

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590193

研究課題名(和文) 持続高血糖と食後高血糖による糖尿病血管障害発症機序の解明と治療法の開発

研究課題名(英文) Mechanism of vascular dysfunction with continuous hyperglycemia or postprandial hyperglycemia and development of treatment strategy

研究代表者

菊池 千草 (KIKUCHI, CHIGUSA)

名古屋市立大学・薬学研究科(研究院)・講師

研究者番号：20444987

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：食後高血糖による血管障害機序と新規糖尿病薬dipeptidyl peptidase 4(DPP-4)阻害薬の効果を明らかにするため、モデル動物と患者情報を用いて検討した。糖尿病患者の動脈硬化性疾患発症には血糖値日内変動幅が影響していた。食後高血糖モデル動物血管壁ではリン酸化酵素であるprotein kinase C delta が減少し、内皮細胞一酸化窒素合成酵素由来の活性酸素が増加していた。DPP-4阻害薬の慢性投与は食後の血糖値の上昇を抑制し、活性酸素産生を抑制することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In this study, we examined the mechanism of vascular dysfunction mediated by postprandial hyperglycemia and the effects of new antidiabetes agent, dipeptidyl peptidase 4 (DPP-4) inhibitor using model animals and patient's data. Onset of atherosclerotic disease in diabetic patients was depend on circadian rhythm of blood glucose. Protein kinase C delta was decreased and reactive oxygen species via eNOS uncoupling was increased in the vascular wall of postprandial hyperglycemia model animals. Chronic administration of DPP-4 inhibitor suppresses postprandial hyperglycemia and decreased reactive oxygen species production.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：糖尿病 血管障害 活性酸素 食後高血糖 DPP-4阻害薬

## 1. 研究開始当初の背景

糖尿病治療の最終的な目標は健康な人と変わらない寿命の確保である。これまでの薬物療法は厳格な血糖管理つまり上昇した血糖値を下げることを重視していた。しかし、近年発表された大規模臨床試験の結果は、厳格な血糖管理の有効性を証明するどころか、逆に死亡率が高いという結果であった。この原因としては重篤な低血糖が関係していると考えられている。そこで注目されているのが食後高血糖の是正である。耐糖能障害において  $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害薬による食後高血糖抑制が糖尿病や心血管イベント発症阻止にきわめて有効であることは示されているが、未だ血糖管理の明確な指針が設定されるまでには至らない。

最近、従来とは全く異なる作用機序の糖尿病薬が発売された。インクレチン薬と言われる 2 種類の薬剤で glucagon-like peptide-1 (GLP-1) 受容体作動薬と dipeptidyl peptidase 4 (DPP-4) 阻害薬である。これらの薬剤の長所は血糖上昇時のみ作用するため、低血糖をきたしにくく食後高血糖を是正できることである。DPP-4 阻害薬は 1 日 1 から 2 回の服用であり服用時間にも制限がないため、服薬コンプライアンスも良好であることが期待できる。ところが、GLP-1 作動薬は eNOS 活性の増加等による血管内皮機能改善作用が報告されている一方、DPP-4 阻害薬でも GLP-1 作動薬と同じ効果があるかは不明である。

食後高血糖状態において血管内皮が障害され、動脈硬化へと進展していく要因は、酸化ストレスに起因するところが大きいと言われている。研究代表者らは食後高血糖状態である食後高血糖モデルラットの大動脈や冠状動脈において活性酸素種であるスーパーオキシド産生が増加することを明らかにしている。また、糖尿病ラット大動脈のスーパーオキシド産生増加へのプロテインキナーゼ C (PKC) の関与と NAD(P)H オキシダーゼ活性化の関与を明らかにしている。

## 2. 研究の目的

本研究では、スーパーオキシド産生増加についての検討することにより、新規糖尿病薬 DPP-4 阻害薬が食後高血糖を是正し、糖尿病

による大血管障害の予防薬になりうるかを明らかにすることを目的とする。(1) 持続高血糖および食後高血糖モデル動物における大血管の活性酸素産生増加機序、(2) 新規糖尿病薬 DPP-4 阻害薬の活性酸素産生増加に対する効果、(3) 糖尿病患者での持続高血糖と食後高血糖による血管障害について検討した。

## 3. 研究の方法

### (1) 糖尿病患者の食後高血糖と動脈硬化性疾患発症に関する症例対照研究

名古屋市立大学病院の内分泌糖尿病内科を受診している 2 型糖尿病患者を対象とした。2 型糖尿病であり動脈硬化性疾患を発症した患者を選択して、コントロール患者は年齢性別等をマッチングさせて選択し症例対照研究を行った。診療情報より血糖値日内変動幅において、また、治療薬間で差が見られるか検証した。

### (2) 持続高血糖モデル動物の作製

6 週齢の Sprague-Dawley (SD) 雄性ラットに Streptozocin STZ (50mg/kg) を腹腔内に 2 回投与した。

### (3) 食後高血糖モデル

自然発症 2 型糖尿病モデルラットである Otsuka Long Evans Tokushima Fatty (OLETF) ラットと、非糖尿病モデルラット (コントロール用) として Long Evans Tokushima Otsuka (LETO) ラットを用いた。

### (4) 新規糖尿病薬 DPP-4 阻害薬の投与

STZ を投与したラットおよび OLETF ラットに DPP-4 阻害薬 anagliptin を 6 週間経口投与した。6 週間投与した後、ブドウ糖負荷試験を行い、血糖値の変動を観察した。

### (5) スーパーオキシド産生量の測定

ラットより動脈を摘出し、L-012 による化学発光法または dihydroethidium の 2 つの手法で測定した。摘出した動脈標本を 0.1mM L-012 を用い、ルミノメーターにて測定した化学発光強度よりスーパーオキシド産生量を比較した。PKC 阻害剤、nitric oxide synthase (NOS) に関連する阻害剤、NADPH オキシダーゼ阻害剤にてインキュベートした標本のスーパーオキシド産生量も測定した。また、動脈を凍結して切片を作成し、2 $\mu$ M dihydroethidium の蛍光を共焦点レーザー顕微

鏡にて撮影し、イメージアナライザーソフトを用いて、スーパーオキシド産生量を検証した。

(6) PKC 活性化の測定

ウエスタンブロット法にてリン酸化した PKC 発現量を測定した。

(7) endothelial NOS (eNOS) 活性化の測定

ウエスタンブロット法にて、リン酸化した eNOS 発現量を測定した。

(8) カタラーゼ活性の測定

吸光度計を用いて、過酸化水素の減少を測定した。

全ての研究は、学内の動物実験委員会、倫理審査委員会において承認された研究計画に従い、実施した。

4. 研究成果

(1) 糖尿病患者の動脈硬化性疾患に対する血糖値変動の影響

動脈硬化性疾患発症群（発症群）と対照群 29 ペアについて検討したところ、血糖値日内変動幅は発症群の方が有意な差が認められた。血糖値日内変動幅が大きい群では動脈硬化性疾患の発症が有意に増加していた。食後高血糖改善薬を用いて血糖値日内変動幅を抑制できている場合、動脈硬化性疾患発症数が抑制される傾向であった。

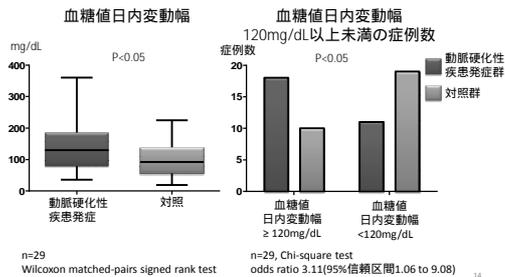


図 1. 動脈硬化性疾患発症群と対照群の血糖値日内変動幅の比較

(2) モデル動物血管壁における活性酸素増加とその機序

食後高血糖モデル OLETF ラット大動脈の血管壁の活性酸素は増加していた。その増加は PKC 阻害剤, NADPH オキシダーゼ阻害剤, NOS 阻害剤, テロラヒドロピオプテリンの前駆体である sepiapterin, PI3K 阻害剤により抑制された。

NOS は serin1177 (Ser1177) がリン酸化され

ると活性化する。ウエスタンブロット法にてリン酸化された Ser1177eNOS 量を検討したところ、OLETF ラットでは有意に増加していた。

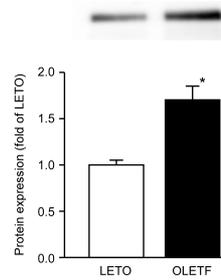


図 2 ラット大動脈における Ser1177 がリン酸化された eNOS のタンパク発現

PKC のサブタイプの一つである PKC  $\delta$  はリン酸化されることにより活性化される。ウエスタンブロットにてリン酸化した PKC  $\delta$  タンパク発現量を検討したところ、OLETF ラットでは有意に減少していた。

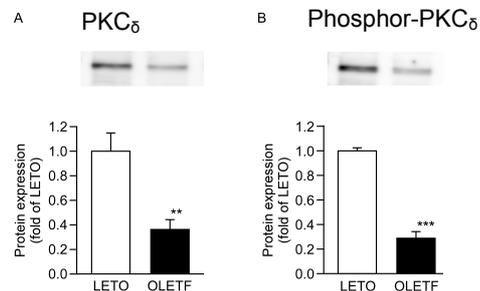


図 3 ラット大動脈における PKC およびリン酸化された PKC のタンパク発現

PKC  $\delta$  は catalase を活性化すると報告がある。大動脈の catalase 活性を測定したところ、OLETF ラットでは有意に抑制されていた。

以上のことから、食後高血糖モデル動物 OLETF ラットでは、PKC  $\delta$  の発現量が減少することで、catalase 活性が減少する。それにより過酸化水素が増加し、Akt/PI3K 経路が活性化し、eNOS が活性化され、eNOS uncoupling による活性酸素産生が増加するという機序が示唆された。

持続高血糖モデル STZ ラットにおいても大動脈の血管壁の活性酸素は増加していた。その増加は、PKC 阻害剤, NADPH オキシダーゼ阻害剤, NOS 阻害剤にて抑制される傾向ではあったが有意な差は認められなかった。

(3) DPP-4 阻害薬 anagliptin の血管における

## 活性酸素産生増加に対する効果

食後高血糖モデル動物 OLETF ラットに anagliptin (ANG) を 6 週間投与した。耐糖能試験を行ったところ、糖負荷後の血糖値上昇は ANG により有意に抑制されていた。

OLETF ラットの動脈および大腿動脈を摘出し、活性酸素を測定したところ、活性酸素の産生増加は ANG の投与により有意に抑制されていた。

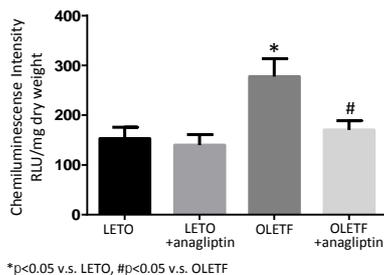


図 4 ラット大動脈における活性酸素産生量 (化学発光法)

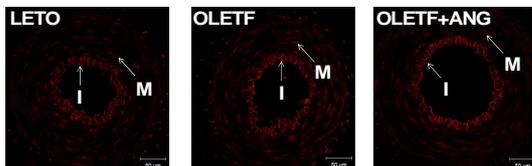


図 5 ラット大腿動脈における活性酸素産生 dihydroetidium 染色

持続高血糖モデル動物 STZ ラットにも anagliptin (ANG) を 6 週間投与した。耐糖能試験を行ったところ、糖負荷後の血糖値上昇は ANG を投与しても変化は認められなかった。

STZ ラットの動脈を摘出し、活性酸素を測定したところ、活性酸素の産生増加は ANG の投与により有意に抑制されていた。

以上のことから、ANG の投与は食後高血糖を抑制し、血管壁での活性酸素産生増加を抑制することが示唆された。しかし、血糖値の変化がなくても活性酸素産生増加が抑制されたことから ANG の直接的な抗酸化作用が存在することが示唆された。

### (4) まとめ

本研究において、食後高血糖の血管障害機序を明らかにした。

動脈硬化性疾患発症には、血糖値日内変動幅が影響し、食後高血糖改善薬の投与で動脈硬化性疾患の発症が抑制されることが示唆された。

食後高血糖は PKC $\delta$  の減少と eNOS uncoupling を介して活性酸素を増加し、血管障害を促進することを明らかにした。持続高血糖では、酵素阻害剤により食後高血糖と同じような活性酸素産生増加の抑制が認められなかったことから、持続高血糖の活性酸素産生増加機序の解明が今後の課題である。

新規糖尿病薬である DPP-4 阻害薬 anagliptin は食後高血糖を抑制し、抗酸化作用を示した。しかし、血糖値非依存性の抗酸化作用が認められた。機序の解明が今後の課題である。

### (5) 今後の展望

本研究により食後高血糖の抑制が大血管障害の予防となる知見を挙げた。また、DPP-4 阻害薬の投与により血管障害を予防できる可能性が示唆されたことから、大血管障害予防のための DPP-4 阻害薬の積極的な使用も考えられる。

本研究の結果は糖尿病患者の血糖管理方法のエビデンスに繋がることが予想される。これにより、糖尿病の大血管障害を減少させることができる。それは、心血管死の減少、そして、糖尿病治療の究極の目的である健康な人と変わらない寿命の確保に貢献できる。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1 件)

Chigusa Kikuchi, Junko Kajikuri, Eisei Hori, Chie Nagami, Tamihide Matsunaga, Kazunori Kimura, Takeo Itoh

Aortic superoxide production at the early hyperglycemic stage in a rat type 2 diabetes model and the effects of pravastatin

*Biol. Pharm. Bull.*, **37**, 996-1002 (2014)

DOI: 10.1248/bpb.b13-00975

[学会発表](計 17 件)

菊池千草, 加藤真梨, 今枝憲郎, 岡山直司, 鈴木 匡, 松永民秀

糖尿病患者に対する服薬指導教育プログラムの作成と評価

第 54 回日本糖尿病学会年次学術集会。

2011 年 5 月 21 日 (札幌); 11-21-22.

菊池千草, 堀 英生, 永味千枝, 梶栗潤子, 伊藤猛雄, 松永民秀

PKC δ の糖尿病大血管障害への関与と  
プラバスタチンの慢性投与効果の検討

**第 119 回日本薬理学会近畿部会.**

2011 年 7 月 8 日 (名古屋); C-21.  
堀 英生, 永味千枝, 菊池千草, 竹内正  
義, 松永民秀

糖尿病モデルラットの大動脈におけ  
るスーパーオキシド産生増加機序の解  
明

**第 57 回 (平成 23 年度) 日本薬学会東海  
支部総会・大会.**

2011 年 7 月 9 日 (名古屋); G1540.  
加藤真梨, 菊池千草, 堀 英生, 加藤岳  
史, 今枝憲郎, 岡山直司, 松永民秀  
2 型糖尿病患者の糖代謝にプラバスタチ  
ンが与える影響とアディポネクチンの  
関連性

**第 57 回 (平成 23 年度) 日本薬学会東海  
支部総会・大会.**

2011 年 7 月 9 日 (名古屋); G1640.  
堀 英生, 永味千枝, 菊池千草, 竹内正  
義, 松永民秀

糖尿病モデルラットの大動脈におけ  
るスーパーオキシド産生増加機序及び  
プラバスタチンの慢性投与効果の検討

**第 21 回日本医療薬学会年会.**

2011 年 10 月 1 日 (神戸); 口頭 (土)  
12-14:06.

菊池千草, 永味千枝, 坂 明展, 渡邊幹  
哉, 鐵野敦司, 松永民秀, 鈴木 匡  
薬剤師によるペン型インスリン注入器  
用注射針 3 種類の比較

**第 21 回日本医療薬学会年会.**

2011 年 10 月 2 日 (神戸); 口頭 (日)  
3-14:12.

菊池千草, 永味千枝, 梶栗潤子, 伊藤猛  
雄, 松永民秀  
プラバスタチンによる糖尿病血管障害  
の治療効果の機序

**日本薬学会第 132 年会.**

2012 年 3 月 30 日 (札幌); 30E14-pm12.  
菊池千草, 永味千枝, 坂 明展, 渡邊幹  
哉, 福田頼子, 鐵野敦司, 川原 淳, 松  
永民秀, 鈴木 匡

患者教育技術の向上を目指した薬局薬  
剤師の糖尿病薬物療法体験学習

**第 55 回日本糖尿病学会年次学術集会 .**

2012 年 5 月 17 日 (横浜); I-17-16

永味千枝, 菊池千草, 坂 明展, 渡邊幹  
哉, 福田頼子, 鐵野敦司, 川原 淳, 松  
永民秀, 鈴木 匡

糖尿病薬物療法の模擬体験を通じたア  
ドヒアランスに影響を与える要因の解  
明

**第 55 回日本糖尿病学会年次学術集会 .**

2012 年 5 月 17 日 (横浜); I-17-17  
菊池千草, 永味千枝, 梶栗潤子, 伊藤猛  
雄, 松永民秀

糖尿病の大血管障害における酸化スト  
レスの PKC を介した産生亢進機序

**第 35 回日本高血圧学会総会 .**

2012 年 9 月 22 日 (名古屋); PB-3-088  
菊池千草, 永味千枝, 松永民秀, 武田佳  
司美, 榊原幹夫, 鈴木 匡

薬局薬剤師を対象とした継続的糖尿病  
薬物療法模擬体験学習の患者指導に及  
ぼす効果の検証

**日本社会薬学会第 31 年会 .**

2012 年 9 月 16 日 (鈴鹿); 55  
永味千枝, 堀 英生, 菊池千草, 竹内正  
義, 松永民秀

糖尿病における終末糖化産物 (AGEs)  
によるスーパーオキシド産生増加とプ  
ラバスタチンによる抑制効果機序の解  
明

**第 22 回日本医療薬学会年会 .**

2012 年 10 月 28 日 (新潟); P2-529  
菊池千草, 松永民秀, 鈴木 匡  
事前学習における糖尿病薬物療法体験  
学習の実務実習後の評価

**第 22 回日本医療薬学会年会 .**

2012 年 10 月 28 日 (新潟); P2-537  
永味千枝, 菊池千草, 竹内正義, 松永民  
秀

食後高血糖モデルラットの大動脈にお  
ける血管障害機序とアナグリプチン  
の効果

**日本薬学会第 133 年会 .**

2013 年 3 月 30 日 (横浜); 30amF-505  
菊池千草, 永味千枝, 竹内正義, 松永民  
秀

新規 DPP-4 阻害薬アナグリプチン慢性  
投与の食後高血糖モデル動物の血管に  
おけるスーパーオキシド産生増加に対  
する効果

**第 56 回日本糖尿病学会年次学術集会. 2013**

年 5 月 17 日 ( 熊本 ); II-16-1.  
新原浩太, 菊池千草, 近藤祐樹, 野田雅  
人, 堀 英生, 松永民秀  
マウス脂肪細胞のアディポネクチン分  
泌に対する性ホルモンとプラスタチ  
ンの影響

**日本病院薬剤師会関東ブロック第 43 回  
学術大会 .**

2013 年 9 月 1 日 ( 新潟 );  
菊池千草, 今枝憲郎, 岡山直司, 松永民  
秀  
糖尿病患者の動脈硬化性疾患に対する  
血糖値変動の影響

**第 23 回日本医療薬学会年会.**

2013 年 9 月 22 日 ( 仙台 ); 日-10-O37-08.

[ その他 ]

ホームページ :

<http://www.phar.nagoya-cu.ac.jp/hp/ryc/index.html>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

菊池 千草 ( KIKUCHI CHIGUSA )  
名古屋市立大学・大学院薬学研究科・講師  
研究者番号 : 20444987

(2) 研究分担者

松永 民秀 ( MATSUNAGA TAMIHIDE )  
名古屋市立大学・大学院薬学研究科・教授  
研究者番号 : 40209581

今枝 憲郎 ( IMAEDA KENRO )

名古屋市立大学・大学院医学研究科・講師  
研究者番号 : 30347398

(3) 連携研究者

鈴木 匡 ( SUZUKI TADASHI )  
名古屋市立大学・大学院薬学研究科・教授  
研究者番号 : 20555081

梶栗 潤子 ( KAJIKURI JYUNKO )

名古屋市立大学・大学院医学研究科・研究  
員  
研究者番号 : 10444986