

博士論文

DPP-4 阻害薬の
血管内皮細胞を介した
骨格筋インスリン抵抗性改善作用
に関する研究

佐藤 寛之

DPP-4 阻害薬の血管内皮細胞を介した
骨格筋インスリン抵抗性改善作用に関する研究

所属：代謝・栄養病態学

指導教員：山内 敏正

申請者名：佐藤 寛之

目次

1	要旨	2
2	序文	3
3	方法	11
4	結果	20
5	考察	35
6	謝辞	43
7	引用文献	44

1 要旨

2型糖尿病治療薬である dipeptidyl peptidase 4 (DPP-4) 阻害薬がインスリン抵抗性を改善することが確認されているが、詳細なメカニズムは明らかではない。そこで、DPP-4 阻害薬による骨格筋インスリン抵抗性改善メカニズムを検証することにした。当研究室で樹立した血管内皮特異的 IRS2 (ETIrs2) 欠損マウスにアナグリプチンを投与した結果、ETIrs2 欠損マウスにて見られた骨格筋のインスリン依存性糖取り込み低下はグルカゴン様ペプチド-1 (GLP-1) 依存性に改善した。さらに、GLP-1 によって血管内皮一酸化窒素合成酵素 (eNOS) のリン酸化が亢進されることを確認した。すなわち、DPP-4 阻害薬が GLP-1 を介して血管内皮細胞の eNOS を活性化することで、骨格筋インスリン抵抗性を改善すると考えられた。

2 序文

現在、わが国での 2 型糖尿病患者数は増加し続けており、厚生労働省が行った患者調査の結果によると、糖尿病患者の総数は約 316 万人で過去最多となっている。さらに、糖尿病予備軍を合わせるとその総数は約 2000 万人と推計されており、日本国民の約 25 %が糖尿病もしくは糖尿病予備軍であると考えられている。欧米人に比して日本人のインスリン分泌能は半分ほどであるという遺伝因子に加えて、食生活の乱れや運動不足という環境因子の影響により、肥満に伴うインスリン抵抗性が進行した結果、インスリンの相対的な作用不足となり、2 型糖尿病患者の増加に繋がっていると推察される。つまり、2 型糖尿病の発症原因として、日本人に特徴的である遺伝因子に環境因子が追加されることで、インスリン分泌不全及びインスリン抵抗性という 2 つの要因が単独または相互に関連することが寄与していると示唆される (1, 2)。

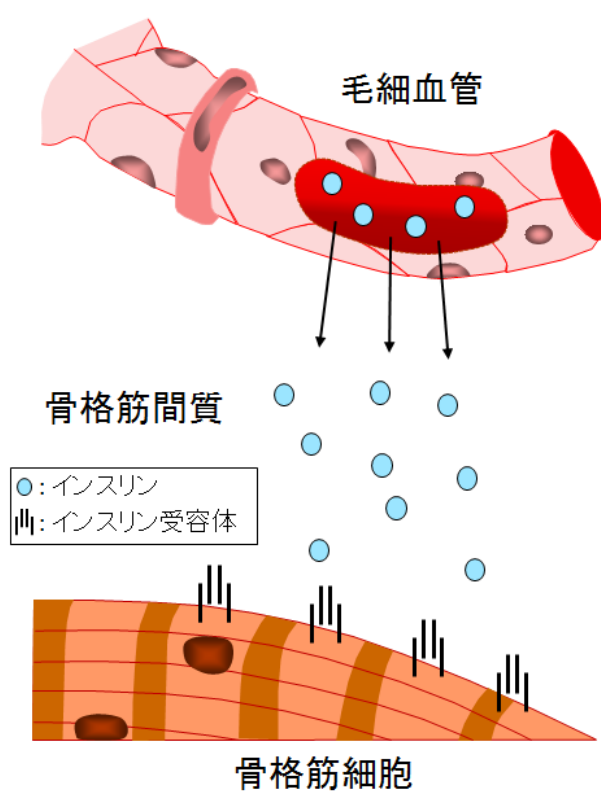
インスリンが作用する臓器として骨格筋や肝臓が主に知られている。中でも、骨格筋におけるグルコースの消費量は全組織・臓器内で最も多く、骨格筋で生じたインスリン抵抗性は 2 型糖尿病や内臓脂肪型肥満を誘発し、糖尿病網膜症や糖尿病腎症をはじめとする細小血管障害や、心筋梗塞や狭心症などの大血管障

害を引き起こす要因と考えられている (3, 4)。そのため、インスリンによって惹起される骨格筋での糖取り込みメカニズムや、肥満によって誘発されるインスリン抵抗性の発症メカニズムを解明することは、糖尿病、メタボリックシンドローム、糖尿病合併症などの多くの疾患の予防及び治療の助けとなりうる。

食事により膵臓の β 細胞から分泌されたインスリンは、血液中から骨格筋に分布する毛細血管へと移行した後、骨格筋の間質へと拡散し、骨格筋細胞の表面に発現するインスリン受容体に結合することで、インスリンによる骨格筋での糖取り込みが行われる (5-9) (図 1)。一方、骨格筋へのインスリンの拡散は肝臓に比して緩徐であり、インスリンによる糖取り込みも肝臓に比べて緩やかであると報告されている (3, 10, 11)。さらに、肥満患者における肝臓や血液中でのインスリン分布は健常人と違いはないにも関わらず、骨格筋間質へのインスリンの拡散が減少することで、間質でのインスリン濃度が減少し、インスリンに依存した骨格筋の糖取り込みが減少している (12)。これらの知見より、肥満患者での骨格筋インスリン抵抗性発症メカニズムとして、骨格筋自体の糖取り込み障害に加えて、インスリンの骨格筋間質への拡散が健常人よりも緩やかとなり、インスリンに依存した骨格筋での正常な糖取り込み量が低下していることが示唆される。しかし、血液中に存在するインスリンの骨格筋への拡散がどのように

調節されているのか，肥満患者においてインスリン依存性の糖取り込みがなぜ障害されているのか，に関する詳細なメカニズム研究は現在のところ十分に行われていない。

インスリンの骨格筋での想定作用メカニズム



(引用文献9より改変)

(図1)

我々は以前，血管内皮細胞で発現しているインスリン受容体の基質の一つである insulin receptor substrate (IRS) 2 を血管内皮細胞で特異的に欠損したマウ

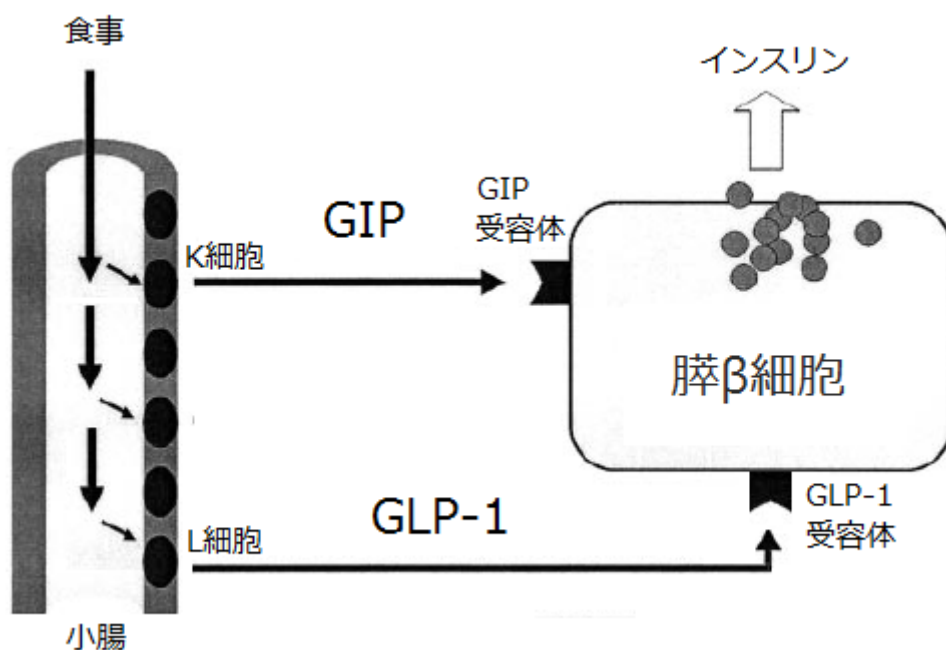
スを作成した。本マウスの血管内皮細胞では、血管拡張作用を担う一酸化窒素 (NO) の合成酵素である eNOS のインスリン刺激後の活性化がコントロールマウスと比べ約 30%まで低下していた (9)。また、グルコースクランプ法を実施したところ、骨格筋でのインスリン依存性の糖取り込みの低下が生じており、インスリンの骨格筋間質への拡散が減少しているデータが得られた (9)。続いて、マイクロバブルを使用して骨格筋に分布する毛細血管の拡張能について確認したところ、コントロールマウスにおいてはインスリンによって eNOS 依存的に毛細血管が拡張したが、ETIrs2 欠損マウスにおいては毛細血管の拡張能が弱いことが明らかとなった (9)。さらに、マイクロダイアリシスプローブを用いた検討において、ETIrs2 欠損マウスにおいては、骨格筋間質におけるインスリン濃度が有意に減少していることが分かった (9)。これらのことより、ETIrs2 欠損マウスではインスリンによる eNOS の活性化が不十分であるため、毛細血管の拡張能が障害され、骨格筋間質へのインスリンの拡散が不足するため、骨格筋でのインスリン依存性の糖取り込みが減少すると考えられた。さらに、このような特徴を有する ETIrs2 欠損マウスに eNOS の発現量を増加させる薬剤であるプロスタグランジン I₂ アナログを投与した結果、インスリン刺激後の血管内皮細胞における eNOS の活性化がコントロールマウスと同じレベルにまで改善した (9)。これに伴い、毛細血管の拡張能、骨格筋間質におけるイン

スリン濃度及び骨格筋でのインスリン依存性の糖取り込みも同様に改善する結果を得ている (9)。

食事を摂取すると血糖値の上昇が見られるが、血糖値の調節に寄与する消化管ホルモンとして、インクレチンがあげられる (13)。インクレチンの歴史は古く、1906年に腸管抽出物が糖尿病患者における尿糖を低下させることが報告され、インクレチンの概念が作り上げられた (14)。その後、1969年にグルコース依存性インスリン分泌刺激ポリペプチド (GIP) が発見され (15)、1983年に GLP-1 が発見された (16)。現在ではこの2つのホルモンがインクレチンとして確認されており、小腸の K 細胞及び L 細胞からそれぞれ分泌され、GIP 受容体及び GLP-1 受容体を介して、グルコース濃度に応じた膵臓からのインスリン分泌を促進することが確認されている (17-19) (図 2)。2 型糖尿病患者に GLP-1 を投与した際は血糖値の低下が認められたが、GIP を投与した際は血糖値が低下しなかった (20)。また、GLP-1 はグルコース依存的なインスリン分泌促進作用に加えて、食欲減少作用、消化管運動低下作用及びグルカゴン分泌減少作用などを示すことにより (21)、2 型糖尿病患者の血糖調節に関与している。さらに、2 型糖尿病モデルマウスに対する膵臓 β 細胞の増殖作用が認められており (22)、従来の糖尿病治療薬で問題視されてきた長期投与による効果

減衰を軽減できる可能性を秘めている。そのため、2型糖尿病患者の治療に GLP-1 が注目されているが、GLP-1 は血液中に存在する DPP-4 という酵素によって急速に分解されてしまう (23-25)。そのため、DPP-4 の働きを抑制すれば、全身循環の活性型 GLP-1 濃度が増加することで、糖尿病患者の血糖コントロールが改善されると考えられ、DPP-4 による不活化が生じ難い DPP-4 阻害薬及び GLP-1 受容体作動薬の開発研究が活発に行われている。

インクレチンによるインスリン分泌メカニズム



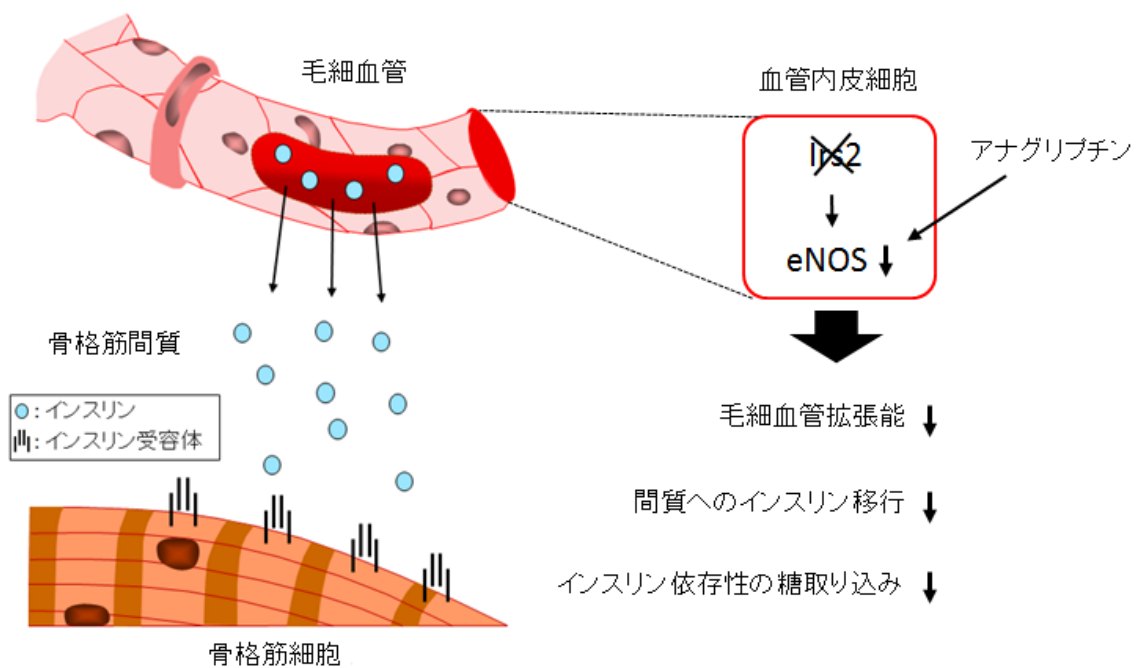
(引用文献 17 より改変)

(図 2)

GLP-1 受容体は膵臓だけでなく様々な臓器や組織に発現していることが確認されており、食欲減少作用や消化管運動低下作用など、多彩な作用を有することが確認されている (18, 26)。中でも、GLP-1 受容体作動薬は高脂肪食を与えたラットの骨格筋に分布する毛細血管の血流量を改善することで、骨格筋における糖取り込みを改善した報告がある (27)。さらに、GLP-1 受容体作動薬が血管内皮細胞中でプロテインキナーゼ A (PKA) を介して eNOS のリン酸化を亢進することが確認されている (28)。これらのことより、GLP-1 受容体作動薬が血管内皮細胞中で eNOS を活性化することで毛細血管血流量を増加させ、骨格筋でのインスリン依存性の糖取り込みを改善する可能性が示唆される。一方、DPP-4 は様々な組織に存在し、可溶性タンパク質として体液中にも存在することが知られている (29, 30)。また、GLP-1 及び GIP 以外にも、血管作用性小腸ペプチド、神経ペプチド、サブスタンス P 及びストローマ細胞由来因子-1 α 等を基質とし、様々な物質の活性調節に寄与している (31)。さらに、DPP-4 は細胞表面マーカーである CD26 としても知られており、CD26 の作用には酵素活性の関与はないとの報告もあるが、免疫反応など幅広い生理作用を有する可能性が考えられる (29, 32, 33)。これらの知見より、GLP-1 受容体作動薬は基本的に GLP-1 による作用を主とするが、DPP-4 阻害薬は GLP-1 以外を介した効果についても期待できる薬剤である。

そこで、DPP-4 阻害薬であるアナグリプチンがインスリンシグナルを介さずに血管内皮細胞での eNOS を活性化し、ETIrs2 欠損マウスで見られた骨格筋に分布する毛細血管の拡張能低下を改善することで、骨格筋間質へのインスリンの拡散障害及びインスリン依存性の骨格筋における糖取り込み減少を改善するかどうか検討した (図 3)。

ETIrs2 欠損マウスに対するアナグリプチンの想定作用



(引用文献 9 より改変)

(図 3)

3 方法

動物

血管内皮細胞で特異的に *Irs2* 遺伝子を欠損した ET*Irs2* 欠損マウスは、我々が以前に樹立したものをを用いた (9, 34)。*Irs2* 遺伝子の両端に loxP 配列を導入した *Irs2* flox マウス (25% 129/Sv, 75% C57Bl/6) を作製し、血管内皮細胞特異的に Tie2-Cre リコンビナーゼを発現しているマウス (25% 129/Sv, 75% C57Bl/6) と交配させることにより、血管内皮細胞のみで *Irs2* 遺伝子を欠損したマウス (25% 129/Sv, 75% C57Bl/6) を作製した。ジェノタイピングは 3 週齢時にマウスの尾の DNA を PCR により増幅して実施した。Cre リコンビナーゼ (a, b) もしくは *Irs2* (c, d, e) 検出に用いた PCR プローブは以下である。動物は 12 時間ごとの明暗サイクルのもと、自由摂餌及び自由給水にて飼育した。8 週齢の雄性 ET*Irs2* 欠損マウスは普通食である CE-2 もしくはアナグリプチンを 0.3%含有する CE-2 を 8 週間与えた。また、コントロールマウスとして、8 週齢の雄性 *Irs2* flox マウスを使用し、CE-2 を 8 週間与えた。アナグリプチン含有 CE-2 は三和化学研究所より供給されたものを使用した。また、すべての動物実験は東京大学動物実験実施マニュアルに従って実施した。

a : 5'-ACATGTTTCAGGGATCGCCAGG-3'

b : 5'-TAACCAGTGAAACAGCATTGC-3'

c : 5'-CCAGTGGGTGGCAGTGTGGGTAAGA-3'

d : 5'-CAGCGCATCGCCTTCTATCGCCTTC -3'

e : 5'-CCCATGTCTGCTTGTATGGAGAGCC-3'

血漿パラメータの測定

血漿中アナグリプチン濃度は液体クロマトグラフィータンデム質量分析装置 (LC-MS/MS) を用いて測定した (35)。血漿 50 μ L に精製水 50 μ L, 内標準物質であるアナグリプチンの d_8 体溶液 40 μ L 及び 0.2 %酢酸 800 μ L を Oasis HLB 固相カラム (Nihon Waters, Tokyo, Japan) を用いて抽出した。固相カラムは 1 mL の 5%メタノールで洗浄後, 1 mL のアセトニトリルで抽出し, 抽出液は窒素気流下で約 40°C にて濃縮乾固後, 1%酢酸/アセトニトリル = 9/1 溶液 200 μ L にて溶解した。溶解液を Cadenza CD-C18 カラム (Imtakt, Kyoto, Japan) を装着した高速液体クロマトグラフ (HPLC) にて 1%酢酸/アセトニトリル = 8/2 溶液を用いて分離した。検出には API4000 (AB Sciex, Tokyo, Japan) を用いた。アナグリプチン及び内標準物質のモニタリングイオンは m/z : 384/231 及び 392/239 とした。血漿における DPP-4 活性は Gly-Pro-MCA (Peptide Institute, Osaka, Japan) を用いた蛍光定量法により測定した (36)。10 μ L の血漿試料と 90 μ L の反応溶

液 (0.1 mg/mL BSA, 0.2 mmol/L Gly-Pro-MCA, 25 mol/L HEPES 緩衝液, 140 mol/L 塩化ナトリウム, pH 7.8) を混合した。反応液を室温暗所で 20 分間反応後, 100 μ L の 25 %酢酸を添加して反応を停止させた。遊離した 7-アミノ-4-メチルクマリンの蛍光強度を Gemini EM マイクロプレートリーダー (MOLECULAR DEVICES, Tokyo, Japan) を用いて, 390 nm の励起波長及び 460 nm の発光波長で測定した。血漿中活性型 GLP-1 濃度は GLP-1 (Active) ELISA キット (Merck Millipore, Tokyo, Japan) を用いて測定した。血漿中中性脂肪 (TG), 遊離脂肪酸 (FFA) 及び総コレステロールは生化学検査用キット (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan) を用いて測定した。血漿中インスリン, アディポネクチン及びレプチンは, それぞれマウスの ELISA キット (インスリン : Morinaga Institute of Biological Science, Kanagawa, Japan, アディポネクチン : Otsuka pharmaceutical, Tokyo, Japan, レプチン : R&D systems, Minneapolis, USA) を用いて測定した。

インスリン負荷試験

マウスは 1 時間の絶食後, 0.75 U/kg でヒトインスリン製剤 (Humulin R, Eli Lilly Japan, Kobe, Japan) を腹腔内投与した。インスリン製剤投与 0, 20, 40, 60, 80, 100 及び 120 分経過後に尾部先端の血糖値を自動血糖測定器 (Glutest Pro,

Sanwa Kagaku Kenkyusho, Nagoya, Japan) により測定した。

高インスリン正常血糖クランプ法

骨格筋でのインスリン依存性の糖取り込みを評価するため、高インスリン正常血糖クランプ法を実施した (9,37)。実験の2日前に全身麻酔下で二股カテーテルを頸静脈に留置した。高インスリン正常血糖クランプ法は3時間の絶食後、無麻酔下でストレスの無い条件下で実施した。インスリンを 5.0 mU/kg/min の速度でカテーテルより持続的に注入した状態で 5 分ごとに尾部先端の血糖値を測定し、グルコースの安定同位体である 6,6-D₂ グルコース (Sigma-Aldrich, Tokyo, Japan) を含有する 50% グルコースをカテーテルより注入して、血糖値が 120 mg/dl となるよう 60 分間維持した。インスリン注入 30, 45 及び 60 分後には、骨格筋の糖取り込み率 (Rd) を算出するために尾部先端より採血した。骨格筋で代謝されない 6,6-D₂ グルコースを含有することで、投与した 6,6-D₂ グルコース量と血液中で検出された 6,6-D₂ グルコース量から Rd を算出した。Rd とグルコース注入速度 (GIR) を基に肝臓における糖産生量 (EGP) を計算した。

毛細血管血流量

Vincent らが報告した方法 (38) を基に、我々が以前確立した方法 (9) を踏襲

した。高インスリン正常血糖クランプ法の開始時もしくは開始 60 分後に造影剤のソナゾイド (Daiichi Sankyo, Tokyo, Japan) を尾静脈内から投与した。ソナゾイド投与後にマウスの後肢骨格筋に分布する毛細血管の血流量を 40 MHz トランスデューサーを備えた超音波高解像度イメージングシステム (Vevo 770, VisualSonics, Toronto, ON, Canada) により測定し, 30 秒間撮影した。動画は VS-11432 ソフト (Vevo 770, VisualSonics, Toronto, ON, Canada) を用いて解析した。なお, 各動画からバックグラウンドを差し引いた後に解析した。

骨格筋間質におけるインスリン濃度

インスリンの骨格筋間質への拡散量を測定するため, 骨格筋でのマイクロダイアリシス法を実施した (9, 39)。マイクロダイアリシス法はマウスの後肢に半透膜を有する 4 mm の微小透析プローブ (CMA-20, CMA Microdialysis, Stockholm, Sweden) を留置して実施した。骨格筋での想定インスリン濃度を含む 0, 0.5, 1, 1.5 ng/ml のインスリン溶液を灌流液に添加し, 透析液におけるインスリン濃度の正味変化量を算出した。インスリン濃度は超高感度マウスインスリン測定キット (Morinaga Institute of Biological Science, Kanagawa, Japan) を用いて測定した。なお, 回帰分析の結果, 灌流液におけるインスリン濃度と透析液におけるインスリン濃度の間には直線関係が成り立っていた。

骨格筋中のインスリンシグナル

骨格筋におけるインスリンシグナルを確認するため、インスリンをマウスの下大静脈から注入した。インスリン投与の 60 分後に、後肢のヒラメ筋及び腓腹筋を単離後、速やかに液体窒素で凍結し、ウェスタンブロット法に使用した。単離した骨格筋におけるインスリンシグナルの確認方法は Ogihara らの報告を参考にした (40)。ヒラメ筋と腓腹筋を採取後、10-15 mg の重さとなるよう切断し、100 nmo/l インスリンを含有もしくは非含有する 1% BSA/DMEM 中で 37°C にて 10 分間インキュベーションした。続いて、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) にて数回洗浄して反応停止後、液体窒素で速やかに凍結し、ウェスタンブロット法に使用した。

エキセンジン (9-39) の投与

エキセンジン (9-39) (Sigma-Aldrich, Tokyo, Japan) または媒体 (1%ウシ血清アルブミンを添加した生理食塩水) を浸透圧ポンプ (model 1002, DURECT Corporation, Cupertino, CA, USA) を用いて 50 pmol/kg/min の速度となるよう皮下投与を行った (41)。2 週間経過後に浸透圧ポンプを交換し、8 週間投与した。

細胞培養

ヒト冠状動脈内皮細胞 (HCAEC) 及び血管内皮細胞用培地はロンザジャパン株式会社 (Tokyo, Japan) から購入し, 37°C で 5% CO₂ 条件下にて培養した。ウシ胎児血清 (FBS), ヒドロコルチゾン, ヒト上皮増殖因子 (hEGF), 血管内皮増殖因子 (VEGF), R3 インスリン様増殖因子 (IGF) -1, ヒト線維芽細胞増殖因子 (hFGF) - β , アスコルビン酸及びゲンタマイシン/アムホテリシンを培地に添加した。コンフルエントになった細胞を血清非添加培地で 24 時間インキュベーションした。GLP-1 添加の 30 分前に PKA 阻害剤である H89 (Sigma-Aldrich, Tokyo, Japan) を添加し (42), インスリンと AMP 活性化プロテインキナーゼ (AMPK) 特異的活性化剤 (AICAR) は 30 分間インキュベーション後にタンパク質の発現量を確認した。全ての実験は継代数 10 回以内に実施した。

NOS 阻害

高インスリン正常血糖クランプ法を施行中のマウスへ一酸化窒素合成酵素 (NOS) 阻害剤 (L-NAME) (Sigma-Aldrich, Tokyo, Japan) を 50 mg/kg にてボース投与後, 10 mg/kg/h にて持続的に静脈内投与した (43)。投与開始時及び投与 60 分後の毛細血管血流量を測定した。

ウェスタンブロット法

組織及び細胞のホモジナイズ溶液はバッファーA (25 mmol/L トリス塩酸 pH7.4, 10 mmol/L オルトバナジン酸ナトリウム, 10 mmol/L ピロリン酸ナトリウム, 100 mmol/L フッ化ナトリウム, 10 mmol/L エチレンジアミン四酢酸, 10 mmol/L グリコールエーテルジアミン四酢酸及び 1 mmol/L フェニルメチルスルホニルフルオリド) を用いて調製した。IR β の検出には, ホモジナイズ溶液を IR β のウサギポリクローナル抗体と 4°C で一晩中反応させた。その後, プロテイン G セファロースビーズ懸濁液を加えて 4°C で 1 時間反応させた。バッファーA で 3 回洗浄した後, 免疫複合体を 7%もしくは 10%の SDS-PAGE にて分離した。分離したタンパク質をポリフッ化ビニリデン (PVDF) 膜 (General Electric Company, Tokyo, Japan) に転写し, それぞれの抗体を用いて検出した。検出には ECL キット (General Electric Company, Tokyo, Japan) を使用した。

IR β (sc-711) 及び β -アクチン (sc-1616) に対する抗体は Santa Cruz Biotechnology (Dallas, USA) より購入した。Akt (#9272), p-Akt (Ser-473) (#9271), AMPK α (#2532), p-AMPK α (Thr-172) (#2531) 及び p-eNOS (Ser-473) (#9271) は Cell Signaling Technology (Danvers, USA) より購入した。pY (05-321) は Upstate Biotechnology (Lake Placid, USA) より, eNOS (610297) は BD pharmingen (Franklin Lakes, USA) より購入した。

RNA 抽出及び RT-PCR

組織・臓器及び細胞からトータル RNA を抽出する際は、説明書に従って Trizol 試薬 (Thermo Fisher Scientific, Yokohama, Japan) 及び RNeasy Mini Kit (Qiagen Sciences, Germantown, MD, USA) を使用した。1 μ g のトータル RNA を用いて、MultiScribe 逆転写酵素 (Thermo Fisher Scientific, Yokohama, Japan) とランダムヘキサマー (Thermo Fisher Scientific, Yokohama, Japan) により cDNA を作成した。Taqman プローブ (Thermo Fisher Scientific, Yokohama, Japan) を用いてリアルタイム PCR を実施した。なお、内部標準遺伝子である GAPDH もしくは β -アクチンを用いて各遺伝子の定量値を補正した。

TNF α (Mm00443258_m1), MCP-1 (Mm00441242_m1), Resistin (Mm00445641_m1),

RBP4 (Mm00803264_g1), VEGF (Mm01281449_m1), GAPDH (Mm99999915_g1),

β -アクチン (Mm00607939_s1)

GLP-1 受容体 Forward : CTCTTCTAACCTCAGCCAAACA

GLP-1 受容体 Reverse : ACACCACCTACAGCCATTTC

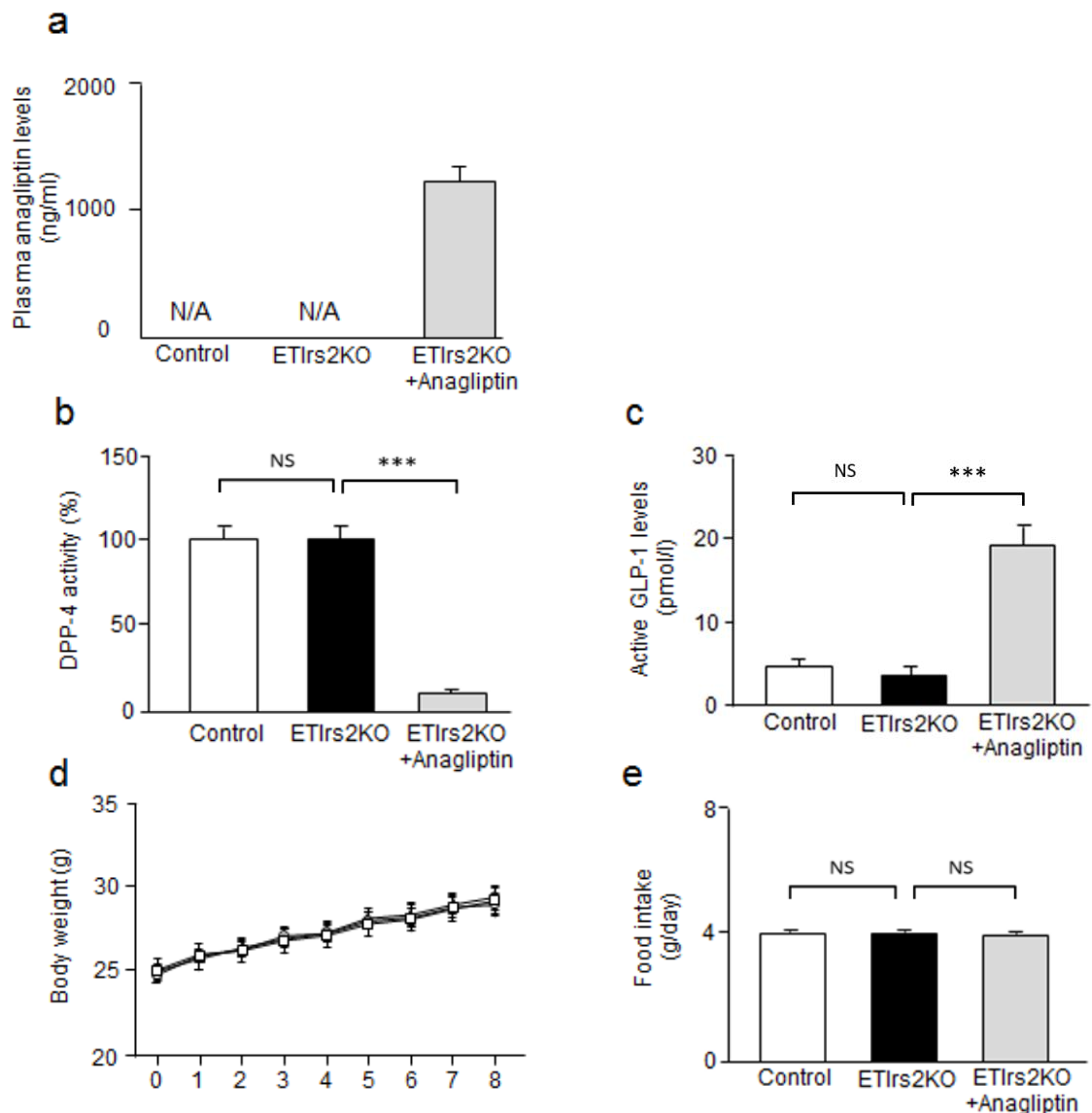
統計解析

一元配置分散分析を実施後、テューキー・クレーマー法による多重検定を実施した。統計的有意水準は 5% とし、結果は平均値 \pm 標準誤差で記載した。

4 結果

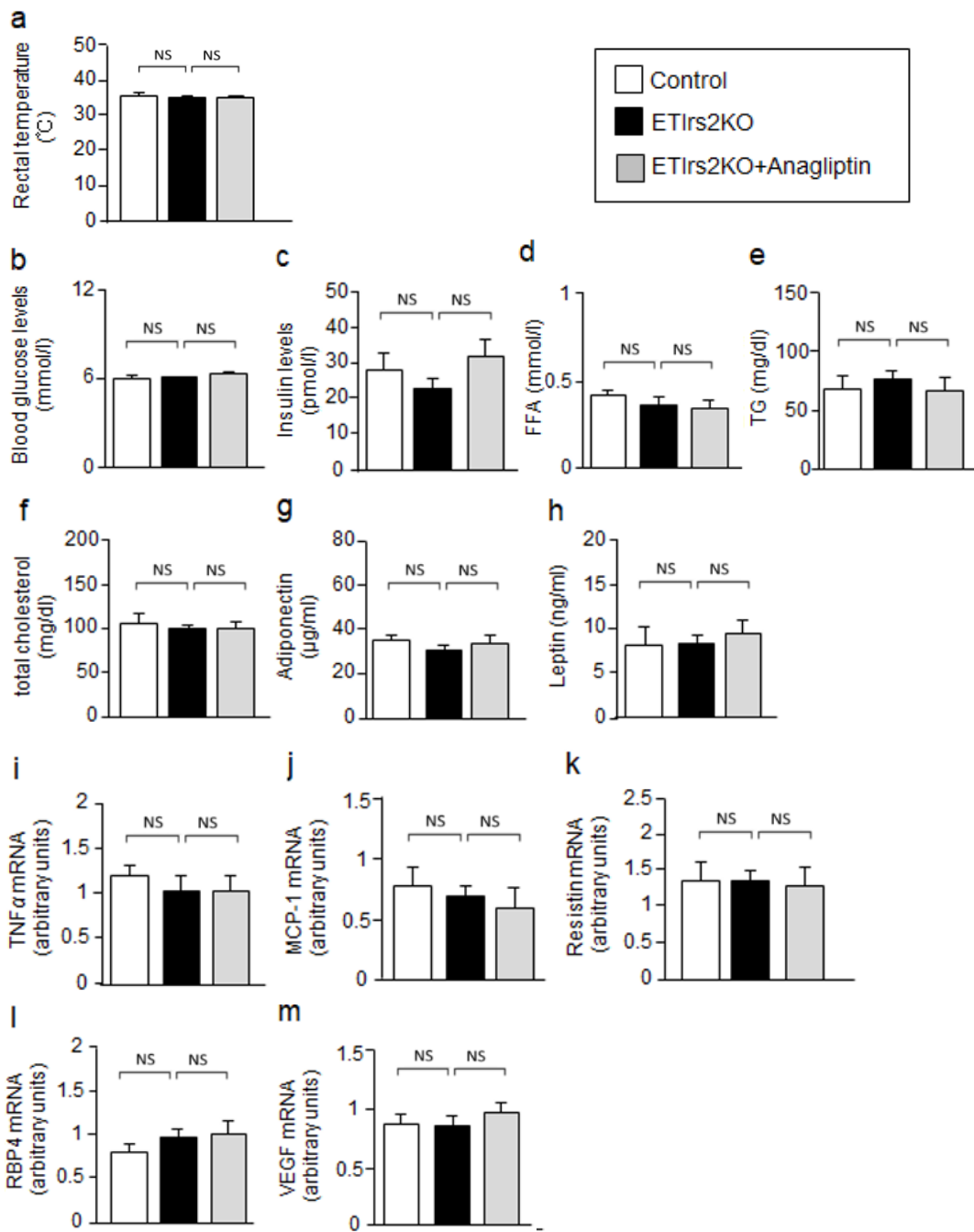
1) ETIrs2 欠損マウスで見られたインスリン依存性の骨格筋における糖取り込み低下をアナグリプチンは改善する

アナグリプチンを ETIrs2 欠損マウスに 8 週間投与後の血漿中アナグリプチン濃度は約 1200 ng/ml であり (図 4-a), 健康成人にアナグリプチンを投与した時の血漿中アナグリプチン濃度と同程度であった (44)。その時の血漿中 DPP-4 活性は 90 % 近く阻害され (図 4-b), 血漿中活性型 GLP-1 濃度は有意に増加した (図 4-c)。一方, 体重や摂餌量は 3 群間で差はなかった (図 4-d, e)。また, 直腸温, 血糖値, 中性脂肪 (TG), トータルコレステロール及び炎症性サイトカイン等のパラメータ値についても有意な差は見られなかった (図 5-a-m)。これらの結果より, アナグリプチンは体重や摂餌量に影響を及ぼすことなく, 血漿中活性型 GLP-1 濃度を増加させることが分かった。



a : 血漿中アナグリプチン濃度 (n=21-24), b,c : 血漿中 DPP-4 活性, 血漿中活性型 GLP-1 濃度 (n=21-24), d : 体重推移(n=15), e : 摂餌量(n=7). *** : $p < 0.001$, N/A : not applicable, NS : not significant, mean \pm SEM,

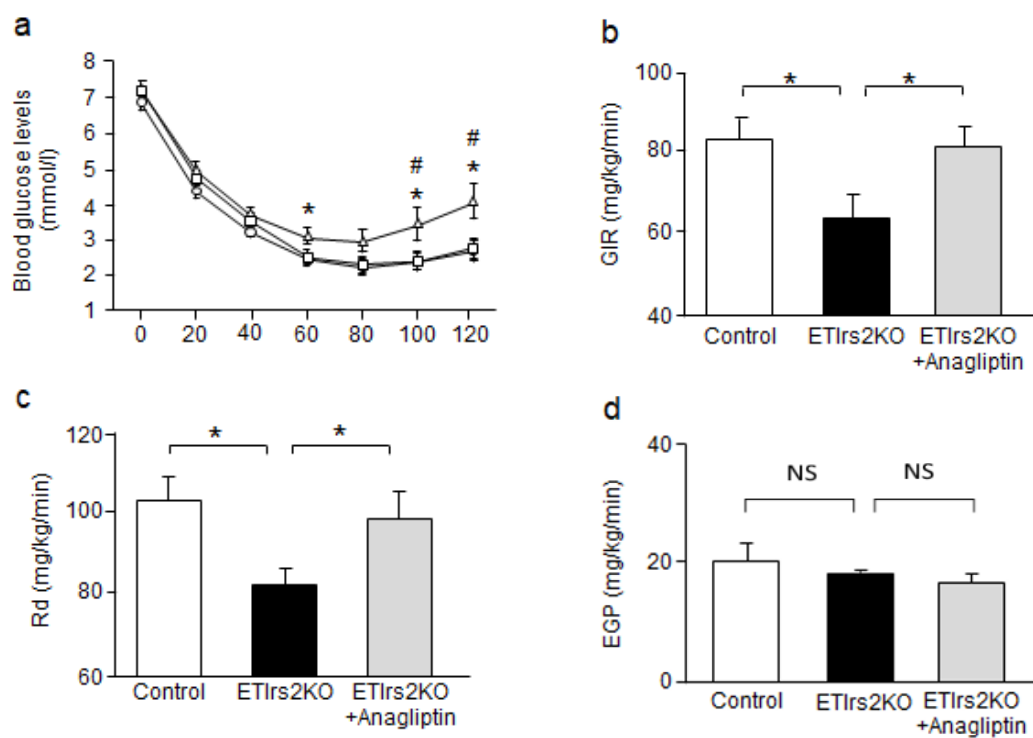
(図 4)



a : 直腸温(n = 10), b-h : 血糖値, 血漿インスリン, 遊離脂肪酸 (FFA), 中性脂肪 (TG), 総コレステロール, アディポネクチン, レプチン (n = 9-12), i-m : TNF α mRNA, MCP-1 mRNA, Resistin mRNA, RBP4 mRNA, VEGF mRNA (n = 4-7). NS : not significant, mean \pm SEM

(図 5)

インスリン抵抗性の評価を行うため、インスリン負荷試験 (ITT) を実施した。当研究室で以前報告した通り (9), ETIrs2 欠損マウスではコントロールマウスと比べて、インスリンの血糖低下作用が弱くインスリン抵抗性を呈したが、アナグリプチンを投与することによりインスリン抵抗性の改善が見られた (図 6-a)。つづいて、高インスリン正常血糖クランプ法を実施したところ、ETIrs2 欠損マウスでは GIR の低下が見られたが、アナグリプチンを投与することにより有意な改善が見られた (図 6-b)。さらに、アナグリプチン投与群ではコントロールマウス群と同程度にまで Rd が改善していた (図 6-c)。一方で、EGP については 3 群間で有意な差は見られなかった (図 6-d)。これらの結果より、アナグリプチンは ETIrs2 欠損マウスにて見られたインスリン依存性の骨格筋の糖取り込み減少を改善することが明らかとなった。

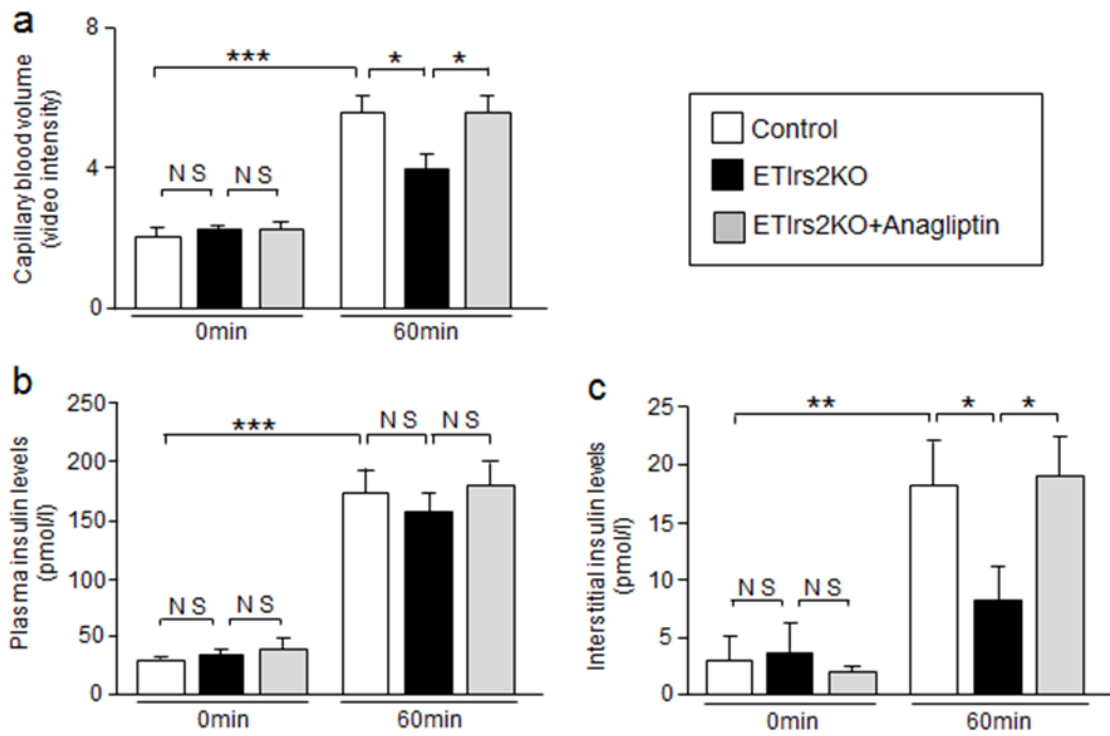


a : ITT 実施時の血糖値 (○ : Control, △ : ETIrs2KO, □ : ETIrs2KO+Anagliptin) (n = 13-15), * : $p < 0.05$, Control vs ETIrs2KO, # : $p < 0.05$, ETIrs2KO vs ETIrs2KO+Anagliptin. b-d : 高インスリン正常血糖クランプ法実施時の GIR, Rd, EGP (n = 7-9), * : $p < 0.05$, NS : not significant, mean \pm SEM.

(図 6)

2) アナグリプチンは ETIrs2 欠損マウスで見られたインスリンによる毛細血管拡張能や間質におけるインスリン濃度の減少を改善する

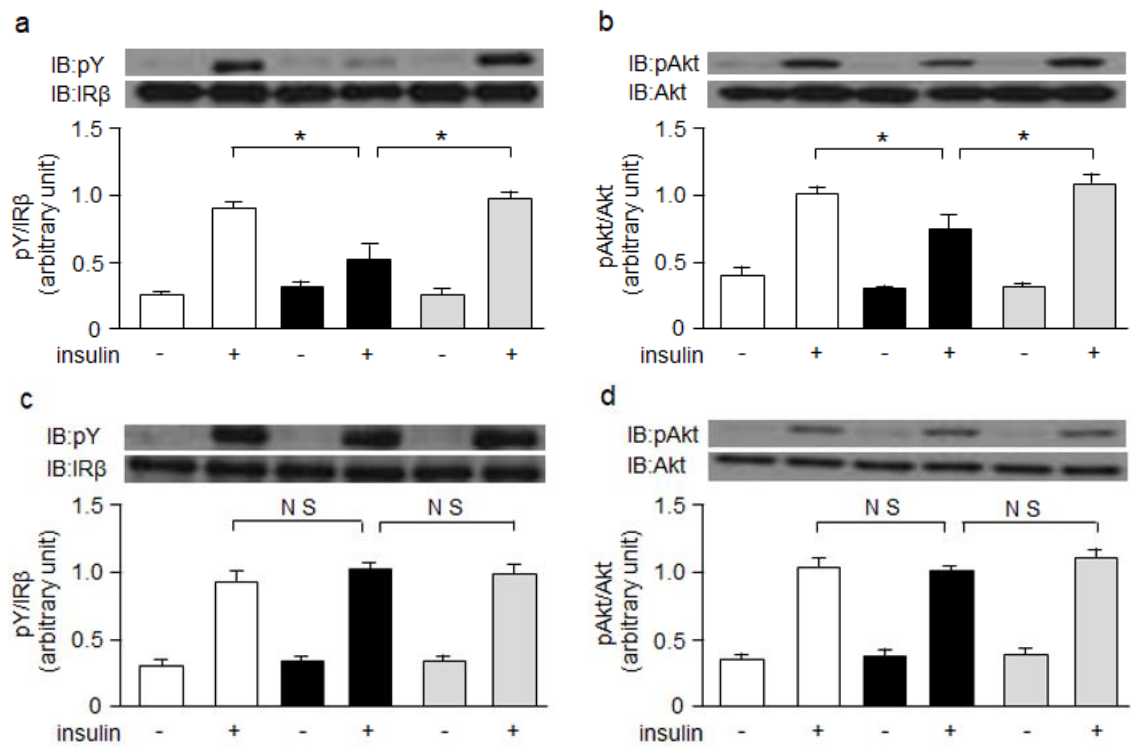
アナグリプチンによるインスリン依存性の骨格筋での糖取り込み減少改善メカニズムを確認するため、高インスリン正常血糖クランプ法を施行後の毛細血管血流量を測定した。その結果、ETIrs2 欠損マウスで見られたインスリンによる毛細血管拡張能の低下は、アナグリプチンを投与することでコントロールマウスと同程度にまで改善した (図 7-a)。さらに、高インスリン正常血糖クランプ法を施行後の骨格筋間質におけるインスリン濃度を測定した結果、血漿中インスリン濃度は 3 群間で明らかな差がなかったにも関わらず、ETIrs2 欠損マウスで見られた骨格筋間質におけるインスリン濃度低下はアナグリプチンの投与で有意な改善が見られた (図 7-b, c)。



a-c : 高インスリン正常血糖クランプ法実施時の毛細血管血流量，血漿中インスリン濃度，間質のインスリン濃度 (n = 9-12). * : p < 0.05, ** : p < 0.01, *** : p < 0.001, NS : not significant, mean ± SEM.

(図 7)

続いて、骨格筋のインスリンシグナルを確認するため、マウスの下大静脈からインスリンを投与して 60 分経過後の骨格筋を単離してウェスタンブロット法を実施した。その結果、ETIrs2 欠損マウスで見られた骨格筋のインスリン受容体 (IR β) や Akt のリン酸化減少は、アナグリプチンを投与することで有意な改善が見られた (図 8-a, b)。一方で、単離後の骨格筋にインスリンを添加した際の IR β 及び Akt のリン酸化は 3 群間で明らかな差はなかった (図 8-c, d)。今回得られた結果より、アナグリプチンは骨格筋自体に作用するのではなく、骨格筋に分布する毛細血管の血流量低下を改善し、骨格筋間質へのインスリンの拡散障害を改善することで、骨格筋におけるインスリンシグナルの活性低下を改善すると考えられた。

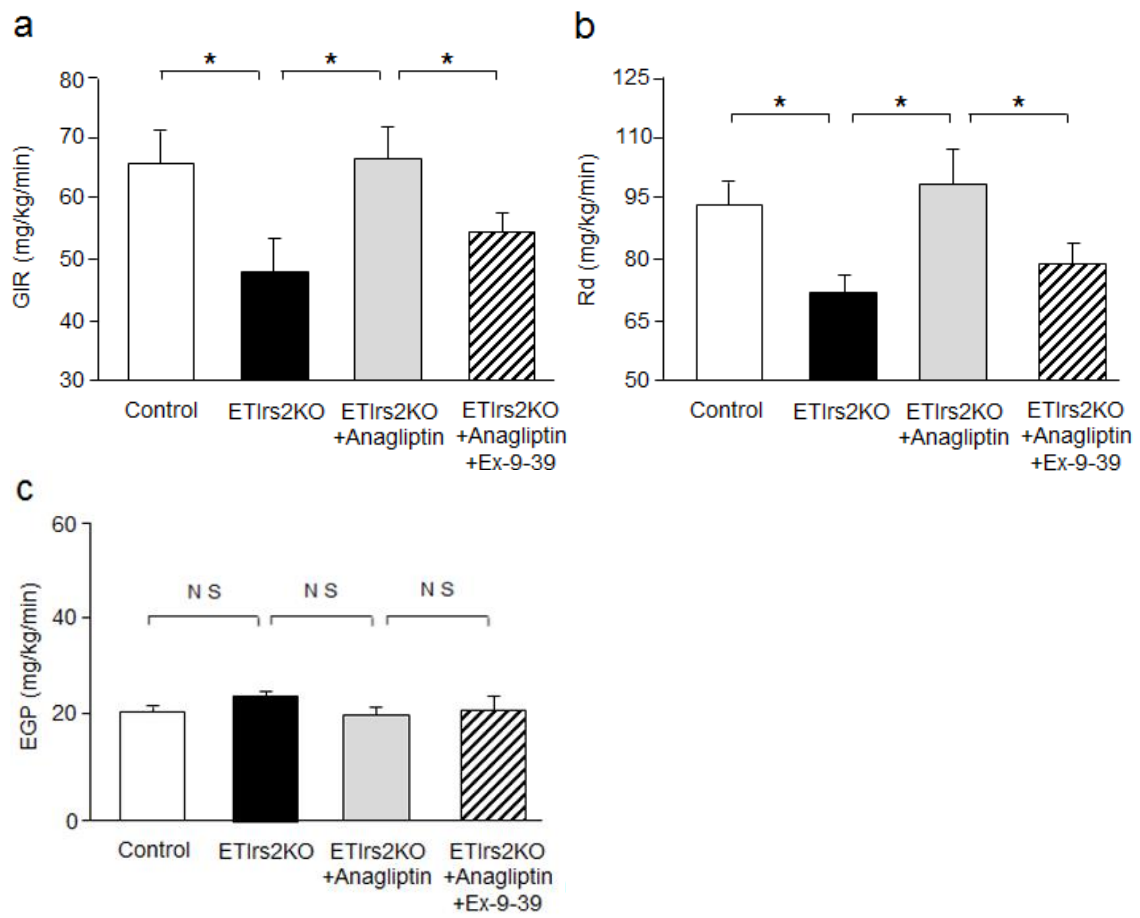


a, b : インスリン投与後に単離した骨格筋の pY, pAkt タンパク発現 (n = 4),
 c, d : 骨格筋単離後にインスリンを添加した際の pY, pAkt タンパク発現 (n = 4),
 * : p < 0.05, NS : not significant, mean ± SEM.

(図 8)

3) アナグリプチンは ETIrs2 欠損マウスにて見られたインスリン依存性の骨格筋における糖取り込み減少を GLP-1 依存性に改善する

アナグリプチンの投与により増加した GLP-1 が、インスリン依存性の骨格筋での糖取り込み低下改善作用にどの程度寄与しているのか確認するため、GLP-1 受容体阻害薬であるエキセンジン (9-39) をアナグリプチン投与群に投与した。その結果、アナグリプチン投与群で見られたインスリン依存性の骨格筋における糖取り込み改善作用は、エキセンジン (9-39) の投与によってキャンセルされた (図 9-a, b)。一方、EGP については各群間で明らかな差は見られなかった (図 9-c)。つまり、アナグリプチンは ETIrs2 欠損マウスで見られたインスリン依存性の骨格筋における糖取り込み低下を GLP-1 依存的に改善することが確認された。

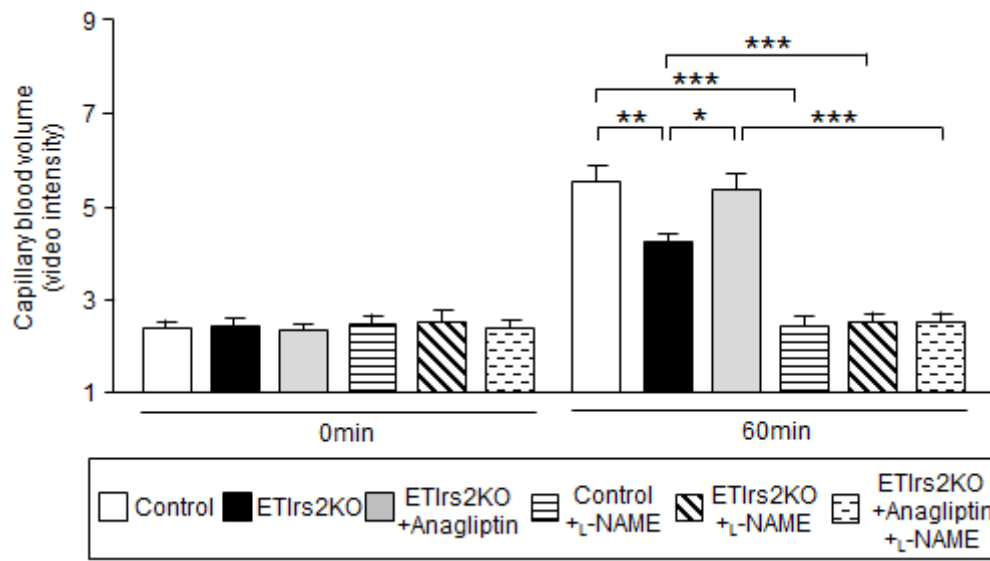


a-c : 高インスリン正常血糖クランプ法実施時の GIR, Rd, EGP (n = 8-11), * : $p < 0.05$, NS : not significant, mean \pm SEM.

(図 9)

4) アナグリプチンは ETIrs2 欠損マウスで見られたインスリンによる毛細血管拡張能の低下を NO 依存性に改善する

アナグリプチンによる毛細血管拡張能の低下改善作用が NO 依存的メカニズムかどうか確認するため、NOS 阻害剤である L-NAME をアナグリプチン投与群に処置した。その結果、インスリン投与前における毛細血管血流量は実施した 6 群間で明らかな差は見られなかったが、アナグリプチン投与群において見られたインスリン投与 60 分後の毛細血管血流量低下改善作用は L-NAME 投与によってキャンセルされた (図 10)。すなわち、アナグリプチンは ETIrs2 欠損マウスで見られたインスリンによる毛細血管拡張能の低下を NO 依存性に改善すると考えられた。

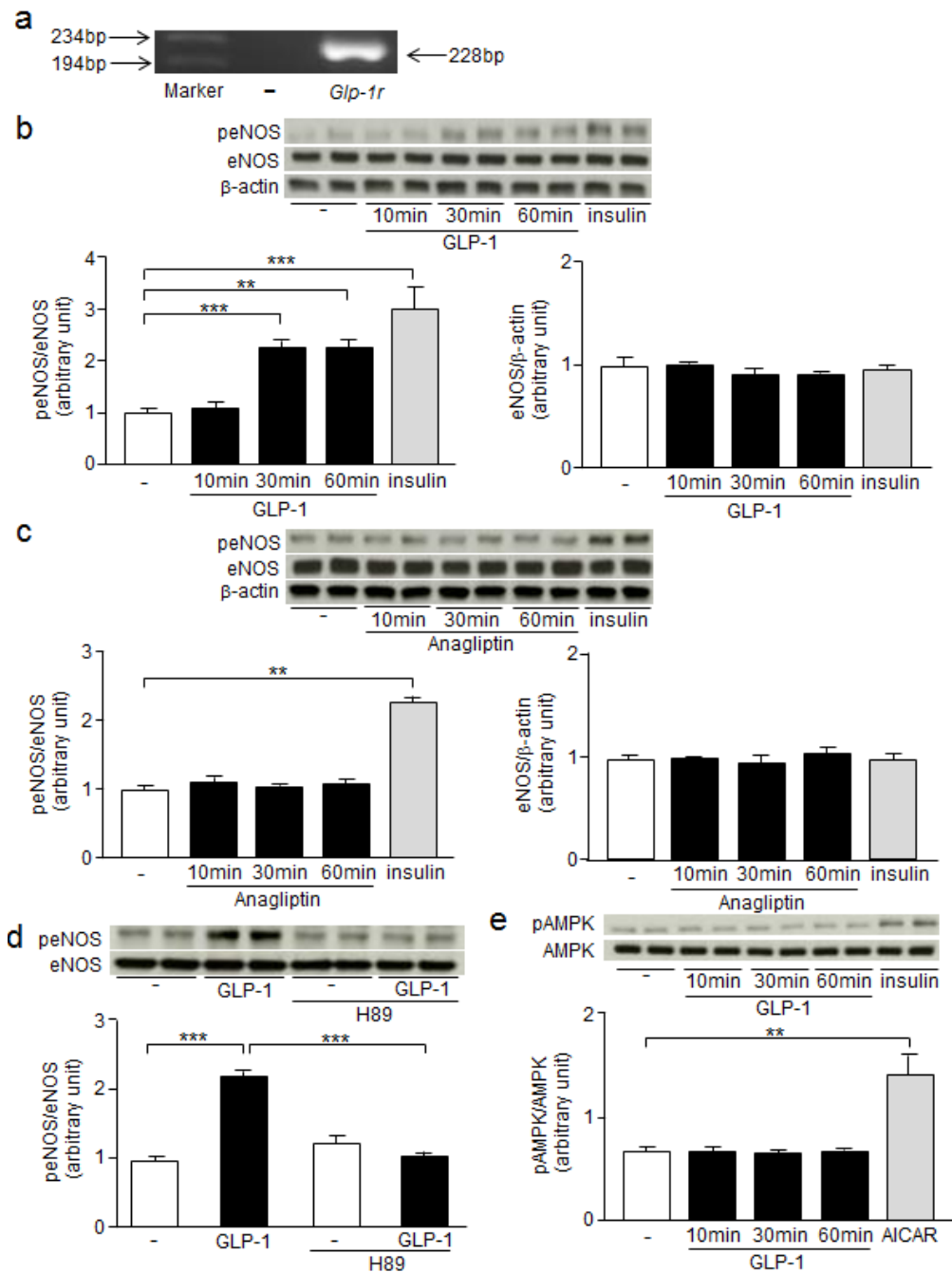


高インスリン正常血糖クランプ法実施時の毛細血管血流量(n = 8-12), * : p < 0.05, ** : p < 0.01, *** : p < 0.001, mean ± SEM.

(図 10)

5) GLP-1 は PKA を介して eNOS をリン酸化する

まず初めに、血管内皮細胞に GLP-1 受容体が発現しているかどうか確認するため、ヒト冠状動脈内皮細胞 (HCAEC) における GLP-1 受容体の発現を PCR により確認した (図 11-a)。続いて、HCAEC に GLP-1 を添加した際の eNOS のリン酸化及び eNOS のタンパク発現量を確認した。その結果、GLP-1 の添加によって eNOS タンパク発現量に変化はなかったが、GLP-1 添加 30 及び 60 分後に eNOS がリン酸化されることが分かった (図 11-b)。一方、アナグリプチンを HCAEC に直接添加しても、eNOS のリン酸化及びタンパク発現量に変化はなかった (図 11-c)。つまり、アナグリプチンによる血管内皮細胞への直接作用ではなく、アナグリプチンの投与により増加した GLP-1 が血管内皮細胞における eNOS を活性化する可能性が考えられた。さらに、PKA 阻害剤の存在下においては、GLP-1 による eNOS のリン酸化が見られなかった (図 11-d)。Wei らの報告によると、GLP-1 受容体作動薬が血管内皮細胞中で AMPK をリン酸化することが確認されているため (45)、AMPK のリン酸化を確認したが、本試験においては GLP-1 によって AMPK はリン酸化しなかった (図 11-e)。



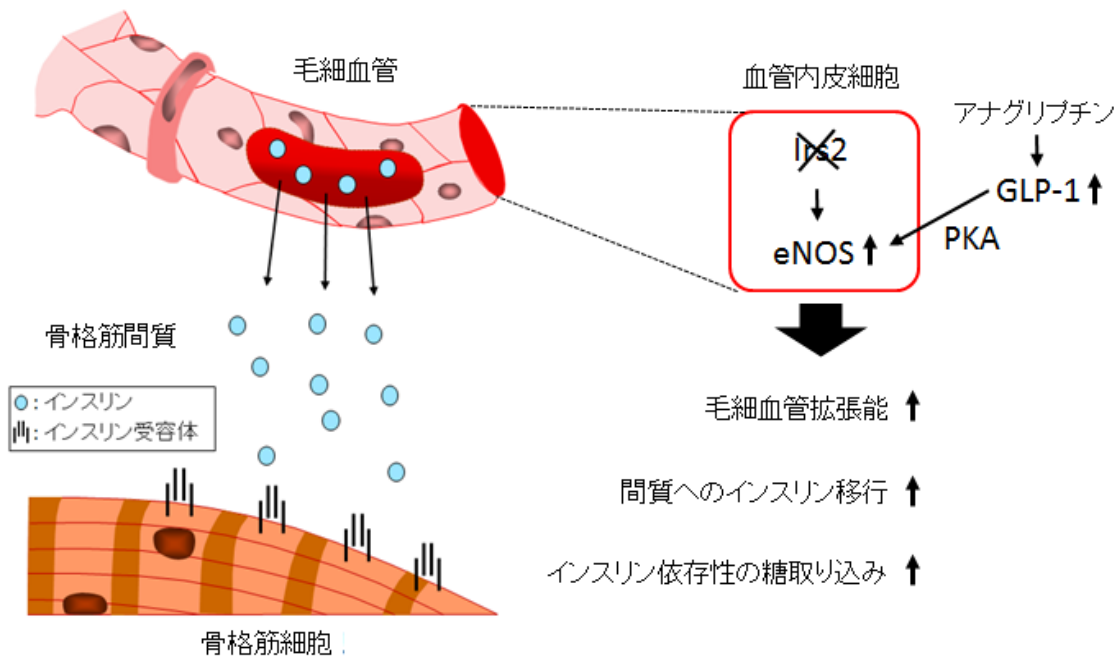
a : HCAEC における GLP-1 受容体の発現, b, c : HCAEC に GLP-1 もしくはアナグリプチン添加後の peNOS, eNOS タンパク発現 (n = 4-6), d : HCAEC に H89 前添加時の GLP-1 による peNOS タンパク発現 (n = 4-6), e : HCAEC に GLP-1 添加後の pAMPK タンパク発現 (n = 4-6), ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.001$, mean \pm SEM.

(図 11)

5 考察

本研究において、ETIrs2 欠損マウスで見られたインスリンによる毛細血管拡張能の低下、骨格筋間質へのインスリンの拡散障害及び骨格筋におけるインスリン依存性の糖取り込み低下がアナグリプチンの投与によって有意に改善することが分かった。また、アナグリプチン投与によるこれらの改善作用は、GLP-1 や NO を介した作用であることも確認した。さらに、アナグリプチンによる血管内皮細胞への直接的な作用ではなく、アナグリプチンを投与することにより増加した活性型 GLP-1 が PKA 依存的に eNOS を活性化する可能性が考えられた。すなわち、アナグリプチンは骨格筋に分布する毛細血管内皮細胞において、インスリンシグナルを介さずに GLP-1 依存的に eNOS を活性化し、毛細血管拡張能を増加させることで、骨格筋間質へのインスリンの拡散量を増やし、インスリン依存性の骨格筋における糖取り込みを増加させる可能性が示唆された (図 12)。

アナグリプチンの作用メカニズム



(引用文献 9 より改変)

(図 12)

臨床試験において、GLP-1 受容体作動薬がインスリン抵抗性を改善することが確認されている (46, 47)。また、DPP-4 阻害薬が肥満・高血圧自然発症ラット (SHR/NDmcr-cp) の内皮機能低下を改善することで、インスリン抵抗性の改善に寄与した報告もある (48)。しかし、GLP-1 受容体作動薬によるヒトのインスリン抵抗性改善作用には体重減少等を伴っていた。また、SHR/NDmcr-cp ラットはレプチン受容体遺伝子にナンセンス変異を有し、高血糖、高血圧、インスリン抵抗性、肥満、炎症性サイトカイン値の上昇及び高脂血症を呈す

る。そのため、DPP-4 阻害薬を投与することにより、耐糖能異常や炎症性サイトカイン値の上昇を改善した。したがってこれらの報告からは、GLP-1 受容体作動薬や DPP-4 阻害薬による直接作用なのか、または危険因子プロファイルの改善による間接作用によってインスリン抵抗性を改善したのか判断し難かった。一方、ETIrs2 欠損マウスは内皮機能障害を呈するにも関わらず、肥満、高脂血症、炎症性サイトカイン値及びアディポサイトカイン値等の危険因子プロファイルはコントロールマウスと同程度であり、アナグリプチンの投与によっても変化は見られなかった（図 4-d,e 及び図 5-a-m）。そのため本研究成果は、DPP-4 阻害薬の投与により改善する危険因子プロファイルの影響を排除した結果であると考えている。

アナグリプチン自体は血管内皮細胞中で eNOS をリン酸化しなかったが、GLP-1 が PKA を介して eNOS をリン酸化することが確認できた。本研究結果と同様に、松原らは、DPP-4 阻害薬自体は HCAEC 中で eNOS をリン酸化しなかったが、GLP-1 単独もしくは GLP-1 に DPP-4 阻害薬を添加した際に eNOS がリン酸化されると報告している (49)。また、GLP-1 による eNOS のリン酸化が PKA 阻害剤によって阻害されることも本試験内で確認した。Dong らは、ラットに GLP-1 を持続注入した際に毛細血管の血流量が増加するが、PKA 阻害剤

の存在下ではこの血流増加が阻害されると報告している (42)。これらの知見より、本研究では GLP-1 による eNOS のリン酸化作用を培養細胞を用いて確認したが、アナグリプチンの投与によって増加した活性型 GLP-1 が、PKA 依存性に骨格筋に分布する毛細血管内皮細胞において、eNOS のリン酸化を亢進している可能性が示唆された。

ETIrs2 欠損マウスは骨格筋だけでなく、肝臓等に分布する毛細血管の IRS2 遺伝子も欠損されているが、肝臓でのインスリン抵抗性を呈していないのは何故だろうか。インスリンが各臓器へ作用するためには、膵臓から分泌された後、血液中から毛細血管を介して各臓器へ移行する必要があるが、毛細血管の内壁に存在する内皮細胞がその拡散を制御していると考えられる。インスリンによる血管内皮細胞の拡散メカニズムを検討した報告では、インスリンは血管内皮細胞に発現するインスリン受容体を介して拡散していると考えられた (50)。一方、毛細血管の構造は臓器ごとにそれぞれ異なると考えられている (51) (図 13)。

- ・ 心筋や骨格筋などにおいて観察される連続性毛細血管
- ・ 内分泌腺や腎糸球体などにおいて観察される有窓性毛細血管
- ・ 造血組織や肝臓において観察される洞様毛細血管

そのため、分子量が 5807 もあるインスリンのような高分子の場合、血液から組織への拡散が各臓器によって異なると考えられる。実際、イヌの骨格筋におけるインスリンの拡散について検討した報告によると、骨格筋におけるインスリンの拡散メカニズムとして、インスリン受容体を介さない拡散メカニズムがあると示唆されている (52)。さらに、高カロリー高脂肪食により、骨格筋と肝臓のインスリン抵抗性を惹起したイヌにおいて、インスリンとほぼ同様の分子量であるイヌリンを投与した際の組織内分布を普通食のイヌと比較したところ、肝臓においては差が認められなかったが、骨格筋においてはイヌリンの分布が低下していた (53)。つまり、インスリンの骨格筋細胞への拡散障害が、骨格筋でのインスリン抵抗性の発症メカニズムの一つであると考えられた。

各臓器における毛細血管の構造

連続性毛細血管(骨格筋、心筋など)
閉鎖結合によって内皮細胞が連結された連続的な内皮細胞層を示す。



有窓性(小孔性)毛細血管
(腎糸球体、内分泌腺、外分泌腺など)
内皮の薄膜化した部分に大きさの異なる孔(fenester)がある。



洞様毛細血管(肝小葉、造血組織など)
比較的直径が大きい毛細血管である。
血管壁には有窓性毛細血管と同様な孔と断裂の両方みられ、細胞成分が血液と組織の間を細胞が移動できる。



(引用文献 50 より転載)

(図 13)

運動療法は食事療法と並んで、2型糖尿病における最も重要な治療法である(54)。運動療法による血糖コントロール改善作用の一つに、骨格筋におけるインスリン抵抗性改善作用があげられる(55)。運動をすると筋肉量が増加し、骨格筋における糖の取り込み容量が増加することに加えて、骨格筋への糖の輸送担体である glucose transporter type 4 (GLUT4)が増加することで、骨格筋への糖の取り込み量が増加する(56)。また、身体活動の増加がインスリン依存性の血管拡張作用や骨格筋への血流増加作用を有することが多くの研究で報告されている(57-59)。さらに、2017年の報告では、健康成人への運動負荷が骨格筋に分布する毛細血管の血流量を増加させ、骨格筋のインスリン感受性を亢進させることが確認されている(60)。そのため、本研究で得られたアナグリプチンの作用は、運動療法で得られる効果と一部重なる可能性が示唆されたが、更なる検討が必要である。

2008年に米国食品医薬品局(FDA)がガイダンスを発表し、米国で2型糖尿病治療薬を新規に申請する際は、心血管に対する安全性データを提出することが義務付けられたため、2008年以降、糖尿病治療薬の心血管アウトカム大規模臨床試験が実施されている。DPP-4阻害薬についても5つの試験が実施されているが、いずれの試験においても、主要評価項目である心血管死、非致死的心

筋梗塞，非致死的脳卒中のイベント発症率は対照薬に比して非劣性であった (61-65)。一方で，GLP-1 受容体作動薬についても同様の試験が行われているが，対照薬に対して，心血管死や非致死的脳卒中のイベント抑制作用が確認されている (66, 67)。両薬剤は主に GLP-1 を介した作用を有するが，DPP-4 阻害薬は膵臓から分泌された GLP-1 の分解を抑制するため，分泌量自体に及ぼす影響は少ない。一方で，GLP-1 受容体作動薬は DPP-4 に耐性を持つ GLP-1 を高濃度投与するため，GLP-1 の作用が強く見られる。実際に，先の大規模臨床試験においても，GLP-1 受容体作動薬は大血管に作用して血圧を低下させている (66, 67)。本試験において，アナグリプチンによる毛細血管への作用については確認されたが，大血管には影響を及ぼさなかった。また，ETIrs2 欠損マウスは毛細血管の拡張能障害による骨格筋インスリン抵抗性を呈する比較的早期の 2 型糖尿病モデルマウスであると考えられる。これらのことから，骨格筋インスリン抵抗性を呈する早期の 2 型糖尿病患者に対して DPP-4 阻害薬を投与することで，毛細血管拡張能を介した骨格筋インスリン抵抗性を改善する可能性が示唆された。

6 謝辞

本学位論文を作成する際に多大なご協力とご指導を賜りました，指導教員であります東京大学大学院医学系研究科 代謝・栄養病態学 山内敏正教授に感謝しております。本研究を実施するにあたり，有益なご指導とご助言を賜りました国家公務員共催組合連合会 虎の門病院 院長 門脇孝先生ならびに東京大学医学部附属病院 病態栄養治療部 部長 窪田直人准教授に深く感謝しております。本研究を実施する際に，数多くのご助言とご協力を頂きました東京大学大学院医学系研究科 代謝・栄養病態学の皆様に感謝しております。いつも応援してくれた妻及び二人の子供達に感謝して謝辞といたします。

7 引用文献

1. Kadowaki T, Miyake Y, Hagura R, Akanuma Y, Kajinuma H, Kuzuya N, Takaku F, Kosaka K. Risk factors for worsening to diabetes in subjects with impaired glucose tolerance. *Diabetologia*. 26, 44-49 (1984).
2. Kadowaki T. Insights into insulin resistance and type 2 diabetes from knockout mouse models. *J Clin Invest*. 106, 459-465 (2000).
3. DeFronzo RA, Tobin JD, Andres R. Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance. *Am J Physiol*. 237, E214-223 (1979)
4. Bergman RN. Toward physiological understanding of glucose tolerance. Minimal-model approach. *Diabetes*. 38, 1512-1527 (1989)
5. White MF, Kahn CR. The insulin signaling system. *J Biol Chem*. 269, 1-4 (1994)
6. Petersen KF, Dufour S, Befroy D, Garcia R, Shulman GI. Impaired mitochondrial activity in the insulin-resistant offspring of patients with type 2 diabetes. *N Engl J Med*. 350, 664-671 (2004)
7. Vincent MA, Clerk LH, Rattigan S, Clark MG, Barrett EJ. Active role for the vasculature in the delivery of insulin to skeletal muscle. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 32, 302-307 (2005)

8. Long YC, Zierath JR. Influence of AMP-activated protein kinase and calcineurin on metabolic networks in skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 295, E545-E552 (2008)
9. Kubota T, Kubota N, Kumagai H, Yamaguchi S, Kozono H, Takahashi T, Inoue M, Itoh S, Takamoto I, Sasako T, Kumagai K, Kawai T, Hashimoto S, Kobayashi T, Sato M, Tokuyama K, Nishimura S, Tsunoda M, Ide T, Murakami K, Yamazaki T, Ezaki O, Kawamura K, Masuda H, Moroi M, Sugi K, Oike Y, Shimokawa H, Yanagihara N, Tsutsui M, Terauchi Y, Tobe K, Nagai R, Kamata K, Inoue K, Kodama T, Ueki K, Kadowaki T. Impaired insulin signaling in endothelial cells reduces insulin-induced glucose uptake by skeletal muscle. *Cell Metab.* 13, 294-307 (2011)
10. Sherwin RS, Kramer KJ, Tobin JD, Insel PA, Liljenquist JE, Berman M, Andres R. A model of the kinetics of insulin in man. *J Clin Invest.* 53, 1481-1492 (1974)
11. Yang YJ, Hope ID, Ader M, Bergman RN. Insulin transport across capillaries is rate limiting for insulin action in dogs. *J Clin Invest.* 84, 1620-1628 (1989)
12. Sjöstrand M, Gudbjörnsdottir S, Holmäng A, Lönn L, Strindberg L, Lönnroth P. Delayed transcapillary transport of insulin to muscle interstitial fluid in obese subjects. *Diabetes.* 51, 2742-2748 (2002)
13. Nauck MA, Homberger E, Siegel EG, Allen RC, Eaton RP, Ebert R, Creutzfeldt W.

Incretin effects of increasing glucose loads in man calculated from venous insulin and C-peptide responses. *J Clin Endocrinol Metab.* 63, 492-498 (1986)

14. Moore B. On the treatment of Diabetes mellitus by acid extract of Duodenal Mucous Membrane. *Biochem J.* 1, 28-38 (1906)

15. Brown JC, Pederson RA, Jorpes E, Mutt V. Preparation of highly active enterogastrone. *Can J Physiol Pharmacol.* 47, 113-114 (1969)

16. Bell GI, Santerre RF, Mullenbach GT. Hamster preproglucagon contains the sequence of glucagon and two related peptides. *Nature.* 302, 716-718 (1983)

17. Yamada C, Yamada Y, Tsukiyama K, Yamada K, Yamane S, Harada N, Miyawaki K, Seino Y, Inagaki N. Genetic inactivation of GIP signaling reverses aging-associated insulin resistance through body composition changes. *Biochem Biophys Res Commun.* 364, 175-180 (2007)

18. Drucker DJ, Nauck MA. The incretin system: glucagon-like peptide-1 receptor agonists and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in type 2 diabetes. *Lancet.* 368, 1696-1705 (2006)

19. Mest HJ, Mentlein R. Dipeptidyl peptidase inhibitors as new drugs for the treatment of type 2 diabetes. *Diabetologia.* 48, 616-620 (2005)

20. Willms B, Werner J, Holst JJ, Orskov C, Creutzfeldt W, Nauck MA. Gastric

emptying, glucose responses, and insulin secretion after a liquid test meal: effects of exogenous glucagon-like peptide-1 (GLP-1)-(7-36) amide in type 2 (noninsulin-dependent) diabetic patients. *J Clin Endocrinol Metab.* 81, 327-332 (1996)

21. Holst JJ, The physiology of glucagon-like peptide 1. *Physiol Rev.* 87, 1409-1439 (2007)

22. Wang Q, Brubaker PL. Glucagon-like peptide-1 treatment delays the onset of diabetes in 8 week-old db/db mice. *Diabetologia.* 45, 1263-1273 (2002)

23. Mentlein R, Gallwitz B, Schmidt WE. Dipeptidyl-peptidase IV hydrolyses gastric inhibitory polypeptide, glucagon-like peptide-1(7-36)amide, peptide histidine methionine and is responsible for their degradation in human serum. *Eur J Biochem.* 214, 829-835 (1993)

24. Deacon CF, Nauck MA, Toft-Nielsen M, Pridal L, Willms B, Holst JJ. Both subcutaneously and intravenously administered glucagon-like peptide I are rapidly degraded from the NH₂-terminus in type II diabetic patients and in healthy subjects. *Diabetes.* 44, 1126-1131 (1995)

25. Deacon CF, Johnsen AH, Holst JJ. Degradation of glucagon-like peptide-1 by human plasma in vitro yields an N-terminally truncated peptide that is a major endogenous metabolite in vivo. *J Clin Endocrinol Metab.* 80, 952-957 (1995)

26. Drucker DJ. The biology of incretin hormones.. *Cell Metab.* 3, 153-165 (2006)
27. Chai W, Zhang X, Barrett EJ, Liu Z. Glucagon-like peptide 1 recruits muscle microvasculature and improves insulin's metabolic action in the presence of insulin resistance. *Diabetes.* 63, 2788-2799 (2014)
28. Erdogdu O, Nathanson D, Sjöholm A, Nyström T, Zhang Q. Exendin-4 stimulates proliferation of human coronary artery endothelial cells through eNOS-, PKA- and PI3K/Akt-dependent pathways and requires GLP-1 receptor. *Mol Cell Endocrinol.* 325, 26-35 (2010)
29. Lambeir AM, Durinx C, Scharpé S, De Meester I. Dipeptidyl-peptidase IV from bench to bedside: an update on structural properties, functions, and clinical aspects of the enzyme DPP IV. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 40, 209-294 (2003)
30. Misumi Y, Hayashi Y, Arakawa F, Ikehara Y. Molecular cloning and sequence analysis of human dipeptidyl peptidase IV, a serine proteinase on the cell surface. *Biochim Biophys Acta.* 1131, 333-336 (1992)
31. Tetsuhiro Tanaka, Yoshiki Higashijima, Takehiko Wada, Masaomi Nangaku. The potential for renoprotection with incretin-based drugs. *Kidney Int.* 86, 701-711 (2014)
32. 加来浩平, 門脇孝. DPP-4 阻害薬-効果的で安全な臨床使用のために-. フジメディカル出版. 2011

33. De Meester I, Korom S, Van Damme J, Scharpé S. CD26, let it cut or cut it down. *Immunol Today*. 20, 367-375 (1999)
34. Hashimoto S, Kubota N, Sato H, Sasaki M, Takamoto I, Kubota T, Nakaya K, Noda M, Ueki K, Kadowaki T. Insulin receptor substrate-2 (Irs2) in endothelial cells plays a crucial role in insulin secretion. *Diabetes*. 64, 876-886 (2015)
35. Furuta S, Tamura M, Hirooka H, Mizuno Y, Miyoshi M, Furuta Y. Pharmacokinetic disposition of anagliptin, a novel dipeptidyl peptidase-4 inhibitor, in rats and dogs. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet*. 38, 87-96 (2013)
36. Deacon CF, Hughes TE, Holst JJ. Dipeptidyl peptidase IV inhibition potentiates the insulinotropic effect of glucagon-like peptide 1 in the anesthetized pig. *Diabetes*. 47, 764-769 (1998)
37. Kubota N, Kubota T, Itoh S, Kumagai H, Kozono H, Takamoto I, Mineyama T, Ogata H, Tokuyama K, Ohsugi M, Sasako T, Moroi M, Sugi K, Kakuta S, Iwakura Y, Noda T, Ohnishi S, Nagai R, Tobe K, Terauchi Y, Ueki K, Kadowaki T. Dynamic functional relay between insulin receptor substrate 1 and 2 in hepatic insulin signaling during fasting and feeding. *Cell Metab*. 8, 49-64 (2008)
38. Vincent MA, Clerk LH, Lindner JR, Klibanov AL, Clark MG, Rattigan S, Barrett EJ. Microvascular recruitment is an early insulin effect that regulates skeletal muscle

glucose uptake in vivo. *Diabetes*. 53, 1418-1423 (2004)

39. Jansson PA, Fowelin JP, von Schenck HP, Smith UP, Lönnroth PN. Measurement by microdialysis of the insulin concentration in subcutaneous interstitial fluid. Importance of the endothelial barrier for insulin. *Diabetes*. 42, 1469-1473 (1993)

40. Ogihara T, Asano T, Ando K, Chiba Y, Sekine N, Sakoda H, Anai M, Onishi Y, Fujishiro M, Ono H, Shojima N, Inukai K, Fukushima Y, Kikuchi M, Fujita T. Insulin resistance with enhanced insulin signaling in high-salt diet-fed rats. *Diabetes*. 50, 573-583 (2001)

41. De León DD, Deng S, Madani R, Ahima RS, Drucker DJ, Stoffers DA. Role of endogenous glucagon-like peptide-1 in islet regeneration after partial pancreatectomy. *Diabetes*. 52, 365-371 (2003)

42. Dong Z, Chai W, Wang W, Zhao L, Fu Z, Cao W, Liu Z. Protein kinase A mediates glucagon-like peptide 1-induced nitric oxide production and muscle microvascular recruitment. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 304, E222-E228 (2013)

43. Fitzgerald SM, Bashari H, Cox JA, Parkington HC, Evans RG. Contributions of endothelium-derived relaxing factors to control of hindlimb blood flow in the mouse in vivo. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 293, H1072-H1082 (2007)

44. Sunami Y, Sesoko S, Kaku K. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of single

and multiple doses of anagliptin, a novel inhibitor of dipeptidyl peptidase-4. *Jpn Pharmacol Ther.* 40, 847-858 (2012)

45. Wei R, Ma S, Wang C, Ke J, Yang J, Li W, Liu Y, Hou W, Feng X, Wang G, Hong T. Exenatide exerts direct protective effects on endothelial cells through the AMPK/Akt/eNOS pathway in a GLP-1 receptor-dependent manner. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 310, E947-957 (2016)

46. Díaz-Soto G, de Luis DA, Conde-Vicente R, Izaola-Jauregui O, Ramos C, Romero E. Beneficial effects of liraglutide on adipocytokines, insulin sensitivity parameters and cardiovascular risk biomarkers in patients with Type 2 diabetes: a prospective study. *Diabetes Res Clin Pract.* 104, 92-96 (2014)

47. Kim SH, Abbasi F, Lamendola C, Liu A, Ariel D, Schaaf P, Grove K, Tomasso V, Ochoa H, Liu YV, Chen YD, Reaven G. Benefits of liraglutide treatment in overweight and obese older individuals with prediabetes. *Diabetes Care.* 36, 3276-3282 (2013)

48. Nakagami H, Pang Z, Shimosato T, Moritani T, Kurinami H, Koriyama H, Tenma A, Shimamura M, Morishita R. The dipeptidyl peptidase-4 inhibitor teneligliptin improved endothelial dysfunction and insulin resistance in the SHR/NDmcr-cp rat model of metabolic syndrome. *Hypertens Res.* 37, 629-635 (2014)

49. Matsubara J, Sugiyama S, Sugamura K, Nakamura T, Fujiwara Y, Akiyama E,

- Kurokawa H, Nozaki T, Ohba K, Konishi M, Maeda H, Izumiya Y, Kaikita K, Sumida H, Jinnouchi H, Matsui K, Kim-Mitsuyama S, Takeya M, Ogawa H. A dipeptidyl peptidase-4 inhibitor, des-fluoro-sitagliptin, improves endothelial function and reduces atherosclerotic lesion formation in apolipoprotein E-deficient mice. *J Am Coll Cardiol.* 59, 265-276 (2012)
50. King GL, Johnson SM. Receptor-mediated transport of insulin across endothelial cells. *Science.* 227, 1583-1586 (1985)
51. 窪田 哲也, 窪田 直人, 門脇 孝. 血管内皮機能とインスリン抵抗性. *日本薬理学雑誌.* 2, 85-88 (2008)
52. Steil GM, Ader M, Moore DM, Rebrin K, Bergman RN. Transendothelial insulin transport is not saturable in vivo. No evidence for a receptor-mediated process. *J Clin Invest.* 97, 1497-1503 (1996)
53. Ellmerer M, Hamilton-Wessler M, Kim SP, Huecking K, Kirkman E, Chiu J, Richey J, Bergman RN. Reduced access to insulin-sensitive tissues in dogs with obesity secondary to increased fat intake. *Diabetes.* 55, 1469-1775 (2006)
54. 日本糖尿病学会. 糖尿病診療ガイドライン 2019. 南江堂.
55. Richter EA, Garetto LP, Goodman MN, Ruderman NB. Muscle glucose metabolism following exercise in the rat: increased sensitivity to insulin. *J Clin Invest.* 69, 785-793

(1982)

56. Ploug T, Stallknecht BM, Pedersen O, Kahn BB, Ohkuwa T, Vinten J, Galbo H. Effect of endurance training on glucose transport capacity and glucose transporter expression in rat skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 259, E778-E786

(1990)

57. Bisquolo VA, Cardoso CG Jr, Ortega KC, Gusmao JL, Tinucci T, Negrao CE, Wajchenberg BL, Mion D Jr, Forjaz CL. Previous exercise attenuates muscle sympathetic activity and increases blood flow during acute euglycemic hyperinsulinemia. *J Appl Physiol.* 98, 866–871 (2005)

58. Mikus CR, Roseguini BT, Uptergrove GM, Morris EM, Rector RS, Libla JL, Oberlin DJ, Borengasser SJ, Taylor AM, Ibdah JA, Laughlin MH, Thyfault JP. Voluntary wheel running selectively augments insulin-stimulated vasodilation in arterioles from white skeletal muscle of insulin-resistant rats. *Microcirculation.* 19, 729-738 (2012)

59. Padilla J, Olver TD, Thyfault JP, Fadel PJ. Role of habitual physical activity in modulating vascular actions of insulin. *Exp Physiol.* 100, 759-771 (2015)

60. Sjoberg KA, Frosig C, Kjobsted R, Sylow L, Kleinert M, Betik AC, Shaw CS, Kiens B, Wojtaszewski JFP, Rattigan S, Richter EA, McConell GK. Exercise increases human skeletal muscle insulin sensitivity via coordinated increases in microvascular

perfusion and molecular signaling. *Diabetes*. 66, 1501-1510 (2017)

61. Scirica BM, Bhatt DL, Braunwald E, Steg PG, Davidson J, Hirshberg B, Ohman P, Frederick R, Wiviott SD, Hoffman EB, Cavender MA, Udell JA, Desai NR, Mosenzon O, McGuire DK, Ray KK, Leiter LA, Raz I, SAVOR-TIMI 53 Steering Committee and Investigators. Saxagliptin and cardiovascular outcomes in patients with type 2 diabetes mellitus. *N Engl J Med*. 369, 1317-1326 (2013)

62. White WB, Cannon CP, Heller SR, Nissen SE, Bergenstal RM, Bakris GL, Perez AT, Fleck PR, Mehta CR, Kupfer S, Wilson C, Cushman WC, Zannad F, EXAMINE Investigators. Alogliptin after acute coronary syndrome in patients with type 2 diabetes. *N Engl J Med*. 369, 1327-1335 (2013)

63. Green JB, Bethel MA, Armstrong PW, Buse JB, Engel SS, Garg J, Josse R, Kaufman KD, Koglin J, Korn S, Lachin JM, McGuire DK, Pencina MJ, Standl E, Stein PP, Suryawanshi S, Werf FV, Peterson ED, Holman RR, TECOS Study Group. Effect of sitagliptin on cardiovascular outcomes in type 2 diabetes. *N Engl J Med*. 373, 232-242 (2015)

64. Rosenstock J, Perkovic V, Johansen OE, Cooper ME, Kahn SE, Marx N, Alexander JH, Pencina M, Toto RD, Wanner C, Zinman B, Woerle HJ, Baanstra D, Pfarr E, Schnaidt S, Meinicke T, George JT, Eynatten M, McGuire DK, CARMELINA Investigators. Effect

of linagliptin vs placebo on major cardiovascular events in adults with type 2 diabetes and high cardiovascular and renal risk: The CARMELINA randomized clinical trial. JAMA. 321, 69-79 (2019)

65. Rosenstock J, Kahn SE, Johansen OE, Zinman B, Espeland MA, Woerle HJ, Pfarr E, Keller A, Mattheus M, Baanstra D, Meinicke T, George JT, Eynatten M, McGuire DK, Marx N, CAROLINA Investigators. Effect of Linagliptin vs Glimepiride on Major Adverse Cardiovascular Outcomes in Patients With Type 2 Diabetes: The CAROLINA Randomized Clinical Trial. 322, 1155-1166 (2019)

66. Marso SP, Daniels GH, Brown-Frandsen K, Kristensen P, Mann JFE, Nauck MA, Nissen SE, Pocock S, Poulter NR, Ravn LS, Steinberg WM, Stockner M, Zinman B, Bergenstal RM, Buse JB, LEADER Steering Committee; LEADER Trial Investigators. Liraglutide and cardiovascular outcomes in type 2 diabetes. N Engl J Med. 375, 311-322 (2016)

67. Gerstein HC, Colhoun HM, Dagenais GR, Diaz R, Lakshmanan M, Pais P, Probstfield J, Riesenmeyer JS, Riddle MC, Rydén L, Xavier D, Atisso CM, Dyal L, Hall S, Rao-Melacini P, Wong G, Avezum A, Basile J, Chung N, Conget I, Cushman WC, Franek E, Hancu N, Hanefeld M, Holt S, Jansky P, Keltai M, Lanas F, Leiter LA, Lopez-Jaramillo P, Cardona Munoz EG, Pirags V, Pogosova N, Raubenheimer PJ, Shaw JE, Sheu WH,

Temelkova-Kurktschiev T; REWIND Investigators. Dulaglutide and cardiovascular outcomes in type 2 diabetes (REWIND): a double-blind, randomised placebo controlled trial. *Lancet*. 394, 121-130 (2019)