

Title	肥満2型糖尿病モデル動物db/dbマウスにおけるPPAR γ アゴニストおよびPPAR α アゴニストの影響
Sub Title	
Author	矢島, 賢(Yajima, Ken) 猿田, 享男(Saruta, Takao)
Publisher	慶應医学会
Publication year	2005
Jtitle	慶應医学 (Journal of the Keio Medical Society). Vol.82, No.2 (2005. 6) ,p.T95- T106
JaLC DOI	
Abstract	
Notes	学位論文
Genre	Journal Article
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00069296-20050601-0095

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the Keio Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

学位論文

肥満 2 型糖尿病モデル動物 *db/db* マウスにおける
PPAR γ アゴニストおよび PPAR α アゴニストの影響

慶應義塾大学医学部内科学教室

(指導：猿田享男教授)

や じま けん
矢 島 賢

(平成 16 年 10 月 15 日受付)

Key Words : peroxisome proliferator-activated receptor, glucose-stimulated insulin secretion, glucolipotoxicity, insulin resistance, type 2 diabetes with obesity

近年、我が国の 2 型糖尿病患者数および肥満患者数は軒並み増加しつづけている。これにより、疾患特有の合併症、特に動脈硬化性疾患や虚血性心疾患の発症や進展、それによる死亡および医療費の増大が社会問題にまで発展している。動脈硬化性疾患、特に虚血性心疾患の成因研究の基盤にリスクファクターの同定があり、多くの疫学調査から糖尿病および肥満はもちろんのこと、高血圧、高コレステロール血症、高中性脂肪血症、喫煙などさまざまなものが判明している(マルチプルリスクファクター症候群)。1988 年に Reaven がインスリン抵抗性、高インスリン血症、高 very low-density lipoprotein (以下 VLDL と略す) 血症、低 high-density lipoprotein-cholesterol (以下 HDL-C と略す) 血症、高血圧および耐糖能異常を併せ持つ病態を「シンドローム X」として名づけ、非肥満者でもこれらの因子が集積し、動脈硬化性疾患の発症基盤として重要であることを示した¹⁾。1989 年に Kaplan は、肥満者の体型を考慮した上で上半身肥満の重要性を指摘し、「死の四重奏」を提唱した²⁾。DeFronzo らは、肥満にかかわらずその中心にはインスリン抵抗性が存在するとして、“インスリン抵抗性症候群”を提唱した³⁾。このように、リスクファクターが単独で存在するというよりもむしろ個人に集積することが多く、集積したもののほど動脈硬化性疾患の発症が著増することが以前より提唱されてきた。しかし、なぜリスクファクターが個人に集積するのかは不明であった。

そのなかで、大阪大学の松澤らは 1987 年に「内臓脂肪型肥満」を提唱し、近年その概念を確立している。彼らは、肥満の中でも治療すべき“肥満症”は腹腔内(主

に腸間膜)に脂肪が蓄積する「内臓脂肪型肥満」⁴⁾で、これは肥満者のみでなく非肥満者においても動脈硬化性疾患の発症と強く関連していることを報告している⁵⁾。そして、内臓脂肪蓄積型の肥満はインスリン抵抗性の上流に位置し、糖尿病、高血圧、高脂血症といった生活習慣病を惹起していると考え、肥満および脂肪細胞に対する研究(アディポサイエンス)が活発に行われるようになった。これまで脂肪細胞は単にエネルギーを貯蔵する組織と考えられていたが、レプチンの発見を皮切りとして、脂肪細胞からはさまざまな生理活性物質(アディポサイトカインと呼ばれる)が分泌されていることが判明し、これらの分泌異常が生体内の代謝に影響することが明らかとなった。

また、脂肪組織としての脂肪だけでなく、各臓器の細胞内のトリグリセリド(以下 TG と略す)も障害をもたらしていることが注目されている。インスリン分泌を行う膵 β 細胞への TG の蓄積はインスリン分泌を低下させ^{6~8)}、糖取り込みを行う骨格筋や肝臓においては細胞内 TG 含量とこれらの臓器のインスリン抵抗性が強く相関しており、脂肪毒性として注目されている⁹⁾。また、生活習慣の改善やインスリン抵抗性改善薬によって、これら細胞内の TG 含量が低下しインスリン抵抗性が改善されることが示されている。

インスリン抵抗性改善薬は糖尿病患者、特に肥満 2 型糖尿病患者の治療に世界中で用いられているが、近年 peroxisome proliferator-activated receptor (以下 PPAR と略す) γ アゴニストであることが判明した。PPAR γ アゴニストは、骨格筋や肝臓、脂肪組織などの

末梢組織においてインスリン抵抗性をさまざまなメカニズムにより改善させることが知られている。しかし、PPAR γ アゴニストの膵臓に対する影響、とくにインスリン分泌を調査した研究は少ない¹⁰⁻¹³⁾。PPAR γ は、げっ歯類だけではなくヒトのランゲルハンス氏島（以下ラ島と略す）にも発現していることが確認されているため¹⁴⁾、PPAR γ アゴニストの膵臓での影響が注目されている。

一方、高脂血症の治療に用いられているフィブレート系薬剤は、PPAR α アゴニストであることが最近判明した。PPAR α アゴニストは主に脂肪酸代謝に関連しており、フィブレート系薬剤の脂質低下作用はこのメカニズムによるとされているが、インスリン抵抗性を改善させるとの報告が散見され注目されている^{15, 16)}。しかし、そのインスリン分泌に対する影響は不明である。

PPAR γ アゴニストとPPAR α アゴニストとの併用療法の報告は数少ないが、動脈硬化と密接に関連する脂質代謝において併用療法が単独よりも優れていることなどを示す報告がある^{17), 18)}。最近、PPAR γ とPPAR α の両方に効くアゴニストが開発され、糖尿病や代謝症候群に対する有効性—両アゴニストはPPAR γ アゴニストによる体重増加を抑制すること、肝臓や筋肉のTG含量を低下させること、およびインスリン抵抗性を改善することなどが報告されている¹⁹⁻²¹⁾。

そこで我々は、次のような仮説を立てた。PPAR γ アゴニストとPPAR α アゴニストはともに脂質代謝改善作用があるため、その併用療法により脂質低下作用を増強することを介して肥満2型糖尿病患者の脂肪毒性、とくにラ島におけるインスリン分泌不全をより解除できるであろうというものである。

本研究では、PPAR γ アゴニストとしてpioglitazoneを、PPAR α アゴニストとしてbezafibrateを用いた。PPAR γ アゴニスト単独療法としてpioglitazone群（以下PIO群と略す）、pioglitazoneとbezafibrateを用いての併用療法群（以下P+B群と略す）そしてPPAR γ とPPAR α の両アゴニストである5-[(2, 4-dioxothiazolidin-5-yl) methyl]-2-N-[[4-(trifluoromethyl)-phenyl] methyl] benzamide群（以下KRP-297群と略す）に分け、それぞれの薬剤を雄性C57BL/6Jマウスおよび肥満2型糖尿病のモデルである雄性*db/db*マウスに用い、未治療群と比較した。体重、食餌および飲水摂取量、代謝関連の血漿パラメーターを測定し、肥満および糖・脂質代謝への影響を評価した。膵 β 細胞への影響として、インスリン分泌に関しては膵灌流実験によるグルコース刺激性インスリン分泌（glucose-stimulated insulin secretion：以下GSISと略す）を評価し、さらにラ島

への影響を病理組織学的に評価した。

材料・対象と方法

1. 材料

Pioglitazone, bezafibrate および KRP-297 は、それぞれ武田薬品工業（大阪）、キッセイ薬品工業（松本）、杏林製薬（東京）から供与を受けた。コントロール食としてCE-2を日本クレア社（東京）より購入し、PIO, P+B および KRP-297 は 0.1% の carboxymethyl-cellulose を使用してCE-2に混餌させた。

2. 動物

5週齢の雄性C57BL/6Jマウスおよび5週齢の雄性*db/db*マウスを、日本クレア社より購入した。慶應義塾大学の実験動物の取り扱い方のガイドラインに従って実験を行った。両種のマウスをコントロール食であるCE-2で1週間飼育し、その後それぞれの薬剤混餌食で4週間飼育した。PIO群は【C57BL/6J：0.02% (wt/wt), 31.3 \pm 0.3 mg/kg/日；*db/db*：0.02% (wt/wt), 34.2 \pm 0.4 mg/kg/日】、P+B群は【C57BL/6J：0.02% (wt/wt), 29.2 \pm 0.5 mg/kg/日；*db/db*：0.02% (wt/wt), 33.3 \pm 0.4 mg/kg/日】+【C57BL/6J：0.06% (wt/wt), 97.3 \pm 1.5 mg/kg/日；*db/db*：0.07% (wt/wt), 111.0 \pm 1.5 mg/kg/日】、KRP-297群は【C57BL/6J：0.02% (wt/wt), 30.2 \pm 0.3 mg/kg/日；*db/db*：0.02% (wt/wt), 32.2 \pm 0.4 mg/kg/日】であった。すべてのマウスの食餌摂取量、飲水摂取量および体重は、週に3-4回朝に測定した。

3. 血漿の代謝パラメーターの測定

10週齢のマウスの眼窩から、EDTAでコーティングされたヘマトクリット管にて血液を採取した。血漿中の糖およびTGは、富士ドライケミ5500（富士フィルム、東京）を用いて測定した。遊離脂肪酸は、NEFA-Cテスト（和光、大阪）にて測定した。インスリンは、酵素免疫法（以下EIAと略す）（森永、横浜）にて、アディポネクチンはradioimmunoassay法（コスミック、東京）にて測定した。

4. 膵臓のインスリン含量

膵臓を1.8 mlの酸エタノール中でホモゲナイズし、ホモジネートを48時間4℃で貯蔵した後、4℃にて10分間10,000 rpmで遠心分離した。上清を貯蔵し、さらにペレットを0.2 mlの酸エタノールで再抽出した。遠

心分離の後、集めた上清を 0.25% の牛血清アルブミン (以下 BSA と略す) を含んだ 0.1M のリン酸緩衝液で 10,000 倍に希釈した。インスリン濃度は EIA にて測定した。

5. 膵臓の TG 含量

膵臓をメタノール 2 ml 中に入れ、4℃で保存した後ホモジネートし、クロロホルム 2 ml および Folch 液 (クロロホルム：メタノール=2：1) 4 ml を加えた。室温で 1 時間振盪させ、室温にて 15 分間 3,000 rpm で遠心し、上清を 60℃にて乾燥固定させた。沈渣を Folch 液で再抽出し、上清を同条件で乾燥固定した後、4% Triton X-100 を加え 1 時間 65℃に加熱した。さらに超音波を 20 分かけた後、TG 量を富士ドライケミ 5500 (富士フィルム、東京) にて測定した。

6. 膵灌流実験

10 週齢の各群マウスを一晩絶食後、50 mg/kg のペントバルビタールで麻酔した。腹腔動脈と門脈にカニューレーションし、他の動脈は結紮した。灌流の速度は毎分 0.5ml で一定にした。灌流液は、3% (wt/vol) のデキストラン T-40 を含んだ Krebs-Ringer bicarbonate buffer, 1% (wt/vol) の BSA および 20 mM の HEPES にて構成した。95% の酸素および 5% の二酸化炭素の混合ガスを灌流液に流し、pH を 7.35 から 7.45 の間に維持した。膵臓からの灌流液は 2 分間隔で門脈のカテーテルからチューブに採取し、即座に冷凍してインスリン測定のために -20℃で保存した。手術後の平衡状態を保つため 5.6 mM の糖濃度の灌流液で 15 分間灌流した後、本実験に移った。すなわち、正常の糖濃度 (5.6 mM) の灌流液で 10 分間の灌流を行った後、高い糖濃度 (16.7 mM) の灌流液に切り替え 20 分間灌流し、その後 20 分間はもとの糖濃度 (5.6 mM) の灌流液に戻すというプロトコールで行った。

7. 病理組織学的検討

膵灌流実験を行っていないマウスから膵臓を摘出し、35-38% のホルマリンで固定した。膵組織をパラフィンで固定し、切り出してヘマトキシリン-エオジン染色を行った。また、モルモット抗ヒトインスリン抗体およびウサギ抗 glucose transporter 2 (以下 GLUT2 と略す) ポリクローナル抗体を用いて免疫組織染色を行い、検討した。

8. 統計学的分析

すべての結果は平均値±標準誤差で示し、統計学的分析は StatView プログラム (ver 5.0J, SAS 社, 米国ノースカロライナ州) を使用して行った。有意差の検定は、分散分析 (以下 ANOVA と略す) の後、Bonferroni-Dunn 法を用いて post hoc 多重比較検定を行った。P<0.05 を統計学的に有意と解釈した。

結 果

1. 体重、食餌摂取量および飲水摂取量の変化

第 1 表に示すように、C57BL/6J マウスにおいて PPAR γ アゴニスト治療群のマウスの体重は、未治療群よりも有意に増加していた²²⁾。db/db マウスにおいても、PPAR γ アゴニスト治療群のマウスの体重は未治療群よりも有意に増加していたが、KRP-297 治療群の体重増加は他の治療群と比べ最も少なかった。

C57BL/6J マウスにおいて、PPAR γ アゴニスト治療群のマウスの食餌摂取量もまた未治療群と比較して有意に増加していた。一方、db/db マウスにおいては、KRP-297 治療群の食餌摂取量は最も少なく、他の治療群では未治療群と差は認められなかった。C57BL/6J マウスにおける PPAR γ アゴニスト治療群では飲水摂取量がやや増加していたが、db/db マウスでは未治療群で著明に増加していた。

2. 血漿の代謝パラメーター

第 1 図に示すように、db/db マウスの未治療群の血糖、インスリン、TG および遊離脂肪酸は C57BL/6J マウスの未治療群と比較して著明に上昇しており、これらは PPAR γ アゴニスト治療群では改善した²²⁾。アディポネクチンは、db/db マウスにおいて PPAR γ アゴニスト治療群では著明に増加しており、KRP-297 群ではさらに有意に増加していた (第 2 図)。

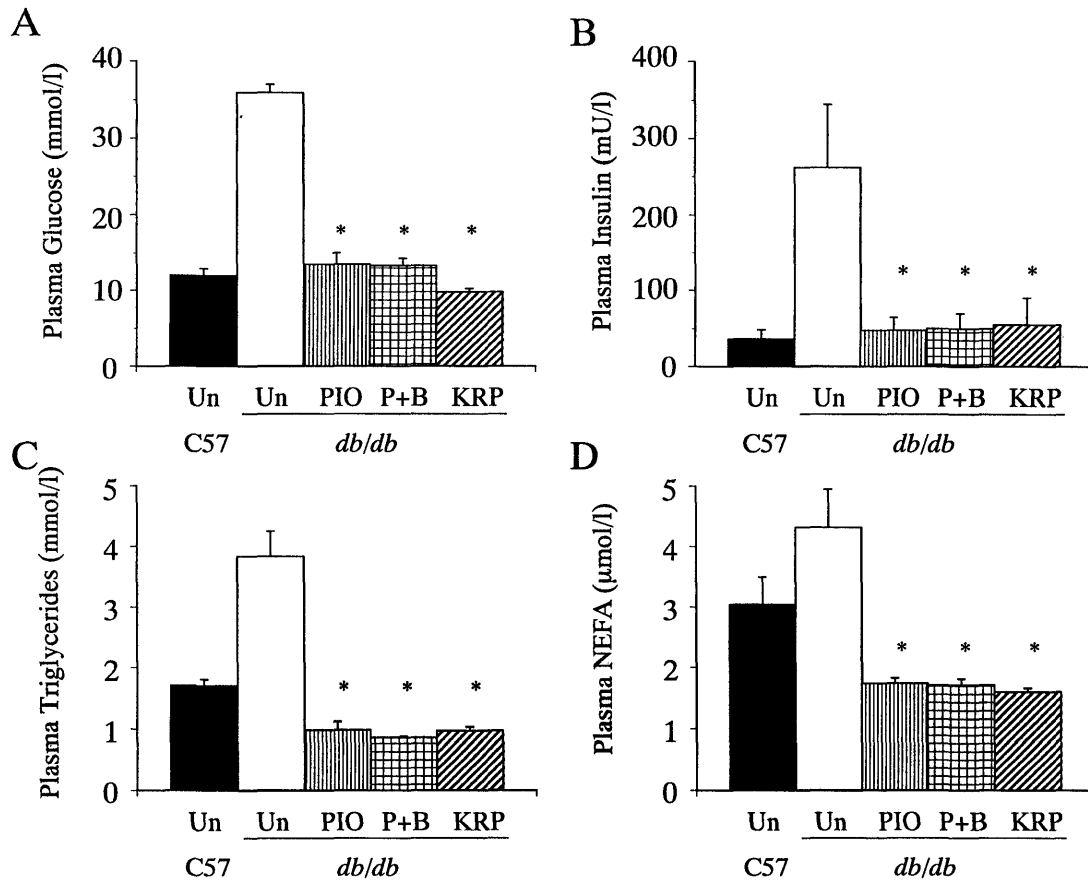
3. 膵臓のインスリン含量

db/db マウスの未治療群の膵インスリン含量は、C57BL/6J マウスの未治療群と比較してほぼ完全に枯渇していた (第 3 図)²²⁾。統計学的有意差はなかったが (P=0.051, ANOVA による)、db/db マウスの PIO 群および P+B 群の膵臓インスリン含量は、db/db マウスの未治療群と比べて改善していた。db/db マウスの KRP-297 群の膵インスリン含量は、C57BL/6J マウスの未治療群とほぼ同じであった。

第1表 C57BL/6J マウスおよび *db/db* マウスにおける4週間での体重変化, 食餌摂取量および飲水量

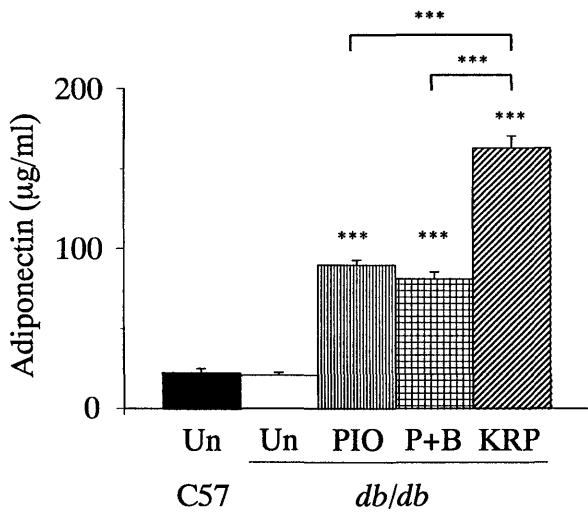
マウス	群	体重変化 (g)	食餌摂取量 (g)	飲水量 (g)
C57BL/6J	Untreated	3.06±0.25	96.35±1.59	158.45±5.12
	PIO	4.91±0.17*	112.29±1.38*	189.88±7.95*
	P+B	4.12±0.34*	108.27±1.75*	178.79±6.33
	KRP-297	4.70±0.18*	107.98±1.71*	198.33±7.63*
<i>db/db</i>	Untreated	9.90±0.46	191.50±2.77	505.60±17.64
	PIO	21.17±0.45*	182.80±3.07	196.10±5.12*
	P+B	19.30±0.48*	180.67±3.29	197.40±8.23*
	KRP-297	15.46±0.43* ^{†‡}	164.93±2.04* ^{†‡}	191.13±4.31*

*P<0.0083 compared with untreated group in each strain. [†]P<0.0083 compared with PIO group in each strain. [‡]P<0.0083 compared with P+B group in each strain.



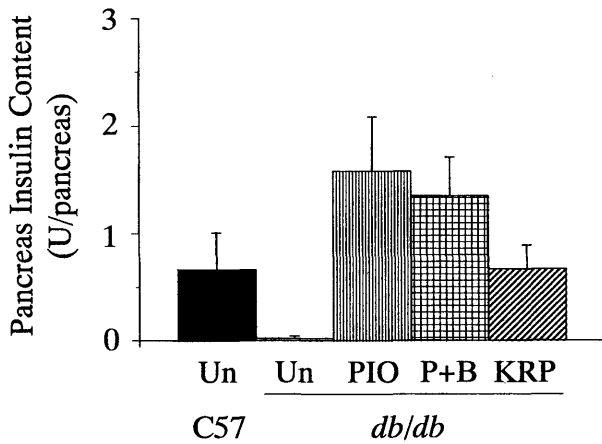
第1図 10週齢における血漿パラメーター

A: 糖, B: インスリン, C: 中性脂肪, D: 遊離脂肪酸. Un: 未治療群, PIO: pioglitazone 群, P+B: pioglitazone+bezafibrate 群, KRP: KRP-297 群, C57: C57BL/6J マウス, *db/db*: *db/db* マウス. それぞれのバーは平均値±標準誤差で示した. *P<0.0083, ANOVA (Bonferroni-Dunn) による. C57BL/6J 未治療群の値は参考値として示した. (Yajima K et al: Am J Physiol Endocrinol Metab 284: E966-E971, 2003²²⁾ の Fig. 1 を許可を得て転載)



第2図 10週齢における血漿アディポネクチン値

Un：未治療群，PIO：pioglitazone 群，P+B：pioglitazone+bezafibrate 群，KRP：KRP-297 群，C57：C57BL/6J マウス，db/db：db/db マウス，それぞれのバーは平均値±標準誤差で示した。***P<0.0001，ANOVA (Bonferroni-Dunn) による。C57BL/6J 未治療群の値は参考値として示した。

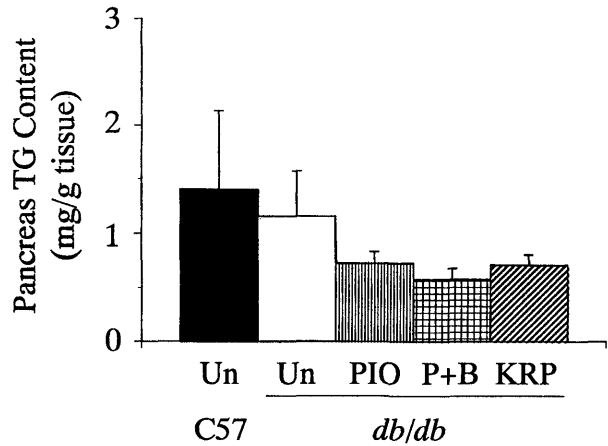


第3図 10週齢における膵臓のインスリン含量

Un：未治療群，PIO：pioglitazone 群，P+B：pioglitazone+bezafibrate 群，KRP：KRP-297 群，C57：C57BL/6J マウス，db/db：db/db マウス，それぞれのバーは平均値±標準誤差で示した。P=0.051，ANOVA (Bonferroni-Dunn) による。C57BL/6J 未治療群の値は参考値として示した。(Yajima K et al：Am J Physiol Endocrinol Metab 284：E966-E971，2003²²⁾の Fig. 2 を許可を得て転載)

4. 膵臓の TG 含量

db/db マウスにおける膵臓の TG 含量は，PPAR γ アゴニスト治療群では未治療群と比べて低下傾向にあったが，統計学的に有意差はなかった (P=0.322，ANOVA による) (第4図)。



第4図 10週齢における膵臓の中性脂肪含量

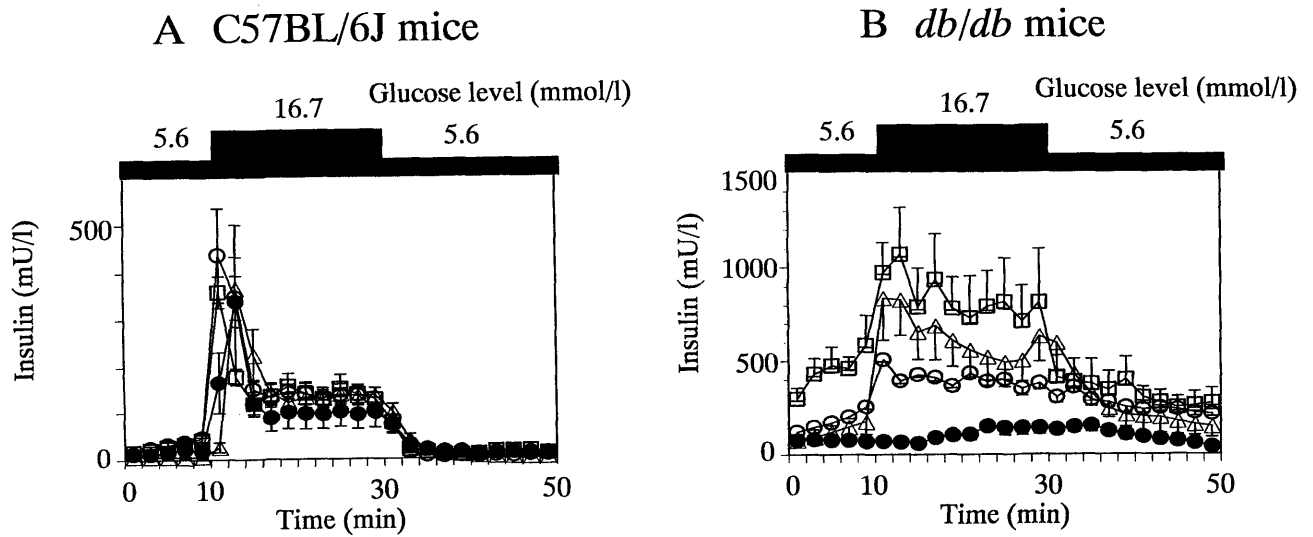
Un：未治療群，PIO：pioglitazone 群，P+B：pioglitazone+bezafibrate 群，KRP：KRP-297 群，C57：C57BL/6J マウス，db/db：db/db マウス，それぞれのバーは平均値±標準誤差で示した。P=0.322，ANOVA (Bonferroni-Dunn) による。C57BL/6J 未治療群の値は参考値として示した。

5. 膵灌流実験

C57BL/6J マウスの各群間で，GSIS の差は認められなかった (第5図 A)²²⁾。一方 db/db マウスでは (第5図 B)，未治療群では C57BL/6J マウスのような良好な GSIS は全く見られなかったが，PPAR γ アゴニスト治療群では GSIS が良好に保たれていた²²⁾。4群間で比較すると，PIO 群の GSIS は db/db マウスの未治療群と比べて有意差はなかったが，P+B 群および KRP-297 群の GSIS はともに有意に増加していた (第2表)²²⁾。

6. 病理組織学的検討

db/db マウスの未治療群のラ島は過形成で，インスリンは著明に減少しており，染色パターンもまばらであった (第6図)²²⁾。db/db マウスの PIO 群および P+B 群のラ島も過形成であったが，インスリン染色はほぼ正常であった。db/db マウスの KRP-297 群のラ島では過形成は認められず，インスリン染色もほぼ正常であった。インスリン染色の結果は，膵臓のインスリン含量の結果



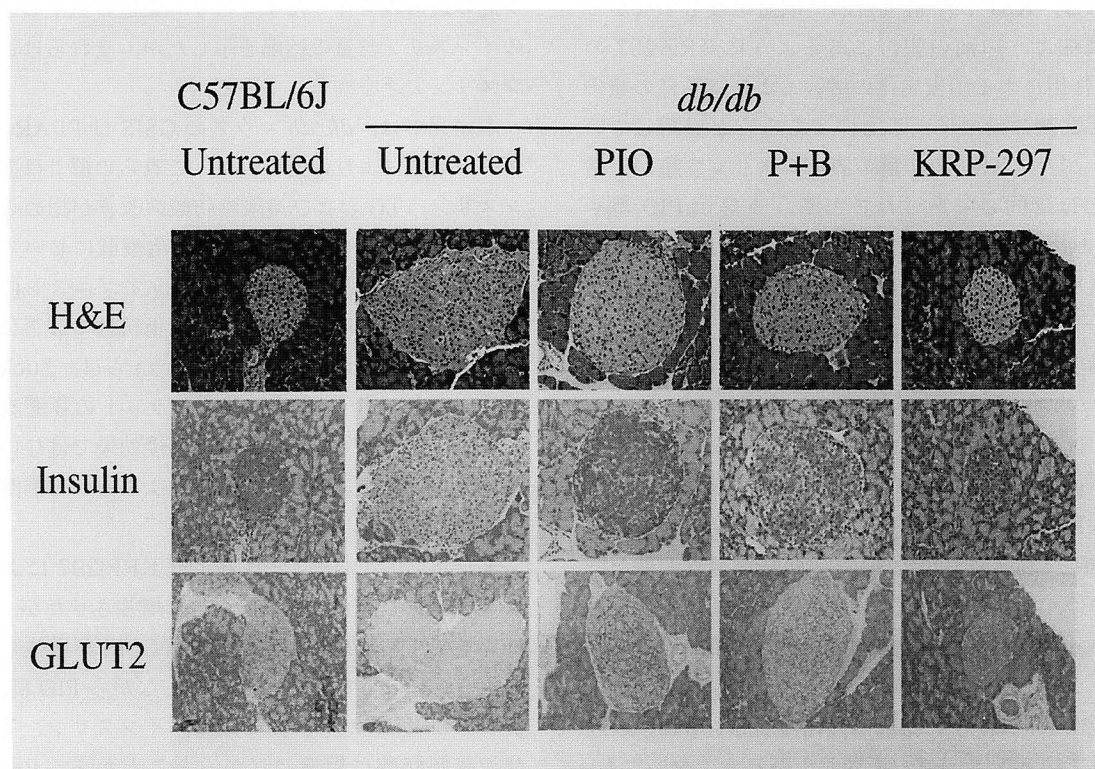
第5図 胼灌流実験におけるグルコース刺激性インスリン分泌

A: C57BL/6J マウス ●: 未治療群, ○: pioglitazone 群, □: pioglitazone+bezafibrate 群, △: KRP-297 群. それぞれのバーは平均値±標準誤差で示した. B: *db/db* マウス ●: 未治療群, ○: pioglitazone 群, □: pioglitazone+bezafibrate 群, △: KRP-297 群. それぞれのバーは平均値-標準誤差で示した. pioglitazone+bezafibrate 群のバーは平均値+標準誤差で示した. (Yajima K et al: Am J Physiol Endocrinol Metab 284: E966-E971, 2003²²⁾ の Fig. 3 を許可を得て転載)

第2表 C57BL/6J マウスおよび *db/db* マウスにおける胼灌流実験によるグルコース刺激性インスリン分泌 (GSIS)

GSIS (mU)	C57BL/6J		<i>db/db</i>	
	0-10分	10-30分	0-10分	10-30分
Untreated	79.02±52.01	1301.10±333.07	371.60±49.90	1059.50±190.91
PIO	151.80±27.54	1857.53±269.23	878.89±206.04	4054.41±997.69
P+B	138.32±22.75	1637.92±194.65	2248.18±410.89* [†]	8426.53±1788.66*
KRP-297	29.35±19.08	1556.51±202.71	602.60±189.85	6334.80±1161.62*

*P<0.0083 compared with untreated group in each strain during the same period. [†]P<0.0083 compared with PIO group in each strain during the same period. [‡]P<0.0083 compared with KRP-297 group in each strain during the same period.



第6図 10週齢における膵ラ島の組織標本

Untreated：未治療群，PIO：pioglitazone 群，P+B：pioglitazone+bezafibrate 群，KRP-297：KRP-297 群。H&E：ヘマトキシリンエオジン染色，Insulin：インスリン染色，GLUT2：GLUT2 染色，倍率：80×。（Yajima K et al：Am J Physiol Endocrinol Metab 284：E966-E971, 2003²²⁾の Fig. 4 を許可を得て転載）

と類似していた。GLUT2 は、正常な C57BL/6J マウスの膵β細胞膜に発現していた。db/db マウスの未治療群では GLUT2 の発現が欠損していたが、PPAR γ アゴニスト治療群では C57BL/6J マウスと同様に保たれていた。しかし、db/db マウスの PIO 群，P+B 群および KRP-297 群における GLUT2 発現の差は認められなかった。

考 察

本研究では、肥満 2 型糖尿病のモデルである db/db マウスの高血糖，高脂血症，インスリン抵抗性，膵インスリンの枯渇および GSIS の無反応を，PPAR γ アゴニストが改善させることを示した。さらに，PPAR α アゴニストの併用や PPAR γ/α 両アゴニストの投与によって GSIS が増強することを示した。すなわち，肥満 2 型糖尿病において PPAR γ アゴニストと PPAR α アゴニストの併用療法は，PPAR γ アゴニスト単独よりも体重増加

の抑制および膵臓の GSIS 促進の両面においてより効果的である可能性を示した。

1. 体重変化，食餌摂取量および飲水量

PPAR γ アゴニストは，インスリン抵抗性を呈する肥満 2 型糖尿病患者の治療によく用いられる。しかし，PPAR γ は脂肪細胞のマスターレギュレーターであるため，その作用により体脂肪量の増加や肥満を引き起こすことが知られている²³⁾。体重増加の程度は，PPAR γ アゴニストの種類により異なると報告されている²⁴⁾。また，PPAR γ アゴニストによる体重の増加はげっ歯類だけでなくヒトでも報告されており^{25~28)}，それは食餌摂取量の増加または薬物の作用による脂肪細胞の増加によるものと推測されている^{29~34)}。

本研究では，C57BL/6J マウスにおいて，PPAR γ アゴニスト治療群の体重は食餌摂取量の増加に伴って有意に増加した。一方 db/db マウスにおいては，KRP-297 群が PIO 群や P+B 群と比べ最も体重増加が少なかっ

た。これは、KRP-297 群で食餌摂取量が最も少なかったことに加え、以前の報告にあるように KRP-297 の PPAR α 作用による脂質異化の増強および脂肪量の減少といった薬剤の効果によるものであろうと推測している^{17), 35)}。また、KRP-297 群の膵インスリン含量が正常マウスとほぼ同じであったことや、ラ島が PIO 群や P+B 群と比べ過形成でなかったことは、KRP-297 が肥満を最も改善させたことによるものと推測している¹⁹⁾。

2. 血漿の代謝パラメーター

PPAR γ アゴニストの投与により、*db/db* マウスの未治療群では上昇した血糖、インスリン、TG および遊離脂肪酸が正常化した。しかし、これらのパラメーターに関して、PPAR α アゴニストの付加効果は見出せなかった。*db/db* マウスにおいて KRP-297 群が最も血糖が低かったのは、おそらく薬剤の影響に加え食餌摂取量が最も少なかったためであろうと考えられた。

アディポネクチンは、脂肪細胞から分泌されるインスリン感受性ホルモンで、抗動脈硬化作用をもつため最近注目されている^{36), 37)}。げっ歯類およびヒトにおいても、肥満の改善や PPAR γ アゴニストの投与によりアディポネクチンが増加することが近年報告されているが^{38)~40)}、本実験においてもその効果が確認された。また、PIO と比較して KRP-297 によるアディポネクチンの分泌効果が強いことが示されたが、薬剤の効果に加え、食餌摂取量の抑制に伴う肥満抑制による二次的な効果の影響も考えられた。

3. グルコース刺激性インスリン分泌および膵ラ島における変化

C57BL/6J マウスの GSIS は良好な反応を示し、PPAR α アゴニストや PPAR γ アゴニストの4週間の治療による変化は認めなかった。一方、*db/db* マウスの未治療群においては重篤なインスリン抵抗性、糖毒性および脂肪毒性の結果によるインスリンの枯渇のため、GSIS の反応は見られなかった。*db/db* マウスの未治療群の血漿インスリンレベルは、この週齢では他の治療群よりも高かったが、それは未治療群の *db/db* マウスのラ島が、極度の高血糖に対してなんとかインスリンを分泌しているからと考えられた。本研究において、刺激する灌流液の糖濃度は 16.7 mM であり、*db/db* マウスの未治療群の血糖よりも低い。そのため、*db/db* マウスの未治療群のラ島では高血糖に対する感受性が低下し、16.7 mM での GSIS 反応が見られなかった可能性も推測している。我々は、*db/db* マウスの未治療群において

ラ島の過形成を伴ったインスリン染色の低下および膵臓のインスリン含量の枯渇を示したが、それらはともにインスリン欠乏を物語っている。

本研究では、*db/db* マウスの GSIS は PPAR γ アゴニストの治療により保持された。これらの群では血糖、インスリン、TG および遊離脂肪酸の改善が認められた。また我々は、PPAR γ アゴニスト治療群においてラ島のインスリンの保持を示し、PPAR γ アゴニストによるインスリンの節約効果はインスリン抵抗性の改善によるものであろうと結論付けた。de Souza らは、Zucker diabetic fatty (以下 ZDF と略す) ラットの膵灌流実験において、GSIS の改善が PIO の直接効果ではないことを示し、インスリン抵抗性の改善によるものと推測している⁴¹⁾。

また本研究では、P+B および KRP-297 による治療は *db/db* マウスの GSIS を有意に増強させたが、PPAR α アゴニストを加えたことでなぜ GSIS が増強したのかは明らかにできなかった。しかしながら PIO 群、P+B 群および KRP-297 群間で血糖、インスリン、TG および遊離脂肪酸に相違はなかったことから、P+B 群と KRP-297 群においてインスリン分泌が増加したのはインスリン抵抗性の改善によるものではなく、膵 β 細胞における糖の感受性が増強したためではないかと考えられた。

脂肪毒性は膵 β 細胞の異常、すなわち GSIS と GLUT2 の消失および TG の蓄積を招く^{8), 42)}とされ、Higa らは、ZDF ラットを用いて troglitazone がこのような脂肪毒性の特徴を防いだことを報告している⁴³⁾。本研究においても、糖感受性や GSIS と関連している GLUT2 の染色性を評価した。その結果、PPAR γ アゴニスト治療によって *db/db* マウスにおける GLUT2 が保持されたことを示した。PPAR α アゴニストの付加により GSIS が増強されたが、PIO 群、P+B 群および KRP-297 群の間で GLUT2 染色における差を同定することは困難であった。しかし、ZDF ラットのラ島において PPAR α の発現が抑制されていたとの報告や⁴⁴⁾、高血糖が膵 β 細胞の PPAR α 発現を減弱させる報告⁴⁵⁾など、ラ島への PPAR α の直接作用が注目され PPAR α と GSIS が関連していると考えられる⁴⁶⁾。さらに Wang らは、PPAR α は正常ラットのラ島での GLUT2 を直接増加させる転写調節因子の一つであると推測していること⁴⁷⁾、近年ラットの GLUT2 遺伝子のプロモーター領域に PPAR 応答配列 (以下 PPRE と略す) が同定されたことなどから⁴⁸⁾、PPAR α アゴニストが膵 β 細胞における GLUT2 遺伝子の PPRE に影響している可能性がある

る。さらに本研究からは、PPAR α アゴニストが GLUT2 を量的にはなく質的な面から糖感受性を亢進させ GSIS を増強させている可能性が考えられた。

また膵臓における TG 含量の差について検討したところ、PPAR γ アゴニスト治療によりそれらの低下傾向を示したものの統計学的な有意差は見られず、PPAR α アゴニストによる影響も説明できなかった。また、我々は検討することができなかったが、分離したラ島での TG 含量が PPAR α アゴニストにより減少する可能性がある。GSIS における PPAR α の直接の影響を解明するためにはさらなる研究が必要であると考えられた。

総 括

本研究は、PPAR γ アゴニストと PPAR α アゴニストの併用療法や PPAR γ/α 両アゴニストによる治療は脂質低下作用を増強することを介して、肥満 2 型糖尿病モデル動物である db/db マウスの脂肪毒性や膵ラ島におけるインスリン分泌不全をより解除できるであろうという仮説のもとに実験を行い、以下の結果を得た。

1. db/db マウスにおいて、PPAR γ アゴニスト治療群では高血糖、高脂血症および高インスリン血症が改善した。このため、db/db マウスの代謝状態は改善され、未治療群よりも体重は増加していた。KRP-297 群では PIO 群や P+B 群と比べ、体重増加および食餌摂取量が最も少なかった。

2. 未治療群の db/db マウスのラ島で認められたインスリン顆粒の枯渇および膵 β 細胞膜に存在する GLUT2 の消失が、PPAR γ アゴニストの治療により改善された。KRP-297 群の膵臓のインスリン含量が正常マウスとはほぼ同程度であったこと、および膵ラ島が PIO 群や P+B 群と比べ過形成ではなかったことは、KRP-297 が肥満を最も改善させたことによるものと考えられた。

3. GSIS は、db/db マウスの未治療群で消失していたが、PPAR γ アゴニストの治療により改善され、PPAR α アゴニストの併用によりさらに増強された。PPAR γ アゴニストと PPAR α アゴニストの併用により、代謝パラメーターにおいては仮説のような増強効果は認められなかったが、GSIS の増強効果が認められた。また、PPAR γ/α の両アゴニストによる治療では、体重増加の抑制およびラ島の過形成防止も認められた。以上より、肥満 2 型糖尿病において PPAR γ アゴニストと PPAR α

アゴニストの併用療法や PPAR γ/α の両アゴニストによる治療は、PPAR γ アゴニスト単独よりも体重増加の抑制および膵臓の GSIS 増強の両面においてより効果的である可能性を示した。

本稿を終えるにあたり、御懇篤なる御指導、御校閲を賜りました慶應義塾大学医学部内科学教室 猿田享男教授に深謝いたします。また、本研究を直接御指導くださり論文の御校閲をいただきました慶應義塾大学保健管理センター兼医学部内科学教室 広瀬 寛講師、研究を御指導いただきました元慶應義塾大学医学部先端医科学研究所 藤田晴久講師ならびに瀬戸淑子講師、慶應義塾大学病理学教室 山田健人講師、研究にご協力いただきました研究室の諸先生方、先端医科学研究所の方々に感謝いたします。

本論文は、Yajima K, Hirose H, Fujita H, Seto Y, Fujita H, Ukeda K, Miyashita K, Kawai T, Yamamoto Y, Ogawa T, Yamada T, Saruta T : Combination therapy with PPAR γ and PPAR α agonists increases glucose-stimulated insulin secretion in db/db mice. Am J Physiol Endocrinol Metab 284 : E966-E971, 2003²²⁾の一部を含む。

本研究の一部は、第 61 回米国糖尿病学会 (2001 年、フィラデルフィア)、第 44, 45, 47 回日本糖尿病学会年次学術集会 (2001 年 京都, 2002 年 東京, 2004 年 東京)、第 24 回日本肥満学会年次学術集会 (2003 年、千葉) において報告した。

文 献

- 1) Reaven GM : Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. Diabetes 37 : 1595-1607, 1988
- 2) Kaplan NM : The deadly quartet. Upper-body obesity, glucose intolerance, hypertriglyceridemia, and hypertension. Arch Intern Med 149 : 1514-1520, 1989
- 3) DeFronzo RA, Ferrannini E : Insulin resistance. A multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidemia, and atherosclerotic cardiovascular disease. Diabetes Care 14 : 173-194, 1991
- 4) Matsuzawa Y, Shimomura I, Nakamura T, Keno Y, Tokunaga K : Pathophysiology and pathogenesis of visceral fat obesity. Ann N Y Acad Sci 676 : 270-278, 1993
- 5) Fujioka S, Matsuzawa Y, Tokunaga K, Tarui S : Contribution of intra-abdominal fat accumulation to the impairment of glucose and lipid metabolism in

- human obesity. *Metabolism* 36 : 54-59, 1987
- 6) Lee Y, Hirose H, Ohneda M, Johnson JH, McGarry JD, Unger RH : Beta-cell lipotoxicity in the pathogenesis of non-insulin-dependent diabetes mellitus of obese rats : impairment in adipocyte-beta-cell relationships. *Proc Natl Acad Sci USA* 91 : 10878-10882, 1994
 - 7) Hirose H, Lee YH, Inman LR, Nagasawa Y, Johnson JH, Unger RH : Defective fatty acid-mediated beta-cell compensation in Zucker diabetic fatty rats. Pathogenic implications for obesity-dependent diabetes. *J Biol Chem* 271 : 5633-5637, 1996
 - 8) Unger RH : Lipotoxicity in the pathogenesis of obesity-dependent NIDDM. Genetic and clinical implications. *Diabetes* 44 : 863-870, 1995
 - 9) Shulman GI : Cellular mechanisms of insulin resistance. *J Clin Invest* 106 : 171-176, 2000
 - 10) Prigeon RL, Kahn SE, Porte D : Effect of troglitazone on B cell function, insulin sensitivity, and glycemic control in subjects with type 2 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 83 : 819-823, 1998
 - 11) Masuda K, Okamoto Y, Tsuura Y, Kato S, Miura T, Tsuda K, Horikoshi H, Ishida H, Seino Y : Effects of troglitazone (CS-045) on insulin secretion in isolated rat pancreatic islets and HIT cells : an insulinotropic mechanism distinct from glibenclamide. *Diabetologia* 38 : 24-30, 1995
 - 12) Ohtani K, Shimizu H, Tanaka Y, Sato N, Mori M : Pioglitazone hydrochloride stimulates insulin secretion in HIT-T 15 cells by inducing Ca²⁺ influx. *J Endocrinol* 150 : 107-111, 1996
 - 13) Ohtani KI, Shimizu H, Sato N, Mori M : Troglitazone (CS-045) inhibits beta-cell proliferation rate following stimulation of insulin secretion in HIT-T 15 cells. *Endocrinology* 139 : 172-178, 1998
 - 14) Dubois M, Pattou F, Kerr Conte J, Gmyr V, Vandewalle B, Desreumaux P, Auwerx J, Schoonjans K, Lefebvre J : Expression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) in normal human pancreatic islet cells. *Diabetologia* 43 : 1165-1169, 2000
 - 15) Guerre M, Gervois P, Raspe E, Madsen L, Poulain P, Derudas B, Herbert JM, Winegar DA, Willson TM, Fruchart JC, Berge RK, Staels B : Peroxisome proliferator-activated receptor alpha activators improve insulin sensitivity and reduce adiposity. *J Biol Chem* 275 : 16638-16642, 2000
 - 16) Taniguchi A, Fukushima M, Sakai M, Tokuyama K, Nagata I, Fukunaga A, Kishimoto H, Doi K, Yamashita Y, Matsuura T, Kitatani N, Okumura T, Nagasaka S, Nakaishi S, Nakai Y : Effects of bezafibrate on insulin sensitivity and insulin secretion in non-obese Japanese type 2 diabetic patients. *Metabolism* 50 : 477-480, 2001
 - 17) Chaput E, Saladin R, Silvestre M, Edgar AD : Fenofibrate and rosiglitazone lower serum triglycerides with opposing effects on body weight. *Biochem Biophys Res Commun* 271 : 445-450, 2000
 - 18) Lefebvre AM, Peinado Onsurbe J, Leitersdorf I, Briggs MR, Paterniti JR, Fruchart JC, Fievet C, Auwerx J, Staels B : Regulation of lipoprotein metabolism by thiazolidinediones occurs through a distinct but complementary mechanism relative to fibrates. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17 : 1756-1764, 1997
 - 19) Murakami K, Tobe K, Ide T, Mochizuki T, Ohashi M, Akanuma Y, Yazaki Y, Kadowaki T : A novel insulin sensitizer acts as a coligand for peroxisome proliferator-activated receptor-alpha (PPAR-alpha) and PPAR-gamma : effect of PPAR-alpha activation on abnormal lipid metabolism in liver of Zucker fatty rats. *Diabetes* 47 : 1841-1847, 1998
 - 20) Murakami K, Tsunoda M, Ide T, Ohashi M, Mochizuki T : Amelioration by KRP-297, a new thiazolidinedione, of impaired glucose uptake in skeletal muscle from obese insulin-resistant animals. *Metabolism* 48 : 1450-1454, 1999
 - 21) Ide T, Nakazawa T, Mochizuki T, Murakami K : Tissue-specific actions of antidiabetic thiazolidinediones on the reduced fatty acid oxidation in skeletal muscle and liver of Zucker diabetic fatty rats. *Metabolism* 49 : 521-525, 2000
 - 22) Yajima K, Hirose H, Fujita H, Seto Y, Fujita H, Ukeda K, Miyashita K, Kawai T, Yamamoto Y, Ogawa T, Yamada T, Saruta T : Combination therapy with PPARgamma and PPARalpha agonists increases glucose-stimulated insulin secretion in db/db mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 284 : E966-971, 2003
 - 23) Lehmann JM, Moore LB, Smith Oliver TA, Wilkison WO, Willson TM, Kliewer SA : An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma). *J Biol Chem* 270 : 12953-12956, 1995
 - 24) King AB : A comparison in a clinical setting of the efficacy and side effects of three thiazolidinediones. *Diabetes Care* 23 : 557, 2000
 - 25) Hirshman MF, Fagnant PM, Horton ED, King PA, Horton ES : Pioglitazone treatment for 7 days failed to correct the defect in glucose transport and glucose transporter translocation in obese Zucker rat (fa/fa) skeletal muscle plasma membranes. *Biochem Biophys Res Commun* 208 : 835-845, 1995
 - 26) Murase K, Odaka H, Suzuki M, Tayuki N, Ikeda H : Pioglitazone time-dependently reduces tumour necrosis factor-alpha level in muscle and improves metabolic abnormalities in Wistar fatty rats. *Diabetologia* 41 : 257-264, 1998
 - 27) Kawai T, Takei I, Oguma Y, Ohashi N, Tokui M, Oguchi S, Katsukawa F, Hirose H, Shimada A, Watanabe K, Saruta T : Effects of troglitazone on fat distribution in the treatment of male type 2 diabetes.

- Metabolism 48 : 1102-1107, 1999
- 28) Schwartz S, Raskin P, Fonseca V, Graveline JF : Effect of troglitazone in insulin-treated patients with type II diabetes mellitus. Troglitazone and Exogenous Insulin Study Group. N Engl J Med 338 : 861-866, 1998
- 29) Hallakou S, Doare L, Foufelle F, Kergoat M, Guerre Millo M, Berthault MF, Dugail I, Morin J, Auwerx J, Ferre P : Pioglitazone induces *in vivo* adipocyte differentiation in the obese Zucker fa/fa rat. Diabetes 46 : 1393-1399, 1997
- 30) Pickavance L, Widdowson PS, King P, Ishii S, Tanaka H, Williams G : The development of overt diabetes in young Zucker Diabetic Fatty (ZDF) rats and the effects of chronic MCC-555 treatment. Br J Pharmacol 125 : 767-770, 1998
- 31) Shimaya A, Kurosaki E, Nakano R, Hirayama R, Shibasaki M, Shikama H : The novel hypoglycemic agent YM440 normalizes hyperglycemia without changing body fat weight in diabetic db/db mice. Metabolism 49 : 411-417, 2000
- 32) De Vos P, Lefebvre AM, Miller SG, Guerre Millo M, Wong K, Saladin R, Hamann LG, Staels B, Briggs MR, Auwerx J : Thiazolidinediones repress ob gene expression in rodents via activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. J Clin Invest 98 : 1004-1009, 1996
- 33) Wang Q, Dryden S, Frankish HM, Bing C, Pickavance L, Hopkins D, Buckingham R, Williams G : Increased feeding in fatty Zucker rats by the thiazolidinedione BRL 49653 (rosiglitazone) and the possible involvement of leptin and hypothalamic neuro-peptide Y. Br J Pharmacol 122 : 1405-1410, 1997
- 34) Zhang B, Graziano MP, Doebber TW, Leibowitz MD, White Carrington S, Szalkowski DM, Hey PJ, Wu M, Cullinan CA, Bailey P, Lollmann B, Frederich R, Flier JS, Strader CD, Smith RG : Down-regulation of the expression of the obese gene by an antidiabetic thiazolidinedione in Zucker diabetic fatty rats and db/db mice. J Biol Chem 271 : 9455-9459, 1996
- 35) Etgen GJ, Oldham BA, Johnson WT, Broderick CL, Montrose CR, Brozinick JT, Misener EA, Bean JS, Bensch WR, Brooks DA, Shuker AJ, Rito CJ, McCarthy JR, Ardecky RJ, Tyhonas JS, Dana SL, Bilakovics JM, Paterniti JR Jr, Ogilvie KM, Liu S, Kauffman RF : A tailored therapy for the metabolic syndrome : the dual peroxisome proliferator-activated receptor-alpha/gamma agonist LY465608 ameliorates insulin resistance and diabetic hyperglycemia while improving cardiovascular risk factors in preclinical models. Diabetes 51 : 1083-1087, 2002
- 36) Chandran M, Phillips SA, Ciaraldi T, Henry RR : Adiponectin : more than just another fat cell hormone? Diabetes Care 26 : 2442-2450, 2003
- 37) Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Terauchi Y, Kubota N, Hara K, Mori Y, Ide T, Murakami K, Tsuboyama Kasaoka N, Ezaki O, Akanuma Y, Gavrilova O, Vinson C, Reitman ML, Kagechika H : The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipodystrophy and obesity. Nat Med 7 : 941-946, 2001
- 38) Hotta K, Funahashi T, Arita Y, Takahashi M, Matsuda M, Okamoto Y, Iwahashi H, Kuriyama H, Ouchi N, Maeda K, Nishida M, Kihara S, Sakai N, Nakajima T, Hasegawa K, Muraguchi M, Ohmoto Y, Nakamura T, Yamashita S, Hanafusa T, Matsuzawa Y : Plasma concentrations of a novel, adipose-specific protein, adiponectin, in type 2 diabetic patients. Arterioscler Thromb Vasc Biol 20 : 1595-1599, 2000
- 39) Maeda N, Takahashi M, Funahashi T, Kihara S, Nishizawa H, Kishida K, Nagaretani H, Matsuda M, Komuro R, Ouchi N, Kuriyama H, Hotta K, Nakamura T, Shimomura I, Matsuzawa Y : PPARgamma ligands increase expression and plasma concentrations of adiponectin, an adipose-derived protein. Diabetes 50 : 2094-2099, 2001
- 40) Hirose H, Kawai T, Yamamoto Y, Taniyama M, Tomita M, Matsubara K, Okazaki Y, Ishii T, Oguma Y, Takei I, Saruta T : Effects of pioglitazone on metabolic parameters, body fat distribution, and serum adiponectin levels in Japanese male patients with type 2 diabetes. Metabolism 51 : 314-317, 2002
- 41) de Souza CJ, Yu JH, Robinson DD, Ulrich RG, Meglasson MD : Insulin secretory defect in Zucker fa/fa rats is improved by ameliorating insulin resistance. Diabetes 44 : 984-991, 1995
- 42) Unger RH, Zhou YT, Orci L : Regulation of fatty acid homeostasis in cells : novel role of leptin. Proc Natl Acad Sci USA 96 : 2327-2332, 1999
- 43) Higa M, Zhou YT, Ravazzola M, Baetens D, Orci L, Unger RH : Troglitazone prevents mitochondrial alterations, beta cell destruction, and diabetes in obese prediabetic rats. Proc Natl Acad Sci USA 96 : 11513-11518, 1999
- 44) Zhou YT, Shimabukuro M, Wang MY, Lee Y, Higa M, Milburn JL, Newgard CB, Unger RH : Role of peroxisome proliferator-activated receptor alpha in disease of pancreatic beta cells. Proc Natl Acad Sci USA 95 : 8898-8903, 1998
- 45) Roduit R, Morin J, Masse F, Segall L, Roche E, Newgard CB, Assimacopoulos Jeannet F, Prentki M : Glucose down-regulates the expression of the peroxisome proliferator-activated receptor-alpha gene in the pancreatic beta-cell. J Biol Chem 275 : 35799-35806, 2000
- 46) Sugden MC, Holness MJ : Potential role of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha in the modulation of glucose-stimulated insulin secretion. Diabetes 53 Suppl 1 : S71-81, 2004
- 47) Wang MY, Koyama K, Shimabukuro M, Mangelsdorf D, Newgard CB, Unger RH : Overexpression of leptin

receptors in pancreatic islets of Zucker diabetic fatty rats restores GLUT-2, glucokinase, and glucose-stimulated insulin secretion. Proc Natl Acad Sci U S A 95 : 11921-11926, 1998

48) Kim HI, Kim JW, Kim SH, Cha JY, Kim KS, Ahn YH : Identification and functional characterization of the peroxisomal proliferator response element in rat GLUT2 promoter. Diabetes 49 : 1517-1524, 2000
