

博士学位論文

食後高血糖の蓄積による炎症の慢性化と

2型糖尿病の発症・進展との関連

Relation between chronic inflammation induced by accumulation of  
postprandial hyperglycemia and development of type 2 diabetes

2016年2月

静岡県立大学大学院 薬食生命科学総合学府 薬食生命科学専攻  
博士後期課程 栄養生理学研究室

今井 千裕

# 目次

略語一覧	1
はじめに	3
<b>第1章</b>	
「2型糖尿病モデル OLETF ラットにおける 食後高血糖抑制による炎症リスクの低減作用」	
第1章 序論	8
<u>第1節</u>	
「単回の食後高血糖抑制による心血管疾患発症リスク因子の発現抑制効果」	
序	11
方法	13
結果	18
考察	21
<u>第2節</u>	
「食後高血糖の長期抑制による心血管疾患発症リスク因子の発現抑制効果」	
序	25
方法	27
結果	35
考察	44
<u>第3節</u>	
「好中球エラスターゼの活性阻害による心血管疾患発症リスク因子の発現抑制効果」	
序	49
方法	52
結果	55
考察	60
第1章 総括	62

## 第2章

### 「2型糖尿病患者における食後高血糖抑制による炎症リスクの低減作用」

第2章 序論	64
--------	----

#### 第1節

##### 「2型糖尿病患者における $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害薬およびDPP-4阻害薬の併用による血糖振幅の改善と心血管疾患発症リスク因子の発現抑制との関連」

序	66
方法	68
結果	73
考察	82

#### 第2節

##### 「2型糖尿病患者におけるDPP-4阻害薬による血糖振幅の改善と心血管疾患発症リスク因子の発現抑制」

序	88
方法	91
結果	96
考察	99

第2章 総括	101
--------	-----

## 第3章

### 「ヒト単球様THP-1細胞における短期高グルコース曝露によるエピゲノムの蓄積を介した炎症関連遺伝子発現増大機構」

第3章 序論	103
--------	-----

#### 第1節

##### 「短期高グルコース曝露による炎症関連遺伝子の発現持続作用」

序	105
方法	106
結果	109
考察	111

## 第2節

「短期高グルコース曝露によるヒストンコードを介した

炎症関連遺伝子の発現持続機構」

序	113
方法	116
結果	122
考察	128
第3章 総括	132
おわりに	133
引用文献	136
謝辞	150

## 略語一覧

ACCORD : Action to Control Cardiovascular Risk in Diabetes  
AGE : advanced glycation end products (終末糖化産物)  
1,5-AG : 1,5-anhydroglucitol  
 $\alpha$ -GI :  $\alpha$ -glucosidase inhibitor ( $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害剤)  
ALT : alanine aminotransferase  
 $\alpha$ 1-PI :  $\alpha$ 1- protease inhibitor  
AST : aspartate aminotransferase  
AUC : area under the curve (曲線下面積)  
BET : bromodomain and extra-terminal  
Brd4 : bromodomain-containing protein 4 (ブロモドメインタンパク質 4)  
CCK : cholecystokinin (コレシストキニン)  
CD : cluster of differentiation antigen (CD 抗原)  
CGM : continuous glucose monitoring (持続血糖測定)  
ChIP assay : chromatin immunoprecipitation assay (クロマチン免疫沈降法)  
CTD : C-terminal domain (C 末端ドメイン)  
CVD : cardiovascular disease (心血管疾患)  
DAMPs : damage-associated molecular patterns (傷害関連分子パターン)  
DECODE : Diabetes Epidemiology: Collaborative analysis Of Diagnostic criteria in Europe  
DPP-4 : dipeptidyl peptidase-4 (ジペプチジルペプチダーゼ-4)  
eNOS : endothelial nitric oxide synthase (内皮型一酸化窒素合成酵素)  
E-selectin : ELAM-1, endothelial-leukocyte adhesion molecule 1  
 $\gamma$ -GTP :  $\gamma$ -glutamyltransferase  
GIP : glucose-dependent insulintropic polypeptide  
(グルコース依存性インスリン分泌刺激ポリペプチド)  
GK rat : Goto-Kakizaki rat  
GLP-1 : glucagon-like peptide-1 (グルカゴン様ペプチド-1)  
HAT : histone acetyl transferase (ヒストンアセチル基転移酵素)  
hCLS : hepatic crown-like structure  
HDAC : histone deacetylase (ヒストン脱アセチル化酵素)  
HDL-cholesterol : high density lipoprotein cholesterol  
ICAM-1 : intracellular adhesion molecule-1  
IFN- $\gamma$  : interferon- $\gamma$   
IL : interleukin (インターロイキン)  
IRS-1 : insulin receptor substrate -1 (インスリン受容体基質-1)  
LDL-cholesterol : low density lipoprotein cholesterol

MAGE : mean amplitude of glycemic excursions (平均血糖変動幅)  
MeRIA7 : Meta-analysis of Risk Improvement with Acarbose 7  
NASH : non-alcoholic steatohepatitis (非アルコール性脂肪性肝炎)  
NE : neutrophil elastase (好中球エラスターゼ)  
NEFA : non-esterified fatty acids (遊離脂肪酸)  
NF- $\kappa$ B : nuclear factor- $\kappa$ B  
NO : nitric oxide (一酸化窒素)  
O-GlcNAc : O-linked  $\beta$ -N-acetyl glucosamine  
OGTT : oral glucose tolerance test (経口グルコース負荷試験)  
OLETF rat : Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty rat (OLETF ラット)  
OSTT : oral sucrose tolerance test (経口スクロース負荷試験)  
P-TEFb : positive elongation factor b  
QOL : Quality of life (生活の質)  
RAGE : receptor for AGE (終末糖化産物受容体)  
ROS : reactive oxygen species (活性酸素種)  
sE-selectin : soluble form of E-selectin (可溶性 E-セレクトイン)  
sICAM-1 : soluble form of ICAM-1 (可溶性 ICAM-1)  
SMBG : self-monitoring of blood glucose (自己血糖測定)  
STOP-NIDDM : Study TO Prevent Non-insulin-dependent diabetes mellitus  
STZ : streptozocin (ストレプトゾトシン)  
sVCAM-1 : soluble form of VCAM-1 (可溶性 VCAM-1)  
TG : triacylglycerol, triglyceride  
TLR4 : Toll-like receptor 4 (Toll 様受容体 4)  
TNF- $\alpha$  : tumor necrosis factor- $\alpha$  (腫瘍壊死因子- $\alpha$ )  
tPAI-1 : total plasminogen activator inhibitor-1  
VCAM-1 : vascular cell adhesion molecule-1  
vWf : von Willebrand factor (フォンウィルブランド因子)

## はじめに

### 我が国における糖尿病の実態

生活習慣の欧米化に伴い、我が国では生活習慣に起因する疾患である2型糖尿病の有病率が高くなっている。厚生労働省によって3年に1度、全国で実施される患者調査によると、2014年調査における糖尿病の患者数は316万6000人となり、2011年調査の270万人から46万6000人増え、過去最多となった[1]。さらに、2012年に実施された国民栄養・健康調査における推計では、「糖尿病を強く疑われる人」は約950万人と、前回調査が行われた2007年から約60万人増加した。「糖尿病の可能性を否定できない人」も約1100万人にのぼり、糖尿病および糖尿病予備軍を合わせると、日本国民の5人に1人がこれに該当することからも、糖尿病の発症予防・早期発見・治療介入による合併症予防への対策が急務とされる[2]。

### 2型糖尿病の成因

糖尿病は1型糖尿病、2型糖尿病、その他特定の機序・疾患による糖尿病、妊娠糖尿病に分類されるが、日本人の糖尿病の90%以上を2型糖尿病が占めている。2型糖尿病は、遺伝素因と環境因子が関与する多因子疾患であり、糖尿病になりやすい遺伝素因に、肥満、過食、運動不足、ストレスなどの環境因子が加わって発症に至る。また、2型糖尿病の初期は自覚症状に乏しく、罹患者が気づき始めたときには、糖尿病の合併症である網膜症、糖尿病性腎症、神経障害および動脈硬化性疾患などを認めることも少なくない。さらに発症後では完治するのが困難なため、莫大な医療費がかかることから、発症を未然に防ぐことが必要である。

2型糖尿病は、唯一の血糖上昇抑制ホルモンであるインスリンの分泌不全と、組織でのインスリン感受性の低下（インスリン抵抗性）がさまざまな程度に関与し、結果として相対的なインスリン作用の不足が起こることによって慢性的な高血糖となる疾患で、種々の特徴的な代謝異常を伴う。正常な状態では、血中グルコース濃度が上昇すると膵臓のβ細胞からインスリンが分泌される。分泌されたインスリンの作用によって、肝臓での糖新生が抑制され、骨格筋における糖の取り込み、肝臓・脂肪組織における脂肪合成が促進される。インスリン不足やインスリン作用の異常は、これらのカスケードを障害し、結果として高血糖状態をもたらす。

2型糖尿病発症前における初期の代謝異常は、食後高血糖である。食後高血糖は、過食などの生活要因による急激な糖の流入に対するインスリン作用の不足によって引き起こされる。食後高血糖に伴って過剰分泌されるインスリンによる血糖低下作用は、各組織におけるインスリン抵抗性および膵β細胞の疲弊によって減弱し、やがて空腹時血糖値の上昇をもたらす。このように食後高血糖の繰り返しは、不可逆的なインスリン作用不足の発端になることから、2型糖尿病の発症予防における食後高血糖の抑制は重要である。実際に、多くの研究において、ヘモグロビンA1c (HbA1c) に

代表されるような血糖値の平均を示す値よりも、食後血糖値の上昇の方が、2型糖尿病の発症および合併症の発症・進展に強く関連することが示されている[3-6]。それに加え、食後高血糖は2型糖尿病における心血管疾患（cardiovascular disease : CVD）の発症に関する独立した危険因子であることがコホート研究にて明らかにされている[7]。さらに、耐糖能異常者（STOP-NIDDM）および2型糖尿病患者（MeRIA7）における介入研究では、 $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害剤（ $\alpha$ -GI）アカルボースによって食後高血糖を抑制すると、CVDの発生率が劇的に低下することが報告されている[8-11]。

## 2型糖尿病と炎症

近年、2型糖尿病は慢性的な炎症疾患であるという概念が定着しつつある。特に食後高血糖は、ミトコンドリアにおける糖代謝の急速な増強による活性酸素種（ROS）の産生を誘導し、白血球を活性化する[12]。活性化された白血球はインターロイキン（IL）-1 $\beta$  や tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  等の炎症性サイトカインを分泌する[13,14]。これら炎症性サイトカインは、単球・マクロファージの活性化や組織への単球の浸潤を引き起こすことが知られている[15]。さらに、炎症性サイトカインは単球の浸潤を介さずに、カスパーゼ経路を活性化することにより各組織でアポトーシスを誘導し、直接的に炎症を引き起こすことが報告されている[16]。また IL-1 $\beta$  やインターフェロン（IFN）- $\gamma$  等が膵臓の $\beta$ 細胞のアポトーシスを引き起こすことも知られている[17,18]。他にも、これら炎症性サイトカインの発現増大は、血管上皮への単球の浸潤を誘導することにより、アテローム性動脈硬化症のリスクを高めることや[19,20]、IL-1 $\beta$  や IL-6 および TNF- $\alpha$  の発現増大は、インスリン抵抗性の主要な要因であることなどが報告されている[15]。近年、多くの疫学研究において、これら炎症に関与する因子と2型糖尿病が強く関連することが報告されており、日本および欧米諸国での横断研究によって、血中の IL-1 $\beta$  や TNF- $\alpha$  タンパク質濃度は、肥満、耐糖能異常または2型糖尿病と正の相関を示すことが明らかとなっている[21-23]。

## 食後高血糖による CVD 発症リスク

食後高血糖は、血管における炎症を促進することによって血管内皮障害を引き起こし、CVDの発症・進展をもたらす可能性があることが示されている。活性化された白血球から分泌された炎症性サイトカインは、血管内皮細胞表面に存在する細胞接着分子（E-selectin, ICAM-1, VCAM-1）の発現を誘導する[24-26]。また、白血球より分泌された炎症性サイトカインは、さらなる白血球の活性化をもたらし、血管内皮細胞上の細胞接着分子に対する受容体である CD11a-c 等のインテグリン分子を白血球表面に発現させる[27]。これら細胞接着分子により、白血球、特に好中球の血管内皮への接着が増強され、白血球は血管内皮に浸潤する過程でさらに ROS や強力なプロテアーゼである好中球エラスターゼを分泌しながら、結果として血管内皮障害を引き起こす[28,29]。日本人対象者を含めた2型糖尿病患者における縦断研究および横断研究では、血中における可溶性細胞接着分子 sE-selectin 濃度と、動脈硬化に関連する臨床検



査値および CVD のその後の罹患率との間には、正の相関があったことが報告されている[29-32]。それゆえ、食後高血糖による CVD の発症は、炎症性サイトカインおよび細胞接着分子などの CVD 発症リスク因子の増大を介して引き起こされている可能性があると考えられる。

## 2型糖尿病における食後高血糖抑制薬の近況

現在の2型糖尿病患者に対する経口糖尿病薬による治療は、食後血糖値を効率的に低下させることのできる  $\alpha$ -GI や dipeptidyl peptidase-4 (DPP-4) 阻害薬が主流となりつつある。

$\alpha$ -GI は、小腸の二糖類水解酵素の活性を抑制することで炭水化物の消化・吸収を遅延させ、食後高血糖を抑制する[33]。現在、糖尿病治療薬は作用機序の異なる様々なものが開発されており、臨床の場では患者それぞれの状態に合わせて薬剤が選択される。炭水化物の摂取量の多い日本人においては、 $\alpha$ -GI が糖尿病治療薬の第一選択となることが多い。 $\alpha$ -GI の中でもミグリトールは、アカルボースやボグリボースといった他の  $\alpha$ -GI と異なり、小腸上部で吸収され、高用量で患者に投与できるという特徴を持つ。このことにより、ミグリトールは他の  $\alpha$ -GI に比べ食後 1 時間の血糖値を強力に抑制するとともに、食後 2-3 時間における阻害作用は比較的少ないため、結果として血糖振幅を穏やかにする。本研究室では、インスリン分泌能が低いことによって2型糖尿病を発症する GK ラットおよび過食による肥満から2型糖尿病を自然発症する OLETF (Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty) ラットに対し、ミグリトール添加食を長期投与すると、膝疲弊が抑制されることを明らかにしている[34,35]。

DPP-4 阻害薬は、消化管ホルモンであるインクレチンを増強することによって食後高血糖を抑制する[36]。これらインクレチンには、グルカゴン様ペプチド-1 (GLP-1) と、グルコース依存性インスリン分泌刺激ポリペプチド (GIP) 等がある。これらのホルモンは、食事刺激に应答して腸管より分泌され、膵  $\beta$  細胞からのインスリンの分泌を増強する。DPP-4 阻害薬は、GLP-1 および GIP を分解するタンパク質分解酵素である DPP-4 を阻害することによって、これらインクレチンの血中濃度の上昇に伴うインスリン分泌促進効果により高血糖を改善する。DPP-4 阻害薬の利点は、GLP-1 による膵  $\beta$  細胞のインスリン分泌促進作用を高めるとともに、その分泌能力を保護する点にある。さらに、インクレチンは高血糖の場合にのみインスリン分泌を促進し、正常血糖域ではインスリン分泌を促進しない。そのため、2型糖尿病治療薬において危惧される低血糖のリスクが少ない。

このように、 $\alpha$ -GI および DPP-4 阻害薬は、それぞれ作用機序の異なる薬剤であるが、ともに食後高血糖を効果的に抑制し、副作用のリスクが少ない。さらに近年では、高血糖のみでなく低血糖を含めた全体的な血糖振幅の抑制が、2型糖尿病患者における合併症、特に大血管障害の発症予防に重要であることが示唆されている[37]ことから、経口糖尿病薬の効果的な使用による食後高血糖の抑制および低血糖の出現の低下を含む血糖振幅の改善が重要視されている。

以上のことから、生活習慣の乱れなどによる食後高血糖の繰り返しが、炎症性サイトカインや細胞接着分子などの CVD 発症リスク因子の発現を増大させ、2 型糖尿病の発症・進展を促進する可能性が考えられる。しかしながら、食後高血糖の抑制により、炎症が低減されるかは明らかではない。さらに、食後高血糖の繰り返しによって、慢性的な炎症が引き起こされ、2 型糖尿病の発症に至る機構も明らかとなっていない。そこで本論文では、食後高血糖の抑制によって炎症が低減され、2 型糖尿病の発症・進展が抑制されるかを、2 型糖尿病モデル OLETF ラット（第 1 章）および 2 型糖尿病患者（第 2 章）において検討した。さらに第 3 章では、食後高血糖の履歴が、細胞にどのような分子機構によって記憶・蓄積され、炎症の慢性化をもたらすのかを明らかにするため、ヒト単球様 THP-1 細胞を用いて、短期間の高血糖曝露による炎症関連遺伝子の発現増大に対するエピゲノム情報の関与について検証した。

## 第 1 章

# 2 型糖尿病モデル OLETF ラットにおける食後高血糖抑制による 炎症リスクの低減作用

## 第1章 序論

2型糖尿病は、遺伝的素因および環境的要因から成る複合的要因によって発症する。2型糖尿病発症の主要なリスク要因には、過食あるいは運動不足、またはその両方による体重の増加がある。過食は、膵β細胞からのインスリン分泌過剰をもたらし、体重増加およびインスリン抵抗性を誘導する[38]。インスリン抵抗性は、特に食後増大する血糖に対して分泌されるインスリンの作用の減弱を引き起こすことによって、食後高血糖を誘導する。

近年の多くの研究において、HbA1cに代表されるような血糖値の平均的な上昇よりも、食後血糖値の上昇の方が、その後の2型糖尿病の発症および合併症の発症・進展に強く関与することが示されている[3-6]。それに加え、食後高血糖は2型糖尿病における心血管疾患（CVD）の発症に関する独立した危険因子であることがコホート研究によって明らかにされている[7]。さらに、耐糖能異常者（STOP-NIDDM）および2型糖尿病患者（MeRIA7）に対する介入研究では、食後高血糖を抑制することによって、CVDの発生率が低下することが報告されている[8-11]。これらの報告は、前糖尿病の段階からの食後高血糖の抑制は、CVDの発症・進展を抑制することを示唆している。

食後高血糖は、ミトコンドリアにおける糖代謝の急速な増強による活性酸素種（ROS）の産生を誘導し、白血球を活性化する[12]。活性化された白血球は、炎症性サイトカインを分泌し[13,14]、血管内皮細胞表面に細胞接着分子の発現を誘導する[24-26]。また、白血球より分泌された炎症性サイトカインは、さらなる白血球の活性化をもたらし、血管内皮細胞上の細胞接着分子に対する受容体であるインテグリン分子を白血球表面に発現させる[27]。これら細胞接着分子により、白血球、特に好中球の血管内皮への接着が増強される。さらに好中球は、血管内皮に浸潤する過程で、ROSや強力なプロテアーゼである好中球エラスターゼ（NE）を分泌し、結果として血管内皮の傷害を引き起こす[28,29]。血管内皮の傷害は、CVD等の血管合併症の直接の原因となるのみでなく、血管内皮機能の減弱をもたらすことによってインスリンの末梢組織への移行を妨げる[39,40]。これらのことから、食後高血糖によって発現誘導された炎症性サイトカインおよび細胞接着分子は、血管内皮における炎症を増大させ、2型糖尿病の発症・進展およびCVDの発症を促進していると考えられる。

そこで本章では、食後高血糖の抑制が、末梢血白血球からの炎症性サイトカインおよび動脈組織における細胞接着分子の発現を低下させることによって、2型糖尿病の発症・進展およびCVDの発症を抑制するかを調べるため、2型糖尿病モデル OLETFラットを用いて以下の検討を行った。

本章第1節では、単回の食後高血糖の抑制が、末梢血白血球におけるCVD発症リスク因子の発現増大を抑制するかを検討した。具体的には、2型糖尿病モデル OLETFラットに対して経口糖負荷試験を行い、インスリン非依存性（ $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害

剤(GI)ミグリトール)あるいはインスリン依存性(DPP-4 阻害剤アナグリプチン)の食後高血糖抑制剤によって、食後高血糖を抑制した時の炎症関連遺伝子の発現量を調べた。

本章第2節では、ミグリトールまたはアナグリプチンの長期的な投与が、末梢白血球および下大動脈組織におけるCVD発症リスク因子の発現を抑制するかを、2型糖尿病モデルOLETFラットを用いて検討した。

本章第3節では、好中球から分泌されるNEが、食後高血糖によって誘導される動脈組織の炎症に関与するかを検討した。具体的には、OLETFラットに糖負荷を1日1回、8日間行うことによって食後高血糖モデルを作製し、NEの活性を選択的に阻害する薬剤であるシベレスタッドナトリウム水和物を糖負荷と同時に繰り返し投与し、動脈組織におけるCVD発症リスク因子の発現が抑制されるかを検討した。

## 第1章 第1節

単回の食後高血糖抑制による心血管疾患発症リスク因子の  
発現抑制効果

## 序

2型糖尿病は、遺伝素因や環境要因といった複合的な要因から引き起こされる他因子疾患であり、2型糖尿病の進展は、糖尿病性網膜症、腎症、神経症等の多くの合併症の発症をもたらす。さらに、心血管疾患（CVD）のような動脈硬化疾患の発症リスクが、2型糖尿病の罹患により高くなることが多くの研究で明らかとなっている。また、糖尿病を発症していない対象者においても、食後血糖値の増大が CVD 発症リスクを増大させることも報告されている。例えば、舟形研究や DECODE 研究等の大規模疫学研究では、空腹時血糖値よりも耐糖能異常が、その後の CVD 発症と強く正に相関することが報告されている[4,6]。また、STOP-NIDDM 研究では、 $\alpha$ -GI であるアカルボースを耐糖能異常者に投与し食後高血糖を抑制すると、2型糖尿病およびCVDの発生率が顕著に減少したことを報告している[8-10]。これらのことから、耐糖能異常者や2型糖尿病における食後高血糖の抑制は、合併症、特に CVD の予防に重要であると考えられる。

近年、糖尿病合併症の発症には、活性化した白血球（好中球・単球）から分泌される IL-1 $\beta$ 、IL-8、IL-18、TNF- $\alpha$  などの炎症性サイトカインや炎症性サイトカイン様因子 S100 タンパク質が関与する可能性が報告されている。これまでに耐糖能異常者や2型糖尿病患者において、インスリン抵抗性指数や血中グルコース濃度と、IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-12、IL-18、TNF- $\alpha$  の血中タンパク質濃度が正に相関することが報告されている[21,41]。これらの炎症性サイトカインは単球・マクロファージの活性化を促すとともに、さまざまな組織におけるマクロファージの組織内浸潤を促進し、インスリン抵抗性、膵 $\beta$ 細胞のアポトーシス、動脈硬化症、腎症といった多くの病態や合併症の発症をもたらす[15-20]。それゆえ、高血糖、特に食後の血糖上昇の抑制は、炎症性サイトカインの発現を低下させることによって、2型糖尿病の発症・進展および合併症の発症を抑制すると考えられる。

本研究室の先行研究では、 $\alpha$ -GI であるミグリトールによって食後高血糖を抑制すると、ストレプトゾトシン（STZ）誘導性インスリン分泌不全ラットの末梢血白血球における IL-1 $\beta$ 、IL-18、TNF- $\alpha$  等の炎症性サイトカイン遺伝子の発現量が低下することを報告している[42]。 $\alpha$ -GI は、小腸の二糖類水解酵素の活性を抑制することで炭水化物の消化・吸収を遅延させ、食後高血糖を抑制する[33]。現在、糖尿病治療薬は作用機序の異なる様々なものが開発されており、臨床の場では患者それぞれの状態に合わせて薬剤が選択される。炭水化物の摂取量の多い日本人においては、 $\alpha$ -GI が糖尿病治療薬の第一選択となることが多い。 $\alpha$ -GI の中でもミグリトールは、アカルボースやボグリボースといった他の  $\alpha$ -GI と異なり、小腸上部で吸収されるため、高用量で患者に投与できるという特徴を持つ。このことにより、ミグリトールは他の  $\alpha$ -GI に比べ食後1時間の血糖値を強力に抑制する一方で、食後2-3時間における阻害作用は比較的少ないため、結果として血糖振幅を緩やかにする。本研究室では、インスリン分泌

能の低下から徐々に2型糖尿病を発症する GK ラット、および過食による肥満から2型糖尿病を自然発症する OLETF ラットに対し、ミグリトール添加食を長期投与すると、膵疲弊が抑制されることを明らかにしている[34,35]。

また近年、GLP-1 および GIP 等のインクレチンホルモンの作用増強によって食後高血糖を抑制する DPP-4 阻害剤が開発された[36]。DPP-4 阻害剤は、DPP-4 によるインクレチンの不活性化を阻害することによってインクレチンの血中濃度を保ち、膵β細胞における cAMP 濃度の上昇[43]を介して、生理的なインスリン分泌を増強する薬剤である。インクレチンによるインスリン分泌の増強は、グルコース濃度依存的に惹起され[44]、ある一定以上のグルコース存在下でのみ発揮されるため[45,46]、2型糖尿病治療薬において危惧される低血糖のリスクが少なく、さらに食後血糖値とともに空腹時血糖値に対しても効果を発揮する[47,48]。

このように、α-GI であるミグリトールは消化管における炭水化物の消化・吸収を阻害し、食後高血糖を抑制する。一方で DPP-4 阻害剤は、インクレチン効果の増強によって膵β細胞の機能を補助し、血糖値を低下させる。この2種類の糖尿病治療薬は、それぞれインスリン非依存性あるいはインスリン依存性の薬剤であるが、共に血糖の振幅を緩やかにし、食後高血糖を効果的に抑制する。よってこれらの薬剤は、末梢白血球における炎症関連遺伝子の発現を抑制し、CVD の発症リスクを減少させることが考えられる。しかしながら、インスリン依存的または非依存的機序による単回の食後高血糖の抑制が、末梢白血球における炎症関連遺伝子の発現を抑制するかは明らかでない。そこで本節では、コレシストキニン (CCK) -A 受容体欠損ラットであり、過食による肥満から徐々に高インスリン血症、高血糖、脂質異常症を呈し、2型糖尿病を自然発症する OLETF ラットに対し、単回の経口スクロース負荷試験を行い、末梢白血球における炎症関連遺伝子の発現が増大するかを調べた。さらに、α-GI であるミグリトールあるいは DPP-4 阻害剤であるアナグリプチンを投与し、食後高血糖を抑制した場合に、これらの遺伝子発現が抑制されるかを検討した。



## 方法

### 1) 実験動物

4週齢の雄性 OLETF ラット 24 匹を大塚製薬株式会社大塚 GEN 研究所（徳島）より搬入した。ラットはすべて個別のケージにて飼育し、飼育期間中は室温  $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度  $55 \pm 5\%$ 、12 時間明暗サイクル（明期 7-19 時、暗期 19-7 時）を一定に保った。10 日間普通固形飼料（MF: オリエンタル酵母株式会社、東京）を用いて馴化させた後、すべてのラットに 40%スクロース水を 6-10 週齢の間、自由飲水させた。その後、スクロース水をやめ、すべてのラットに基準食（カゼイン 20%、コーンスターチ 27.8%、スクロース 27.8%、コーン油 9.5%、ラード 5%、AIN93 ビタミンミックス 3.5%、AIN93G ミネラルミックス 1%、セルロース 5%、L-システイン 0.3%、コリン酒石酸 0.25%）および水を 13 週齢まで自由摂食させた。14 時間絶食をさせた後、尾先端より採血を行い、軽度のインスリン抵抗性を発症していることを確認し、体重および採血結果（空腹時血糖値、TG、HbA1c）に基づいて、8 匹ずつ 3 群に群分けした。体重および検査値において、3 群間に有意な差はなかった（血糖値： $142.7 \pm 1.8 \text{ mg/dL}$ 、HbA1c： $4.8 \pm 0.1\%$ 、体重： $453.1 \pm 1.2 \text{ g}$ ）。群分け後も、経口スクロース負荷試験までの期間は、すべてのラットに対して基準食を与えて飼育した。なお、本実験は静岡県立大学における動物実験に関する指針に従って実施した。

### 2) 経口スクロース負荷試験 (OSTT)

13 週齢ラットに対し、各群 2-3 匹ずつ、3 日間にわたって経口スクロース負荷試験 (OSTT) を行った。6 時間絶食させたラットの空腹時血液を採取した後、DPP-4 阻害剤アナグリプチン投与群に対しては、スクロース投与 30 分前にアナグリプチンを経口投与した ( $3 \text{ mg/kg}$  体重)。また  $\alpha$ -GI ミグリトール投与群に対してはスクロース水溶液にミグリトールを添加して経口投与した ( $1 \text{ mg/kg}$  体重)。薬剤を投与しないコントロール群については、投与量を一定にするために水を経口投与した。スクロースおよび薬剤の投与量は体重  $1 \text{ kg}$  あたりで算出した。スクロースの投与量は  $2 \text{ g/kg}$  体重とし、コントロール群については、40%スクロース水溶液を体重  $1 \text{ kg}$  あたり  $5 \text{ mL}$  投与し、ミグリトール群には 40%スクロース/ $200 \text{ mg/mL}$  ミグリトール水溶液を体重  $1 \text{ kg}$  あたり  $5 \text{ mL}$  投与した。アナグリプチン群には、アナグリプチン水溶液を投与してから 30 分後に 40%スクロース水溶液を体重  $1 \text{ kg}$  あたり  $5 \text{ mL}$  投与した。ミグリトールおよびアナグリプチンは、両剤ともに三和化学研究所（三重）より提供していただいた。

### 3) 血液サンプルの採取

アナグリプチン群は、アナグリプチン投与前に空腹時採血を行い、他の 2 群はスクロース負荷前に空腹時採血を行った。その後スクロースを経口投与してから 15、30、

60、90、120、180 分後に尾先端から血液を採取した。血糖測定用血液は、微量採血管（フッ化ナトリウム - ヘパリンリチウム処理、テルモ株式会社、東京）で採取した。採取した血液は、4°C、3,000 rpm（MX-305、トミー精工株式会社、東京：以下、遠心分離は同機種で行った。）で 10 分間遠心して血漿を得た。血漿は直ちに凍結させ、測定を行うまで-80°Cで保存した。mRNA 用の血液は、OSTT 開始時（0 分時）およびスクロース負荷 180 分後のものを採取した。mRNA 用の血液は採取後、予め PAX gene 固定液（BD バイオサイエンス、Franklin Lakes、NJ、USA）を 0.5 mL 入れておいた 1.5 mL チューブに入れ、速やかに混和した後、24 時間室温に放置し、測定を行うまで-80°Cで保存した。

#### 4) 血漿グルコース濃度の測定

血漿グルコース濃度の測定には、グルコース CII-テストワコーキット（和光純薬工業株式会社、大阪）を使用した。血糖値測定用に採取した血漿 3  $\mu$ L に 60 mM リン酸緩衝液 pH 7.1（含フェノール 5.3 mmol/L）に発色剤（含ムタロターゼ 0.13 単位/mL、グルコースオキシダーゼ 9.0 単位/mL、ペルオキシダーゼ 0.65 単位/mL、4-アミノアンチピリン 0.50 mmol/mL、アスコルビン酸オキシダーゼ 2.7 単位/mL）を溶解した発色試薬 300  $\mu$ L を加え、よく混和させた後、37°Cで 5 分間インキュベートした。この時、キット付属のグルコース標準液についても同様に操作を行った。その後、マイクロプレートリーダーを用い、2 波長測光法（主波長 505 nm、副波長 600 nm）にて吸光度を測定した。標準液から標準曲線を作成し、サンプルの血漿グルコース濃度を求めた。

#### 5) 定量的リアルタイム PCR による mRNA 発現量の測定

##### ① 総 RNA の抽出

総 RNA の抽出は、RNeasy mini Kit（キアゲン株式会社、Venlo、Netherlands）を用いて行った。凍結保存しておいた血液を室温で融解し、25°C、13,000 rpm、10 分間遠心し、上澄みを捨て、500  $\mu$ L の DNase/RNase free water を入れ、攪拌した。再び 25°C、13,000 rpm、10 分間遠心し、上澄みを捨てる操作を 3 回繰り返した後、得た沈殿に 350  $\mu$ L の RLT with  $\beta$ -ME（使用する直前に RLT 1 mL に対し 10  $\mu$ L の  $\beta$ -メルカプトエタノールを加えたもの）を入れ、攪拌しつつ 55°Cで 15 分加温して沈殿を完全に溶かした。25°C、14,000 rpm、10 分間遠心し、上澄みを別のチューブへ移し、そこへ 350  $\mu$ L の 70 %エタノールを加えた後、ピペティングでよく混ぜ、全量をカラムに移した。カラムを 25°C、5,000 rpm、2 分間遠心し、溶出液を捨てた後、700  $\mu$ L の RW1 バッファーを入れ 25°C、5,000 rpm、2 分間遠心し、溶出液を捨てた。500  $\mu$ L の RPE バッファーを入れ 25°C、5,000 rpm、2 分間遠心し、溶出液を捨てた。この作業をもう一度繰り返した後、溶出液を捨て、25°C、13,000 rpm、2 分間遠心した。最後に総 RNA を集めるために新しいチューブに代えて、30  $\mu$ L の DNase/RNase free water をカラムの上のフィルターに加え 2 分間放置し、25°C、10,000 rpm、1 分間遠心をして溶出液を回収する作業を 2 回行った。

## ② RNA 濃度の定量

Quant-it<sup>TM</sup> RNA reagent (インビトロジェン株式会社、Waltham, MA, USA) を Quant it RNA Buffer で 200 倍希釈した溶液 198  $\mu$ L に、抽出した RNA 溶液 2  $\mu$ L を加え攪拌した後、インビトロジェン株式会社の Qubit<sup>TM</sup> fluorometer で蛍光強度を測定した。標準 RNA 溶液と蛍光強度を比較することにより RNA 濃度を求めた。

## ③ cDNA の合成 (逆転写反応)

総 RNA が 100 ng 含まれるように調整し、Random Primer (25  $\mu$ M、タカラバイオ株式会社、滋賀) 2  $\mu$ L と DNase/RNase free water を合わせて 12.25  $\mu$ L になるように混和した。ヒートブロックにて 70°C で 10 分間反応させた後、10 分間氷上で冷却させた。各チューブに cDNA 合成用混合液 (5 $\times$ "Firststrand buffer" (Superscript III Reverse transcriptase、インビトロジェン株式会社) 4  $\mu$ L、0.1M DTT 2  $\mu$ L、dNTP-MIX (10 mM each dNTP) 1  $\mu$ L、RNase inhibitor (和光純薬工業株式会社) 0.25  $\mu$ L、Superscript III 0.5  $\mu$ L) を 7.75  $\mu$ L 入れて混和し、45°C で 2 時間反応させた後、70°C で 10 分間反応させた。4 mg/mL の RNaseA (シグマ-アルドリッチ株式会社、St. Louis, MI, USA) を 1  $\mu$ L 加え、37°C で 30 分間反応させた後、使用するまで -80°C で保存した。

## ④ 定量的リアルタイム PCR

逆転写 PCR は、Universal Probe Library (ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社、Basel, Switzerland) を用いて行った。cDNA 2  $\mu$ L と混合液 (Light Cycler 480 Probes Master 5  $\mu$ L、DNase RNase free water 2.7  $\mu$ L、Universal Probe Library 0.1  $\mu$ L、sense primer (20  $\mu$ M) 0.1  $\mu$ L、antisense primer (20  $\mu$ M) 0.1  $\mu$ L) 8  $\mu$ L を混合し、PCR プレート (LightCycler、ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社) に加え、専用の蓋シールで蓋をして、遠心 (1,000 rpm、10 秒間) を行った。その後、Light cycler 480 (ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社) により、Denature (95°C で 5 分間) を 1 サイクル行った後、PCR (95°C で 10 秒間、60°C で 25 秒間、72°C で 1 秒間) を 50 サイクル行い、その後 Cooling (50°C で 30 秒間) を 1 サイクル行うという条件下で増幅を行い、mRNA 発現量の測定を行った。この実験に使用したプライマーの塩基配列および Universal Probe Library の番号は **Table 1** に示した。

## ⑤ 解析

定量的 PCR を行った後に、付属のソフトウェアを使用し、それぞれの遺伝子において、対数的に上昇するサイクル数を割り出した。割り出されたそれぞれの値は 1 サイクルの違いが 2 倍の違いであるとする Delta Delta 法[49]を用い、それぞれの遺伝子の発現量を換算した。また目的の mRNA 発現量を補正するため、内部標準として HPRT を定量的 PCR 法にて同様に解析し、目的とする遺伝子の mRNA 発現量と、HPRT の mRNA 発現量の値の比を計算し、発現量の相対値を求めた。

## 6) 統計解析

実験データは平均値±標準誤差で表した。

統計解析は、エクセル統計（社会情報サービス株式会社、東京）で行った。

**Fig. 1** については一元配置分散分析、**Fig. 2** については、二元配置分散分析の Tukey の検定にて判断した。 $p < 0.05$  で有意差ありとした。

**Table 1** Sequences of the oligonucleotide primers used for real-time RT-PCR

Target mRNA	Sequence
Interleukin 1 beta (IL-1 $\beta$ ) (#78)	5'-TGTGATGAAAGACGGCACAC-3' 5'-CTTCTTCTTTGGGTATTGTTTGG-3'
Interleukin 18 (IL-18) (#76)	5'-CAACGAATCCCAGACCAGAC-3' 5'-ACATCCTTCCATCCTTCACAG-3'
Tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) (#63)	5'-GTCTACTGAACTTCGGGGTGA-3' 5'-ATGAGAGGGAGCCCATTTG-3'
S100 calcium binding protein A8 (S100a8) (#26)	5'-GCCACAAGGAGTAACAGAGCTT-3' 5'-TGACGACTTTATTCTGTAGACATATCC-3'
S100 calcium binding protein A9 (S100a9) (#85)	5'-AAGGACTTGCCAAATTTTCTGA-3' 5'-GGACAGTTGATTGTCCTGGTTT-3'
S100 calcium binding protein A11 (S100a11) (#44)	5'-CGACCGCATGATGAAGAAG-3' 5'-AAGCCACCAATAAGGTTGAGAA-3'
Interleukin-1 receptor type 2 (IL-1R2) (#116)	5'-GCAAGGTACACGAATGCAGA-3' 5'-CACACCAACTTCCAGAGTGC-3'
Interleukin-1 receptor antagonist (IL-1Rn) (#25)	5'-TCTGGAGATGACACCAAGCTC-3' 5'-GCGCTTGCTTCTTCTTTGTTC-3'
Tumor necrosis factor receptor 2 (TNF-R2) (#1)	5'-GAGGCCCAAGGGTCTCAG-3' 5'-GCTGCCATGGGAAGAATC-3'
Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT) (#22)	5'-AGTCAACGGGGGACATAAAA-3' 5'-CTTCAACAATCAAGACGTTCTTTC-3'

\*The numbers in parentheses indicate ID of a universal probe (Roche Diagnostics, Tokyo) used to detect the signals of each gene.

## 結果

### 1) 経口スクロース負荷試験 (OSTT) における血糖値の推移

13週齢の OLETF ラットに対して経口スクロース負荷試験を行い、スクロース投与前、投与 15、30、60、90、120、180 分後に採取した血液の血糖値を測定した結果を **Fig. 1** に示した。全群とも、開始 (0 分) 時の血糖値は 190 mg/dL 前後であった。薬剤を投与していないコントロール群においては、スクロース投与後から血糖値が顕著に上昇し、30 分後には最大値 (275±37 mg/dL) となった。その後 180 分時においても、他群と比べて高い傾向にあった。

$\alpha$ -GI であるミグリトールをスクロース水溶液に混和して投与したミグリトール群においては、スクロース負荷直後から血糖値の上昇が抑制され、糖負荷 15 および 30 分後の血糖値は、コントロール群と比較して有意に低かった。血糖値が最大となった 60 分時においても、血糖値は 219±64 mg/dL であった。

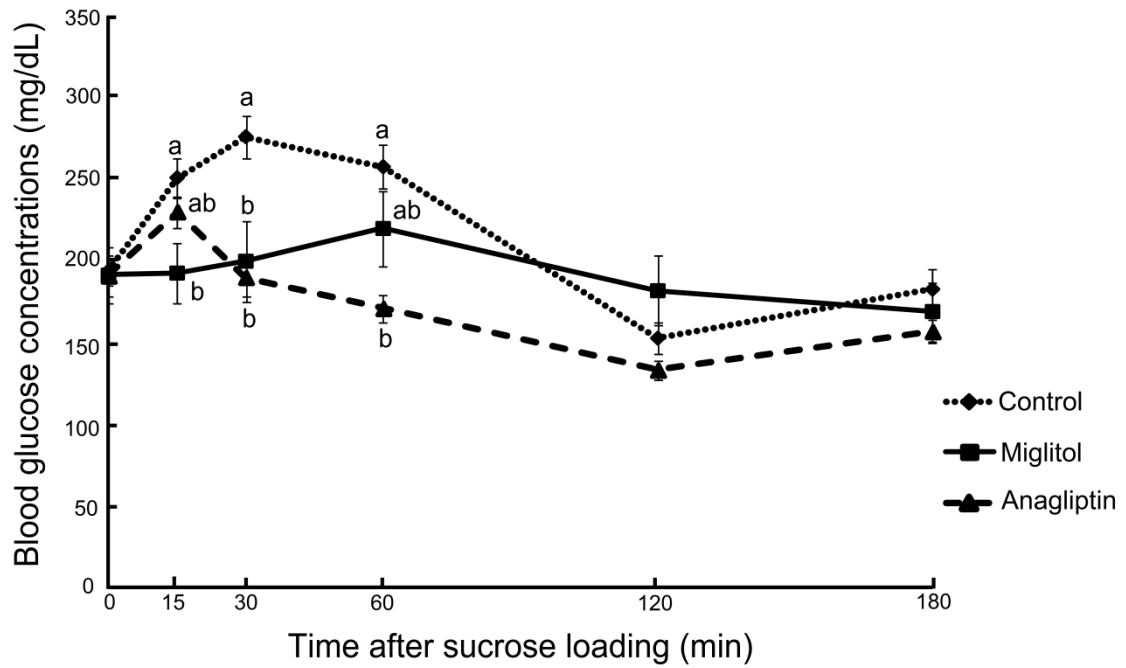
また、DPP-4 阻害剤であるアナグリプチン投与群の血糖値は、スクロース負荷 15 分後には 229±17 mg/dL と高いレベルを示したが、それ以降は低下し、スクロース負荷 30 および 60 分後の血糖値は、コントロール群と比較して有意に低かった。

### 2) 血糖上昇による末梢血白血球における炎症関連遺伝子の発現変動

経口スクロース負荷試験開始前 (0 分時) とスクロース負荷 180 分後において採取した血液を用いて、炎症性サイトカインおよび炎症性サイトカイン受容体、ならびに S100 タンパク質の mRNA 量を測定した結果を **Fig. 2** に示した。

コントロール群においては、180 分時における末梢血白血球の IL-1 $\beta$ 、IL-18、TNF- $\alpha$ 、S100a8、S100a9、S100a11、IL-1R2、IL-1Rn、TNF-R2 の mRNA の発現量は、0 分時に比べ有意に増大していた。一方、ミグリトール群、アナグリプチン群においては、末梢血白血球における炎症関連遺伝子のスクロース投与 180 分後の発現増大はみられなかった。

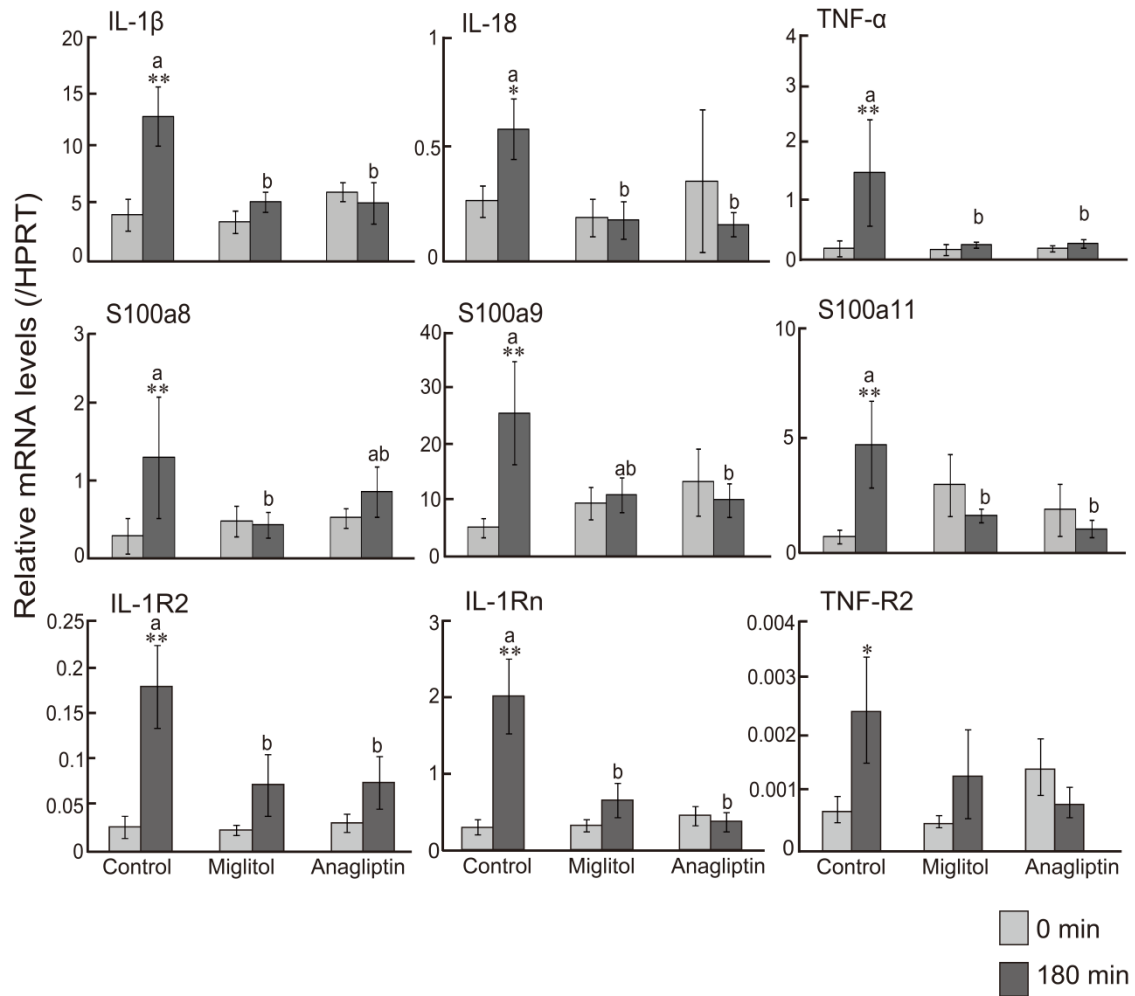
各群のスクロース負荷 180 分後における炎症関連遺伝子の発現量を比較したところ、IL-1 $\beta$ 、IL-18、TNF- $\alpha$ 、S100a11、IL-1R2、IL-1Rn の mRNA 量は、コントロール群と比べて、ミグリトール群とアナグリプチン群のいずれでも有意に低かった。また、S100a8 の mRNA 量は、コントロール群と比べてミグリトール群で有意に低く、S100a9 の mRNA 量は、コントロール群と比較してアナグリプチン群で有意に低かった。



**Fig. 1** Changes in the blood glucose concentration following oral sucrose loading with or without miglitol or anagliptin to OLETF rats.

The symbols and bars represent the mean  $\pm$  SEM (n=8).

<sup>a-b</sup>Values not sharing a common superscript are significantly different (as determined by Tukey's test based on a one-way ANOVA) from each other at each time point ( $p < 0.05$ ).



**Fig. 2 Quantitative RT-PCR analysis of inflammation-related genes in the peripheral leukocytes of OLETF rats subjected to oral sucrose loading with or without miglitol or anagliptin.**

Values represent the mean  $\pm$  SEM of 5-8 animals.

Values not sharing a common letter are significantly different from one another among the treatment groups after 180 min (as determined by Tukey's test based on repeated two-way ANCOVA).

Asterisks denote significant differences (Tukey's test based on repeated two-way ANCOVA) compared with the 0 min value (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ).



## 考察

食後高血糖は、インターロイキン (IL) や TNF- $\alpha$  等の炎症性サイトカインの発現を誘導し、膵臓の  $\beta$  細胞のアポトーシス[16]や粥状動脈硬化、心血管疾患[19]、インスリン抵抗性[15]を引き起こし、糖尿病合併症の発症リスクを増大させることが知られている。特にこれまでの疫学研究において、血糖値の総和を反映する HbA1c よりも、食後 2 時間値の方が、その後の CVD による死亡率と関連があることが報告されている[3-6]。それゆえ、食後高血糖の繰り返しが、これら炎症関連遺伝子の発現を増大させ、2 型糖尿病および合併症の発症進展を促進する可能性が高いと考えられる。しかしながら、持続的な高血糖状態が炎症を増大させる実験科学的根拠は多く報告されているが、単回の食後高血糖が直接炎症を増大させるかは明らかでない。

本節では、2 型糖尿病発症前の軽度のインスリン抵抗性を有する自然発症糖尿病 OLETF ラットを用いて経口スクロース負荷試験を行い、負荷前と負荷後の末梢血白血球における炎症関連遺伝子の発現を調べた。また、2 型糖尿病治療薬である  $\alpha$ -GI および DPP-4 阻害剤のいずれの血糖降下薬の投与によっても、それら遺伝子の発現が抑制されるかを調べた。その結果、OLETF ラットに対する単回の経口スクロース負荷は、食後高血糖とともに、末梢血白血球における IL-1 $\beta$ 、IL-18、TNF- $\alpha$ 、S100a8、S100a9、S100a11、IL-1R2、IL-1Rn、TNF-R2 等の炎症関連遺伝子の発現増大をもたらすことが明らかとなった。

軽度耐糖能異常 OLETF ラットにスクロースを経口負荷すると (コントロール群)、血糖値が顕著に上昇したが、ミグリトールもしくはアナグリプチンをスクロース負荷時 (ミグリトール群) あるいはスクロース負荷 30 分前 (アナグリプチン群) に投与すると、血糖上昇が有意に抑制された。ミグリトールは、小腸の二糖類水解酵素の活性を抑制することによって、食後高血糖を抑制する薬剤であり、インスリン分泌を抑制する方向に働くものである。それゆえ、今回の経口スクロース負荷試験におけるミグリトールによる血糖値の抑制効果は、スクロースの消化・吸収が緩慢化したためであると考えられた。一方で DPP-4 阻害剤であるアナグリプチンは、インスリン分泌促進作用を持つインクレチン (GLP-1 および GIP) を分解する DPP-4 を阻害することによって、血中インクレチン濃度を上昇させ、その結果としてインスリン分泌を促進し、血糖値を下げる薬剤である。アナグリプチン投与によって、スクロース投与 30 分以降の血糖値が抑制されたのは、インクレチン作用の増強によるインスリン分泌の増加が予測された。

本節では、スクロース負荷試験の 0 分時および 180 分時における血液から総 RNA を抽出し、炎症関連遺伝子の発現を調べた。その結果、免疫応答や情報伝達に関わる複数の遺伝子の発現がスクロースを負荷してから 180 分後において顕著に上昇することが明らかとなった。その中には、自然免疫細胞 (好中球、単球・マクロファージ) より産生され、血管内皮細胞活性化や白血球活性化、局所組織破壊などに関わる

IL-1 $\beta$ [50]や、同じく自然免疫細胞より産生され、白血球の活性化・遊走・集積や接着因子活性化、好中球増産などに関与する TNF- $\alpha$ [51]が含まれていた。また、S100タンパク質ファミリーである S100a8 および S100a9 は、白血球上に発現する Toll 様受容体 4 (TLR4) や、血管内皮細胞表面に存在する終末糖化産物受容体 (RAGE) に結合し、炎症性サイトカイン/ケモカイン様の作用を示すことによって動脈硬化を促進することが報告されている[52-54]。さらに S100a8、S100a9 の多くはヘテロダイマーを形成して血中に存在し、炎症性サイトカインの発現誘導、マクロファージの活性化、血管内皮へのマクロファージの浸潤を引き起こすことが知られている[55-57]。また、IL-1R2 や TNF-R2 は、IL-1 $\beta$  および TNF- $\alpha$  のそれぞれの受容体である。その一方で、IL-1 $\beta$  のアンタゴニスト[58]として作用する IL-1Rn の遺伝子発現量が、単回のスクロース負荷によって上昇したことは、注目すべき点である。この結果は、単回のスクロース負荷はネガティブフィードバック機構として抗炎症性に働く可能性があることを示している。今後は、2型糖尿病の発症初期および後期の OLETF ラットにおいて、スクロース負荷試験を行った時の末梢血白血球における IL-1 $\beta$ /IL-Rn の遺伝子発現比が変化するかどうかを調べる必要があると考えられる。しかしながら、本節の結果は、食後高血糖が、肥満およびインスリン抵抗性の動物モデルにおいて、末梢血白血球における炎症関連遺伝子の発現増大をもたらすことによって CVD の発症・進展を促進する可能性を示唆している。また、本研究室のこれまでの研究によって、ストレプトゾトシン (STZ) によってインスリン分泌を低下させたラットにスクロースを経口投与すると、食後の血糖上昇に伴い末梢血白血球における炎症関連遺伝子の発現が増大することが、すでに明らかとなっている[42,59]。これらの報告および本節の結果を併せると、食後高血糖は、インスリン分泌不全あるいはインスリン抵抗性のどちらに起因する場合においても、動物モデルの末梢血白血球における IL-1 $\beta$  や TNF- $\alpha$  等の炎症関連遺伝子の発現増大を誘導すると考えられる。さらに、本節で用いた OLETF ラットに対する単回のスクロース負荷試験による IL-1 $\beta$ 、IL-18、TNF- $\alpha$  の mRNA 発現量が、先行研究で用いた STZ 投与ラットにおける発現量よりも高かったことは特筆すべきと考えられる。STZ 処置ラットは、膵  $\beta$  細胞のアポトーシス誘導によるインスリン分泌不全モデルとして知られている。一方で OLETF ラットは、過食により肥満を呈し、高インスリン血症、高血糖、脂質異常症を慢性的に発症・進展させながら緩やかに2型糖尿病を発症するモデルである[60]。最近の研究では、肥満や脂質異常等の代謝異常、いわゆるメタボリックシンドロームが、肥満や脂質異常を伴わない代謝異常よりも、CVD 発症に強く関連しているとの報告がされている[61,62]。上記の知見は、食後高血糖に対する末梢血白血球における炎症関連遺伝子の発現が、肥満や脂質異常によって増強されている可能性があることを示唆している。

本節の結果より、インスリン分泌を促進しない薬剤である  $\alpha$ -GI ミグリトールおよびインスリン分泌を促進する薬剤である DPP-4 阻害剤アナグリプチンのいずれでも、経口スクロース負荷によって末梢血白血球で誘導される炎症関連遺伝子の発現増大が抑制されることが明らかとなった。これらの結果は、末梢血白血球におけるスクロ

一誘導性の炎症関連遺伝子の発現増大は、本質的には食後高血糖によって引き起こされていることを示唆している。

本研究室の先行研究において、STZラットに対する20日間のミグリトール処置は、末梢血白血球におけるIL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、S100タンパク質の遺伝子発現を減少させることが報告されている[59]。さらに、前糖尿病段階（5週齢）のOLETFラットに対し、40週間ミグリトール処置をしたところ、末梢血白血球におけるTNF- $\alpha$ の遺伝子発現量が減少したことも明らかとなっている[63]。また、日本人2型糖尿病患者において、3ヵ月間のミグリトールの服用によってTNF- $\alpha$ の血中レベルおよび末梢血白血球における遺伝子発現量が減少することも報告されている[64]。本節の結果は、単回のスクロース負荷による末梢血白血球における炎症関連遺伝子の発現増大が、ミグリトールまたはアナグリプチンによって抑制されることを示している。よって今後は、OLETFラットにおけるミグリトールまたはアナグリプチンによる長期の食後高血糖の抑制が、末梢血白血球における炎症関連遺伝子の発現抑制や血中タンパク質レベルの低下をもたらすのかを調べる必要がある。

以上の結果より、2型糖尿病発症前の軽度耐糖能異常モデルラットにおける一過性の食後高血糖は、末梢血白血球における炎症関連遺伝子の発現増大をもたらし、炎症を促進する可能性が示唆された。さらに、炎症関連遺伝子の発現増大は、糖尿病合併症の発症進展だけでなく、2型糖尿病および耐糖能異常の発症にも関連していると考えられた。また、ミグリトールやアナグリプチンによる食後高血糖の抑制は、これら炎症関連遺伝子の発現上昇を抑制することが明らかとなった。それゆえ、2型糖尿病発症前からの食後高血糖の抑制は、炎症リスクを低減し、2型糖尿病の発症・進展、合併症の予防に繋がるものと期待される。

## 第1章 第2節

食後高血糖の長期抑制による心血管疾患発症リスク因子の  
発現抑制効果

## 序

2型糖尿病は、インスリン分泌不全とインスリン抵抗性がさまざまな程度に関与し、インスリン作用が不足することによって慢性的な高血糖を主徴とする疾患である。健康な状態においては、インスリンは血糖値の上昇に伴って膵β細胞から分泌される。分泌されたインスリンは、肝臓における糖新生を抑制するとともに、骨格筋における糖の取り込み、肝臓・脂肪組織における脂肪合成を促進する。インスリン作用の異常はこれらのカスケードを阻害し、結果として高血糖状態をもたらす。

2型糖尿病発症初期における主要なリスク要因は、過食あるいは運動不足、またはその両方による体重の増加であると考えられる。過食は、膵β細胞からのインスリン分泌過剰をもたらし、体重増加を引き起こし、インスリン抵抗性を誘導する[38]。インスリン抵抗性は、インスリンの作用減弱を引き起こすことによって、食後高血糖を誘導する。

近年の多くの研究において、食後血糖値の上昇が、その後の2型糖尿病の発症および合併症の発症・進展に強く関与することが示されている[3-6]。さらに、食後高血糖は2型糖尿病における心血管疾患(CVD)の発症に関する独立した危険因子であることがコホート研究にて明らかにされている[7]。また、耐糖能異常者および2型糖尿病患者に対する介入研究では、食後高血糖を抑制することによって、CVDの発生率が劇的に低下することが報告されている[8-11]。これらの報告は、前糖尿病の段階からの食後高血糖の抑制は、CVDの発症・進展を抑制することを示唆している。

CVDの発症には、血管内皮機能の障害が関与していることがわかっており、特に、好中球、単球・マクロファージ等の白血球の活性化による炎症性サイトカインの産生が関与すると考えられている。食後高血糖は、白血球からのIL-1βやTNF-α等の炎症性サイトカインの分泌を促進し[13,14]、血管内皮細胞表面に細胞接着分子(E-selectin, ICAM-1, VCAM-1)の発現を誘導する[24-26]。さらに、白血球より分泌された炎症性サイトカインは、さらなる白血球の活性化をもたらし、血管内皮細胞上の細胞接着分子に対する受容体であるCD11a-c等のインテグリン分子を白血球表面に発現させる[27]。これら細胞接着分子により、白血球、特に好中球の血管内皮への接着が増強され、白血球は血管内皮に浸潤する過程でさらにROSや強力なプロテアーゼである好中球エラスターゼを分泌しながら、結果として血管内皮の傷害を引き起こすことが示唆されている[28,29]。

これら炎症性サイトカインおよび細胞接着分子が、2型糖尿病と関連していることは、多くの疫学研究によって明らかとなっている。日本および欧米諸国での横断研究において、血中のIL-1βやTNF-α濃度は、肥満、耐糖能異常または2型糖尿病と正の相関を示すことが報告されている[21-23]。さらに、日本人対象者を含めた2型糖尿病患者における縦断研究および横断研究では、血中における可溶性細胞接着分子sE-selectin濃度と、動脈硬化に関連する臨床検査値およびCVDのその後の罹患率との

間に正の相関があったことが報告されている[29-32]。これらの報告は、IL-1 $\beta$  や TNF- $\alpha$  等の炎症性サイトカインおよび sE-selectin、sICAM-1、sVCAM-1 等の可溶性細胞接着分子の血中濃度は、2型糖尿病や CVD の発症を予測できる可能性があることを示唆している。

本章第 1 節では、OLETF ラットに対する単回の経口スクロース負荷は、末梢白血球における IL-1 $\beta$ 、IL-18、TNF- $\alpha$  等の炎症性サイトカインおよび、S100a8、S100a9、S100a11 等の S100 タンパク質の遺伝子発現を増大させることを明らかにした。さらにそれら遺伝子発現の増大は、ミグリトールまたは DPP-4 阻害剤であるアナグリプチンによる食後高血糖の抑制によって抑制されることも明らかとなった。

これらの報告をまとめると、食後高血糖によって活性化された白血球から分泌される炎症性サイトカインおよびそれらによって誘導される細胞接着分子が、血管内皮において好中球や単球・マクロファージのような白血球の血管への接着・浸潤を誘導することにより、CVD の発症を促進する可能性が考えられる。さらに、食後高血糖の抑制は、耐糖能異常者や 2 型糖尿病患者において CVD の発症リスクを劇的に低下させることから、食後高血糖の抑制は、白血球からの炎症性サイトカインの産生および血管内皮における細胞接着分子の発現を抑制することによって、CVD の発症・進展の抑制に寄与している可能性がある。しかしながら、耐糖能異常および 2 型糖尿病モデル動物における食後高血糖抑制剤の長期的な処置が、末梢白血球における炎症性サイトカインおよび血管内皮における細胞接着分子の発現を低下させるかは明らかでない。

本節においては、ともに食後高血糖を抑制する  $\alpha$ -GI ミグリトールまたは DPP-4 阻害剤アナグリプチンの長期的な処置が、CVD 発症に関与する炎症性サイトカインおよび細胞接着分子の遺伝子発現を抑制するかを、2 型糖尿病モデル OLETF ラットを用いて検討した。

## 方法

### 1) 実験動物および飼育方法

本章第1節で用いた耐糖能異常を有する13週齢雄性OLETFラットを用いた。経口スクロース負荷試験において、それぞれスクロースのみ（コントロール群）、およびスクロースとともにミグリトール（ミグリトール群）あるいはアナグリプチン（アナグリプチン群）を投与したラットに対して、同様の薬剤が含まれる食餌を摂食させた。基準食の組成は、カゼイン20%、コーンスターチ27.8%、スクロース27.8%、コーン油9.5%、ラード5%、AIN93ビタミンミックス3.5%、AIN93Gミネラルミックス1%、セルロース5%、L-システイン0.3%、コリン酒石酸0.25%、とし、ミグリトール群の食餌には、基準食に600 ppm (0.6 g/1000g diet) のミグリトール、アナグリプチン群の食餌には、基準食に1,200 ppm (1.2 g/1000g diet) のアナグリプチンを混合し、試験食を作製した。薬剤重量による基準食との差はセルロース重量で補正した。ラットはすべて個別のケージにて飼育し、飼育期間中は室温 $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55\pm 5^{\circ}\text{C}$ 、12時間明暗サイクル（明期7-19時、暗期19-7時）の条件の下で、47週間試験食を自由に摂取させた。試験食投与開始11、25、39週目において、14時間絶食の後、体重を測定し、微量採血管（フッ化ナトリウム-ヘパリンリチウム処理またはヘパリンリチウム処理、テルモ株式会社）を用いて、尾先端より血糖測定用血液およびmRNA測定用血液の採取を行った。試験食摂食後45週目（58週齢時）において、全匹について経口グルコース負荷試験を行った。血糖測定用血液、mRNA測定用血液および血清インスリン濃度測定用血液は、それぞれフッ化ナトリウム-ヘパリンリチウム処理微量採血管、ヘパリンリチウム処理微量採血管、プレイン微量採血管を用いて採取した。60週齢時に、非絶食下において屠殺し、動脈血、下大動脈組織および肝臓組織を採取した。屠殺時の動脈血液は、ベノジェクトII血液採取管（テルモ株式会社）を用いて採取した。なお、本実験は静岡県立大学における動物実験に関する指針に従って実施した。

### 2) 経口グルコース負荷試験 (OGTT)

経口グルコース負荷試験は試験食投与開始後45週目において実施した。ラットを16時間絶食させたのち、40%グルコース溶液（2 g/kg 体重）を投与した。血糖測定用血液および血清インスリン濃度測定用血液は、グルコース負荷前（0分時）および負荷15、30、60、90、120、180分後にそれぞれ尾先端より採取した。採取した血液は、 $4^{\circ}\text{C}$ 、3,000 rpm（MX-305、トミー精工株式会社：以下、遠心分離は同機種で行った。）で20分間遠心して血漿および血清を得た。その後直ちに凍結させ、測定を行うまで $-80^{\circ}\text{C}$ で保存した。mRNA用血液は、グルコース負荷前（0分時）および負荷180分後に採取した。mRNA用の血液は採取後、予めPAX gene 固定液（BD バイオサイエンス）を0.5 mL入れておいた1.5 mLチューブに入れ、速やかに混和した後、24時間室

温に放置し、測定を行うまで-80°Cで保存した。

### 3) 血漿グルコース濃度および血清インスリン濃度の測定

全てのサンプルにおける血漿グルコース濃度の測定には、グルコース CII-テストワコーキット（和光純薬工業株式会社）を使用した。血清インスリン濃度は、レビスラットインスリン ELISA キット（AKRIN-010、シバヤギ、群馬）を用いて測定した。

### 4) 血液生化学指標

トリアシルグリセロール (TG)、低密度リポタンパク質 (LDL) -コレステロール、高密度リポタンパク質 (HDL) -コレステロール、非エステル化脂肪酸 (NEFA)、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST)、アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT)、 $\gamma$ -グルタミルトランスペプチダーゼ ( $\gamma$ -GTP) 濃度は、商業用キットを用いて測定を行った (TG: TG L-type Wako, LDL-cholesterol: LDL L-type Wako, HDL-cholesterol: HDL L-type Wako, NEFA: NEFA-HA2 test Wako, AST: AST L-type Wako, ALT: ALT L-type Wako,  $\gamma$ -GTP:  $\gamma$ -GTP L-type Wako、和光純薬工業株式会社)。体重および摂食量は、2-3 日おきに測定した。

### 5) 肝臓トリグリセリド濃度の測定

肝臓組織を 0.1 g 量り取り、1 mL の sodium deoxycholate 含有 RIPA 緩衝液 (1% NP-40、0.5% sodium deoxycholate、0.1% SDS、20 mM Tris-HCl (pH 8.0)、5 mM EDTA、150 mM NaCl) を加え、テフロン型ホモジナイザーでホモジナイズした。測定には、トリグリセライド E-テストワコー（和光純薬工業株式会社）を用いた。

### 6) 末梢血白血球からの総 RNA 抽出

末梢血白血球からの総 RNA の抽出は、第 1 章第 1 節に記載した方法に従って行った。総 RNA 量の測定は、インビトロジェン株式会社の Qubit™ fluorometer を用いて行い、RNA が 1 サンプルあたり 100ng 含まれるようにサンプル容量を算出した。

### 7) 下大動脈組織および肝臓組織からの総 RNA 抽出

屠殺後に採取した下大動脈組織および肝臓組織を 0.1 g とり、1 mL の solution D 溶液 (4 M guanidine thiocyanate、25 mM sodium citrate (pH 7.5)、0.5% sarcosyl、0.1 M 2-mercaptoethanol) を加え、テフロン型ホモジナイザーでホモジナイズした。ホモジネートからの総 RNA の抽出は、Chomczynski らの方法に従って行った[65]。0.5 mL のホモジネートに 50  $\mu$ L の 2 M sodium acetate (pH 4.0) を加えて 10 秒間攪拌し、500  $\mu$ L の平衡酸性フェノールを加えて 20 秒間攪拌した。200  $\mu$ L のクロロホルム-イソアミルアルコール (49:1) を加えて 1 分間攪拌し、氷上で 15 分間静置した。14,000 rpm、4°C、20 分遠心分離し、上清を新しいチューブに移した。等量のイソプロパノールを加えて混和し、-30°C に 30 分間静置した後、14,000 rpm、4°C、20 分間遠心分離し、上清を取



り除いた。300  $\mu\text{L}$  の Tris-EDTA (TE) 緩衝液 (pH 7.5) を加え、沈殿を完全に溶かし、75  $\mu\text{L}$  の 10 M LiCl を加え、氷上で1時間インキュベートした後、14,000 rpm、4°C、30分間遠心分離し、上清を捨てた。1 mL の 70%エタノールを加え、14,000 rpm、4°C、10分間遠心分離し、上清を捨て、これを2回繰り返した後、沈殿を乾燥させ、エタノールを完全に取り除いた。RNA ペレットに 50  $\mu\text{L}$  の DNase/RNase free water を加え、RNA を溶かして総 RNA サンプルとした。総 RNA の定量は、抽出したサンプル 2  $\mu\text{L}$  に対し 98  $\mu\text{L}$  の TE 緩衝液 (pH 7.5) を加え、分光高度計を用いて波長 260 nm にて吸光度を測定して求めた。下大動脈組織については、RNA が 1 サンプルあたり 240 ng 含まれるようにサンプル容量を算出した。肝臓組織については、1 サンプルあたり 2,500 ng の RNA が含まれるようにサンプル容量を算出した。

#### 8) 逆転写反応および定量的 RT-PCR

末梢血白血球、下大動脈組織および肝臓組織から抽出した RNA は、Superscript III Reverse transcriptase (インビトロジェン株式会社) を用いて逆転写反応を行い、cDNA を作製した。

末梢血白血球および下大動脈組織から作製した cDNA による定量的 PCR は、Universal Probe Library (ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社) を用いて行った。Universal Probe Library を用いた PCR については、第1章第1節に記載した。この実験に使用したプライマーの塩基配列および Universal Probe Library の番号は **Table 2** に示した。肝臓組織から作製した cDNA に対しては、LightCycler 480 SYBR Green I Master (ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社) を用いた。cDNA 2.5  $\mu\text{L}$  と混合液 (LightCycler 480 SYBR Green I Master 5  $\mu\text{L}$ 、DNase RNase free water 2  $\mu\text{L}$ 、sense primer (10  $\mu\text{M}$ ) 0.25  $\mu\text{L}$ 、antisense primer (10  $\mu\text{M}$ ) 0.25  $\mu\text{L}$ ) 7.5  $\mu\text{L}$  を混合し、Light cycler 480 (ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社) を用いて、Denature (95°C で5分間) を1サイクル行った後、PCR (95°C で10秒間、60°C で10秒間、72°C で6秒間) を50サイクル行い、Melting curve (95°C で10秒間、65°C で15秒間、その後98°C まで徐々に上昇) を1サイクル行い、その後 Cooling (50°C で10秒間) を1サイクル行うという条件下で増幅を行い、mRNA 発現量の測定を行った。目的の mRNA 発現量は、内部標準として測定した遺伝子の mRNA 発現量で補正した相対値で求めた。この実験に使用したプライマーの塩基配列は **Table 3** に示した。

#### 9) MILLIPLEX イムノアッセイによる動脈血中可溶性細胞接着分子濃度の測定

可溶性 ICAM-1 (sICAM-1) および可溶性 E-selectin (sE-selectin) 濃度は、MILLIPLEX™ MAP Kit Rat Cardiovascular Disease (CVD) Panel 2 (Cat# RCVD2-89K, メルクミリポア株式会社, Darmstadt, Germany) を用いて測定した。血清サンプルおよびスタンダード溶液を、抗 sICAM-1 および抗 sE-selectin 抗体ビーズとともに付属のプレートのウェルに入れ、4°C で 20 時間インキュベートした。洗浄液でプレートを洗浄した後、ビオチン標識抗 sICAM-1 抗体あるいは抗 sE-selectin 抗体を加え、室温で 2 時間インキュベ

ートし、洗浄した。さらにストレプトアビジン-フィコエリスリン溶液を加え、室温で30分間インキュベートした。プレートを洗浄後、各ウェルに Assay Buffer を加え、よく振盪させてビーズを懸濁させ、Luminex 200 xPONENT システム（ルミネックス社、TX、USA）にかけて測定を行った。

### 1.0) ウェスタンブロッティング

#### ① 試料の調製

RIPA buffer [RIPA with sodium deoxycholate (1% NP-40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 5 mM EDTA, 150 mM NaCl), 0.1 mM Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>, 10 mM NaF, プロテアーゼインヒビタータブレット 1 粒/10 mL (ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社)] を、採取した肝臓組織 0.1 g につき 500 μL 加え、テフロン型ホモジナイザーでホモジナイズした。4°C、14,000 rpm、30 分間遠心分離し、上清を 1.5 mL チューブに回収した。そのうち 2 μL を蒸留水で 10 倍希釈し、溶液中のタンパク質量を Lowry 法[66]にて測定した。タンパク質が 150 μL に対して 2,000 μg 含まれるように RIPA buffer で希釈し、SDS sample buffer (0.28 M Tris/HCl (pH 6.8), 44.8% glycerol, 12% SDS, 0.04% bromophenol blue) に 2-mercaptoethanol を 9:1 の割合で混合したものを 50 μL 加え、60°C で 20 分間インキュベートした。よく攪拌した後、14,000 rpm で 1 分間遠心分離してサンプルをスピンドウンし、使用するまで -80°C で保存した。

#### ② SDS-PAGE

濃縮ゲルおよび展開ゲルを次の組成で作製した。

	濃縮ゲル	展開ゲル
	5%	10%
30% acrylamide-0.8% bisacrylamide	2.5	13.32
1 M Tris-HCl, pH 6.8	0.75	-
1.5 M Tris-HCl, pH 8.9	-	10
10% SDS	0.15	1.62
10% ammonium persulfate	0.15	0.4
TEMED	0.01	0.016
H <sub>2</sub> O	11.44	14.644 (mL)

展開ゲル、濃縮ゲルの順に調製し、ガラス板に流し込んで固め、20 ウェルのゲルを作製した。サンプルを 10 μL (タンパク質量 100 μg 相当) ずつウェルに入れ、SDS running buffer (18 mM Tris, 143 mM glycine, 2.6 mM SDS) を用いて電気泳動した。泳動は、濃縮ゲル、展開ゲル中ともに 90V で行った。泳動終了後、Transfer buffer

(25 mM Tris, 192 mM glycine (pH 8.3), 20%(w/v) methanol) を用いて 80V で 2 時間、メンブレンに転写した。メンブレンは、Immobilon blotting filter paper (メルクミリポア株式会社) を用いた。

### ③ ウェスタンブロッティング

タンパク質を転写させたメンブレンを、1×PBS、0.01% Tween 20 - 1 M NaCl、10% スキムミルク (メグミルク、東京) 中に浸し、室温で 1 時間ブロッキングした。その後、浸漬溶液中に抗 CD11c 抗体 (アブカム株式会社、Little Chalfont、UK) あるいは抗 TFIIB 抗体 (メルクミリポア株式会社) を添加して、4°C で 12 時間インキュベートした。メンブレンを PBS-Tween-NaCl で 5 分間洗浄し、洗浄操作を 5 回繰り返した後、PBS-Tween-NaCl -5% スキムミルクで希釈した二次抗体溶液とメンブレンを室温で 4 時間反応させ、一次抗体と同様に洗浄した。さらに、PBS-Tween-NaCl -5% スキムミルクで希釈した三次抗体溶液とメンブレンを 4°C で 12 時間以上反応させ、同様に洗浄した。用いた抗体およびその希釈倍率を以下に示す。

	一次抗体 (スキムミルク 10%)	二次抗体 (スキムミルク 5%)	三次抗体 (スキムミルク 5%)
CD11c	anti-CD11c (ab 11029) Abcam 1:10,000	anti-mouse IgG (biotinylated) GE ヘルスケア株式会社 1: 5,000	anti-biotin HRP-linked Cell signaling 1: 5,000
TFIIB	anti-TFIIB (06-243) MILLIPORE 1: 10,000	anti-Rabbit IgG (biotinylated) GE ヘルスケア株式会社 1: 5,000	anti-biotin HRP-linked Cell signaling 1: 5,000

検出は化学発光 (ECL Plus Western Blotting Detection System, Amersham Biosciences; GE ヘルスケア株式会社、Little Chalfont、UK) を用いて行い、ルミノ・イメージアナライザー (Las 3000-mini、富士フイルム株式会社、東京) を用いて視覚化した。CD11c レベルは、TFIIB レベルにて補正し、数値化した。

### 1.1) CD68 免疫染色

免疫染色は、三和化学研究所 (三重) に測定を依頼した。採取した肝臓からパラフィンブロックを作成し、3 μm に薄切した。一次抗体に抗ラット CD68 マウス抗体 (MCA341GA; バイオ・ラッド ラボラトリーズ株式会社、Hercules、California、USA)、発色基質に DAB (茶)、対比染色にヘマトキシリン (青) を用いた。染色下標本を顕微鏡下で観察し、スコアリングによる定性的評価を行った。スコアリングは、コントロール群の第 1 番目のラットにおける染色強度を 3 とし、1 (弱) から 5 (強) までの 5 段階で評価した。

## 1 2) 統計解析

すべてのデータは、平均値±標準誤差で示した。

統計解析は、エクセル統計（社会情報サービス株式会社）で行った。

有意差は、一元配置分散分析（**Table 4**、**Table 5**、**Fig. 3**、**Fig. 5**）、または二元配置分散分析（**Fig. 4**）における Tukey の検定にて判断した。**Fig. 6**については、Student's *t*-test により群間の有意差を検定した。 $p < 0.05$  で有意差ありとした。

**Table 2** Sequences of the oligonucleotide primers used for real-time RT-PCR (Universal probe)

Target mRNA	Sequence
Interleukin 1 beta (IL-1 $\beta$ ) (#78)	5'-TGTGATGAAAGACGGCACAC-3' 5'-CTTCTTCTTTGGGTATTGTTTGG-3'
Tumor necrosis factor (TNF- $\alpha$ ) (#63)	5'-GTCTACTGAACTTCGGGGTGA -3' 5'-ATGAGAGGGAGCCCATTG-3'
S100 calcium binding protein A8 (S100a8) (#26)	5'-GCCACAAGGAGTAACAGAGCTT-3' 5'-TGACGACTTTATTCTGTAGACATATCC -3'
S100 calcium binding protein A9 (S100a9) (#85)	5'-AAGGACTTGCCAAATTTTCTGA-3' 5'-GGACAGTTGATTGTCCTGGTTT-3'
S100 calcium binding protein A11 (S100a11) (#44)	5'-CGACCGCATGATGAAGAAG-3' 5'-AAGCCACCAATAAGGTTGAGAA-3'
Intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) (#29)	5'-GCAGACCACTGTGCTTTGAG-3' 5'-TCCAGCTCCACTCGCTCT-3'
Vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) (#13)	5'-CAAATGGAGTCTGAACCCAAA-3' 5'-GGTTCTTTTCGGAGCAACG-3'
Selectin E (E-selectin) (#18)	5'-TCTAAGATGCGAGCAATCAGG-3' 5'-CAGGATTCTGCAGACAGTTCA-3'
TATA-box binding protein (TBP) (#129)	5'-CCCACCAGCAGTTCAGTAGC-3' 5'-CAATTCTGGGTTTGATCATTCTG-3'

\*The numbers in parentheses indicate ID of a universal probe (Roche Diagnostics) used to detect the signals of each gene.

**Table 3** Sequences of the oligonucleotide primers used for real-time RT-PCR (SYBR Green I)

Target mRNA	Sequence
Cluster of differentiation 11c (CD11c)	5'-AAGCCCAAGTGTTTCCTTCG-3'
	5'-AATGACGTGTCGGCTGCT-3'
Cluster of differentiation 68 (CD68)	5'-ACGGACAGCTTACCTTTGGA-3'
	5'-AATGTCCACTGTGCTGCTTG-3'
TATA-box binding protein (TBP)	5'-CCCACCAGCAGTTCAGTAGC-3'
	5'-CAATTCTGGGTTTGATCATTCTG-3'

## 結果

### 1) OLETF ラットへの食後高血糖抑制剤の長期投与による体重および空腹時血糖値の変化

試験食投与開始 0、11、25、39 週後における体重および 14 時間空腹時血糖値の結果を **Table 4** に示した。39 週後における体重は、薬剤投与した 2 群において、コントロール群と比較して減少する傾向にあった。14 時間絶食後における血糖値は、すべての時点において、いずれの群においても有意な差は観察されなかった。

### 2) OLETF ラットへの食後高血糖抑制剤の長期投与による組織重量、肝臓トリグリセリド濃度および血液生化学指標の変化

60 週齢において非絶食下で解剖した時の、体重、組織重量および動脈血清より測定された血液生化学指標の結果を **Table 5** に示した。いずれの組織重量も、3 群間に有意な差はなかった。血中 ALT 活性は、ミグリトール群においてコントロール群と比較して有意に低値を示した。他の血中の検査値は群間に有意な差はなかったが、コントロール群と比較して、薬剤を投与した群では、TG 濃度、AST 活性、 $\gamma$ -GTP 活性は低い傾向にあり、HDL-コレステロールは高い傾向を示した。

肝臓のトリグリセリド量は、コントロール群 ( $55.6 \pm 3.6$  (mg/g liver weight)) と比較してアナグリプチン群 ( $39.3 \pm 3.1$  (mg/g liver weight)) では有意に低値を示した。

### 3) OLETF ラットへの食後高血糖抑制剤の長期投与による耐糖能の改善

ミグリトールまたはアナグリプチンの処置によって耐糖能が改善するかどうかを調べるために、試験食投与開始 45 週目において経口グルコース試験を行い、血漿グルコース濃度および血清インスリン濃度を測定した (**Fig. 3**)。

コントロール群では、経口グルコース負荷後の血漿グルコース濃度は、60 分後に最大を示し ( $555 \pm 36$  mg/dL)、負荷 180 分後においても高値 ( $342 \pm 50$  mg/dL) を保っていた。一方でミグリトール群やアナグリプチン群では、負荷 60-180 分後における血漿グルコース濃度は、コントロール群と比較すると低い傾向を示し、ミグリトール群では負荷 90-180 分後の血漿グルコース濃度はコントロール群と比較して有意に低値を示した。コントロール群、ミグリトール群、アナグリプチン群の経口グルコース負荷試験における血漿グルコース濃度の曲線下面積(AUC)は、それぞれ  $47,964 \pm 3,496$ 、 $32,489 \pm 3,171$ 、 $38,260 \pm 1,347$  (mg·h/dL) であった。AUC は、コントロール群と比較してミグリトール群で有意に ( $p < 0.05$ ) 低値を示し、さらにアナグリプチン群でもコントロール群と比較して低値の傾向を示した ( $p = 0.085$ )。

コントロール群、ミグリトール群、アナグリプチン群の経口グルコース負荷試験における血清インスリン濃度の AUC は、それぞれ、 $885 \pm 223$ 、 $972 \pm 191$ 、 $783 \pm 190$  (ng·h/dL) であった。これらの値にいずれも有意差はなかった。空腹時における血清イン

スリン濃度は、アナグリプチン群においてコントロール群と比較して有意に低値を示した。

#### 4) OLETF ラットにおける食後高血糖抑制剤の長期投与による末梢血白血球における空腹時の炎症関連遺伝子の発現変動

食後高血糖の長期にわたる抑制が、末梢血白血球における空腹時の炎症関連遺伝子の発現を抑制するかを調べるため、試験食投与開始から 0、11、25、39 週後における炎症関連遺伝子の発現を測定した (Fig. 4)。

コントロール群では、試験食投与開始 39 週後における末梢血白血球の IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、S100a9、S100a11 の遺伝子発現量が、試験食開始時と比較して有意に上昇した。ミグリトール群およびアナグリプチン群においては、これら遺伝子発現量に有意な変化はなかった。コントロール群における試験食投与開始 11、25、39 週後における TNF- $\alpha$  の mRNA 発現量は、試験食投与開始時と比較して有意に高値を示し、その発現量の増大は、ミグリトール群やアナグリプチン群と比較して顕著に高かった。S100a11 の mRNA 発現量は、コントロール群と比較して両薬剤投与群で低い傾向を示し、ミグリトール群との間には試験食投与開始 11 および 39 週後、アナグリプチン群との間には 25 および 39 週後において有意な差を示した。

#### 5) OLETF ラットにおける食後高血糖抑制剤の長期投与による下大動脈組織における細胞接着分子の遺伝子発現変動および動脈血清における血中可溶性細胞接着分子濃度の変化

下大動脈組織における細胞接着分子遺伝子の mRNA 発現量および動脈血清における血中可溶性細胞接着分子タンパク質濃度の結果を Fig. 5 に示した。下大動脈組織における VCAM-1 遺伝子の発現量は、どの群間においても有意差はなかった。また ICAM-1 の mRNA 発現量においても、アナグリプチン群とコントロール群との間で有意な差はなかった。しかしながら、E-selectin の下大動脈組織における mRNA 発現量は、ミグリトール群およびアナグリプチン群のいずれも、コントロール群と比較して有意に低かった。

さらに、動脈血清における血中可溶性 E-selectin、ICAM-1 タンパク質濃度は、コントロール群と比較してミグリトール群およびアナグリプチン群で有意に低下していた。

#### 6) 肝臓組織における白血球浸潤マーカーの変化

Table 5 に示した肝臓トリグリセリド濃度の結果より、アナグリプチン群では肝臓組織における脂肪蓄積が低下し、炎症が低減している可能性が考えられた。そこでコントロール群およびアナグリプチン群において、肝臓組織における白血球の浸潤マーカーについて、mRNA 発現量とタンパク質発現量を測定し、さらに組織切片を用いて免疫染色を行った (Fig. 6)。



肝臓組織における CD11c および CD68 の mRNA 発現量は、コントロール群と比較してアナグリプチン群で有意に低下していた。特に、活性化した白血球に発現する CD11c 遺伝子の mRNA 発現は、アナグリプチンの処置によって顕著に減少していた。さらに、CD11c のタンパク質発現量をウエスタンブロッティングで測定したところ、CD11c の肝臓中タンパク質量は、コントロール群と比較してアナグリプチン群で有意に低下していた。白血球の全量を反映する指標である CD68 の免疫染色によって、肝臓組織における白血球の存在率について比較したところ、アナグリプチン群ではコントロール群と比較して CD68 陽性細胞が減少する傾向にあった。

**Table 4** Body weights and fasting blood glucose concentrations in the OLETF rats assigned to each experimental group

		week 0	week 11	week 25	week 39
Body weight (g)	Control	447 ± 16	719 ± 21	905 ± 33	1033 ± 48
	Miglitol	455 ± 6	688 ± 19	852 ± 27	975 ± 41
	Anagliptin	449 ± 13	710 ± 23	888 ± 30	948 ± 39
Fasting blood glucose (mg/dL)	Control	144 ± 13	140 ± 5	179 ± 4	164 ± 7
	Miglitol	126 ± 6	130 ± 4	161 ± 10	156 ± 13
	Anagliptin	153 ± 7	150 ± 4	182 ± 8	175 ± 11

Values are expressed as means ± SEM for 6–7 rats.

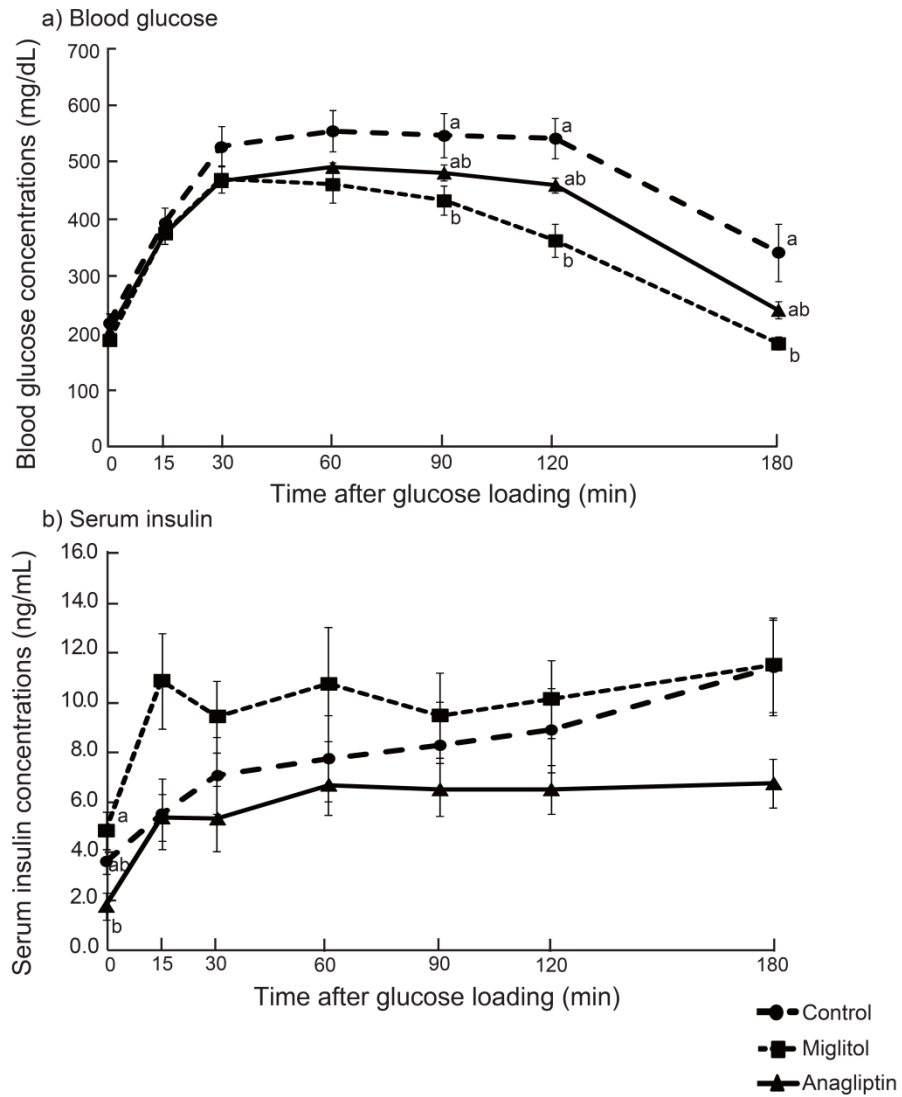
**Table 5** Basic clinical parameters in the OLETF rats assigned to each experimental group

	Control	Miglitol	Anagliptin
Body weight (g)	1087 ± 76	1030 ± 48	977 ± 37
Total food intake (kg)	7.8 ± 0.4	8.0 ± 0.2	7.9 ± 0.3
Liver weight (g)	27.8 ± 2.1	29.9 ± 0.7	27.8 ± 1.1
Liver TG (mg/g liver weight)	55.6 ± 3.6 <sup>a</sup>	47.5 ± 3.9 <sup>ab</sup>	39.3 ± 3.1 <sup>b</sup>
Mesenteric adipose tissue weight (g)	16.2 ± 1.3	16.5 ± 0.4	17.1 ± 0.8
Epididymal adipose tissue weight (g)	28.2 ± 3.6	29.7 ± 1.9	29.0 ± 1.9
Kidney weight (g)	4.3 ± 0.4	5.1 ± 0.3	4.4 ± 0.3
Blood biochemical parameters			
Glucose (mg/dL)	279 ± 46	229 ± 11	232 ± 10
TG (mg/dL)	237 ± 78	179 ± 28	143 ± 14
LDL-cholesterol (mg/dL)	81 ± 17	100 ± 7	79 ± 8
HDL-cholesterol (mg/dL)	120 ± 22	148 ± 8	135 ± 12
NEFA (mEq/L)	0.59 ± 0.05	0.55 ± 0.04	0.49 ± 0.06
AST (IU/L)	100 ± 15	68 ± 12	77 ± 10
ALT (IU/L)	41 ± 5 <sup>a</sup>	28 ± 2 <sup>b</sup>	33 ± 2 <sup>ab</sup>
γ-GTP (IU/L)	4.0 ± 2.4	1.5 ± 0.1	1.5 ± 0.1

Values are expressed as means ± SEM for 6–7 rats.

a,b: Values not sharing a common letter differ significantly from each other at  $p < 0.05$  by Tukey's test based on one-way ANOVA.

TG; triacylglycerol, LDL; low-density lipoprotein, HDL; high-density lipoprotein, NEFA; non-esterified fatty acid, AST; aspartate aminotransferase, ALT; alanine aminotransferase, γ-GTP; γ-glutamyl transpeptidase.

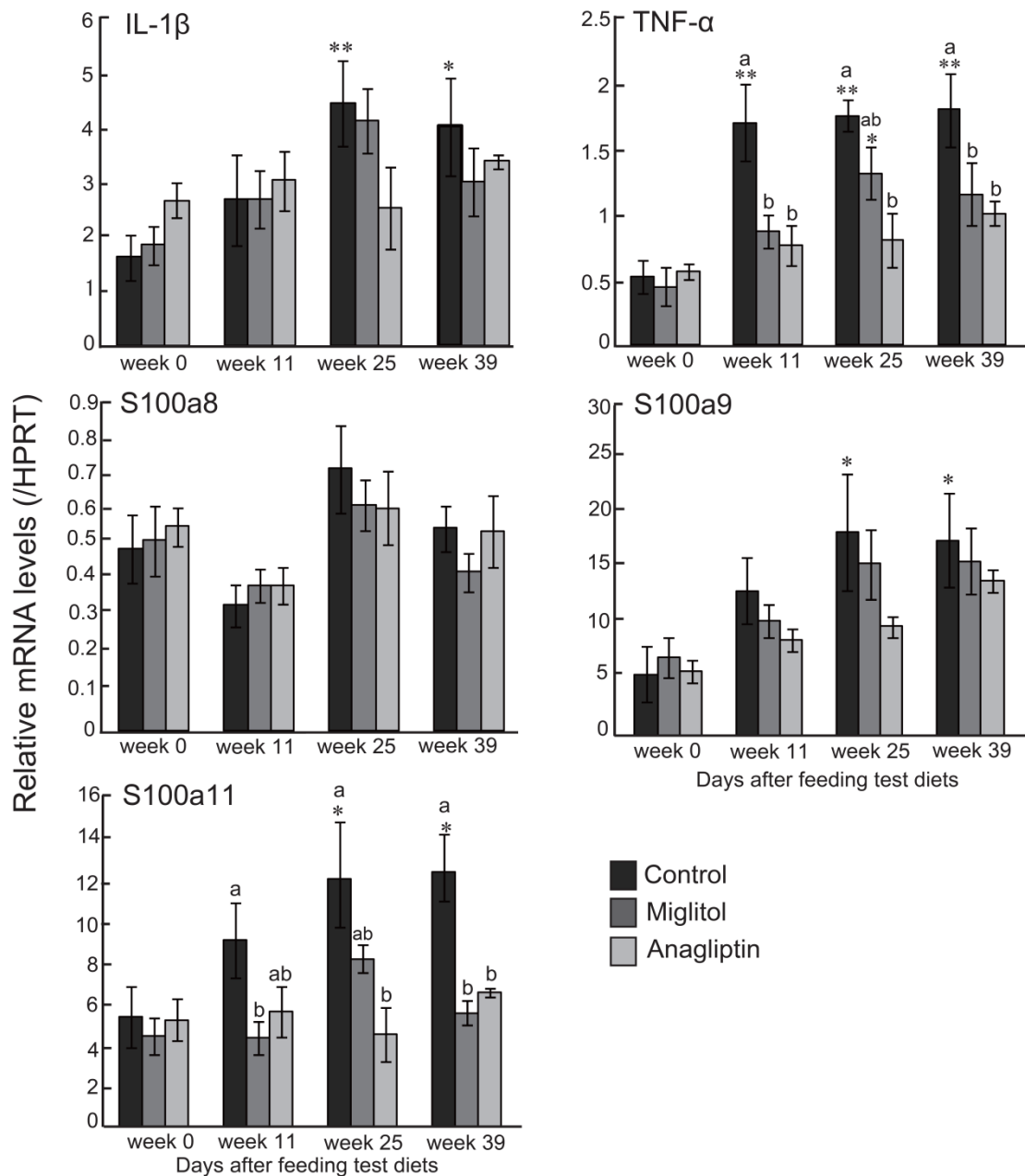


**Fig. 3** Changes in plasma glucose and serum insulin concentrations following oral glucose loading in the OLETF rats fed a control diet or the diet containing miglitol or anagliptin for 45 wks.

a) Plasma glucose concentration. b) Serum insulin concentration.

The data are means  $\pm$  SEM for 6–7 animals.

Values not sharing a common letter differ significantly from each other among the treatment groups by Tukey’s test based on one-way ANOVA.

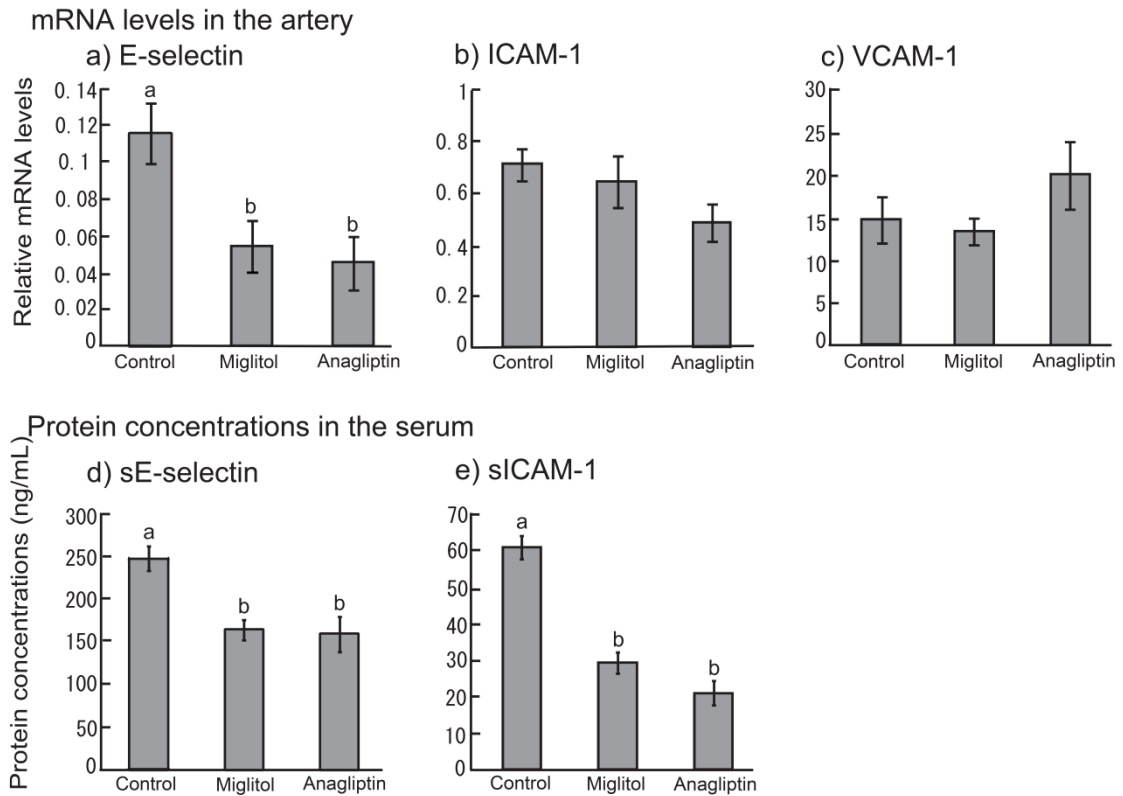


**Fig. 4** Effects of feeding a diet containing miglitol or anagliptin for 39 wks on expression of inflammatory-related genes in peripheral leukocytes of OLETF rats.

The data are means  $\pm$  SEM for 6–7 animals.

Values not sharing a common letter differ significantly from each other among the treatment groups at the same week by Tukey's test based on repeated two-way ANOVA.

\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , significant differences compared with week 0 (Tukey's test based on repeated two-way ANOVA).



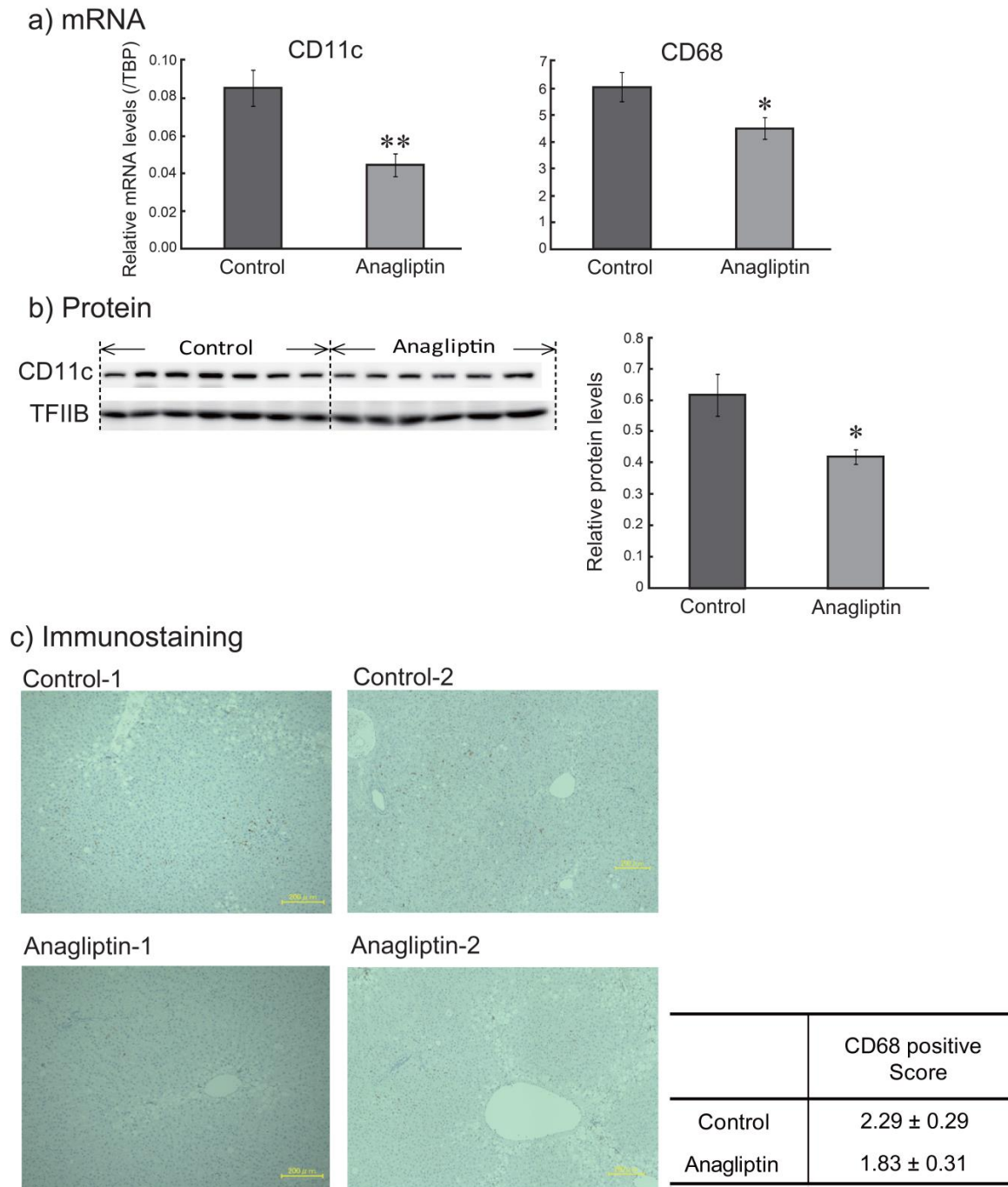
**Fig. 5 Effects of feeding a diet containing miglitol or anagliptin on the expression of adhesion molecules in aortic tissues and arterial blood of OLETF rats.**

a-c) mRNA levels in the artery. d-e) Protein concentrations in the serum.

The results of quantitative RT-PCR analyses for individual samples were normalized by the corresponding TBP mRNA abundance.

The data are means  $\pm$  SEM for 5–7 animals.

Values not sharing a common letter differ significantly from each other among the treatment groups by Tukey's test based on one-way ANOVA.



**Fig. 6 Effects of feeding a diet containing anagliptin on the expression of CD11c and CD68 in the liver of OLETF rats.**

(a) mRNA levels in the liver. The results of quantitative RT-PCR analyses for individual samples were normalized by the corresponding TBP mRNA abundance. (b) CD11c protein levels in the liver. (c) CD68 immunostaining in the liver.

The data are means ± SEM for 5–7 animals.

\*\*\*; Significantly different from control group at  $p < 0.05$  and  $p < 0.01$ , respectively (Student's  $t$ -test).

## 考察

近年の多くの研究において、食後血糖値の増大が、その後の2型糖尿病や合併症の発症・進展に深く関与していることが示唆されている[3-6]。また、耐糖能異常者（STOP-NIDDM）や2型糖尿病患者（MeRIA7）に対して $\alpha$ -GIであるアカルボースを投与することによって食後高血糖を抑制すると、CVDの発生率が低下することも報告されている[8-11]。本章第1節の研究結果より、ミグリトールまたはアナグリプチンの処置は、OLETFラットにおいて経口スクロース負荷によって誘導される食後高血糖を抑制し、末梢血白血球における炎症関連遺伝子の発現増大を抑制することが明らかとなった。しかしながら、長期的な食後高血糖の抑制による炎症性サイトカインの抑制が、CVD発症リスクを低減させるかは明らかでなかった。そこで本節では、耐糖能異常を有する2型糖尿病モデルOLETFラットに対するこれらの薬剤の長期投与による食後高血糖の抑制が、末梢血白血球における炎症性サイトカインの発現、下大動脈組織における細胞接着分子の発現および動脈血中の可溶性細胞接着分子濃度を低下させるかを検討した。

ミグリトールは、小腸における $\alpha$ -グルコシダーゼを阻害することによって食後の血糖値やインスリン濃度の上昇を抑制する[33]。一般的に、食後高血糖の阻害によるインスリン分泌の抑制は、膵 $\beta$ 細胞のアポトーシスを抑制し、インスリン分泌能力を保持する。実際に、本研究室の先行研究によって、OLETFラットに対するミグリトールの長期的な処置は、インスリン分泌能力を保持し、2型糖尿病の発症を抑制することが明らかとなっている[35]。これらの知見は、ミグリトールが食後のインスリン分泌を節約させることによって膵 $\beta$ 細胞におけるインスリン分泌能力を保護していることを示唆している。本節では、経口グルコース負荷試験におけるグルコース負荷90-180分後にかけての血漿グルコース濃度が、コントロール群と比較してミグリトール群で低値を示した。それとともに、ミグリトール群では、コントロール群と比較して血清インスリン濃度が高い傾向にあった。この結果は、長期のミグリトールの投与は、OLETFラットにおける食後のインスリン分泌能力を保持したことを示唆している。一方でアナグリプチンにおいては、経口グルコース負荷試験における血漿グルコース濃度曲線下面積が、コントロール群と比較して低下傾向にあった（ $p = 0.085$ ）。血清インスリン濃度は、コントロール群およびアナグリプチン群で有意な差はなかったものの、アナグリプチン群で低下する傾向にあり、空腹時における血清インスリン濃度は、アナグリプチン群でコントロール群と比較して低値を示した。このことから、OLETFラットに対するアナグリプチン添加食の投与は、インスリン抵抗性を改善したことが考えられた。これまでも、DPP-4阻害薬の一種であるテネリグリプチンの2型糖尿病患者への投与はインスリン抵抗性を改善[67]し、さらに、アナグリプチンのマウスに対する投与は、耐糖能を改善する[68]ことが報告されている。

本節では、空腹時における末梢血白血球の炎症関連遺伝子（IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、S100a9、



S100a11) の発現が、耐糖能異常を有する対照 OLETF ラットでは初期から増大傾向を示した一方で、ミグリトールあるいはアナグリプチンを投与すると、これら遺伝子の発現が抑制されることを明らかにした。さらに、ミグリトールあるいはアナグリプチンの投与が、下大動脈組織における細胞接着分子 E-selectin の mRNA 発現量を減少させるだけでなく、動脈血中の可溶性 E-selectin タンパク質濃度および ICAM-1 タンパク質濃度を低下させることを明らかにした。E-selectin は、血管内皮細胞表面に発現し、白血球のローリングを担う細胞接着分子である。白血球表面のセレクトインリガンドは血管内皮表面に発現する E-selectin に結合することによって血管内皮上をローリングする[69]。これは白血球の血管内皮への浸潤の初期的な段階であり、次いで白血球は、ICAM-1 および VCAM-1 に結合して血管内皮とより緊密に結合する[70]。それゆえ、E-selectin の発現増大は、内皮血管障害を誘導し、動脈硬化を促進すると考えられる。また、本節の結果において、下大動脈組織における ICAM-1 の遺伝子発現は有意な差がみられなかったのに反して、動脈血における可溶性 ICAM-1 タンパク質濃度が、ミグリトールおよびアナグリプチンのいずれの投与によっても低下していたことは、注目すべきである。最近の研究において、ICAM-1 のタンパク質レベルは、プロテアソームやライソゾームにおけるタンパク質の分解によって調節を受けることが、小腸様細胞 Caco-2 の実験から明らかとなってきた[71]。本節の結果および上記の知見は、可溶性 ICAM-1 のタンパク質レベルは、タンパク質分解やタンパク質合成のレベルによって調節されている可能性を示唆している。この可能性については、さらに検討を重ねる必要がある。

本節における結果は、耐糖能異常の段階からの食後高血糖の抑制は、末梢血白血球における炎症性サイトカインおよび炎症性サイトカイン様因子の遺伝子発現の増大を抑制し、下大動脈組織における細胞接着分子（特に E-selectin）の遺伝子発現を低下させることによって、CVD 発症リスクを低減する可能性を示唆している。加えて本節においては、 $\alpha$ -GI ミグリトールあるいは DPP-4 阻害剤アナグリプチンのいずれにおいても、これらの遺伝子発現および血中タンパク質濃度の減少がみられたことから、食後高血糖の抑制は、CVD 発症リスク低減のための効果的な接近法であると考えられる。

一方で、肝臓組織におけるトリグリセリド濃度が、ミグリトール群ではなくアナグリプチン群において、コントロール群と比較して顕著に減少していたことは特記すべきである。アナグリプチンをはじめとした DPP-4 阻害剤は、インクレチンホルモンである GLP-1 および GIP の分解を担う DPP-4 を阻害することによって、インスリン分泌を促進する薬剤である[36]が、GLP-1 に関してはインスリン分泌促進作用のみでなく、多数の腭外作用が報告されている[72]。また、本節における OLETF ラットの 58 週齢時の経口グルコース負荷試験では、アナグリプチン添加食を投与していたラットは、食後高血糖の抑制ならびにインスリン分泌の節約が観察されたことから、インスリン抵抗性の改善が示唆された。肝臓におけるインスリン抵抗性は、摂食時におけるインスリンによる糖新生抑制作用を減弱させ、肝臓における VLDL 合成の低下をもた

らす。その結果、肝臓組織におけるトリグリセリドの蓄積が亢進すると考えられる。さらに、肝臓のインスリン抵抗性は、トリグリセリド含量の増加に付随して引き起こされることも報告されている[73]。よって、肝臓におけるトリグリセリドの蓄積は、インスリン作用を減弱させ、遊離脂肪酸等のデンジャーシグナル(DAMPs)の増大や、活性酸素種(ROS)による白血球の活性化をもたらし、炎症の進行を増幅させると推察される。本節における OLETF ラットの肝臓組織では、このような脂質異常を伴ったインスリン抵抗性と炎症による組織障害が進行しており、アナグリプチンの投与はそれらを改善していることが考えられた。そこで、肝臓組織における炎症について調べるため、白血球、特にマクロファージの浸潤および白血球活性化マーカーが、アナグリプチンの投与によって低下するかを検討した。その結果、アナグリプチン群の肝臓組織においては、マクロファージマーカーである CD68 の mRNA 発現量がコントロール群よりも低く、さらに活性化された白血球の表面に発現する CD11c の mRNA 発現量は、コントロール群よりも顕著に低かった。これらの変化は、CD11c のウエスタンブロッティングおよび CD68 の免疫染色でも同様に認められた。これまでに肝臓におけるマクロファージマーカー F4/80 の発現は、高脂肪食負荷によってそれほど増加しないが、CD11c の発現は、高脂肪食の負荷によって顕著に増加することが報告されている[74]。一方で、脂肪組織においては、高脂肪食の負荷によって F4/80-CD11c 陽性細胞が増加することが明らかとなっている。以上のことを踏まえると、本節におけるアナグリプチン投与による OLETF ラットの肝臓組織での CD11c の発現低下も、CD11c 陽性マクロファージの浸潤が減少したことによる可能性が高いと考えられる。インスリン感受性末梢組織における炎症には、CD11c 陽性マクロファージの関与が強く示唆されている。CD11c 陽性マクロファージは高レベルの炎症性サイトカインや ROS を分泌し[75-77]、特に肝臓においては肝脂肪変性やインスリン抵抗性に関与していることが分かっている[78,79]。CD11c 陽性マクロファージを除去したマウスでは、インスリン抵抗性の改善が認められ、肝臓のトリグリセリドレベルが減少することも報告されている[80]。さらに近年では、メタボリックシンドロームや2型糖尿病に高確率で合併する非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)の特徴的病変として観察される hCLS 構造の形成に、CD11c 陽性マクロファージが主要な役割を果たしていることが明らかとなっている[81]。また、マクロファージには炎症促進性(M1)マクロファージと抗炎症性(M2)マクロファージが存在することが明らかとなっているが、肥満では、これらのマクロファージの構成バランスが崩れ、CD11c 陽性 M1 マクロファージの存在比が増加することも知られている[82]。本節において、マクロファージマーカーである CD68、白血球の全量を反映するマーカーである CD18 の mRNA 量は、アナグリプチン群で減少傾向を示したものの、有意な差はなかった。このことから、OLETF ラットの肝臓組織においては、CD11c 陽性マクロファージの割合が増加していることが推察される。肝臓組織における CD11c 陽性マクロファージは、インスリン抵抗性に関与する炎症性サイトカインである TNF- $\alpha$ 、IL-6 などの炎症メディエーター、および ROS の主要なソースでもある[78,79]。近年の報告では、炎症性サイトカ

イン IL-1 $\beta$  のシグナルは脂質代謝異常に関与し、肝臓での脂肪合成のシグナル伝達を介して肝線維化に関与している可能性が指摘されている[83]ことから、CD11c 陽性マクロファージの肝臓への浸潤を介した炎症の増大が、肝臓におけるトリグリセリド蓄積やインスリン抵抗性の悪化に影響している可能性が考えられる。

以上のことから、肝臓における CD11c 陽性マクロファージの活性化および浸潤には、食後高血糖や ROS の増大が関与し、炎症や脂質代謝異常を介してインスリン抵抗性および2型糖尿病の発症・進展に関与していることが考えられた。本節の結果は、アナグリプチンの長期投与が、肝臓における CD11c 陽性マクロファージを介した炎症を効率よく抑制する可能性を示唆している。

以上の結果を踏まえると、食後高血糖の長期的な抑制は、2型糖尿病モデル OLETF ラットにおいて末梢血白血球や末梢組織における白血球の活性化による炎症を抑制し、さらには動脈組織における細胞接着分子の発現低下を介して CVD の発症を抑制することが考えられた。

## 第1章 第3節

好中球エラスターゼの活性阻害による心血管疾患発症リスク因子の  
発現抑制効果

## 序

2型糖尿病は、遺伝的素因および、肥満、運動不足、過食やストレス等の環境因子から成る複合的要因によって発症する。2型糖尿病の進展は、糖尿病性網膜症、腎症、神経症等の多くの微小血管障害による合併症の発症をもたらすが、近年、2型糖尿病患者においては、心血管疾患（CVD）のような大血管障害の発生率も高くなることが明らかとなっている。2型糖尿病における最大の治療目標は、これらの微小血管障害および大血管障害によって生じる合併症の発症・進展を抑制し、生活の質（Quality of life : QOL）の低下を防ぐことにある。

2型糖尿病発症の主要なリスク要因は、過食あるいは運動不足、またはその両方による体重の増加であると考えられる。過食は、膵β細胞からのインスリン分泌過剰をもたらし、体重増加を引き起こし、インスリン抵抗性を誘導する[38]。インスリン抵抗性が引き起こされると、食後の血糖増大に対する末梢組織でのインスリン作用の不足から食後高血糖を呈する。インスリン抵抗性およびインスリン分泌低下に伴うインスリン作用不足が進展することによって、持続的な高血糖を呈し、2型糖尿病を発症すると考えられる。

末梢組織におけるインスリン抵抗性に関する研究は、細胞内インスリンシグナル伝達の障害などに焦点があてられてきた。しかしながら、各組織においてインスリンが作用するためには、インスリンが標的組織へと運ばれる必要がある。すなわち、末梢組織におけるインスリン作用には、血管によるインスリンの運搬、特に血管内皮細胞におけるインスリンの組織移行を考慮する必要がある。2型糖尿病や肥満で認められるインスリン抵抗性状態では、血管内皮機能障害による末梢組織へのインスリンの移行の低下が観察されている[39,40]。この要因としては、炎症、高血糖、遊離脂肪酸、酸化ストレスなどが挙げられる。特に、食後に起こる急激な血糖上昇は、酸化ストレスを亢進し、炎症性サイトカインの発現増大を介して血管内皮細胞における機能障害を誘発する可能性があることは、すでに本章第1節および第2節で明らかにした通りである。これらのことから、食後高血糖による血管内皮細胞における炎症を抑制することは、インスリン移行などを担う血管内皮細胞の機能低下を予防するためにも重要であると考えられる。

血管内皮細胞を介した末梢組織へのインスリン移行には、一酸化窒素（NO）による血管拡張、白血球の遊走抑制、血小板の接着抑制などの作用が重要な役割を担っている。NOは、内皮型一酸化窒素合成酵素（eNOS）によって血管内皮細胞において合成される。血管内皮細胞におけるeNOSの働きは、インスリンによって制御されている。これまでに、インスリンのシグナル伝達に関与するIRS-1やIRS-2欠損マウスでは、血管内皮における血管拡張機能が障害されていることが報告されている[84]。さらに血管内皮細胞特異的IRS-2欠損マウスでは、eNOSの活性が減少することも明らかになっている[39]。

血管内皮細胞は、血管を構成する膜の中で最も内側に存在するため、血液内の環境に容易に影響を受ける。特に食後高血糖は、活性酸素種（ROS）の産生を誘導し、白血球を活性化する[12]。活性化した白血球から分泌される炎症性サイトカインは、E-selectin や ICAM-1、VCAM-1 等の細胞接着分子の血管内皮細胞上への発現を誘導する[24-26]。さらに炎症性サイトカインは、血管内皮細胞上の細胞接着分子に対する受容体であるインテグリン分子の白血球表面への発現を促進する[27]。これら細胞接着分子およびインテグリンの作用によって、白血球の血管内皮への接着および浸潤が増強され、結果として血管内皮機能障害を引き起こす[28,29,69,70]。これらの知見は、食後高血糖の繰り返しによる血管内皮機能障害の発症および進行の一因は、好中球、単球・マクロファージ等の白血球の活性化による炎症性サイトカインの産生にある可能性が高いことを示唆している。

食後高血糖による血管内皮障害には、循環血中の白血球の大部分（全白血球の50-70%）を占める顆粒球の一種である好中球の活性化が、大きく寄与している可能性がある。好中球は、炎症惹起刺激に対して速やかに応答し、機能する細胞である。急性呼吸促迫症候群や外傷、感染症などが生じた際には、好中球が炎症部位へと大量に動員されることが知られており、これらの罹患時には、好中球から分泌される細胞内プロテアーゼである好中球エラスターゼ（NE）による血管組織傷害が起こることが明らかとなっている[85]。NE は、好中球細胞内のアズール顆粒から分泌される殺菌性酵素であり、コラーゲン I -IV および結合組織の機械特性を決定している弾性繊維のエラスチンを分解する。活性化した好中球は、血管内皮にローリング・接着を経て浸潤し、NE および大量の活性酸素種を周囲に放出する。NE は強力なプロテアーゼであるため、通常は、放出されてから速やかに内因性の  $\alpha 1$ -プロテアーゼインヒビター（ $\alpha 1$ -PI）によって不活化される。しかしながら、好中球から分泌された活性酸素種が  $\alpha 1$ -PI を失活させる働きを持つ[86]ため、結果として NE の活性は維持され、血管内皮の傷害を促進する。さらに NE は、好中球自体からの炎症性サイトカインの分泌を増強することによって、さらなる炎症を惹起すると考えられる。インスリン抵抗性や2型糖尿病では、高血糖による酸化ストレスの亢進が引き起こされることから、NE 活性の増大によって血管内皮の傷害が誘導されている可能性が高い。

さらに近年、NE は血管内皮の傷害を促進するだけでなく、末梢組織におけるインスリンシグナル伝達経路を障害し、インスリン抵抗性および2型糖尿病の発症・進展を誘導する可能性があることがわかってきた。これまでに、高脂肪食を摂食させたマウスの脂肪組織および肝臓組織では、好中球数および NE の活性が増大していること、脂肪組織では、NE 活性の増大および IRS-1 の分解が促進されることが報告されている[87]。また、肥満を呈したマウスでは、NE と  $\alpha 1$ -PI との間の不均衡状態により NE の活性が増大し、脂肪組織や肝臓におけるインスリンシグナル伝達（IRS/PI3K/Akt 経路）の障害ならびに炎症反応が誘導されることがわかっている[88]。これらの知見から、インスリン抵抗性および2型糖尿病によって生じる高血糖状態は、NE 活性を増大させ、動脈組織の傷害および機能障害を引き起こす可能性がある。しかしながら、

NE の活性が、動脈組織における食後高血糖誘導性の炎症に関与するかについてはいまだ明らかでない。さらに NE 活性の抑制によって、動脈組織における食後高血糖誘導性の炎症関連遺伝子および細胞接着分子遺伝子の発現増大が抑制されるかはわかっていない。

そこで本節では、1 日 1 回の経口グルコース負荷を 8 日間行った食後高血糖モデル OLETF ラットに、NE の活性を選択的に阻害する薬剤であるシベレスタッドナトリウム水和物を糖負荷と同時に投与し、動脈組織における炎症関連遺伝子および細胞接着分子遺伝子の発現量、および動脈血清における可溶性細胞接着分子タンパク質濃度が低下するかを検討した。

## 方法

### 1) 実験動物および飼育方法

4週齢の雄性 OLETF ラット 16 匹を日本エスエルシー株式会社（浜松）より搬入した。1 ケージあたり 4 匹にて飼育し、室温  $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度  $55 \pm 5\%$ 、12 時間明暗サイクル（明期 7-19 時、暗期 19-7 時）を一定に保った。食餌は普通固形飼料（MF: オリエンタル酵母株式会社）および水を自由摂取させ、34 週齢までの間、4 週間に 1 回ずつ体重および随時血糖値を測定した。34 週齢において、体重および随時血糖値に有意差のないように 8 匹ずつ 2 群に分けた。この時、1 ケージあたり同群のラット 2 匹ずつに分けて解剖まで飼育した。35 週齢において、食餌を普通固形飼料から AIN-93M（オリエンタル酵母株式会社）とし、摂食量に有意差がでないように餌重量を決めて与えた。36 週齢から 37 週齢にかけて、4 時間絶食下で、8 日間連続で好中球エラストーゼ阻害剤（NEI）シベレスタッドナトリウム水和物（注射用エラスポール 100、小野薬品工業株式会社、大阪）を腹腔内投与し、30 分後から経口グルコース負荷試験（OGTT）を行った。血糖測定用血液および血清インスリン濃度測定用血液は、それぞれフッ化ナトリウム - ヘパリンリチウム処理微量採血管、プレイン微量採血管（テルモ株式会社）を用いて採取した。経口グルコース負荷試験が終了した翌日に、非絶食下において屠殺し、動脈血および動脈組織を採取した。屠殺時の動脈血液は、ベノジェクト II 血液採取管（テルモ株式会社）を用いて採取した。なお、本実験は静岡県立大学における動物実験に関する指針に従って実施した。

### 2) NE 活性阻害剤腹腔内投与および経口グルコース負荷試験（OGTT）

NE 活性阻害剤腹腔内投与および OGTT は、36 週齢から 37 週齢にかけて実施した。ラットを 4 時間絶食させた後、尾先端より採血を行った。血糖測定用血液および血清インスリン濃度測定用血液は、それぞれフッ化ナトリウム - ヘパリンリチウム処理微量採血管、プレイン微量採血管（テルモ株式会社）を用いた。空腹時血液（0 分時）を採取後、NEI 群には、NE 活性阻害剤（ $10 \text{ mg/mL/kg}$  体重）を、コントロール群には生理食塩水を腹腔内に投与し、30 分後にすべてのラットに対し体重  $1 \text{ kg}$  あたり  $2 \text{ g}$  のグルコースを経口投与した。投与試験は 8 日間連続して行い、グルコース負荷 15、30、60、90、120、180 分後の血液をそれぞれ尾先端より採取した。血液の採取は、1、3、8 日目のみ行い、その他の日ではグルコース投与後 3 時間で再摂食を行った。採取した血液は、 $4^{\circ}\text{C}$ 、 $3,000 \text{ rpm}$ （MX-305、トミー精工株式会社：以下、遠心分離は同機種で行った。）で 20 分間遠心して血漿および血清を得た。その後直ちに凍結させ、測定を行うまで  $-80^{\circ}\text{C}$  で保存した。

### 3) 血漿グルコース濃度および血清インスリン濃度の測定

血漿グルコース濃度の測定には、グルコース CII-テストワコーキット（和光純薬工



業株式会社) を使用した。血清インスリン濃度は、レビスラットインスリン ELISA キット (AKRIN-010、シバヤギ) を用いて測定した。

#### 4) 動脈組織からの総 RNA 抽出

屠殺後採取した動脈組織 0.1 g に、1 mL の solution D 溶液 (4 M guanidine thiocyanate、25 mM sodium citrate (pH 7.5)、0.5% sarcosyl、0.1 M 2-mercaptoethanol) を加え、テフロン型ホモジナイザーでホモジナイズし、ホモジナイズ溶液から総 RNA を抽出した。総 RNA の抽出は、第 1 章第 2 節と同様に、Chomczynski らの方法に従って行った[65]。RNA 濃度の測定は、Qubit<sup>TM</sup> fluorometer (インビトロジェン株式会社) を用いて行い、RNA が 1 サンプルあたり 153 ng 含まれるようにサンプル容量を算出した。

#### 5) 逆転写反応および定量的 RT-PCR

動脈組織から抽出した RNA は、Superscript III Reverse transcriptase (インビトロジェン株式会社) を用いて逆転写反応を行い、cDNA を作製した。

cDNA による定量的 PCR は、Universal Probe Library (ロシュ・ダイアグノスティクス株式会社) を用いて行った。Universal Probe Library を用いた PCR については第 1 章第 1 節に記載した。目的の mRNA 発現量は、内部標準として測定した遺伝子の mRNA 発現量で補正した相対値で求めた。この実験に使用したプライマーの塩基配列および Universal Probe Library の番号は Table 6 に示した。

#### 6) MILLIPLEX イムノアッセイによる動脈血中可溶性細胞接着分子濃度の測定

可溶性 ICAM-1 (sICAM-1) および可溶性 E-selectin (sE-selectin) 濃度は、MILLIPLEX MAP Rat Vascular Injury Magnetic Bead Panel 2 (Cat# RV2MAG-26K, メルクミリポア株式会社) を用いて測定した。血清サンプルおよびスタンダード溶液を、抗 sICAM-1 および抗 sE-selectin 抗体ビーズとともに付属のプレートのウェルに入れ、4°C で 20 時間インキュベートした。洗浄液でプレートを洗浄した後、ビオチン標識抗 sICAM-1 抗体あるいは抗 sE-selectin 抗体を加え、室温で 1 時間インキュベートし、さらにストレプトアビジン-フィコエリスリン溶液を加え、室温で 30 分間インキュベートした。プレートを洗浄後、各ウェルに Sheath Fluid を加え、よく振盪させてビーズを懸濁させ、Luminex 200 xPONENT システム (ルミネックス社) にかけて測定を行った。

#### 7) 統計解析

すべてのデータは、平均値±標準誤差で示した。

統計解析は、エクセル統計 (社会情報サービス株式会社) で行った。

**Fig. 7** および **Fig. 8** における群間の有意差は、Student's *t*-test により検定を行い、 $p < 0.05$  で有意差ありとした。

**Table 6** Sequences of the oligonucleotide primers used for real-time RT-PCR

Target mRNA	Sequence
Selectin E (E-selectin) (#18)	5'-TCTAAGATGCGAGCAATCAGG-3' 5'-CAGGATTCTGCAGACAGTTCA-3'
Intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) (#29)	5'-GCAGACCACTGTGCTTTGAG-3' 5'-TCCAGCTCCACTCGCTCT-3'
Vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) (#13)	5'-CAAATGGAGTCTGAACCCAAA-3' 5'-GGTTCTTTCGGAGCAACG-3'
Tumor necrosis factor (TNF- $\alpha$ ) (#63)	5'-GTCTACTGAACTTCGGGGTGA -3' 5'-ATGAGAGGGAGCCCATTTG-3'
Interleukin 18 (IL-18) (#76)	5'-CAACGAATCCCAGACCAGAC-3' 5'-ACATCCTTCCATCCTTCACAG-3'
Interferon gamma (IFN- $\gamma$ ) (#106)	5'-GTTTGCAGCTCTGCCTCAT-3' 5'-TTTCAATGAGTGTGCCTTGG-3'
Cluster of differentiation 11a (CD11a) (#58)	5'-TCAGTTCCCAGTCAAGTCAGC-3' 5'-AGCTCCTACAACCACATCTGC-3'
Cluster of differentiation 11b (CD11b) (#68)	5'-ACTCTGATGCCTCCCTTGG-3' 5'-CCTGGACACGTTGTTCTCAC-3'
Cluster of differentiation 11c (CD11c) (#122)	5'-AAGCCCAAGTGTTCCTTCG-3' 5'-AATGACGTGTCGGCTGCT-3'
Cluster of differentiation 18 (CD18) (#84)	5'-GGGCTGCTGGATAACCTACAC-3' 5'-GGGGCCTTTCACACACTCT-3'
YY1 transcription factor (YY1) (#125)	5'-CCAAGCAACTGGCAGAATTT-3' 5'-CCTTTATGAGGGCAAGCTATTG-3'

\*The numbers in parentheses indicate ID of a universal probe (Roche Diagnostics) used to detect the signals of each gene.

## 結果

### 1) OLETF ラットへの NE 活性阻害剤投与による体重および組織重量の変化

解剖時の体重および各組織重量を **Table 7** に示した。解剖時の体重は、コントロール群と NE 活性阻害剤を投与した NEI 群との間で有意な差はみられなかった。腸間膜脂肪組織および精巣上体脂肪組織重量は、コントロール群と比較して NEI 群で増加傾向を示したが、有意差はなかった。また、AIN-93M 摂食後の両群の摂食量に違いはみられなかった。

### 2) OLETF ラットにおける NE 活性阻害剤腹腔内投与および経口グルコース負荷の繰り返しによる血漿グルコース濃度および血清インスリン濃度の変化

36 週齢から 37 週齢にかけて、NE 活性阻害剤腹腔内投与および OGTT を 8 日間連続して行い、試験開始から 1、3、8 日目に経時的に採血し、血漿グルコース濃度および血清インスリン濃度を測定した結果を **Fig. 7** に示した。

試験開始日における血漿グルコース濃度は、空腹時は両群で変化はなかった（コントロール群：424.0±19.0 mg/dL、NEI 群：425.1±27.7 mg/dL）が、グルコース投与後 15 分から 180 分にかけての血糖値は、コントロール群と比較して NEI 群で低値を示し、180 分後では有意に低値であった。試験開始から 3 日目では、空腹時およびグルコース投与後 30、120、180 分の血漿グルコース濃度が、コントロール群と比べて NEI 群で有意に低かった。試験開始から 8 日目においても、空腹時およびグルコース投与後 180 分までの血漿グルコース濃度は、NEI 群でコントロール群と比して低値を示した。

血清インスリン濃度は、試験開始 1、3、8 日後のいずれの日でも、両群で有意な差はなかった。

### 3) NE 活性阻害剤腹腔内投与および経口グルコース負荷の繰り返しによる OLETF ラットの動脈組織における細胞接着分子遺伝子および炎症関連遺伝子の発現変動

解剖時に採取した動脈組織から RNA を抽出し、リアルタイム RT-PCR によって細胞接着分子遺伝子および炎症関連遺伝子の発現量を測定した結果を **Fig. 8a** に示した。

細胞接着分子 E-selectin の動脈組織における mRNA 発現量は、NEI 群においてコントロール群と比較して有意に低値を示した。他の細胞接着分子である ICAM-1 および VCAM-1 の mRNA 発現量も、NEI 群で低値を示す傾向にあった。炎症性サイトカイン TNF- $\alpha$  および INF- $\gamma$  の mRNA 発現量は、NEI 群においてコントロール群と比して有意に低く、IL-18 の mRNA 発現量も低値の傾向にあった。インテグリン分子である CD11a、CD11b、CD11c、CD18 の mRNA 発現量は、NEI 群で低値の傾向にあり、特に CD11c の mRNA 量は NEI 群で有意に低下した。

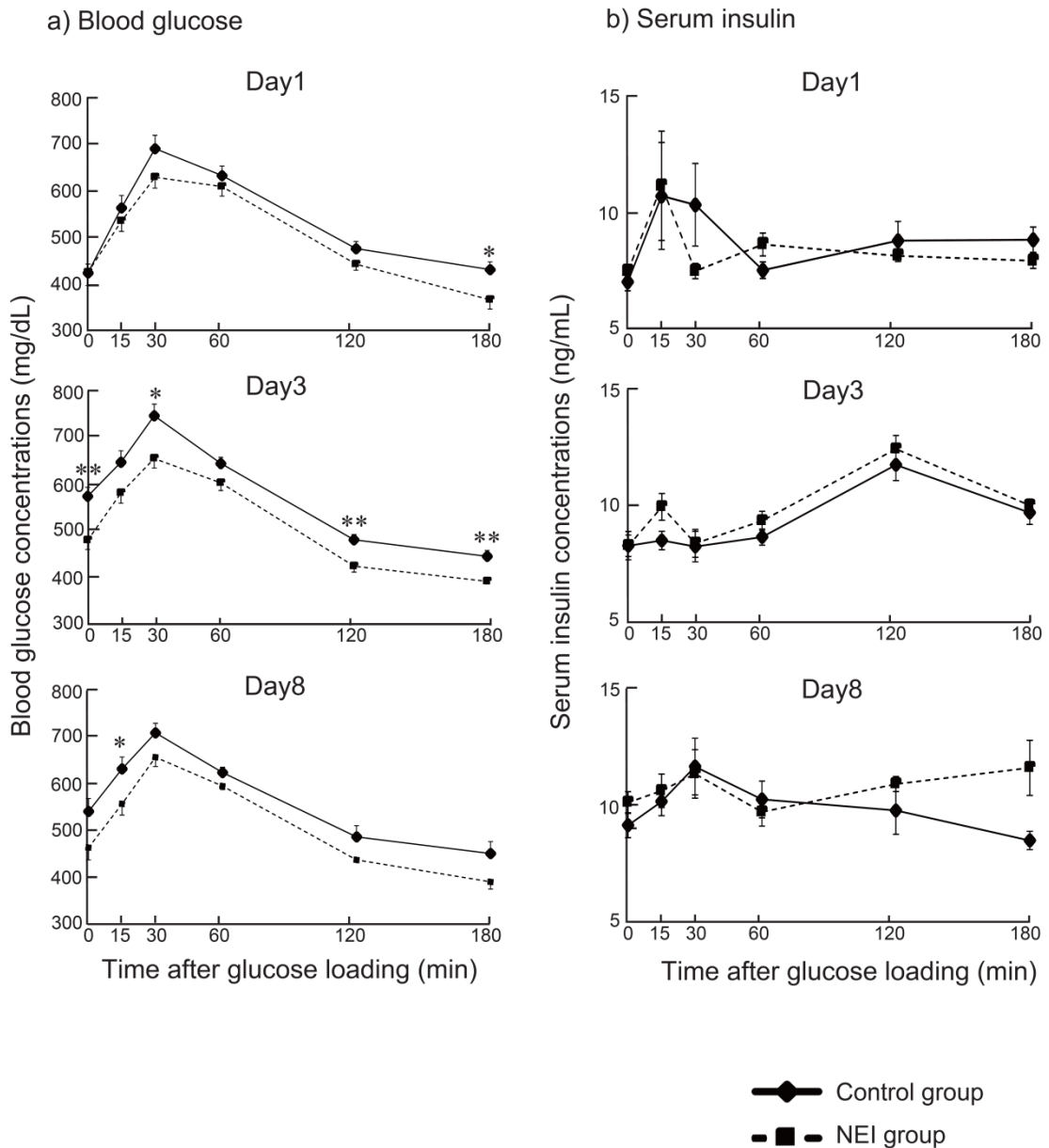
#### 4) NE 活性阻害剤腹腔内投与および経口グルコース負荷の繰り返しによる OLETF ラットの動脈血清における可溶性細胞接着分子濃度の変化

動脈血清における血中可溶性 E-selectin (sE-selectin) および可溶性 ICAM-1 (sICAM-1) タンパク質濃度を測定した結果を、**Fig. 8b** に示した。sE-selectin および sICAM-1 の動脈血清中のタンパク質濃度は、NEI 群においてコントロール群と比較して有意に減少していた。

**Table 7** Tissue weights in the OLETF rats assigned to both experimental group

	Body weight (g)	Liver weight (g/100g BW)	Mesenteric adipose tissue weight (g/100g BW)	Epididymal adipose tissue weight (g/100g BW)	Heart weight (g/100g BW)
Control group	559 ± 17	4.49 ± 0.07	0.91 ± 0.13	1.88 ± 0.19	0.29 ± 0.01
NEI group	552 ± 14	4.44 ± 0.09	1.09 ± 0.05	2.18 ± 0.11	0.31 ± 0.01

Values are expressed as means ± SEM for 8 rats.

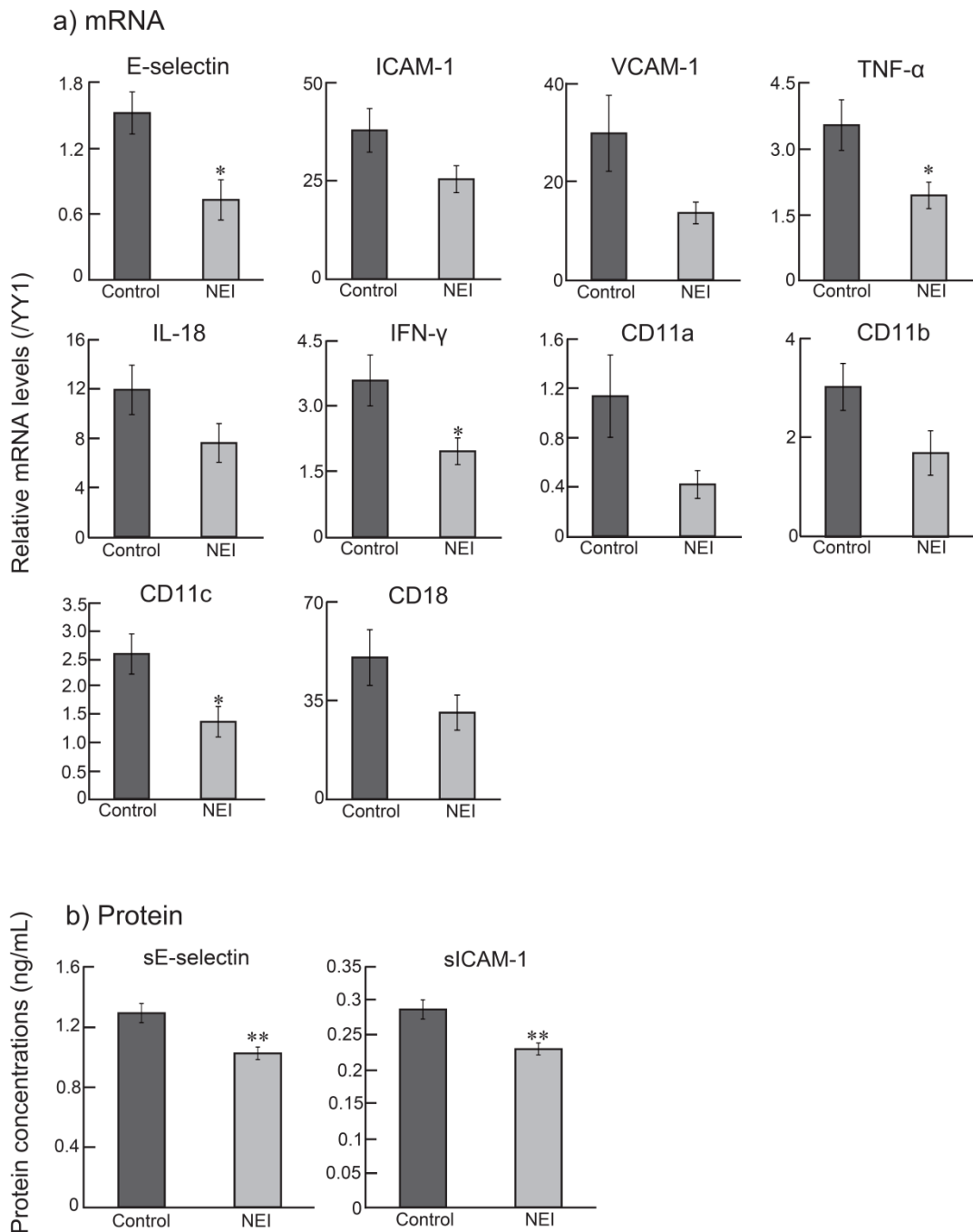


**Fig. 7 Changes in plasma glucose and serum insulin concentrations following glucose loading in the OLETF rats intraperitoneally administrated with neutrophil elastase inhibitor (NEI) on days 1, 3 and 8 after the beginning of the experiment.**

a) Blood glucose concentration. b) Serum insulin concentration.

The data are means  $\pm$  SEM for 8 animals.

\*\*\*; Significantly different from control group at  $p < 0.05$  and  $p < 0.01$ , respectively (Student's  $t$ -test).



**Fig. 8** Effects of NEI treatment on the expression of adhesion molecules and pro-inflammatory cytokine genes in the aorta tissues and arterial blood of OLETF rats.

(a) mRNA levels in the aorta tissues. (b) Protein concentrations in the serum.

The data are means  $\pm$  SEM for 7-8 animals.

\*\*\*; Significantly different from control group at  $p < 0.05$  and  $p < 0.01$ , respectively (Student's  $t$ -test).

## 考察

活性化した好中球から分泌される好中球エラスターゼ (NE) は、血管における組織傷害を促進すると考えられている。また近年の報告では、NE は骨格筋や脂肪組織等の末梢組織におけるインスリンシグナル伝達経路を障害することによって糖の取り込みや脂肪蓄積を低下させ、インスリン抵抗性や2型糖尿病を誘導することが報告されている[39,87]。さらにNEは好中球のさらなる活性化をもたらし、IL-1 $\beta$ やTNF- $\alpha$ 等の炎症性サイトカインの分泌を促進する。これらの炎症性サイトカインは、細胞接着分子の発現を誘導することによって組織に接着、浸潤し、組織傷害を惹起すると考えられている。活性化好中球から分泌されるNEは通常、内因性のプロテアーゼインヒビター ( $\alpha$ 1-PI) と血中で速やかに結合し不活化されるが、活性酸素種 (ROS) が存在すると  $\alpha$ 1-PI は失活し、NE の血中活性が増大する[86]。これらのことから、食後高血糖が NE 活性を増大させ、血管内皮の組織傷害を促進することによってインスリン抵抗性や2型糖尿病を発症・進展させる可能性がある。しかしながら、食後高血糖モデル動物において、NE の活性を抑制することによって、動脈組織における炎症が低減されるかは明らかではなかった。

そこで本節では、2型糖尿病モデルラットに対する1日1回の経口グルコース負荷時に、NE 活性阻害剤 (NEI) シベレスタッドナトリウム水和物を投与してNEの活性を抑制する試験を、8日間連続して行った。その後ラットから動脈組織および動脈血を採取し、動脈組織における炎症関連遺伝子および細胞接着分子遺伝子の発現量、ならびに動脈血清における可溶性細胞接着分子濃度が、NE 活性の抑制によって低下するかを検討した。

その結果、経口グルコース負荷試験開始1、3、8日後において、NE 活性阻害剤を腹腔内投与した群 (NEI 群) では、生理食塩水を投与したコントロール群と比較して、血漿グルコース濃度の低下がみられた。一方で血清インスリン濃度は、両群におけるいずれの試験日、時間においても変化はなかった。これまでに14日間NE阻害剤を投与したDIOマウスでは、耐糖能が顕著に改善することが報告されている[87]。本節において、単回の経口グルコース負荷時においてNEの活性を阻害すると、インスリンの変化を伴わずに糖負荷後の血漿グルコース濃度が低下することが明らかとなった。この結果は、糖負荷時のNE活性の抑制は、インスリン作用を増大させ、食後の血糖上昇を抑制することを示唆している。さらに、8日間連続で経口グルコース負荷試験を行うと、NEIの投与によって食後高血糖だけでなく空腹時血糖値も低下した。2型糖尿病は、インスリン抵抗性による食後血糖値の上昇を初発段階とし、やがてインスリン作用の不足による空腹時血糖値の上昇を呈し、発症する。それゆえ、NE活性阻害剤の繰り返し投与は、インスリン抵抗性を抑制すると考えられた。インスリンが膵 $\beta$ 細胞から分泌され、インスリン感受性組織において作用し、血糖低下作用を発揮するためには、末梢組織におけるインスリンシグナル伝達経路の正常性と、血管内



皮細胞を介したインスリンの組織移行が重要である。それゆえ、NEI 投与によるインスリン抵抗性の改善には、血管内皮細胞の機能の改善が関与する可能性が考えられた。

そこで本節では、動脈組織への白血球の接着・浸潤を促進し血管内皮の機能障害に関連する細胞接着分子 (E-selectin, ICAM-1, VCAM-1) および、動脈に浸潤した白血球が分泌する炎症性サイトカイン (TNF- $\alpha$ , IL-18, IFN- $\gamma$ )、インテグリン (CD11a, CD11b, CD11c, CD18) の遺伝子発現量を調べた。その結果、これらの遺伝子発現は、NEI 群においてコントロール群と比較して顕著に低下した。炎症性サイトカインは、食後高血糖による好中球、単球やマクロファージ等の白血球の活性化によって産生が増大し、血管内皮細胞表面への細胞接着分子の発現を誘導する[24-26]。また一方で、白血球は炎症性サイトカインによる自己活性化によって、血管内皮上の細胞接着分子の受容体であるインテグリン分子を細胞表面に発現する。これらの分子は、白血球、特に好中球の血管内皮へのローリング・接着・浸潤を亢進させる[69,70]。本節の結果は、食後高血糖の繰り返しによる動脈組織への白血球の接着あるいは浸潤の促進には、NE の活性の増大が関与する可能性を示唆している。さらに、動脈血清中における可溶性細胞接着分子 (sE-selectin, sICAM-1) 濃度も、NEI 群において有意に低下した。血管内皮に表出している細胞接着分子の一部、あるいはスプライシングにより産生された膜貫通部分をもたない細胞接着分子は、細胞外へ遊離し、末梢血中を循環する[89]。よって、可溶性細胞接着分子濃度は、細胞接着分子を発現する血管内皮細胞数を反映する。本節における結果は、NE の活性抑制は、細胞接着分子の血管内皮細胞上への発現を減少させたことを示している。以上の結果より、食後高血糖モデル OLETF ラットの動脈組織における炎症関連因子の発現は、NE の活性を阻害することによって低減されることが示唆された。今後、NEI の投与によって動脈組織への白血球の接着・浸潤が抑制されるかどうかを、組織免疫染色等の視覚化できる方法で検討する必要がある。さらに、NE 活性阻害剤が、食後高血糖の繰り返しによるインスリン抵抗性や炎症の増大をどのようにして抑制するかを、骨格筋や脂肪組織、肝臓組織等のインスリン感受性組織においてより詳細に調べる必要がある。

これらの結果をまとめると、食後高血糖を繰り返した時の NE の活性抑制は、2型糖尿病モデル OLETF ラットの動脈組織における炎症関連因子の発現を抑制することが明らかとなった。さらに動脈組織における炎症の抑制は、インスリンの作用を保ち、食後高血糖を抑制する一因となる可能性が示唆された。

## 第1章 総括

本章では、食後高血糖の抑制が、末梢血白血球からの炎症性サイトカインの分泌および、動脈組織における細胞接着分子の発現を低下させることによって、2型糖尿病の発症・進展および心血管疾患（CVD）の発症を抑制するかを2型糖尿病モデル動物で調べることを目的とした。

本章第1節では、2型糖尿病モデル OLETF ラットに対する単回の経口スクロース負荷は、末梢血白血球における食後高血糖誘導性の炎症関連遺伝子の発現増大をもたらすことが明らかとなった。さらにミグリトールやアナグリプチンによる食後高血糖の抑制は、これらの炎症関連遺伝子の発現増大を抑制し、2型糖尿病の発症・進展を抑制する可能性が高いことが示唆された。

本章第2節では、ミグリトールまたはアナグリプチンによる食後高血糖の長期抑制は、空腹時における末梢血白血球の炎症関連遺伝子の発現および、動脈組織における細胞接着分子の遺伝子発現およびタンパク質濃度を低下させることを明らかにした。この結果より、食後高血糖の長期的な抑制は、末梢血白血球や動脈組織における炎症関連因子の発現低下を介して CVD の発症を抑制する可能性があることが示された。

本章第3節では、好中球から分泌される好中球エラスターゼ（NE）が、食後高血糖によって誘導される動脈組織の炎症に関与するかを調べるために、NE の活性を選択的に阻害する薬剤であるシベレスタッドナトリウム水和物を糖負荷と同時に繰り返し投与した。その結果、食後高血糖を繰り返した時の NE の活性阻害は、動脈組織における炎症を抑制することが明らかとなった。また、動脈組織における炎症の抑制は、インスリンの作用を保ち、耐糖能異常を改善する一因となる可能性が示唆された。

本章により、食後高血糖の抑制は、炎症リスクを低減し、2型糖尿病の発症・進展および CVD の発症を抑制する可能性があることが実験動物において示された。

## 第2章

# 2型糖尿病患者における食後高血糖抑制による炎症リスクの 低減作用

## 第2章 序論

第1章の2型糖尿病モデル動物による検討では、食後高血糖の長期にわたる抑制は、動脈組織等における炎症を低減させ、心血管疾患（CVD）の発症・進展を抑制する可能性があることが示された。近年の多くの疫学研究では、HbA1cに表されるような血糖値の平均的な推移を示す値よりも、食後血糖値の上昇といった血糖値の変動を示す値の方が、その後の2型糖尿病の発症およびCVD等の合併症の発症・進展に関連することが明らかとなっている[3-6]。これらのことから、2型糖尿病患者において食後高血糖を抑制することは、炎症によるCVDの発症リスクを低減させると考えられる。

現在の2型糖尿病患者における経口糖尿病薬による治療は、食後血糖値を効率的に低下させることのできる $\alpha$ -GIやDPP-4阻害薬が主流となりつつある。両剤に共通するのは、食後高血糖を効果的に抑制することと、2型糖尿病治療において危惧される低血糖の出現が少ないことである。 $\alpha$ -GIは小腸において糖質の消化・吸収を遅延させること[33]によって、DPP-4阻害薬はインクレチンによる生理的インスリン分泌促進作用を保護すること[36]によって、食後高血糖を抑制する。また近年では、高血糖のみでなく低血糖を含めた全体的な血糖振幅の抑制が、2型糖尿病患者における合併症、特に大血管障害の発症予防に重要であることも明らかとなっている[37]。これらのことから、経口糖尿病薬の効果的な治療による食後高血糖の抑制および低血糖の出現率の低下を含む血糖振幅の改善は重要である。

本章第1節では、2型糖尿病患者における $\alpha$ -GIおよびDPP-4阻害薬の併用による血糖振幅の改善とCVD発症リスク因子の発現抑制との関連を調べるために、茨城県にある糖尿病専門クリニックに通院する2型糖尿病患者を対象とし、薬剤の単独療法から併用療法への切り替えによって、血糖コントロールが改善し、炎症関連遺伝子の発現および血中のサイトカインタンパク質濃度が低下するかを検討した。

本章第2節では、2型糖尿病患者におけるDPP-4阻害薬による血糖振幅の改善とCVD発症リスク因子の発現抑制について調べるために、1日1回投与のDPP-4阻害薬であるシタグリプチンを服用中にも関わらず、効果が不十分な2型糖尿病患者において、1日2回投与のDPP-4阻害薬であるビルダグリプチンに薬剤を変更した際に、血糖振幅および、末梢血白血球における炎症関連遺伝子および細胞接着分子遺伝子の発現が低下するかを調べた。

## 第2章 第1節

2型糖尿病患者における  $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害薬および  
DPP-4 阻害薬の併用による血糖振幅の改善と心血管疾患発症  
リスク因子の発現抑制との関連

## 序

近年、STOP-NIDDM や MeRIA7 のような疫学研究において、 $\alpha$ -GI であるアカルボースによる食後高血糖の抑制は、耐糖能異常者や2型糖尿病患者における2型糖尿病および、高血圧や心血管疾患（CVD）等の発生率を低下させることが報告されている[8-11]。これらの知見は、食後高血糖の抑制によって、2型糖尿病に付随するCVDの発症リスクを低減することを示唆している。 $\alpha$ -GIは、小腸の二糖類水解酵素の活性を抑制することで炭水化物の消化・吸収を遅延させ、食後高血糖を抑える薬剤である[33]。また、 $\alpha$ -GIの中でもミグリトールは、ボグリボースやアカルボースといった他の $\alpha$ -GIと異なり、小腸上部で吸収されるため、高用量で患者に投与できるという特徴を持つ。このことにより、ミグリトールは他の $\alpha$ -GIに比べ食事1時間後の血糖値を強く抑制し、血糖振幅を緩やかにする。本研究室の先行研究においても、2型糖尿病患者に対して $\alpha$ -GIの旧薬（アカルボース、ボグリボース）からミグリトールに切り換える処置を行うと、血糖値の振幅および低血糖の自覚症状が低下するとともに、末梢血白血球の炎症性サイトカインの遺伝子発現が低下することを明らかにしている[64]。これらのことから、ミグリトールは、2型糖尿病患者において効果的にCVDの発症を抑制することが可能であると考えられる。

また近年、消化管ホルモンであるインクレチンを増強することによって食後高血糖を抑制する新しい薬剤が開発された。インクレチンには、グルカゴン様ペプチド-1（GLP-1）と、グルコース依存性インスリン分泌刺激ポリペプチド（GIP）等がある。これらのホルモンは、食事刺激に応答して腸管より分泌され、膵 $\beta$ 細胞からのインスリンの分泌を増強する。インクレチン関連薬には、GLP-1受容体作動薬とDPP-4阻害薬の2つがある。このうちDPP-4阻害薬は、GLP-1およびGIPを分解するタンパク質分解酵素であるDPP-4を阻害することによって、これらインクレチンの血中濃度の上昇に伴うインスリン分泌促進効果により高血糖状態を改善する[36]。DPP-4阻害薬の利点は、GLP-1が膵 $\beta$ 細胞のインスリン分泌を促進するとともに、その分泌能力を保護する点にある[90]。実際に、高脂肪食およびストレプトゾトシンによって糖尿病を誘発したマウスに対し、DPP-4阻害薬を投与したところ、膵臓におけるグルコース応答性のインスリン分泌能力が回復したことが報告されており[91]、これはGLP-1による膵 $\beta$ 細胞の保護効果であると考えられる。また、インクレチンはある一定以上のグルコース存在下でのみインスリン分泌を促進し[45,46]、正常血糖域ではインスリン分泌を促進しない。そのため、2型糖尿病治療薬において危惧される低血糖のリスクが少なく、さらに食後高血糖とともに空腹時の高血糖も改善する[47,48]。

以上のように、ミグリトールは消化管における炭水化物の消化・吸収を遅延させ、食後高血糖を抑制する。一方でDPP-4阻害薬は、インクレチン効果の増強によって膵 $\beta$ 細胞の機能を補助し、血糖値を低下させる。このような作用メカニズムの異なる2つの薬剤の併用では、互いの薬剤が協調的に機能を発揮することによって、相加的な

血糖コントロール改善効果が得られることが期待される。

しかしながら、これら薬剤の併用療法による効果を示したデータの蓄積は不十分であり、さらにヒトにおける臨床的な研究の報告は乏しい。これまでに、健常人を対象として行った単回の食事負荷試験において、ミグリトールと DPP-4 阻害薬であるシタグリプチンの共投与群では、単独投与群と比較して、食後の血糖値、インスリン、総 GIP 濃度が低く、活性型 GLP-1 濃度が高かったことが報告されている[92]。しかしながら、2 型糖尿病患者においてそれらの効果を示した報告はない。

CVD をはじめとした糖尿病合併症の発症・進展には、酸化ストレスや炎症が関与していることが、多くの研究により明らかとなっている[93]。酸化ストレスは、白血球をはじめとしたさまざまな組織からの炎症性サイトカインの分泌を促進する[13,14]。IL-1 $\beta$  や TNF- $\alpha$  は、活性化された好中球、単球、マクロファージなどから分泌され、血管内皮細胞表面の細胞接着分子 (E-selectin、ICAM-1、VCAM-1) の発現を誘導することがわかっている[24-26,94]。これら細胞接着分子の血中可溶性濃度は、健常人や 1 型糖尿病患者における CVD 発症リスクと関連していることが報告されている[95-97]ことから、炎症性サイトカインや細胞接着分子が、CVD をはじめとする糖尿病合併症の発症・進展に関与することを示唆している。

これらを踏まえると、2 型糖尿病患者に対するミグリトールとシタグリプチンの併用療法が、血糖コントロール改善、特に食後高血糖の抑制をもたらし、末梢血白血球における炎症性サイトカインおよび血管内皮における細胞接着分子の発現を抑制することによって、CVD の発症リスクを低減させる可能性がある。

そこで本節では、茨城県にある糖尿病専門クリニックに通院する 2 型糖尿病患者を対象とし、薬剤の単独療法から併用療法に切り替えて経過を観察し、併用療法によって、血糖コントロールや血糖管理に重要な臨床検査値が改善するか、また、炎症関連遺伝子の発現および血中のサイトカインタンパク質濃度が低下するかを調べ、2 型糖尿病における CVD の発症リスク抑制効果について検討した。

## 方法

### 1) 対象者

対象者は、茨城県那珂市にある糖尿病専門クリニック（那珂記念クリニック、茨城県）に通院する2型糖尿病患者の中から選定した。

選定条件は以下の通りである。

- ・2010年5月から2010年10月の間に本院を受診した者
- ・HbA1cが6.5%から10.5%（NGSP値）の者
- ・試験開始時点の少なくとも前2ヵ月において、ミグリトール（Group-M）またはシタグリブチン（Group-S）の各薬剤を単独で50 mg処方されており、その投与量が一定であった者
- ・他薬の処方を受けていない者

また、除外対象とした条件は以下の通りである。

- ・妊娠中または妊娠の可能性のある者、またはその計画がある者
- ・重篤な腎障害（クレアチニン  $\geq 2$  mg/dL）を有する者
- ・20歳以下の者
- ・重篤な臨床条件（肝障害、循環器疾患、肺機能障害、膵臓疾患、がん、感染症、外部障害、2型糖尿病合併症など）を有する者
- ・手術前後の者
- ・その他、担当医師が本研究において適当でないと判断した者

選定の結果、ミグリトールを単独で服用していた患者（Group-M）18名、シタグリブチンを単独で服用していた患者（Group-S）14名が、対象者として登録された。対象者は、**Fig. 9**に示すフローチャートの通りに選定した。すべての対象者に対してインフォームド・コンセントを行い、本臨床試験におけるデータおよび解析結果の扱いに関する同意を得た。本研究のプロトコールは、那珂記念クリニックの倫理委員会の承認を受けて行った。

### 2) 研究デザイン

研究デザインの概要は**Fig. 9**に示した。すべての対象者には、試験開始の少なくとも2ヵ月前から同じ治療を継続させた。併用療法を開始する1ヵ月前を単独療法観察期間とし、対象者には継続して同薬を同用量処方した。（Group-M：ミグリトール50 mg、Group-S：シタグリブチン50 mg）

その後、併用療法として、Group-MおよびGroup-Sの患者に対して、それぞれシタグリブチン50 mgおよびミグリトール50 mgを追加服用させた（併用療法期間）。単独療法から併用療法の切り替えは期間を空けずに行った。併用療法の観察期間は3ヵ



月とした。単独療法終了期および併用療法終了期において血液サンプルを採取し、さらに同時期に食事負荷試験を行った。

### 3) 体重測定および血液検査

単独療法終了時および併用療法終了時において体重測定を行い、血液サンプルを採取した。血液採取では、前日夜より絶食とし、早朝血液を採取した。血液検査は、HbA1c、グリコアルブミン、1,5-アンヒドログリシトール(1,5-AG)、血糖値、血清中性脂肪(TG)、血清コレステロール濃度(TC)、血清HDL-コレステロール濃度について行った。

### 4) 自己血糖モニタリング (Self-monitoring blood glucose, SMBG)

自己血糖測定には、Glutest Neo SMBG device (三和化学株式会社) を用い、単独療法時および併用療法時の任意の1日間における、各食事(朝食、昼食、夕食)前と食事終了1時間後に測定した。対象者ごとに各時点の測定値を集計して1日の血糖変動データとした。得られたデータは、Serviceらの計算式[98]にあてはめ、MAGE (mean amplitude of glycemic excursions) に準じた値を算出して血糖変動の指標とした。

### 5) 食事負荷試験

単独療法終了時および併用療法終了時において、食事負荷試験を行った。2回の食事負荷試験における食事内容は全対象者で同一のものとし、試験食はエネルギー490 kcal (C: 64%、P: 12.5%、F: 23.5%) とした。食事負荷前および負荷1、2時間後において血液を採取し、血糖値、インスリン濃度、活性型GLP-1濃度、活性型GIP濃度、総GIP濃度を測定した。インクレチン濃度測定のための血液については、DPP-4阻害薬を含む採血管BD™ P700 (GLP-1保存用真空採血管, BD バイオサイエンス) を用いて採取した。採取した血漿は測定まで-80°Cで保存した。また、同じく食事負荷前および負荷1、2時間後において、末梢血白血球における遺伝子発現測定のための血液サンプルを採取(1 mLの血液をPAX gene 固定液 (BD バイオサイエンス) に混和)した。採取した血液サンプルは、室温で24時間以上静置した後、凍結保存した。さらに、インスリン濃度測定のための血清から、血中サイトカイン濃度を測定するためのサンプルを分取した。

### 6) インクレチン濃度の測定

食事負荷試験における活性型GLP-1濃度の測定では、OASIS HLB Extraction Cartridge (Waters, Milford, MA) を用いた固相抽出による血漿の前処理を行った。カラムに吸着した検体は2%アンモニア含有75%メタノール溶液で溶出し、窒素気流下で乾固後、Glucagon Like Peptide-1 (Active) ELISA キット (メルクミリポア株式会社) を用いて測定した。なお、キット付属の標準品は用いず、GLP-1 (7-36) amide (ペプチド研究所、大阪) を assay buffer で溶解、希釈して測定の標準液とした。活性型GIP濃度および総GIP濃度はLC-MS/MS/MSによって測定した[99]。

### 7) 定量的リアルタイム PCR による炎症関連遺伝子の発現量の測定

PAX gene 固定液 (BD バイオサイエンス) によって固定したサンプルから、第 1 章第 1 節で記載した方法に従って、総 RNA を抽出した。RNA 濃度の定量は、インビトロジェン株式会社の Qubit™ fluorometer を用いて測定し、標準 RNA 溶液と蛍光強度を比較することにより RNA 濃度を求めた。RNA が 100 ng 含まれるように調整したサンプルから cDNA を合成し、Universal Probe Library (ロシュ・ダイアグノスティクス株式会社) を用いて定量的リアルタイム PCR を行った。Universal Probe Library を用いた PCR については、第 1 章第 1 節に記載した。目的の mRNA 発現量は、内部標準として測定した遺伝子の mRNA 発現量で補正した相対値で求めた。この実験に使用したプライマーの塩基配列は **Table 8** に示した。

### 8) MILLIPLEX イムノアッセイによる血中炎症性サイトカインおよび血中可溶性細胞接着分子濃度の測定

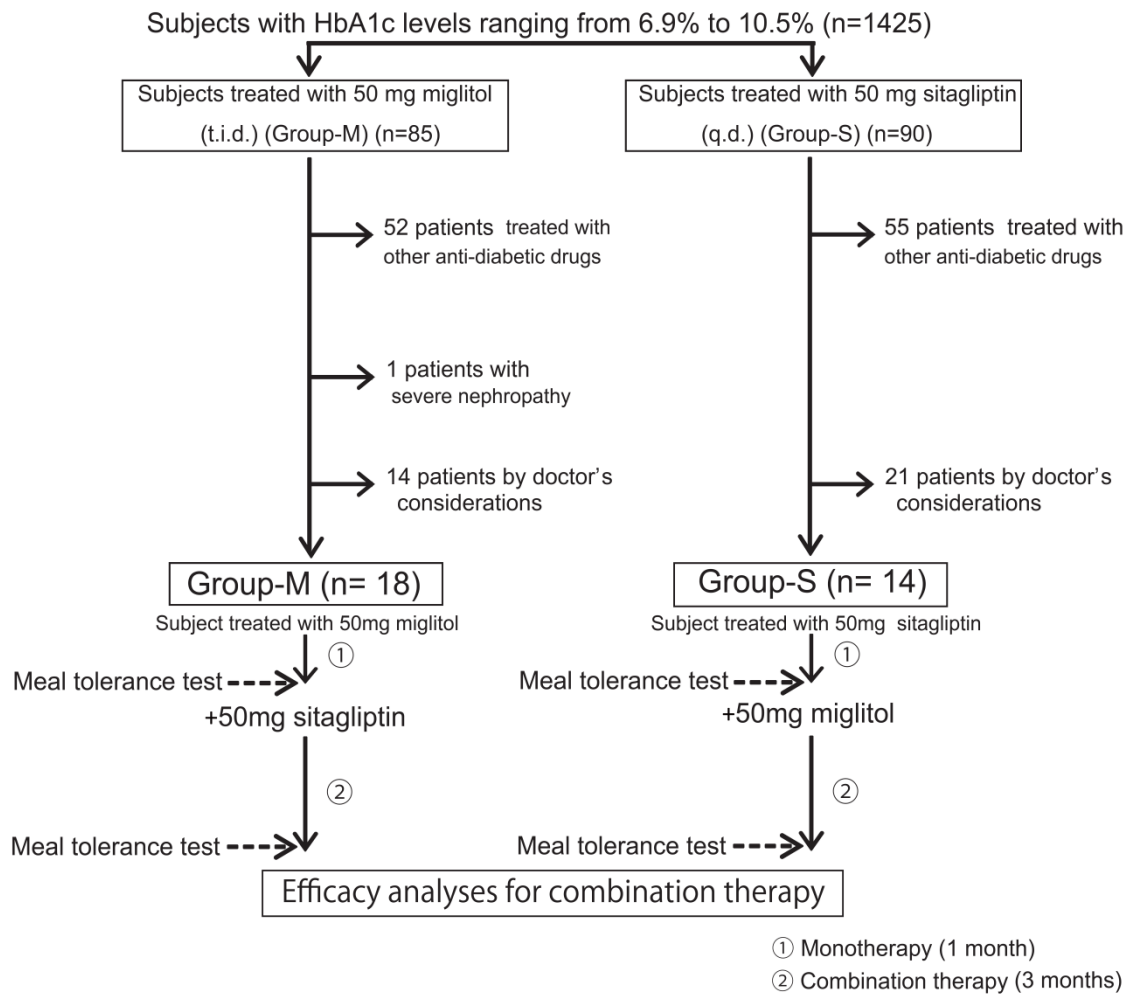
血中における炎症性サイトカイン濃度の測定は、Bio-Plex Pro™ Assays (バイオ・ラッド ラボラトリーズ株式会社) を用いた。また、可溶性細胞接着分子濃度の測定は、MILLIPLEX™ MAP Kit Human Cardiovascular Disease (CVD) Panel 1 (Cat# HCVD1-67AK、メルクミリポア株式会社) を用いた。測定は、Luminex 200 xPONENT システム (ルミネックス社) にて行った。

### 9) 統計解析

全ての実験データは、平均値±標準偏差で示した。

統計解析は、エクセル統計 (社会情報サービス株式会社) で行った。

**Table 9**、**Table 10**、**Fig. 10b**、**Table 11** におけるグループ間の有意差は、Student's *t*-test (対応あり) で判断した。**Fig. 10a**、**Fig. 11** は二元配置分散分析における Tukey の検定で判断した。 $p < 0.05$  で有意差ありとした。



**Fig. 9 Study design**

**Table 8** The sequences of oligonucleotide primers used for real-time RT-PCR

Target mRNA	Sequence
Interleukin 1 beta (IL-1 $\beta$ ) (#78)	5'-CTGTCCTGCGTGTTGAAAGA -3' 5'-TGGGTAATTTTTGGGATCTACA -3'
Interleukin 8 (IL-8) (#72)	5'-AGACAGCAGAGCACACAAGC-3' 5'-ATGGTTCCTTCCGGTGGT -3'
Tumor necrosis factor (TNF- $\alpha$ ) (#29)	5'-CAGCCTCTTCTCCTTCCTGAT -3' 5'-GCCAGAGGGCTGATTAGAGA -3'
Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT) (#73)	5'-TGACCTTGATTATTTTGCATACC -3' 5'-CGAGCAAGACGTTTCAGTCCT-3'

\*The numbers in parentheses indicate ID of a universal probe (Roche Diagnostics) used to detect the signals of each gene.

## 結果

### 1) 2型糖尿病患者におけるミグリトールまたはシタグリプチンの単独療法から併用療法に切り替えた時の血液臨床パラメーターの変化

ミグリトールあるいはシタグリプチンの単独療法時およびミグリトール/シタグリプチン併用療法開始3ヵ月後の両グループの特徴を **Table 9** に示した。

ミグリトール単独療法にシタグリプチンの併用療法を処置する群を **Group-M**、シタグリプチン単独療法にミグリトールの併用療法を処置する群を **Group-S** と定義した。

**Group-M** において、ミグリトール/シタグリプチン併用療法切り替え3ヵ月後の HbA1c (%), グリコアルブミン濃度(%) は、ミグリトール単独療法時と比較して有意に ( $p < 0.001$ ) 低下し、血糖振幅の指標として用いられている 1,5-AG 濃度は、有意な ( $p < 0.001$ ) 上昇を示した。

**Group-S** において、ミグリトール/シタグリプチン併用療法切り替え3ヵ月後の HbA1c (%) ( $p < 0.001$ )、グリコアルブミン濃度(%) ( $p < 0.01$ ) は、シタグリプチン単独療法時と比較して有意に低下し、1,5-AG 濃度は有意に上昇 ( $p < 0.001$ ) した。

### 2) 単独療法から併用療法への切り替えによる食後血糖値および血糖変動域(MAGE)の変化

自己血糖測定 (SMBG) によって測定された血糖値および、SMBG の測定値より算出した血糖変動域 (MAGE) の結果を **Fig. 10** に示した。

**Group-M** では、併用療法切り替え3ヵ月後の血糖値は、ミグリトール単独療法時と比較して、すべての時間帯(朝食前後、昼食前後、夕食前後)において有意に ( $p < 0.001$ ) 低値を示した。さらに食後の血糖の上昇は、単独療法時には毎食後に観察されたが、併用療法切り替え3ヵ月後は、朝食後以外には観察されなかった (**Fig. 10a**)。

**Group-S** では、併用療法切り替え3ヵ月後の血糖値は、シタグリプチン単独療法時に比べて、毎食後(朝食後、昼食後、夕食後)において有意に ( $p < 0.001$ ) 低値を示した。 (**Fig. 10a**)。

また、血糖値の振幅の指標となる MAGE は、**Group-M**、**Group-S** のいずれにおいても、単独療法時よりも併用療法切り替え3ヵ月後において有意に ( $p < 0.01$ ) 低値を示した (**Fig. 10b**)。

### 3) 食事負荷試験における各検査データの変化

ミグリトールあるいはシタグリプチンの単独療法終了時および、併用療法切り替え3ヵ月後に食事負荷試験を行い、食事負荷0、1、2時間後の血液を採取し、血糖値、インスリン濃度、活性型 GLP-1 濃度、活性型 GIP 濃度、総 GIP 濃度を測定した (**Table 10**)。

(a) 血糖値の変化

Group-M の食事負荷前の血糖値は、併用療法切り替え 3 ヶ月後において、ミグリトールの単独療法時と比較して、有意に ( $p < 0.01$ ) 低かった。また、ミグリトール単独療法時、併用療法切り替え 3 ヶ月後どちらにおいても、食事負荷 2 時間後まで血糖値が徐々に上昇した。併用療法切り替え 3 ヶ月後において食事負荷 1、2 時間後の血糖値は、ミグリトール単独療法時と比較して有意に ( $p < 0.001$ ) 低値を示した。

Group-S の食事負荷前の血糖値は、シタグリプチンの単独療法時と、併用療法切り替え 3 ヶ月後に差は観察されなかった。また、シタグリプチン単独療法時、併用療法切り替え 3 ヶ月後のどちらにおいても、食事負荷 2 時間後まで血糖値が徐々に上昇したが、併用療法切り替え 3 ヶ月後の食事負荷 1、2 時間後の血糖値は、シタグリプチン単独療法時と比較して有意に ( $p < 0.001$ ) 低値を示した。

(b) インスリン濃度の変化

インスリン濃度は、Group-M、Group-S とともに、食事負荷前および食事負荷後において、単独療法時および併用療法切り替え 3 ヶ月後のいずれにおいても有意な変化はなかった。

(c) 活性型 GLP-1 濃度の変化

Group-M における食事負荷前の血中活性型 GLP-1 濃度は、併用療法時においてミグリトール単独療法時と比較して有意に ( $p < 0.01$ ) 高かった。またミグリトール単独療法、併用療法切り替え 3 ヶ月後どちらにおいても、食事負荷前から食事負荷 1 時間後にかけて血中活性型 GLP-1 濃度は上昇したが、併用療法切り替え 3 ヶ月後の食事負荷 1、2 時間後の血中活性型 GLP-1 濃度は、ミグリトール単独療法の時に比べて有意に ( $p < 0.001$ ) 高値を示した。

Group-S における食事負荷前の血中活性型 GLP-1 濃度は、シタグリプチン単独療法時および併用療法切り替え 3 ヶ月後に差はみられなかった。食事負荷後の血中活性型 GLP-1 濃度は、シタグリプチン単独療法時、併用療法切り替え 3 ヶ月後のどちらにおいても、食事負荷 1 時間後にかけて上昇した。食事負荷 1、2 時間後の血中活性型 GLP-1 濃度は、併用療法切り替え 3 ヶ月後において、シタグリプチン単独療法時と比較して有意に ( $p < 0.001$ ) 高値を示した。

(d) 活性型 GIP 濃度の変化

Group-M における食事負荷前の血中活性型 GIP 濃度は、併用療法切り替え 3 ヶ月後において、ミグリトール単独療法時と比較して有意に ( $p < 0.05$ ) 高かった。またミグリトール単独療法時、併用療法切り替え 3 ヶ月後どちらにおいても、食事負荷前から食事負荷 2 時間後にかけて血中活性型 GIP 濃度は上昇したが、併用療法切り替え 3 ヶ月後の食事負荷後の血中活性型 GIP 濃度の 2 時間値は、ミグリトール

単独療法の時に比べて有意に ( $p < 0.05$ ) 高値を示した。

一方で、Group-S における食事負荷前の血中活性型 GIP 濃度は、シタグリプチン単独療法、併用療法切り替え 3 ヶ月後に差はみられなかった。食事負荷後の血中活性型 GIP 濃度は、シタグリプチン単独療法時、食事の負荷によって食事負荷前から食事負荷 1 時間後にかけて上昇し、2 時間後には減少する傾向にあった。併用療法切り替え 3 ヶ月後の食事負荷 1 時間後の血中活性型 GIP 濃度は、シタグリプチン単独療法時に比べて有意に ( $p < 0.01$ ) 低値を示した。

#### (e) 総 GIP 濃度の変化

食事負荷前の血中総 GIP 濃度は、Group-M と Group-S のいずれでも、単独療法時、併用療法切り替え 3 ヶ月後に差は観察されなかった。

Group-M における血中総 GIP 濃度は、ミグリトール単独療法時、併用療法時ともに、食事負荷前から食事負荷 2 時間後にかけて上昇した。併用療法切り替え後において、食事負荷 1、2 時間後の血中総 GIP 濃度は、ミグリトール単独療法時に比べて有意に ( $p < 0.01$ ) 低値を示した。

Group-S における血中総 GIP 濃度は、シタグリプチン単独療法時では、食事負荷前から食事負荷 1 時間後にかけて上昇した。一方、併用療法切り替え 3 ヶ月後では食事負荷前から 2 時間後にかけて上昇した。併用療法切り替え 3 ヶ月後の総 GIP 濃度は、食事負荷 1 時間後において、シタグリプチン単独療法時と比較して、有意に ( $p < 0.01$ ) 低値を示した。

#### 4) 末梢血白血球における炎症関連遺伝子の発現変動

ミグリトールあるいはシタグリプチンの単独療法終了時、および併用療法切り替え 3 ヶ月後に実施した食事負荷試験において、血液を採取し、総 RNA の抽出、cDNA の合成を行い、定量的リアルタイム PCR にて末梢血白血球における炎症性サイトカインの遺伝子発現を測定した結果を Fig. 11 に示した。

Group-M における末梢血白血球 IL-1 $\beta$  の mRNA 量は、併用療法切り替え 3 ヶ月後の食事負荷前の発現量が、ミグリトール単独療法の時に比べ有意に ( $p < 0.01$ ) 高値を示した。ミグリトール単独療法時には、IL-1 $\beta$  の mRNA 発現量は、食事負荷 1 時間後には食事負荷前に比べて有意に ( $p < 0.05$ ) 増大していたが、併用療法切り替え 3 ヶ月後では、食事負荷後の IL-1 $\beta$  の mRNA 量の発現増大は観察されなかった。末梢血白血球における TNF- $\alpha$  および IL-8 の mRNA 量は、ミグリトール単独療法時、併用療法切り替え 3 ヶ月後ともに、食事負荷 2 時間後まで変動は見られなかった。

Group-S では、Group-M と比較すると、単独療法終了時の食事負荷前における末梢血白血球の炎症関連遺伝子の発現量が、全体的に高い傾向がみられた。末梢血白血球における IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-8 の mRNA 量は、シタグリプチン単独療法の時には、食事負荷後に発現量が増大し、1 時間後もしくは 2 時間後の発現量が、食事負荷前よりも有意に高かったが、併用療法切り替え 3 ヶ月後では、食事負荷に伴う末梢血白血球

における炎症関連遺伝子の発現増大は観察されなかった。これらの遺伝子発現はいずれも、シタグリプチン単独療法時および併用療法切り替え3ヵ月後の食事負荷前における発現量に差は観察されなかった。しかしながら、食事負荷1時間後もしくは2時間後において、併用療法切り替え3ヵ月後では、シタグリプチン単独療法の時と比較して有意に遺伝子発現量が減少していた。

#### 5) 炎症性サイトカインおよび可溶性細胞接着分子の血中タンパク質濃度の変化

ミグリトールあるいはシタグリプチンの単独療法終了時、および併用療法切り換え3ヵ月後に実施した食事負荷試験において血液を採取し、Luminex 200 xPONENT システムにて、炎症性サイトカインおよび可溶性細胞接着分子の血中タンパク質濃度を測定した結果を、**Table 11** に示した。

Group-Mの併用療法切り替え3ヵ月後における血中IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-8、IL-12、TNF- $\alpha$ 、MCP-1濃度は、食事負荷前、食事負荷後の全ての時間において、ミグリトール単独療法時に比べて低値を示す傾向があった。併用療法切り替え3ヵ月後の血中sE-selectin濃度は、食事負荷前および食事負荷1時間後において、ミグリトール単独療法時と比較して、有意に ( $p < 0.01$ ) 低値を示した。血中sICAM-1、sVCAM-1の濃度は、ミグリトール単独療法時および併用療法切り替え3ヵ月後のいずれにおいても、食事負荷後に血中サイトカイン濃度の有意な変動は観察されなかった。血中tPAI-1の濃度は、食事負荷2時間後において、ミグリトール単独療法時と比較して、併用療法切り替え3ヵ月後の方が有意に ( $p < 0.05$ ) 低値を示した。

Group-Sでは、併用療法切り替え3ヵ月後における血中IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-8、TNF- $\alpha$ 、MCP-1濃度が、食事負荷前および食事負荷後の全ての時間において、シタグリプチン単独療法の時よりも低値を示す傾向があった。特に、血中IL-8濃度は、食事負荷前および食事負荷1、2時間後の濃度が、シタグリプチン単独療法時に比べ、併用療法切り替え3ヵ月後において有意に ( $p < 0.05$ ) 低値を示した。また、食事負荷前、食事負荷1時間後および2時間後の血中sE-selectin濃度は、シタグリプチン単独療法時に比べ、併用療法切り替え3ヵ月後において有意に ( $p < 0.05$ ) 低値を示した。sVCAM-1については、食事負荷前および食事負荷2時間後における血中濃度が、併用療法切り替え3ヵ月後において、シタグリプチン単独療法時と比較して、有意に ( $p < 0.05$ ) 低値を示した。血中sICAM-1およびtPAI-1の濃度は、ミグリトール単独療法時および併用療法切り替え3ヵ月後においても、有意な変動は観察されなかった。

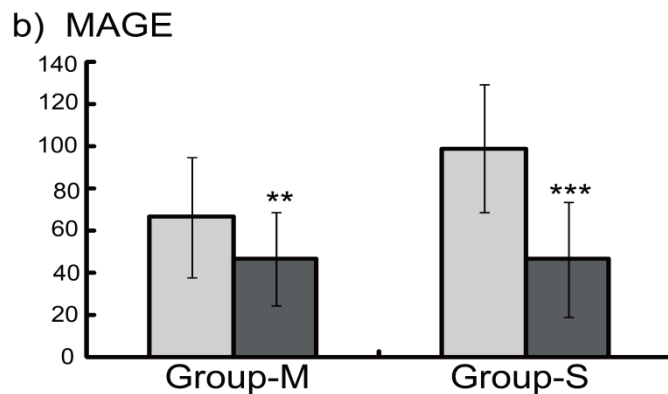
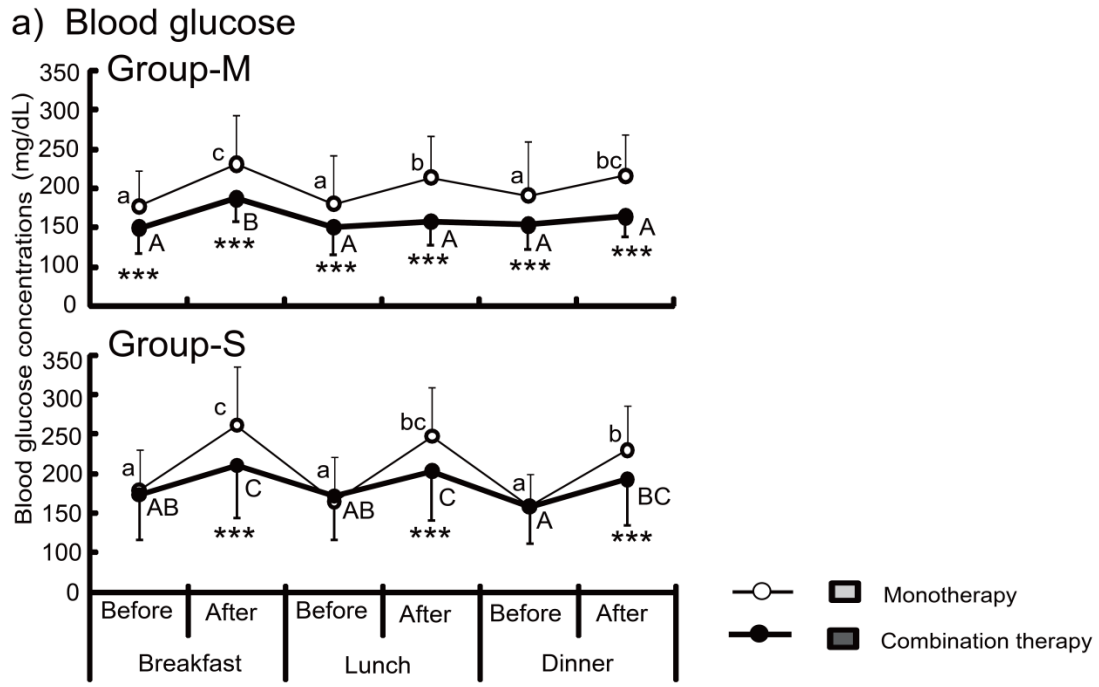


**Table 9** Basic parameters at the end of monotherapy and combination therapy

	Group-M			Group-S		
Sex (male/female)	7/11			10/4		
Age (years)	58.6 ± 7.3			54.8 ± 9.6		
	Month 0	Month 3	Change	Month 0	Month 3	Change
HbA1c (%)	8.6 ± 1.4	7.3 ± 0.8	-1.3 ± 0.7 ***	8.5 ± 1.2	7.9 ± 1.3	-0.6 ± 0.5 ***
Glycoalbumin (%)	23.1 ± 4.4	19.2 ± 3.5	-3.9 ± 2.4 ***	23.3 ± 4.8	21.7 ± 4.6	-1.6 ± 1.8 **
1,5-AG (µg/mL)	9.8 ± 6.6	16.8 ± 8.2	6.9 ± 5.3 ***	5.0 ± 3.8	10.4 ± 5.8	5.3 ± 4.2 ***
TG (mg/dL)	164 ± 184	125 ± 102	-39 ± 87	122 ± 59	122 ± 68	-1 ± 60
TC (mg/dL)	196 ± 36	194 ± 39	-2 ± 26	195 ± 26	194 ± 24	-2 ± 13
HDL-C (mg/dL)	60.2 ± 10.7	63.8 ± 12.7	3.6 ± 8.9	66.8 ± 17.0	63.6 ± 14.6	-3.2 ± 6.4
Body weight (kg)	59.5 ± 11.9	59.1 ± 11.4	-0.3 ± 1.5	64.7 ± 10.0	64.2 ± 10.2	-0.5 ± 1.4

Values are expressed as means ± SD.

\*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , significant difference vs. the end of monotherapy by paired  $t$ -test.



**Fig. 10** Effects of switching from miglitol monotherapy (Group-M) or sitagliptin monotherapy (Group-S) to miglitol/sitagliptin combination therapy on self-monitoring blood glucose levels before and after meals, and mean amplitude of glycemic excursions (MAGE) in type 2 diabetic patients.

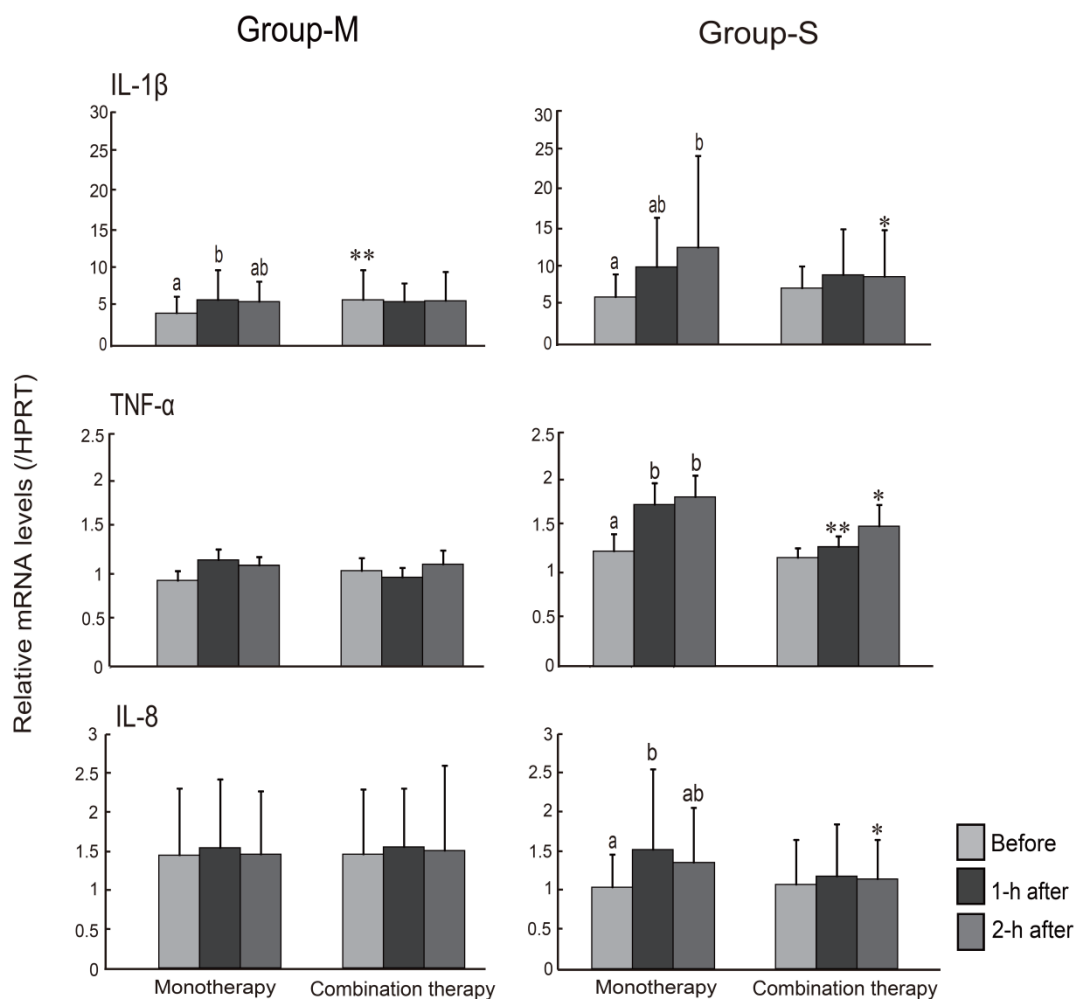
a) Blood glucose. Values are means  $\pm$  SD. Values not sharing a common alphabet are significantly different from each other at the same time period by Tukey's test based on repeated two-way ANOVA in each group. Asterisks denote significant differences (Tukey's test based on repeated two-way ANOVA) compared with the value obtained at the period of monotherapy (\*\*\*)  $p < 0.001$ .

b) MAGE (mean amplitude of glycemic excursions). Asterisks denote significant differences (paired Student's t-test) compared with the value obtained at the period of monotherapy (\*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ ).

**Table 10** Plasma concentrations of glucose, active GLP-1, active GIP, and total GIP following meal tolerance tests at the end of monotherapy and combination therapy

		Group-M			Group-S		
		Before	1 h after	2 h after	Before	1 h after	2 h after
Plasma glucose (mg/dL)	Monotherapy	168 ± 46	228 ± 54	260 ± 64	169 ± 34	268 ± 53	268 ± 70
	Combination therapy	141 ± 20 **	173 ± 27 ***	201 ± 35 ***	157 ± 36	203 ± 39 ***	229 ± 46 ***
Insulin (mU/L)	Monotherapy	2.88 ± 1.55	8.88 ± 4.10	12.8 ± 6.6	3.78 ± 4.73	15.6 ± 12.5	14.9 ± 11.4
	Combination therapy	2.67 ± 1.32	8.63 ± 5.10	17.1 ± 12.5	3.08 ± 2.93	7.87 ± 5.43	13.4 ± 11.5
Active GLP-1 (pmol/L)	Monotherapy	0.89 ± 0.68	3.98 ± 1.80	2.91 ± 1.58	2.90 ± 1.90	7.35 ± 2.95	5.81 ± 2.61
	Combination therapy	2.37 ± 1.30 ***	10.7 ± 4.0 ***	8.67 ± 3.00 ***	2.75 ± 1.10	11.1 ± 3.6 **	7.97 ± 2.70 *
Active GIP (pmol/L)	Monotherapy	14.6 ± 8.4	62.7 ± 37.9	82.5 ± 58.6	45.4 ± 41.6	168 ± 80	111 ± 55
	Combination therapy	39.8 ± 32.0 *	71.9 ± 40.2	137 ± 92.0*	38.8 ± 25	111 ± 60 **	129 ± 50
Total GIP (pmol/L)	Monotherapy	68.0 ± 44.5	186 ± 78	249 ± 143	77.5 ± 48.6	260 ± 113	171 ± 76
	Combination therapy	72.0 ± 36.6	124 ± 47 **	196 ± 115 **	67.3 ± 31.1	160 ± 69 **	186 ± 81

Values are expressed as means ± SD. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , significant difference vs. the end of monotherapy by a paired  $t$ -test.



**Fig.11 Changes in expression of pro-inflammatory cytokine genes in peripheral leukocytes following a meal tolerance test in type 2 diabetic patients during the period of monotherapy with either miglitol (Group-M) or sitagliptin (Group-S) and after the combination therapy for 3 months.**

Values are means  $\pm$  SD.

Values not sharing a common alphabet are significantly different from one another in each group by Tukey's test based on repeated two-way ANOVA.

Asterisks donate significant differences (Tukey's test based on repeated two-way ANOVA) compared with the value obtained at the period of monotherapy (\*  $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ).

**Table 11** Changes in the plasma protein concentrations of inflammatory cytokines and adhesion molecules following meal tolerance tests at the end of monotherapy and combination therapy

		Group-M			Group-S		
		Before	1 h after	2 h after	Before	1 h after	2 h after
IL-1 $\beta$ (pg/mL)	Monotherapy	2.88 $\pm$ 1.75	2.54 $\pm$ 1.71	2.69 $\pm$ 1.96	3.86 $\pm$ 1.37	3.53 $\pm$ 1.27	3.44 $\pm$ 1.45
	Combination therapy	2.37 $\pm$ 1.48	2.43 $\pm$ 1.35	2.34 $\pm$ 1.92	3.68 $\pm$ 1.42	3.35 $\pm$ 1.38	3.36 $\pm$ 1.44
IL-6 (pg/mL)	Monotherapy	13.9 $\pm$ 4.4	13.2 $\pm$ 4.1	13.3 $\pm$ 4.2	15.2 $\pm$ 4.2	14.8 $\pm$ 3.8	15.0 $\pm$ 5.0
	Combination therapy	12.6 $\pm$ 3.2	12.7 $\pm$ 3.6	12.5 $\pm$ 3.9	13.7 $\pm$ 3.7	13.2 $\pm$ 3.6	14.0 $\pm$ 4.3
IL-8 (pg/mL)	Monotherapy	22.6 $\pm$ 4.0	22.4 $\pm$ 4.5	22.1 $\pm$ 4.7	23.3 $\pm$ 5.5	23.1 $\pm$ 6.2	23.3 $\pm$ 6.7
	Combination therapy	22.2 $\pm$ 3.7	21.4 $\pm$ 4.0	21.2 $\pm$ 4.1	21.9 $\pm$ 5.7 *	21.3 $\pm$ 5.8 **	21.3 $\pm$ 5.7 *
IL-12 (p70) (pg/mL)	Monotherapy	10.4 $\pm$ 6.6	10.0 $\pm$ 7.2	11.0 $\pm$ 8.0	11.1 $\pm$ 6.2	9.3 $\pm$ 3.5	9.9 $\pm$ 4.4
	Combination therapy	9.7 $\pm$ 5.2	9.0 $\pm$ 5.3	9.7 $\pm$ 7.2	10.5 $\pm$ 6.5	9.3 $\pm$ 5.7	10.7 $\pm$ 6.8
TNF- $\alpha$ (pg/mL)	Monotherapy	47.2 $\pm$ 16.7	47.4 $\pm$ 17.9	47.5 $\pm$ 15.5	48.4 $\pm$ 13.9	45.9 $\pm$ 15.5	48.9 $\pm$ 13.1
	Combination therapy	44.9 $\pm$ 14.1	44.3 $\pm$ 12.7	45.4 $\pm$ 16.1	45.8 $\pm$ 16.1	44.3 $\pm$ 15.7	46.3 $\pm$ 13.2
MCP-1 (pg/mL)	Monotherapy	105 $\pm$ 31	101 $\pm$ 25	95 $\pm$ 24	109 $\pm$ 20	103 $\pm$ 19	104 $\pm$ 20
	Combination therapy	100 $\pm$ 43	97 $\pm$ 32	88 $\pm$ 28	100 $\pm$ 34	99 $\pm$ 29	92 $\pm$ 24
sE-selectin (ng/mL)	Monotherapy	25.1 $\pm$ 10.9	16.8 $\pm$ 8.2	15.1 $\pm$ 8.7	37.6 $\pm$ 18.3	29.9 $\pm$ 17.7	28.3 $\pm$ 15.9
	Combination therapy	16.7 $\pm$ 10.3**	13.6 $\pm$ 8.7 **	13.1 $\pm$ 9.4	27.9 $\pm$ 17.2 **	25.8 $\pm$ 16.1 **	23.9 $\pm$ 16.3 *
sICAM-1 (ng/mL)	Monotherapy	72.0 $\pm$ 17.1	75.9 $\pm$ 15.3	79.1 $\pm$ 18.3	66.2 $\pm$ 25.5	68.2 $\pm$ 21.7	66.7 $\pm$ 23.8
	Combination therapy	80.4 $\pm$ 24.8	75.5 $\pm$ 21.9	76.3 $\pm$ 23.4	66.8 $\pm$ 30.3	63.5 $\pm$ 27.5	66.6 $\pm$ 29.5
sVCAM-1 (ng/mL)	Monotherapy	1023 $\pm$ 245	940 $\pm$ 224	910 $\pm$ 180	1043 $\pm$ 231	941 $\pm$ 201	960 $\pm$ 203
	Combination therapy	999 $\pm$ 238	947 $\pm$ 188	914 $\pm$ 223	959 $\pm$ 169 **	900 $\pm$ 211	882 $\pm$ 182 *
tPAI-1 (ng/mL)	Monotherapy	151 $\pm$ 35	126 $\pm$ 34	115 $\pm$ 31	125 $\pm$ 40	101 $\pm$ 28	99 $\pm$ 25
	Combination therapy	137 $\pm$ 43	115 $\pm$ 42	97 $\pm$ 28 *	111 $\pm$ 32	101 $\pm$ 24	91 $\pm$ 26

Values are means  $\pm$  SD. \* $p$  < 0.05, \*\* $p$  < 0.01, significant difference vs. the end of monotherapy by paired  $t$ -test.

## 考察

本節では、茨城県にある糖尿病専門クリニックに通院する2型糖尿病患者を対象とし、薬剤の単独使用による治療法から併用療法に切り替えるという処置を行い、その前後で、血糖コントロールや血糖管理に重要な臨床検査値、末梢血白血球における炎症関連遺伝子の発現や血中サイトカインタンパク質量が変動しているかを調べ、CVDの発症・進展の抑制に対する寄与について検討した。

以前の研究において、非糖尿病男性におけるシタグリプチンおよびミグリトールの経口同時投与は、シタグリプチンまたはミグリトールの単独投与と比較して、食後の血糖上昇を抑制することが報告されている[92]。また、2型糖尿病患者における単回の食事による血糖値の振幅は、インスリンにミグリトールおよびシタグリプチンを付加した方が、それぞれを単独で投与した時よりも抑制されることが、症例研究によって明らかとなっている[100]。本節において、ミグリトールまたはシタグリプチンの単独療法から両薬剤の併用療法に切り替えたことで、血中 HbA1c 比率およびグリコアルブミンの値が減少することが明らかとなった。この結果は、ミグリトールを服用していた2型糖尿病患者にシタグリプチンを、シタグリプチンを服用していた2型糖尿病患者にミグリトールを併用させることで、単独療法よりも血糖コントロールがさらに改善することを示している。

また本節では、併用療法により 1,5-AG 濃度が増加することが示された。1,5-AG は、血糖コントロールの状態を表す指標のひとつであり、高血糖に際しての尿糖排泄に伴い、尿中に失われ急減する[101]。そのため血糖上昇に対応する変化は速く、反対に血糖改善時の回復も比較的速やかである。従って 1,5-AG は、血糖振幅を反映する指標であると考えられる。実際に、自己血糖測定の結果から算出した血糖振幅の指標である MAGE が、Group-M、Group-S とともに、併用療法で低下していた。それゆえ、ミグリトールとシタグリプチンの併用療法は、単独療法より食後の血糖振幅を低下させることが明らかとなった。

また、ミグリトールを併用した Group-S における食後のインスリン濃度が、単独療法よりも減少する傾向にあった一方で、食後の血糖値の上昇は有意に抑制されていたことには注目すべきである。ミグリトールは、小腸上部において炭水化物の消化・吸収を強力に阻害する[33]ため、インスリンの効果に依存せず、食後の血糖値の1時間値を効果的に抑制する。一方で、シタグリプチンを含む DPP-4 阻害薬による抑制は、インクレチンによるインスリン分泌を介しているため、ミグリトールよりも遅い段階で食後高血糖抑制が起こる[47,102]。このことから、ミグリトールは、シタグリプチンによって十分には抑制することができない早期の食後高血糖を、インスリンの必要量を節約することによって効果的に抑制したと考えられる。また、このようなミグリトールによるインスリン分泌の抑制は、膵β細胞の機能保護や、脂肪蓄積の抑制および糖尿病合併症の発症抑制に効果があることが期待される。一方で、ミグリトールを

以前から服用しており、シタグリプチンとの併用を処方された Group-M では、食後血糖値が有意に抑制されていたが、インスリン濃度に変化はみられなかった。インスリン濃度が変化しなかったにも関わらず、食後血糖値が抑制されたのは、おそらく、DPP-4 阻害薬によるグルカゴン濃度の減少などといった他の血糖値の抑制効果に基づくものであると考えられる。培養細胞を用いた実験において、GLP-1 は、膵  $\alpha$  細胞からのグルカゴン分泌を抑制することが報告されている[103]。さらに、GLP-1 アゴニストであるエキセナチドは、2型糖尿病患者において食後のグルカゴン濃度を減少させることが報告されている[104]。また、シタグリプチンの投与は、2型糖尿病患者において食後のグルカゴン濃度を減少させることも明らかにされている[105]。これらの知見は、ミグリトールを投与していた患者に対するシタグリプチンの併用療法は、グルカゴン濃度を減少させる可能性があることを示唆している。しかしながら、症例研究では、シタグリプチンの投与は、食後のグルカゴン濃度に影響を与えないという報告もある[100]。シタグリプチンを含めた DPP-4 阻害薬が、2型糖尿病患者において食後の血中グルカゴン濃度を減少させるかどうかについては、このように不透明な部分も多い。よって、シタグリプチンの投与によって食後血糖値が減少するメカニズムに関しては、さらに詳細に調べる必要がある。さらに、ミグリトールを処置していた2型糖尿病患者に対し、シタグリプチンを併用処置することによって、食後の血中グルカゴン濃度が減少するかどうかは、今後詳細に検討すべきである。

本節では、ミグリトールを服用していた患者に対してシタグリプチンを併用させると、空腹時および食後の活性型 GLP-1 濃度が上昇し、シタグリプチンを服用していた患者に対してミグリトールを処方し併用させると、食後の活性型 GLP-1 濃度が上昇することが明らかになった。一方で、食後の血中総 GIP 濃度は、併用療法によって両グループにおいて低下し、活性型 GIP 濃度は、両グループにおいて高値を示していた。シタグリプチンなどの DPP-4 阻害薬が、血中の活性型 GLP-1 と活性型 GIP 濃度を上昇させることは、すでに複数の論文において報告されている[47,102]。一方で、シタグリプチンを併用したことにより、血中総 GIP 濃度の低下が観察された原因としては、活性型 GIP 濃度が増加したことに対する負のフィードバック機構により、小腸における GIP 発現量および分泌量が減少したことが考えられた。また、ミグリトールに関しては、ミグリトールの投与が、小腸上部での GIP の分泌を減少させ、小腸下部での GLP-1 の分泌を増加させることが明らかとなっている[106]。これは、ミグリトール自体が小腸上部で吸収されるため、小腸下部ではその作用が減弱し、小腸下部に分布する GLP-1 分泌細胞である L 細胞に対しての糖の刺激が増大するためであると考えられる。

GLP-1 は、膵  $\beta$  細胞をアポトーシスから保護する作用を持つが、GIP はその作用を持たない[47,102]。一方で、GIP は脂肪酸合成を誘導し、結果として GIP の過剰な分泌は、過体重を引き起こすと考えられている[107]。それゆえ、ミグリトール服用患者へのシタグリプチンの併用およびシタグリプチン服用患者へのミグリトールの併用による空腹時および食後の活性型 GLP-1 濃度の上昇、総 GIP 濃度の低下は、膵  $\beta$  細

胞のアポトーシスや肥満のリスクの低減をもたらす可能性が高いことが考えられる。本節で行ったミグリトールとシタグリプチンの併用療法は、過剰なインスリンおよびGIP分泌を抑制し、さらに、GLP-1の分泌を促進することによって、インスリンの効率的利用を促し、2型糖尿病の進行や合併症を抑制するものと考えられる。

さらに本節では、Group-Sにおいてミグリトールの併用療法を行うと、複数の炎症性サイトカイン（IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-8）の遺伝子発現が低下することが観察された。この結果から、ミグリトールによる食後高血糖抑制は炎症関連遺伝子の発現抑制に有効であることが示唆された。このことは、2型糖尿病における治療では、食後高血糖の管理が重要であるとする既存の複数の報告を支持するものと考えられる。一方、予めミグリトール単独療法を行っていたGroup-Mにおいては、シタグリプチンの併用療法によっても、炎症性サイトカイン遺伝子の発現低下は観察されなかった。この原因としては、Group-Mでは、シタグリプチンとの併用療法を受ける前からミグリトールの単独療法によって、すでに炎症性サイトカインの遺伝子発現が低下していたためと考えられる。また、空腹時および食後における血中の炎症性サイトカインタンパク質濃度（IL-8）および可溶性細胞接着分子タンパク質濃度（sE-selectin, sVCAM-1）は、Group-Sにおいて、ミグリトールの併用療法によって減少した。ミグリトールにシタグリプチンを併用したGroup-Mにおいて、それらの血中濃度もわずかに減少する傾向を示したが、シタグリプチンにミグリトールを併用したGroup-Sよりも効果的なものではなかった。しかしながら、ミグリトール単独療法時における炎症性サイトカインおよび細胞接着分子の血中タンパク質濃度は、シタグリプチン単独療法のものと比較すると、予め低いレベルを示していた。これらの結果は、ミグリトールはより効果的にこれらの炎症反応を減少させることを示唆している。実際に、日本人2型糖尿病患者において、 $\alpha$ -GIであるアカルボースからミグリトールへと薬剤を変更すると、血糖値の振幅が低下するだけでなく、末梢血白血球におけるIL-1 $\beta$ やTNF- $\alpha$ 等の炎症性サイトカインの遺伝子発現が低下することが報告されている[64]。これらの知見および本節での結果を併せて考えると、ミグリトールおよびシタグリプチンの併用療法は、血中における炎症性サイトカインおよび可溶性細胞接着分子のタンパク質濃度を低下させることによってCVDの発症リスクを低減させることを示唆している。

また、併用療法を3ヵ月行っても、血中のIL-1 $\beta$ およびTNF- $\alpha$ のタンパク質濃度に変化はなかった。IL-1 $\beta$ やTNF- $\alpha$ は、炎症の初期機序を担い、好中球や単球などの自然免疫細胞を活性化させる[50,51]。一方で、IL-8やsE-selectin、sVCAM-1は、血管内皮への活性化白血球の接着などの二次的な段階を担う[70]。本節における結果では、ミグリトールおよびシタグリプチンの併用療法は、このような二次的な段階への移行を減弱させた可能性がある。加えて、初期機序を担うIL-1 $\beta$ やTNF- $\alpha$ などのタンパク質レベルは、以前から行われていた単独療法によってある程度減少していた可能性もある。

経口糖尿病治療薬による細胞接着分子等のCVD発症リスク因子の減少に関する報告では、16週間のメトホルミン無作為プラセボ対照試験において、メトホルミンの投



与によって耐糖能異常者における sICAM-1、sVCAM-1 およびフォンウィルブランド因子 (vWf) の血中タンパク質濃度が減少し[108]、さらに、2型糖尿病患者における sICAM-1、sVCAM-1、sE-selectin および tPAI-1 の血中タンパク質濃度が減少した[109] ことが示されている。さらに、メトホルミンのシステマティックレビューでは、2型糖尿病患者において CVD 発症リスクが低下することを報告している[110]。これらの報告は、2型糖尿病患者における CVD 発症リスクの低下は、sICAM-1、sVCAM-1、sE-selectin、tPAI-1 などの細胞接着分子の血中タンパク質濃度の減少が一因である可能性を示唆している。よって今後は、ミグリトール、シタグリプチン、メトホルミンの三剤併用療法が、2型糖尿病患者における CVD の発生率や発症リスク因子を効率よく減少させるかどうかを、単剤療法および二剤併用療法と比較検討する必要があると考えられる。

2型糖尿病患者における CVD 発症リスク因子の減少が、併用療法による血糖振幅の抑制の結果であるのか、それとも直接的な薬物効果によるものなのかは、未だに明らかではない。よって、無作為プラセボ対照試験などによって、CVD 発症リスク因子が、2型糖尿病患者に対するミグリトールおよびシタグリプチンの併用療法によって減少するかどうかを、それぞれの単剤療法を含めて比較検討する必要がある。さらに、ミグリトールやシタグリプチンの投与が、CVD 発症リスク因子や CVD の発生率の低下に関連がないことが報告されている SU 薬[110,111]と比較して、CVD 発症リスクの低減効果をもたらすかを調べることも必要である。

また、本節での研究デザインは、相対的に短期間の臨床試験であったため、血圧や肝障害マーカー、クレアチニン、C 反応性タンパク質などの基礎臨床パラメーターを測定していない。今後は、2型糖尿病患者への長期間にわたるミグリトールとシタグリプチンの併用療法によって、CVD や腎症、網膜症、神経障害などの糖尿病合併症の発症進展に関連する代謝性パラメーターが変化するかどうか検討する必要がある。

これらをまとめると、2型糖尿病患者に対するミグリトールおよびシタグリプチンの併用療法は、血糖コントロール、特に血糖値の振幅を改善し、活性型 GLP-1 濃度を増加させることが明らかとなった。さらに併用療法によって、IL-8、sE-selectin、sVCAM-1 などの炎症性サイトカインおよび可溶性細胞接着分子濃度が減少することが示された。

近年の研究においては、食後高血糖の方が HbA1c などの血糖値の総和を示す値よりも、その後の2型糖尿病患者における死亡率の増加や CVD 発症リスクの増加との関連性が高いことが報告されている[3-6]。この報告と本節の結果を考え合わせると、CVD 発症リスク因子の発現には、血糖値の基底レベルの低下よりも、食後高血糖がより深く関与していることが示唆される。

本節の結論として、ミグリトールとシタグリプチンの併用療法は、血糖コントロール、血糖値の振幅およびインクレチン濃度を改善し、2型糖尿病の病状改善に有用であることが明らかとなった。特に、食後の高血糖抑制は、CVD 発症リスク因子の遺伝子発現およびタンパク質発現を低下させることによって、2型糖尿病の発症・進展

および合併症の発症のリスクを低減させるものと考えられた。

## 第2章 第2節

### 2型糖尿病患者における DPP-4 阻害薬による血糖振幅の改善と 心血管疾患発症リスク因子の発現抑制

## 序

近年の多くの研究では、HbA1c に表されるような血糖値の平均的な推移を示す値よりも、食後血糖値の上昇といった血糖値の変動を示す値の方が、その後の2型糖尿病および合併症の発症・進展に関連することが示されている[3-6]。また食後高血糖は、2型糖尿病における心血管疾患（CVD）の発症に關与する独立した危険因子であることが観察研究で報告されている[7]。さらに耐糖能異常者（STOP-NIDDM）および2型糖尿病患者（MeRIA7）を対象とした介入研究においても、 $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害剤アカルボースによる食後高血糖の抑制と、CVD の発生率の低下が関連することが報告されている[8-11]。これらのことから、食後高血糖の抑制は、2型糖尿病およびCVD の発症・進展の抑制に重要であることが考えられる。

CVD の発症には、食後血糖値の上昇による血管内皮障害が関与していると考えられている。糖尿病における血管内皮機能障害の発症および進行には、好中球、単球・マクロファージ等の白血球の活性化による炎症性サイトカインの産生が関与する。特に食後高血糖は、活性酸素種（ROS）の産生を誘導し、白血球を活性化する[12]。活性化された白血球から分泌される炎症性サイトカイン[13,14]は、細胞接着分子（E-selectin, ICAM-1, VCAM-1）[24-26]やインテグリン分子（CD11a-c）[27]の発現を誘導する。これら細胞接着分子により、白血球の血管内皮への接着が増強され、血管内皮障害を引き起こすと考えられる[28,29]。ヒト臍帯血内皮細胞（HUVECs）を用いた実験では、持続的な高グルコース曝露よりも、むしろ正常グルコース/高グルコースの反復曝露の方が、細胞のアポトーシスが誘導されることが報告されている[112]。また、肝実質細胞 L02 を用いた実験では、高グルコースの繰り返し刺激が、アポトーシス、酸化ストレスの増大およびミトコンドリアの機能不全を誘導することが明らかとなっている[113]。さらに、摂食時間を制限し、断続的な高血糖を誘発したストレプトゾトシン投与ラットでは、胸部大動脈内皮への単球の接着が、持続的に高血糖を呈したラットと比較して顕著に観察されることも報告されている[114]。これらの報告は、持続的な高血糖よりもむしろ断続的な高血糖の方が、細胞障害を誘発する可能性があることを示している。

さらに近年では、高血糖のみでなく、低血糖を含めた全体的な血糖振幅が、2型糖尿病における合併症、特に大血管障害の発症・進展に重要であることが示唆されている。2型糖尿病患者を対象とした無作為化対照試験において、長期の血糖値の推移を反映する HbA1c は微小血管障害と関連を示し、血糖値の振幅を表す平均血糖変動幅（MAGE）は冠動脈疾患等の大血管障害と関連することが報告されている[37]。さらに、2型糖尿病患者における MAGE の上昇が、下肢血管病および冠動脈疾患の発症と相関するとともに、頸動脈内膜厚や C 反応性蛋白質（CRP）の増加と関連することも報告されている[115-117]。また、血糖管理を強化療法群または通常療法群に分け、CVD の発症をみた ACCORD 研究では、目標 HbA1c 値を 6.0%未満とした強化療法群

において、全死亡率が通常療法群と比較して有意に上昇したことが報告されている[118]。厳格な血糖管理を目指した強化療法群で死亡率が上昇した理由は明らかではないものの、強化療法群では通常療法群と比較して低血糖の頻度が有意に高かったことが報告されている。これらの報告をふまえると、食後の高血糖やその後の血糖低下が繰り返されることは、血管内皮を障害し、粥状動脈硬化や糖尿病合併症の発症を促進している可能性が考えられる。

現在の経口糖尿病薬による治療は、食後血糖値を効率的に低下させることのできる $\alpha$ -GI や DPP-4 阻害薬が主流となりつつある。 $\alpha$ -GI は、小腸の二糖類水解酵素の活性を抑制することで炭水化物の消化・吸収を遅延させ、食後高血糖を抑制する[33]。炭水化物の摂取量の多い日本人においては、長らく  $\alpha$ -GI が第一選択薬として使用されてきた。一方、DPP-4 阻害薬は、日本では 2009 年 10 月に認可された、国内では 10 年ぶりの新しい作用機序を有する経口糖尿病薬である。DPP-4 阻害薬は、食事刺激に応答して腸管より分泌され、膵  $\beta$  細胞からのインスリンの分泌を増強する GLP-1 や GIP 等のインクレチンホルモンを増強することによって高血糖を抑制する[36]。これらインクレチンを介したインスリン分泌促進効果は、高血糖の場合のみ発揮され[45,46]、正常血糖域ではインスリン分泌を促進しない。そのため、2型糖尿病治療薬において危惧される低血糖のリスクが少なく、血糖値の安定性に優れた薬剤であることが利点である。実際に、スルホニル尿素薬やインスリン製剤で治療中の日本人 2 型糖尿病患者に DPP-4 阻害薬シタグリプチンを投与すると、血糖値の振幅が顕著に低下することが報告されている[119]。さらに本章第 1 節でも示したように、ミグリトールおよびシタグリプチンの併用療法を行うと、食後高血糖が効率よく抑制され、血糖値の振幅が安定化する。これらのことから、 $\alpha$ -GI や DPP-4 阻害薬による血糖値の振幅の抑制によって、2型糖尿病における大血管障害の発症・進展を抑制することが可能であると考えられる。

しかしながら、これらの知見は、作用機序の異なる薬剤からの切り替え治療や、新しい作用機序を有する薬剤の付加治療に関する報告がほとんどである。DPP-4 阻害薬には用法・用量の異なる多くの種類がある。例えばシタグリプチンは 1 回 50 mg を 1 日 1 回服用する薬剤であり、ビルダグリプチンは 1 回 50 mg を 1 日 2 回服用する薬剤である。このように、用法・用量は異なるが、同じ機序によって高血糖を抑制する DPP-4 阻害薬間での薬剤の切り替え治療について調べた報告はない。さらに、DPP-4 阻害薬は、血糖低下作用と低血糖の発現頻度が少ないことから、第一選択薬として使用されることが増えているが、一方で、シタグリプチン 50 mg/日を服用している有効症例の約半数では、血糖低下作用が持続せず、リバウンドを起こすという研究結果も報告されている[120]。このような場合に、DPP-4 阻害薬間で薬剤を切り替えるという処置が、血糖振幅を低下させ、炎症を低減させることによって CVD 等の合併症の発症抑制をもたらさうるかは明らかになっていない。

そこで本節では、シタグリプチンを服用しているにも関わらず、効果が不十分な 2 型糖尿病患者において、薬剤をビルダグリプチンに変更した場合に、血糖振幅および、

末梢血白血球における炎症関連遺伝子およびインテグリン遺伝子の発現が低下するかを調べ、血糖振幅の低下と CVD 発症リスク低減作用の関連性について検討した。

## 方法

### 1) 対象者

対象者は、茨城県那珂市の糖尿病専門クリニック（那珂記念クリニック）に通院する2型糖尿病患者の中から選定した。

選定条件は以下の通りである。

- ・シタグリブチン 50 mg 服用中で効果不十分の者（HbA1c 7%以上 (NGSP 値)）
- ・食事、運動療法を行っている者
- ・20 歳以上
- ・本臨床試験の意義、目的および方法等を理解し、自由意志による文書同意が得られた者

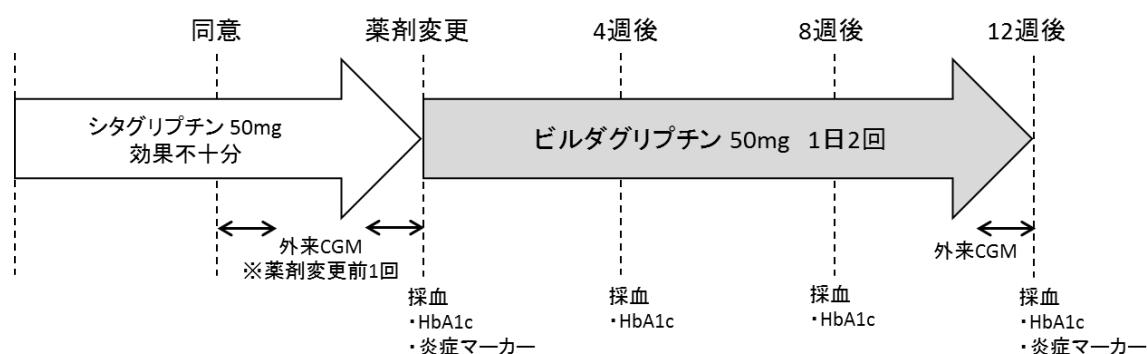
また、除外対象とした条件は以下の通りである。

- ・インスリン治療を必要とする者（糖尿病ケトアシドーシス、糖尿病性昏睡、1型糖尿病患者等）
- ・ビルダグリブチン製剤の成分に対し過敏症の既往歴のある者
- ・重度の肝機能障害のある者
- ・重症感染症、手術前後、重篤な外傷のある者
- ・その他、担当医師が本臨床試験において適当でないと判断した者

選定の結果、上記選定基準を満たし、除外基準に該当しない2型糖尿病患者 10 名を、本臨床試験の対象者として登録した。すべての対象者に対してインフォームド・コンセントを行い、本臨床試験におけるデータおよび解析結果の扱いに関する同意を得た。本臨床試験のプロトコールは、那珂記念クリニックの倫理委員会の承認を受けて行った。

### 2) 研究デザイン

研究デザインの概要は以下の表に示した。すべての対象者には、研究同意を得る前から同じ治療（シタグリブチン 50 mg/1 回/1 日）を継続させた。ビルダグリブチン 50 mg/2 回/1 日への切り替え前において、任意の 5 日間について外来持続血糖測定（continuous glucose monitoring : CGM）を行った。薬剤変更前に基礎身体検査および採血を行い、その後、ビルダグリブチンを 1 回あたり 50 mg で 1 日 2 回投与する治療法に変更し、12 週間観察を行った。ビルダグリブチン服用開始 4、8、12 週後に来院してもらい、採血を行った。観察期間終了直前において、任意の 5 日間について外来 CGM を行った。研究期間を通して、有害事象の有無、中止・脱落の有無について観察した。



### 3) 身体検査および血液検査

薬剤変更前に体重および血圧測定を行った。血液を採取し、HbA1c、血清コレステロール濃度 (TC)、血清中性脂肪 (TG)、血清 HDL-コレステロール、血清 LDL-コレステロール、グリコアルブミン (GA)、尿酸 (UA)、クレアチンホスホキナーゼ (CPK)、 $\gamma$ -GTP、AST、ALT を測定した。対象者の臨床検査値は、Table 12 に示す。HbA1c は、薬剤変更 4、8、12 週間においても測定を行った。さらに薬剤変更前および薬剤変更 12 週間後において、mRNA 測定用の血液を PAX gene 固定液 (BD バイオサイエンス) を用いて採取した。

### 4) 外来CGM

薬剤変更時および薬剤変更 12 週間後の前 5 日間に、持続血糖測定器を用いて 5 分毎の血糖値を測定した。持続血糖測定器は、メドトロニック iPro2 (日本メドトロニック、東京) を用いた。全データにおける中 3 日間を使用し、平均血糖変動幅 (MAGE) を算出した。

### 5) MAGE の算出

外来 CGM のデータから、正確に 5 分毎に血糖値を計測することのできた中 3 日間のデータを抜き出した。すべての血糖値データにおける極大・極小の値を抽出し、極大→極小の変動幅の平均を計算した。このとき、差を算出する方向は血糖値が下降していくものに統一した。また、血糖値のデータより標準偏差 (SD) を算出し、極大→極小の変動が 1 SD 未満の血糖変動は除外した。算出した変動の平均値を MAGE とした[98]。すべての対象者の薬剤変更前および薬剤変更 12 週間後における外来 CGM より MAGE を算出し、平均値を算出した。

### 6) 定量的リアルタイム PCR による炎症関連遺伝子の発現変動の測定

PAX gene 固定液 (BD バイオサイエンス) によって固定し、凍結保存しておいたサンプルを室温で融かし、25°C、3,000 rpm、30 分間遠心し、上澄みを捨て、5 mL の DNase/RNase free water を入れ、攪拌した。再び 25°C、3,000 rpm (SCR20BB、日立工



機株式会社、東京)で30分間遠心し、上澄みを捨てる操作を3回繰り返した後、得た沈殿に1,100  $\mu\text{L}$ のRLT with  $\beta\text{-ME}$  (使用する直前にRLT 1 mLに対し10  $\mu\text{L}$ の $\beta$ -メルカプトエタノールを加えたもの)を入れ、攪拌しつつ60°Cで15分加温して沈殿を完全に溶かした。25°C、14,000 rpm (MX-305、トミー精工株式会社:以下、遠心分離は同機種で行った。)で10分間遠心し、上澄みを350  $\mu\text{L}$ 別チューブへ移し、そこへ350  $\mu\text{L}$ の70%エタノールを加えた後、ピペッティングでよく混ぜ、RNeasy mini Kit (キアゲン株式会社)を用いて総RNAを抽出した。抽出方法は、第1章第1節に記載した。RNA濃度の定量は、インビトロジェン株式会社のQubit™ fluorometerを用いて行い、標準RNA溶液と蛍光強度を比較することによりRNA濃度を求めた。RNAが165 ng含まれるようにサンプルを調整し、cDNAの合成を行った。Random Primer (タカラバイオ株式会社)4  $\mu\text{L}$ とDNase/RNase free waterが合わせて25.25  $\mu\text{L}$ になるように混和し、恒温槽にて70°Cで10分間反応させた後、10分間氷上で冷却させた。各チューブにcDNA合成用混合液(5×"Firststrand buffer"(Superscript III Reverse transcriptase、インビトロジェン株式会社)8  $\mu\text{L}$ 、0.1M DTT 4  $\mu\text{L}$ 、dNTP-MIX (10 mM each dNTP) 2  $\mu\text{L}$ 、RNase inhibitor (和光純薬工業株式会社) 0.5  $\mu\text{L}$ 、Superscript III 1  $\mu\text{L}$ )を15.5  $\mu\text{L}$ 入れて混和し、45°Cで2時間反応させた後、70°Cで10分間反応させた。4 mg/mLのRNaseA (シグマ-アルドリッチ株式会社)を1  $\mu\text{L}$ 加え、37°Cで30分間反応させた後、DNase RNase free waterを加え、全量を100  $\mu\text{L}$ とした。cDNAによる定量的PCRは、Universal Probe Library (ロシュ・ダイアグノスティクス株式会社)を用いて行った。Universal Probe Libraryを用いたPCRについては、第1章第1節に記載した通りに行った。目的のmRNA発現量は、内部標準として測定した遺伝子のmRNA発現量で補正した相対値で求めた。この実験に使用したプライマーの塩基配列はTable 13に示した。

### 9) 統計解析

全ての実験データは、平均値 $\pm$ 標準偏差で示した。

統計解析は、エクセル統計(社会情報サービス株式会社)で行った。

Fig. 12、Fig. 13における有意差は、Student's *t*-test (対応あり)で判断した。 $p < 0.05$ で有意差ありとした。

**Table 12** Basic parameters of type 2 diabetic patients enrolled in the cliniced trial

	n			
Sex (male/ female)	4	/	6	10
Age (years)	61.5	±	8.8	10
Body weight (kg)	64.5	±	14.0	10
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	24.7	±	3.4	10
Blood pressure, SBP (mmHg)	133.0	±	15.1	10
Blood pressure, DBP (mmHg)	78.2	±	10.8	10
Fasting blood glucose (mg/dL)	169	±	42.7	10
HbA1c (%)	7.6	±	0.7	10
Total cholesterol (mg/dL)	163.8	±	23.2	10
Triacylglycerol (mg/dL)	145.7	±	114.9	10
HDL-cholesterol (mg/dL)	57.9	±	15.4	7
LDL-cholesterol (mg/dL)	76.8	±	22.4	10
Glycoalbumin (%)	19.1	±	2.9	10
Uric acid (mg/dL)	5.2	±	1.2	10
CPK (IU/L)	127.7	±	97.3	10
γ-GTP (IU/L)	38.1	±	23.0	10
AST (IU/L)	27.5	±	12.4	10
ALT (IU/L)	34.3	±	23.4	10

**Table 13** The sequences of oligonucleotide primers used for real-time RT-PCR

Target mRNA	Sequence
Interleukin 1 beta (IL-1 $\beta$ ) (#78)	5'-CTGTCCTGCGTGTTGAAAGA -3' 5'-TGGGTAATTTTTGGGATCTACA -3'
Tumor necrosis factor (TNF- $\alpha$ ) (#29)	5'-CAGCCTCTTCTCCTTCCTGAT -3' 5'-GCCAGAGGGCTGATTAGAGA -3'
Interleukin 18 (IL-18) (#46)	5'-CAACAAACTATTTGTCGCAGGA -3' 5'-TGCCACAAAGTTGATGCAAT -3'
S100 calcium binding protein A8 (S100a8) (#78)	5'-CAAGTCCGTGGGCATCAT -3' 5'-GACGTCGATGATAGAGTTCAAGG -3'
Cluster of differentiation 11a (CD11a) (#17)	5'-ATCTTCAAAGCAGGCCACTC -3' 5'-CGTGCAATTCAACCGAGTC -3'
Cluster of differentiation 11b (CD11b) (#17)	5'-GATCTTTGCGATCGAGGGTA -3' 5'-GCTGAAGCCTTCCTGAGACA -3'
Cluster of differentiation 11c (CD11c) (#1)	5'-AATCTCGGCATCTCCTTCAG -3' 5'-TTCCACACCATCACTTCTGC -3'
Cluster of differentiation 18 (CD18) (#1)	5'-GAGAACCAAGGTCTGGTGGA -3' 5'-AGCATCAGCATGGTTCCTG -3'
Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT) (#73)	5'-TGACCTTGATTTATTTGCATACC -3' 5'-CGAGCAAGACGTTTCAGTCCT-3'

\*The numbers in parentheses indicate ID of a universal probe (Roche Diagnostics) used to detect the signals of each gene.

## 結果

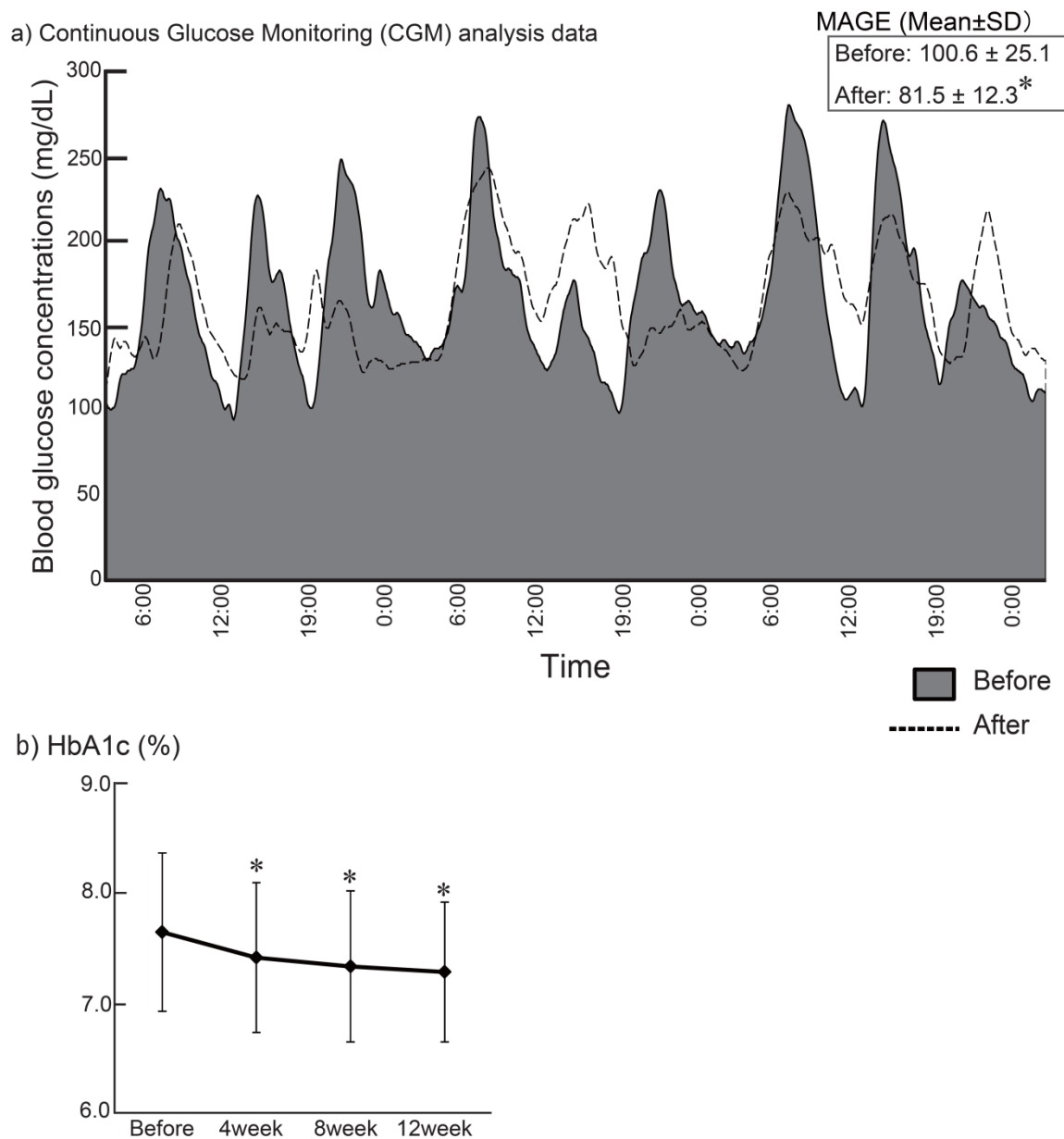
### 1) シタグリプチンの1日1回投与からビルダグリプチンの1日2回投与に治療を変更した際の外来CGMおよびMAGEの変化

シタグリプチン（1日1回50mg）からビルダグリプチン（1回50mgを1日2回）へ薬剤治療を変更する前、および変更12週間における外来CGMの結果の代表例を**Fig. 12a**に示した。CGMは5日間装着し、そのうちの3日間について解析を行った。ある対象者における外来CGMでは、薬剤変更前では、血糖値の急激な上昇（最高値280mg/dL）および下降（最低値95mg/dL）が頻繁に観察されたが、ビルダグリプチンに薬剤を変更してから12週間における外来CGMでは、血糖値の急激な上昇が抑制される傾向があった（最高値243mg/dL）。さらに、薬剤変更12週間における最低血糖値は119mg/dLであった。すべての対象者の結果よりMAGEを算出し、それらの平均を比較したところ、薬剤変更前は $100.6 \pm 25.1$  mg/dLであったが、薬剤変更12週後は $81.5 \pm 12.3$  mg/dLと、薬剤変更前と比較して有意に低値を示した。

さらに薬剤変更してから4、8、12週間におけるHbA1c（**Fig. 12b**）は、薬剤変更前と比較してすべての時点で有意に低値を示した。

### 2) シタグリプチンの1日1回投与からビルダグリプチンの1日2回投与に治療を変更した際の末梢血白血球における炎症関連遺伝子およびインテグリン遺伝子の発現変動

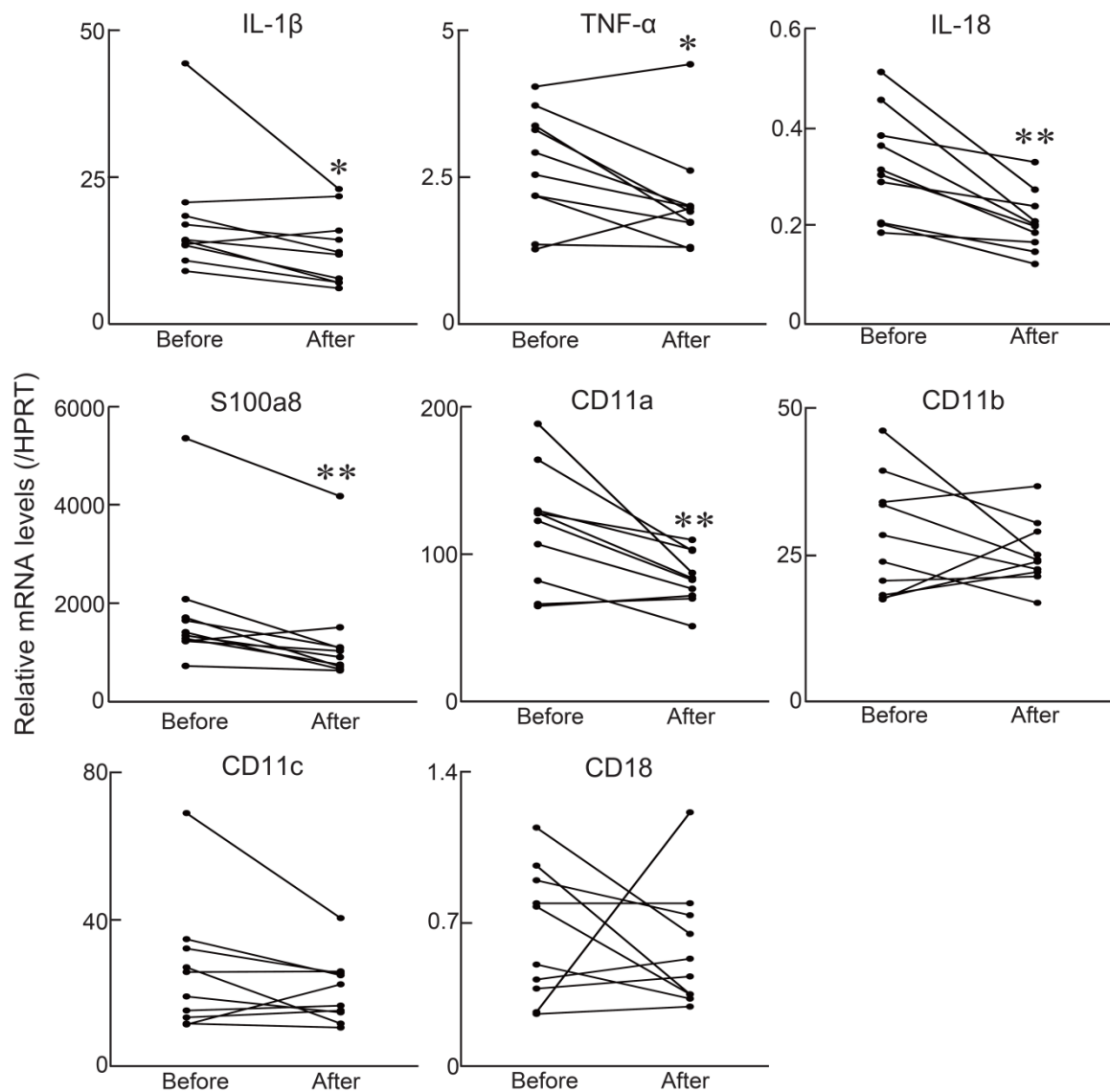
シタグリプチンからビルダグリプチンへ薬剤変更する前、および薬剤治療を変更してから12週間において空腹時血液を採取し、mRNA量を測定した結果を**Fig. 13**に示した。IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-18、S100a8、CD11aのmRNA発現量は、薬剤治療の変更前と比較して変更12週間において有意に低値を示した。



**Fig. 12 Effects of switching from therapy with sitagliptin to that with vildagliptin for 12 weeks on the blood fluctuations in type 2 diabetic patients.**

Values are means ± SD.

Asterisks donate significant differences (paired Student's *t*-test) compared with the value before switching therapy with sitagliptin to that with vildagliptin (\**p* < 0.05).



**Fig. 13** Changes in expression of pro-inflammatory cytokine genes in peripheral leukocytes in type 2 diabetic patients before and after therapy with vildagliptin.

Values are means  $\pm$  SD.

Asterisks donate significant differences (paired Student's *t*-test) compared with the value before switching therapy with sitagliptin to that with vildagliptin (\**p* < 0.05, \*\**p* < 0.01).

## 考察

本節では、DPP-4 阻害薬シタグリプチンで効果が不十分な 2 型糖尿病患者に対し、同じく DPP-4 阻害薬であるビルダグリプチンに変更した際の平均血糖変動幅 (MAGE) および、末梢血白血球における炎症関連遺伝子およびインテグリン遺伝子の発現量を測定し、血糖振幅の平坦化が心血管疾患 (CVD) 等の合併症の発症・進展リスクを低減させるかを調べた。

これまでの多くの疫学研究では、HbA1c に表されるような血糖値の平均的な推移を示す値よりも、食後血糖値の上昇といった血糖値の変動を示す値の方が、その後の 2 型糖尿病および合併症の発症・進展に関連することが示されている [3-6]。さらに近年では、食後高血糖のみでなく、低血糖を含めた血糖値の日内変動幅が、2 型糖尿病における合併症、特に大血管障害の発症・進展に寄与することが示唆されている [37,118]。食後高血糖を効果的に抑制する経口糖尿病薬としては、 $\alpha$ -GI や DPP-4 阻害薬が知られているが、特に DPP-4 阻害薬は、インクレチン作用増強によるグルコース依存性インスリン分泌を促進することによって食後高血糖を効果的に抑制する [36]。さらに DPP-4 阻害薬は、正常血糖域ではインスリン分泌を促進しないことから、低血糖の発生頻度が少ない薬剤である。その一方で DPP-4 阻害薬の一種であるシタグリプチンは、有効症例の約半数で効果が持続せず、リバウンドを引き起こすことも報告されている [120]。

本節において、シタグリプチンを服用しているにも関わらず効果が不十分な 2 型糖尿病患者に対して、シタグリプチン 1 日 1 回服用の代わりにビルダグリプチンを 1 日 2 回服用させる治療を 12 週間行ったところ、血糖値の振幅を表す MAGE が有意に低下した。これまでに、スルホニル尿素薬やインスリン製剤で治療中の日本人 2 型糖尿病患者に対する DPP-4 阻害薬シタグリプチンの投与は、血糖値の振幅を有意に抑制することが明らかとなっている [119]。本節の研究によって、異なる薬剤への DPP-4 阻害薬の付加治療のみでなく、DPP-4 阻害薬間での薬剤治療の変更によっても、血糖値の振幅が抑制され、血糖コントロールが改善することが明らかとなった。

さらに、末梢血白血球における IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-18、S100a8、CD11a の遺伝子発現量が、ビルダグリプチンへの薬剤変更によって有意に低下した。糖尿病における血管内皮機能障害の発症および進行には、好中球、単球・マクロファージ等の白血球の活性化による炎症性サイトカインの産生が関与すると考えられている。特に、食後高血糖は、活性酸素種 (ROS) の産生増大を介して、白血球による炎症性サイトカインの分泌を増大させ、血管内皮細胞上および白血球表面に細胞接着分子の発現を誘導することが分かっている。実際に、持続的な高血糖よりも、断続的な高血糖の方が、胸部大動脈内皮細胞における単球の接着を促進することが、ストレプトゾトシン投与ラットにおいて明らかにされている [114] ことから、血糖値の変動はこれらの炎症反応を促進する可能性が高いと考えられる。本節で行った外来 CGM の結果より、すべて

の対象者における 3 日間での最低血糖値を平均すると、薬剤変更前では  $94.6 \pm 29.2$  mg/dL であったのに対し、薬剤変更 12 週後においては  $106.9 \pm 28.3$  mg/dL と、ビルダグリプチン治療後において高い傾向を示した。この結果は、薬剤変更前後における MAGE の変化は、食後高血糖抑制のみでなく、食間の血糖低下が緩和した結果でもあることを示している。血糖値の振幅を表す MAGE では、低値の血糖値も値に考慮されるが、HbA1c 等の長期間の平均的な血糖値の推移を反映する指標においては、これを推測することは困難である。一般的に健常者の場合、食後血糖値は 30 分ほどでピークに達し、2 時間程度で定常値に戻り、その後、正常血糖範囲内を推移する。しかしながら 2 型糖尿病患者では、治療薬の影響によって、食間における低血糖が頻繁に起こることが知られており、食間の血糖値の影響は無視できない。薬剤治療の変更前後における外来 CGM の血糖値の平均は、どの対象者においてもそれほど変化がなかったにも関わらず、末梢血白血球における炎症関連遺伝子の発現が抑制されたことは、食間の血糖低下を含めた血糖振幅の管理が内皮血管障害の抑制に重要である可能性を示唆している。

結論として、本節の研究によって、シタグリプチンで効果が不十分な 2 型糖尿病患者に対する薬剤のビルダグリプチンへの切り替えは、MAGE を低下させ、末梢血白血球における炎症関連遺伝子およびインテグリン遺伝子の発現を抑制し、CVD 発症リスクを低減する可能性があることが明らかとなった。



## 第2章 総括

本章では、2型糖尿病患者における経口糖尿病薬の効果的な治療による血糖振幅の改善が、心血管疾患（CVD）発症リスク因子の発現を抑制するかを調べた。

本章第1節では、2型糖尿病患者における $\alpha$ -GIおよびDPP-4阻害薬の併用による血糖振幅の改善とCVD発症リスク因子の発現抑制との関連を調べるために、茨城県にある糖尿病専門クリニックに通院する2型糖尿病患者を対象とし、薬剤の単独療法から併用療法に切り替えて経過を観察し、血糖コントロールや血糖管理に重要な臨床検査値が改善するか、また、末梢血白血球における炎症関連遺伝子の発現および血中の炎症性サイトカインおよび可溶性細胞接着分子のタンパク質濃度が低下するかを検討した。その結果、併用療法は血糖振幅およびインクレチン濃度を改善した。特に本節の結果では、食後の高血糖抑制は、炎症サイトカインおよび細胞接着分子の遺伝子発現やタンパク質濃度を低下させることによって、CVDの発症リスクを低減する可能性があることが示された。

本章第2節では、2型糖尿病患者におけるDPP-4阻害薬による血糖振幅の改善とCVD発症リスク因子の発現抑制について調べるために、1日1回のシタグリプチン服用による薬剤治療を行っているにも関わらず効果が不十分な2型糖尿病患者において、薬剤治療を1日2回服用するビルダグリプチンへ変更することによって、血糖振幅が低下するとともに、末梢血白血球における炎症関連遺伝子およびインテグリン遺伝子の発現が低下するかを調べた。その結果、ビルダグリプチンへの薬剤の変更は、急激な血糖低下を含めた血糖値の日内変動幅を改善し、さらに空腹時における末梢血白血球の炎症関連遺伝子およびインテグリン遺伝子の発現を抑制することが明らかとなった。

本章の結論として、2型糖尿病患者における食後高血糖抑制は、炎症を抑制することによってCVD等の合併症の発症リスクを低減する可能性が示唆された。

## 第3章

ヒト単球様 THP-1 細胞における短期高グルコース曝露による  
エピゲノムの蓄積を介した炎症関連遺伝子発現増大機構

### 第3章 序論

第1章および第2章の結果より、食後高血糖の繰り返しは炎症の慢性化をもたらし、2型糖尿病や心血管疾患（CVD）等の合併症の発症・進展を促進する可能性が示唆された。さらに食後高血糖の繰り返しは、空腹時においても末梢血白血球における炎症関連遺伝子の発現レベルを維持させることが、2型糖尿病モデル OLETF ラットおよび2型糖尿病患者での検討により明らかとなった。これらのことから、食後高血糖の情報を体内に蓄積する機構が存在し、それによって空腹時における炎症関連遺伝子の発現が維持されている可能性が示唆された。しかしながら、食後高血糖の刺激が、どのような分子機構によって細胞内に記憶・蓄積され、炎症の慢性化をもたらすのかは明らかではない。そこで第3章では、DNAの塩基配列の変化を伴わずに遺伝子発現の変動をもたらすエピゲノム情報（ヒストン修飾およびヒストン認識結合ドメインタンパク質 Brd4）が、食後高血糖の刺激によって炎症関連遺伝子上に蓄積し、遺伝子発現の増大および維持をもたらすという仮説を立て、検証を行った。

本章第1節では、高グルコース刺激が、白血球における炎症関連遺伝子の発現維持をもたらすかを調べるために、ヒト単球様 THP-1 細胞に対して24時間の高グルコース刺激を与え、その後低グルコース環境に戻してから2日後における炎症関連遺伝子の発現量を調べた。

本章第2節では、ヒト単球様 THP-1 細胞に対する24時間の高グルコース曝露による TNF- $\alpha$  等の炎症関連遺伝子の発現増大が、その後低グルコース環境に戻しても維持されるかを調べた。さらにその発現増大にヒストンアセチル化修飾等が関与するかをクロマチン免疫沈降法（ChIP アッセイ）にて検討した。また、高グルコース曝露時に、アセチル化ヒストン-エピゲノム因子 Brd4 の特異的結合阻害剤である(+)-JQ1 を共投与し、Brd4 のアセチル化ヒストンへの結合の阻害が、これら炎症関連遺伝子の発現に関与するかを調べた。

## 第3章 第1節

短期高グルコース曝露による炎症関連遺伝子の発現持続作用

## 序

2型糖尿病患者では、糖尿病性網膜症、腎症、神経症といった糖尿病三大合併症の他に、心血管疾患（CVD）のような大血管障害の発生率が高くなることが知られている。さらに、糖尿病を発症していない対象者においても、食後血糖値の上昇が、CVD発症リスクを増大させることも報告されている[4,6]。CVD等の血管性合併症の発症には、活性化した白血球（好中球・単球）から分泌される炎症性サイトカインが関与する。特にIL-1 $\beta$ やTNF- $\alpha$ は、白血球の遊走および血管内皮細胞の活性化を誘導する[121-123]ことが知られており、活性化した白血球が血管細胞を傷害し、CVDの発症を促進すると考えられる。これら白血球の活性化は、高血糖、特に食後の血糖上昇によって強く誘導される。第1章で示したように、単回の食後高血糖は、OLETFラットの末梢血白血球における炎症性サイトカイン遺伝子の発現量を増大させる。さらに、長期的な食後高血糖の蓄積は、末梢血白血球における炎症性サイトカインおよび動脈組織における細胞接着分子遺伝子の発現を増大させる。また、日本および欧米諸国での多くの横断研究によって、血中のIL-1 $\beta$ やTNF- $\alpha$ 濃度は、肥満、耐糖能異常または2型糖尿病の発症と正の相関を示すことが報告されている[21-23]。これらの研究成果や報告は、食後高血糖の繰り返しは、活性化された白血球における炎症関連遺伝子の発現増大を介して、2型糖尿病および合併症の発症・進展をもたらす可能性があることを示している。さらに、第1章第2節でみられるように、食後高血糖の繰り返しは、OLETFラットにおける空腹時の末梢血白血球における炎症関連遺伝子の発現を徐々に増大させる。さらに本研究室における先行研究においても、ストレプトゾトシン投与ラットに対して4日間連続して経口スクロース負荷を行うと、4日後の空腹時の末梢血白血球におけるIL-1 $\beta$ 、IL-18、TNF- $\alpha$ の遺伝子発現量が、連続経口スクロース負荷を行う前の空腹時の遺伝子発現よりも高値を示すという知見も報告されている[42]。これらの研究結果は、食後高血糖の情報は、末梢血白血球において何らかの形で記憶・蓄積され、空腹時の炎症関連遺伝子の発現に影響を与えている可能性を示唆している。すなわち食後高血糖は、空腹時の末梢血白血球における炎症関連遺伝子の発現増大あるいは発現維持をもたらすことによって、炎症の慢性化を引き起こし、2型糖尿病および合併症の発症・進展を促進している可能性がある。しかしながら、食後高血糖などの短期の高グルコース曝露がどのように体内に蓄積され、炎症関連遺伝子の発現増大をもたらすかは明らかとなっていない。

そこで本節ではまず、高グルコース刺激が、白血球における炎症関連遺伝子の発現にどの程度影響を与えるかを調べるために、ヒト単球様THP-1細胞に対して24時間高グルコース刺激を与え、その後低グルコース環境に戻した時の炎症関連遺伝子の発現量を調べた。

## 方法

### 1) ヒト単球様 THP-1 細胞の培養

ヒト単球様 THP-1 細胞は、American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA) から得た。細胞は 37°C、5% 二酸化炭素、95% 大気分圧のインキュベーター (HERA cell 150、日本ケンドロ株式会社、東京) 内で 10% fetal calf serum、1% non-essential amino acids (インビトロジェン株式会社)、20 mM Hepes (pH 7.4)、1×antibiotic-antimycotic mixed stock solution (ナカライテック株式会社、京都)、2 mM L-glutamine (インビトロジェン株式会社) を含み、11 mM glucose を添加した RPMI 1640 を用いて、細胞培養ディッシュ (サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社、神奈川) 内で培養し、増殖させた。

この細胞を低グルコース培地 (5 mM glucose) または高グルコース培地 (25 mM glucose) で 24 時間培養し、細胞を回収した (0 day)。すべての培地を新しいものに交換し、そのうち高グルコース培地で培養した細胞プレートの半数を低グルコースに換え、他の細胞とともに 2 日間培養し、培養後、細胞をすべて回収した (+2 day)。細胞は、 $1.8 \times 10^6$  cells/plate の濃度で播いた。

### 2) 定量的リアルタイム PCR による mRNA 発現量の測定

#### ① 細胞サンプルの保存

培養液と細胞をよく攪拌させた後、1 つのプレートごとに細胞培地混合液を 1 mL ずつとり、1.5 mL チューブに入れた。4°C、2,800 rpm (MX-305、トミー精工株式会社：以下、遠心分離は同機種で行った。) で 10 分間遠心分離した後、上清を除き、沈殿に 350  $\mu$ L の RLT with  $\beta$ -ME を加え、よく攪拌してから -80°C で保存した。

#### ② 総 RNA の抽出

総 RNA の抽出は、RNeasy mini kit (キアゲン株式会社) を用いて行った。凍結保存していた RNA 用のサンプルを溶解し、350  $\mu$ L の 70 % エタノールを加えた後、ピペティングでよく混ぜ、全量をカラムに移した。カラムを 25°C、5,000 rpm、2 分間遠心し、溶出液を捨てた後、700  $\mu$ L の RW1 バッファーを入れ 25°C、5,000 rpm、2 分間遠心し、溶出液を捨てた。500  $\mu$ L の RPE バッファーを入れ 25°C、5,000 rpm、2 分間遠心し、溶出液を捨てた。この作業をもう一度繰り返した後、溶出液を捨て、25°C、13,000 rpm、2 分間遠心した。最後に総 RNA を集めるために新しいチューブに代え、30  $\mu$ L の DNase/RNase free water をカラムの上のフィルターに加え 2 分間放置し、25°C、10,000 rpm、1 分間遠心をして溶出液を回収する作業を 2 回行った。

#### ③ RNA 濃度の定量

RNA 濃度の定量は、インビトロジェン株式会社の Qubit<sup>TM</sup> fluorometer を用いて測定

した。標準 RNA 溶液と蛍光強度を比較することにより RNA 濃度を求めた。

#### ④ cDNA の合成

総 RNA が 187 ng 含まれるように調整し、Random Primer (タカラバイオ株式会社) 4  $\mu$ L と DNase/RNase free water が合わせて 25.25  $\mu$ L になるようにし、混和した。恒温槽にて 70°C で 30 分間反応させた後、10 分間氷上で冷却させた。各チューブに cDNA 合成用混合液 (5 $\times$ "Firststrand buffer" (Superscript III Reverse transcriptase、インビトロジェン株式会社) 8  $\mu$ L、0.1 M DTT 4  $\mu$ L、dNTP-MIX (10 mM each dNTP) 2  $\mu$ L、RNase inhibitor (和光純薬工業株式会社) 0.5  $\mu$ L、Superscript III 1  $\mu$ L) を 15.5  $\mu$ L 入れて混和し、45°C で 2 時間反応させた後、70°C で 10 分間反応させた。4 mg/ml の RNase A (シグマ-アルドリッチ株式会社) を 1  $\mu$ L 加え、37°C で 30 分間反応させた後、DNase RNase free water を加え、全量を 100 $\mu$ L とし、使用するまで -80°C で保存した。

#### ⑤ 定量的リアルタイム PCR

逆転写 PCR は、Universal Probe Library (ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社) を用いて行った。Universal Probe Library を用いた PCR については、第 1 章第 1 節に記載した通りに行った。目的の mRNA 発現量は、内部標準として測定した遺伝子の mRNA 発現量で補正した相対値で求めた。この実験に使用したプライマーの塩基配列および Universal Probe Library の番号は **Table 14** に示した。

### 3) 統計解析

実験データは平均値 $\pm$ 標準誤差で表した。

統計解析は、エクセル統計 (社会情報サービス株式会社) で行った。

**Fig. 14** における有意差は、Student's *t*-test で判断した。 $p < 0.05$  で有意差ありとした。

**Table 14** The sequences of oligonucleotide primers used for real-time RT-PCR

Target mRNA	Sequence
Interleukin 1 beta (IL-1 $\beta$ ) (#78)	5'-CTGTCCTGCGTGTTGAAAGA -3'
	5'-TGGGTAATTTTTGGGATCTACA -3'
Tumor necrosis factor (TNF- $\alpha$ ) (#29)	5'-CAGCCTCTTCTCCTTCCTGAT -3'
	5'-GCCAGAGGGCTGATTAGAGA -3'
S100 calcium binding protein A8 (S100a8) (#78)	5'-CAAGTCCGTGGGCATCAT -3'
	5'-GACGTCGATGATAGAGTTCAAGG -3'
S100 calcium binding protein A9 (S100a9) (#85)	5'-GTGCGAAAAGATCTGCAAAA -3'
	5'-TCAGCTGCTTGTCTGCATTT -3'
Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT) (#73)	5'-TGACCTTGATTTATTTTGCATACC -3'
	5'-CGAGCAAGACGTTTCAGTCCT-3'

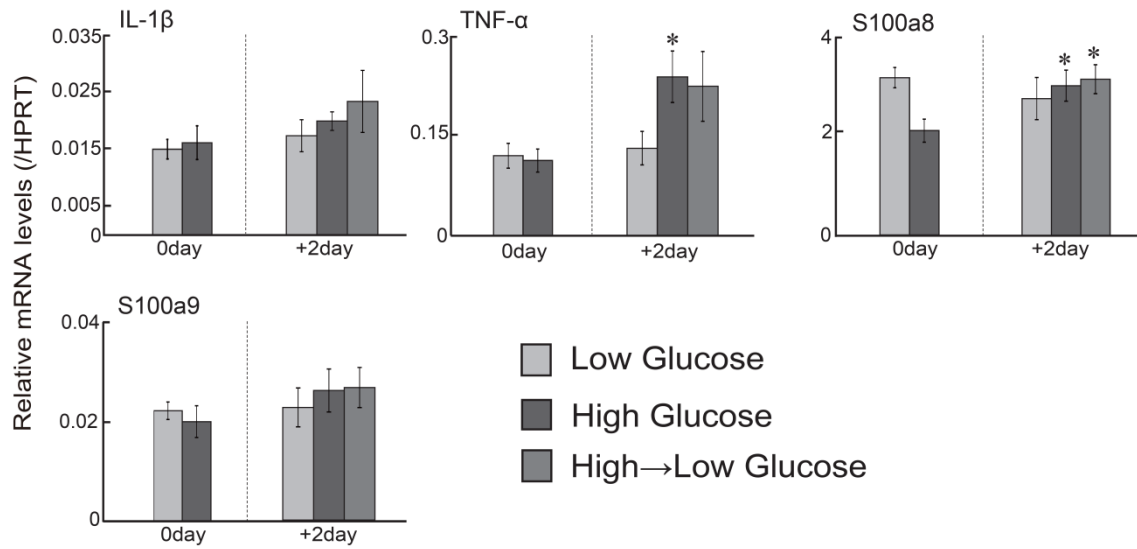
\*The numbers in parentheses indicate ID of a universal probe (Roche Diagnostics) used to detect the signals of each gene.



## 結果

### 1) ヒト単球様 THP-1 細胞における短期高グルコース曝露による炎症関連遺伝子の mRNA 発現量の変化

高グルコース培地で3日間培養した細胞(+2 day)における炎症関連遺伝子(TNF- $\alpha$ 、S100a8)の発現量は、24時間高グルコース培地で培養した直後の細胞(0 day)と比較して有意に増大した。さらに、高グルコース培地で24時間培養し、その後低グルコース培地に換えて2日間培養した細胞では、S100a8の遺伝子発現量が、24時間高グルコースで培養した直後の細胞と比較して有意に高値を示し、TNF- $\alpha$ の遺伝子発現量も増大する傾向にあった( $p = 0.07$ )。



**Fig. 14 Quantitative RT-PCR analysis of pro-inflammatory cytokine genes in human monocyte-like THP-1 cells exposed for 24h to a high glucose concentration in the medium.**

The data are means  $\pm$  SEM for 6 samples per each group.

Asterisks denote significant differences (paired Student's *t*-test) compared with 0 day ( $*p < 0.05$ ).

## 考察

食後高血糖は白血球を活性化し、炎症性サイトカインを分泌することによって炎症を促進し、2型糖尿病および合併症の発症・進展に関与すると考えられる。また、第1章第2節および本研究室の先行研究[42]において、糖尿病モデル動物における食後高血糖の繰り返しの抑制は、空腹時の末梢血白血球における炎症関連遺伝子の発現量を低下させることが明らかとなっている。これらのことから、食後高血糖の情報は、末梢血白血球において何らかの形で記憶・蓄積され、炎症関連遺伝子の発現増大および発現維持をもたらすことによって2型糖尿病および合併症の発症・進展に関与することが考えられた。そこで本節では、ヒト単球様 THP-1 細胞における炎症関連遺伝子の発現が、短期の高グルコース刺激によっても誘導されるか、さらにそれら遺伝子の発現増大が、低グルコース環境下においても持続するかを調べた。

本節の結果より、3日間高グルコース培地で培養した細胞では、TNF- $\alpha$  等の炎症関連遺伝子の発現量が増大していた。さらに24時間高グルコース培地で培養し、その後、低グルコース培地に換えた細胞であっても、炎症関連遺伝子の発現量は高い傾向にあった。これらの結果は、ヒト単球様 THP-1 細胞に対する高グルコース刺激は、炎症関連遺伝子の発現増大をもたらすのみでなく、その後通常環境で培養しても、情報として細胞内に残り、それら遺伝子の発現を維持することを示唆している。

この結果をふまえ、本章第2節では、短期の高グルコース曝露が、ヒト単球様 THP-1 細胞において炎症関連遺伝子の発現持続をもたらす機序について検討した。

## 第3章 第2節

短期高グルコース曝露によるヒストンコードを介した

炎症関連遺伝子の発現持続機構

## 序

食後高血糖によって活性化された白血球から分泌される炎症性サイトカインは、2型糖尿病および合併症の発症・進展に関与する[15,20,124,125]。炎症性サイトカインの中でも  $IL-1\beta$  や  $TNF-\alpha$  は、好中球・単球の遊走や血管内皮細胞の活性化を誘導するため、2型糖尿病合併症として知られる心血管疾患（CVD）などの動脈硬化性疾患の発症を促進すると考えられる[121-123]。日本および欧米諸国での多くの横断研究によって、血中の  $IL-1\beta$  や  $TNF-\alpha$  のタンパク質濃度は、肥満、耐糖能異常または2型糖尿病と正の相関を示すことが報告されている[21-23]。さらに、食後血糖値の上昇は、糖尿病を発症していない対象者においても、CVD のような動脈硬化疾患の発症リスクを増大させることも報告されている[4,6]。

食後高血糖は、食後の血糖上昇に対するインスリン作用の不足により引き起こされ、その繰り返しによって血糖増大幅が徐々に大きくなり、やがて空腹時血糖値の上昇を引き起こし、慢性的な高血糖に至る。第1章第2節および本研究室の先行研究[42]では、OLETF ラットまたは STZ 投与ラットにおける食後高血糖の繰り返しが、空腹時の末梢血白血球における炎症関連遺伝子の発現を増大させることを明らかにしている。これらの報告をふまえると、糖尿病発症前からの食後高血糖の繰り返しは、白血球を活性化することによって炎症性サイトカインの増大をもたらし、炎症の慢性化を引き起こすことによって2型糖尿病および合併症の発症・進展を促進する可能性があることが考えられる。本章第1節において、ヒト単球様 THP-1 細胞に対する短期高グルコース曝露は、 $IL-1\beta$  や  $TNF-\alpha$  などの炎症関連遺伝子の発現増大をもたらし、さらにそれら遺伝子の発現は、低グルコース環境に戻した後も維持されることが明らかとなった。本章第1節の結果およびモデル動物での結果は、高グルコースの情報、何らかの形で白血球に蓄積される機構が存在することを示唆している。

近年、食後高血糖の繰り返しを含めた生活習慣の蓄積には、クロマチン上に後天的に記載される情報、すなわちエピゲノム情報が関与する、という可能性が考えられている。これは、生活習慣などの環境要因が、細胞内のゲノム上に情報として蓄積していき、さまざまな遺伝子発現変動をもたらすというものである。このエピゲノム情報による遺伝子発現変動は、DNA の一次配列の変化を伴わない後天的な修飾によって様々な生命現象を制御する「エピジェネティクス」と称する制御機構として、近年盛んに研究が行われている。エピゲノム情報には、遺伝子プロモーター領域の CpG アイランドのメチル化修飾（DNA のメチル化）と、ヒストンタンパク質のアセチル化・メチル化といったヒストン修飾（ヒストンコード）がある。DNA のメチル化が起こると、その部位の遺伝子発現が不活化され、転写が抑制される。一方でヒストン修飾は、DNA を核内へと収納するための構造体を形成するヒストンタンパク質が、リン酸化、メチル化、アセチル化、ユビキチン化などの様々な修飾を受けることで、それら修飾の種類や修飾部位の組み合わせによって転写、細胞分裂、DNA 修復、DNA 複

製、減数分裂など、多様な生命現象を引き起こす[126,127]。ヒストンタンパク質は、ゲノム DNA が巻き付いたヌクレオソーム構造を形成し、それらヌクレオソームが連続した構造がクロマチンである。ヒストンタンパク質は、H2A、H2B、H3、H4 と呼ばれるコアヒストンタンパク質がそれぞれ2分子ずつ集まって8量体を形成している。コアヒストンタンパク質は球状のドメインと、安定な構造を持たないヒストンテールから成り、そのN末端テールはヌクレオソームの上面から外に出て、さまざまな修飾を受ける。このヒストンテールに起きた化学修飾と、それと相互作用するタンパク質によって様々な機能が引き出されるという「ヒストンコード仮説」は2000年に提唱され、現在までに多くの研究がなされている[128]。実際に、これまでの本研究室での先行研究によって、ヒストン修飾は糖質などの栄養素の摂取によって変動しうることが示されている[129,130]。2型糖尿病などの生活習慣の蓄積に基づく疾患は、徐々に組織の形質を変化させて進行することから、このようなヒストン修飾の変容を介したエピジェネティック制御機構によって疾患関連遺伝子の発現が変動し、発症する可能性が高いと考えられる。

ヒストン修飾の中でも、ヒストンのアセチル化修飾は転写活性化、DNA修復、DNA複製といった様々な機能と関連している。クロマチン構造は、その凝集の度合いから、ユークロマチンとヘテロクロマチンの2つの構造タイプに分かれる。クロマチン同士の凝集がない状態のユークロマチン状態では転写が盛んに行われる。ヒストンのアセチル化修飾は、陽性に帯電しているヒストンタンパク質の電荷を強制的に中和するため、ヒストンタンパク質とDNAとの結合が弛緩する。結果として、ヘテロクロマチンが、ユークロマチンへと変化する。そのため、ユークロマチン領域では、ヒストンH3、H4が高度にアセチル化修飾されていることがわかっている[131,132]。一方、ヒストンのメチル化修飾には、このような電荷を変化させる作用はないが、ヒストンのアセチル化およびメチル化修飾はともに、クロマチン周辺に弛緩・凝集や転写に関与するタンパク質複合体を集合させる。

これらの修飾ヒストンとクロマチンの弛緩・凝集や転写に関与するタンパク質との結合には、ヒストン修飾部位を認識して結合するドメインを有するタンパク質が重要となる。ヒストン認識結合ドメインとヒストン修飾が相互作用することで初めてヒストンコードが読み取られ、転写制御など様々な生理作用が発揮される。ヒストン認識結合ドメインの一つであるブロモドメインは約110アミノ酸残基からなり、ブロモドメインを持つタンパク質は、アセチル化したヒストンに結合する。ヒストンアセチル基転移酵素(HAT)[133-135]や、HATと相互作用する転写共役因子の多くもブロモドメイン領域を有することがわかっている。ブロモドメインタンパク質のうち、2つのブロモドメイン(BD1およびBD2)とC末端ドメイン(ET)ドメインを持つタンパク質はBETファミリーと呼ばれ、転写調節に重要な役割を果たしていることがわかってきた。ヒトにおけるBETファミリーは、Brd2、Brd3、Brd4、Brdtの4種類が確認されており、Brd2およびBrd4は、転写に関与していることが報告されている[136]。特にBrd4は、転写領域のアセチル化ヒストンを認識して結合し、転写伸長因子であ

る positive elongation factor b (P-TEFb) をヒストンアセチル化部位へと強く誘導する [137,138]。P-TEFb は RNA ポリメラーゼ II の C-terminal domain (CTD) のセリン 2 番目のリン酸化を促進することによって転写伸長反応を促進することが知られている [139,140] ため、Brd4 は転写伸長反応に関与することが示唆されている。

近年、糖質などの栄養素の摂取による遺伝子発現変化に関しては、遺伝子転写領域におけるヒストン修飾および Brd4 を介した転写伸長反応における制御が重要であることが、本研究室の先行研究において示唆されている。転写反応は主に、RNA ポリメラーゼ II の遺伝子領域上へのリクルート (開始段階)、RNA ポリメラーゼ II による mRNA の合成 (伸長段階)、RNA ポリメラーゼ II の DNA 上からの解離 (終結段階) に分けられる。転写の開始は、遺伝子転写領域の上流にあるプロモーター/エンハンサー領域において制御されており、これまで、この領域におけるエピゲノム変化による制御が転写の律速段階を司ると考えられてきた。しかしながら近年では、プロモーター/エンハンサー領域における転写開始の制御のみでなく、RNA ポリメラーゼ II が mRNA の合成を行う段階、すなわち転写伸長反応の効率化が、遺伝子発現を制御する重要な要因であることがわかってきた。転写伸長段階における RNA ポリメラーゼ II は転写開始点から +30~+50 base pair 付近で一時停止する [141,142] が、その一時停止は P-TEFb による RNA ポリメラーゼ II の C 末端ドメインのセリン 2 番目のリン酸化によって解除される [139,140]。すなわち、転写領域におけるヒストンアセチル化修飾の増大は、ブロモドメインタンパク質 Brd4 との相互作用によって、P-TEFb の転写領域への集合をもたらし、転写伸長反応を促進することによって、標的遺伝子の mRNA 合成の量的な調節を担っていると考えられる。このような調節機構による遺伝子発現の増大は、小腸消化吸収関連遺伝子において起こることが先行研究によって明らかとなっているが、その他の遺伝子発現においても起こりうると考えられる。それゆえ、食後高血糖の蓄積により増大する炎症関連遺伝子の発現増大および発現維持にも同様のエピジェネティック制御機構が関与している可能性がある。そこで本章では、第 1 節で検討したヒト単球様 THP-1 細胞に対する短期の高グルコース曝露モデルを用い、短期間の高グルコース曝露による IL-1 $\beta$  や TNF- $\alpha$  などの炎症関連遺伝子の発現増大が、その後低グルコース環境に戻しても維持されるかを調べ、さらにその発現増大に THF- $\alpha$  遺伝子近傍のヒストンアセチル化修飾が関与するかをクロマチン免疫沈降法 (ChIP アッセイ) にて検討した。さらに高グルコース曝露時に、アセチル化ヒストン-Brd4 特異的結合阻害剤である (+)-JQ1 [143] を共投与し、Brd4 のアセチル化ヒストンへの結合の阻害によって、これら炎症関連遺伝子の発現が低下するかを調べた。

## 方法

### 1) ヒト単球様 THP-1 細胞の培養

ヒト単球様 THP-1 細胞は、本章第 1 節と同様のものを用いた。細胞は 37°C、5% 二酸化炭素、95% 大気分圧のインキュベーター (HERA cell 150、日本ケンドロ株式会社) 内で 10% fetal calf serum、1% non-essential amino acids (インビトロジェン株式会社)、20 mM Hepes (pH 7.4)、1× antibiotic-antimycotic mixed stock solution (ナカライテック株式会社)、2 mM L-glutamine (インビトロジェン株式会社) を含み、11 mM glucose を添加した RPMI 1640 を用いて、細胞培養ディッシュ (サーモフィッシャー株式会社) 内で培養し、増殖させた。

この細胞を 12 プレートずつ 3 群に分け、それぞれの細胞を低グルコース培地 (5 mM glucose)、高グルコース培地 (25 mM glucose)、または高グルコース培地に (+)-JQ1 (Brd4-アセチル化ヒストン結合阻害剤; Shanghai Haoyuan Chemexpress. Co. Ltd, Shanghai, China) を添加した培地 ((+)-JQ1 最終濃度 100 nmol/L) で 24 時間培養し、細胞を回収した (0 day)。すべての培地を低グルコース培地に交換し、さらに 4 日間培養した。2 日ごとに細胞の回収および培地交換を行った (+2 day, +4day)。細胞は、 $2.25 \times 10^7$  cells/15 mL/plate の濃度で播いた。

### 2) 細胞サンプルの回収

#### ① RNA 用サンプル

培養液と細胞をよく攪拌させた後、1 群につき 6 つのプレートから細胞培地混合液を 1 mL ずつとり、1.5 mL チューブに入れた。4°C、8,000 rpm (MX-305、トミー精工株式会社) で 10 分間遠心分離した後、上清を除き、沈殿に 350  $\mu$ L の RLT with  $\beta$ -ME を加え、よく攪拌してから -80°C で保存した。

#### ② クロマチン免疫沈降法 (ChIP アッセイ) 用サンプル

細胞培地混合液 10 mL に、11× 固定液 (1.1% formaldehyde、50 mM Hepes (pH 8.0)、100 mM NaCl、1 mM EDTA、0.5 mM EGTA) を 1.2 mL ずつ加えて攪拌し、室温で 20 分間静置して、DNA および DNA に結合するタンパク質を固定した (クロスリンク反応)。反応を停止させるため、1.5 M グリシンを 1 mL 加えて攪拌し、室温で 10 分間静置した。その後よく攪拌して 15 mL チューブに分注した。ホルムアルデヒドを除去するため、4°C、2,800 rpm (SCR20BB、日立工機株式会社) で 10 分間遠心した後、上清を除き、沈殿に FACS solution (1×PBS (-)、2% bovine serum、0.05% NaN<sub>3</sub>) を 10 mL 加えてよく混和し、再び 4°C、2,800 rpm (SCR20BB、日立工機株式会社) で 10 分間遠心した後、上清を除いた。この洗浄操作をもう一度繰り返し、残液のないように上清を除いた後、残った沈殿に 1 mL のプロテアーゼインヒビタータブレット (1 粒/10 mL, ロシュ・ダイアグノスティクス株式会社) 入りの SDS lysis buffer (50 mM



Tris-HCl pH 8.0、10 mM EDTA pH 8.0、1% SDS、0.5 mM PMSF) を加えて溶解させた。10 分毎に攪拌しながら 30 分間氷上に置き、細胞を可溶化し、-80°C で保存した。

### 3) 定量的リアルタイム PCR による mRNA 発現量の測定

総 RNA の抽出は、第 3 章第 1 節に記載したものと同様に行った。抽出した総 RNA の濃度を Qubit™ fluorometer を用いて測定し、総 RNA が 1 サンプルあたり 800 ng 含まれるように調整し、逆転写反応を行った。cDNA による定量的 PCR は、Universal Probe Library (ロシュ・ダイアグノスティクス株式会社) を用いて行った。この実験に使用したプライマーの塩基配列および Universal Probe Library の番号は Table 15 に示した。逆転写反応および定量的 PCR は、第 3 章第 1 節に記載した方法に従って行った。

### 4) クロマチン免疫沈降法 (ChIP アッセイ)

#### ① 超音波破碎

-80°C に凍結保存していたサンプルを室温で融解し、DNA フラグメントが 200-500 base pair (bp) となるようにソニケーションするため、サンプルを 3,000 rpm (SCR20BB、日立工機株式会社) で 1 分間遠心し、S-250 SONIFIER (ブランソン、神奈川) を用いて 30 秒間のソニケーションと 30 秒間の氷上での冷却を 12 セット繰り返した (DNA の断片化)。この溶液を、1.5 mL チューブに移し、6°C、15,000 rpm (MX-305、トミー精工株式会社：これ以降の操作はすべて同機種を用いて行った) で 15 分間遠心し、上清を新しい 1.5 mL チューブに移した。

#### ② タンパク質定量

細胞数を一定にするために、ソニケーションしたサンプル 2  $\mu$ L を 10 倍希釈し、Lowry 法[66]にてタンパク質量を測定した。結果を基にプロテアーゼインヒビター入りの SDS lysis buffer でタンパク質量が均等になるように希釈した。これを 100  $\mu$ L ずつ分注し、使用するまで -80°C で保存した。

#### ③ 免疫沈降

100  $\mu$ L ずつ分注し、保存しておいた断片化 DNA 可溶性クロマチン画分に 900  $\mu$ L の ChIP dilution buffer (50 mM Tris-HCl (pH 8.0)、167 mM NaCl、1.1% Triton X-100、0.11% sodium deoxycholate) を加えて 10 倍に希釈し、非特異的な分子を除くために 10  $\mu$ L の 50% protein G-Sepharose/salmon sperm DNA、1% BSA 懸濁液 (Protein G Sepharose 4 Fast Flow; GE ヘルスケア株式会社、salmon sperm DNA; サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社) を加え、4°C で 2 時間、ローテーターを用いて攪拌した。その後、4°C、5,000 rpm、5 分間遠心し、上清を新しい 1.5 mL チューブへ移した。さらに上清を 4°C、5,000 rpm、2 分間遠心した後、上清を 400  $\mu$ L ずつ新しいチューブに移した。この時、Input 画分として 130  $\mu$ L をとり、免疫沈降が終わるまで 4°C に保存した。400

μL に分注したサンプルに対し、以下の抗体 2 μL を使用して免疫沈降を行った。

- anti-acetyl-histone H3 (ミリポア株式会社)
- anti-Brd4 (シグマアルドリッチ株式会社、カスタム抗体作製サービス、Brd C 末端ペプチド CFQSDLLSIFEENLF をウサギに免疫し、作製)
- anti-RNA polymerase II (コーヴァンス、Princeton、New Jersey、USA)

断片化 DNA-クロマチン複合体と抗体の混合液を 4°C で 24 時間、ローテーターを用いて攪拌した。その後各チューブに 5 μL の 50% protein G-Sepharose/salmon sperm DNA, 1% BSA 懸濁液を加え、12-24 時間攪拌することにより、目的の DNA/タンパク質複合体を 50% protein G-Sepharose ビーズに結合させた。この複合体を 4°C、5,000 rpm、2 分間遠心して沈殿させ、上清を取り除き、沈殿物に 750 μL の RIPA buffer (50 mM Tris-HCl (pH 8.0)、1 mM EDTA、1% Triton X-100、0.1% SDS、0.1% sodium deoxycholate) / 150 mM NaCl を加え、ローテーターを用いて攪拌 (4°C、5 分以上) してから 4°C、5,000 rpm、2 分間遠心して上清を取り除いた。同様の洗浄操作を、RIPA buffer/ 500 mM NaCl で 6-8 回、LiCl wash buffer (10 mM Tris-HCl、0.25 M LiCl、1 mM EDTA (pH 8.0)、0.5% NP-40、0.5% sodium deoxycholate) で 2 回、TE buffer で 2 回行った。4°C、5,000 rpm、2 分間遠心して回収した DNA/タンパク質複合体の結合したビーズを、400 μL の ChIP direct elution buffer (10 mM Tris-HCl (pH 8.0)、5 mM EDTA、300 mM NaCl、0.5% SDS) に懸濁させた。この時、4°C で保存していた 130 μL の Input サンプルに 270 μL の ChIP direct elution buffer を加え、さらに塩濃度が 300 mM NaCl になるように 5 M NaCl を加えた。以降の操作は、Input サンプルも同様に行った。

#### ④ DNA の回収

ChIP direct elution buffer に懸濁したビーズを 65°C で 14-16 時間加熱することにより、脱クロスリンク反応を行った。

脱クロスリンク反応後、4 mg/mL RNaseA を 1 μL 加え、37°C で 30 分間インキュベートし、さらに 10 mg/mL proteinase K を 1 μL 加え、55°C で 1 時間インキュベートした。次に、20 mg/mL glycogen を 10 μL 加えて攪拌した後、4°C、10,000 rpm、5 分間遠心し、ビーズを取り除き、DNA/タンパク質複合体を含む上清を新しい 1.5 mL チューブに移した。得られた上清に、フェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール (25: 24: 1) を 400 μL 加え、ローテーターを用いて 10 分間攪拌した後、4°C、14,000 rpm、5 分間遠心し、DNA を含む上清を 360 μL ずつとり、新しいチューブに回収した。回収した上清に 900 μL の 100% エタノールを加え、ローテーターを用いて 10 分間攪拌し、-80°C で 12 時間以上静置した。

#### ⑤ エタノール洗浄

遠心機ならびにローターをあらかじめ 4°C に冷却しておき、-80°C に静置しておいた

サンプルをただちに 4°C、14,000rpm、30 分間遠心した。上清を取り除き、沈殿に 900  $\mu\text{L}$  の 70%エタノールを加え、4°C、14,000 rpm、30 分間遠心し、上清を除いた。室温に放置して乾燥させた DNA の沈殿に対し、Input 画分には 100  $\mu\text{L}$ 、免疫沈降画分には 75  $\mu\text{L}$  の DNase/RNase free water を加え、沈殿を溶かし、-80°Cで保存した。

#### ⑥ 定量的リアルタイム PCR

定量的 PCR は、LightCycler 480 SYBR Green I Master (ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社) を用いて行った。生成した DNA 溶液 2  $\mu\text{L}$  と混合液 (LightCycler 480 SYBR Green I Master 5  $\mu\text{L}$ 、DNase RNase free water 2.5  $\mu\text{L}$ 、sense primer (10  $\mu\text{M}$ ) 0.25 $\mu\text{L}$ 、antisense primer (10  $\mu\text{M}$ ) 0.25  $\mu\text{L}$ ) 8  $\mu\text{L}$  を混合し、Light cycler 480 (ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社) を用いて、Denature (95°Cで 5 分間) を 1 サイクル行った後、PCR (95°Cで 10 秒間、60°Cで 10 秒間、72°Cで 6 秒間) を 50 サイクル行い、Melting curve (95°Cで 10 秒間、65°Cで 15 秒間、その後徐々に 98°Cまで上昇) を 1 サイクル行い、その後 Cooling (50°Cで 10 秒間) を 1 サイクル行うという条件下で増幅を行った。この実験に使用したプライマーの塩基配列は **Table 16** に示した。

#### ⑦ 解析

定量的 PCR を行った後に、付属のソフトウェアを使用し、それぞれの遺伝子領域において、対数的に上昇するサイクル数を割り出した。割り出されたそれぞれの値は 1 サイクルの違いが 2 倍の違いであるとする Delta Delta 法[49]を用い、発現量を換算した。抗体によって免疫沈降され、回収された DNA は、同様の方法で定量した Input 中の DNA 量に対する比率で求めた。

#### 5) 統計解析

実験データは平均値±標準誤差で表した。

統計解析は、エクセル統計 (社会情報サービス株式会社) で行った。

**Fig. 15**、**Fig. 16**、**Fig. 17**、**Fig. 18** における有意差は、Student's *t*-test で判断した。 $p < 0.05$  で有意差ありとした。

**Table 15** The sequences of oligonucleotide primers used for real-time RT-PCR

Target mRNA	Sequence
Interleukin 1 beta (IL-1 $\beta$ ) (#78)	5'-CTGTCCTGCGTGTTGAAAGA -3'
	5'-TGGGTAATTTTTGGGATCTACA -3'
Tumor necrosis factor (TNF- $\alpha$ ) (#29)	5'-CAGCCTCTTCTCCTTCCTGAT -3'
	5'-GCCAGAGGGCTGATTAGAGA -3'
S100 calcium binding protein A8 (S100a8) (#78)	5'-CAAGTCCGTGGGCATCAT -3'
	5'-GACGTCGATGATAGAGTTCAAGG -3'
S100 calcium binding protein A9 (S100a9) (#85)	5'-GTGCGAAAAGATCTGCAAAA -3'
	5'-TCAGCTGCTTGTCTGCATTT -3'
Cluster of differentiation 11a (CD11a) (#17)	5'-ATCTTCAAAGCAGGCCACTC -3'
	5'-CGTGCAATTCAACCGAGTC -3'
Transcription factor IIB (TF II B) (#17)	5'-GGAGATTTGTCTACCATGATTTG -3'
	5'-AATTGCCAAATTCGTCAAAACT-3'

\*The numbers in parentheses indicate ID of a universal probe (Roche Diagnostics) used to detect the signals of each gene.

**Table 16** The sequences of oligonucleotide primers used for ChIP assay of TNF- $\alpha$  gene-interacting nuclear proteins

Region on the TNF- $\alpha$ gene	Sequence
-2,000	5'-AGCTCCCAGAAGATGGTGTATC -3'
	5'-AAGACAGTACTAGGGCTGAGGA -3'
-1,000	5'-AAGGAAAAGTCAGGGTCTGGA -3'
	5'-TGGACATTCTCCTACCCATTG -3'
-400	5'-AACACAGCTTTTCCCTCCAAC -3'
	5'-GGTCTGTGGTCTGTTTCCTTCT -3'
1	5'-AAGGAAGTTTTCCGCTGGTT -3'
	5'-GTGTGCCAACAACCTGCCTTTA -3'
1,000	5'-TTTAAGGGTGACTCCCTCGAT -3'
	5'-CCCAAACCCAGAATTAGGAAAG -3'
2,000	5'-GAACATCCAACCTTCCCAAAC -3'
	5'-TTTGAGCCAGAAGAGGTTGAG -3'
over 5,000	5'-ACTTGAGGTCAGGAGTTCGAGA -3'
	5'-GCCCCGGCTAACTTTTTGTATC -3'

This region is denoted in bp relative to the transcription initiation site.

## 結果

### 1) ヒト単球様 THP-1 細胞における短期高グルコース曝露による炎症関連遺伝子の mRNA 発現量の増大および (+)-JQ1 添加による発現増大抑制

ヒト単球様 THP-1 細胞における炎症関連遺伝子の mRNA 発現量の結果を **Fig. 15** に示した。THP-1 細胞を高グルコース培地で 24 時間培養し、その後低グルコース培地に換えて 2 日間培養した後の TNF- $\alpha$ 、S100a9 の mRNA 発現量は、5 日間低グルコース培地で培養した細胞と比較して有意に増大した。同様に、IL-1 $\beta$ 、S100a8 の mRNA 発現量も低グルコース培養細胞と比べて高い傾向を示した。さらに、これら炎症関連遺伝子の発現増大は、低グルコース培地に換えてから 4 日後においても維持された。

一方で、高グルコース培地に(+)-JQ1 を添加した培地で 24 時間培養し、その後低グルコース培地に換えて 2 日間培養した後の IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、S100a9 の遺伝子発現量は、高グルコース培地で 24 時間培養し、その後低グルコース培地に換えて 2 日間培養した細胞と比較すると有意に低値を示した。それら遺伝子の発現抑制は、低グルコース培地に換えてから 4 日後においてもみられた (**Fig. 15**)。

### 2) クロマチン免疫沈降法 (ChIP アッセイ) による TNF- $\alpha$ 遺伝子近傍におけるヒストン修飾の変動

ChIP アッセイは、短期の高グルコース曝露によって mRNA 発現量が増大し、(+)-JQ1 の添加によって発現増大が抑制された TNF- $\alpha$  遺伝子に焦点を当てて行った。

#### ①ヒト単球様 THP-1 細胞における TNF- $\alpha$ 遺伝子近傍のヒストン H3 のアセチル化修飾の変動

短期の高グルコース曝露によって、その後低グルコース培地に戻した後も TNF- $\alpha$  遺伝子の mRNA 発現が維持されていた。この発現維持に対してヒストン H3 のアセチル化修飾の変動が関与しているかを調べるために、ChIP アッセイを行った。ChIP アッセイのバックグラウンドを示す IgG のシグナルは Input と比べて 0.03% 以下であった。

低グルコース培地で培養した細胞と比較して、高グルコース培地で 24 時間培養した後、低グルコース培地に換えて 2 日および 4 日間培養した細胞では、TNF- $\alpha$  遺伝子の転写開始点上流域 (-400 base pair (bp)) および転写領域 (+1、+1000、+2000bp) のヒストン H3 のアセチル化が顕著に増大した。一方で、高グルコース培地に(+)-JQ1 を添加して 24 時間培養し、その後低グルコース培地に換えて培養した細胞では、TNF- $\alpha$  遺伝子近傍のヒストン H3 のアセチル化は抑制された (**Fig. 16**)。

#### ②ヒト単球様 THP-1 細胞における TNF- $\alpha$ 遺伝子への Brd4 結合量の変動

高グルコース培地に(+)-JQ1 を添加して 24 時間培養した細胞では、高グルコース曝

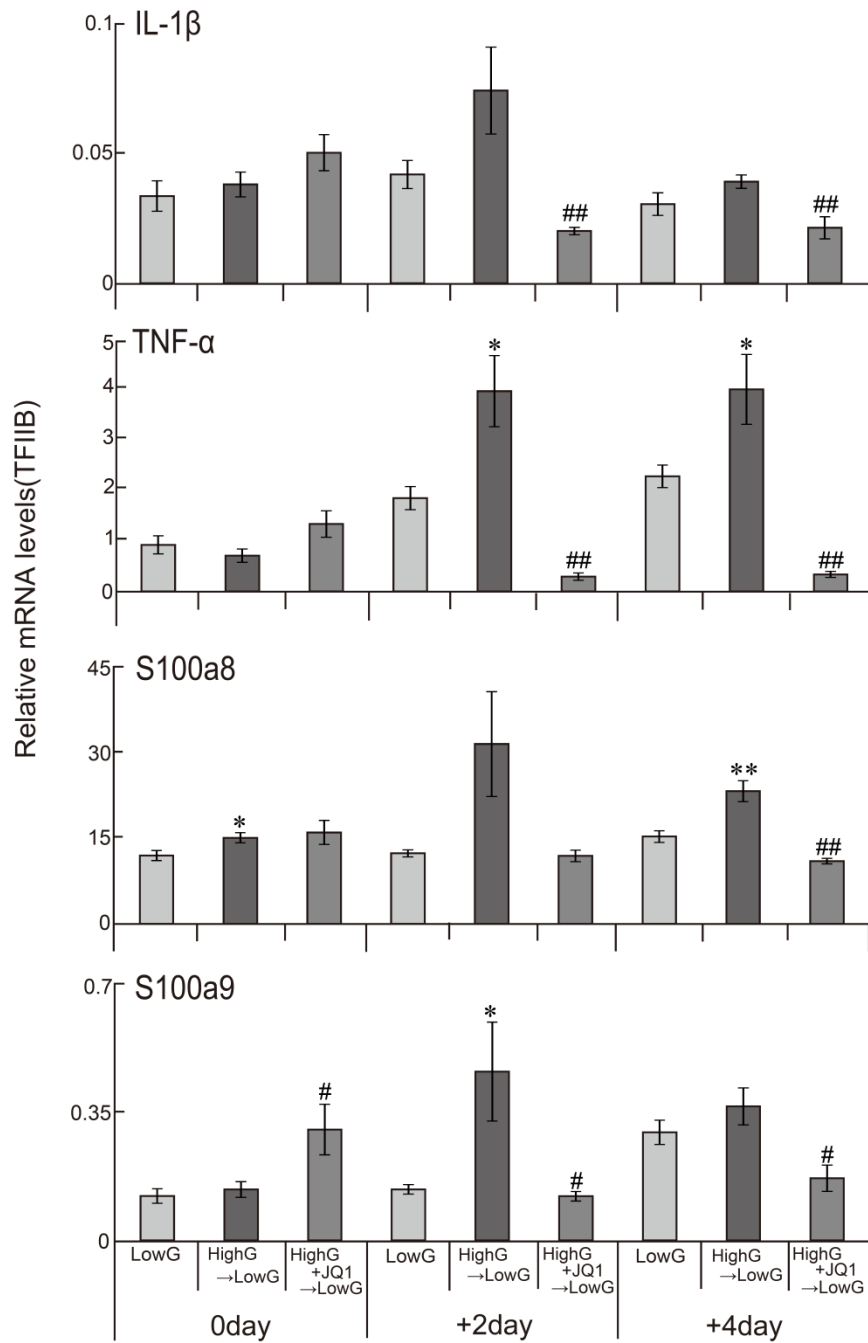
露によって増大あるいは維持された遺伝子発現がみられなかった。(+)JQ1 はプロモドメインを介してアセチル化ヒストンに結合し、転写伸長反応を促進する Brd4[136,144,145]の結合を阻害する。そこで、Brd4 の結合量が(+)JQ1 によって減少しているかを、ChIP アッセイにて検討した。

高グルコース培地で 24 時間培養し、その後低グルコース培地に換えて培養した細胞では、低グルコース培地に換えて 2 日後における TNF- $\alpha$  遺伝子の転写開始点(+1bp)での Brd4 結合量の増大がみられた。一方で、高グルコース培地に(+)JQ1 を添加して 24 時間培養した細胞では、(+)JQ1 を添加しなかった場合と比較して、TNF- $\alpha$  遺伝子の転写開始点 (+1bp) での Brd4 結合量が抑制された (**Fig. 17**)。

### ③ヒト単球様 THP-1 細胞における TNF- $\alpha$ 遺伝子近傍の RNA ポリメラーゼ II の結合量の変動

短期の高グルコース曝露によるその後の TNF- $\alpha$  遺伝子の発現維持および(+)JQ1 の添加による発現増大および維持の抑制に、TNF- $\alpha$  遺伝子近傍の RNA ポリメラーゼ II の結合量が関与するかを、ChIP アッセイにて検討した。

TNF- $\alpha$  遺伝子における RNA ポリメラーゼ II 結合量は、いずれの群でも転写開始点 (+1bp) において増大した。特に、高グルコース培地で 24 時間曝露した後、低グルコース培地に換えて 2 日間培養した細胞における転写開始点の RNA ポリメラーゼ II 結合量は、他の群と比較して有意に増大した (**Fig. 18**)。



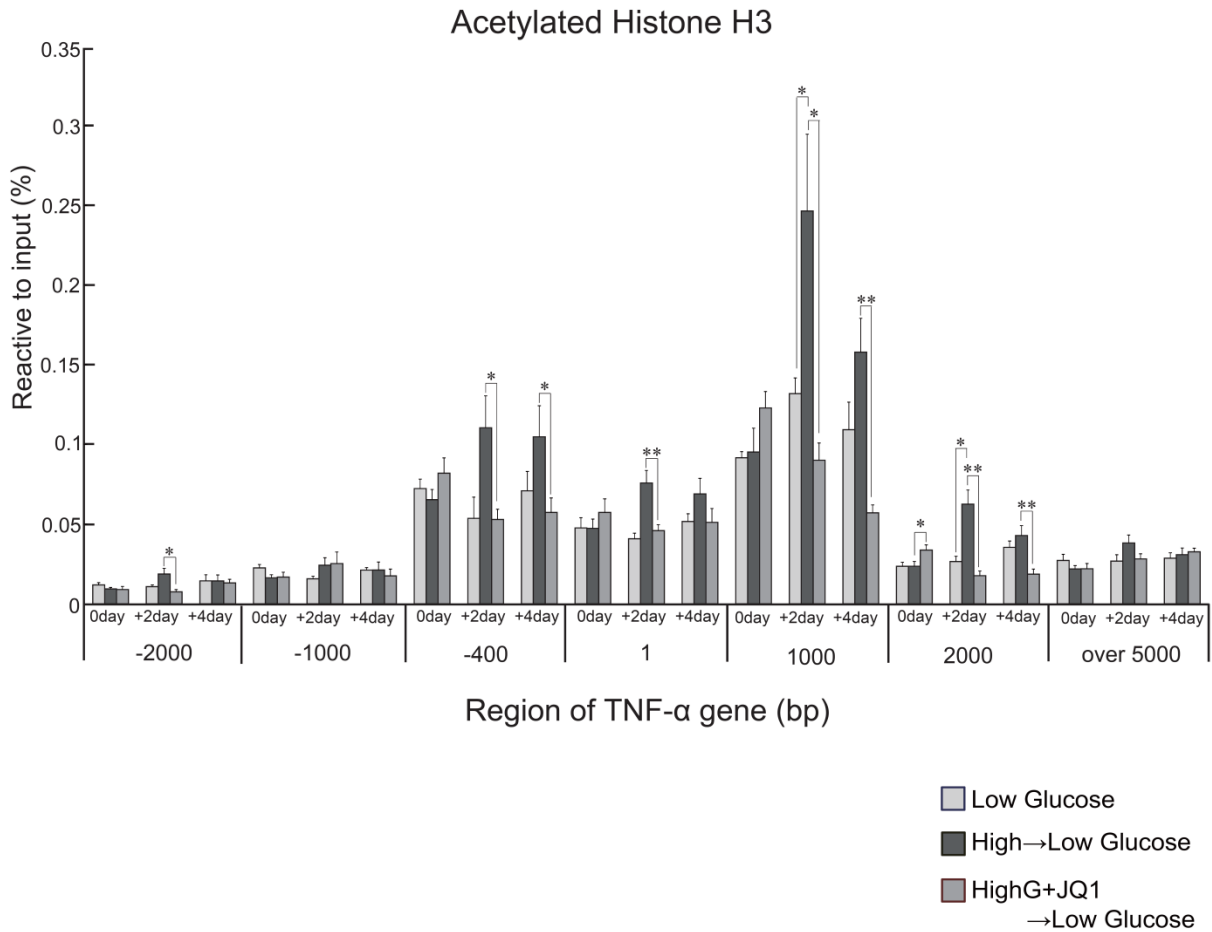
**Fig.15** Effects of a transient exposure to a high glucose with or without (+)-JQ1 on the expressions of pro-inflammatory cytokines and S100 protein genes in human monocyte-like THP-1 cells.

The data are means  $\pm$  SEM for 6 cells per each group.

\*\*\* denote a significant difference compared with the cells treated with a low glucose medium on the same day (Student's *t*-test, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ).

##,## denoted a significant difference compared with the mRNA levels in the cells exposed to high glucose concentration for 24h and then treated with a low glucose medium (Student's *t*-test, # $p < 0.05$ , ## $p < 0.01$ ).



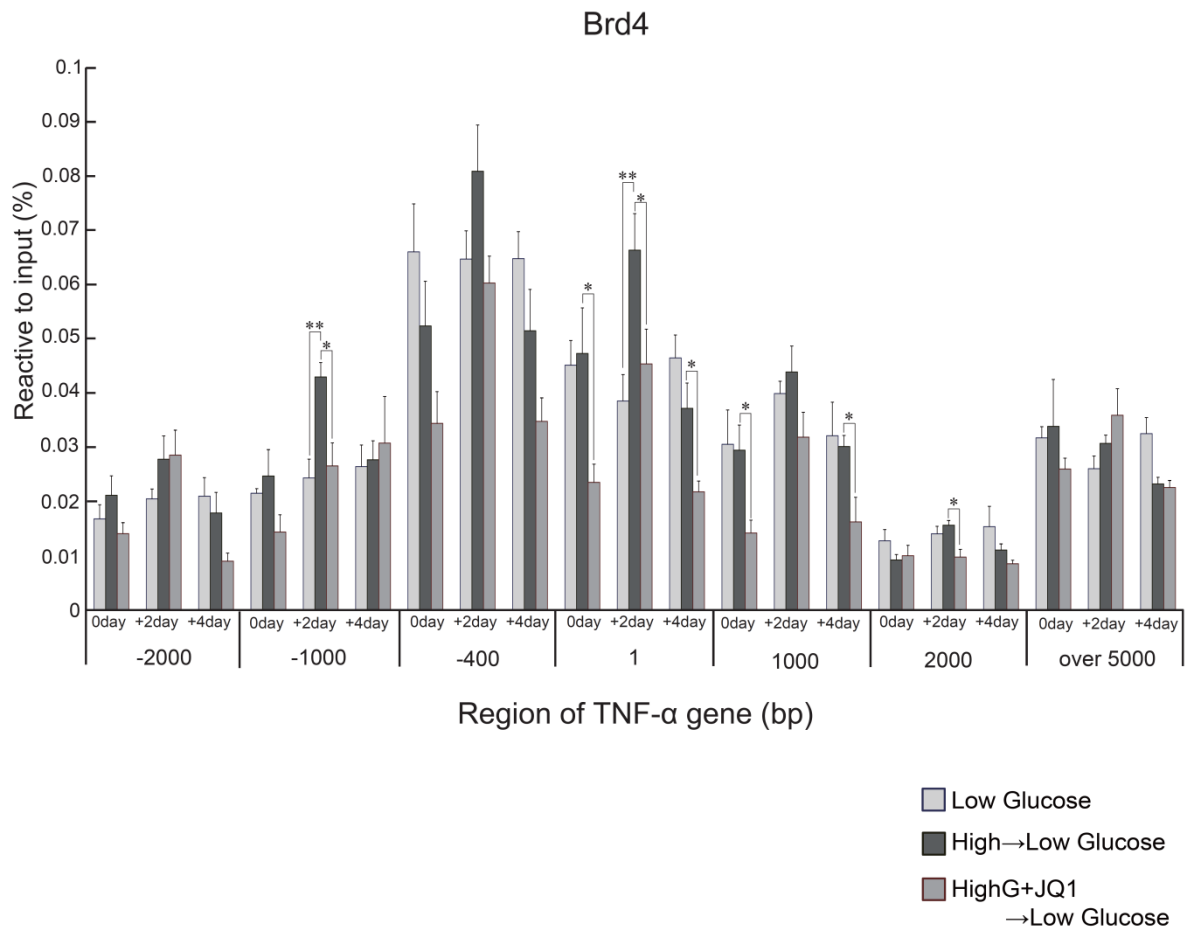


**Fig.16** Effects of a transient exposure to a high glucose medium with or without (+)-JQ1 on acetylation levels of histone H3 on TNF- $\alpha$  gene in human monocyte-like THP-1 cells.

ChIP signals were detected by quantitative real-time PCR following immunoprecipitation of acetylated histone H3 on the promoter/enhancer and transcribed regions of the TNF- $\alpha$  gene in human monocyte-like THP-1 cells subjected to 24h high glucose exposure and/or (+)-JQ1.

The data are means  $\pm$  SEM for 6 cells per each group.

Asterisks denote significant differences between the cells cultured in different conditions on each day. (Student's *t*-test, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ).

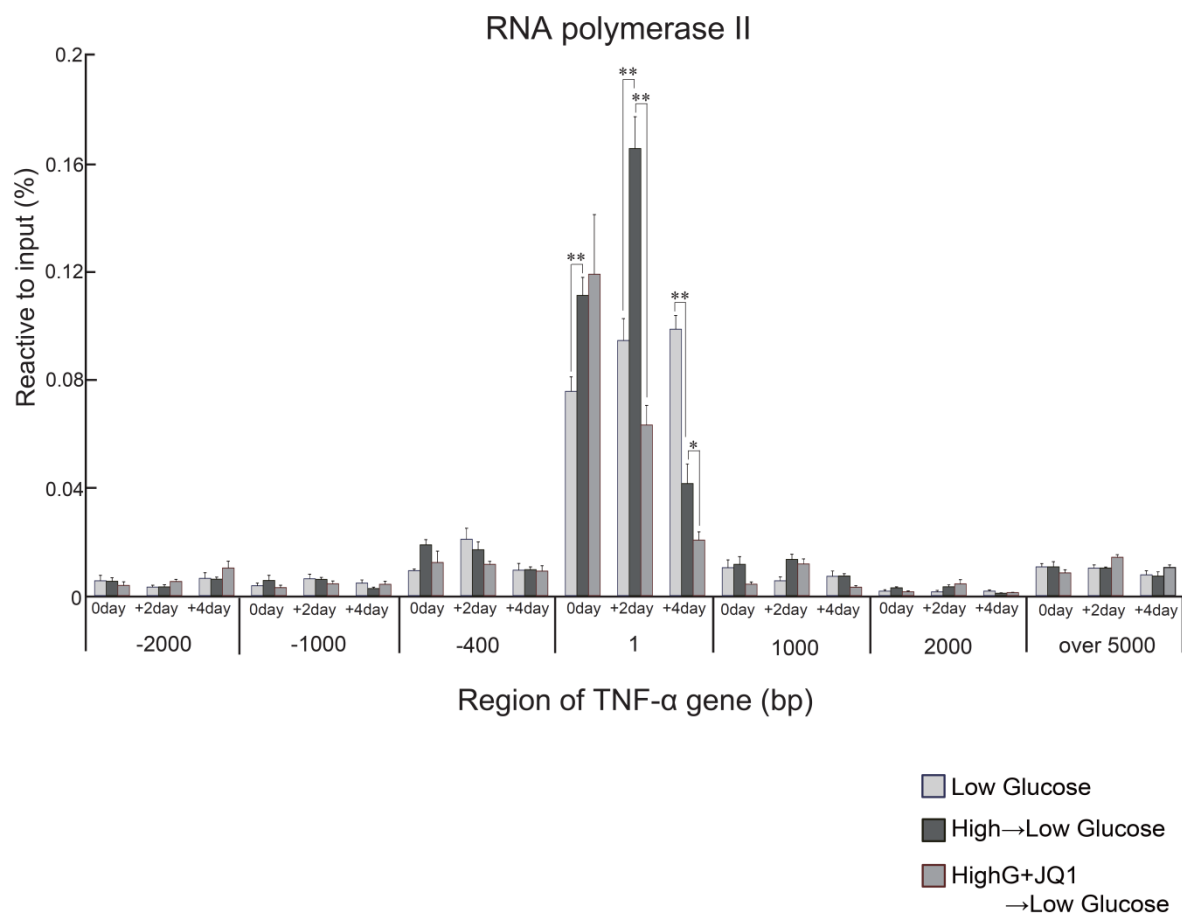


**Fig.17 Effects of a transient exposure to a high glucose medium with or without (+)-JQ1 on Brd4 occupancy on TNF- $\alpha$  gene in human monocyte-like THP-1 cells.**

ChIP signals were detected by quantitative real-time PCR following immunoprecipitation of the occupancy of Brd4 on the promoter/enhancer and transcribed regions of the TNF- $\alpha$  gene in human monocyte-like THP-1 cells cultured in a low glucose medium or in a high glucose medium with or without (+)-JQ1 for 24h.

The data are means  $\pm$  SEM for 6 cells per each group.

Asterisks denote significant differences between the cells cultured in different conditions on each day (Student's *t*-test, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ).



**Fig.18** Effects of a transient exposure to a high glucose medium with or without (+)-JQ1 on polymerase II occupancy on TNF- $\alpha$  gene in human monocyte-like THP-1 cells.

ChIP signals were detected by quantitative real-time PCR following immunoprecipitation of the occupancy of RNA polymerase II on the promoter/enhancer and transcribed regions of the TNF- $\alpha$  gene in human monocyte-like THP-1 cells cultured in a low glucose medium or in a high glucose medium with or without (+)-JQ1 for 24h.

The data are means  $\pm$  SEM for 6 cells per each group.

Asterisks denote significant differences between the cells cultured in different conditions on each day (Student's *t*-test, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ).

## 考察

食後高血糖により活性化された白血球からの炎症性サイトカインの分泌増大は、2型糖尿病および合併症の発症・進展を促進すると考えられている[15,20,124,125]。食後高血糖は糖尿病発症前の耐糖能異常期から観察される。これまでの報告で、2型糖尿病患者のみでなく、糖尿病を発症していない耐糖能異常者においても、食後高血糖の繰り返しは、その後の心血管疾患（CVD）などの発症リスクを増大させることがわかっている[4,6]。これらの報告は、食後高血糖の繰り返しは、慢性的に炎症性サイトカインの分泌を促進することによって2型糖尿病や合併症の発症・進展を促進する可能性があることを示している。

第1章第2節および第2章第2節より、食後高血糖の繰り返しは空腹時においても末梢血白血球における炎症関連遺伝子の発現レベルを維持させることが明らかとなった。さらに、本章第1節では、ヒト単球様 THP-1 細胞に対する 24 時間の短期高グルコース曝露は、IL-1 $\beta$  や TNF- $\alpha$  などの炎症関連遺伝子の発現増大をもたらし、さらにそれら遺伝子の発現は、低グルコース環境に戻してから 2 日後においても維持されることが明らかとなった。以前の他の研究者による報告では、血管内皮細胞に対する 16 時間の高グルコース培地での培養は、NF- $\kappa$ B および VCAM-1 の遺伝子発現を増大させ、その後低グルコース培地に戻し 6 日間培養した後もそれらの発現が維持されたことが報告されている[146]。血管内皮細胞のターンオーバーは約 1,000 日であり、一方で好中球や単球の血中での寿命は数日と短い。しかしながら、高グルコースによる曝露はヒト単球様 THP-1 細胞および血管内皮細胞の双方において、炎症関連遺伝子および細胞接着分子遺伝子の発現持続をもたらした。末梢血白血球および血管内皮細胞は、炎症の際にはそれぞれが分泌する因子によって共活性化され、アテローム性動脈硬化病変の形成に働くことが知られている[147]。アテローム性動脈硬化病変の形成機序は、①白血球による炎症性サイトカインの分泌による E-selectin や ICAM-1 などの細胞接着分子の誘導、②細胞接着分子への白血球の接着、③白血球の血管内皮細胞への浸潤、④マクロファージによる病巣形成である。本節により、血管内皮細胞における細胞接着分子の遺伝子発現のみでなく、末梢血白血球においても、高グルコース誘導性の炎症関連遺伝子の発現が、刺激を除いた後も維持されることが明らかとなったことから、食後高血糖は血管内における炎症の慢性化をもたらし、アテローム性動脈硬化病変の形成を促進する可能性があると考えられる。さらに、これらの知見は、食後高血糖の情報が白血球内に蓄積する機構が存在することを強く示唆している。

近年、クロマチン上に後天的に記載されるエピゲノム情報（ヒストン修飾およびヒストン認識結合ドメインタンパク質）が遺伝子発現の制御に深く関連していることが明らかとなってきた。特に本研究室の先行研究では、糖質摂取などの栄養摂取による遺伝子発現の増大には、転写領域におけるヒストンのアセチル化修飾が重要であることが明らかとなっている。転写領域におけるヒストンのアセチル化修飾は、転写伸長

段階における mRNA 合成効率の上昇をもたらすことによって、標的遺伝子の mRNA の量的な調節を担っている可能性があると考えられている。具体的には、転写領域のアセチル化ヒストンにプロモドメインタンパク質 Brd4 が結合し、RNA ポリメラーゼ II の活性を増大させ、転写伸長反応を促進するというものである。しかしながら、高グルコース環境への曝露による炎症関連遺伝子の発現増大および発現維持に、これらエピゲノム情報が関与するかは明らかではなかった。そこで、短期的な高グルコース曝露が、顕著な mRNA 発現量の変動が観察された TNF- $\alpha$  遺伝子近傍における、ヒストンアセチル化修飾および転写伸長促進エピゲノム因子 Brd4 の結合量を変化させるかをクロマチン免疫沈降法 (ChIP アッセイ) にて検討した。

本節の結果より、短期間高グルコース環境に曝露した細胞では、その後低グルコース培地に戻した 2 日後、4 日後であっても、TNF- $\alpha$  遺伝子上のヒストン H3 のアセチル化修飾量の増大が維持されることが明らかとなった。その修飾量の増大は、主に転写領域 (+1、+1000、+2000 bp) において顕著にみられた。さらに、Brd4 の TNF- $\alpha$  遺伝子上への結合量を測定したところ、高グルコース環境に曝露し、その後低グルコース培地に戻した 2 日後の細胞では、TNF- $\alpha$  遺伝子の転写開始点付近において Brd4 の発現量の増大がみられた。また、RNA ポリメラーゼ II の TNF- $\alpha$  遺伝子の転写開始点 (+1bp) における結合量は、高グルコース環境に短期間曝露し、その後低グルコース培地で 2 日間培養した細胞において、低グルコース培地で培養した細胞と比較して増大した。これらのヒストン H3 のアセチル化修飾、Brd4 および RNA ポリメラーゼ II の結合量の増大は、Brd4-アセチル化ヒストン結合阻害剤(+)-JQ1 を高グルコース培地に添加して 24 時間培養した細胞では抑制された。これに伴い、(+)-JQ1 を添加した高グルコース培地で培養した細胞では、炎症関連遺伝子の発現量も同様に抑制された。これらの結果は、高グルコース環境への短期曝露による炎症関連遺伝子の発現増大には、遺伝子転写領域におけるヒストン H3 のアセチル化修飾および Brd4 の結合増大に伴う RNA ポリメラーゼ II の活性増大が関与していることを示唆している。RNA ポリメラーゼ II はプロモーター領域に結合した基本転写因子に結合し、標的遺伝子の転写開始点付近に集合する。基本転写因子のプロモーター領域への集合は、エンハンサー領域に結合する転写活性化因子によって補助される。その後、RNA ポリメラーゼ II は、TFIIH などのリン酸化酵素によって C 末端ドメイン (CTD) の 5 番目のセリン残基がリン酸化されることにより、転写伸長反応を開始する。さらに、2 番目のセリン残基が Brd4 や、Brd4 に結合する P-TEFb によってリン酸化される[139,140]ことによって、転写伸長反応が促進される。本節では、RNA ポリメラーゼ II のリン酸化を測定しなかったために、転写開始反応と転写伸長反応がどのような程度で促進されていたかは判断できない。しかしながら、転写開始点近傍において、RNA ポリメラーゼ II の結合が高グルコース曝露によって顕著に増大し、またその増大が(+)-JQ1 の添加によって抑制されていたことを考えると、高グルコース刺激は、Brd4 を介して RNA ポリメラーゼ II の集合を促進することによって、転写伸長反応のみでなく、転写開始反応も促進していた可能性も考えられる。近年、Brd4 はエンハンサー領域に結合し、

エンハンサーRNAの合成を促進することによって基本転写因子およびRNAポリメラーゼ II といった転写開始複合体の形成を促進することが報告されている[148]。本節の結果においても、短期高グルコース曝露による Brd4 の結合量の増大は、転写領域だけでなく、転写開始点上流 (-1000、-400bp) においてもみられた。これらのことから、Brd4 は転写領域における転写伸長の促進、および転写開始に必要な RNA ポリメラーゼ II の動員に影響を及ぼした可能性が考えられた。また Brd4 は、ヒストンのアセチル化に依存したヒストンシャペロン活性を持ち、RNA ポリメラーゼ II と会合することによって転写伸長反応を促進するとの報告もある[148]。このように Brd4 は、エンハンサー領域から転写領域において、転写開始から伸長反応に至るまでのさまざまな段階に関与し、転写を促進することが想定される。今後は高グルコース環境に曝露した THP-1 細胞における Brd4 の役割をより詳細に検討する必要がある。

今回の検討によって、高グルコース刺激による白血球における炎症関連遺伝子の発現増大レベルの維持には、ヒストンコードの変化が関与していることが示唆された。しかしながら、これらヒストンコードの変容による遺伝子発現変動についてより詳細に検討するためには、他にも存在する様々な修飾やそれに関与する酵素および転写因子の結合について調べる必要がある。例えば、ヒストンのアセチル化修飾は、ヒストンのアセチル化を触媒するヒストンアセチル基転移酵素 (HAT) や脱アセチル化を触媒するヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) といったタンパク質によって可逆的に行われており[149]、さらに、転写伸長反応には P-TEFb による RNA ポリメラーゼ II のリン酸化が重要である。また、ヒストン H3 の 4 番目リジン残基 (H3K4) のジ・トリメチル化は、ヒストンのアセチル化や転写の活性化に先行して起こり、ヒストンのアセチル化を引き起こすタンパク質を標的遺伝子上に誘導することが報告されており[150,151]、これら他のヒストンのメチル化修飾等を測定することが必要である。また、TNF- $\alpha$  等の炎症関連遺伝子には、転写因子 NF- $\kappa$ B の活性化が重要である。高グルコース刺激は、細胞内外における活性酸素種 (ROS) の産生を亢進し、リン酸化カスケードを活性化することによって NF- $\kappa$ B の活性化をもたらす。NF- $\kappa$ B は PCAF や p300/CBP によるアセチル化を受け、TNF- $\alpha$  などの標的遺伝子上に結合し、ヒストンのアセチル化を促進する[149]。さらに NF- $\kappa$ B は、炎症やアテローム形成において、スーパーエンハンサーと呼ばれる転写活性を増大させる集合体を転写開始点上流に構築することも報告されている[152]。Brd4 は NF- $\kappa$ B と共活性化することによって転写活性化に働くことも報告されていることから[153]、これら転写因子と Brd4 の相互作用についても検討する必要がある。

第 1 章第 2 節における検討では、OLETF ラットにおける食後高血糖の繰り返しは、空腹時の末梢血白血球における炎症関連遺伝子の発現レベルを徐々に上昇させることが明らかとなった。この結果および本節で得られた結果をふまえると、血中の末梢血白血球の半減期は数日と短いものの、繰り返される食後高血糖の刺激が、末梢血白血球における炎症関連遺伝子のある領域上にヒストン修飾として記憶・蓄積されることによって、炎症関連遺伝子の継続的な発現や次の刺激受容時における遺伝子発現応

答の増大幅の変化をもたらすことが考えられた。それゆえ、これらの遺伝子上への記憶・蓄積が日々の生活習慣の中で行われることによって、2型糖尿病の発症に繋がる可能性が考えられる。しかしながら、ヒト単球様 THP-1 細胞は癌細胞由来の高増殖性を有した細胞であるため、増殖性が低い正常な生体の単球細胞とは異なることに留意しなければならない。今回、24 時間高グルコース培地で培養した直後の細胞では、炎症関連遺伝子の発現増大はみられなかった。これは細胞が高増殖性を有していたために、増殖期に高グルコースの刺激が入っても、即座に遺伝子発現が起こらなかったことが一因であると考えられる。Brd4 は、細胞増殖期においてヒストン修飾状態を維持し、クロマチンの状態を保存する機能を持つことが報告されている[154]。そのため、細胞分裂期もしくは細胞分裂期直前の細胞では、高グルコースの情報は Brd4 によって受容された可能性も考えられた。しかしながら、ヒストン H3 のアセチル化修飾量は、24 時間の高グルコース曝露では増大していなかったため、高グルコースの情報が Brd4 によるヒストンのアセチル化修飾の維持として受容されていたとは、今回の結果からは考えにくい。近年、グルコースの刺激は、転写関連因子の O-GlcNAc 修飾を促進することによって、転写を活性化する機構が存在する可能性が示唆されている[155]。今回の高グルコース刺激による炎症関連遺伝子の発現増大も、このような O-GlcNAc 修飾を介している可能性が考えられる。よって今後は、高グルコース刺激が Brd4 等への O-GlcNAc 修飾を介して、ヒストンのアセチル化修飾を増大させることによって、炎症関連遺伝子の発現を誘導するかを調べる必要があると考えられる。またヒトでは、24 時間の間に、食事の度毎に通常 3 回の食後高血糖が起こるため、今回行った 24 時間の高グルコース曝露による変化を、生体内における生理的な現象に還元することは難しいということも考慮する必要がある。それゆえ今後は、食後高血糖による末梢白血球におけるこれらエピゲノムの変化を、2型糖尿病モデル動物や2型糖尿病患者を対象として検討する必要がある。

結論として、本節における検討によって、ヒト単球様 THP-1 細胞における短期高グルコース曝露は、ヒストンコードを介して炎症関連遺伝子の発現持続をもたらし、炎症の慢性化に関与する可能性があることが示唆された。

### 第3章 総括

本章では、DNA の塩基配列の変化を伴わずに遺伝子発現の変動をもたらすエピゲノム情報（ヒストン修飾およびヒストン認識結合ドメインタンパク質 Brd4）が、食後高血糖の刺激によって炎症関連遺伝子上に蓄積し、遺伝子発現の増大および維持をもたらすという仮説を検証した。

本章第1節では、高グルコース刺激が、白血球における炎症関連遺伝子の発現維持をもたらすかを調べるために、ヒト単球様 THP-1 細胞に対して 24 時間の高グルコース刺激を与え、その後低グルコース環境に戻してから 2 日後における炎症関連遺伝子の発現量を調べた。その結果、高グルコース環境に 24 時間曝露した細胞では、低グルコース培地に戻した後も、TNF- $\alpha$  などの炎症関連遺伝子の発現が、高グルコース環境で培養した細胞と同レベルに維持されることが明らかとなった。

本章第2節では、ヒト単球様 THP-1 細胞に対する 24 時間の高グルコース曝露による TNF- $\alpha$  等の炎症関連遺伝子の発現増大が、その後低グルコース環境に戻しても維持されるかを調べた。さらにその発現増大にヒストンアセチル化修飾等が関与するかをクロマチン免疫沈降法（ChIP アッセイ）にて検討した。また、高グルコース曝露時に、アセチル化ヒストン-Brd4 特異的結合阻害剤である(+)-JQ1 を共投与し、Brd4 のアセチル化ヒストンへの結合の阻害が、これら炎症関連遺伝子の発現に関与するかを調べた。その結果、高グルコース環境に 24 時間曝露した細胞では、TNF- $\alpha$  遺伝子の発現増大に伴い、その遺伝子周辺のヒストンのアセチル化修飾の増大が、低グルコース培地に変更後 4 日目まで維持されていた。さらに、アセチル化したヒストンに結合し転写伸長効率を増大させるエピゲノム因子 Brd4 および RNA ポリメラーゼ II の TNF- $\alpha$  遺伝子周辺への結合も維持されていた。一方、高グルコース培地に曝露する際に Brd4-アセチル化ヒストン結合阻害剤(+)-JQ1 を添加すると、ヒストンアセチル化修飾、Brd4 ならびに RNA ポリメラーゼ II の結合量の増大が抑制されるとともに、TNF- $\alpha$  遺伝子の発現増大が抑制されることが示された。

本章の結論として、ヒト単球様 THP-1 細胞における短期高グルコース曝露による炎症関連遺伝子の発現持続には、ヒストンアセチル化修飾およびエピゲノム因子 Brd4 が関与することが示唆された。



## おわりに

食後高血糖は白血球を活性化し、炎症性サイトカインおよび細胞接着分子などの心血管疾患（CVD）発症リスク因子の発現を増大させることによって炎症を促進し、2型糖尿病およびCVDの発症・進展をもたらすと考えられる。しかしながら、食後高血糖の抑制により炎症が低減されるかは明らかではなく、さらに食後高血糖の繰り返しによって慢性的な炎症が引き起こされ、2型糖尿病発症に至る分子機構はわかっていなかった。そこで本論文では、食後高血糖の抑制によって炎症が低減され、2型糖尿病の発症・進展が抑制されるかを、2型糖尿病モデル OLETF ラット（第1章）および2型糖尿病患者（第2章）において検討した。さらに第3章では、食後高血糖の履歴が、細胞にどのような分子機構によって記憶・蓄積され、炎症の慢性化をもたらすのかを明らかにするため、ヒト単球様 THP-1 細胞を用いて、高グルコース刺激による炎症関連遺伝子の発現増大に対するエピゲノム情報の関与について検証した。

第1章では、2型糖尿病モデル OLETF ラットを用いて、食後高血糖の抑制によって炎症リスクが低減されるかを検討した。まず、単回の食後高血糖がCVD発症リスク因子の発現増大をもたらすかを調べるために、OLETF ラットに対して経口糖負荷試験を行った。その結果、糖負荷後において、末梢血白血球における IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  等のCVDに関連する遺伝子の発現が増大した。それらの発現増大は、 $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害剤ミグリトール、DPP-4 阻害剤アナグリプチンの経口投与のいずれでも、食後の血糖レベルを低下させることによって抑制された。次に、長期の食後高血糖の抑制が炎症の慢性化を低減するかを調べるため、ミグリトールまたはアナグリプチンを添加した高スクロース食をOLETF ラットに47週間摂食させた。その結果、空腹時の末梢血白血球における IL-1 $\beta$  および TNF- $\alpha$  の mRNA 発現量が、コントロール群と比較してミグリトールやアナグリプチン添加群で有意に低下した。さらに、ミグリトールやアナグリプチンを添加した群では、下大動脈組織における細胞接着分子（E-selectin、ICAM-1）の遺伝子発現量およびこれらの血中における可溶性タンパク質量も同様に減少することが明らかとなった。さらに、食後血糖の上昇に伴う動脈組織における細胞接着分子の発現増大に、血管のコラーゲン基質のプロテアーゼである好中球エラスターゼによる動脈血管の内皮障害が関与するかを調べるため、好中球エラスターゼの活性阻害剤を食後高血糖モデル動物に対して投与したところ、動脈組織における E-selectin、TNF- $\alpha$  等のCVDの発症に関与する因子の遺伝子発現が有意に低下した。第1章の結果から、2型糖尿病モデル OLETF ラットにおける食後高血糖の抑制は、末梢血白血球における炎症性サイトカインおよび動脈組織における細胞接着分子の発現増大を抑制し、炎症リスクを低減することが考えられた。

第2章では、2型糖尿病患者において、食後高血糖抑制により炎症リスクが低減されるかを検討した。 $\alpha$ -GI ミグリトールまたは DPP-4 阻害薬シタグリプチンの単剤処方による治療で血糖管理が不良と判断された2型糖尿病患者を対象とし、両薬剤の併

用療法を行ったところ、食後血糖上昇が抑制されるとともに、末梢血白血球における炎症関連遺伝子の発現、ならびに動脈血における可溶性 E-selectin 等のタンパク質濃度が低下した。また、1日1回処方薬である DPP-4 阻害薬シタグリプチンによる治療で効果が不十分と判断された2型糖尿病患者において、薬剤を1日2回処方のビルダグリプチンに変更したところ、血糖値の日内変動幅が減少するとともに、空腹時の末梢血白血球における IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  等の CVD の発症に関与する因子の遺伝子発現が低下した。第2章の結果から、2型糖尿病患者における血糖振幅の抑制は、末梢血白血球における炎症関連遺伝子の発現を抑制し、CVD の発症リスクを低下させる可能性が考えられた。

第3章では、ヒト単球様 THP-1 細胞を用いて、短期高グルコース曝露によるエピゲノムの蓄積を介した炎症関連遺伝子の発現増大機構を検討した。第1章および第2章の結果から、食後高血糖の繰り返しは炎症の慢性化をもたらし、2型糖尿病や CVD 等の合併症の発症・進展を促進する可能性が示唆された。さらに食後高血糖の繰り返しは、空腹時においても炎症関連遺伝子の発現レベルを維持させたことから、食後高血糖の情報を体内に蓄積する機構があることが示唆された。しかしながら、食後高血糖の刺激が、細胞にどのような分子機構によって記憶・蓄積され、炎症の慢性化をもたらすのかは明らかではなかった。そこで、食後高血糖の刺激がヒストン修飾として炎症関連遺伝子上に蓄積し、遺伝子発現の増大をもたらすという仮説を検証するため、まず、ヒト単球様 THP-1 細胞を24時間高グルコース (25 mM) 環境に曝露し、その後低グルコース (5 mM) 培地に戻して2日間培養し、回収した細胞における炎症関連遺伝子の発現を、低グルコースまたは高グルコース培地でそれぞれ3日間培養した細胞と比較した。その結果、高グルコース環境に短期間曝露した細胞では、低グルコース培地に戻してから2日後においても、IL-1 $\beta$  や TNF- $\alpha$  の遺伝子発現の増大が維持されることが明らかとなった。さらに、これら炎症関連遺伝子の発現維持に、エピジェネティックな調節機構が関与するかを調べるため、同様に高グルコース環境に短期間曝露した細胞を作製し、低グルコース培地に戻してから2日後および4日後における TNF- $\alpha$  遺伝子近傍のヒストンアセチル化修飾量等を測定した。その結果、高グルコース環境に24時間曝露した細胞では、炎症関連遺伝子の発現増大に伴い、TNF- $\alpha$  遺伝子周辺のヒストンのアセチル化修飾の増大が、低グルコース培地に変更後4日目まで維持されていた。さらに、アセチル化ヒストンに結合し転写伸長効率を増大させるエピゲノム因子 Brd4 の TNF- $\alpha$  遺伝子周辺への結合も維持されていた。一方、高グルコース培地に曝露する際に Brd4-アセチル化ヒストン結合阻害剤(+)-JQ1 を添加しておくこと、ヒストンアセチル化修飾や Brd4 の結合量の増大が抑制されるとともに、TNF- $\alpha$  遺伝子の発現増大が抑制されることが示された。第3章の結果から、ヒト単球様 THP-1 細胞における短期高グルコース曝露による炎症関連遺伝子の発現維持には、ヒストンアセチル化修飾およびエピゲノム因子 Brd4 が関与することが示唆された。

以上の結果をまとめると、2型糖尿病モデル動物および2型糖尿病患者における検討では、食後高血糖の抑制は、末梢血白血球や動脈組織における CVD 発症リスク因

子の発現抑制をもたらすことが明らかとなった。さらに、ヒト単球様 THP-1 細胞を用いた検討から、食後高血糖の履歴は、炎症関連遺伝子上のヒストンアセチル化修飾等のエピゲノムの蓄積を介して遺伝子の発現維持をもたらし、炎症の慢性化を促進することによって、2型糖尿病および CVD 等の合併症の発症・進展を導く可能性があることが示唆された。

## 引用文献

1. 厚生労働省. 患者調査. [http://www.mhlw.go.jp/toukei/list/10-20-kekka\\_gaiyou.html](http://www.mhlw.go.jp/toukei/list/10-20-kekka_gaiyou.html), (2015).
2. 厚生労働省. 国民健康・栄養調査. [http://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/kenkou\\_eiy\\_ou\\_chousa.html](http://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/kenkou_eiy_ou_chousa.html), (2013).
3. Bonora, E.: Postprandial peaks as a risk factor for cardiovascular disease: Epidemiological perspectives. *International Journal of Clinical Practice*, 5-11 (2002).
4. Tominaga, M., Eguchi, H., Manaka, H., Igarashi, K., Kato, T., and Sekikawa, A.: Impaired glucose tolerance is a risk factor for cardiovascular disease, but not impaired fasting glucose. The Funagata Diabetes Study. *Diabetes Care*, **22**, 920-924 (1999).
5. Yu, P. C., Bosnyak, Z., and Ceriello, A.: The importance of glycated haemoglobin (HbA(1c)) and postprandial glucose (PPG) control on cardiovascular outcomes in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Research and Clinical Practice*, **89**, 1-9 (2010).
6. DECODE Study Group, t. E. D. E. G.: Glucose tolerance and cardiovascular mortality: comparison of fasting and 2-hour diagnostic criteria. *Arch Intern Med*, **161**, 397-405 (2001).
7. Nakagami, T., Qiao, Q., Tuomilehto, J., Balkau, B., Tajima, N., Hu, G., and Borch-Johnsen, K.: Screen-detected diabetes, hypertension and hypercholesterolemia as predictors of cardiovascular mortality in five populations of Asian origin: the DECODA study. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil*, **13**, 555-561 (2006).
8. Chiasson, J. L., Josse, R. G., Gomis, R., Hanefeld, M., Karasik, A., and Laakso, M.: Acarbose for prevention of type 2 diabetes mellitus: the STOP-NIDDM randomised trial. *Lancet*, **359**, 2072-2077 (2002).
9. Chiasson, J. L., Josse, R. G., Gomis, R., Hanefeld, M., Karasik, A., and Laakso, M.: Acarbose treatment and the risk of cardiovascular disease and hypertension in patients with impaired glucose tolerance: the STOP-NIDDM trial. *JAMA*, **290**, 486-494 (2003).
10. Zeymer, U., Schwarzmaier-D'assie, A., Petzinna, D., and Chiasson, J. L.: Effect of acarbose treatment on the risk of silent myocardial infarctions in patients with impaired glucose tolerance: results of the randomised STOP-NIDDM trial electrocardiography substudy. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil*, **11**, 412-415 (2004).
11. Hanefeld, M., Cagatay, M., Petrowitsch, T., Neuser, D., Petzinna, D., and Rupp, M.: Acarbose reduces the risk for myocardial infarction in type 2 diabetic patients: meta-analysis of seven long-term studies. *Eur Heart J*, **25**, 10-16 (2004).
12. Niedowicz, D. M., and Daleke, D. L.: The role of oxidative stress in diabetic complications. *Cell Biochem Biophys*, **43**, 289-330 (2005).

13. Ginn-Pease, M. E., and Whisler, R. L.: Redox signals and NF-kappaB activation in T cells. *Free Radic Biol Med*, **25**, 346-361 (1998).
14. Haddad, J. J.: Redox regulation of pro-inflammatory cytokines and IkappaB-alpha/NF-kappaB nuclear translocation and activation. *Biochem Biophys Res Commun*, **296**, 847-856 (2002).
15. Shoelson, S. E., Lee, J., and Goldfine, A. B.: Inflammation and insulin resistance. *J Clin Invest*, **116**, 1793-1801 (2006).
16. Hui, H., Dotta, F., Di Mario, U., and Perfetti, R.: Role of caspases in the regulation of apoptotic pancreatic islet beta-cells death. *J Cell Physiol*, **200**, 177-200 (2004).
17. Jorns, A., Gunther, A., Hedrich, H. J., Wedekind, D., Tiedge, M., and Lenzen, S.: Immune cell infiltration, cytokine expression, and beta-cell apoptosis during the development of type 1 diabetes in the spontaneously diabetic LEW.1AR1/Ztm-iddm rat. *Diabetes*, **54**, 2041-2052 (2005).
18. Montolio, M., Biarnes, M., Tellez, N., Escoriza, J., Soler, J., and Montanya, E.: Interleukin-1beta and inducible form of nitric oxide synthase expression in early syngeneic islet transplantation. *J Endocrinol*, **192**, 169-177 (2007).
19. Hoge, M., and Amar, S.: Role of interleukin-1 in bacterial atherogenesis. *Drugs Today (Barc)*, **42**, 683-688 (2006).
20. Mahmoudi, M., Curzen, N., and Gallagher, P. J.: Atherogenesis: the role of inflammation and infection. *Histopathology*, **50**, 535-546 (2007).
21. Spranger, J., Kroke, A., Mohlig, M., Hoffmann, K., Bergmann, M. M., Ristow, M., Boeing, H., and Pfeiffer, A. F.: Inflammatory cytokines and the risk to develop type 2 diabetes: results of the prospective population-based European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Potsdam Study. *Diabetes*, **52**, 812-817 (2003).
22. Matsushita, K., Yatsuya, H., Tamakoshi, K., Wada, K., Otsuka, R., Takefuji, S., Sugiura, K., Kondo, T., Murohara, T., and Toyoshima, H.: Comparison of circulating adiponectin and proinflammatory markers regarding their association with metabolic syndrome in Japanese men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **26**, 871-876 (2006).
23. Misaki, Y., Miyauchi, R., Mochizuki, K., Takabe, S., Shimada, M., Ichikawa, Y., and Goda, T.: Plasma interleukin-1beta concentrations are closely associated with fasting blood glucose levels in healthy and preclinical middle-aged nonoverweight and overweight Japanese men. *Metabolism*, **59**, 1465-1471 (2010).
24. Kadl, A., and Leitinger, N.: The role of endothelial cells in the resolution of acute inflammation. *Antioxid Redox Signal*, **7**, 1744-1754 (2005).
25. Blake, G. J., and Ridker, P. M.: Novel clinical markers of vascular wall inflammation. *Circ Res*, **89**, 763-771 (2001).
26. Smith, C. W.: Endothelial Adhesion Molecules and Their Role in Inflammation.

- Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, **71**, 76-87 (1993).
27. Peschel, T., and Niebauer, J.: Role of pro-atherogenic adhesion molecules and inflammatory cytokines in patients with coronary artery disease and diabetes mellitus type 2. *Cytometry B Clin Cytom*, **53**, 78-85 (2003).
  28. Lucchesi, B. R.: Modulation of leukocyte-mediated myocardial reperfusion injury. *Annu Rev Physiol*, **52**, 561-576 (1990).
  29. Kowalska, I., Straczkowski, M., Szelachowska, M., Kinalska, I., Prokop, J., Bachorzewska-Gajewska, H., and Stepień, A.: Circulating E-selectin, vascular cell adhesion molecule-1, and intercellular adhesion molecule-1 in men with coronary artery disease assessed by angiography and disturbances of carbohydrate metabolism. *Metabolism*, **51**, 733-736 (2002).
  30. Matsumoto, K., Sera, Y., Nakamura, H., Ueki, Y., and Miyake, S.: Serum concentrations of soluble adhesion molecules are related to degree of hyperglycemia and insulin resistance in patients with type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract*, **55**, 131-138 (2002).
  31. Matsumoto, K., Fujishima, K., Moriuchi, A., Saishoji, H., and Ueki, Y.: Soluble adhesion molecule E-selectin predicts cardiovascular events in Japanese patients with type 2 diabetes mellitus. *Metabolism*, **59**, 320-324 (2010).
  32. Bluher, M., Unger, R., Rassoul, F., Richter, V., and Paschke, R.: Relation between glycaemic control, hyperinsulinaemia and plasma concentrations of soluble adhesion molecules in patients with impaired glucose tolerance or Type II diabetes. *Diabetologia*, **45**, 210-216 (2002).
  33. Van de Laar, F. A., Lucassen, P. L., Akkermans, R. P., Van de Lisdonk, E. H., Rutten, G. E., and Van Weel, C.: Alpha-glucosidase inhibitors for type 2 diabetes mellitus. *Cochrane Database Syst Rev*, CD003639 (2005).
  34. Goda, T., Suruga, K., Komori, A., Kuranuki, S., Mochizuki, K., Makita, Y., and Kumazawa, T.: Effects of miglitol, an alpha-glucosidase inhibitor, on glycaemic status and histopathological changes in islets in non-obese, non-insulin-dependent diabetic Goto-Kakizaki rats. *Br J Nutr*, **98**, 702-710 (2007).
  35. Fukaya, N., Mochizuki, K., Tanaka, Y., Kumazawa, T., Jiuxin, Z., Fuchigami, M., and Goda, T.: The alpha-glucosidase inhibitor miglitol delays the development of diabetes and dysfunctional insulin secretion in pancreatic beta-cells in OLETF rats. *Eur J Pharmacol*, **624**, 51-57 (2009).
  36. Chia, C. W., and Egan, J. M.: Incretin-based therapies in type 2 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab*, **93**, 3703-3716 (2008).
  37. Jung, H. S.: Clinical Implications of Glucose Variability: Chronic Complications of Diabetes. *Endocrinol Metab (Seoul)*, **30**, 167-174 (2015).
  38. Muoio, D. M., and Newgard, C. B.: Mechanisms of disease: molecular and metabolic

- mechanisms of insulin resistance and beta-cell failure in type 2 diabetes. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **9**, 193-205 (2008).
39. 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., and Kadowaki, T.: Impaired insulin signaling in endothelial cells reduces insulin-induced glucose uptake by skeletal muscle. *Cell Metab*, **13**, 294-307 (2011).
  40. Balletshofer, B. M., Rittig, K., Enderle, M. D., Volk, A., Maerker, E., Jacob, S., Matthaehi, S., Rett, K., and Haring, H. U.: Endothelial dysfunction is detectable in young normotensive first-degree relatives of subjects with type 2 diabetes in association with insulin resistance. *Circulation*, **101**, 1780-1784 (2000).
  41. Bruun, J. M., Stallknecht, B., Helge, J. W., and Richelsen, B.: Interleukin-18 in plasma and adipose tissue: effects of obesity, insulin resistance, and weight loss. *Eur J Endocrinol*, **157**, 465-471 (2007).
  42. Tanaka, Y., Mochizuki, K., Fukaya, N., Shimada, M., and Goda, T.: The alpha-glucosidase inhibitor miglitol suppresses postprandial hyperglycaemia and interleukin-1beta and tumour necrosis factor-alpha gene expression in rat peripheral leucocytes induced by intermittent sucrose loading. *Br J Nutr*, **102**, 221-225 (2009).
  43. Furman, B., Ong, W. K., and Pyne, N. J.: Cyclic AMP signaling in pancreatic islets. *Adv Exp Med Biol*, **654**, 281-304 (2010).
  44. Fujimoto, W., Miki, T., Ogura, T., Zhang, M., Seino, Y., Satin, L. S., Nakaya, H., and Seino, S.: Niflumic acid-sensitive ion channels play an important role in the induction of glucose-stimulated insulin secretion by cyclic AMP in mice. *Diabetologia*, **52**, 863-872 (2009).
  45. Drucker, D. J., and Nauck, M. A.: The incretin system: glucagon-like peptide-1 receptor agonists and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in type 2 diabetes. *Lancet*, **368**, 1696-1705 (2006).
  46. Baggio, L. L., and Drucker, D. J.: Biology of incretins: GLP-1 and GIP. *Gastroenterology*, **132**, 2131-2157 (2007).
  47. Mudaliar, S., and Henry, R. R.: Effects of incretin hormones on beta-cell mass and function, body weight, and hepatic and myocardial function. *Am J Med*, **123**, S19-27 (2010).
  48. Drucker, D. J.: Therapeutic potential of dipeptidyl peptidase IV inhibitors for the treatment of type 2 diabetes. *Expert Opin Investig Drugs*, **12**, 87-100 (2003).
  49. Livak, K. J., and Schmittgen, T. D.: Analysis of relative gene expression data using

- real-time quantitative PCR and the 2(T)(-Delta Delta C) method. *Methods*, **25**, 402-408 (2001).
50. Dinarello, C. A.: Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood*, **87**, 2095-2147 (1996).
  51. Bradley, J. R.: TNF-mediated inflammatory disease. *J Pathol*, **214**, 149-160 (2008).
  52. Ehlermann, P., Eggers, K., Bierhaus, A., Most, P., Weichenhan, D., Greten, J., Nawroth, P. P., Katus, H. A., and Remppis, A.: Increased proinflammatory endothelial response to S100A8/A9 after preactivation through advanced glycation end products. *Cardiovasc Diabetol*, **5**, 6 (2006).
  53. Foell, D., Wittkowski, H., Vogl, T., and Roth, J.: S100 proteins expressed in phagocytes: a novel group of damage-associated molecular pattern molecules. *J Leukoc Biol*, **81**, 28-37 (2007).
  54. Schiopu, A., and Cotoi, O. S.: S100A8 and S100A9: DAMPs at the crossroads between innate immunity, traditional risk factors, and cardiovascular disease. *Mediators Inflamm*, **2013**, 828354 (2013).
  55. Bouma, G., Lam-Tse, W. K., Wierenga-Wolf, A. F., Drexhage, H. A., and Versnel, M. A.: Increased serum levels of MRP-8/14 in type 1 diabetes induce an increased expression of CD11b and an enhanced adhesion of circulating monocytes to fibronectin. *Diabetes*, **53**, 1979-1986 (2004).
  56. Bouma, G., Coppens, J. M., Lam-Tse, W. K., Luini, W., Sintnicolaas, K., Levering, W. H., Sozzani, S., Drexhage, H. A., and Versnel, M. A.: An increased MRP8/14 expression and adhesion, but a decreased migration towards proinflammatory chemokines of type 1 diabetes monocytes. *Clin Exp Immunol*, **141**, 509-517 (2005).
  57. Sunahori, K., Yamamura, M., Yamana, J., Takasugi, K., Kawashima, M., Yamamoto, H., Chazin, W. J., Nakatani, Y., Yui, S., and Makino, H.: The S100A8/A9 heterodimer amplifies proinflammatory cytokine production by macrophages via activation of nuclear factor kappa B and p38 mitogen-activated protein kinase in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*, **8**, R69 (2006).
  58. Steinkasserer, A., Spurr, N. K., Cox, S., Jeggo, P., and Sim, R. B.: The human IL-1 receptor antagonist gene (IL1RN) maps to chromosome 2q14-q21, in the region of the IL-1 alpha and IL-1 beta loci. *Genomics*, **13**, 654-657 (1992).
  59. Fukaya, N., Mochizuki, K., Shimada, M., and Goda, T.: The alpha-glucosidase inhibitor miglitol decreases glucose fluctuations and gene expression of inflammatory cytokines induced by hyperglycemia in peripheral leukocytes. *Nutrition*, **25**, 657-667 (2009).
  60. Moran, T. H., and Bi, S.: Hyperphagia and obesity in OLETF rats lacking CCK-1 receptors. *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences*, **361**, 1211-1218 (2006).



61. Wajchenberg, B. L.: Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome. *Endocr Rev*, **21**, 697-738 (2000).
62. Perrini, S., Leonardini, A., Laviola, L., and Giorgino, F.: Biological specificity of visceral adipose tissue and therapeutic intervention. *Arch Physiol Biochem*, **114**, 277-286 (2008).
63. Mochizuki, K., Fukaya, N., Tanaka, Y., Fuchigami, M., and Goda, T.: Treatment with the alpha-glucosidase inhibitor miglitol from the preonset stage in Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty rats improves glycemic control and reduces the expression of inflammatory cytokine genes in peripheral leukocytes. *Metabolism*, **60**, 1560-1565 (2011).
64. Osonoi, T., Saito, M., Mochizuki, K., Fukaya, N., Muramatsu, T., Inoue, S., Fuchigami, M., and Goda, T.: The alpha-glucosidase inhibitor miglitol decreases glucose fluctuations and inflammatory cytokine gene expression in peripheral leukocytes of Japanese patients with type 2 diabetes mellitus. *Metabolism*, **59**, 1816-1822 (2010).
65. Chomczynski, P., and Sacchi, N.: Single-Step Method of Rna Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate Phenol Chloroform Extraction. *Analytical Biochemistry*, **162**, 156-159 (1987).
66. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, **193**, 265-275 (1951).
67. Kusunoki, M., Sato, D., Nakamura, T., Oshida, Y., Tsutsui, H., Natsume, Y., Tsutsumi, K., and Miyata, T.: DPP-4 Inhibitor Teneligliptin Improves Insulin Resistance and Serum Lipid Profile in Japanese Patients with Type 2 Diabetes. *Drug Res (Stuttg)*, **65**, 532-534 (2014).
68. Nakaya, K., Kubota, N., Takamoto, I., Kubota, T., Katsuyama, H., Sato, H., Tokuyama, K., Hashimoto, S., Goto, M., Jomori, T., Ueki, K., and Kadowaki, T.: Dipeptidyl peptidase-4 inhibitor anagliptin ameliorates diabetes in mice with haploinsufficiency of glucokinase on a high-fat diet. *Metabolism*, **62**, 939-951 (2013).
69. Abbassi, O., Kishimoto, T. K., McIntire, L. V., Anderson, D. C., and Smith, C. W.: E-selectin supports neutrophil rolling in vitro under conditions of flow. *J Clin Invest*, **92**, 2719-2730 (1993).
70. Kadono, T.: [The role of adhesion molecules in cutaneous inflammation]. *Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi*, **33**, 242-248 (2010).
71. Astarci, E., Sade, A., Cimen, I., Savas, B., and Banerjee, S.: The NF-kappaB target genes ICAM-1 and VCAM-1 are differentially regulated during spontaneous differentiation of Caco-2 cells. *FEBS J*, **279**, 2966-2986 (2012).
72. Ussher, J. R., and Drucker, D. J.: Cardiovascular biology of the incretin system. *Endocr Rev*, **33**, 187-215 (2013).
73. Marchesini, G., Brizi, M., Morselli-Labate, A. M., Bianchi, G., Bugianesi, E.,

- McCullough, A. J., Forlani, G., and Melchionda, N.: Association of nonalcoholic fatty liver disease with insulin resistance. *Am J Med*, **107**, 450-455 (1999).
74. Li, P., Lu, M., Nguyen, M. T., Bae, E. J., Chapman, J., Feng, D., Hawkins, M., Pessin, J. E., Sears, D. D., Nguyen, A. K., Amidi, A., Watkins, S. M., Nguyen, U., and Olefsky, J. M.: Functional heterogeneity of CD11c-positive adipose tissue macrophages in diet-induced obese mice. *J Biol Chem*, **285**, 15333-15345 (2010).
75. Lumeng, C. N., Bodzin, J. L., and Saltiel, A. R.: Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J Clin Invest*, **117**, 175-184 (2007).
76. Capurso, C., and Capurso, A.: From excess adiposity to insulin resistance: the role of free fatty acids. *Vascul Pharmacol*, **57**, 91-97 (2012).
77. Diaz-Gandarilla, J. A., Osorio-Trujillo, C., Hernandez-Ramirez, V. I., and Talamas-Rohana, P.: PPAR activation induces M1 macrophage polarization via cPLA(2)-COX-2 inhibition, activating ROS production against *Leishmania mexicana*. *Biomed Res Int*, **2013**, 215283 (2013).
78. Ramadori, G., and Armbrust, T.: Cytokines in the liver. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, **13**, 777-784 (2001).
79. Rivera, C. A., Adegboyega, P., van Rooijen, N., Tagalicud, A., Allman, M., and Wallace, M.: Toll-like receptor-4 signaling and Kupffer cells play pivotal roles in the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis. *J Hepatol*, **47**, 571-579 (2007).
80. Patsouris, D., Li, P. P., Thapar, D., Chapman, J., Olefsky, J. M., and Neels, J. G.: Ablation of CD11c-positive cells normalizes insulin sensitivity in obese insulin resistant animals. *Cell Metab*, **8**, 301-309 (2008).
81. Itoh, M., Kato, H., Suganami, T., Konuma, K., Marumoto, Y., Terai, S., Sakugawa, H., Kanai, S., Hamaguchi, M., Fukaiishi, T., Aoe, S., Akiyoshi, K., Komohara, Y., Takeya, M., Sakaida, I., and Ogawa, Y.: Hepatic crown-like structure: a unique histological feature in non-alcoholic steatohepatitis in mice and humans. *PLoS One*, **8**, e82163 (2013).
82. Lumeng, C. N., DelProposto, J. B., Westcott, D. J., and Saltiel, A. R.: Phenotypic switching of adipose tissue macrophages with obesity is generated by spatiotemporal differences in macrophage subtypes. *Diabetes*, **57**, 3239-3246 (2008).
83. Negrin, K. A., Roth Flach, R. J., DiStefano, M. T., Matevossian, A., Friedline, R. H., Jung, D., Kim, J. K., and Czech, M. P.: IL-1 signaling in obesity-induced hepatic lipogenesis and steatosis. *PLoS One*, **9**, e107265 (2014).
84. Kubota, T., Kubota, N., Moroi, M., Terauchi, Y., Kobayashi, T., Kamata, K., Suzuki, R., Tobe, K., Namiki, A., Aizawa, S., Nagai, R., Kadowaki, T., and Yamaguchi, T.: Lack of insulin receptor substrate-2 causes progressive neointima formation in response to vessel injury. *Circulation*, **107**, 3073-3080 (2003).
85. Ishii, T., Doi, K., Okamoto, K., Imamura, M., Dohi, M., Yamamoto, K., Fujita, T., and

- Noiri, E.: Neutrophil elastase contributes to acute lung injury induced by bilateral nephrectomy. *Am J Pathol*, **177**, 1665-1673 (2010).
86. Weiss, S. J.: Tissue destruction by neutrophils. *N Engl J Med*, **320**, 365-376 (1989).
87. Talukdar, S., Oh da, Y., Bandyopadhyay, G., Li, D., Xu, J., McNelis, J., Lu, M., Li, P., Yan, Q., Zhu, Y., Ofrecio, J., Lin, M., Brenner, M. B., and Olefsky, J. M.: Neutrophils mediate insulin resistance in mice fed a high-fat diet through secreted elastase. *Nat Med*, **18**, 1407-1412 (2012).
88. Mansuy-Aubert, V., Zhou, Q. L., Xie, X., Gong, Z., Huang, J. Y., Khan, A. R., Aubert, G., Candelaria, K., Thomas, S., Shin, D. J., Booth, S., Baig, S. M., Bilal, A., Hwang, D., Zhang, H., Lovell-Badge, R., Smith, S. R., Awan, F. R., and Jiang, Z. Y.: Imbalance between neutrophil elastase and its inhibitor alpha1-antitrypsin in obesity alters insulin sensitivity, inflammation, and energy expenditure. *Cell Metab*, **17**, 534-548 (2013).
89. Gearing, A. J., and Newman, W.: Circulating adhesion molecules in disease. *Immunol Today*, **14**, 506-512 (1993).
90. Vilsboll, T.: The effects of glucagon-like peptide-1 on the beta cell. *Diabetes Obes Metab*, **11 Suppl 3**, 11-18 (2009).
91. Mu, J., Petrov, A., Eiermann, G. J., Woods, J., Zhou, Y. P., Li, Z., Zycband, E., Feng, Y., Zhu, L., Roy, R. S., Howard, A. D., Li, C., Thornberry, N. A., and Zhang, B. B.: Inhibition of DPP-4 with sitagliptin improves glycemic control and restores islet cell mass and function in a rodent model of type 2 diabetes. *Eur J Pharmacol*, **623**, 148-154 (2009).
92. Aoki, K., Masuda, K., Miyazaki, T., Togashi, Y., and Terauchi, Y.: Effects of miglitol, sitagliptin or their combination on plasma glucose, insulin and incretin levels in non-diabetic men. *Endocr J*, **57**, 667-672 (2010).
93. Sasaki, S., and Inoguchi, T.: The role of oxidative stress in the pathogenesis of diabetic vascular complications. *Diabetes Metab J*, **36**, 255-261 (2012).
94. Bartzeliotou, A. I., Margeli, A. P., Tsironi, M., Skenderi, K., Bacoula, C., Chrousos, G. P., and Papassotiropoulos, I.: Circulating levels of adhesion molecules and markers of endothelial activation in acute inflammation induced by prolonged brisk exercise. *Clin Biochem*, **40**, 765-770 (2007).
95. Demerath, E., Towne, B., Blangero, J., and Siervogel, R. M.: The relationship of soluble ICAM-1, VCAM-1, P-selectin and E-selectin to cardiovascular disease risk factors in healthy men and women. *Ann Hum Biol*, **28**, 664-678 (2001).
96. Hattori, H., Sato, H., Ito, D., Tanahashi, N., Murata, M., Saito, I., Watanabe, K., and Suzuki, N.: A561C polymorphism of E-selectin is associated with ischemic cerebrovascular disease in the Japanese population without diabetes mellitus and hypercholesterolemia. *Brain Res*, **1108**, 221-223 (2006).

97. Soedamah-Muthu, S. S., Chaturvedi, N., Schalkwijk, C. G., Stehouwer, C. D., Ebeling, P., and Fuller, J. H.: Soluble vascular cell adhesion molecule-1 and soluble E-selectin are associated with micro- and macrovascular complications in Type 1 diabetic patients. *J Diabetes Complications*, **20**, 188-195 (2006).
98. Service, F. J., Molnar, G. D., Rosevear, J. W., Ackerman, E., Gatewood, L. C., and Taylor, W. F.: Mean amplitude of glycemic excursions, a measure of diabetic instability. *Diabetes*, **19**, 644-655 (1970).
99. Miyachi, A., Murase, T., Yamada, Y., Osonoi, T., and Harada, K.: Quantitative analytical method for determining the levels of gastric inhibitory polypeptides GIP1-42 and GIP3-42 in human plasma using LC-MS/MS/MS. *J Proteome Res*, **12**, 2690-2699 (2013).
100. Kishimoto, M., and Noda, M.: A pilot study of the efficacy of miglitol and sitagliptin for type 2 diabetes with a continuous glucose monitoring system and incretin-related markers. *Cardiovasc Diabetol*, **10**, 115 (2011).
101. Kawasaki, T., Yamanouchi, T., Kashiwabara, A., Inoue, T., Yoshimura, T., Fujimori, S., Tanabe, T., and Aiso, Y.: The influence of traditional Chinese herbal drugs on serum 1, 5-anhydroglucitol levels. *Diabetes Res Clin Pract*, **50**, 97-101 (2000).
102. Zarowitz, B. J., and Conner, C.: The intersection of safety and adherence: new incretin-based therapies in patients with type 2 diabetes mellitus. *Pharmacotherapy*, **29**, 55S-67S (2009).
103. De Marinis, Y. Z., Salehi, A., Ward, C. E., Zhang, Q., Abdulkader, F., Bengtsson, M., Braha, O., Braun, M., Ramracheya, R., Amisten, S., Habib, A. M., Moritoh, Y., Zhang, E., Reimann, F., Rosengren, A. H., Shibasaki, T., Gribble, F., Renstrom, E., Seino, S., Eliasson, L., and Rorsman, P.: GLP-1 inhibits and adrenaline stimulates glucagon release by differential modulation of N- and L-type Ca<sup>2+</sup> channel-dependent exocytosis. *Cell Metab*, **11**, 543-553 (2010).
104. Kolterman, O. G., Buse, J. B., Fineman, M. S., Gaines, E., Heintz, S., Bicsak, T. A., Taylor, K., Kim, D., Aisporna, M., Wang, Y., and Baron, A. D.: Synthetic exendin-4 (exenatide) significantly reduces postprandial and fasting plasma glucose in subjects with type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*, **88**, 3082-3089 (2003).
105. Zerilli, T., and Pyon, E. Y.: Sitagliptin phosphate: a DPP-4 inhibitor for the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Clin Ther*, **29**, 2614-2634 (2007).
106. Narita, T., Katsuura, Y., Sato, T., Hosoba, M., Fujita, H., Morii, T., and Yamada, Y.: Miglitol induces prolonged and enhanced glucagon-like peptide-1 and reduced gastric inhibitory polypeptide responses after ingestion of a mixed meal in Japanese Type 2 diabetic patients. *Diabet Med*, **26**, 187-188 (2009).
107. Yip, R. G., and Wolfe, M. M.: GIP biology and fat metabolism. *Life Sci*, **66**, 91-103 (2000).

108. Caballero, A. E., Delgado, A., Aguilar-Salinas, C. A., Herrera, A. N., Castillo, J. L., Cabrera, T., Gomez-Perez, F. J., and Rull, J. A.: The differential effects of metformin on markers of endothelial activation and inflammation in subjects with impaired glucose tolerance: a placebo-controlled, randomized clinical trial. *J Clin Endocrinol Metab*, **89**, 3943-3948 (2004).
109. De Jager, J., Kooy, A., Lehert, P., Bets, D., Wulffele, M. G., Teerlink, T., Scheffer, P. G., Schalkwijk, C. G., Donker, A. J., and Stehouwer, C. D.: Effects of short-term treatment with metformin on markers of endothelial function and inflammatory activity in type 2 diabetes mellitus: a randomized, placebo-controlled trial. *J Intern Med*, **257**, 100-109 (2005).
110. Hemmingsen, B., Lund, S. S., Wetterslev, J., and Vaag, A.: Oral hypoglycaemic agents, insulin resistance and cardiovascular disease in patients with type 2 diabetes. *Eur J Endocrinol*, **161**, 1-9 (2009).
111. Uwaifo, G. I., and Ratner, R. E.: Differential effects of oral hypoglycemic agents on glucose control and cardiovascular risk. *Am J Cardiol*, **99**, 51B-67B (2007).
112. Risso, A., Mercuri, F., Quagliaro, L., Damante, G., and Ceriello, A.: Intermittent high glucose enhances apoptosis in human umbilical vein endothelial cells in culture. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **281**, E924-930 (2001).
113. Yin, X., Zheng, F., Pan, Q., Zhang, S., Yu, D., Xu, Z., and Li, H.: Glucose fluctuation increased hepatocyte apoptosis under lipotoxicity and the involvement of mitochondrial permeability transition opening. *J Mol Endocrinol*, **55**, 169-181 (2015).
114. Watada, H., Azuma, K., and Kawamori, R.: Glucose fluctuation on the progression of diabetic macroangiopathy--new findings from monocyte adhesion to endothelial cells. *Diabetes Res Clin Pract*, **77 Suppl 1**, S58-61 (2007).
115. Jiao, X. M., Zhang, X. G., Xu, X. U., Yi, C., Bin, C., Cheng, Q. P., Gong, Q. Q., and Lv, X. F.: Blood glucose fluctuation aggravates lower extremity vascular disease in type 2 diabetes. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, **18**, 2025-2030 (2014).
116. Zhang, X. G., Zhang, Y. Q., Zhao, D. K., Wu, J. X., Zhao, J., Jiao, X. M., Chen, B., and Lv, X. F.: Relationship between blood glucose fluctuation and macrovascular endothelial dysfunction in type 2 diabetic patients with coronary heart disease. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, **18**, 3593-3600 (2014).
117. Zhang, X., Xu, X., Jiao, X., Wu, J., Zhou, S., and Lv, X.: The effects of glucose fluctuation on the severity of coronary artery disease in type 2 diabetes mellitus. *J Diabetes Res*, **2013**, 576916 (2013).
118. Gerstein, H. C., Miller, M. E., Byington, R. P., Goff, D. C., Jr., Bigger, J. T., Buse, J. B., Cushman, W. C., Genuth, S., Ismail-Beigi, F., Grimm, R. H., Jr., Probstfield, J. L., Simons-Morton, D. G., and Friedewald, W. T.: Effects of intensive glucose lowering in type 2 diabetes. *N Engl J Med*, **358**, 2545-2559 (2008).

119. Takahara, M., Shiraiwa, T., Kaneto, H., Katakami, N., Matsuoka, T. A., and Shimomura, I.: Efficacy of sitagliptin on blood glucose fluctuation in Japanese type 2 diabetic patients with basal-supported oral therapy. *Endocr J*, **59**, 1131-1136 (2012).
120. Tajiri, Y., Tsuruta, M., Ohki, T., Kato, T., Sasaki, Y., Tanaka, K., Kono, S., Tojikubo, M., and Yamada, K.: Long-term efficacy of sitagliptin for the treatment of type 2 diabetic patients in Japan. *Endocr J*, **59**, 197-204 (2012).
121. Azcutia, V., Abu-Taha, M., Romacho, T., Vazquez-Bella, M., Matesanz, N., Luscinskas, F. W., Rodriguez-Manas, L., Sanz, M. J., Sanchez-Ferrer, C. F., and Peiro, C.: Inflammation determines the pro-adhesive properties of high extracellular d-glucose in human endothelial cells in vitro and rat microvessels in vivo. *PLoS One*, **5**, e10091 (2010).
122. Morigi, M., Angioletti, S., Imberti, B., Donadelli, R., Micheletti, G., Figliuzzi, M., Remuzzi, A., Zoja, C., and Remuzzi, G.: Leukocyte-endothelial interaction is augmented by high glucose concentrations and hyperglycemia in a NF-kB-dependent fashion. *J Clin Invest*, **101**, 1905-1915 (1998).
123. Luppi, P., Cifarelli, V., Tse, H., Piganelli, J., and Trucco, M.: Human C-peptide antagonises high glucose-induced endothelial dysfunction through the nuclear factor-kappaB pathway. *Diabetologia*, **51**, 1534-1543 (2008).
124. Lu, L., Zhang, Q., Pu, L. J., Xu, X. W., Zhang, R. Y., Zhang, J. S., Hu, J., Yang, Z. K., Lu, A. K., Ding, F. H., Shen, J., Chen, Q. J., Lou, S., Fang, D. H., and Shen, W. F.: Elevation of tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1beta and interleukin-6 levels in aortic intima of Chinese Guizhou minipigs with streptozotocin-induced diabetes. *Chin Med J (Engl)*, **120**, 479-484 (2007).
125. Wen, Y., Gu, J., Li, S. L., Reddy, M. A., Natarajan, R., and Nadler, J. L.: Elevated glucose and diabetes promote interleukin-12 cytokine gene expression in mouse macrophages. *Endocrinology*, **147**, 2518-2525 (2006).
126. Schneider, R., Bannister, A. J., Myers, F. A., Thorne, A. W., Crane-Robinson, C., and Kouzarides, T.: Histone H3 lysine 4 methylation patterns in higher eukaryotic genes. *Nat Cell Biol*, **6**, 73-77 (2004).
127. Schubeler, D., MacAlpine, D. M., Scalzo, D., Wirbelauer, C., Kooperberg, C., van Leeuwen, F., Gottschling, D. E., O'Neill, L. P., Turner, B. M., Delrow, J., Bell, S. P., and Groudine, M.: The histone modification pattern of active genes revealed through genome-wide chromatin analysis of a higher eukaryote. *Genes Dev*, **18**, 1263-1271 (2004).
128. Strahl, B. D., and Allis, C. D.: The language of covalent histone modifications. *Nature*, **403**, 41-45 (2000).
129. Mochizuki, K., Honma, K., Shimada, M., and Goda, T.: The regulation of jejunal induction of the maltase-glucoamylase gene by a high-starch/low-fat diet in mice. *Mol*

- Nutr Food Res*, **54**, 1445-1451 (2010).
130. Honma, K., Mochizuki, K., and Goda, T.: Carbohydrate/fat ratio in the diet alters histone acetylation on the sucrase-isomaltase gene and its expression in mouse small intestine. *Biochem Biophys Res Commun*, **357**, 1124-1129 (2007).
  131. Roh, T. Y., Ngau, W. C., Cui, K., Landsman, D., and Zhao, K.: High-resolution genome-wide mapping of histone modifications. *Nat Biotechnol*, **22**, 1013-1016 (2004).
  132. Roh, T. Y., Cuddapah, S., and Zhao, K.: Active chromatin domains are defined by acetylation islands revealed by genome-wide mapping. *Genes Dev*, **19**, 542-552 (2005).
  133. Dhalluin, C., Carlson, J. E., Zeng, L., He, C., Aggarwal, A. K., and Zhou, M. M.: Structure and ligand of a histone acetyltransferase bromodomain. *Nature*, **399**, 491-496 (1999).
  134. Hudson, B. P., Martinez-Yamout, M. A., Dyson, H. J., and Wright, P. E.: Solution structure and acetyl-lysine binding activity of the GCN5 bromodomain. *J Mol Biol*, **304**, 355-370 (2000).
  135. Mujtaba, S., He, Y., Zeng, L., Farooq, A., Carlson, J. E., Ott, M., Verdin, E., and Zhou, M. M.: Structural basis of lysine-acetylated HIV-1 Tat recognition by PCAF bromodomain. *Mol Cell*, **9**, 575-586 (2002).
  136. Wu, S. Y., and Chiang, C. M.: The double bromodomain-containing chromatin adaptor Brd4 and transcriptional regulation. *J Biol Chem*, **282**, 13141-13145 (2007).
  137. Jang, M. K., Mochizuki, K., Zhou, M., Jeong, H. S., Brady, J. N., and Ozato, K.: The bromodomain protein Brd4 is a positive regulatory component of P-TEFb and stimulates RNA polymerase II-dependent transcription. *Mol Cell*, **19**, 523-534 (2005).
  138. Yang, Z., Yik, J. H., Chen, R., He, N., Jang, M. K., Ozato, K., and Zhou, Q.: Recruitment of P-TEFb for stimulation of transcriptional elongation by the bromodomain protein Brd4. *Mol Cell*, **19**, 535-545 (2005).
  139. Yamada, T., Yamaguchi, Y., Inukai, N., Okamoto, S., Mura, T., and Handa, H.: P-TEFb-mediated phosphorylation of hSpt5 C-terminal repeats is critical for processive transcription elongation. *Mol Cell*, **21**, 227-237 (2006).
  140. Margaritis, T., and Holstege, F. C.: Poised RNA polymerase II gives pause for thought. *Cell*, **133**, 581-584 (2008).
  141. Wada, T., Takagi, T., Yamaguchi, Y., Ferdous, A., Imai, T., Hirose, S., Sugimoto, S., Yano, K., Hartzog, G. A., Winston, F., Buratowski, S., and Handa, H.: DSIF, a novel transcription elongation factor that regulates RNA polymerase II processivity, is composed of human Spt4 and Spt5 homologs. *Genes Dev*, **12**, 343-356 (1998).
  142. Price, D. H.: P-TEFb, a cyclin-dependent kinase controlling elongation by RNA polymerase II. *Mol Cell Biol*, **20**, 2629-2634 (2000).

143. Filippakopoulos, P., Qi, J., Picaud, S., Shen, Y., Smith, W. B., Fedorov, O., Morse, E. M., Keates, T., Hickman, T. T., Felletar, I., Philpott, M., Munro, S., McKeown, M. R., Wang, Y., Christie, A. L., West, N., Cameron, M. J., Schwartz, B., Heightman, T. D., La Thangue, N., French, C. A., Wiest, O., Kung, A. L., Knapp, S., and Bradner, J. E.: Selective inhibition of BET bromodomains. *Nature*, **468**, 1067-1073 (2010).
144. Pamblanco, M., Poveda, A., Sendra, R., Rodriguez-Navarro, S., Perez-Ortin, J. E., and Tordera, V.: Bromodomain factor 1 (Bdf1) protein interacts with histones. *FEBS Lett*, **496**, 31-35 (2001).
145. Kim, J. H., Cho, E. J., Kim, S. T., and Youn, H. D.: CtBP represses p300-mediated transcriptional activation by direct association with its bromodomain. *Nat Struct Mol Biol*, **12**, 423-428 (2005).
146. El-Osta, A., Brasacchio, D., Yao, D., Poci, A., Jones, P. L., Roeder, R. G., Cooper, M. E., and Brownlee, M.: Transient high glucose causes persistent epigenetic changes and altered gene expression during subsequent normoglycemia. *J Exp Med*, **205**, 2409-2417 (2008).
147. Szekanecz, Z., Shah, M. R., Pearce, W. H., and Koch, A. E.: Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression and soluble ICAM-1 (sICAM-1) production by cytokine-activated human aortic endothelial cells: a possible role for ICAM-1 and sICAM-1 in atherosclerotic aortic aneurysms. *Clin Exp Immunol*, **98**, 337-343 (1994).
148. Kanno, T., Kanno, Y., LeRoy, G., Campos, E., Sun, H. W., Brooks, S. R., Vahedi, G., Heightman, T. D., Garcia, B. A., Reinberg, D., Siebenlist, U., O'Shea, J. J., and Ozato, K.: BRD4 assists elongation of both coding and enhancer RNAs by interacting with acetylated histones. *Nat Struct Mol Biol*, **21**, 1047-1057 (2014).
149. Pons, D., de Vries, F. R., van den Elsen, P. J., Heijmans, B. T., Quax, P. H., and Jukema, J. W.: Epigenetic histone acetylation modifiers in vascular remodelling: new targets for therapy in cardiovascular disease. *Eur Heart J*, **30**, 266-277 (2009).
150. Wang, H., Cao, R., Xia, L., Erdjument-Bromage, H., Borchers, C., Tempst, P., and Zhang, Y.: Purification and functional characterization of a histone H3-lysine 4-specific methyltransferase. *Mol Cell*, **8**, 1207-1217 (2001).
151. Musri, M. M., Corominola, H., Casamitjana, R., Gomis, R., and Parrizas, M.: Histone H3 lysine 4 dimethylation signals the transcriptional competence of the adiponectin promoter in preadipocytes. *J Biol Chem*, **281**, 17180-17188 (2006).
152. Brown, J. D., Lin, C. Y., Duan, Q., Griffin, G., Federation, A. J., Paranal, R. M., Bair, S., Newton, G., Lichtman, A. H., Kung, A. L., Yang, T., Wang, H., Lusinskas, F. W., Croce, K. J., Bradner, J. E., and Plutzky, J.: NF-kappaB directs dynamic super enhancer formation in inflammation and atherogenesis. *Mol Cell*, **56**, 219-231 (2014).
153. Huang, B., Yang, X. D., Zhou, M. M., Ozato, K., and Chen, L. F.: Brd4 coactivates transcriptional activation of NF-kappaB via specific binding to acetylated RelA. *Mol*



- Cell Biol*, **29**, 1375-1387 (2009).
154. Nishiyama, A., Dey, A., Miyazaki, J., and Ozato, K.: Brd4 is required for recovery from antimicrotubule drug-induced mitotic arrest: preservation of acetylated chromatin. *Mol Biol Cell*, **17**, 814-823 (2006).
  155. Park, M. J., Kim, D. I., Lim, S. K., Choi, J. H., Han, H. J., Yoon, K. C., and Park, S. H.: High glucose-induced O-GlcNAcylated carbohydrate response element-binding protein (ChREBP) mediates mesangial cell lipogenesis and fibrosis: the possible role in the development of diabetic nephropathy. *J Biol Chem*, **289**, 13519-13530 (2014).

## 謝辞

本研究を行うにあたり、多大なるご指導とご鞭撻を賜りました、静岡県立大学 合田敏尚先生、本間一江先生、ならびに山梨大学 望月和樹先生に、深く感謝申し上げます。また、OLETF ラットを提供して下さいました大塚製薬株式会社様、ミグリトールおよびアナグリプチンを提供して下さいました三和化学研究所様、抗 Brd4 抗体を供与して下さいました尾里啓子先生、臨床試験にご協力下さいました那珂記念クリニックの皆様、に厚く御礼申し上げます。最後に、本研究を進めるにあたってご協力いただきました静岡県立大学栄養生理学研究室の卒業生ならびに在校生の皆様、に心より感謝の意を表します。

2016年2月  
今井 千裕