質の量的減少の週齢による変化は、耐糖能の低下および血漿 insulin 値の上昇の週齢による経過と相関していた。特に、9 週齢では InsR、IRS-1 および IRS-2 の発現低下は小さく、insulin 分泌の亢進による代償効果で insulin の作用の低下が顕在化しないと推察される。これらの結果から、脂肪組織における InsR、IRS-1 および IRS-2 の mRNA の発現低下とタンパク質量の減少が ddY-H マウスにおける insulin 抵抗性の発現と高週齢における糖尿病様症状の誘発の一因であることが示唆された。

脂肪組織と同様に、骨格筋も insulin の重要な標的臓器の一つで insulin の作用により glucose を取り込み、糖代謝を亢進することから、骨格筋の insulin 抵抗性も高血糖の原因となる。本研究では、骨格筋の InsR、IRS-1 および IRS-2 について検討しなかったが、ddY-H マウスの骨格筋で変化が生じていることも考えられ、今後検討する必要がある。また、insulin の細胞内情報伝達には PI3-K や Akt などのタンパク質が関与している。IRS-1 欠損マウスは骨格筋、IRS-2 欠損マウスは肝臓と骨格筋ともに PI3-K 活

性が低下しており、それらの組織がインスリン抵抗性の発現の原因となる臓器として考えられている。⁶⁸⁾ 脂肪組織だけでなく骨格筋や肝におけるそれらの発現変動やリン酸化などが ddY-H マウスの **insulin** 抵抗性発現に関与している可能性も考えられ、今後さらに検討する必要がある。

第4章 ddY-H マウスの雌雄による病態発症の比較

4-1 序論

第1章および第2章において雄性 ddY-H マウスでは glucose による血漿 insulin 値が上昇するにもかかわらず耐糖能が低下することを示した。また、第3章では、雄性 ddY-H マウスの副睾丸脂肪組織において insulin 情報伝達系の InsR、IRS-1 および IRS-2 の発現が減少し、この減少が insulin 抵抗性発現の一因であることを示唆した。前田らは、雌性の ddY-H 系マウスでは、15 週齢までに insulin 抵抗性は発現しないことを報告している⁴⁴⁾。そこで、本章では、さらに高週齢の雌性 ddY-H マウスにおける耐糖能と insulin 情報伝達系との関連性を検討した。

4-2 実験材料と実験方法

4-2-1 実験動物と飼育条件

実験には静岡県立大学動物実験センターのコロニーで繁殖した雌雄の ddY-H マウスおよび ddY-L マウスを使用した。飼育環境は、第1章の 1-2-1 に準じた。

4-2-2 試薬

試薬は第1章の 1-2-2、第3章の 3-2-2 と同様に購入したものを使用した。

4-2-3 体重と脂肪組織重量の測定

マウスを4週間で離乳し、標準固形飼料（MF 飼料、オリエンタル酵母）を自由に摂餌・摂水させ、1週間に一度体重を測定した。また、一定週齢で4時間（9:00～13:00）絶食させた後、断頭し、雌性マウスから子宮周辺脂肪組織および腸管膜脂肪組織の脂肪組織を、また雄性マウスから副睾丸脂肪組織および腸管膜脂肪組織を摘出し、その重量を測定した。

4-2-4 Glucose の経口投与による耐糖能試験

雌雄の ddY-H マウスおよび ddY-L マウス（各系統 8 匹）を4時間（9:00～13:00）絶食させた後、2-2-3 と同様に glucose（3.0 g/kg）を経口投与した。Glucose 投与直前および投与 30 分後、60 分後、120 分後に尾静脈から採血し、第1章の 1-2-9 に準じて血糖値を測定した。Glucose 投与後の時間を軸に血糖値をプロットした血糖値-時間曲線から AUC を算出した。

4-2-5 Glucose を経口投与したマウスの血漿 insulin 値の測定

第2章の 2-2-3 に準じ雌雄の ddY-H マウスおよび ddY-L マウス（各 6 匹）に glucose（3 g/kg）を経口投与し、投与 15 分後に断頭により採血した。血漿 insulin 値を第1章の 1-2-10 に準じ測定した。

4-2-6 肝の総 RNA の抽出

第 3 章の 3-2-3 に準じた。

4-2-7 副睾丸脂肪組織および子宮周辺脂肪組織の総 RNA の抽出

第 3 章の 3-2-4 に準じた。

4-2-8 リアルタイム PCR 法

第 3 章の 3-2-5 に準じた。

4-2-9 副睾丸脂肪組織および子宮周辺脂肪組織の InsR、IRS-1 および IRS-2 のタンパク質量の測定

第 3 章の 3-2-6 に準じた。

4-2-10 尿糖の検査

4-2-3 で断頭したマウスの膀胱からシリンジで尿を採血し、ウロペーパー（栄研化学）を使用して、尿糖の有無を検査した。

4-2-11 統計処理

第 1 章の 1-2-11 に準じた。

4-3 実験結果

4-3-1 雌性マウスの体重および脂肪組織重量

Fig. 4-1 に雌性の ddY-H マウスおよび ddY-L マウスの体重増加を示す。雌性 ddY-H マウスでは、離乳した 4 週齢から雌性 ddY-L マウスと比較して有意な体重増加がみられ、週齢を追うごとにその差は大きくなった。Fig. 4-2 に示すように ddY-L マウスでは雌性の体重は高週齢になっても雄性よりも少なかった。一方、ddY-H マウスでは 15 週齢までは雄性の体重が有意に大きかったが、雄性では 20 週齢ごろから糖尿がみられるようになり体重の増加がみられなくなるが、雌性では増加し続けるため 25 週齢では雌雄の差が無くなった。

雌性 ddY-H マウスの子宮周辺脂肪組織および腸管膜脂肪組織の重量は、雌性 ddY-L マウスと比較して若週齢から既に多く、週齢とともに著明に肥大化した。30 週齢では子宮周辺脂肪組織は 4.5 倍、腸管膜脂肪組織では 2.3 倍であった (Fig. 4-3)。

4 時間絶食した 6~30 週齢の雌雄マウスの尿検査を行ったところ、雄性の ddY-H マウスでは 15 週齢まで全てのマウスで尿糖は検出されなかったが、20 週齢で 50% (6/12)、25 週齢で 83% (10/12)、30 週齢で 100% (12/12) のマウスで尿糖が観察された。一方、雌性の ddY-H マウスおよび雌雄の ddY-L マウスでは 30 週齢まで全てのマウスで尿糖は検出されなかった (data not shown)。

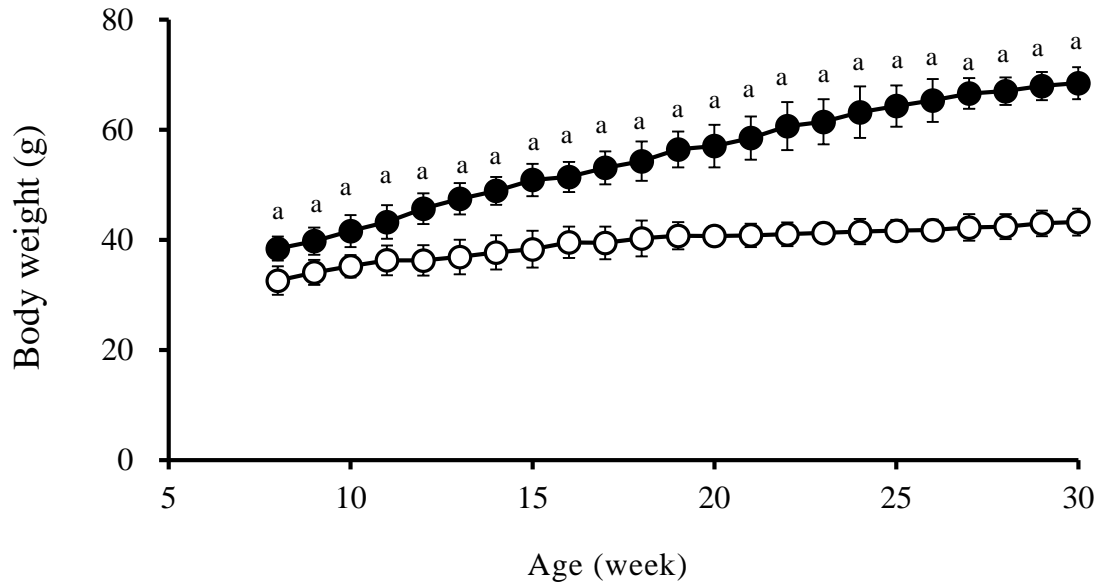


Fig. 4-1 Increase in body weight of female ddY-H or ddY-L mice.

ddY-H: closed circle, ddY-L: open circle. Each column and bar represents the mean \pm S.D. for 25 mice. Significantly different from ddY-L mice at the corresponding age (^a: $p < 0.01$).

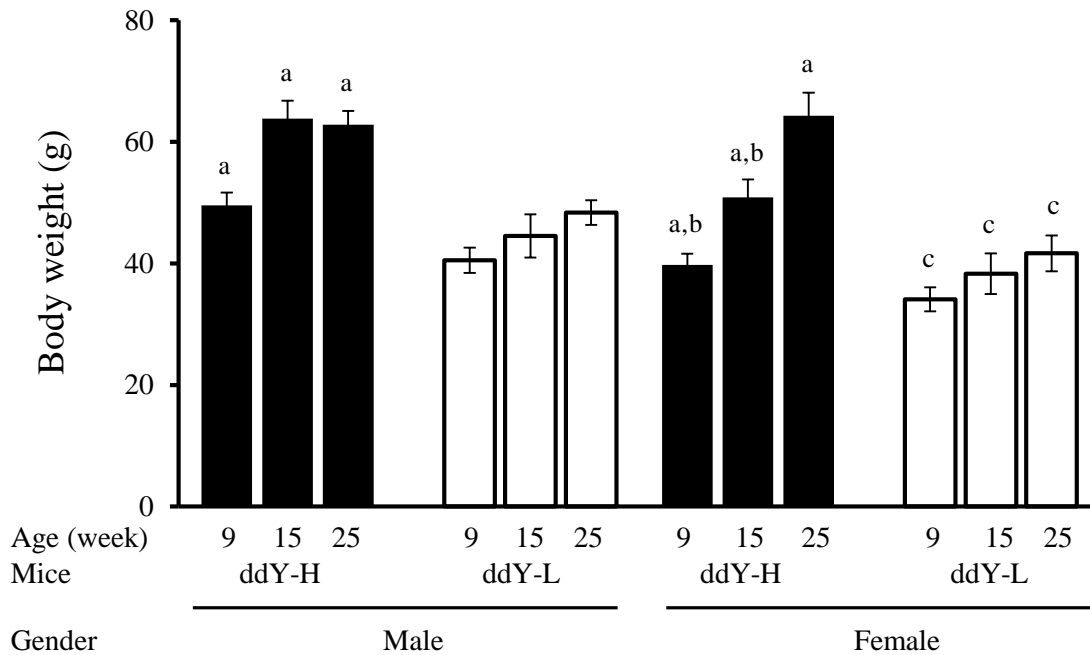


Fig. 4-2 Comparison of body weight between gender of ddY-H or ddY-L mice.

ddY-H: closed column, ddY-L: open column. Each column and bar represents the mean \pm S.D. for 12 mice. Significantly different from ddY-L mice at the same age (^a: $p < 0.01$), from male ddY-H mice at the same age (^b: $p < 0.01$) and from male ddY-L mice at the same age (^c: $p < 0.01$).

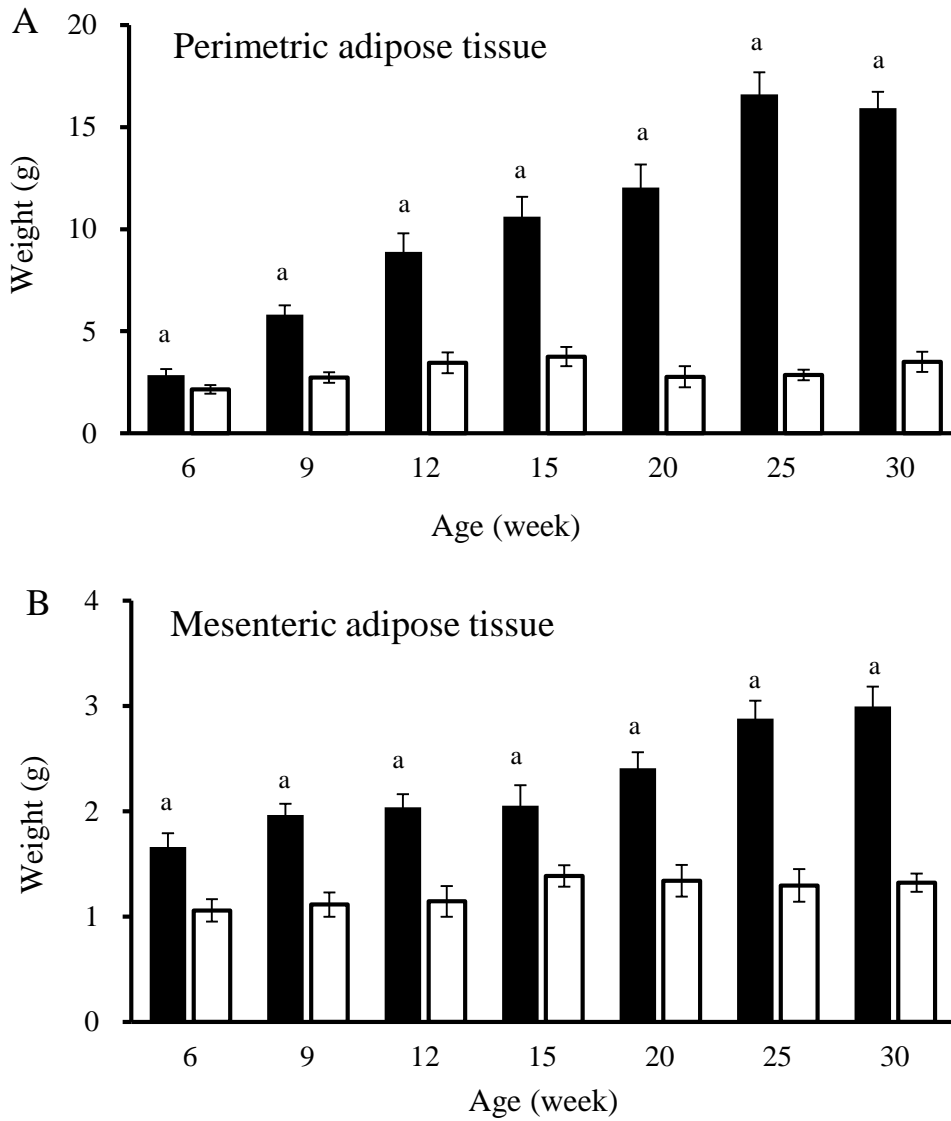


Fig. 4-3 Weights of perimetric adipose tissue (A) and mesenteric adipose tissue (B) in female mice

ddY-H: closed column, ddY-L: open column. Each column and bar represents the mean \pm S.D. for 12 mice. Significantly different from ddY-L mice at the same age (^a : $p < 0.01$).

4-3-2 雌雄マウスの耐糖能の比較

第1章で示したように、経口糖負荷試験において雄性の ddY-H マウスでは、6~9 週齢では耐糖能の低下は認められなかったが、12 週齢以降で有意な低下がみられた。これまでの研究で雌性 ddY-H マウスでは15 週齢まで耐糖能の低下はみられないと報告されている。²⁶⁾ 4-3-1 で示したように、雌性 ddY-H マウスでは加齢により著明な肥満を呈したので、高週齢でも耐糖能の低下が生じないのか確認する目的で、30 週齢までの雌性マウスに glucose (3.0 g/kg) の経口投与による耐糖能試験を実施した。Fig. 4-4 に血糖値-時間曲線から算出した AUC を示す。雌性 ddY-H マウスでは雌性 ddY-L マウスと比較して glucose 経口投与後の AUC は30 週齢までわずかに低下の傾向はみられたが、有意な低下は認められなかった (Fig.4-4)。

したがって、雌性 ddY-H マウスでは加齢によっても耐糖能の低下は生じないことが明らかになった。

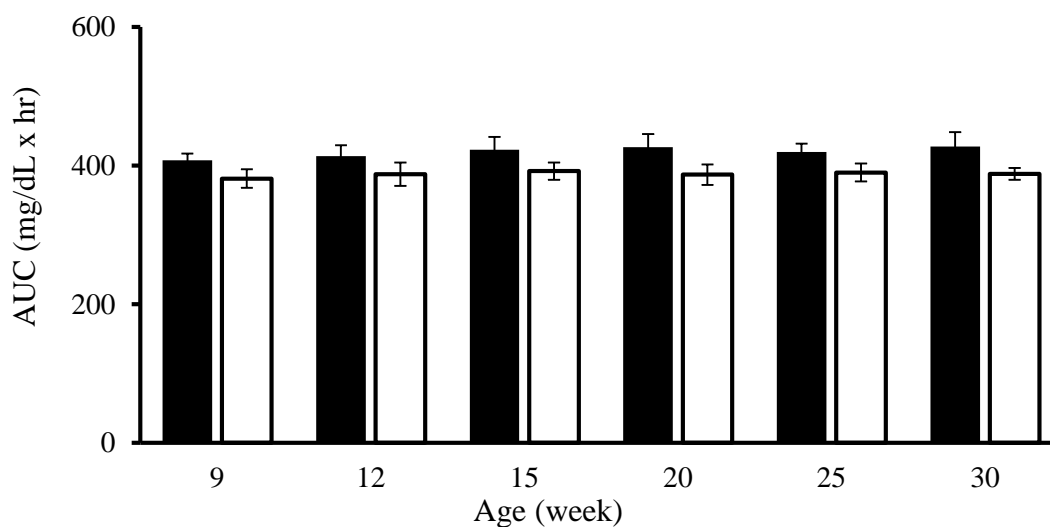


Fig. 4-4 AUC following an oral-glucose tolerance test.

Oral-glucose tolerance test was carried out after 4 h-fasting (9:00-13:00) in female mice at the respective age and AUC in serum glucose concentration-time curve was calculated. ddY-H: closed column, ddY-L: open column. Each column and bar represents the mean \pm S.E. for 8 mice.

4-3-3 雌雄マウスにおける glucose 投与による血漿 insulin 値上昇の比較

第2章で示したように、4時間絶食した雄性 ddY-L マウスの血漿 insulin 値は15週齢まで一定で低値であったのに対し、雄性 ddY-H マウスでは、12週齢以降で有意な上昇がみられた。そこで25週齢まで週齢をおって測定したところ、9~25週齢の雌雄の ddY-L マウスの血漿 insulin 値は低値で一定であり、雌雄の差はなかった (Fig. 4-5A, B)。一方、雄性 ddY-H マウスでは12~25週齢で加齢に伴い著明に上昇した (Fig. 4-5B)。雌性 ddY-H マウスでは、雌性 ddY-L マウスと比較すると9週齢から有意な上昇が認められ、その後も少しずつ上昇したが、雄性 ddY-H マウスと比較するとその上昇量は小さかった (Fig. 4-5A)。

Glucose (3.0 g/kg) 投与15分後の血漿 insulin 値は、雌雄の ddY-H マウスおよび ddY-L マウスのいずれにおいても上昇した。しかし、ddY-L マウスではその上昇は週齢による違いはなく一定であり、雌雄の差はなかった。一方、雄性 ddY-H マウスでは9~25週齢の各週齢で高値となり、加齢に伴う著明な上昇がみられた (Fig. 4-5B)。雌性 ddY-H マウスでは雌性 ddY-L マウスと比較して有意に高値であったが、雄性マウスと比較するとその差は小さく、週齢による変化はほとんど認められなかった (Fig. 4-5A)。

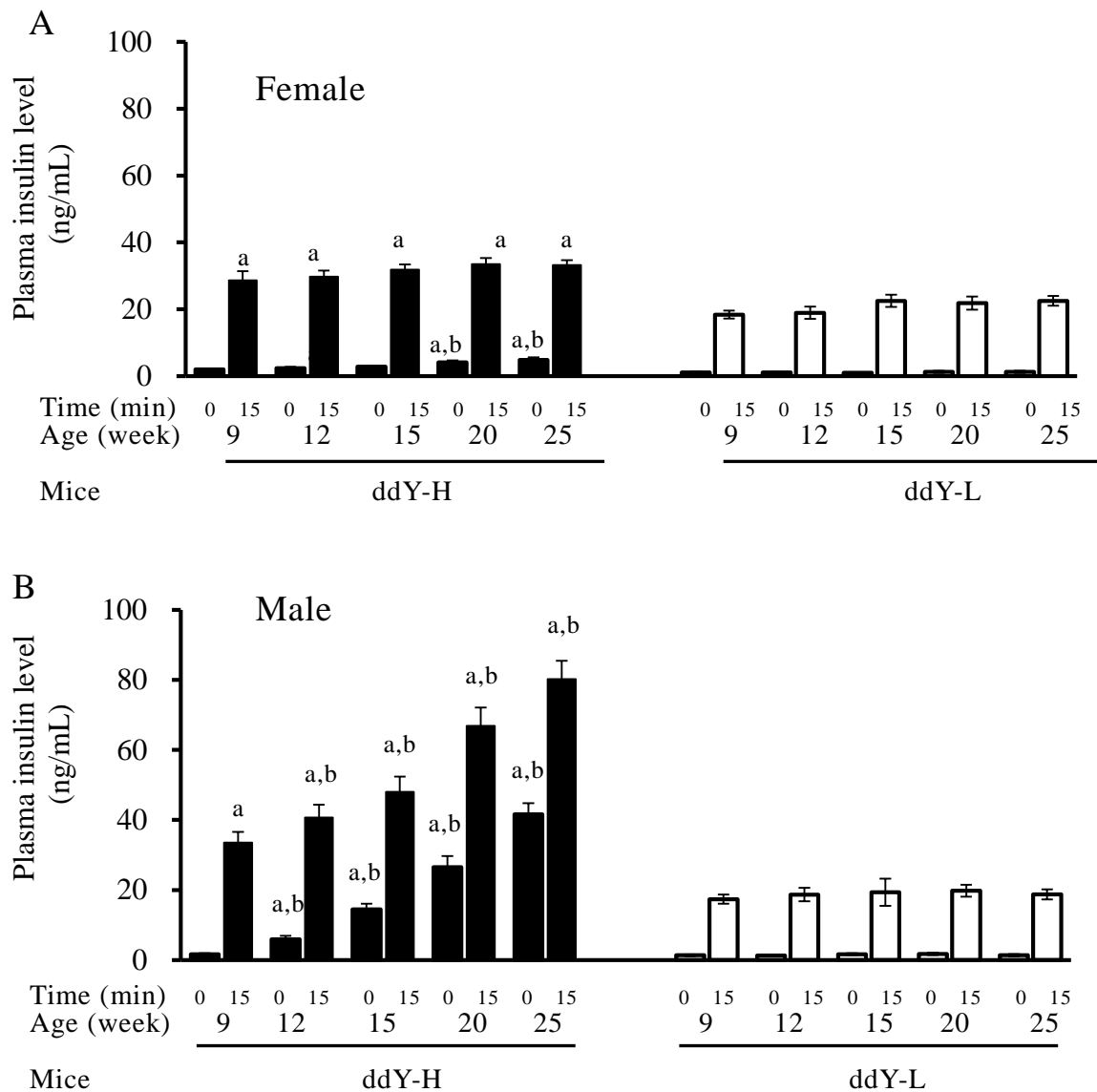


Fig. 4-5 Increase in plasma insulin level induced by oral glucose administration.

Glucose (3 g/kg) was orally administered to ddY-H mice (closed column) and ddY-L mice (open column) after 4 hr fasting (9:00–13:00). Blood was taken by decapitation before the administration (0 time) and after 15 min for insulin measurement. Each column and bar represents the mean \pm SE of 6 mice. Significantly different from corresponding time point in ddY-L mice at the same age (^a: $p < 0.01$) and from ddY-H mice at 9-weeks of age (^b: $p < 0.01$).

4-3-4 雌雄マウスの脂肪組織における InsR、IRS-1 および IRS-2 の mRNA 発現の比較

15 週齢の雌性マウスの子宮周辺脂肪組織と雄性マウスの副睪丸脂肪組織における InsR、IRS-1 および IRS-2 の mRNA の発現量を Fig. 4-6 に比較して示す。

第 3 章で示したように、雄性 ddY-H マウスの副睪丸脂肪組織では InsR の mRNA 発現量は、雄性 ddY-L と比較して著明に減少したが、雌性マウスの子宮周辺脂肪組織では ddY-H マウスと ddY-L マウスで差がなかった (Fig. 4-6A)。

また、副睪丸脂肪組織における IRS-1 および IRS-2 の mRNA の発現量も、雄性 ddY-L マウスと比較して雄性 ddY-H マウスで著明に低下したが、雌性マウスの子宮周辺脂肪組織では ddY-H と ddY-L で差がなかった (Fig. 4-6B, 6C)。

したがって、雌性の ddY-H マウスでは、脂肪組織の insulin 情報伝達系の初期段階の InsR、IRS-1 および IRS-2 の mRNA の発現が減少していないことが示唆された。

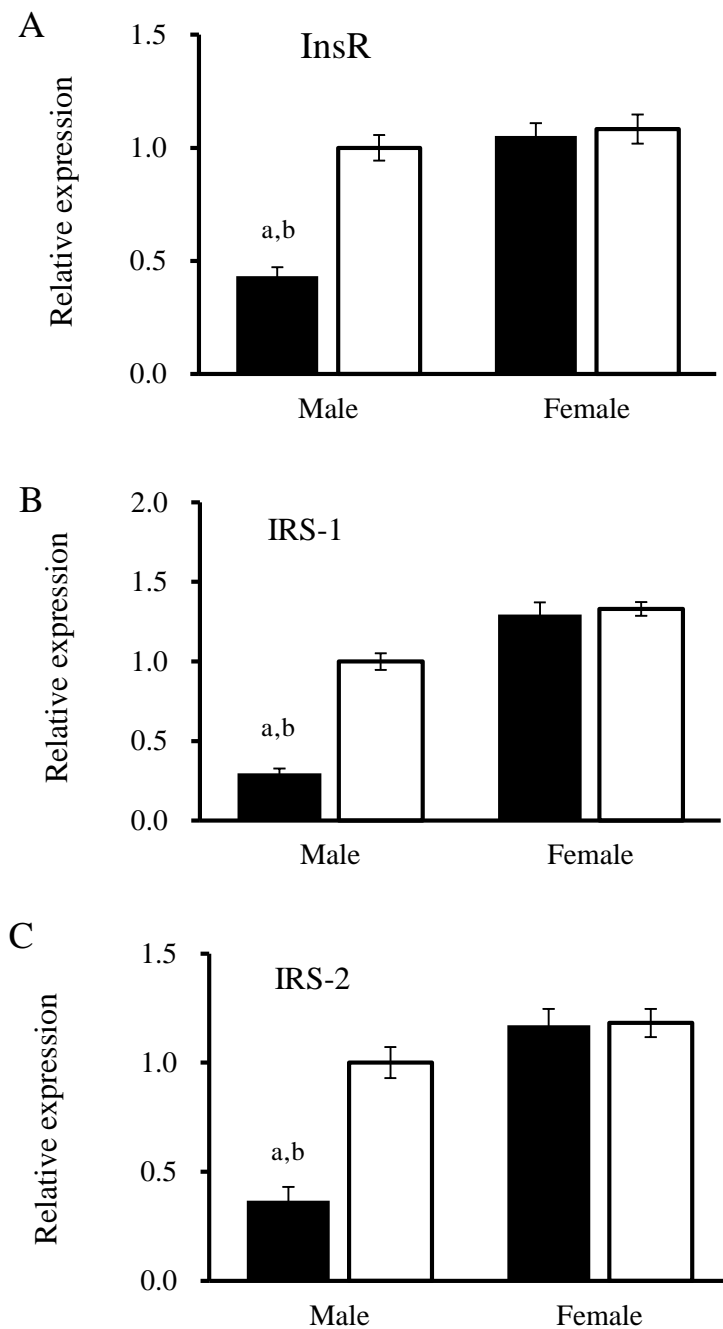


Fig. 4-6 mRNA expression of InsR, IRS-1 and IRS-2 in adipose tissue of ddY-H or ddY-L mice.

Total RNA was extracted from epididymal adipose tissue of male mice and from perimetric adipose tissue of female mice after fasting for 4 hr (9:00- 13:00) at 15-weeks of age and the quantitative real-time PCR analysis of InsR (A), IRS-1 (B) and IRS-2 (C) was carried out. Each mRNA expression was normalized to β -actin and was expressed as relative ratio to that of male ddY-L mice at 15 weeks of age. ddY-H: closed column, ddY-L: open column. Each column and bar represents the mean \pm S.E. for 6 mice. Significantly different from male ddY-L mice (^a: $p < 0.01$) and female ddY-H mice (^b: $p < 0.01$). Data of male mice are same as those in Fig. 3-2.

4-3-5 雌雄マウスの脂肪組織における InsR、IRS-1 および IRS-2 のタンパク質発現の比較

4-3-4 において、15 週齢の雌性 ddY-H マウスの子宮周辺脂肪組織では、InsR、IRS-1 および IRS-2 の mRNA 発現は低下していなかった。しかし、第 3 章 3-3-3 に示したように雄性 ddY-H マウスでは副睾丸脂肪組織におけるそれらのタンパク質量が低下していたので、InsR、IRS-1 および IRS-2 のタンパク質量を ELISA により測定し、それぞれの発現量を総タンパク質 1 mg あたりの値として算出した。15 週齢の雌性マウスの子宮周辺脂肪組織と雄性マウスの副睾丸脂肪組織中の InsR、IRS-1 および IRS-2 のタンパク質発現量を Fig. 4-7 に比較して示す。

雄性マウスの副睾丸脂肪組織の単位タンパク質あたりの InsR タンパク質量は、雄性 ddY-L マウスと比較して雄性 ddY-H マウスで著明に低下したが、雌性マウスの子宮周辺脂肪組織の単位タンパク質あたりの InsR タンパク質量は ddY-L マウスと ddY-H マウスで差がなかった (Fig. 4-7A)。

単位タンパク質あたりの IRS-1 および IRS-2 のタンパク質量も、雄性 ddY-L マウスと比較して雄性 ddY-H マウスでは著明に低下したが、雌性マウスの子宮周辺脂肪組織では ddY-H マウスと ddY-L マウスで差がなかった (Fig. 4-7B, 7C)。

したがって、雌性の ddY-H マウスでは、子宮周辺脂肪組織における insulin の情報伝達系の InsR、IRS-1 および IRS-2 のタンパク質量の発現が低下していないことが示唆された。

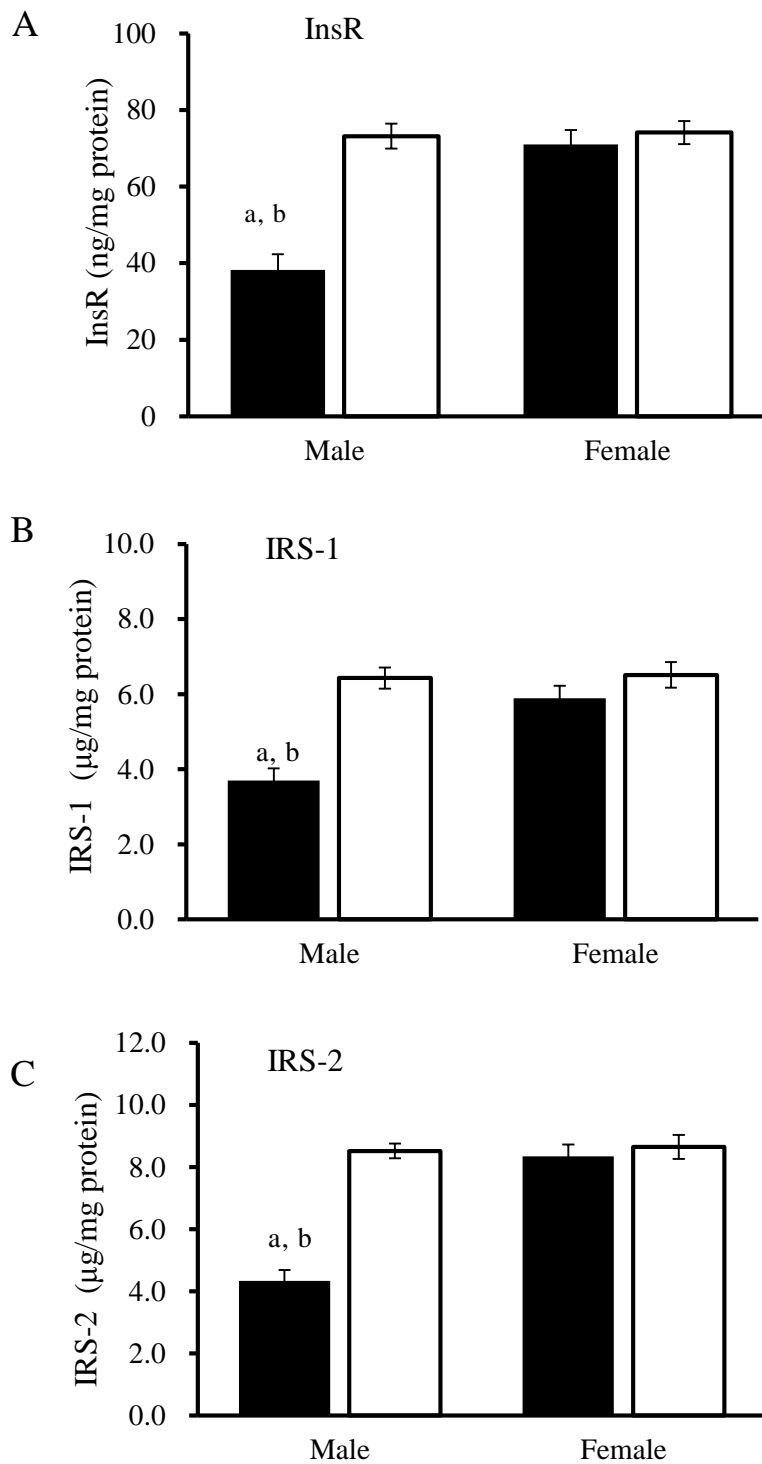


Fig. 4-7 Contents of InsR, IRS-1 and IRS-2 in adipose tissue of ddY-H or ddY-L mice.

The epididymal adipose tissue from male mice and the perimetric adipose from female mice tissue were homogenize in PBS, and InsR (A), IRS-1 (B) and IRS-2 (C) in homogenate were assayed by ELISA. ddY-H mice: closed column and ddY-L mice: open column. Each column and bar represents mean \pm S.E. for 6 mice. Significantly different from male ddY-L mice (^a: $p < 0.01$) and male ddY-H mice (^b: $p < 0.01$). Data of male mice are same as those in Fig. 3-3.

4-4 考察

糖尿病患者の罹患率に性差があることは従来から知られている。⁶⁹⁻⁷¹⁾ また、糖尿病動物モデルである KK-A^y マウス⁷²⁾、NSY マウス⁷³⁾、TSOD マウス⁴⁰⁾、OLETF ラット⁴¹⁾、GK ラット⁴²⁾、SDT ラット⁴³⁾ などでも糖尿病の発症率および症状が雄性で顕著であることが報告されている。雄性 ddY-H マウスでは、標準固形飼料で通常飼育しても4週齢から体重および脂肪組織量の増加が認められ、12週齢でインスリン抵抗性を発現し、20週齢ごろから糖尿病様症状を呈するが、雌性 ddY-H マウスでは20週齢までにそのような病態を示さず、病態発症に性差がある。⁴⁴⁾ 第3章で示したように、雄性 ddY-H マウスでは耐糖能の低下と脂肪組織の insulin の情報伝達系の InsR、IRS-1 および IRS-2 の発現低下の関連性が示唆された。本章では雌性マウスの耐糖能と血漿 insulin 値の変動を著明な肥満となる高週齢まで追跡し、脂肪組織における InsR、IRS-1 および IRS-2 の発現との関連性を検討した。

雌性 ddY-H マウスの体重は、6週齢から雌性 ddY-L マウスより高値で、他の多くのマウスと同様に雄性マウスより少ない体重で推移した。しかし、20週齢以降では性差はなくなり、それ以降雄性マウスでは体重の伸びはみられなかったのに対し、雌性マウスではさらに増加する。また、雄性 ddY-H マウスの副睾丸脂肪組織は雌性 ddY-L マウスより大きい⁴⁵⁾、雌性の ddY-H マウスと ddY-L マウスの子宮周辺脂肪組織および腸管膜脂肪組織の重量の差はそれ以上に大きく、ddY-H マウスでは著明に肥大化した。脂肪組織は、単なるエネルギーの貯蔵庫としての役割だけでなく、種々の adipocytokine を分泌する内分泌組織として全身の代謝を制御している。^{74, 75)} 脂肪組織の肥大化により tumor necrosis factor α (TNF- α)、leptin、interleukin-6 (IL-6)、adiponectin、retinol-binding protein-4 (RBP-4) などの adipocytokine の産生・分泌異常が生じ、末梢組織の insulin 抵抗性発現の一因となることが指摘されている。⁷⁶⁻⁸¹⁾ Adiponectin の血中濃度は BMI と逆相関し、特に内臓脂肪型肥満患者では低値であり⁸²⁾、また adiponectin の投与で db/db マウスや KKA^y マウスのインスリン抵抗性が改善するとの報告がある⁸⁰⁾。一方、monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) や TNF- α は adiponectin の遺伝子発現を抑制する。⁸³⁾ MCP-1 は脂肪細胞から、TNF- α はマクロファージから分泌され、相互に増強してインスリン抵抗性を悪化させる。すなわち、脂肪細胞由来の遊離脂肪酸がマクロファージを刺激し、TNF- α の産生を増加させ、TNF- α がさらに脂肪細胞の炎症性変化や遊離脂肪酸の産生増大を誘導する。肥大化した脂肪細胞においては TNF- α の分泌が亢進しており、adiponectin の発現を抑制し、脂肪組織が減少すると TNF- α の分泌が低下し、逆に増加した adiponectin が TNF- α の発現を抑制することが知られている⁸⁴⁾。

雄性 ddY-H マウスでは、脂肪組織における MCP-1 や TNF- α の発現が増加し、その増加と insulin 抵抗性との関連性が報告されている。⁴⁵⁾ しかし、雌性 ddY-H マウスでは、脂肪組織の著明な肥大化にもかかわらず、30週齢まで insulin 抵抗性は認められなかった。また、血漿 insulin 値は、雌性 ddY-L マウスと比較して有意に高かったが、雄性マウスと比較するとその上昇は軽度であった。Glucose 投与による血漿 insulin 値の上昇量も雌性 ddY-L マウスと比較して大きかったが、雄性マウスと比較するとその上昇量

は小さく、週齢による違いはなく一定であった。この雌雄の ddY-H マウスにおける耐糖能と血漿 insulin 値の比較から、雄性 ddY-H マウスにおいて glucose 投与による血漿 insulin 値の上昇が増強されるのは、末梢組織における insulin 抵抗性の亢進に対する代償性効果と関連していると推察される。さらに、雄性 ddY-H マウスでは 20 週齢から尿糖を呈するマウスがみられ、30 週ではすべてのマウスで尿糖がみられた。しかし雌性 ddY-H マウスでは 30 週齢でもすべてのマウスで尿糖は検出されなかった。したがって、雌性 ddY-H マウスでは、30 週齢まで耐糖能の低下はほとんど生じないことが示唆された。

第 3 章で示したように、雄性 ddY-H マウスの副睾丸脂肪組織では InsR、IRS-1 および IRS-2 の mRNA およびタンパク質の発現は加齢とともに著明に低下し、その週齢による低下の推移が insulin 抵抗性発現の推移と相関していた。しかし、雌性 ddY-H マウスの子宮周辺脂肪組織の InsR、IRS-1 および IRS-2 の mRNA およびタンパク質の発現は、雌性 ddY-L マウスと差はなかった。Kahn らは、脂肪組織の GLUT4 を特異的に欠損させたマウスが全身の insulin 抵抗性を示すことを報告している。⁸⁵⁾ したがって、脂肪組織における insulin 作用の欠如による脂肪組織内への glucose の取り込みの低下が insulin 抵抗性発現の一因となる。雄性 ddY-H マウスでは、脂肪組織における InsR、IRS-1 および IRS-2 の mRNA およびタンパク質の発現量が低下したこと、またそれらの発現低下と insulin 抵抗性の発現の週齢による推移が一致していた。一方、雌性 ddY-H マウスでは、30 週齢にいたるまで insulin 抵抗性はみられず、また脂肪組織の InsR、IRS-1 および IRS-2 の mRNA およびタンパク質の発現の低下は認められなかった。これらの結果は、雄性 ddY-H マウスの脂肪組織における insulin の情報伝達系の初期段階である InsR、IRS-1、IRS-2 発現の低下が insulin 抵抗性発現の一因であることを示唆している。

ddY-H マウスの insulin 抵抗性発現の性差の原因として遺伝的背景が考えられるが、現在のところその原因遺伝子は不明である。一方、これまでに estrogen が性差の原因であるとの指摘もある。正常なラットおよびマウスの近交系統の多くにおいても雌性に比べて雄性において糖代謝能はわずかであるが低い。また、estrogen の α 受容体ノックアウトマウスや estrogen 産生に異常をきたす aromatase ノックアウトマウスでは糖代謝異常が生じ、肥満となり糖尿病症状を示す。^{86, 87)} ヒトでは、estrogen 受容体遺伝子の多型が 2 型糖尿病発症と関連していることが報告されている。⁸⁸⁾ これらのことは、estrogen が糖尿病発症抑制作用を示すことを示唆している。ddY-H マウスの insulin 抵抗性発現の性差は、insulin 抵抗性発現の原因を追及する上で重要と考えられ、今後さらに検討する必要がある。

総括

日本人の糖尿病患者の90%以上が2型糖尿病であり、その成因は、insulin 分泌不全と insulin 抵抗性である。Insulin 抵抗性の発症には多くの遺伝子が関与することから、その発症機構の全貌は明らかではない。前田らは、標準飼料で飼育しても insulin 抵抗性を発症し、加齢により糖尿病症状を呈するマウス (ddY-H マウス) とそれらの症状を示さないマウス (ddY-L マウス) を系統分離した。ddY-H マウスの糖尿病症状の発症には性差があり、雄性のみが発症し、雌性では発症しない。雄性 ddY-H マウスは2型糖尿病のモデルマウス、雄性 ddY-L マウスはその対照の健常マウスとして insulin 抵抗性の発症機序を検討する有用な実験系である。本研究では、雄性 ddY-L マウスを対照として、雄性 ddY-H マウスにおける insulin 抵抗性発現機序について検討した。

雄性 ddY-H マウスの耐糖能低下の発症経過を明らかにする目的で、6~15 週齢のマウスに glucose を経口投与、腹腔内投与および静脈内投与し、血糖値の経時的変動を検討した。雄性 ddY-L マウスでは、経口投与、腹腔内投与および静脈内投与した glucose に対する耐糖能の週齢による違いはなく一定であった。一方、雄性 ddY-H マウスの経口投与した glucose に対する耐糖能は6~9 週齢では雄性 ddY-L マウスと同程度であったが、12~15 週齢で著明に低下した。一方、腹腔内投与、静脈内投与した glucose に対する耐糖能は9 週齢から有意に低下し、12~15 週齢では耐糖能の低下がさらに進行した。雄性 ddY-H マウスでは、超速効型 insulin 分泌促進薬である nateglinide の経口投与および insulin の腹腔内投与による血糖値の低下量は9 週齢から有意に減少し、12~15 週齢では約 50%まで減少した。さらに、血糖値および血漿 insulin 値から算出した insulin 抵抗性インデックスも雄性 ddY-H マウスで9 週齢から有意に上昇し、12~15 週齢で著明に上昇した。これらの結果から、雄性 ddY-H マウスの耐糖能の低下は、9 週齢から発症し、12~15 週齢でさらに進行することが示唆された。

Insulin は血糖値調節に重要な役割を果たしている。6~15 週齢の雄性 ddY-L マウスでは、4 時間絶食時の血漿 insulin 値および glucose を経口投与したときの血漿 insulin 値の週齢による違いはなく一定であった。一方、雄性 ddY-H マウスでは、4 時間絶食時の血漿 insulin 値は6~9 週齢では雄性 ddY-L マウスと同程度であったが、12~15 週齢で有意に上昇した。また、glucose を経口投与したときの血漿 insulin 値は、9 週齢から有意に上昇し、12~15 週齢では2.5 倍に上昇した。特に、12~15 週齢では血漿 insulin 値が高値で持続した。

雄性 ddY-H マウスで glucose の経口投与による血漿 insulin 値の上昇が増強された要因として incretin の関与が考えられた。DPP-4 阻害薬である sitagliptin は、6~15 週齢の雄性 ddY-L マウスにおいて glucose による血漿 insulin 値の上昇を60%増強し、その増強は各週齢で一定であった。雄性 ddY-H マウスでは、6 週齢と比べ9 週齢から血漿 insulin 値の上昇が大きくなる傾向がみられ、12~15 週齢では80%増強した。しかし、雄性 ddY-H マウスの glucose の投与による血漿 GLP-1 値と血漿 GIP 値の上昇は雄性 ddY-L マウスと比較して僅かに上昇するかほとんど差がなかった。一方、膵の β 細胞に直接作用して insulin を分泌させる nateglinide は、6~15 週齢の雄性 ddY-L マウスにおいて

血漿 insulin 値の上昇を 60% 増強し、その増強は各週齢で一定であった。雄性 ddY-H マウスでは 9 週齢から nateglinide による血漿 insulin 値の上昇が大きくなり、12 週齢の血漿 insulin 値は雄性 ddY-L マウスの 4.2 倍となった。これらの結果から、雄性 ddY-H マウスでは 9 週齢から glucose 刺激による膵 β 細胞からの insulin 分泌が亢進し、12~15 週齢でさらに増強されること、この増強への incretin の関与は考えにくく、主として β 細胞の insulin 分泌に関与する刺激伝導の ATP 感受性 K^+ チャネルよりも下流で刺激に対する反応性が亢進していることが示唆された。

Insulin 抵抗性発現の原因として末梢組織における insulin の細胞内情報伝達系の初期段階の障害が知られている。雄性 ddY-H マウスでは副睾丸脂肪組織の InsR、IRS-1 および IRS-2 の mRNA 発現が雄性 ddY-L マウスと比較して 9 週齢から減少しはじめ、12~20 週齢ではそれぞれ 57~61%、64~70%、60~68% まで減少した。また、副睾丸脂肪組織における単位タンパク質あたりの InsR、IRS-1 および IRS-2 のタンパク質発現量も雄性 ddY-L マウスと比べ、それぞれ 27~52%、37~60%、44~58% に減少した。雄性 ddY-H マウスの肝では、IRS-2 の mRNA 発現が 9 週齢から減少しはじめ、12~20 週齢では雄性 ddY-L マウスの 29~53% に減少したが、InsR と IRS-1 の mRNA 発現の減少は認められなかった。IRS-1 と IRS-2 は肝の insulin の細胞内情報伝達において、再摂餌時には IRS-1 が、空腹時と摂食直後時には IRS-2 が主に関与し時間的な役割分担があるとされており、雄性 ddY-H マウスの肝では insulin の細胞内情報伝達障害はほとんどないと推察される。一方、雌性 ddY-H マウスでは、加齢により著明な肥満となり、子宮周辺脂肪組織および腸管膜脂肪組織が肥大化したが、30 週齢まで insulin 抵抗性は認められなかった。また、脂肪組織の InsR、IRS-1 および IRS-2 の mRNA 発現も雌性 ddY-L マウスと同程度であった。雄性 ddY-H マウスの脂肪組織における InsR、IRS-1 および IRS-2 の減少の発現経過は、耐糖能の低下の発現経過と相関していることから、insulin 抵抗性の一因であることが示唆された。

本研究の結果から、insulin 抵抗性自然発症マウスである雄性 ddY-H マウスの insulin 抵抗性は 9 週齢から生じるが、膵 β 細胞からの insulin 分泌の亢進による代償性効果によりマスクされ、12~15 週齢では insulin 抵抗性がより進行して顕在化することが明らかとなった。また、脂肪組織の InsR、IRS-1 および IRS-2 の発現減少が insulin 抵抗性発現の一因であることが示唆された。ヒトのインスリン抵抗性発現は単一遺伝子によるものではなく、多数の原因遺伝子が作用し合って発症する割合が大きく、全ての糖尿病患者において雄性 ddY-H の病態経過が一致するとは限らないが、少なくとも InsR、IRS-1、IRS-2 の発現低下を示す 2 型糖尿病患者の発症や病態を解明するために有用であるといえる。

以上より、雄性 ddY-H マウスは加齢により insulin 抵抗性を発現する 2 型糖尿病の病態モデル動物であり、今後さらに雄性 ddY-H マウスの insulin 情報伝達系障害の発生機序を明らかにすることにより、ヒトにおける insulin 抵抗性発現原因の少なくとも一部が明らかとなることが期待される。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始懇切なるご指導、ご助言を賜り、本校のご校閲を頂きました静岡県立大学大学院薬学研究科臨床薬剤学教室 賀川義之教授に厚く御礼申し上げます。

本研究の直接の指導教員として細部にわたり、終始懇切なるご指導、ご助言を賜りました静岡県立大学大学院薬学研究科臨床薬剤学教室 前田利男客員教授に深く感謝いたします。

本研究にあたり、ご指導、ご助言をいただきました宮寄靖則准教授、石井康子講師、内野智信講師、谷澤康玄助教に感謝いたします。

本論文の提出にあたり貴重なご助言とご校閲を賜りました静岡県立大学大学院薬学研究科臨床薬効解析学教室 伊藤邦彦教授、静岡県立大学大学院薬学研究科薬理学教室 石川智久教授、静岡県立大学大学院薬学研究科統合生理学教室 武田厚司教授に厚く御礼申し上げます。

本研究に様々なご協力をいただきました今井志織さん、有澤佳純さん、小倉加称美さんをはじめ、静岡県立大学薬学部薬学科臨床薬剤学講座の諸氏に感謝いたします。

社会人大学院生としての立場を理解し、公私にわたりご支援いただきました中東遠総合医療センター職員および関係者の皆様に感謝いたします。

最後に、本研究を暖かく見守り、辛抱強く支援してくれた家族に対し心より感謝いたします。

参考文献

- 1) International Diabetes Federation: IDF DIABETES ATLAS seventh edition 2015 (2015).
- 2) 厚生労働省：平成 25 年国民健康・栄養調査結果の概要(2013)。
- 3) 日本糖尿病学会：科学的根拠に基づく糖尿病診療ガイドライン 2013(2013)。
- 4) Ashcroft FM, Rorsman P. Diabetes mellitus and the β cell: the last ten years. *Cell*, **148**, 1160-1171 (2012).
- 5) Lafontan M. Adipose tissue and adipocyte dysregulation. *Diabetes Metab.*, **40**, 16-28 (2014).
- 6) Yasuda K, Miyake K, Horikawa Y, Hara K, Osawa H, Furuta H, Hirota Y, Mori H, Jonsson A, Sato Y, Yamagata K, Hinokio Y, Wang HY, Tanahashi T, Nakamura N, Oka Y, Iwasaki N, Iwamoto Y, Yamada Y, Seino Y, Maegawa H, Kashiwagi A, Takeda J, Maeda E, Shin HD, Cho YM, Park KS, Lee HK, Ng MC, Ma RC, So WY, Chan JC, Lyssenko V, Tuomi T, Nilsson P, Groop L, Kamatani N, Sekine A, Nakamura Y, Yamamoto K, Yoshida T, Tokunaga K, Itakura M, Makino H, Nanjo K, Kadowaki T, Kasuga M. Variants in *KCNQ1* are associated with susceptibility to type 2 diabetes mellitu. *Nat. Genet.*, **40**, 1092-1097 (2008).
- 7) Hara K, Fujita H, Johnson TA, Yamauchi T, Yasuda K, Horikoshi M, Peng C, Hu C, Ma RC, Imamura M, Iwata M, Tsunoda T, Morizono T, Shojima N, So WY, Leung TF, Kwan P, Zhang R, Wang J, Yu W, Maegawa H, Hirose H; DIAGRAM consortium, Kaku K, Ito C, Watada H, Tanaka Y, Tobe K, Kashiwagi A, Kawamori R, Jia W, Chan JC, Teo YY, Shyong TE, Kamatani N, Kubo M, Maeda S, Kadowaki T. Genome-wide association study identifies three novel loci for type 2 diabetes. *Hum. Mol. Genet.*, **23**, 239-46 (2014).
- 8) 本田律子、門脇 孝. インスリン作用の流れ. インスリン抵抗性 (松澤佑次、藤田敏郎、門脇 孝 編) 医学書院、東京、pp 8-12 (2006).
- 9) 本田律子、門脇 孝. インスリン抵抗性という概念の発展. インスリン抵抗性 (松澤佑次、藤田敏郎、門脇 孝 編) 医学書院、東京、pp 2-6 (2006).
- 10) Ferrannini E. Analysis of data on insulin resistance from the European group for the study of insulin resistance: focus on obesity and hypertension. *Endocr. Pract.*, **2**, 43-49 (2003).
- 11) Reaven GM. Syndrome X. *Curr. Treat. Options Cardiovasc. Med.*, **3**, 323-332 (2001).
- 12) 浦 信行. メタボリックシンドロームの概念. メタボリックシンドロームと生活習慣病 (島本和明 編) 診断と治療社、東京、pp 1-8 (2007).
- 13) Alberti KG, Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ, Cleeman JI, Donato KA, Fruchart JC, James WP, Loria CM, Smith SC Jr; International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; International Association for the Study of Obesity. Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association;

- World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation*. **120**, 1640-1645 (2009).
- 14) Kadowaki T, Yamauchi T, Kubota N, Hara K, Ueki K, Tobe K. Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome. *J. Clin. Invest.*, **116**, 1784–1792 (2006).
 - 15) Lazar MA. The humoral side of insulin resistance. *Nat. Med.*, **12**, 43-44 (2006).
 - 16) Lane MD, Flores-Riveros JR, Hresko RC, Kaestner KH, Liao K, Janicot M, Hoffman RD, McLenithan JC, Kastelic T, Christy RJ. Insulin-receptor tyrosine kinase and glucose transport. *Diabetes Care*, **13**, 565-575 (1990).
 - 17) White MF. The insulin signalling system and the IRS proteins. *Diabetologia*, **40**, (Suppl. 2), S2-S17 (1997).
 - 18) Backer JM, Myers MG Jr, Shoelson SE, Chin DJ, Sun XJ, Miralpeix M, Hu P, Margolis B, Skolnik EY, Schlessinger J, White MF. Phosphatidylinositol 3'-kinase is activated by association with IRS-1 during insulin stimulation. *EMBO J.*, **11**, 3469-3479 (1992).
 - 19) Alessi DR, Andjelkovic M, Caudwell B, Cron P, Morrice N, Cohen P, Hemmings BA. Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *EMBO J.*, **15**, 6541-6551 (1996).
 - 20) Lee J, Pilch PF. The insulin receptor: structure, function, and signaling. *Am. J. Physiol.*, **266**, C319-C334 (1994).
 - 21) Cushman SW, Wardzala LJ. Potential mechanism of insulin action on glucose transport in the isolated rat adipose cell. Apparent translocation of intracellular transport systems to the plasma membrane. *J. Biol. Chem.*, **255**, 4758-4762 (1980).
 - 22) Ueki K, Yamamoto-Honda R, Kaburagi Y, Yamauchi T, Tobe K, Burgering BM, Coffey PJ, Komuro I, Akanuma Y, Yazaki Y, Kadowaki T. Potential role of protein kinase B in insulin-induced glucose transport, glycogen synthesis, and protein synthesis. *J. Biol. Chem.*, **273**, 5315-5322 (1998).
 - 23) Karlsson HK, Zierath JR. Insulin signaling and glucose transport in insulin resistant human skeletal muscle. *Cell Biochem. Biophys.*, **48**, 103-113 (2007).
 - 24) DeFronzo RA, Tripathy D. Skeletal muscle insulin resistance is the primary defect in type 2 diabetes. *Diabetes Care*, **32**, S157-S163 (2009).
 - 25) Virkamäki A, Ueki K, Kahn CR. Protein-protein interaction in insulin signaling and the molecular mechanisms of insulin resistance. *J. Clin. Invest.*, **103**, 931-943 (1999).
 - 26) Caro JF, Ittoop O, Pories WJ, Meelheim D, Flickinger EG, Thomas F, Jenquin M, Silverman JF, Khazanie PG, Sinha MK. Studies on the mechanism of insulin resistance in the liver from humans with noninsulin-dependent diabetes. Insulin action and binding in isolated hepatocytes, insulin receptor structure, and kinase activity. *J Clin Invest.*, **78**, 249-258 (1986).

- 27) Bisbis S, Bailbe D, Tormo MA, Picarel-Blanchot F, Derouet M, Simon J, Portha B. Insulin resistance in the GK rat: decreased receptor number but normal kinase activity in liver. *Am. J. Physiol.*, **265**, E807-E813 (1993).
- 28) Zorad S, Jezova D, Szabova L, Macho L, Tybitanclova K. Low number of insulin receptors but high receptor protein content in adipose tissue of rats with monosodium glutamate-induced obesity. *Gen. Physiol. Biophys.*, **22**, 557-560 (2003).
- 29) Dominici FP, Cifone D, Bartke A, Turyn D. Loss of sensitivity to insulin at early events of the insulin signaling pathway in the liver of growth hormone-transgenic mice. *J. Endocrinol.*, **161**, 383-392 (1999).
- 30) Taniguchi CM, Ueki K, Kahn R. Complementary roles of IRS-1 and IRS-2 in the hepatic regulation of metabolism. *J. Clin. Invest.*, **115**, 718-727 (2005).
- 31) Araki E, Lipes MA, Patti ME, Brüning JC, Haag B 3rd, Johnson RS, Kahn CR. Alternative pathway of insulin signalling in mice with targeted disruption of the IRS-1 gene. *Nature*, **372**, 186-190 (1994).
- 32) Tamemoto H, Kadowaki T, Tobe K, Yagi T, Sakura H, Hayakawa T, Terauchi Y, Ueki K, Kaburagi Y, Satoh S, Sekihara H, Yoshioka S, Horikoshi H, Furuta Y, Ikawa Y, Kasuga M, Yazaki Y, Aizawa S. Insulin resistance and growth retardation in mice lacking insulin receptor substrate-1. *Nature*, **372**, 182-186 (1994).
- 33) Withers DJ, Gutierrez JS, Towery H, Burks DJ, Ren JM, Previs S, Zhang Y, Bernal D, Pons S, Shulman GI, Bonner-Weir S, White MF. Disruption of IRS-2 causes type 2 diabetes in mice. *Nature*, **391**, 900-904 (1998).
- 34) Pederson TM, Kramer DL, Rondinone CM. Serine/threonine phosphorylation of IRS-1 triggers its degradation: possible regulation by tyrosine phosphorylation. *Diabetes*, **50**, 24-31 (2001).
- 35) Kubota N, Kubota T, Itoh S, Kumagai H, Kozono H, Takamoto I, Mineyama T, Ogata H, Tokuyama K, Ohsugi M, Sasako T, Moroi M, Sugi K, Kakuta S, Iwakura Y, Noda T, Ohnishi S, Nagai R, Tobe K, Terauchi Y, Ueki K, Kadowaki T. Dynamic functional relay between insulin receptor substrate 1 and 2 in hepatic insulin signaling during fasting and feeding. *Cell Metab.*, **8**, 49-64 (2008).
- 36) Chen H, Charlat O, Tartaglia LA, Woolf EA, Weng X, Ellis SJ, Lakey ND, Culpepper J, Moore KJ, Breitbart RE, Duyk GM, Tepper RI, Morgenstern JP. Evidence that the diabetes gene encodes the leptin receptor: identification of a mutation in the leptin receptor gene in db/db mice. *Cell*, **84**, 491-495 (1996).
- 37) Herberg L, Coleman DL. Laboratory animals exhibiting obesity and diabetes syndromes. *Metabolism*, **26**, 59 -99 (1977).
- 38) Nakamura M, Yamada K. Studies on a diabetic (KK) strain of the mouse. *Diabetologia*, **3**, 212-221 (1967).
- 39) Shibata M, Yasuda B, New experimental congenic diabetic mice (N.S.Y. mice). *Tohoku J.*

- Exp. Med.*, **130**, 139-142 (1980).
- 40) Suzuki W, Iizuka S, Tabuchi M, Funo S, Yanagisawa T, Kimura M, Sato T, Endo T, Kawamura H. A new mouse model of spontaneous diabetes derived from ddY strain. *Exp. Anim.*, **48**, 181-189 (1999).
 - 41) Kawano K, Hirashima T, Mori S, Saitoh Y, Kurosumi M, Natori T. Spontaneous long-term hyperglycemic rat with diabetic complications. Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) strain. *Diabetes*, **41**, 1422-1428 (1992).
 - 42) Goto Y, Kakizaki M, Masaki N. Production of spontaneous diabetic rats by repetition of selective breeding. *Tohoku J. Exp. Med.*, **119**, 85-90 (1976).
 - 43) Shinohara M, Masuyama T, Shoda T, Takahashi T, Katsuda Y, Komeda K, Kuroki M, Kakehashi A, Kanazawa Y. A new spontaneously diabetic non-obese Torii rat strain with severe ocular complications. *Int. J. Exp. Diabetes Res.*, **1**, 89-100 (2000).
 - 44) Noge I, Kagawa Y, Maeda T. A new diabetic mouse model derived from the ddY strain. *Biol. Pharm. Bull.*, **33**, 988-992 (2010).
 - 45) Maeda T, Noge I, Kagawa Y. Infiltration of M1 macrophages into adipose tissue of ddY-H mice preceding spontaneous appearances of insulin resistance. *Biol. Pharm. Bull.*, **36**, 825-832 (2013).
 - 46) Satoh H, Ide N, Kagawa Y, Maeda T. Hepatic steatosis with relation to increased expression of peroxisome proliferator-activated receptor- γ in insulin resistant mice. *Biol. Pharm. Bull.*, **36**, 616-623 (2013).
 - 47) Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*, **28**, 412-419 (1985).
 - 48) Rossmesl M, Rim JS, Koza RA, Kozak LP. Variation in type 2 diabetes-related traits in mouse strains susceptible to diet-induced obesity. *Diabetes*, **52**, 1958-1966 (2003).
 - 49) Lee MK, Miles PD, Khoursheed M, Gao KM, Moossa AR, Olefsky JM. Metabolic effects of troglitazone on fructose-induced insulin resistance in the rat. *Diabetes*, **43**, 1435-1439 (1994).
 - 50) Rozman J, Rathkolb B, Neschen S, Fuchs H, Gailus-Durner V, Klingenspor M, Wolf E, Hrabě de Angelis M. Glucose tolerance tests for systematic screening of glucose homeostasis in mice. *Curr. Protoc. Mouse Biol.*, **5**, 65-84 (2015).
 - 51) Watada S, Yu YM, Fischman AJ, Kurihara T, Shen CA, Tompkins RG, Fagan S. Evaluation of intragastric vs intraperitoneal glucose tolerance tests in the evaluation of insulin resistance in a rodent model of burn injury and glucagon-like polypeptide-1 treatment. *J. Burn Care Res.* **35**, e66-e72 (2014).
 - 52) Elrick H, Stimmler L, Hlad CJ Jr, Arai Y. Plasma insulin response to oral and intravenous glucose administration. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **24**, 1076-1082 (1964).

- 53) Andrikopoulos S, Blair AR, Deluca N, Fam BC, Proietto J. Evaluating the glucose tolerance test in mice. *Am. J. Physiol. Endocrinol Metab.*, **295**, E1323-E1332 (2008).
- 54) Wright EM, Hirsch JR, Loo DD, Zampighi GA. Regulation of Na⁺/glucose cotransporters. *J. Exp. Biol.*, **200**, 287-93 (1997).
- 55) Baggio LL, Drucker DJ. Biology of incretins: GLP-1 and GIP. *Gastroenterology*, **132**, 2131-2157 (2007).
- 56) Ohlsson L, Kohan AB, Tso P, Ahrén B. GLP-1 released to the mesenteric lymph duct in mice: effects of glucose and fat. *Regul. Pept.*, **189**, 40-45 (2014).
- 57) Drucker DJ. The biology of incretin hormones. *Cell Metab.*, **3**, 153-165 (2006).
- 58) Grodstein GP, Blumenkrantz MJ, Kopple JD, Moran JK, Coburn JW. Glucose absorption during continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Kidney Int.*, **19**, 564-567 (1981).
- 59) Kahn SE, Hull RL, Utzschneider KM. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature*, **444**, 840–846 (2006).
- 60) Hanif W, Kumar S. Nateglinide: a new rapid-acting insulinotropic agent. *Expert. Opin. Pharmacother.*, **2**, 1027-1031 (2001).
- 61) Proks P, Reimann F, Green N, Gribble F, Ashcroft F. Sulfonylurea stimulation of insulin secretion. *Diabetes*, **51**, S368-S376 (2002).
- 62) Henquin JC. Regulation of insulin secretion: a matter of phase control and amplitude modulation. *Diabetologia*, **52**, 739-751 (2009).
- 63) Ikenoue T, Okazaki K, Fujitani S, Tsuchiya Y, Akiyoshi M, Maki T, Kondo N. Effect of a new Hypoglycemic agent, A-4166[(-)-N-(trans-4-isopropylcyclohexanecarbonyl)-D-phenylalanine], on postprandial blood glucose excursion: comparison with voglibose and glibenclamide. *Biol. Pharm. Bull.*, **20**, 354-359 (1997).
- 64) Gallwitz B. Review of sitagliptin phosphate: a novel treatment for type 2 diabetes. *Vasc. Health Risk. Manag.*, **3**, 203-210 (2007).
- 65) Suzuki T, Imai J, Yamada T, Ishigaki Y, Kaneko K, Uno K, Hasegawa Y, Ishihara H, Oka Y, Katagiri H. Interleukin-6 enhances glucose-stimulated insulin secretion from pancreatic beta-cells: potential involvement of the PLC-IP3-dependent pathway. *Diabetes*, **60**, 537-547 (2011).
- 66) Matsumoto F, Bujo H, Kuramochi D, Saito K, Shibasaki M, Takahashi K, Yoshimoto S, Ichinose M, Saito Y. Effect of nutrition on the cell survival and gene expression of transplanted fat tissues in mice. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **295**, 630-635 (2002).
- 67) Xia JN, Zhang Q.D, Du J, Wen J. Regulation effects of TZQ-F on adipocyte differentiation and insulin action. *J. Ethnopharmacol.*, **150**, 692-699 (2013).
- 68) Kubota T, Kubota N, Kumagai H, Yamaguchi S, Kozono H, Takahashi T, Inoue M, Itoh S, Takamoto I, Sasako T, Kumagai K, Kawai T, Hashimoto S, Kobayashi T, Sato M, Tokuyama K, Nishimura S, Tsunoda M, Ide T, Murakami K, Yamazaki T, Ezaki O, Kawamura K, Masuda H, Moroi M, Sugi K, Oike Y, Shimokawa H, Yanagihara N,

- Tsutsui M, Terauchi Y, Tobe K, Nagai R, Kamata K, Inoue K, Kodama T, Ueki K, Kadowaki T. Impaired insulin signaling in endothelial cells reduces insulin-induced glucose uptake by skeletal muscle. *Cell Metab.*, **13**, 294-307 (2011).
- 69) Morita A, Ishigaki Y. Gender-difference in diabetes mellitus. *Nihon Rinsho*, **73**, 606-610 (2015).
- 70) 池上博司、荻原俊男：2型糖尿病における性差。性差と医療、**1**, 427-430 (2014).
- 71) Meisinger C, Thorand B, Schneider A, Stieber J, Döring A, Löwel H. Sex differences in risk factors for incident type 2 diabetes mellitus: The MONICA Augsburg Cohort Study. *Arch. Intern. Med.*, **162**, 82-89 (2002).
- 72) Suto J, Matsuura S, Imamura K, Yamanaka H, Sekikawa K. Genetic analysis of non-insulin-dependent diabetes mellitus in KK and KK-Ay mice. *Eur. J. Endocrinol.*, **139**, 654-661 (1998).
- 73) The NSY mouse: a new animal model of spontaneous NIDDM with moderate obesity. Ueda H, Ikegami H, Yamato E, Fu J, Fukuda M, Shen G, Kawaguchi Y, Takekawa K, Fujioka Y, Fujisawa T, et al. *Diabetologia*, **38**, 503-508 (1995).
- 74) Lyon CJ, Law RE, Hsueh WA. Minireview: adiposity, inflammation, and atherogenesis. *Endocrinology*, **144**, 2195-2200 (2003).
- 75) Goodpaster BH, Krishnaswami S, Harris TB, Katsiaras A, Kritchevsky SB, Simonsick EM, Nevitt M, Holvoet P, Newman AB. Obesity, regional body fat distribution, and the metabolic syndrome in older men and women. *Arch. Intern. Med.*, **165**, 777-783 (2005).
- 76) Hotamisligil GS. Molecular mechanisms of insulin resistance and the role of the adipocyte. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.*, **24** Suppl 4:S23-27 (2000).
- 77) Schindler TH, Cardenas J, Prior JO, Facta AD, Kreissl MC, Zhang XL, Sayre J, Dahlbom M, Licinio J, Schelbert HR. Relationship between increasing body weight, insulin resistance, inflammation, adipocytokine leptin, and coronary circulatory function. *J. Am. Coll. Cardiol.*, **47**, 1188-1195 (2006).
- 78) Vozarova B, Weyer C, Hanson K, Tataranni PA, Bogardus C, Pratley RE. Circulating interleukin-6 in relation to adiposity, insulin action, and insulin secretion. *Obes. Res.*, **9**, 414-417 (2001).
- 79) Yang Q, Graham TE, Mody N, Preitner F, Peroni OD, Zabolotny JM, Kotani K, Quadro L, Kahn BB. Serum retinol binding protein 4 contributes to insulin resistance in obesity and type 2 diabetes. *Nature*, **436**, 356-62 (2005).
- 80) Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Terauchi Y, Kubota N, Hara K, Mori Y, Ide T, Murakami K, Tsuboyama-Kasaoka N, Ezaki O, Akanuma Y, Gavrilova O, Vinson C, Reitman ML, Kagechika H, Shudo K, Yoda M, Nakano Y, Tobe K, Nagai R, Kimura S, Tomita M, Froguel P, Kadowaki T. The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipodystrophy and obesity. *Nat. Med.*, **7**, 941-946 (2001).
- 81) Cho YM, Youn BS, Lee H, Lee N, Min SS, Kwak SH, Lee HK, Park KS. Plasma

- retinol-binding protein-4 concentrations are elevated in human subjects with impaired glucose tolerance and type 2 diabetes. *Diabetes Care*, **29**, 2457-2461 (2006).
- 82) Arita Y, Kihara S, Ouchi N, Takahashi M, Maeda K, Miyagawa J, Hotta K, Shimomura I, Nakamura T, Miyaoka K, Kuriyama H, Nishida M, Yamashita S, Okubo K, Matsubara K, Muraguchi M, Ohmoto Y, Funahashi T, Matsuzawa Y. Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **257**, 79-83 (1999).
- 83) Suganami T, Nishida J, Ogawa Y. A paracrine loop between adipocytes and macrophage aggravates inflammatory changes: role of free fatty acids and tumor necrosis factor α . *Arterioscler Thromb. Vasc. Biol.*, **205**, 2062-2068 (2005).
- 84) Maeda N, Takahashi M, Funahashi T, Kihara S, Nishizawa H, Kishida K, Nagaretani H, Matsuda M, Komuro R, Ouchi N, Kuriyama H, Hotta K, Nakamura T, Shimomura I, Matsuzawa Y. PPAR γ ligands increase expression and plasma concentrations of adiponectin, an adipose-derived protein. *Diabetes*, **50**, 2094-2099 (2001).
- 85) Abel ED, Peroni O, Kim JK, Kim YB, Boss O, Hadro E, Minnemann T, Shulman GI, Kahn BB. Adipose-selective targeting of the GLUT4 gene impairs insulin action in muscle and liver. *Nature*, **409**, 729-733 (2001).
- 86) Heine PA, Taylor JA, Iwamoto GA, Lubahn DB, Cooke PS. Increased adipose tissue in male and female estrogen receptor- α knockout mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **97**, 12729-12734 (2000).
- 87) Le May C, Chu K, Hu M, Ortega CS, Simpson ER, Korach KS, Tsai MJ, Mauvais-Jarvis F. Estrogens protect pancreatic β -cells from apoptosis and prevent insulin-deficient diabetes mellitus in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **103**, 9232-9237 (2006).
- 88) Gallagher CJ, Keene KL, Mychaleckyj JC, Langefeld CD, Hirschhorn JN, Henderson BE, Gordon CJ, Freedman BI, Rich SS, Bowden DW, Sale MM. Investigation of the estrogen receptor-alpha gene with type 2 diabetes and/or nephropathy in African-American and European-American populations. *Diabetes*, **56**, 675-684 (2007).