

抗糖尿病薬トログリタゾンの
インスリン抵抗性改善作用に関する研究

2013.12.

奥野晃

目 次

緒言	5
第1章 Sprague-Dawley ラット後肢灌流系の糖代謝に対する トログリタゾンの作用	8
1. はじめに	9
2. 実験材料および実験方法	10
3. 結果	14
4. 考察	17
5. 小括	21
第2章 インスリン抵抗性モデル動物、Zucker 肥満ラットの 脂肪組織におけるトログリタゾンの作用	23
1. はじめに	24
2. 実験材料および実験方法	27
3. 結果	31
4. 考察	35
5. 小括	40
第3章 2型糖尿病モデル動物、WBN/Kob-<i>Lepr^{fa}</i> ラットの 糖尿病の病態とその進行におけるインスリン抵抗性の 役割	42
1. はじめに	43
2. 実験材料および実験方法	44

3. 結果	47
4. 考察	50
5. 小括	54
総括	55
謝辞	56
参考文献	57
図 表	72
要 旨	99
Abstract	104
出 典	110

本論文においては以下の略語を用いた。

NIDDM	non-insulin-dependent diabetes mellitus
PPAR	peroxisome proliferator-activated receptor
BSA	bovine serum albumin
TUNEL	terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling
WAT	white adipose tissue
<i>fa/fa</i>	WBN/Kob- <i>Lepr</i> ^{<i>fa</i>}
HOMA-IR	homeostasis model assessment of insulin resistance

緒 言

糖尿病における糖代謝の調節には膵臓 β 細胞より分泌されるインスリンが重要な役割を担っており、糖尿病はインスリンの分泌と作用の特長によって 1 型糖尿病と 2 型糖尿病に大別される。1 型糖尿病の成因は膵臓 β 細胞の破壊にともなうインスリンの絶対的な不足であるのに対し、2 型糖尿病の主な成因はインスリン分泌障害と、インスリンの作用が減弱するインスリン抵抗性であると考えられている (Gupta *et al.*, 2012)。近年、糖尿病の有病率の急激な上昇は世界的に深刻な問題となっており、患者数では 2 型糖尿病が大半を占めている。その為、新たな 2 型糖尿病治療薬の開発が強く望まれている。

2 型糖尿病に適用される抗糖尿病薬には、インスリン分泌促進薬、糖吸収阻害薬、インスリン抵抗性改善薬などがある (Ho *et al.*, 2011)。

ト ロ グ リ タ ズ ン
(5-[[4-[(6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethyl-chroman-2-yl)methoxy]phenyl]methyl]-1,3-thiazolidine-2,4-dione, $C_{24}H_{27}NO_5S$, CS-045) は、チアゾリジンジオン誘導体の一つであり (Fig.1)、インスリン抵抗性改善剤として世界で初めて上市された薬物である (Parker, 2002)。トログリタズンはその臨床上的有用性が期待されたが、特異体質性肝障害により市場からの撤退を余儀なくされた。従って、本剤はその後の作用機序の解析が十分行われなかった。しかし、本領域におけるその後の研究の進展のために、トログリタズンの作用機序の解明は重要と考えられた。

高血糖につながるインスリン抵抗性の主因は、骨格筋におけるインスリン作用不全であると考えられている (DeFronzo, 1988)。このことから、トログリタズンは、骨格筋におけるインスリンの糖取り込み促

進作用を増強している可能性が示唆された。一方、チアゾリジンジオン誘導体は、主に脂肪組織に発現している核内受容体の一つ、peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) γ のリガンドであることが報告された (Lehmann *et al.*, 1995)。PPAR γ は、脂肪細胞への分化を促進し、その遺伝子発現と細胞機能を調整することが報告されている (Kliwer *et al.*, 1992; Schoonians *et al.*, 1996; Sears *et al.*, 1996; Tontonoz *et al.*, 1994a)。更に、チアゾリジンジオン誘導体の PPAR γ に対する結合親和性の順位が抗糖尿病作用の効力の順位とよく一致しており、チアゾリジンジオン誘導体の抗糖尿病作用における、この種の化合物の機能的な受容体が PPAR γ であると考えられている (Willson *et al.*, 1996; Berger *et al.*, 1996)。これらのことから、トログリタゾンには骨格筋における糖取り込みを促進する作用と脂肪組織を介した作用の両方があると考えられる。

本研究では、トログリタゾンの作用機序として、骨格筋における糖代謝に対する作用と、脂肪組織における PPAR γ を介すると考えられる遺伝子発現を調節する作用があると考え、これらの両面から検討した。前者の作用については、インスリンの作用組織である骨格筋を含むラット後肢灌流系を用い、骨格筋におけるインスリン刺激による糖取り込みと糖代謝に対する作用を、インスリン非存在あるいは存在下で比較検討した (第 1 章)。後者の作用については、インスリン抵抗性を呈する肥満動物モデルである Zucker 肥満ラットを用い、遺伝子発現の変化を伴った効果発現までにはある程度の時間が必要であることを考慮し、トログリタゾンを 19–28 日間投与後の白色脂肪組織における作用を検討した (第 2 章)。さらに、新規に作出された 2 型糖尿病モデル動物である WBN/Kob-*Lepr^{fa}* ラットの病態特性を明らかにするため、インスリン抵抗性を改善するトログリタゾンを投与し、糖尿病の病態およ

びその進行におけるインスリン抵抗性の関与を検討した（第3章）。

第1章 Sprague-Dawley ラット後肢灌流系の糖代謝に対する
トログリタゾンの作用

1. はじめに

トログリタゾンとは、インスリン作用を増強する新しいタイプの抗糖尿病薬である。種々の研究から、トログリタゾンは、インスリン欠乏性糖尿病動物や正常動物の血糖値を低下させないが (Fujiwara *et al.*, 1988)、インスリン抵抗性糖尿病モデル動物 (Fujiwara *et al.*, 1988; Fujiwara *et al.*, 1991) や、インスリン非依存的糖尿病患者 (Suter *et al.*, 1992; Iwamoto *et al.*, 1991) の血糖値を低下させることが示されている。また、トログリタゾンは、インスリン抵抗性糖尿病モデル動物や NIDDM 患者の末梢組織において、インスリンによる糖取り込み促進により、血糖値を低下させることが示されてきた。しかしながら、トログリタゾンがどのような作用を通してインスリンによる末梢組織の糖取り込みを促進するのかどうかは未だ明らかではない。Lee と Olefsky は、正常ラットの正常血糖クランプ実験において、トログリタゾンがインスリンによる糖取り込みを急速に促進することを示した (Lee and Olefsky, 1995)。末梢組織の中で骨格筋は、インスリンの主な標的組織であり、体全体の中の容積に占める割合が高いということから、インスリンによる糖取り込みにおいてきわめて重要な役割を果たしている。また、2 型糖尿病患者の骨格筋において、インスリンによる糖取り込みが減弱していることが報告された (DeFronzo, 1988)。これらの知見から、本研究の第 1 章では、インスリンの作用組織である骨格筋を含むラット後肢灌流系を用い、骨格筋におけるインスリン刺激による糖取り込みと糖代謝に対する作用を、インスリン非存在あるいは存在下で比較検討した。

2. 実験材料および実験方法

2.1 動物

雄性 Sprague-Dawley ラットを日本 SLC（静岡）から購入し、6～7週齢（200 - 250 g）で実験に使用した。本実験は三共株式会社動物実験委員会の承認を得た。

2.2 試薬および化合物

トログリタゾンナトリウム塩は三共株式会社化学研究所（東京）で合成された化合物を使用した。脂肪酸を含まないウシ血清アルブミン（BSA、A-6007）及びブタインスリン（I-3505）は、Sigma Chemicals（St. Louis、MO）から購入した。Hexokinase、glucose-6-phosphate dehydrogenase、および乳酸脱水素酵素は、ベーリンガー（Mannheim, Germany）から入手した。その他すべての試薬および物質は、市販で得られる最も高純度のものを使用した。

2.3 灌流液

115 mM NaCl、5.9 mM KCl、1.2 mM MgCl₂、1.2 mM NaH₂PO₄、1.2 mM Na₂SO₄、2.5 mM CaCl₂、25 mM NaHCO₃、および 6 mM グルコースを含有する Krebs 重炭酸緩衝液（pH 7.4）を、95% O₂ - 5% CO₂ 混合ガスで飽和して使用した。

BSA、トログリタゾン、インスリンの溶液の調製：脂肪酸不含 BSA を最終濃度 20% wt/vol となるように灌流液に溶解した。次に、BSA を含む灌流液を、5.0、0.8、0.44、0.22 μm のメッシュサイズのフィルターを用いて順次ろ過し、最終濃度 4 mM のトログリタゾンナトリウム

溶液作製に用いた。ブタインスリンは、弱酸性の水に溶解し、最終濃度が 125 mU/mL となるようにした。

2.4 後肢灌流の手術

後肢灌流のための手術は、Shiota と Sugano (Shiota and Sugano, 1986)、あるいは Ruderman ら (Ruderman *et al.*, 1971) の方法に従って実施した。以下に概略を示す。まず非絶食ラットをペントバルビタールナトリウムで麻酔し (50 mg/kg を腹腔内投与)、左後肢を除く組織に血液を供給する血管をすべて結紮し、灌流液を流し込めるように大動脈にポリエチレンチューブ (16 ゲージ) を挿管した。灌流液の送液の後、即座に大静脈を切断し、左後肢からの流出液を回収できるように左腸骨静脈にポリエチレンチューブを挿管した。

2.5 灌流システム

ラット後肢筋を flow-through 方式 (15 mL/min/leg) で灌流した。灌流液は、95% O₂ - 5% CO₂ で飽和させ、32°C に保温した。30 分間の灌流系の安定化後 (前灌流)、流路へのインスリンとトログリタゾンの吸着を防ぐために、以後の実験実施中、BSA のみ又はトログリタゾン含有 BSA 溶液を注入し続けた。20% wt/vol BSA 溶液は 0.075 mL/min/leg の流速 (終濃度: 0.1%) で注入した。インスリン非存在下 (Fig. 2A) では、BSA 溶液注入の 10 分後にトログリタゾン含有 BSA 溶液に換えて 40 分間注入した (トログリタゾンの終濃度: 5, 10, 20, および 50 μM)。インスリン存在下 (終濃度: 250 μU/mL) のトログリタゾンの効果を調べる場合には、インスリンを 40 分から実験終了 (110 分) まで注入した。実験開始から 60 分後、BSA 溶液をトログリタゾン (終濃度: 20 μM) 含有 BSA 溶液に 30 分間置き換えた (Fig. 2B)。糖取り込みと乳

酸及びピルビン酸放出の測定のために腸骨静脈から流出する灌流液を採取した。

2.6 後肢筋の採取方法

トログリタゾンおよびインスリン処置前のグリコーゲン含量とフルクトース 2,6-ビスリン酸含量を測定するために、0.1% BSA 溶液の注入直前に右脚の筋肉を採取した。左脚の筋肉は、インスリン非存在下ではトログリタゾン注入の 30 分後に (Fig. 2A)、インスリン注入のみおよびインスリンとトログリタゾン注入の場合は、インスリン注入の終わりに採取した (Fig. 2B)。採取した筋肉は液体窒素で直ちに凍結し、グリコーゲンとフルクトース 2,6-ビスリン酸の濃度測定まで -80°C で保存した。大腿四頭筋の赤色部分 (インスリンに反応する赤筋) (James *et al.*, 1985; James *et al.*, 1986) を後肢筋から分離し、グリコーゲンとフルクトース 2,6-ビスリン酸の測定用に液体窒素で凍結した。

2.7 分析方法

グルコース濃度は、ヘキソキナーゼとグルコース 6-リン酸脱水素酵素を用いたキット (food analysis: D-glucose UV methods; Boehringer, Mannheim, Germany) で測定した。乳酸とピルビン酸の濃度は、乳酸脱水素酵素を用いた酵素法により測定した (Gutmann and Wahiefeld, 1974; Passonneau and Lowry, 1974)。灌流流出液の酸素濃度は、Polarographic 電極 (Iijima Product、愛知) で検出した。グリコーゲン量は、Seifter らによって報告された方法 (Seifter *et al.*, 1950) で測定した。筋肉のサンプルの一部を液体窒素で凍結し、乳鉢と乳棒を用いて粉末化して一定量を秤量し、30% KOH 溶液の中に入れ、20 分間湯煎して溶解した。冷却後、70% EtOH でグリコーゲンを沈殿させ遠心した。沈査を水

に溶解し、グリコーゲンの測定に用いた。

フルクトース 2,6-ビスリン酸の濃度は、Van Schaftingen らの方法 (Van Schaftingen *et al.*, 1982) に従って測定した。液体窒素で凍結し、筋肉のサンプルの一部に 50 mM NaOH を加えて粉末化し、その後 80°C で 5 分間保持した。抽出液を 20 mM HEPES を含む氷冷 1 M L-acetic acid で 0°C に中和冷却し、10 分間遠心分離した。上清をフルクトース 2,6-ビスリン酸の測定に用いた。

2.8 データ解析

後肢の糖取り込み、乳酸とピルビン酸放出、および酸素消費の各量は、流入液と流出液の濃度差と流速から計算した。統計解析には、対応のない 2 群間の t 検定を用いた。P 値が 0.05 未満の場合を統計的有意とみなした。

3. 結果

3.1 インスリン非存在下における糖代謝に対するトログリタゾンの作用

糖取り込み： Fig. 3 にトログリタゾンを 40 分間注入したときの糖取り込みに対する作用を示す。最大濃度である 50 μM の濃度においても、インスリン非存在下では、トログリタゾンは糖取り込みを刺激しなかった。

乳酸とピルビン酸の放出、ピルビン酸に対する乳酸の比、酸素消費： Fig. 4 に、乳酸とピルビン酸の放出、ピルビン酸に対する乳酸の比 (L/P 比) に対するトログリタゾンの経時効果を示す。乳酸とピルビン酸の放出 (総量) は、20 および 50 μM のトログリタゾンの注入により徐々に増加し、トログリタゾンの注入 25 分後には定常状態 (20 および 50 μM の濃度でそれぞれ、 2.01 ± 0.15 および $3.02 \pm 1.21 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{leg}$) に達し、トログリタゾンの注入中止後も上昇したままであった。乳酸とピルビン酸の放出に対し、L/P 比は 5 μM のトログリタゾンの注入とともに即座に低下し (トログリタゾン注入の 20 分後の値、トログリタゾン群 : 5.14 ± 0.47 、対照群 : 7.42 ± 0.39 、 $P < 0.05$)、トログリタゾンの注入中止後直ちに初期 (前灌流) レベルに戻った (Fig. 4)。Fig. 5 に酸素消費に対するトログリタゾンの経時効果を示す。20 μM のトログリタゾン注入により、酸素消費が徐々に増加し、トログリタゾン注入の 20 分後に最大 ($6.17 \pm 0.28 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{leg}$) となり、トログリタゾン注入中止後初期値に戻った (Fig. 5)。

灌流後肢筋中のグリコーゲンとフルクトース 2,6-ビスリン酸含量： Table 1 に、インスリン非存在下における、20 μM のトログリタゾン注

入 30 分後の灌流筋の赤筋中のグリコーゲンとフルクトース 2,6-ビスリン酸含量の変化を示す。トログリタゾンは、対照群と比べ有意に筋中のグリコーゲン含量を低下させた (-6.01 ± 1.85 mg/g 湿重量、 $P < 0.05$) が、フルクトース 2,6-ビスリン酸含量は変化しなかった。

3.2 インスリン存在下における糖代謝に対するトログリタゾンの作用

糖取り込み： Fig. 6 にインスリン存在下における糖取り込みに対するトログリタゾンの作用を示す。インスリンを $250 \mu\text{U/mL}$ で 80 分間注入すると、糖取り込みを徐々に増加させ、30 分後には定常状態に達した。インスリンは処置前値 ($0.35 \pm 0.11 \mu\text{g/min/leg}$) の 2.8 倍に糖取り込みを増加させた。インスリンの注入とともに、 $20 \mu\text{M}$ のトログリタゾンを 30 分間注入すると、インスリンによる糖取り込みを徐々に増加させ、30 分の注入の終わりには有意に増加した ($1.79 \pm 0.17 \mu\text{mol/min/leg}$)。インスリンによる糖取り込みは、トログリタゾンの注入中止後も 30 分間更に増加した ($2.20 \pm 0.18 \mu\text{mol/min/leg}$)。

乳酸とピルビン酸の放出と L/P 比： Fig. 7 に、乳酸とピルビン酸の放出および L/P 比に対するトログリタゾン注入の効果を示す。乳酸とピルビン酸の放出（総量）は、インスリン注入の間増加した（インスリン注入の終了時、インスリン群： $2.33 \pm 0.08 \mu\text{mol/min/leg}$ 、対照群： $1.22 \pm 0.10 \mu\text{mol/min/leg}$ ）。インスリンにトログリタゾンを追加すると、乳酸とピルビン酸の放出は更に増加し、トログリタゾン注入の 10 分後には対照群に比し有意となった。この乳酸とピルビン酸の放出の増強はトログリタゾン注入中止後も持続した (Fig. 7A)。インスリン注入はその注入の間を通して L/P 比を低下させる傾向を示した。インスリンへのトログリタゾンの追加は L/P 比を直ちに低下させたが、トログリ

タゾンの注入停止後は注入前のレベルに戻った (Fig. 7B)。Fig. 8 に酸素消費に対するトログリタゾン注入の効果を示す。インスリンのみの注入は酸素消費を増加させなかった。インスリンとともにトログリタゾンを注入すると、インスリン非存在下と同様に、酸素消費が増加した。

灌流後肢筋のグリコーゲン含量： Table 2 に、インスリン単独群とインスリンとトログリタゾン注入群の、インスリン注入終了時の灌流筋の赤筋中のグリコーゲン含量の変化を示す。対照群と比較して有意ではなかったが、インスリンの注入はグリコーゲン含量を増加させる傾向を示した。これとは対照的に、インスリンとトログリタゾンを注入した群のグリコーゲン含量は、インスリン単独注入 (3.11 ± 1.30 mg/g 湿重量) と比較し、有意に低下した (-5.02 ± 3.13 mg/g 湿重量)。

4. 考察

本章において、トログリタゾンは、インスリン存在下で灌流後肢筋の糖取り込みを刺激することを示した (Fig. 6)。この結果は、トログリタゾンそのものが糖取り込みを刺激する作用を有するのではなく (Fig. 3)、骨格筋におけるインスリンの糖取り込み促進作用を増強することを示唆している。この知見は、トログリタゾンが、インスリン欠乏性糖尿病動物ではなく、高インスリンレベルの糖尿病動物の血糖値を低下させるという、*in vivo*における知見と一致する (Fujiwara *et al.*, 1988)。

トログリタゾンは、インスリン非存在下では糖取り込みを引き起こさなかったが (Fig. 3)、後肢筋の乳酸とピルビン酸の放出を増加させ、グリコーゲン含量を減少させた (Fig. 4A, Table 1)。これは、トログリタゾンが、インスリン非存在下では、灌流後肢筋において解糖系とグリコーゲン分解を刺激することを示唆している。フルクトース 2,6-ビスリン酸は肝臓と筋肉において解糖系の刺激因子であることが知られている (Hue and Rinder, 1987)。トログリタゾンは灌流後肢筋において、フルクトース 2,6-ビスリン酸を増加させなかった (Table 1)。これらの結果は、インスリン非存在下にトログリタゾンが注入されたときにみられる解糖系の促進が、フルクトース 2,6-ビスリン酸含量の増加によらないことを示している。トログリタゾンは 5 μM の低濃度で灌流液中の L/P 比を低下させた (Fig. 4B)。L/P 比は細胞質の NAD^+/NADH 比を反映するので (乳酸 + $\text{NAD}^+ \rightleftharpoons$ ピルビン酸 + NADH , Williamson *et al.*, 1967)、トログリタゾンは細胞質の NAD^+/NADH 比を増加させると考えられる。解糖系の段階において、細胞質の NAD^+ がグリセルアル

デヒド 3 リン酸の 1,3-ビスホスホグリセリン酸への転換に使われる。つまり、トログリタゾンは細胞質の NAD^+/NADH 比を増加させることによって、解糖系のグリセルアルデヒド 3 リン酸と 1,3-ビスホスホグリセリン酸の間を刺激すると考えられる。更に、トログリタゾンは解糖系の流れの増加にともなって 2 次的にグリコーゲン分解を刺激させることが示唆される。

インスリン非存在下において、トログリタゾンは灌流後肢筋の酸素消費を増加させた (Fig. 5)。一つの仮説として、トログリタゾンはグルコース酸化あるいは (細胞内脂質を使用した) 脂質酸化あるいはその両方を刺激することによって酸素消費を促進させていると考えられる。しかし、トログリタゾンが脂質酸化を刺激するということは考えにくい。なぜならば、灌流液には遊離脂肪酸が含まれていないことに加えて、仮に脂質酸化が増加した場合、細胞内のアセチル CoA は蓄積し、むしろ解糖系が抑制される結果となる (Randle cycle、Randle *et al.*, 1963; Randle *et al.*, 1988) が、実際には解糖系は亢進しているからである。これらのことを総合すると、トログリタゾンは、グルコース酸化を促進し、その結果、インスリン非存在下における解糖系を促進したと考えられる。

250 $\mu\text{U}/\text{mL}$ のインスリン注入は、処置前値と比較して注入の終了時までに、糖取り込みを 2.8 倍に、乳酸とピルビン酸の放出を 1.5 倍に増加させた (Fig. 6, 7A)。これらの結果は、グルコースの一部がグリコーゲンとして貯蔵されたか、あるいは CO_2 へ転換されたことを示している。

インスリンとともにトログリタゾンを注入すると、インスリンによる糖取り込みと乳酸とピルビン酸の放出が有意に増加した (Fig. 6, 7A)。更に興味深いことに、インスリンの存在下ではトログリタゾンの注入

停止後も糖取り込みが更に増加した (Fig. 6)。トログリタゾン注入停止後 20 分の灌流後肢筋のグリコーゲン含量は、インスリンのみの注入と比較して、インスリンにトログリタゾンを加えて注入すると有意に低下した (Table 1)。この結果は、トログリタゾンがインスリンによるグリコーゲン合成を抑制すること、トログリタゾンのグリコーゲン分解作用がインスリンのグリコーゲン合成作用よりも強いことを示唆している。灌流後肢筋において、トログリタゾン注入停止後のインスリンによる糖取り込みの増強は、筋収縮 (Garetto *et al.*, 1984; Cartee *et al.*, 1989) やエピネフリン処置 (Nolte *et al.*, 1994) によってグリコーゲン含量が減少している筋肉において、インスリンによる糖取り込みが増強される観察結果とよく類似している。筋収縮およびエピネフリン処置のいずれのあとにおいても、グリコーゲンの枯渇がインスリン刺激による糖取り込みを促進するということが考えられる (Cartee *et al.*, 1989; Nolte *et al.*, 1994)。それゆえ、トログリタゾン除去後の条件では、グリコーゲンの枯渇がインスリン刺激による糖取り込みを増強したと考えられる。

以上の結果の概略を Fig. 9 に表す。(1) インスリン非存在下において、トログリタゾンは後肢筋の糖取り込みを増加させなかったが、解糖系を促進させ、グリコーゲン含量を減少させた。これらの変化は、細胞質の NAD^+/NADH 比の低下もしくは酸素消費の増加の結果として生じたと考えられる。(2) インスリン存在下において、トログリタゾンは解糖系とインスリンによる糖取り込みを促進させ、この促進はトログリタゾン注入停止後も更に持続した。インスリンの注入は後肢筋のグリコーゲン含量を増加させたが、インスリン処置にトログリタゾン処置を追加すると、後肢筋のグリコーゲン含量が低下した。グリコーゲン含量の低下は、収縮刺激やエピネフリン処置実験での観察結果

と同様に、後肢筋におけるインスリンによる糖取り込みの増加を増強したと考えられる。

5. 小括

トログリタゾン (CS-045) は、インスリン抵抗性糖尿病動物でインスリン作用を増強して血糖値を低下させることが明らかになり、NIDDM 患者においても同様の作用が確認された新しいタイプの抗糖尿病薬である。骨格筋における糖代謝とインスリンの効果に対するトログリタゾンの作用を調べるために、インスリン非存在下あるいは存在下で、6 mM グルコース添加条件においてラット後肢を灌流し、トログリタゾン溶液を注入した。インスリン非存在下においては、トログリタゾン 50 μM によっても糖取り込みを増加しなかった。しかし、トログリタゾンは 20 μM 以上の濃度で、乳酸とピルビン酸の放出を増加させ、ピルビン酸に対する乳酸の比 (L/P 比) を低下あるいは酸素消費の増加を、それぞれ、5 あるいは 20 μM の濃度から引き起こした。後肢筋において、20 μM のトログリタゾンは、インスリン非存在下でフルクトース 2,6-ビスリン酸の含量を変化させずに、グリコーゲン含量を低下させた。最大効果の半分の効果が得られる 250 $\mu\text{U}/\text{mL}$ のインスリンは、糖取り込みを 2.8 倍に、乳酸とピルビン酸の放出を 1.5 倍に促進した。20 μM のトログリタゾンを 250 $\mu\text{U}/\text{mL}$ のインスリンとともに 30 分間注入すると、インスリン刺激による糖取り込みが、トログリタゾンの注入 30 分後に有意に増加し、この増加はトログリタゾンの注入中止後も更に増大した。インスリンにトログリタゾンを上乗せ処置した群のトログリタゾン注入停止 20 分後の後肢筋のグリコーゲン含量は、インスリンのみを処置した骨格筋と比較すると有意に低下していた。

以上を要約すると、インスリン非存在下では、トログリタゾンは糖

取り込みを増加させないが、骨格筋のグリコーゲン含量と L/P 比の低下と酸素消費の増加を引き起こすとともに、グリコーゲン分解を促進した。インスリン存在下においては、トログリタゾンはインスリンによる糖取り込みを増加させ、この増加はトログリタゾン注入停止後も更に増大した。インスリン注入にトログリタゾンを上乗せすると、後肢筋肉のグリコーゲン含量が低下した。このグリコーゲン含量の低下は、筋収縮あるいはエピネフリン処置で観察される結果によく類似しており、インスリン刺激による糖取り込みの増強を引き起こしていることが示唆された。

第2章 インスリン抵抗性モデル動物、Zucker 肥満ラットの
脂肪組織におけるトログリタゾンの作用

1. はじめに

インスリン抵抗性は、NIDDM の病態と悪化において重要な役割を果たしている(Iwamoto *et al.*, 1991)。特に肥満を伴う NIDDM において、インスリン抵抗性の改善は主な治療標的となっているように、肥満はインスリン抵抗性のもっとも共通の因子である。チアゾリジンジオン化合物は、ヒト NIDDM 患者 (Iwamoto *et al.*, 1991; Saltiel and Olefsky, 1996; Suter *et al.*, 1992; Kumar *et al.*, 1996) と NIDDM の動物モデル (Fujiwara *et al.*, 1988; Fujiwara *et al.*, 1995) において、インスリン抵抗性を改善し、代謝調節を改善することが報告されている。ヒト及び動物での研究において、チアゾリジンジオン化合物の一つであるトログリタゾン (CS-045) が筋肉の糖利用を促進し、肝臓の糖産生を低下させることを示した (Suter *et al.*, 1992; Fujiwara *et al.*, 1995)。トログリタゾンはインスリンシグナル経路の様々な点に影響を与えるが (Iwamoto *et al.*, 1991; Kellerer *et al.*, 1994)、インスリン抵抗性を減弱させる主な作用はこれまで見出されてこなかった。

肥満によるインスリン抵抗性の進展には少なくとも 3 つの候補分子が関与している (Taylor *et al.*, 1996)。体循環中の脂質、例えば遊離脂肪酸 (FFA)、が肥満では増加しており、Randle サイクルを通して筋肉における糖の取り込みと利用を抑制している (Randle *et al.*, 1963; Boden, 1997)。Hotamisligil らは、肥満ラットの脂肪細胞から分泌される TNF α が筋肉における糖取込みを抑制し、これによりインスリン抵抗性を惹起していると提唱した (Hotamisligil *et al.*, 1993; Hotamisligil *et al.*, 1994a; Hotamisligil *et al.*, 1994b)。更に TNF α は、インスリンシグナルの導入を阻害するインスリン受容体基質サブタイプ-1 のセリン

残基のリン酸化を引き起こすこと (Hotamisligil *et al.*, 1996b)、あるいは、グルコーストランスポーター-4 のダウンレギュレーションを引き起こすこと (Stephens and Pekala, 1991) が報告されている。三つ目としてレプチンが挙げられ、肥満に伴って上昇するレプチンそのものがインスリン抵抗性を起こすことが示唆されている (Cohen *et al.*, 1996; Muller *et al.*, 1997; Segal *et al.*, 1996)。3つの仮説は全て、互いに矛盾することなく、肥満において肥大化した脂肪細胞から生成或いは分泌される分子がインスリン抵抗性を引き起こすことを示唆している。

Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) γ は主に脂肪組織に発現し (Tontonoz *et al.*, 1994a; Braissant *et al.*, 1996)、線維芽細胞における PPAR γ の発現増強はその細胞を脂肪細胞に分化させる (Tontonoz *et al.*, 1994a)。活性化した PPAR γ は、retinoid X receptor とヘテロダイマーを形成し、一つのヌクレオシドをはさんで6つのヌクレオシドの認識モチーフ (TGACCT) の定方向反復配列からなる peroxisome proliferator responsive element に結合する (Kliwer *et al.*, 1992)。Peroxisome proliferator responsive element は、acyl-CoA synthase、fatty acid binding protein、lipoprotein lipase、uncoupling protein をコードする遺伝子のプロモーター領域に存在することが報告されている (Schoonians *et al.*, 1996; Sears *et al.*, 1996)。チアゾリジンジオン化合物は PPAR γ のリガンドであることが見出された (Lehmann *et al.*, 1995)。更に、チアゾリジンジオン化合物の PPAR γ に対する結合親和性の順位が抗糖尿病作用の効力の順位とよく一致しており、チアゾリジンジオン化合物の抗糖尿病作用において、この種の化合物の機能的な受容体が PPAR γ であることを示唆している (Willson *et al.*, 1996; Berger *et al.*, 1996)。このように、チアゾリジンジオン化合物の主な作用が PPAR γ の活性化を通じた脂肪細胞の遺伝子発現と細胞機能の調整であると推

定することは理にかなっている。

本章においては、チアゾリジンジオン化合物がインスリン抵抗性を改善する分子メカニズムを解明するために、肥満を伴ったインスリン抵抗性の動物モデルである Zucker 肥満ラット (Apweiler and Freund, 1993) におけるトログリタゾンの白色脂肪組織に対する効果を検討した。その結果、トログリタゾンが白色脂肪組織の小型脂肪細胞を増加させ、同時に大型脂肪細胞を減少させることを見出した。トログリタゾンによるこの効果は、TNF α やレプチンの mRNA の過剰発現と血漿脂質の高値を正常化させ、インスリン抵抗性の改善につなげる重要な機序の一つであると考えられる。

2. 実験材料および実験方法

2.1 動物

7週齢の雄性 Zucker 肥満ラットと Zucker 非肥満ラット（いずれも日本チャールズリバー（神奈川県厚木）から購入）を実験の開始時から粉末飼料（F-2；船橋農場、船橋）を与えて飼育した。飼料の組成は、炭水化物 58.2% (wt/wt)、脂肪 4.8% (wt/wt)、蛋白 20.8% (wt/wt)、繊維 3.2% (wt/wt)であった。トログリタゾン（三共株式会社、東京）を 0.2% (wt/wt)の割合で混合した飼料を 4日間または 19–28 日間与えた。体重と摂餌量を測定し、それらの結果からトログリタゾンの投与量は 200 mg/kg/日と算出された。動物は 4日目または 19–28 日目に組織標本或いは脂肪組織の total RNA の抽出に供した。本実験は三共株式会社動物実験委員会の承認を得た。

2.2 血糖値、血漿インスリンおよび血漿中性脂肪の測定

血液を尾静脈から採取した。血糖値は実験終了後、グルコローダー-F（株式会社エーアンドティー、東京）を用い、グルコースオキシダーゼ法で測定した。血漿インスリンはラットインスリンを標準としたインスリン RIA キット、ラット ¹²⁵I-インスリンアッセイシステム（Amersham International、UK）を用いて測定した。血漿トリグリセリドは比色法による測定キット triglyceride-G-test（和光純薬工業、大阪）を用いて測定した。

2.3 RNA の抽出

動物を断頭した後、腹部皮下、後腹膜、副精巣周囲及び腸間膜の白

色脂肪組織を採取した。脂肪組織の湿重量を測定した後、液体窒素で瞬時に凍結し total RNA の抽出まで -80°C で保存した。2 g の組織を用い、標準的な酸性グアニジンフェノールクロロホルム法 (Chomczynsky and Sacchi, 1987) により total RNA を抽出した。

2.4 プローブ

マウスの脂肪細胞の cDNA をテンプレートとして PPAR γ とレプチンのプローブを増幅した。全長 1518 ヌクレオシドと 517 ヌクレオシドの cDNA をそれぞれ、PPAR γ とレプチンのプローブとして、pBluescript (Stratagene Inc., USA) にクローニングした (Tontonoz *et al.*, 1994b; Zhang *et al.*, 1994)。TNF α のプローブは久留米医科大学医学部 (福岡県) の山田博士から入手した。この TNF α のプローブは全 1105 塩基あり、143 塩基の 5' 側の非翻訳領域、708 塩基の翻訳領域 (これは全 235 アミノ酸配列に対応する)、254 塩基の 3' 側の非翻訳領域からなる (Pennica *et al.*, 1985)。452 ヌクレオシドのグリセルアルデヒド 3 リン酸デヒドロゲナーゼのプローブは市販品 (Clontech) を用いてマウスの肝臓の cDNA をテンプレートとして PCR 法で作製し、pCR[®]2.1 (Invitrogen Corp.) にクローニングした。プローブは [α - ^{32}P]dCTP (110 TBq/mmol) (DuPont-NEN) を用いて Megaprime DNA labeling system (Amersham International) で標識した。

2.5 ノーザンプロット解析

Total RNA を 50% formamide、20 mM 3-(N-morpholino)propane sulfonic acid、5 mM sodium acetate、1 mM EDTA、6.5% formaldehyde を含む pH 7.0 の溶液に再溶解した後、 90°C で 5 分間加熱し、1% アガロースゲル電気泳動を行った。16 又は 20 μg の total RNA を各レーンに載

せた。3時間の電気泳動後、説明書に従いキャピラリー法によってRNAをナイロン膜（Hybond N⁺；Amersham International）へ転写した。ブロッキング後、膜を標識したプローブと共に、5×Denhardt's solution、6×SSC、0.5% SDS 及び 50% formamide を含む hybridizing buffer 中において 42°Cで一晩放置した。その後、2×SSC と 0.1% SDS を含む溶液を用いて室温 5分間で2回洗浄し、最後に 0.2×SSC と 0.1% SDS を含む溶液を使用して室温で10分間の洗浄を2回行った。この膜をバイオイメージングアナライザー（Fuji-BAS、富士フィルム）のイメージングプレートに暴露した。バンドの強度をイメージ解析システムの定量化プログラムを使って定量化し、arbitrary unit で表した。

2.6 脂肪組織中のトリグリセリドと DNA の測定

0.5–1 g の各組織を、150 mM 塩化ナトリウム、0.1% Triton X-100、10 mM トリスを含む pH 8.0、40–50°C の溶液 10 mL 中で最大 60 秒ホモジナイズした（ポリトロンホモジナイザー；Kinematica AG, Lucerne, Switzerland）。この懸濁液の 50 µL をカロリメトリック法による測定キット（Sanassay TG-N; Sanko Pure Chemical Co., Ltd., Tokyo, Japan）を用いたトリグリセリド測定に使用した。DNA の測定のために、ホモジナイズした残りに SDS、proteinase K、EDTA を加え最終濃度がそれぞれ、0.1%、100 mg/mL、10 mM の混液を作製した。37°C で 1–2 時間インキュベーションの後、DNA を標準的な phenol-chloroform 抽出法で抽出した。DNA の沈査を、10 µg/mL ribonuclease、1 mM EDTA、10 mM Tris (pH 8.0) を含む溶液に再溶解した。この溶液の DNA 含量を 260 nm の OD (吸光度) から算出した (50 µg/mL の DNA 溶液の OD_{260 nm} = 1 として算出)。

2.6 組織学的解析と外形計測

断頭後、即座に脂肪組織を組織凍結剤（Tissue-Tek® OCT compound; Miles Inc., Kankakee, IL）に包埋し、 -80°C で保存した。組織切片（厚さ 20 または $10\ \mu\text{m}$ ）をクリオスタットで切り出し、ガラススライドに貼り付けた。ホルマリン固定後、数枚の切片をヘマトキシリン-エオジンで染色した。脂肪細胞の数と大きさの測定用に、ヘマトキシリン-エオジンで染色した白色脂肪組織の部分面積をイメージ解析システム（Q600; Leica Cambridge Ltd., Cambridge, UK）を用いて解析した。4 日間処置したラットから得た脂肪組織の切片を 100%エタノールで固定したのち、アポトーシスを起こした核の検出用に、TUNEL（terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling）法のキット（In Situ Cell Death Detection Kit, POD; Boehringer Mannheim Biochemicals, Indianapolis, IN）を用いて染色した（Gavrieli *et al.*, 1992）。核の総数とアポトーシス陽性の核の数を計数し、総数に対するアポトーシス陽性核の割合を算出した。

2.7 統計解析

データは平均±標準誤差で表した。生物学的データ及び mRNA 発現レベルはそれぞれ、Sheffe 及び Tukey 多重比較解析法により解析した。 P 値が 0.05 未満の場合を統計的有意とみなした。

3. 結果

3.1 血糖値、血漿インスリン値、血漿脂質レベルの改善

トログリタゾンとは、統計的に有意ではないものの肥満ラットの体重をわずかに増加させた (Fig. 10A)。トログリタゾンによる摂餌量への影響はなかった (データ省略)。肥満対照ラットの血糖値は、非肥満ラットよりも 30% 高値に過ぎなかったが (Fig. 10B)、重度のインスリン抵抗性のためにインスリン値は 19 倍の高値であった (Fig. 10C)。トログリタゾンは、肥満動物のインスリン抵抗性を改善し、血糖値とインスリン値を非肥満ラットの水準まで低下させた (Fig. 10B, 10C)。血漿中性脂肪値は肥満ラットにおいて著しく高かった。トログリタゾンを処置した非肥満及び肥満ラットのいずれにおいても中性脂肪値が低下した (Fig. 10D)。肥満ラットにおける血漿遊離脂肪酸 (FFA) 値についても検討したところ、トログリタゾンは FFA 値を有意に低下させた (対照群 : 0.663 ± 0.061 、トログリタゾン処置群 : 0.209 ± 0.021 meq/L、 $P < 0.01$)。

3.2 脂肪組織重量

肥満ラットにおける白色脂肪組織の湿重量は非肥満ラットと比較して 4-6 倍大きかった。トログリタゾンは白色脂肪組織の全湿重量を有意には増加させなかった。トログリタゾン処置によって、肥満ラットでは全く脂肪組織重量の低下が見られなかったが、非肥満ラットでは白色脂肪重量は有意ではないものの低下傾向を示した (Table 3)。

3.3 白色脂肪組織におけるレプチン、TNF α 、および PPAR γ の mRNA の発現

トログリタゾンあるいは肥満そのもののレプチンの mRNA 発現レベルに対する効果を検討した結果、レプチンの mRNA 発現レベルは、副精巣周囲脂肪組織を除き肥満ラットのすべての脂肪組織において有意に高く、皮下白色脂肪組織においては非肥満ラットの 10 倍に達した。トログリタゾンは、検討したいずれの白色脂肪組織においても、肥満ラットのレプチン mRNA 発現レベルを非肥満ラットとほぼ同水準まで著明に低下させた (Fig. 11A, 11B)。統計学的には有意ではないが、非肥満ラットのレプチン mRNA 発現レベルも約 20%まで低下させた (Fig. 11B)。肥満ラットの TNF α の mRNA 発現レベルは、後腹膜および腸間膜白色脂肪組織においてそれぞれ 2 および 1.4 倍に増加した (Fig. 10A, 11C)。トログリタゾンは上昇した TNF α mRNA レベルを非肥満対照群のレベルまで低下させた (Fig. 11A, 11C)。また、肥満ラットの皮下白色脂肪組織においては 41%まで mRNA 発現レベルを低下させた (Fig. 11C)。興味深いことに、トログリタゾンは非肥満ラットの TNF α の mRNA にはほとんど影響を与えなかったが、TNF α の mRNA 発現は有意ではないものの、わずかに増加した例もみられた (Fig. 11C)。PPAR γ の mRNA 発現については、肥満の有無、トログリタゾンの有無にかかわらず、有意な変化は無かった (Fig. 11D)。肥満ラットにおけるトログリタゾンのレプチン、TNF α 、及び PPAR γ の mRNA 発現に対する効果は、グリセルアルデヒド 3 リン酸脱水素酵素のレベルでの補正の有無にかかわらず、本質的に同一の結果であった (データ省略)。

3.4 白色脂肪組織における脂肪細胞

後腹膜白色脂肪組織全体に含まれる中性脂肪含量に変化は無かった

(Fig. 12A)。中性脂肪含量とは対照的に、DNA 含量はトログリタゾン
を処置した肥満ラットにおいて 1.5 倍まで増加した (Fig. 12B)。これ
は、脂肪細胞のサイズが小さくなっていることを示唆している。実際
に、DNA (μg) あたりの中性脂肪 (mg) で表した単位 DNA 量あたりの
中性脂肪含量が、後腹膜白色脂肪組織においてトログリタゾン処置に
より低下した (Fig. 12C)。トログリタゾンは白色脂肪組織の全体の組
織重量に影響を与えなかったが、組織解析により、トログリタゾンが
細胞の数を増加させると同時に、脂肪細胞のサイズを低下させること
が明らかとなった (Fig. 13)。脂肪細胞のサイズに加えて、脂肪細胞分
布の外形計測解析により、トログリタゾンが後腹膜と皮下のいずれの
白色脂肪組織においてもサイズの小さい脂肪細胞群の細胞数を増加さ
せ、サイズの大きい脂肪細胞群の細胞数を減少させていることが示さ
れた (Fig. 14A, 14B)。実際に、後腹膜脂肪組織において、トログリタ
ゾン処置した肥満ラットの白色脂肪のサイズ ($2864 \pm 163 \mu\text{m}^2$) は、ト
ログリタゾン非処置肥満ラットの白色脂肪のサイズ ($5031 \pm 242 \mu\text{m}^2$)
よりも小さかった (Fig. 14, Table 4)。同様の結果が皮下組織におい
ても得られた。更に重要なことに、 $900,000 \mu\text{m}^2$ の脂肪組織切片の中の小
型脂肪細胞 ($<2,500 \mu\text{m}^2$) の数を肥満対照ラットと比較すると、後腹
膜及び皮下白色脂肪組織においてそれぞれ、トログリタゾン処置によ
り 4.3 倍 (195 vs. 45) 及び 4.5 倍 (177 vs. 39) に増加した (Fig. 14, Table
4)。大型脂肪細胞の細胞数は、肥満対照ラットに比しトログリタゾン
処置肥満ラットでは、後腹膜及び皮下白色脂肪組織においてそれぞれ、
43% 及び 54% に減少した。肥満ラットに比べて非肥満ラットでは大型
脂肪細胞数の減少は顕著ではなかったが、トログリタゾンは非肥満ラ
ットにおいても、後腹膜及び皮下白色脂肪組織の小型脂肪細胞数を増
加させ、大型脂肪細胞数を減少させた (Figs. 13, 14, Table 4)。同様の

結果が腸間膜白色脂肪組織においても得られた。次に、トログリタゾン処置の脂肪組織におけるアポトーシスに対する影響を調べた。アポトーシスを示す核は対照群とトログリタゾン処置群両方の脂肪組織に見られたが、アポトーシスの核の数はトログリタゾンを処置した白色脂肪組織において増加していた (Fig. 15)。観察した核の総数に対するアポトーシス陽性の核の割合は、トログリタゾン処置及び対照ラットにおいてそれぞれ、10.8%および4.3%であった (Table 5)。

4. 考察

本章における主な知見は、Zucker 肥満ラットにおいて、トログリタゾンが、脂肪組織の量あるいは総中性脂肪含量に影響を与えることなく、白色脂肪組織の脂肪細胞の数を増加させたことである (Fig. 13, 14)。組織学的計測解析により、トログリタゾンが白色脂肪組織において小型脂肪細胞 ($<2,500 \mu\text{m}^2$) の数をおよそ 4 倍に増加させることが明らかとなった (Table 4)。更に、後腹膜白色脂肪組織の総 DNA 含量は 1.5 倍に増加した (Fig. 12B)。脂肪組織における間質細胞のような他の細胞に対する脂肪細胞の割合は 20% 未満と報告されていることから (Cleary *et al.*, 1979)、脂肪細胞の総 DNA 含量の増加は 3.5 倍に達していたと見積もることができる。トログリタゾンは、脂肪組織に特異的に発現する PPAR γ (Braissant *et al.*, 1996; Tontonoz *et al.*, 1994b) のリガンドになることが示された (Sears *et al.*, 1996; Lehmann *et al.*, 1995; Willson *et al.*, 1996; Berger *et al.*, 1996)。3T3-L1 前駆脂肪細胞において、トログリタゾンによる PPAR γ の活性化が前駆脂肪細胞から脂肪細胞への分化に一致して認められた (Ohsumi *et al.*, 1994)。これらのことから、トログリタゾンが白色脂肪分化において重要な役割を果たしているという仮説が立てられた (Lehmann *et al.*, 1995; Szalkowski *et al.*, 1995; Forman *et al.*, 1995; Kliewer *et al.*, 1995)。本章において明らかとなった *in vivo* でのトログリタゾン処置による白色脂肪細胞数の増加は、トログリタゾンの PPAR γ を通じたこのような脂肪細胞分化促進効果によるものと考えられる。

さらに、トログリタゾン処置は大型脂肪細胞の数を 50% まで減少させることが明らかとなった (Table 4)。大型脂肪細胞数の減少は、小型

脂肪細胞の数が増加したにもかかわらず、白色脂肪組織の全体の量に変化が無かったことと合致する。ヒトの脂肪細胞は、成長因子の欠乏あるいは軽度の熱障害が起こるとアポトーシスを起こすことが報告されていることから (Prins *et al.*, 1994)、次に、大型脂肪細胞数の減少がトログリタゾンに反応してアポトーシスの増加によって引き起こされるのかどうかを調べた。トログリタゾン処置によって引き起こされた大型脂肪細胞数の減少は、少なくとも部分的にはアポトーシスの増加によると考えられる。実際に、トログリタゾンを処置した白色脂肪組織では、アポトーシス陽性の核の割合が 2.5 倍まで増加した (Fig. 15, Table 5)。このように、トログリタゾン処置ラットの脂肪組織においてはアポトーシスによって大型脂肪細胞が減少するが、トログリタゾン処置によって新たな小型脂肪細胞が分化増生するために均衡状態が保持されると考えられる。

肥満ラットの大型脂肪細胞 (切片面積 $> 5,000 \mu\text{m}^2$) の数は非肥満ラットと比較して 2~3 倍多かった (Table 4)。また、白色脂肪におけるレプチンと TNF α の mRNA 発現レベルは肥満ラットで増加した (Fig. 11B, 11C)。更に、肥満ラットにおけるトログリタゾン処置が大型脂肪細胞数を 50% 低下させることが見出された (Fig. 13, 14, Table 4)。また更に、トログリタゾン処置肥満ラットにおいて、白色脂肪組織で増加したレプチンおよび TNF α の mRNA 発現レベルは非肥満ラットのレベルにまで低下した (Fig. 11B, 11C)。レプチンは前駆脂肪細胞と未成熟脂肪細胞では発現していないが (Maffei *et al.*, 1995)、完全に分化した脂肪細胞において発現している (Zhang *et al.*, 1994; Maffei *et al.*, 1995)。TNF α は成熟脂肪細胞のマーカーである aP2 を変異させたマウスから得た脂肪組織には発現していない (Hotamisligil *et al.*, 1996a)。更に、レプチンおよび TNF α の mRNA は、肥大化した脂肪細胞を有す

る肥満インスリン抵抗性のげっ歯類 (Fig. 11B, Table 4) の脂肪組織において高発現している (Hotamisligil *et al.*, 1993; Maffei *et al.*, 1995; Pedersen *et al.*, 1992)。これらのことから、トログリタゾン処置において、脂肪組織の量が変化せずに TNF α とレプチンの mRNA の高発現が正常化することは、大型脂肪細胞数が減少することと関係していると考えられる。トログリタゾンは、*in vitro* の研究において、遺伝子の転写段階を抑制してレプチンの発現を直接低下させることが報告されている (Kallen and Lazar, 1996)。このように、トログリタゾンはまた、大型脂肪細胞における TNF α とレプチンの mRNA の発現を直接抑制する可能性も考えられる。TNF α は、少なくとも一部では、肥満によって引き起こされるインスリン抵抗性の一因であると報告されていることから (Hotamisligil *et al.*, 1993; Hotamisligil *et al.*, 1994a; Hotamisligil *et al.*, 1994b; Hotamisligil *et al.*, 1996b)、トログリタゾンによる TNF α mRNA の発現低下が筋肉のインスリン抵抗性の改善に強く貢献していると考えられる。TNF α は二つの方法でインスリン抵抗性を引き起こすが、チアゾリジンジオン誘導体はそれらの TNF α のシグナル伝達に影響を与えることが示された。トログリタゾンは *in vivo* の脂肪組織において TNF α の発現を低下させる (Hofmann *et al.*, 1994) が、本章においても Zucker 肥満ラットで TNF α の mRNA 発現を低下させることが確認された (Fig. 11C)。また、トログリタゾンは前駆脂肪細胞および脂肪細胞の培養において、TNF α のある作用を遮断することが報告されている (Ohsumi *et al.*, 1994; Szalkowski *et al.*, 1995)。更に、チアゾリジンジオン誘導体は肥満インスリン抵抗性動物モデルにおいて増加したレプチンの mRNA 発現を低下させることが示された (Zhang *et al.*, 1996)。本章では、これらの結果を Zucker 肥満ラットの皮下および腹腔内脂肪組織を含む 4 つの異なる脂肪組織において確認することができた (Fig.

11B)。レプチンについては、少し議論の余地がある (Wang *et al.*, 1997) ものの、肝臓と脂肪組織におけるインスリン抵抗性を惹起することが報告された (Cohen *et al.*, 1996; Muller *et al.*, 1997)。このことから、トログリタゾンによるレプチン mRNA 発現レベルの著明な低下がインスリン抵抗性の改善に寄与していると考えられる。また、レプチン mRNA 発現レベルの低下が大型脂肪細胞数の低下のマーカーとなる可能性も考えられる。

小型白色脂肪細胞群の増加がもととなってインスリン感受性や遊離脂肪酸によって惹起されるインスリン抵抗性の改善につながると考えられる。体重 120–160 g の 4–5 週齢の Sprague-Dawley ラットから得られた小型脂肪細胞は、インスリン存在下で、体重 550 g 以上の 12 か月齢の Sprague-Dawley ラットから得られた大型脂肪細胞よりも多くのグルコースを酸化することができる (Olefsky, 1976)。小型脂肪細胞は最大反応値に達しないインスリンレベルで大型脂肪細胞よりもグルコースを取り込む (Olefsky, 1976)。また、小型脂肪細胞の数の増加はトログリタゾン処置後の遊離脂肪酸レベルの低下の原因であるかもしれない。なぜならば、インスリンの抗脂肪分解作用において脂肪細胞が小さいほど感受性が高いことが知られているからである (Abbott and Foley, 1987)。このように、白色脂肪組織における小型脂肪細胞の増加は、チアゾリジンジオン誘導体による血清遊離脂肪酸及び中性脂肪レベルの低下 (Sreenan *et al.*, 1996; Stevenson *et al.*, 1990) に寄与し、ひいては肥満によって引き起こされたインスリン抵抗性を改善したと考えられる。

皮下脂肪組織は腹腔内脂肪組織とは全く異なった役割があるかもしれない。この研究で、肥満ラットの皮下脂肪組織においてレプチンの mRNA 発現が他の脂肪組織よりも高いことを示した (Fig. 11B)。この

ことと一致して、レプチンの発現レベルが腹膜の組織よりも皮下脂肪の方が高いことが報告されている (Montague *et al.*, 1997)。本章では、TNF α の mRNA 発現レベルが皮下や副精巣周囲脂肪組織ではなく、腸間膜や後腹膜脂肪組織において上昇していることを示した (Fig. 11C)。このように、皮下と内臓脂肪組織は遺伝子発現においてまったく異なるパターンを示しており、このパターンの違いは明確な生理学的意味を持つと考えられる。

本章で得られたデータから、トログリタゾンによって引き起こされる最も重要な事象は白色脂肪組織における脂肪細胞数の増加であると考えられる。白色脂肪組織において増加した細胞数は、小型脂肪細胞数の増加や大型脂肪細胞数の減少などの白色脂肪組織の質的な変化と一致している (Fig. 13, 14, Table 4)。これらの変化は、インスリン感受性の改善に寄与すると考えられる遊離脂肪酸や TNF α やレプチンの低下と関連している (Fig. 16)。

トログリタゾンが脂肪組織の遺伝子発現や細胞の代謝の著しい変化を引き起こすという事実は、脂肪細胞に特異的に発現している PPAR γ がトログリタゾンの主な標的であるという事実と合致する。また、トログリタゾンによる脂肪細胞の遺伝子発現と代謝の変化が *in vivo* でのインスリン抵抗性の改善と関連していることは非常に重要である。これは、肥大化した脂肪組織の遺伝子発現と代謝の変化が肥満を伴ったインスリン抵抗性のもとにあるという概念を示唆する。本章の成果は、トログリタゾンが肥満を伴ったインスリン抵抗性に有用であり効果的であるという事象の作用メカニズムを解明したと考えられるものである。

5. 小括

チアゾリジンジオン化合物は、主に脂肪組織に発現する peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) γ を活性化することが知られている。*In vivo* においてチアゾリジンジオン化合物の一つであるトログリタゾン (CS-045) がインスリン抵抗性を改善するメカニズムを解明するために、本章では肥満、インスリン抵抗性モデル動物 (Zucker 肥満ラット) の白色脂肪組織に対するその作用を検討した。トログリタゾンを 19–28 日間投与すると、このラットの軽度の高血糖と著しい高インスリン血症が正常化した。血漿中性脂肪値は、トログリタゾンにより肥満と非肥満のいずれのラットにおいても低下した。トログリタゾンは肥満ラットの白色脂肪の総量を変化させなかったが、後腹膜及び皮下脂肪組織の小型脂肪細胞 ($<2,500 \mu\text{m}^2$) の数を約 4 倍に増加させた。また、トログリタゾンは大型脂肪細胞 ($>5,000 \mu\text{m}^2$) の数を 50% まで低下させた。トログリタゾンを処置した後腹膜脂肪組織中のアポトーシスを示す核の割合は対照群に比べ 2.5 倍ほど高かった。さらに、トログリタゾンは肥満ラットの後腹膜と腸間膜白色脂肪組織でそれぞれ 2 倍および 1.4 倍に上昇している TNF α の mRNA 発現レベルを正常化した。トログリタゾンは肥満ラットの白色脂肪において 4–10 倍に上昇しているレプチンの mRNA 発現レベルも顕著に低下させた。

これらの結果は、トログリタゾンの主な作用が PPAR γ を介して白色脂肪組織における小型脂肪細胞の数を増加させることにもとづくことを示唆している。トログリタゾン処置肥満ラットの白色脂肪組織における小型脂肪細胞数の増加と大型脂肪細胞数の減少は、増加した TNF α の mRNA 発現レベルと血漿中脂質を正常化し、インスリン抵抗性を改

善に導く重要な機序であると考えられる (Fig. 16)。

第3章 2型糖尿病モデル動物、WBN/Kob-*Lepr^{fa}* ラットの
糖尿病の病態とその進行におけるインスリン抵抗性の
役割

1. はじめに

糖尿病は大きく分けて 1 型糖尿病と 2 型糖尿病に分類される。1 型糖尿病の成因は膵臓 β 細胞の破壊にともなう絶対的なインスリン分泌不足であるのに対し、2 型糖尿病の主な成因はインスリン抵抗性とインスリン分泌障害であると考えられている (Gupta *et al.*, 2012)。

近年、糖尿病の有病率の急激な上昇は世界的に深刻な問題となっている (Wild *et al.*, 2004)。その為、新たな糖尿病治療薬の開発が強く望まれている。新薬候補物質の薬理作用の評価や糖尿病の病態を解明する試験の実施には、糖尿病モデル動物の使用が必要不可欠である。

雄性 WBN/Kob 系ラットは肥満を伴わない慢性膵炎や膵内分泌障害による糖尿病などの広範な病態を発症することが知られている (Ohashi *et al.*, 1990; Tsuchitani *et al.*, 1985)。秋元らにより、この WBN/Kob ラットに肥満遺伝子 ($Lepr^{fa}$) を交配によって導入した fa/fa コンジェニック系統が新規糖尿病モデルラットとして作出された (Akimoto *et al.*, 2008)。肥満遺伝子 ($Lepr^{fa}$) を WBN/Kob ラットに導入したこのコンジェニックラット (以下 fa/fa ラットと略す) は、多因子遺伝性糖尿病モデルであり、糖尿病を自然発生的に発症し、主に肥満を伴い高血糖や膵炎などの病態を示す。しかしながら、この動物における糖尿病の病態とその進行においてインスリン分泌不全とインスリン抵抗性がどのように関与するかは十分に知られていない。

Kaji らは、 fa/fa ラットの高血糖の発症にインスリン分泌能の低下が関与することを示した (Kaji *et al.*, 2012)。本章では、 fa/fa ラットの糖尿病の病態およびその進行におけるインスリン抵抗性の関与を検討した。

2. 実験材料および実験方法

2.1 使用動物および飼育条件

雄性 *fa/fa* ラットと同週齢の雄性 Wistar ラット(日本 SLC 株式会社、静岡)をプラスチック製飼育ケースに入れ、粉末の標準飼料(CRF-1[®], Oriental Yeast, Tokyo, Japan)を与え、水を自由に摂取させ、室温を $23 \pm 3^{\circ}\text{C}$ 、湿度を $55 \pm 5\%$ に調節した。飼育室の照明は7時から19時までとした。本章におけるすべての動物実験を麻布大学で実施し、そのプロトコールは同大学動物実験倫理委員会の承認を得た。

2.2 週齢によるインスリン分泌能およびインスリン抵抗性の変化の検討

既報(Kaji *et al.*, 2012)に従い、5週齢、7週齢、11週齢の *fa/fa* ラットおよび Wistar ラットを各5匹ずつ用いて静脈内糖負荷試験(intravenous glucose tolerance test: IVGTT)を実施した。16時間絶食後、動物にペントバルビタール Na (50 mg/kg) を腹腔内投与した。血糖値とインスリン値の基礎値を得るために、血液 0.2 mL を頸静脈からヘパリン処理したチューブに採取し、その後、グルコース液(20% w/v、大塚製薬工場)を 0.5 g/kg の用量で大腿静脈内に投与した。糖負荷後2分、5分、10分、20分に頸静脈より血液を各 0.2 mL 採取し、その後、3 mL を腹大静脈からヘパリン処理チューブへ採取した。血液サンプルは、 $3,000 \times g$ 、 4°C で、15分間遠心した後、血漿を分離して凍結保存した。

2.3 トログリタゾンによる糖尿病発症予防および治療効果の検討

fa/fa ラット (n = 30) を、治療実験のための [1] トログリタゾン群 (n = 8) と [2] 対照群 (n = 8)、予防実験のための [3] トログリタゾン群 (n = 7) と [4] 対照群 (n = 7) の 4 群に分けた。トログリタゾン群のラットには、トログリタゾン (Daiichi-Sankyo Co., Ltd., Tokyo, Japan) を 0.2% (w/w) の割合で配合した標準飼料を、予防実験においては 7 週齢から、治療実験においては 12 週齢から、それぞれ 4 週間与えた。実験の間、毎週、血糖値およびインスリン値測定用の血液サンプルを尾静脈から採血した。実験の終わりには IVGTT を実施した。

2.4 血液生化学分析

ヘパリン処理した血漿中の総コレステロール (T-Chol)、トリグリセリド (TG) および非エステル結合型脂肪酸 (NEFA) を自動測定器 (JCA-BM 2250; JEOL Ltd., Tokyo Japan) で測定した。血漿インスリン値はラットインスリン酵素結合免疫測定キット (Morinaga Institute of Biological Science, Inc., Yokohama, Japan) を用いて測定した。血糖は酵素法 (和光純薬工業株式会社) により測定した。

IVGTT 時の糖負荷前および糖負荷後 2 分、5 分、10 分、20 分に得た血漿の血糖値及びインスリン値を測定した。更に、IVGTT 時の 0-20 分におけるインスリン値の濃度-時間曲線下面積 (AUC) を台形法により算出し、これを膵臓 β 細胞のインスリン分泌能の指標として用いた。尚、糖負荷前のインスリン値を、IVGTT 時 0 分のインスリン値とみなした。インスリン抵抗性状態の指標となるインスリン抵抗性指数 (homeostasis model assessment insulin resistance : HOMA-IR、Matthews *et al.*, 1985) を絶食時の血糖値とインスリン値をもとに計算した。

2.5 統計学的解析

結果は平均値±標準誤差で表示した。統計学的検定には対応のない Student の t 検定を用い、 P 値が 0.05 未満の場合を統計的有意とみなした。

3. 結果

3.1 *fa/fa* ラットと Wistar ラットの比較

5 週齢において、*fa/fa* ラットの血糖値は Wistar ラットと比べて同等であった。Wistar ラットの血糖値は実験期間中上昇しなかったが、*fa/fa* ラットの血糖値は上昇し、9 週齢及び 11 週齢では有意に高くなった ($P < 0.01$ 、Fig. 17A)。一方、血漿インスリン値は、5 週齢では Wistar ラットよりも *fa/fa* ラットで有意に高かったが、9 週齢と 11 週齢では有意差はなかった (Fig. 17B)。

インスリン抵抗性の指標である HOMA-IR は、*fa/fa* ラットと Wistar ラットのいずれにおいても 5 週齢から 11 週齢までほとんど一定であった。しかし、実験期間を通じて *fa/fa* ラットの HOMA-IR の値は Wistar ラットよりも有意に高かった ($P < 0.01$ 、Fig. 17C)。

インスリン分泌能を表すインスリン値の AUC は、5 週齢においては、Wistar ラットに比べ *fa/fa* ラットは有意に高い値を示した ($59.7 \pm 4.8 \text{ min} \cdot \text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ vs $130.7 \pm 6.2 \text{ min} \cdot \text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$; $P < 0.01$)。しかし、Wistar ラットでは 9 週齢、11 週齢においても 5 週齢と同レベルの値を示したが、*fa/fa* ラットでは著しく低下し、9 週齢および 11 週齢では Wistar ラットに比べて有意に ($P < 0.01$) 低い値を示した (Fig. 17D)。

3.2 トログリタゾンの予防効果

トログリタゾン群と対照群の平均摂餌量に有意な差はなかった (トログリタゾン群 : $23.1 \pm 1.2 \text{ g/day}$ 、対照群 : $26.1 \pm 1.5 \text{ g/day}$)。

7 週齢の *fa/fa* ラットでは、トログリタゾン群と対照群のラットは同程度の血糖値を示した (トログリタゾン群 : $208.1 \pm 21.2 \text{ mg/dL}$ 、対照

群：205.3 ± 32.6 mg/dL)。しかし 8 週齢以降では、対照群は急激に血糖値が上昇し、11 週齢では 541.1 ± 6.0 mg/dL の高血糖を示した。一方、トログリタゾン群では 7 週齢以降、血糖値の上昇が全くみられず、逆に血糖値は 100 mg/dL 前後まで低下し、11 週齢まで持続した (Fig. 18A)。7 週齢ではトログリタゾン群と対照群にはインスリン値に有意な差はなかった (トログリタゾン群：10.6 ± 0.7 ng/mL、対照群：11.4 ± 0.6 ng/mL)。8 週齢以降に両群にインスリン値の低下がみられ、9 週齢においてはトログリタゾン群のインスリン値は対照群に比し有意に低値を示した ($P < 0.05$; Fig. 18B)。10 週齢と 11 週齢では両群ともほぼ等しい値を示した。

静脈内糖負荷試験における血糖値は、糖負荷後 2~5 分で対照群とトログリタゾン群の両群ともにピークに達した。トログリタゾン群の血糖値は、糖負荷前後で対照群に比べて常に有意に ($P < 0.01$) 低い値を示した (Fig. 18C)。血糖値の上昇と同様に、インスリン値は両群とも糖負荷後 2 分でピークに達し、その後は緩やかに減少した。糖負荷前のインスリン値に両群で差はなかったが、糖負荷後はトログリタゾン群において対照群に比べ有意に高いインスリン値を示した ($P < 0.01$; Fig. 18D)。また、トログリタゾンを投与した *fa/fa* ラットの血糖値とインスリン値は、Wistar ラットと同等であった (データ省略)。トログリタゾン群の HOMA-IR は対照群に比べて有意に低かった ($P < 0.01$; Fig. 18E)。インスリン値の AUC はトログリタゾン群において対照群に比べ有意に高かった ($P < 0.01$; Fig. 18F)。

予防試験では、トログリタゾン群は対照群に対して総コレステロールが有意 ($P < 0.01$) に高かったが、TG および NEFA は有意に低かった ($P < 0.01$; Table 6A)。

3.3 トログリタゾンの治療効果

トログリタゾン群と対照群の間で、平均摂餌量の有意な差はみられなかった（トログリタゾン群：26.5 ± 0.5 g/day、対照群：26.0 ± 0.9 g/day）。

投与前の 12 週齢においてトログリタゾン群と対照群ともに高い血糖値を示した（トログリタゾン群：610.1 ± 18.1 mg/dL、対照群：576.9 ± 28.8 mg/dL； $P > 0.05$ ）。対照群では高血糖が持続したが、トログリタゾン群では投与後 1 週間後の 13 週齢から血糖値が低下し、対照群に比べて有意に低値（ $P < 0.01$ ）を示した。実験期間中、トログリタゾン群の血糖値は経時的に低下した（Fig. 19A）。インスリン値については両群ともに同じレベルを推移し、投与後 3 週目の 15 週齢を除いて両群間に有意な差はみられなかった（Fig. 19B）。

IVGTT では、両群とも糖負荷後 2 分でピークを示し、その後は緩やかに減少したが、トログリタゾン群の血糖値は糖負荷前後で対照群に比べて常に有意に（ $P < 0.01$ ）低い値を示した（Fig. 19C）。インスリン値は、糖負荷後の血糖値の上昇に応答して、糖負荷後 2 分でピークを示したが、糖負荷前後で両群に有意な差はみられなかった（Fig. 19D）。しかし、両群のインスリン値は 11 週齢の *fa/fa* ラットや Wistar ラットと比較して非常に低かった。トログリタゾン群の HOMA-IR は、対照群に比べ有意に低い値を示した（ $P < 0.01$ ；Fig. 19E）。トログリタゾン群と対照群のインスリン値の AUC はそれぞれ 14.5 ± 3.6 と 12.1 ± 1.8 min · ng · mL⁻¹であった（ $P > 0.05$ ；Fig. 19F）。

治療試験において、トログリタゾン群では対照群に対して、総コレステロールが有意（ $P < 0.01$ ）に高かったが、TG および NEFA は有意（ $P < 0.01$ ）に低かった（Table 6B）。

4. 考察

2 型糖尿病はインスリンの分泌と感受性におけるバランスの崩れによっておこる慢性高血糖を主徴とする疾患である。本章では *fa/fa* ラットの糖尿病の発症および進展におけるインスリン抵抗性の関与を検討した。

Wistar ラットとの比較試験から、*fa/fa* ラットは高いインスリン抵抗性を有することが明らかとなった。このことは過去の報告 (Kaji *et al.*, 2012) および肥満遺伝子 (*Lepr^{fa}*) を有する Zucker 肥満ラットが肥満症、インスリン抵抗性および高インスリン血症を呈することを示した成績 (Chua *et al.*, 1996; Leonard *et al.*, 2005; Zucker, 1965) と合致する。*fa/fa* ラットは 5 週齢から 11 週齢まで常に高いインスリン抵抗性を示した。一方、*fa/fa* ラットの血漿インスリン濃度は 5 週齢では高い値を示していたが、高血糖が発現した 9 週齢および 11 週齢では低下した。この血漿インスリン濃度の低下は WBN/Kob ラットで観察された同様の膵臓 β 細胞の機能障害 (Akimoto *et al.*, 2008; Tsuchitani *et al.*, 1985) によるものと考えられる。*fa/fa* ラットの血中インスリン濃度で観察される、若齢では高く週齢が進むと低くなる特徴は、2 型糖尿病の病態に合致するものである。*fa/fa* ラットの由来である Zucker 肥満ラットおよび WBN/Kob ラットと比較すると、*fa/fa* ラットは糖尿病の発症が早いことと膵臓の障害が重篤であることが特徴である。特に *fa/fa* ラットでみられる膵障害は、肥満を呈する 2 型糖尿病モデルとして汎用される Zucker 糖尿病肥満ラットと大きく異なる点である。Zucker 糖尿病肥満ラットをはじめとする既存の 2 型糖尿病モデル動物との相違点を明確にするためには、遺伝的背景を調査することが必要であると考えられ

る。

本章では、*fa/fa* ラットの糖尿病の発症および進展におけるインスリン抵抗性の関与を明らかにするために、インスリン感受性増強薬であるトログリタゾンを用いて検討した。トログリタゾンは PPAR γ を介してインスリン抵抗性を改善するチアゾリジンジオン誘導体のプロトタイプである (Fujiwara *et al.*, 1988)。第 2 章およびこれまでの報告から、トログリタゾンは、大型脂肪細胞のアポトーシスと前駆脂肪細胞から小型脂肪細胞への分化を促進することが示唆されている (Kadowaki, 2000; Okuno *et al.*, 1998; Yamauchi *et al.*, 2001)。また、大型脂肪細胞は TNF α やレプチン、遊離脂肪酸を多量に産生し、これらが肝臓や骨格筋でのインスリンの情報伝達を障害してインスリン抵抗性を惹起すると考えられている (Okuno *et al.*, 1998)。

本実験において、*fa/fa* ラットにトログリタゾンを投与すると、予防実験および治療実験のいずれにおいても、有意に高血糖を抑制し、インスリン抵抗性を改善させた。トログリタゾンの用量は、130–140 mg/kg であったが、これは、ラットを用いた薬理実験でしばしば用いられる用量である (Fujiwara *et al.*, 1988; Marra *et al.*, 2005; Wendel and Belury, 2006)。トログリタゾンを *fa/fa* ラットに投与すると、トリグリセリドを低下させ、総コレステロールを上昇させたが、このような血漿脂質に与える効果は、既報のヒトや動物実験の結果 (Min *et al.*, 2002; Willi *et al.*, 2002) と合致する。更に、トログリタゾンは、体重も増加させた (データ省略)。これは、チアゾリジンジオン誘導体の典型的な副作用の一つである (Ross *et al.*, 2011; Stein *et al.*, 2013)。

既報 (Kaji *et al.*, 2012) と同様に、本実験においても、5 週齢及び 7 週齢の *fa/fa* ラットは高インスリン血症を呈し、その後、血漿インスリン値は徐々に低下した。最終的にインスリン値が低下すると高血糖が

生じることから、この初期の高インスリン値は高度なインスリン抵抗性を代償していると考えられる。膵臓 β 細胞の機能低下は高血糖に先行しているとの報告がある (Akimoto *et al.*, 2008; Akimoto *et al.*, 2012)。インスリン分泌能は、IVGTT の結果から、予防実験において亢進していた。しかしながら、8~9 週齢のトログリタゾン群の血漿インスリン値は急激に低下して、対照群よりも低かった。7、10、11 週齢のインスリン値はほぼ同程度であった。この結果に至る機序の詳細は明らかではない。ただし、トログリタゾンは直接炎症やネクロシスを抑制しないことから、トログリタゾンを投与した *fa/fa* ラットにおけるインスリン分泌能の亢進は、膵炎やネクロシスを防ぐようなトログリタゾンの膵臓 β 細胞に対する直接効果ではないと考えられる。一つの仮説として、トログリタゾンによるインスリン抵抗性の改善が正常血糖値を維持するのに必要なインスリンの量を減らし、その結果、膵臓 β 細胞のインスリン分泌の枯渇を軽減したことが考えられる。

以上を Fig. 20 に要約する。*fa/fa* ラットは早期からインスリン抵抗性が生じているものの、インスリン分泌の亢進によってこれを代償し、高血糖が抑制されていると考えられる。直接の証明は十分ではないが、ラットが加齢に伴いインスリンの代償的分泌が膵臓 β 細胞を疲弊させ、ひいてはこれがインスリン分泌障害と糖尿病発症につながると考えられる。一旦、糖尿病が発症すると、重篤なインスリン抵抗性とインスリン分泌不全の結果として恒常的な高血糖が生じる。トログリタゾン投与により、インスリン抵抗性が改善され、これをインスリン分泌能が凌駕できれば、血糖値は正常化すると考えられる。一方、インスリン抵抗性が改善されず、高血糖が持続すると、膵臓への負荷が継続し、糖尿病につながる病態生理学的な状態を悪化させることになり、膵臓 β 細胞における不可逆的変化をもたらすと考えられるが、この仮説を

確認するためには、更なる病理学的解析が必要である。

本章の成績より、*fa/fa* ラットではインスリン抵抗性とインスリン分泌障害が生じており、このラットにおける糖尿病の病態とその進行にはインスリン抵抗性が明確に関与していることが示唆された。2 型糖尿病モデル動物である *fa/fa* ラットは、膵障害の亢進や肥満を伴う 2 型糖尿病の病態生理学的機序の解明や新たな抗糖尿病薬の開発に有用であると考えられる。

5. 小括

WBN/Kob-*Lepr^{fa}* (*fa/fa*) ラットは、膵臓のインスリン分泌障害と重度のインスリン抵抗性を特徴とする新規 2 型糖尿病モデル動物である。既にこの *fa/fa* ラットはインスリン分泌障害とその高血糖の発症への関与が示されてきたが、本章では、この動物における糖尿病の発症と進展におけるインスリン抵抗性の役割を解明することを目的とした。本章ではインスリン抵抗性改善薬としてトログリタゾンを用いた。インスリン抵抗性及びインスリン分泌能はそれぞれ、HOMA-IR 及び静脈内糖負荷試験における血漿インスリン値の曲線下面積によって測定した。*fa/fa* ラットは 5 週齢から 11 週齢で、同週齢の Wistar ラットと比較して著しいインスリン抵抗性を生じていた。*fa/fa* ラットのインスリン分泌能は、5 週齢では Wistar ラットよりも高いが、9 週齢及び 11 週齢では Wistar ラットより低下した。*fa/fa* ラットにトログリタゾンを 0.2% (wt/wt) 含有する標準食を 7 週齢 (予防実験) および 12 週齢 (治療実験) から 4 週間与え、インスリン抵抗性とインスリン分泌能を検討した。その結果、トログリタゾンは予防実験、治療実験のいずれにおいてもインスリン抵抗性を改善し、高血糖、高トリグリセリド血症を有意に改善した。これらの結果から、インスリン抵抗性が、*fa/fa* ラットの 2 型糖尿病の発症と進展に強く関与していることが示唆された。

総 括

本研究の結果から、インスリン抵抗性改善薬であるトログリタゾン
は骨格筋においてはインスリンによる糖取り込みを増強し、脂肪組織
においては小型脂肪細胞の数の増加と大型脂肪細胞の数の減少によっ
てインスリン抵抗性を改善していることが明らかとなった。これらの
作用により、トログリタゾンは 2 型糖尿病の成因の一つであるインス
リン抵抗性を軽減し、高血糖を改善すると考えられた。本研究成果は
チアゾリジンジオン系インスリン抵抗性改善薬の作用機序を明らかに
したとともに、WBN/Kob-*Lepr^{fa}* ラットにおけるインスリン抵抗性の重
要性を示した。また、本研究成果は、更なる 2 型糖尿病の病態メカニ
ズムの解明研究、新規 2 型糖尿病モデル動物の開発、新規作用メカニ
ズムのインスリン抵抗性改善薬の開発に貢献すると期待される。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、終始ご指導、ご鞭撻を賜りました麻布大学 獣医学部 薬理学教室の浅井史敏 教授、同大学 獣医生化学研究室の山下匡 教授、同大学 獣医第二生理学研究室教授の折戸謙介 教授に深謝いたします。東京大学医学部代謝・栄養病態学（糖尿病・代謝内科）教室の門脇孝 教授にはご丁寧かつご熱心なご指導を賜りましたことを深謝いたします。

また、これまでの研究活動を支援していただきました第一三共株式会社 研究開発本部 研究統括部長 大槻昌彦 博士、循環代謝研究所長 高橋正明 博士、第一三共生命科学研究振興財団 常務理事 金子次男 博士に謹んで感謝の意を表します。

最後に、共同研究者として実験にご協力いただきました第一三共株式会社 循環代謝研究所の皆様には厚くお礼申し上げます。

参考文献

- Abbott, W. G. and Foley, J. E. (1987): Comparison of body composition, adipocyte size and glucose and insulin concentration in Pima Indian and Caucasian children. *Metabolism* 36(6): 576–579.
- Akimoto, T., Nakama, K., Katsuta, Y., Zhang, X. J., Ohsuga, M., Ishizaki, M., Sawai, N. and Ozawa, H. (2008): Characterization of a novel congenic strain of diabetic fatty (WBN/Kob-*Lepr^{fa}*) rat. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 366(2): 556–562.
- Akimoto, T., Terada, M. and Shimizu, A. (2012): Progression of pancreatitis prior to diabetes onset in WBN/Kob-*Lepr^{fa}* rats. *J. Vet. Med. Sci.* 74(1): 65–70.
- Apweiler, A. and Freund, P. (1993): Development of glucose intolerance in obese (*fa/fa*) Zucker rats. *Horm. Metab. Res.* 25(10): 521–524.
- Berger, J., Bailey, P., Biswas, C., Cullinan, C. A., Doebber, T. W., Hayes, N. S., Saperstein, R., Smith, R. G. and Leibowitz, M. D. (1996). Thiazolidinediones produce a conformational change in peroxisomal proliferator-activated receptor- γ : binding and activation correlate with antidiabetic actions in *db/db* mice. *Endocrinology* 137(10): 4189–4195.
- Boden, G. (1997): Role of fatty acids in the pathogenesis of insulin resistance and NIDDM. *Diabetes* 46(1): 3–10.

- Braissant, O., Foufelle, F., Scotto, C., Dauca, M. and Whali, W. (1996): Differential expression of peroxisomal proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR- α , - β , and - γ in the adult rat. *Endocrinology* 137(1): 354–366.
- Cartee, G. D., Young, D. A., Sleeper, M. D., Zierath, J., Wallberg-Henriksson, H. and Holloszy, J.O. (1989): Prolonged increase in insulin-stimulated glucose transport in muscle after exercise. *Am. J. Physiol.* 256(4 Pt 1): E494–E499.
- Chomczynsky, P., and Sacchi, N. (1987): Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162(1): 156–159.
- Chua, S. C. Jr, White, D. W., Wu-Peng, X. S., Liu, S. M., Okada, N., Kershaw, E. E., Chung, W. K., Power-Kehoe, L., Chua, M., Tartaglia, L. A. and Leibel, R. L. (1996): Phenotype of fatty due to Gln269Pro mutation in the leptin receptor (*Lepr*). *Diabetes* 45(8): 1141–1143.
- Cleary, M. P., Brasel, J. A. and Greenwood, M. R. (1979): Developmental changes in thymidine kinase, DNA, and fat cellularity in Zucker rats. *Am. J. Physiol.* 236(5): E508–E513.
- Cohen, B., Novick, D. and Rubinstein, M. (1996): Modulation of insulin activities by leptin. *Science* 274(5290): 1185–1188.
- DeFronzo, R. A. (1988): The Triumvirate: β -Cell, Muscle, Liver: A Collusion Responsible for NIDDM. *Diabetes* 37(6): 667–687.

- Forman, B. M., Tontonoz, P., Chen, J., Brun, R. P., Spiegelman, B. M. and Evans, R. M. (1995): 15-deoxy-D12,14-prostaglandin J2 is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR γ . *Cell* 83(5): 803–812.
- Fujiwara, T., Okuno, A., Yoshioka, S. and Horikoshi, H. (1995): Suppression of hepatic gluconeogenesis in long-term Troglitazone-treated diabetic KK and C57BL/KsJ-*db/db* mice. *Metabolism* 44(4): 486–490.
- Fujiwara, T., Yoshioka, S., Yoshioka, T., Ushiyama, I. and Horikoshi, H. (1988): Characterization of new oral antidiabetic agent CS-045. Studies in KK and *ob/ob* mice and Zucker fatty rats. *Diabetes* 37(11): 1549–1558.
- Fujiwara, T., Wada, M., Fukuda, K., Fukami, M., Yoshioka, S., Yoshioka, T. and Horikoshi, H. (1991): Characterization of CS-045, a new oral antidiabetic agent. II. Effects on glycemic control and pancreatic islet structure at a late stage of the diabetic syndrome in C57BL/KsJ-*db/db* mice. *Metabolism* 40(11): 1213–1218.
- Garetto, L. P., Richter, E. A., Goodman, M. N. and Ruderman N. B. (1984): Enhanced muscle glucose metabolism after exercise in the rat: The two phases. *Am. J. Physiol.* 246(6 Pt 1): E471–E475.
- Gavrieli, Y., Sherman, Y. and Ben-Sasson, S. A. (1992): Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J. Cell. Biol.* 119(3): 493–501.
- Gupta, D., Krueger, C. B. and Lastra, G. (2012): Over-nutrition, obesity and

insulin resistance in the development of β -cell dysfunction. *Curr. Diabetes Rev.* 8(2): 76–83.

Gutmann, I. and Wahiefeld, A. W. (1974): L-(+)-Lactate: Determination with lactate dehydrogenase and NAD, in Bergmeyer HU (ed): *Methods of Enzymatic Analysis*, vol 3 (ed 2). New York; NY, Academic, pp 1492–1495.

Ho, J., Leung, A. K. C. and Rabi, D. (2011): Hypoglycemic agents in the management of type 2 diabetes mellitus. *Recent Patents on Endocrine, Metabolic & Immune Drug Discovery* 5(1): 66–73.

Hofmann, C., Lorenz, K., Braithwaite, S. S., Colca, J. R., Palzauk, B. J., Hotamisligil, G. S. and Spiegelman, B. M. (1994): Altered gene expression for tumor necrosis factor- α and its receptors during drug dietary modulation of insulin resistance. *Endocrinology* 134(1): 264–270.

Hotamisligil, G. S., Budavari, A., Murray, D. and Spiegelman, B. M. (1994a): Reduced tyrosine kinase activity of the insulin receptor in obesity-diabetes. *J. Clin. Invest.* 94(4): 1543–1549.

Hotamisligil, G. S., Johnson, R. S., Distel, R. J., Ellis, R., Papaioannou, V. E. and Spiegelman, B. M. (1996a): Uncoupling of obesity from insulin resistance through a targeted mutation in aP2, the adipocyte fatty acid binding protein. *Science* 274(5291): 1377–1379.

Hotamisligil, G. S., Murray, D. L., Choy, L. N. and Spiegelman, B. M. (1994b): Tumor necrosis factor- α inhibits signaling from the insulin

- receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91(11): 4854–4858.
- Hotamisligil, G. S., Peraldi, P., Budavari, A., Ellis, R., White, M. F. and Spiegelman, B. M. (1996b): IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF- α - and obesity-induced insulin resistance. *Science* 271(5249): 665–668.
- Hotamisligil, G. S., Shargill, N. S. and Spiegelman, B. M. (1993): Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* 259(5091): 87–91.
- Hue, L. and Rinder, M. H. (1987): Role of fructose 2,6-bisphosphate in the control of glycolysis in mammalian tissues. *Biochem. J.* 245(1): 313–324.
- Iwamoto, Y., Kuzuya, T., Matsuda, A., Awata, T., Kumakura, S., Inooka, G. and Shiraishi, I. (1991): Effect of new oral antidiabetic agent CS-045 on glucose tolerance and insulin secretion in patients with NIDDM. *Diabetes Care* 14(11): 1083–1086.
- James, D. E., Burleigh, K. M. and Kraegen, E. W. (1986): *In vivo* glucose metabolism in individual tissues of the rat. Interaction between epinephrine and insulin. *J. Biol. Chem.* 261(14): 6366–6374.
- James, D. E., Jenkins, A. B. and Kraegen, E. W. (1985): Heterogeneity of insulin action in individual muscle *in vivo*: Euglycemic clamp studies in rats. *Am. J. Physiol.* 248(5 Pt 1): E567–E574.
- Kadowaki, T. (2000): Insights into insulin resistance and type 2 diabetes

from knockout mouse models. *J. Clin. Invest.* 106(4): 459–465.

Kaji, N., Okuno, A., Ohno-Ichiki, K., Oki, H., Ishizawa, H., Shirai, M. and Asai, F. (2012): Plasma profiles of glucose, insulin and lipids in male WBN/Kob-*Lepr^{fa}* rat, a new model of type 2 diabetes with obesity. *J. Vet Med. Sci.* 74(9): 1185–1189.

Kallen, C. B., and Lazar, M. A. (1996): Antidiabetic thiazolidinediones inhibit leptin (*ob*) gene expression in 3T3-L1 adipocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93(12): 5793–5796.

Kellerer, M., Kroder, G., Tippmer, S., Berti, L., Kiehn, R., Mosthaf, L. and Haring, H. (1994): Troglitazone prevents glucose-induced insulin resistance of insulin receptor in rat-1 fibroblasts. *Diabetes* 43(3): 447–453.

Kliwer, S. A., Lenhard, J. M., Willson, T. M., Pate, I., Morris, D. C. and Lehmann, J. M. (1995): A prostaglandin J2 metabolite binds peroxisome proliferator-activated receptor γ and promotes adipocyte differentiation. *Cell* 83(5): 813–819.

Kliwer, S. A., Umesono, K., Noonan, D. J., Heyman, R. A. and Evans, R. M. (1992): Convergence of 9-cis retinoic acid and peroxisome proliferator signaling pathways through heterodimer formation of their receptors. *Nature* 358(6389): 771–774.

Kumar, S., Boulton, A. J. M., Beck-Nielsen, H., Berthezene, F., Muggeo, M., Persson, B., Spinas, G. A., Donoghue, S., Lettis, S. and Stewart-Long, P. (1996): Troglitazone, an insulin action enhancer,

- improves metabolic control in NIDDM patients. *Diabetologia* 39(6): 701–709.
- Lee, M. K. and Olefsky, J. M. (1995): Acute effects of troglitazone on *in vivo* insulin action in normal rats. *Metabolism* 44(9): 1166–1169.
- Lehmann, J. M., Moore, L. B., Smith-Oliver, T. A., Wilkison, W. O., Willson, T. M. and Kliewer, S. A. (1995): An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor γ . *J. Biol. Chem.* 270(22): 12953–12956.
- Leonard, B. L., Watson, R. N., Loomes, K. M., Phillips, A. R. and Cooper, G. J. (2005): Insulin resistance in the Zucker diabetic fatty rat: a metabolic characterisation of obese and lean phenotypes. *Acta Diabetol.* 42(4): 162–170.
- Maffei, M., Fei, H., Lee, G. H., Dani, C., Leroy, P., Zhang, Y., Proenca, R., Negrel, R., Ailhaud, G. and Friedman, J. M. (1995): Increased expression in adipocytes of *ob* RNA in mice with lesions of the hypothalamus and with mutations at the *db* locus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92(15): 6957–6960.
- Marra, F., DeFranco, R., Robino, G., Novo, E., Efsen, E., Pastacaldi, S., Zamara, E., Vercelli, A., Lottini, B., Spirli, C., Strazzabosco, M., Pinzani, M. and Parola, M. (2005): Thiazolidinedione treatment inhibits bile duct proliferation and fibrosis in a rat model of chronic cholestasis. *World J. Gastroenterol.* 11(32): 4931–4938.

- Matthews, D. R., Hosker, J. P., Rudenski, A. S., Naylor, B. A., Treacher, D. F. and Turner, R. C. (1985): Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 28(7): 412–419.
- Min, K. M., Park, S. W., Cho, K. Y., Song, M. S., Kim, D. K., Park, G. S. and Lee, M. K. (2002): Troglitazone improves blood flow by inhibiting neointimal formation after balloon injury in Otsuka Long-Evans Tokushima fatty rats. *Metabolism* 51(8): 998–1002.
- Montague, C. T., Prins, J. B., Sanders, L., Digby, J. E. and O’Rahilly, S. (1997): Depot- and sex-specific differences in human leptin mRNA expression: implications for the control of regional fat distribution. *Diabetes* 46(3): 342–347.
- Muller, G., Ertl, J., Gerl, M. and Preibisch, G. (1997): Leptin impairs metabolic actions of insulin in isolated rat adipocytes. *J. Biol. Chem.* 272(16): 10585–10593.
- Nolte, L. A., Gulve, E. A., and Holloszy, J. O. (1994): Epinephrine-induced in vivo muscle glycogen depletion enhances insulin sensitivity of glucose transport. *J. Appl. Physiol.* 76(5): 2054–2058.
- Ohashi, K., Kim, J. H., Hara, H., Aso, R., Akimoto, T. and Nakama, K. (1990): WBN/Kob rats. A new spontaneously occurring model of chronic pancreatitis. *Int. J. Pancreatol.* 6(4): 231–247.
- Ohsumi, J., Sakakibara, S., Yamaguchi, J., Miyadai, K., Yoshioka, S., Fujiwara, T., Horikoshi, H. and Serizawa, N. (1994): Troglitazone

prevents the inhibitory effects of inflammatory cytokines on insulin-induced adipocyte differentiation in 3T3-L1 cells. *Endocrinology* 135(5): 2279–2282.

Okuno, A., Tamemoto, H., Tobe, K., Ueki, K., Mori, Y., Iwamoto, K., Umesono, K., Akanuma, Y., Fujiwara, T., Horikoshi, H., Yazaki, Y. and Kadowaki, T. (1998): Troglitazone increases the number of small adipocytes without the change of white adipose tissue mass in obese Zucker rats. *J. Clin. Invest.* 101(6): 1354–1361.

Olefsky, J. M. (1976): The effects of spontaneous obesity on insulin binding, glucose transport, and glucose oxidation of isolated rat adipocytes. *J. Clin. Invest.* 57(4): 842–851.

Parker, J. C. (2002): Troglitazone: the discovery and development of a novel therapy for the treatment of Type 2 diabetes mellitus. *Advanced Drug Delivery Reviews* 54(9): 1173–1197

Passonneau, J. W. and Lowry, O. H. (1974): Pyruvate: Fluorimetric assay, in Bergmeyer HU (ed): *Methods of Enzymatic Analysis*, vol 3 (ed 2). New York, NY, Academic, pp 1452–1456.

Pedersen, O., Kahn, C. R. and Kahn, B. B. (1992): Divergent regulation of the Glut 1 and Glut 4 glucose transporters in isolated adipocytes from Zucker rats. *J. Clin. Invest.* 89(6): 1964–1973.

Pennica, D., Hayflick, J. S., Bringman, T. S., Palladino, M. A. and Goeddel, D. V. (1985): Cloning and expression in *Escherichia coli* of the cDNA for murine tumor necrosis factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*

82(18): 6060–6064.

Prins, J. B., Walker, N. I., Winterford, C. M. and Cameron D. P. (1994): Apoptosis of human adipocytes *in vitro*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 201(2): 500–507.

Randle, P. J., Garland, P. B., Hales, C. N. and Newsholme, E. A. (1963): The glucose-fatty acid cycle: its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. *Lancet* I(7285): 785–789.

Randle, P. J., Kerbey, A. L. and Espinal, J. (1988): Mechanisms decreasing glucose oxidation in diabetes and starvation: Role of lipid fuels and hormones. *Diabetes Metab. Rev.* 4(7): 623–638.

Ross, S. A., Dzida, G., Vora, J., Khunti, K., Kaiser, M. and Ligthelm, R. J. (2011): Impact of weight gain on outcomes in type 2 diabetes. *Curr. Med. Res. Opin.* 27(7): 1431–1438.

Ruderman, N. B., Houghton, C. R. S. and Hems, R. (1971): Evaluation of the isolated perfused rat hindquarter for the study of muscle metabolism. *Biochem. J.* 124(3): 639–651.

Saltiel, A. R. and Olefsky, J. M. (1996): Thiazolidinediones in the treatment of insulin resistance and type II diabetes. *Diabetes* 45(12): 1661–1669.

Schoonians, K., Staels, B. and Auwerx, J. (1996): The peroxisome proliferators activated receptors (PPARs) and their effects on lipid

- metabolism and adipocyte differentiation. *Biochim. Biophys. Acta.* 1302(2): 93–109.
- Sears, I., MacGinntie, M. A., Kovacs, L. G. and Graves, R.A. (1996): Differentiation-dependent expression of the brown adipocyte uncoupling protein gene: regulation by peroxisome proliferator-activated receptor γ . *Mol. Cell. Biol.* 16(7): 3410–3419.
- Segal, K. R., Landt, M. and Klein, S. (1996): Relationship between insulin sensitivity and plasma leptin concentration in lean and obese men. *Diabetes* 45(7): 988–991.
- Seifter, S., Dayton, S., Novic, B., et al. (1950): The estimation of glycogen with the anthrone reagent. *Arch. Biochem. Biophys.* 25(1): 191–200.
- Shiota, M., and Sugano, T. (1986): Characteristics of rat hindlimbs perfused with erythrocyte- and albumin-free medium. *Am. J. Physiol.* 251(1 Pt 1): C78–C84.
- Sreenan, S., Sturis, J., Pugh, W., Burant, C. F. and Polonsky, K. S. (1996): Prevention of hyperglycemia in the Zucker diabetic fatty rat by treatment with metformin or troglitazone. *Am. J. Physiol.* 271(4 Pt 1): E742–E747.
- Stein, S. A., Lamos, E. M. and Davis, S. N. (2013): A review of the efficacy and safety of oral antidiabetic drugs. *Expert Opin. Drug Saf.* 12(2):153–175.
- Stephens, J. M. and Pekala, P. H. (1991): Transcriptional repression of the

- GLUT4 and C/EBP genes in 3T3-L1 adipocytes by tumor necrosis factor- α . *J. Biol. Chem.* 266(32): 21839–21845.
- Stevenson, R. W., Hutson, N. J., Krupp, M. N., Volkmann, R. A., Holland, G. F., Eggler, J. F., Clark, D. A., McPherson, R. K., Hall, K. L., Danbury, B. H., Michael-Gibbs E. and Kreutter D. K. (1990): Actions of novel antidiabetic agent englitazone in hyperglycemic hyperinsulinemic *ob/ob* mice. *Diabetes* 39(10): 1218–1227.
- Suter, S. L., Nolan, J. J., Wallace, P., Gumbiner, B. and Olefsky, J. M. (1992): Metabolic effects of new oral hypoglycemic agent CS-045 in NIDDM subjects. *Diabetes Care* 15(2): 193–203.
- Szalkowski, D., White-Carrington, S., Berger, J. and Zhang, B. (1995): Antidiabetic thiazolidinediones block the inhibitory effect of tumor necrosis factor-alpha on differentiation, insulin-stimulated glucose uptake, and gene expression in 3T3-L1 cells. *Endocrinology* 136(4): 1474–1481.
- Taylor, S. I., Barr, V. and Reitman, M. (1996): Does leptin contribute to diabetes caused by obesity? *Science* 274(5290): 1151–1152.
- Tontonoz, P., Hu, E. and Spiegelman, B. M. (1994a): Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR γ 2, a lipid-activated transcription factor. *Cell* 79(7): 1147–1156.
- Tontonoz, P., Hu, E., Graves, R. A., Budavari, A. I. and Spiegelman, B. M. (1994b): mPPAR gamma 2: tissue-specific regulator of an adipocyte enhancer. *Genes Dev.* 8(10): 1224–1234.

- Tsuchitani, M., Saegusa, T., Narama, I., Nishikawa, T. and Gonda, T. (1985): A new diabetic strain of rat (WBN/Kob). *Lab. Anim.* 19(3): 200–207.
- Van Schaftingen, E., Lederer, B., Bartrons, R., and Hers, H. G. (1982): A kinetic study of pyrophosphate fructose-6-phosphate phosphotransferase from potato tubers. Application to a microassay of fructose-2,6-bisphosphate. *Eur. J. Biochem.* 129(1): 191–195.
- Wang, Y., Kuropatwinski, K. K., White, D. W., Hawley, T. S., Hawley, R. G., Tartaglia, L. A. and Baumann, H. (1997): Leptin receptor action in hepatic cells. *J. Biol. Chem.* 272(26): 16216–16223.
- Wendel, A. A. and Belury, M. A. (2006): Effects of conjugated linoleic acid and troglitazone on lipid accumulation and composition in lean and Zucker diabetic fatty (*fa/fa*) rats. *Lipids* 41(3): 241–247.
- Wild, S., Roglic, G., Green, A., Sicree, R. and King, H. (2004): Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care* 27(5): 1047–1053.
- Willi, S. M., Kennedy, A., Wallace, P., Ganaway, E., Rogers, N. L. and Garvey, W. T. (2002): Troglitazone antagonizes metabolic effects of glucocorticoids in humans: effects on glucose tolerance, insulin sensitivity, suppression of free fatty acids, and leptin. *Diabetes* 51(10): 2895–2902.
- Williamson, D. H., Lund, P. and Krebs, H. A. (1967): The redox state of free nicotinamide-adenine dinucleotide in cytoplasm and mitochondria

of rat liver. *Biochem. J.* 103(2): 514–527.

Willson, T. M., Cobb, J. E., Cowan, D. J., Wiethe, R. W., Correa, I. D., Prakash, S. R., Beck, K. D., Moore, L. B., Kliewer, S. A. and Lehmann, J. M. (1996): The structure-activity relationship between peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonism and the antihyperglycemic activity of thiazolidinediones. *J. Med. Chem.* 39(3): 665–668.

Yamauchi, T., Kamon, J., Waki, H., Murakami, K., Motojima, K., Komeda, K., Ide, T., Kubota, N., Terauchi, Y., Tobe, K., Miki, H., Tsuchida, A., Akanuma, Y., Nagai, R., Kimura, S. and Kadowaki, T. (2001): The mechanisms by which both heterozygous peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) deficiency and PPARgamma agonist improve insulin resistance. *J. Biol. Chem.* 276(44): 41245–41254.

Zhang, B., Graziano, M. P., Doebber, T. W., Leibowitz, M. D., White-Carrington, S., Szalkowski, D. M., Hey, P. J., Wu, M., Cullinan, C. A., Bailey, P., Lollmann, B., Frederich, R., Flier, J. S., Strader, C. D. and Smith, R. G. (1996): 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(16): 9455–9459.

Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L. and Friedman, J. M. (1994): Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372(6505): 425–432.

Zucker, L. M. (1965): Hereditary obesity in the rat associated with hyperlipemia. *Ann. NY Acad. Sci.* 131(1): 447–458.

图 表

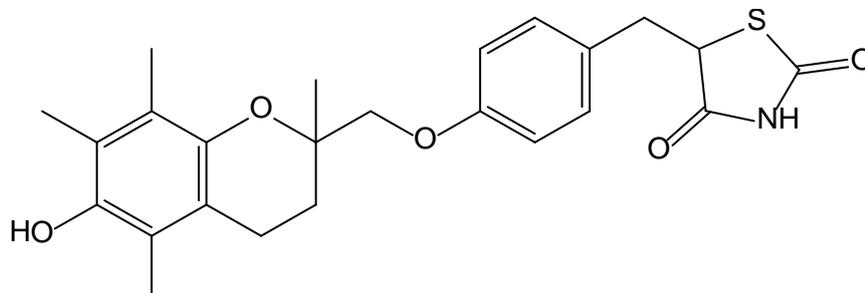


Fig. 1. Chemical structure of troglitazone.

Compound name: トログリタゾン (JAN)、Troglitazone (JAN/USAN/INN)、
5-[[4-[(6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethyl-chroman-2-yl)methoxy]phenyl]meth
yl]-1,3-thiazolidine-2,4-dione

Composition formula: $C_{24}H_{27}NO_5S$

Molecular weight: 441.5

Code number: CS-045

CAS registry number: 97322-877

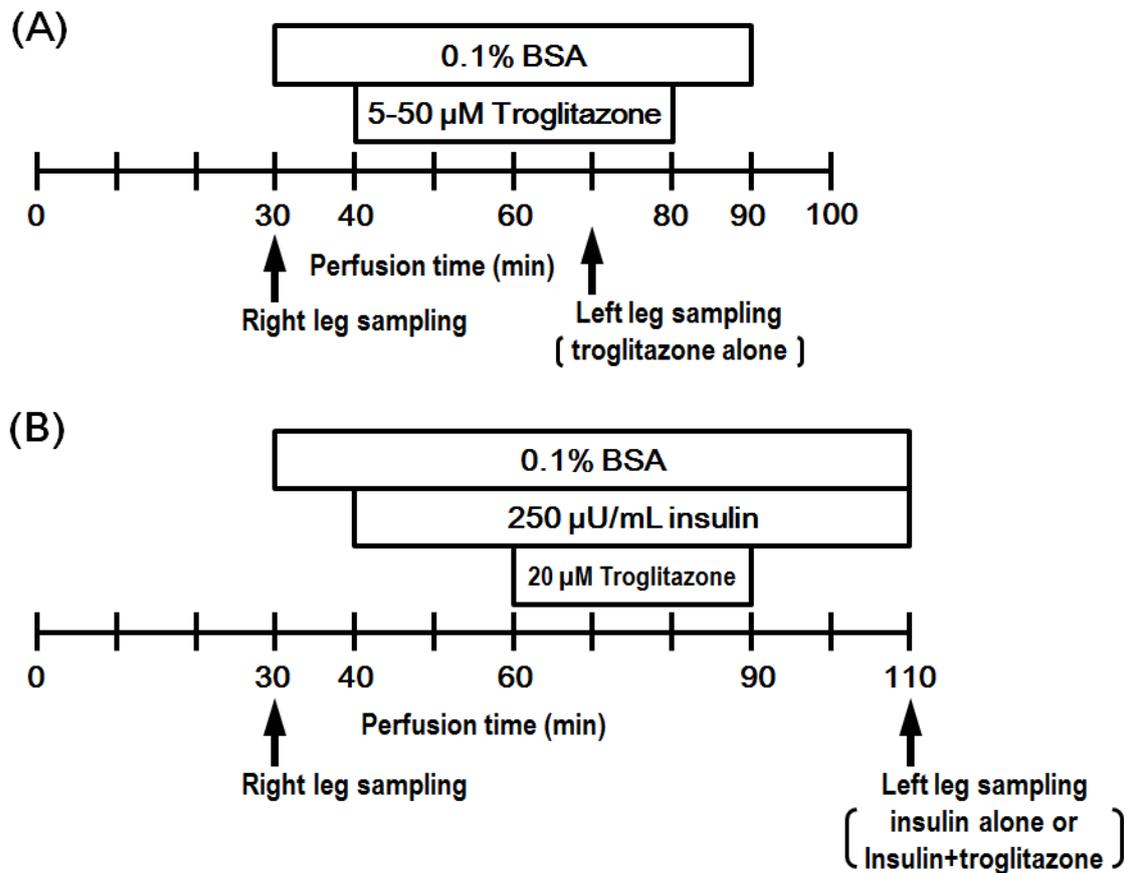


Fig. 2. Experimental protocol without (A) or with (B) insulin treatment. Perfusion medium contains 6 mM glucose.

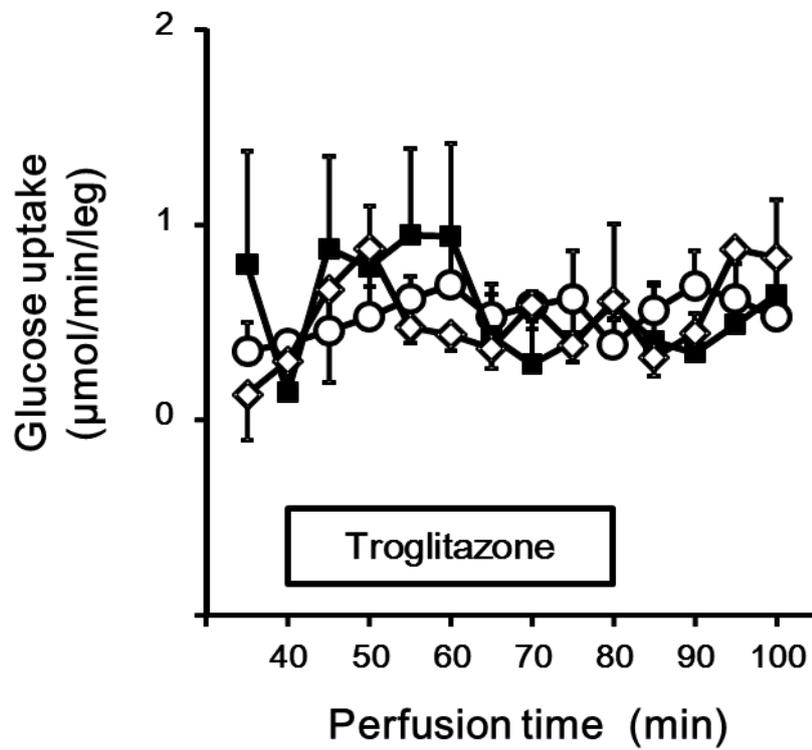


Fig. 3. Effect of troglitazone on glucose uptake in the absence of insulin. (○) Control group, n = 4; (■) 20 μM , n = 3; (◇) 50 μM , n = 3. Values are the mean \pm SEM.

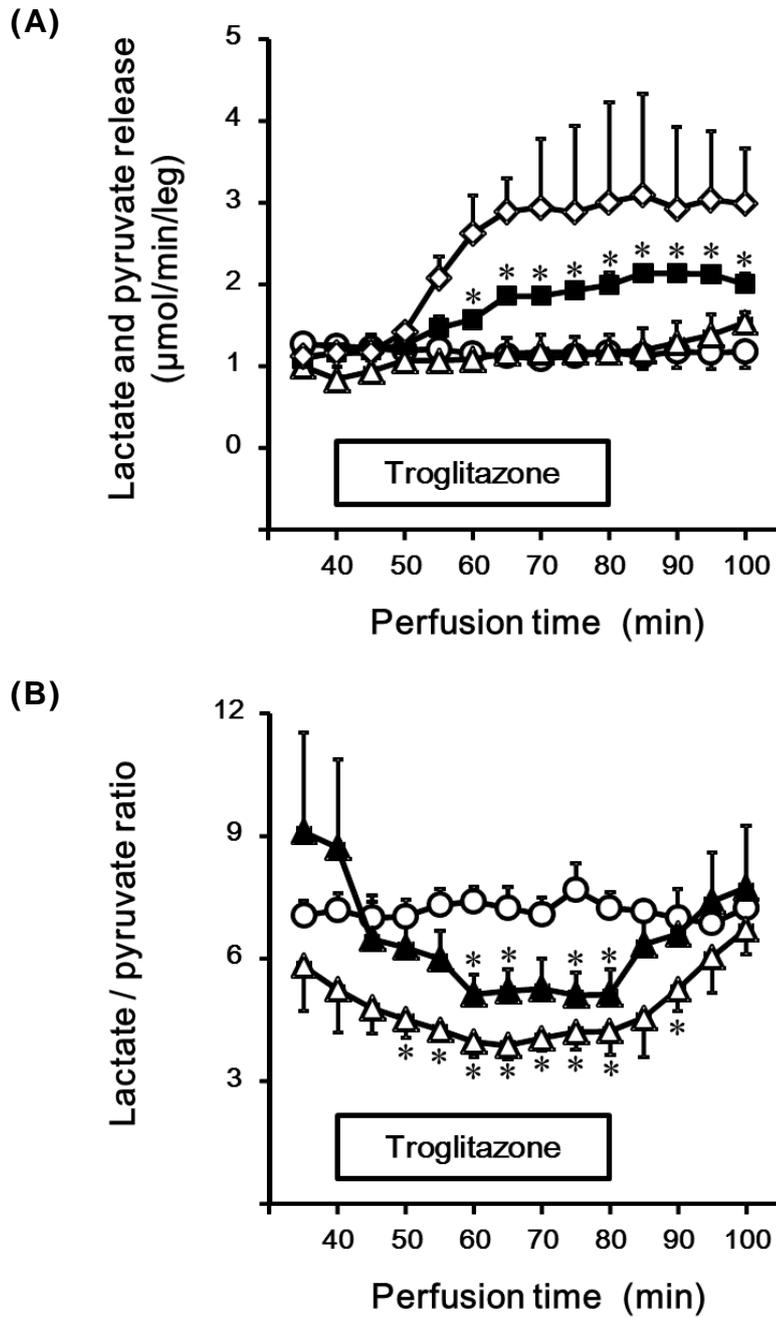


Fig. 4. Effects of troglitazone on lactate and pyruvate release (A) and the Lactate/Pyruvate ratio (B) in the absence of insulin. (○) Control group; (▲) 5 μ M; (△) 10 μ M; (■) 20 μ M; (◇) 50 μ M. Values are the mean \pm SEM from 3 to 4 experiments. * P < 0.05 vs. control.

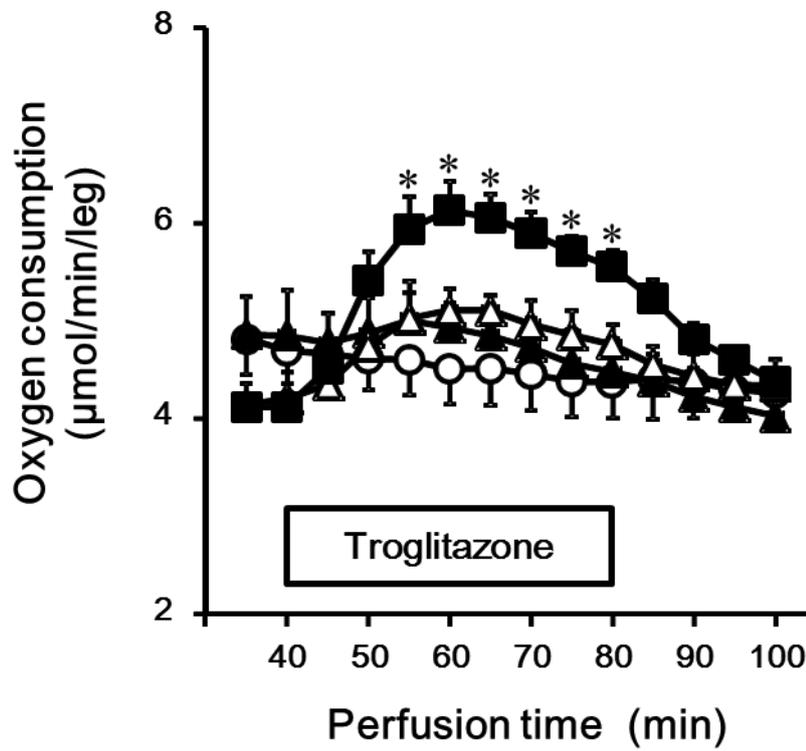


Fig. 5. Effect of troglitazone on oxygen consumption in the absence of insulin. (○) Control group; (▲) 5 μM; (△) 10 μM; (■) 20 μM. Values are the mean ± SEM from 3 to 4 experiments. * $P < 0.05$ vs. control.

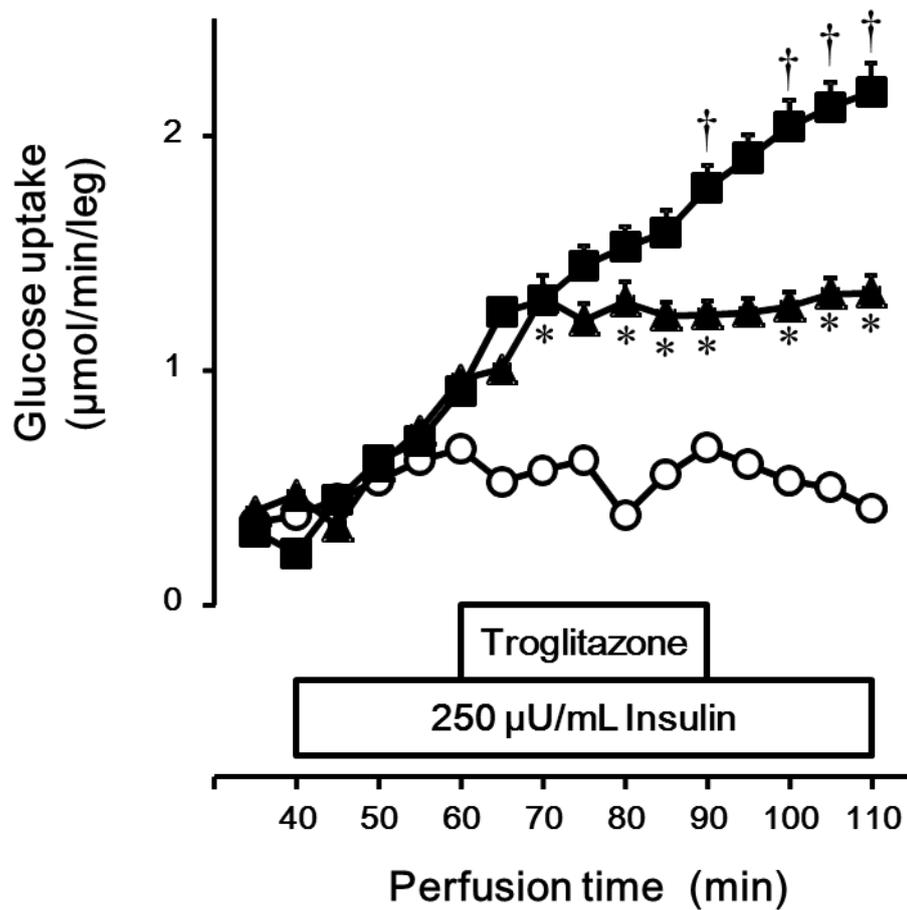


Fig. 6. Effect of 20 μM troglitazone on insulin-induced glucose uptake. Values are the mean \pm SEM. Each group was from 4 experiments for control (\circ), 6 for insulin alone (\blacktriangle), and 7 for insulin plus troglitazone (\blacksquare). $*P < 0.05$, insulin alone vs. control; $\dagger P < 0.05$, insulin plus troglitazone vs. insulin alone.

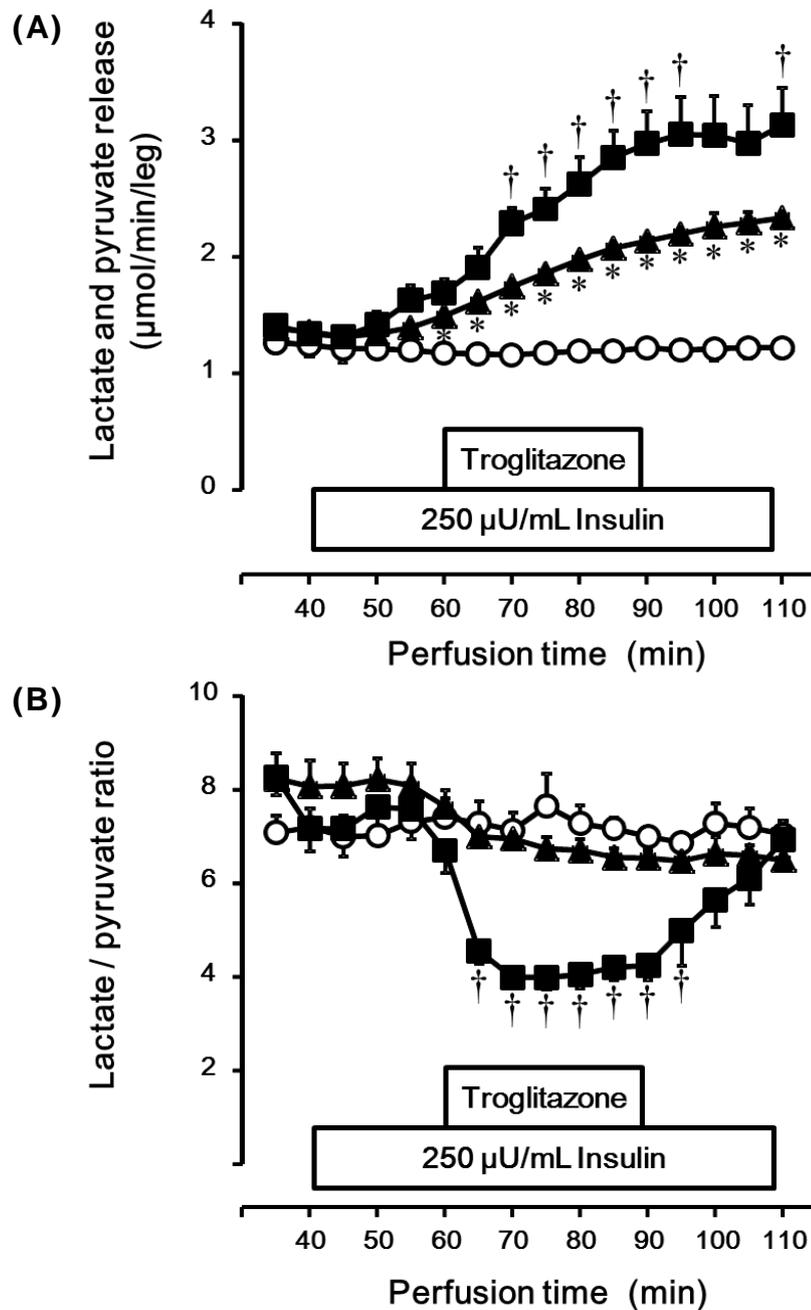


Fig. 7. Effects of 20 μM troglitazone on lactate and pyruvate release (A) and the L/P ratio (B) in the presence of insulin. Values are the mean ± SEM. Each group was from 4 experiments for control (○), 6 for insulin alone (▲), and 7 for insulin plus troglitazone (■). **P* < 0.05, insulin alone vs. control; †*P* < 0.05, insulin plus troglitazone vs. insulin alone.

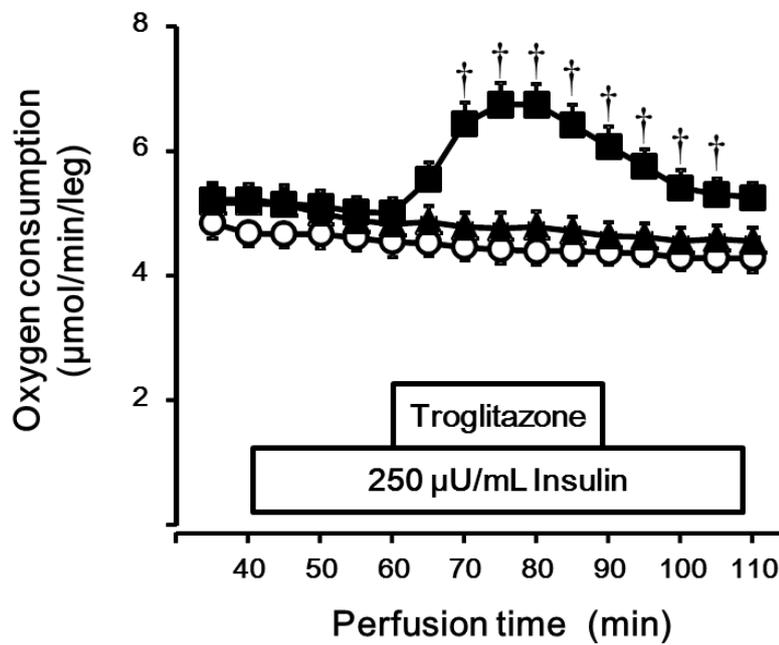


Fig. 8. Effects of 20 μ M troglitazone on oxygen consumption in the presence of insulin. Values are the mean \pm SEM. Each group was from 4 experiments for control (\circ), 6 for insulin alone (\blacktriangle), and 7 for insulin plus troglitazone (\blacksquare). $\dagger P < 0.05$, insulin plus troglitazone vs. insulin alone.

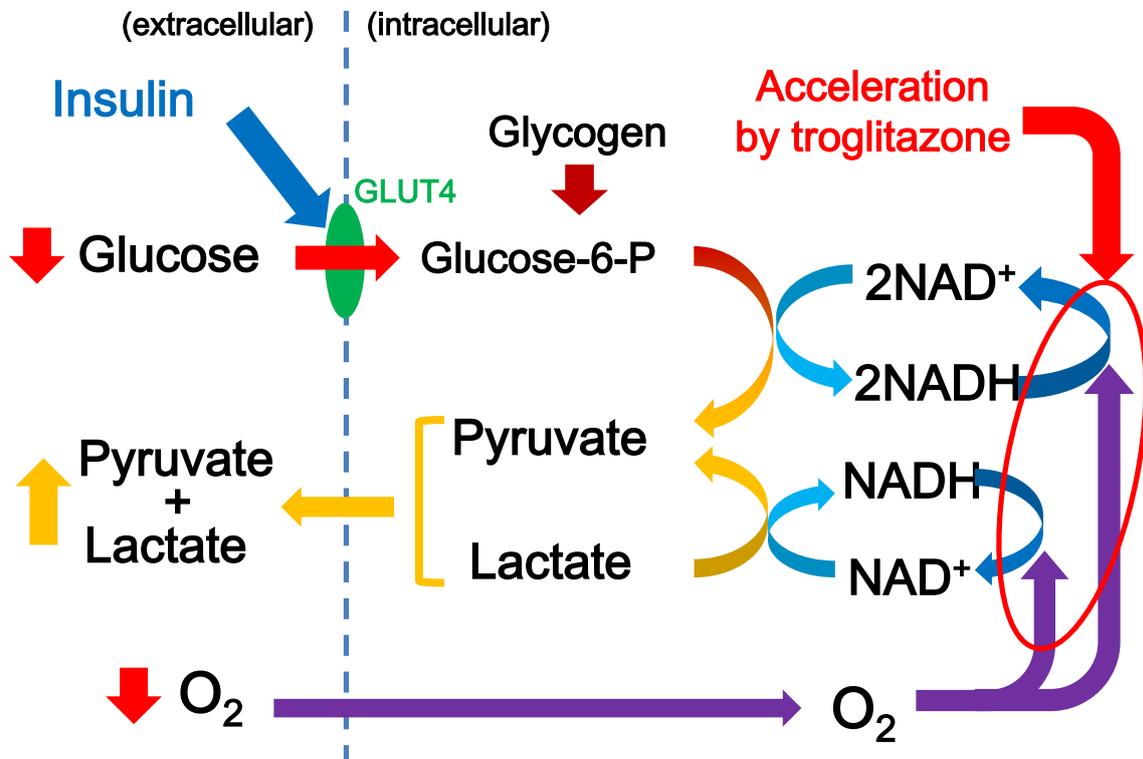


Fig. 9. Explanatory diagram of the action of troglitazone in skeletal muscle.

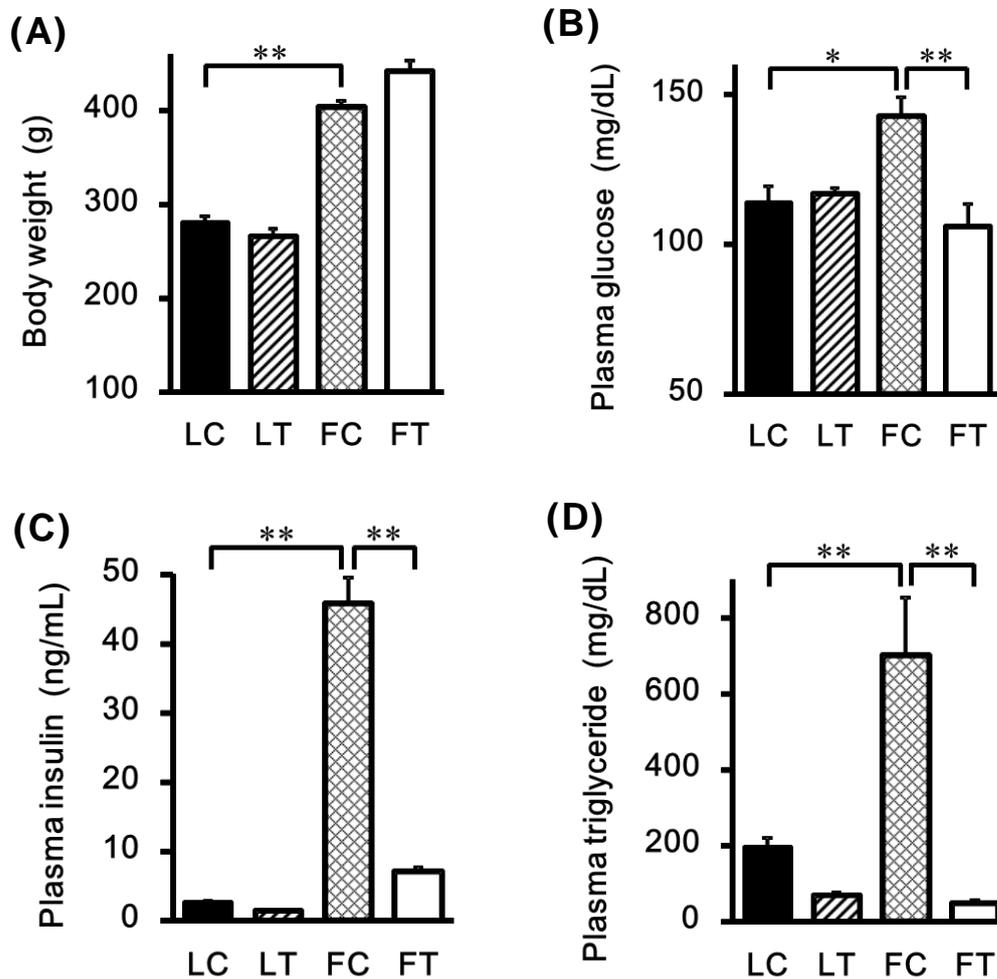


Fig. 10. Body weight and plasma glucose, insulin, and triglyceride levels after troglitazone treatment. Body weight (A), plasma glucose (B), plasma insulin (C), and plasma triglyceride (D) were determined 15 d after troglitazone treatment. Troglitazone was given as a 0.2% food admixture. *LC*, Lean control ($n = 4$, *black bars*). *LT*, Lean troglitazone-treated ($n = 4$, *hatched bars*). *FC*, Obese control ($n = 4$, *meshed bars*). *FT*, Obese troglitazone-treated ($n = 3$, *white bars*).

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, Statistically significant difference.

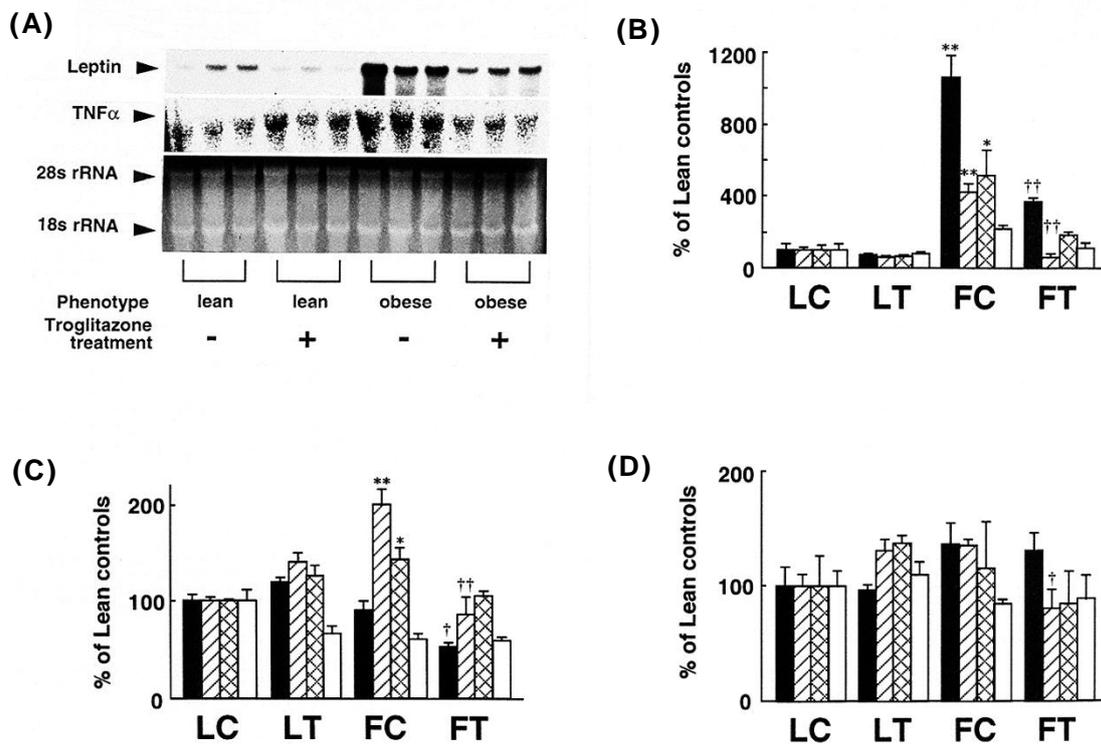


Fig. 11. The mRNA expression levels of leptin, TNF α , and PPAR γ in WATs. A representative Northern blot gel using leptin and TNF α probes, and corresponding ethidium bromide-stained rRNA in agarose gel of mesenteric WAT (A). mRNA expression levels of leptin (B), TNF α (C), and PPAR γ (D) based upon the quantitation of Northern blot gels were expressed as percentage of lean control in each adipose tissue. Each of four bars represents the comparisons of subcutaneous (*black bars*), retroperitoneal (*hatched bars*), mesenteric (*meshed bars*), and epididymal (*white bars*) from left to right. Each value is mean \pm SE of $n = 3$.

LC, Lean control. LT, Lean troglitazone-treated. FC, Obese control.

FT, Obese troglitazone-treated.

Statistical significance, * $P < 0.05$ or ** $P < 0.01$ vs. lean control, † $P < 0.05$ or †† $P < 0.01$ vs. obese control.

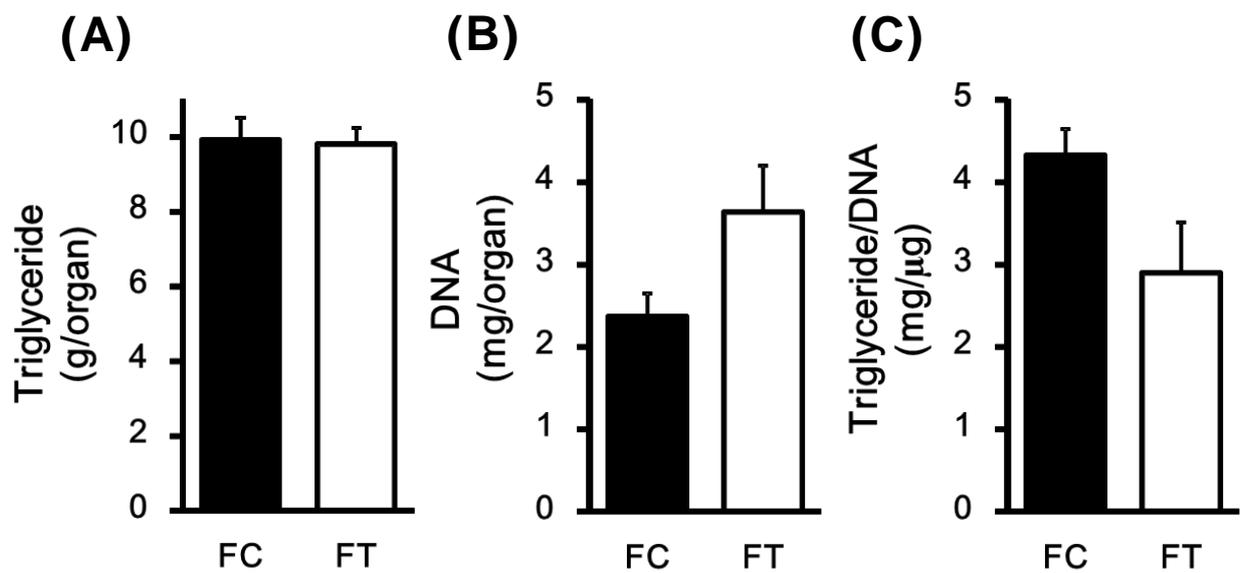


Fig. 12. Triglyceride and DNA contents in retroperitoneal WATs of obese rats. Triglyceride (A) and DNA (B) contents were expressed as total amount contained in the whole retroperitoneal WAT, and the ratio of total triglyceride to total DNA (C) was calculated.

FC, Obese control ($n = 4$, *meshed bars*).

FT, Obese troglitazone-treated ($n = 3$, *white bars*).

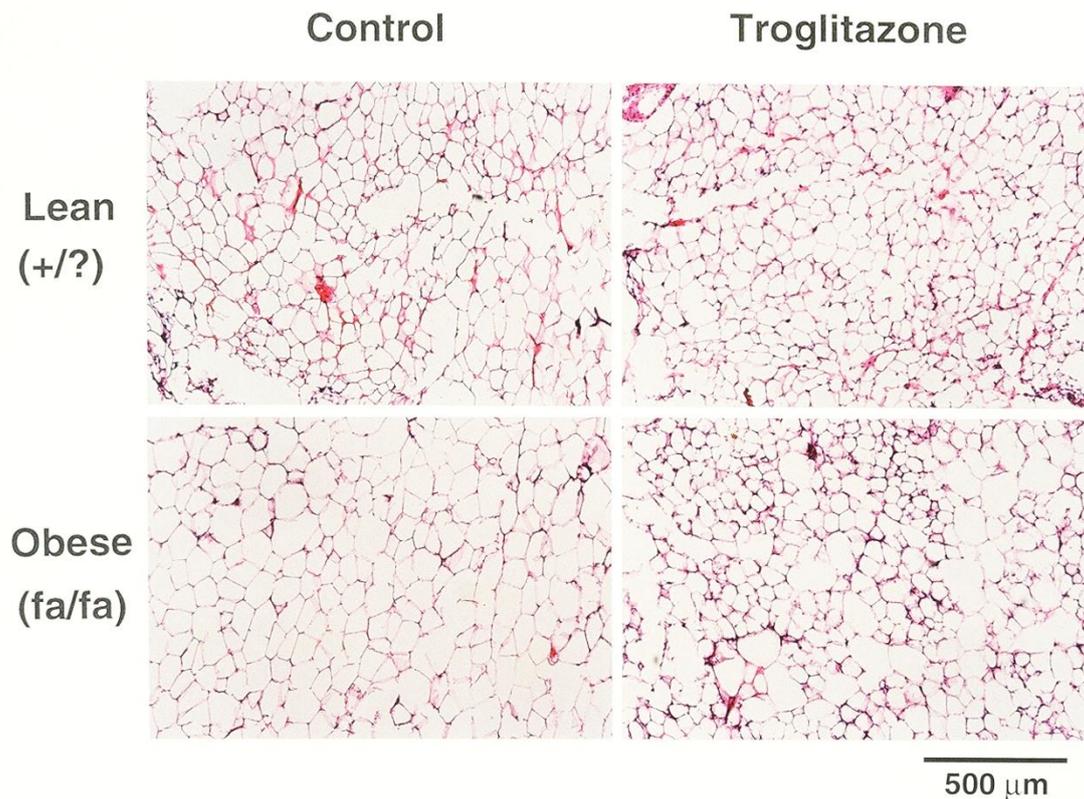


Fig. 13. Histology of retroperitoneal WAT. WAT sections were stained by hematoxylin and eosin after formalin fixation. All sections were cut to a thickness of 20 μm. The size of adipocytes from obese rats was larger than from lean rats. Troglitazone caused a decrease in the size of adipocytes in obese rats.

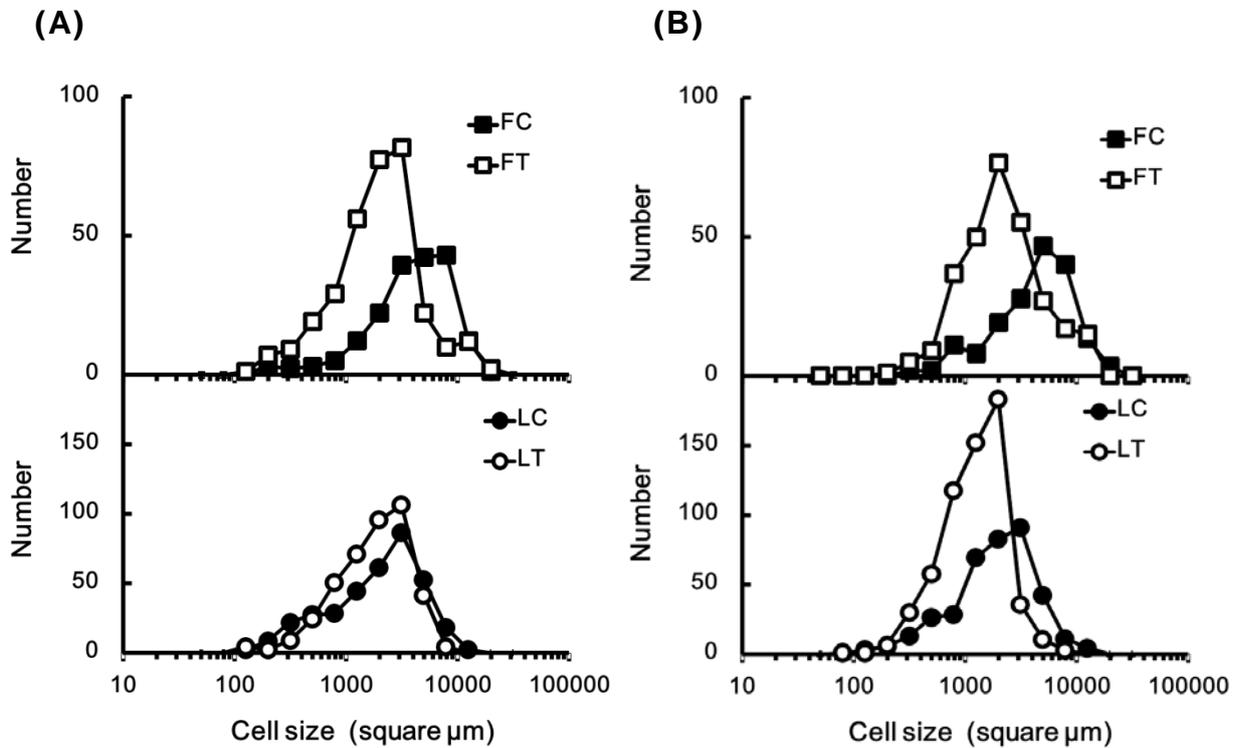


Fig. 14. Distribution of sizes of white adipocytes. Number of adipocytes and their sizes in a fixed area ($900,000 \mu\text{m}^2$) were quantitated by an image analysis system. The representative results from retroperitoneal (A) and subcutaneous adipose tissues (B).

LC, Lean control (*filled circles*).

LT, Lean troglitazone-treated (*open circles*).

FC, Obese control (*filled squares*).

FT, Obese troglitazone-treated (*open squares*).

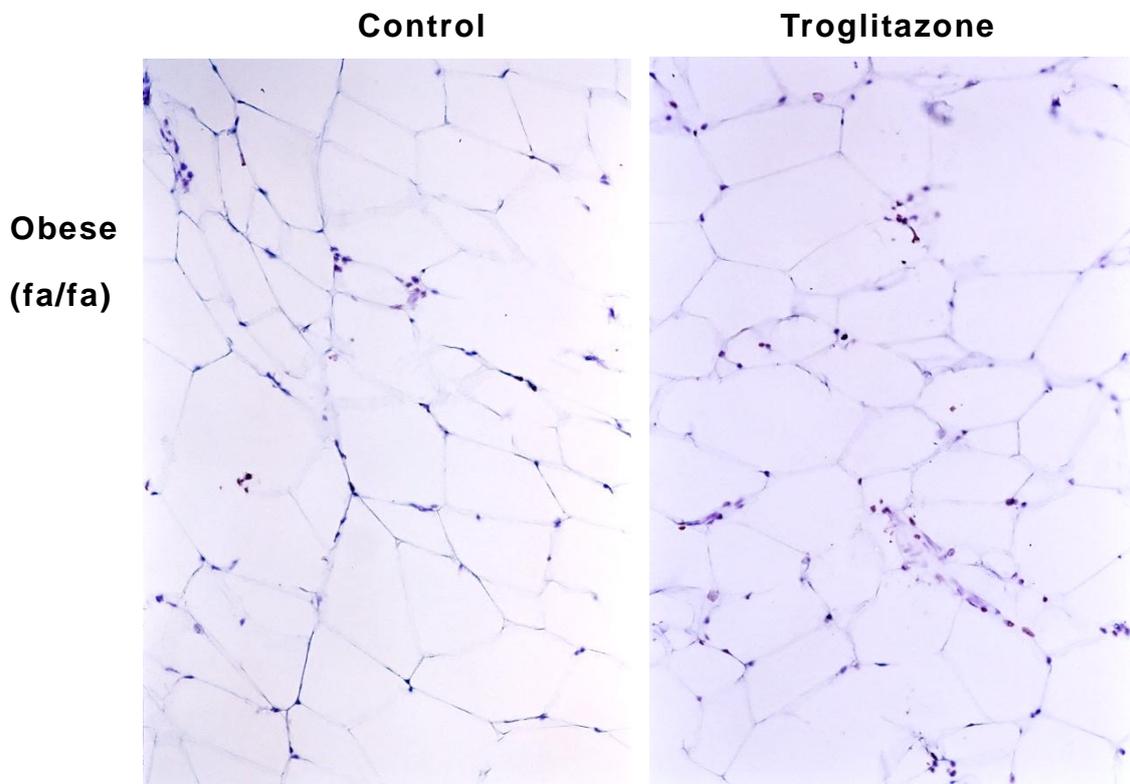


Fig. 15. Apoptotic nuclei stained by the TUNEL technique. All sections were cut to a thickness of 10 μm . The apoptotic nuclei were stained brown. The apoptotic nuclei were found in the sections from both control and troglitazone-treated rats. The number of TUNEL-positive nuclei was much greater by troglitazone treatment than in controls.

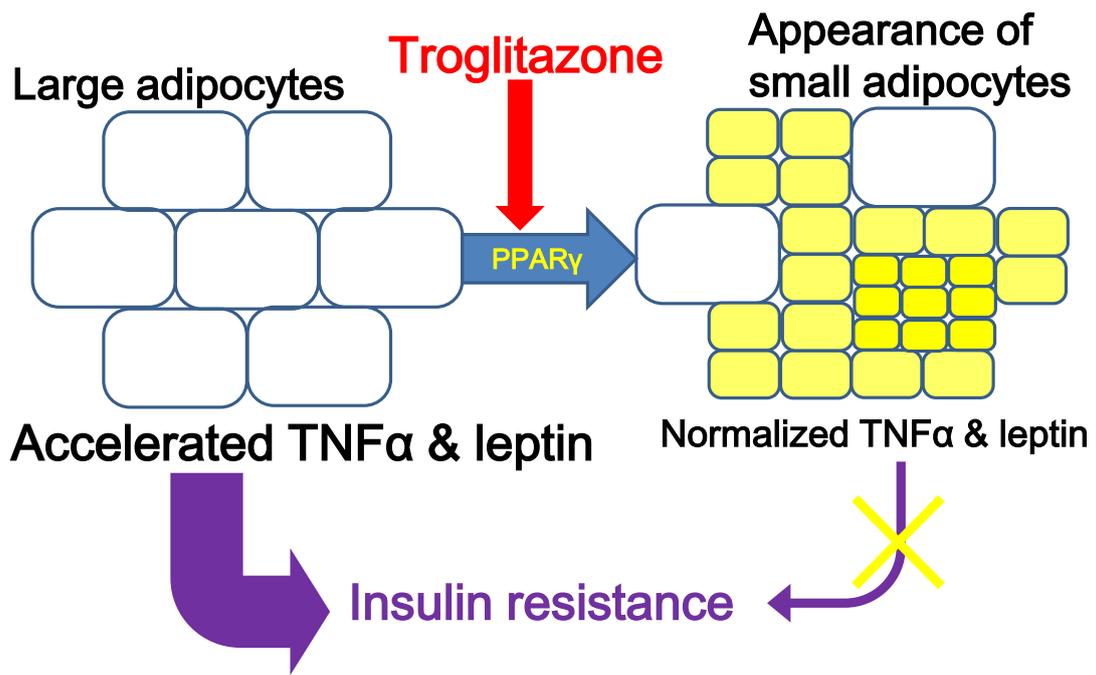


Fig. 16. Explanatory diagram of the action of troglitazone in white adipose tissue.

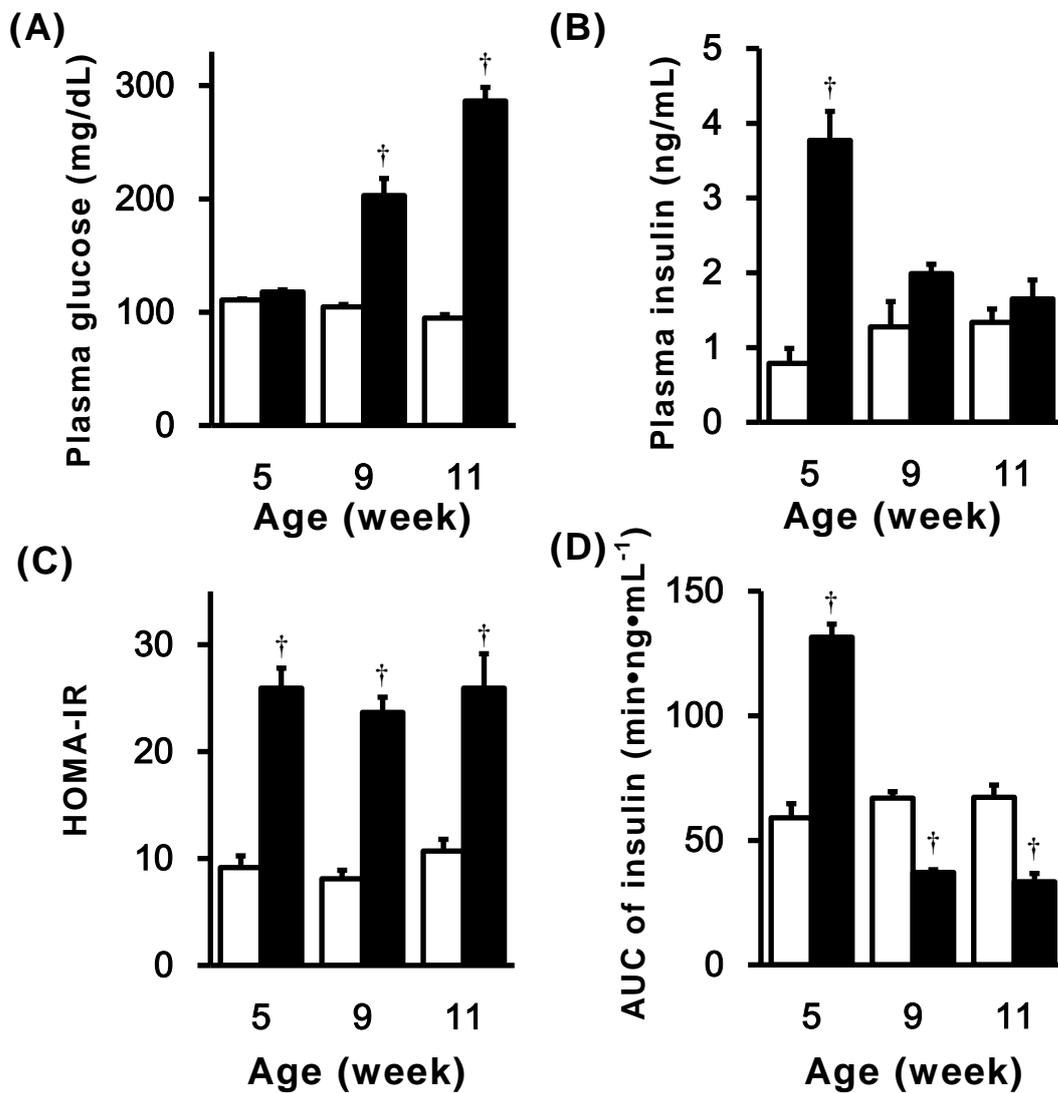


Fig. 17. Changes in values by age. Plasma glucose (A) and insulin (B) levels; homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA-IR) values (C); area under the curve (AUC) of blood insulin levels (D).

□, Wistar rats. ■, *fa/fa* rats.

Numerical values are given as the mean ± SEM; †: $P < 0.01$, vs. Wistar rats.

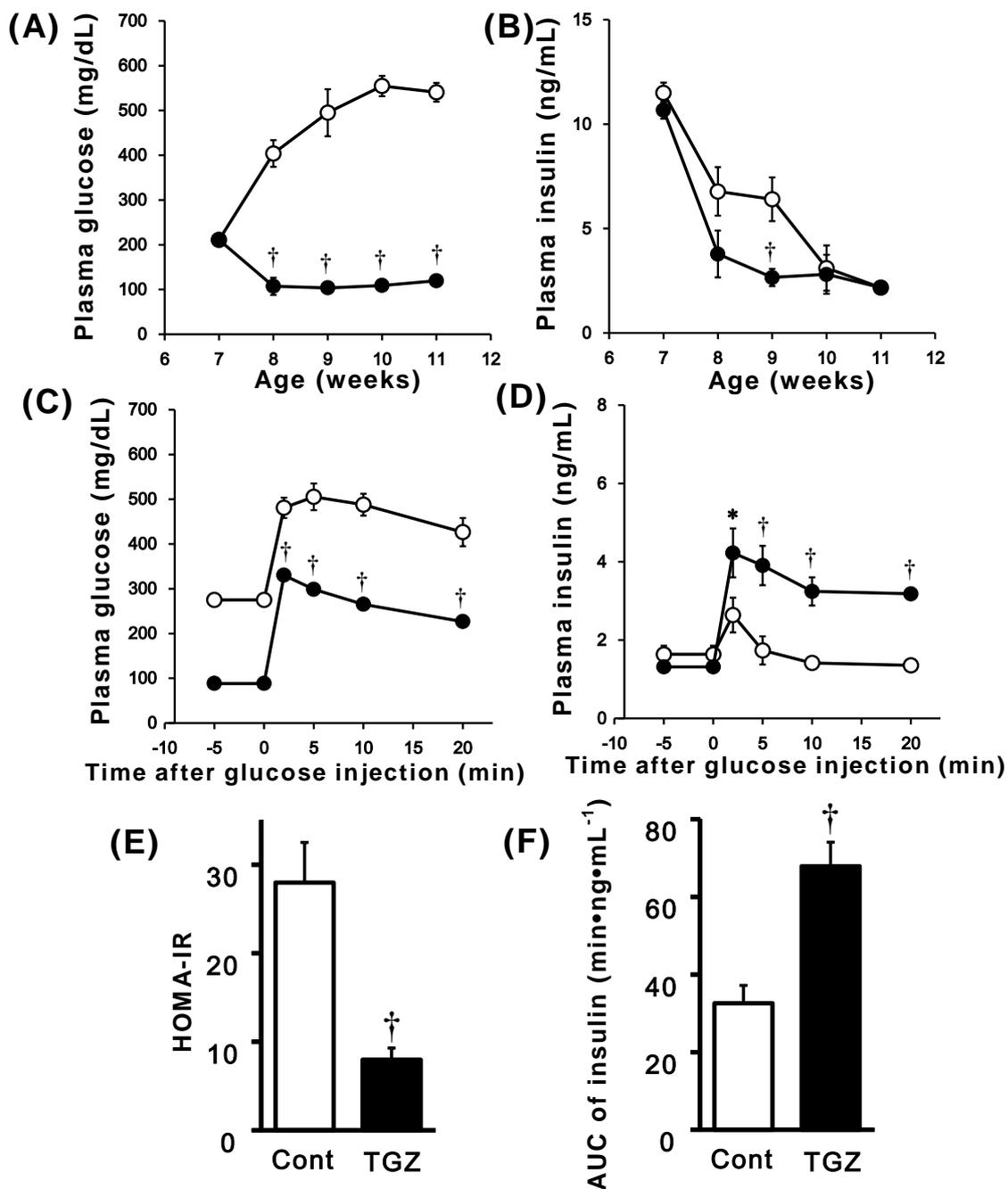


Fig. 18. Changes in plasma glucose (A) and insulin (B) levels in *fa/fa* rats during the prophylactic study; changes in plasma glucose (C) and insulin (D) levels on intravenous glucose tolerance testing (IVGTT); HOMA-IR values (E) and AUC of blood insulin levels (F) at the end of the prophylactic study. ○ or □, Control group. ● or ■, Troglitazone (TGZ) group. Numerical values are given as the mean ± SEM; *: $P < 0.05$; †: $P < 0.01$, vs. control.

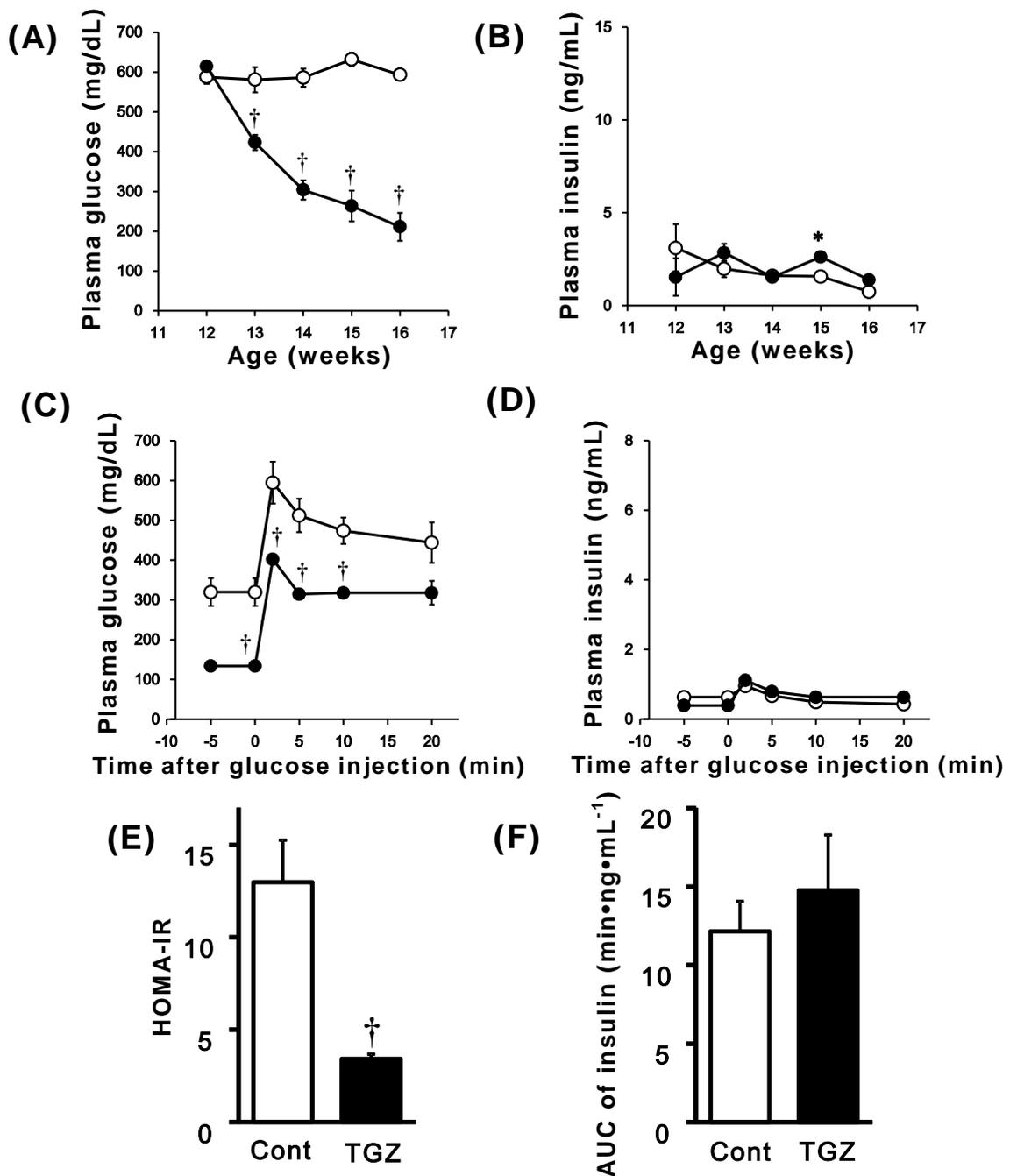


Fig. 19. Changes in plasma glucose (A) and insulin (B) levels in *fa/fa* rats during the therapeutic study, changes in plasma glucose (C) and insulin (D) levels on IVGTT; HOMA-IR values (E) and AUC of blood insulin levels (F) at the end of the therapeutic study.

○ or □, Control group. ● or ■, Troglitazone (TGZ) group.

Numerical values are given as the mean \pm SEM; *: $P < 0.05$; †: $P < 0.01$.

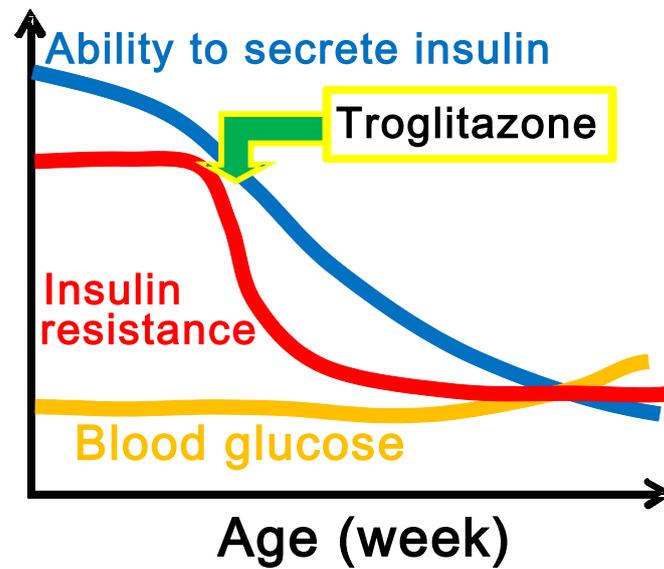
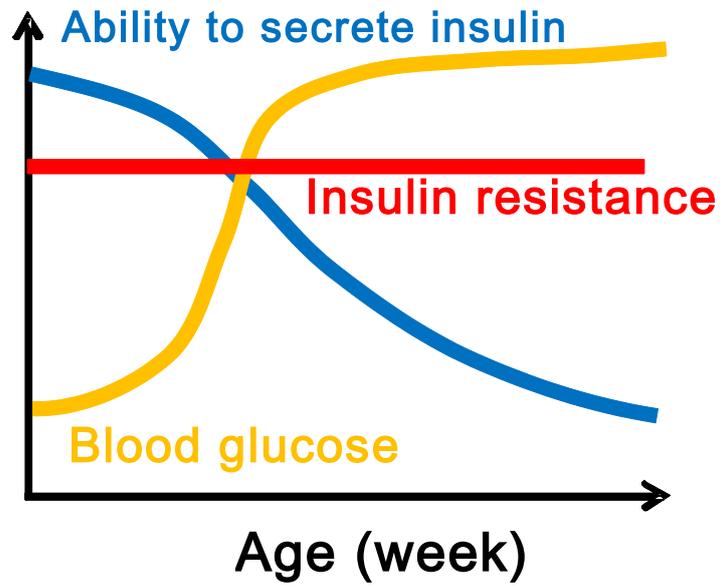


Fig. 20. Explanatory diagram of the involvement of insulin resistance with diabetic pathology and progression in WBN/Kob-*Lepr^{fa}* rat, one of type 2 diabetes model animals.

Table 1. Effect of Troglitazone on Glycogen and F2,6P₂ Content in the Red Portion of Quadriceps Femoris Muscle in the Perfused Hindlimb

Group	Δ Glycogen (mg/g wet weight)	F2,6P ₂ (μ g/g wet weight)
Control (n = 5)	-0.21 \pm 1.30	0.03 \pm 0.44
Troglitazone 20 μ M (n = 5)	-6.01 \pm 1.85*	-0.26 \pm 0.15

Troglitazone was infused from 60 to 90 minutes.

F2,6P₂: fructose-2,6-bisphosphate.

**P* < 0.05 vs. control.

Table 2. Effect of Insulin and Insulin Plus Troglitazone on Glycogen Content in the Red Portion of Quadriceps Femoris Muscle in the Perfused Hindlimb

Group	Δ Glycogen (mg/g wet weight)
Control (n = 5)	0.30 \pm 1.21
Insulin 250 μ U/mL (n = 7)	3.11 \pm 1.30
Insulin 250 μ U/mL + troglitazone 20 μ M (n = 7)	-5.02 \pm 3.13*

Insulin and troglitazone were infused from 40 to 120 minutes and from 60 to 90 minutes, respectively.

* $P < 0.05$ vs. insulin.

Table 3. Weight of WATs

Experimental group	Absolute weight (g)				
	Subcutaneous	Retroperitoneal	Epididymal	Mesenteric	Total
Lean					
control	4.35±0.34	2.42±0.27	2.78±0.32	1.80±0.16	11.34±1.03
troglitazone	3.84±0.30	1.56±0.21	2.35±0.23	1.22±0.12	8.96±0.80
Obese					
control	25.67±1.23	10.28±0.64	9.02±0.62	6.05±0.21	51.03±2.15
troglitazone	26.61±1.66	10.79±0.33	11.88±0.54 [*]	6.24±0.23	55.52±2.51
	Percent of body weight				
Experimental group	Percent of body weight				
	Subcutaneous	Retroperitoneal	Epididymal	Mesenteric	Total
Lean					
control	1.518±0.096	0.843±0.082	0.968±0.100	0.626±0.047	3.955±0.298
troglitazone	1.408±0.080	0.570±0.067	0.861±0.070	0.447±0.032	3.286±0.223
Obese					
control	6.079±0.262	2.437±0.147	2.134±0.128	1.436±0.059	12.085±0.444
troglitazone	5.839±0.235	2.373±0.020	2.610±0.083	1.374±0.045	12.196±0.281

After troglitazone treatment for 19 to 28 d, all rats were sacrificed for removal of adipose tissues. Statistical significance, * $P < 0.05$.

Table 4. Morphometric Analysis of WATs

Treatment	Number	Average size	Small adipocyte number ($< 2,500 \mu\text{m}^2$)	Large adipocyte number ($> 5,000 \mu\text{m}^2$)
Retroperitoneal WAT				
Lean				
control	353	2608 \pm 106	194	43
troglitazone	411	2255 \pm 70	250 ($\times 1.3$)	20 ($\times 0.47$)
Obese				
control	184	5031 \pm 242	45	81
troglitazone	328	2864 \pm 163	195 ($\times 4.3$)	35 ($\times 0.43$)
Subcutaneous WAT				
Lean				
control	371	2485 \pm 101	219	27
troglitazone	600	1492 \pm 40	542 ($\times 2.5$)	8 ($\times 0.30$)
Obese				
control	174	5501 \pm 285	39	85
troglitazone	294	3134 \pm 173	177 ($\times 4.5$)	46 ($\times 0.54$)

Hematoxylin and eosin-stained slides were analyzed with an image analysis system. Number of adipocytes and their sizes in a fixed area ($900,000 \mu\text{m}^2$) were quantitated.

Table 5. The Number of Apoptotic Nuclei

Treatment		Total count	Apoptotic nuclei	Ratio
		%		
Control	1	202	12	5.9
	2	304	8	2.6
Average				4.3
Troglitazone	1	265	27	10.2
	2	320	36	11.3
Average				10.8

After sections (10 μm thick) were stained by the TUNEL method, apoptosis nuclei were counted in a fixed area (900,000 μm^2).

Table 6. Effects of Troglitazone (TGZ) on Blood Lipid Levels in Prophylactic (A) and Therapeutic (B) Studies.

	Control group	TGZ group
(A) Prophylactic study		
Number of rats	8	8
TG (mg/dL)	160 ± 17	46 ± 5 **
T-Chol (mg/dL)	94 ± 4	161 ± 5 **
NEFA (μEq/L)	1526 ± 280	421 ± 45 **
(B) Therapeutic study		
Number of rats	7	7
TG (mg/dL)	191 ± 72	50 ± 8 **
T-Chol (mg/dL)	114 ± 43	161 ± 6 **
NEFA (μEq/L)	1301 ± 492	1111 ± 62 **

Numerical values are given as the mean ± SEM. TG: triglyceride; T-Chol: total cholesterol; NEFA: non-esterified fatty acids.

** : $P < 0.01$ vs. control group.

抗糖尿病薬トログリタゾンの インスリン抵抗性改善作用に関する研究

奥野 晃

要 旨

糖尿病は 1 型糖尿病と 2 型糖尿病に大別されるが、その糖代謝の調節には膵臓のランゲルハンス島 β 細胞（膵臓 β 細胞）より分泌されるインスリンが重要な役割を担っている。1 型糖尿病の成因は膵臓 β 細胞の破壊にともなうインスリンの絶対的な分泌不足であるのに対し、2 型糖尿病の主な成因はインスリン分泌障害と、インスリンの作用が減弱するインスリン抵抗性であると考えられている。近年、糖尿病の有病率の急激な上昇は世界的に深刻な問題となっているが、患者数では 2 型糖尿病が圧倒的多数を占めている。その為、新たな 2 型糖尿病治療薬の開発が強く望まれている。

2 型糖尿病に適用される抗糖尿病薬には、インスリン分泌促進薬や糖吸収阻害薬およびインスリン抵抗性改善薬がある。インスリン抵抗性改善剤として世界で初めて上市された薬物であるトログリタゾンは、チアゾリジンジオン誘導体の一つであり、その臨床上的有用性が期待されたが、特異体質性肝障害により市場からの撤退を余儀なくされた。従って、本剤はその後の作用機序の解析が十分行われなかった。しかし、本領域におけるその後の研究の進展のために、トログリタゾンの作用機序の解明は重要と考えられた。

高血糖につながるインスリン抵抗性の主因が骨格筋におけるインスリン作用不全によると考えられている。このことから、トログリタゾンは、骨格筋におけるインスリンの糖取り込み促進作用を増強している可能性が示唆された。一方、チアゾリジンジオン誘導体は、主に脂肪組織に発現し、脂肪細胞の遺伝子発現と細胞機能を調整するとされる核内転写促進因子 $PPAR\gamma$ のリガンドであることが報告された。更に、チアゾリジンジオン誘導体の $PPAR\gamma$ に対する結合親和性と抗糖尿病作用の効力はよく相関していることから、チアゾリジンジオン誘導体の抗糖尿病作用においては $PPAR\gamma$ が機能的な受容体であると考えられている。これらのことから、トログリタゾンには骨格筋における糖取り込みを促進する作用と脂肪組織を介した作用の両方があると考えられる。

本研究では、トログリタゾンの作用機序として、骨格筋における糖代謝に対する作用と、脂肪組織における $PPAR\gamma$ を介すると考えられる遺伝子発現調節を介した作用の両面から検討した。前者の作用については、インスリンの作用組織である骨格筋を含むラット後肢灌流系を用い、骨格筋におけるインスリン刺激による糖取り込みと糖代謝に対する作用を、インスリン非存在あるいは存在下で比較検討した（第 1 章）。後者の作用については、インスリン抵抗性を呈する肥満動物モデルである Zucker 肥満ラットを用い、遺伝子発現の変化を伴った効果発現までにはある程度の時間が必要であることを考慮し、トログリタゾンを 19–28 日間投与後に白色脂肪組織における作用を検討した（第 2 章）。さらに、新規に作出された糖尿病モデル動物である $WBN/Kob-Lepr^{fa}$ ラットの病態特性を明らかにするため、インスリン抵抗性を改善するトログリタゾンを投与し、糖尿病の病態およびその進行におけるインスリン抵抗性の関与を検討した（第 3 章）。

第1章 Sprague-Dawley ラット後肢灌流系の糖代謝に対する トログリタゾンの作用

Sprague-Dawley ラット後肢灌流系において、トログリタゾン(20 μM)をインスリン (250 $\mu\text{U/mL}$) とともに 30 分間注入すると、インスリン刺激による糖取り込みがトログリタゾンの注入 30 分後に有意に増加し、この増加はトログリタゾンの注入中止後も更に増大した。インスリンとトログリタゾン併用処置群ではトログリタゾン注入中止 30 分後の骨格筋のグリコーゲン含量は、インスリン単独処置群の骨格筋よりも有意に低下していた。インスリン非存在下では、トログリタゾンは高濃度 (50 μM) においても糖取り込みに影響を与えなかった。しかし、トログリタゾン ($\geq 20 \mu\text{M}$) は乳酸とピルビン酸の放出を増加させ、ピルビン酸に対する乳酸の比 (L/P 比) は低下し、酸素消費は増加した。後肢骨格筋において、トログリタゾンは、インスリン非存在下において、フルクトース 2,6-ビスリン酸の含量を変化させずに、グリコーゲン含量を低下させた。トログリタゾンは、インスリン非存在下では糖取り込みを引き起こさないが、インスリン存在下においてはインスリンによる糖取り込みを増加させ、この増加はトログリタゾン注入中断後も更に亢進した。インスリン存在下にトログリタゾンを作用させると、後肢骨格筋のグリコーゲン含量が減少した。このグリコーゲン含量の減少は、筋収縮あるいはエピネフリン処置で観察されるものに類似しており、インスリン刺激による糖取り込みの増強を引き起こしていると考えられる。

第2章 インスリン抵抗性モデル動物 Zucker 肥満ラットの 脂肪組織におけるトログリタゾンの作用

インスリン抵抗性モデル動物である Zucker 肥満ラットに、トログリタゾンを 19–28 日間混餌投与すると、軽度の高血糖と顕著な高インスリン血症が正常化した。血漿中性脂肪はトログリタゾン投与により肥満ラットおよび非肥満ラットのいずれにおいても低下した。トログリタゾンは、肥満ラットの白色脂肪の総量を変化させなかったが、後腹膜及び皮下脂肪組織の小型脂肪細胞 ($<2,500 \mu\text{m}^2$) の数をおよそ 4 倍に増加させた。トログリタゾンはまた、大型脂肪細胞 ($>5,000 \mu\text{m}^2$) の数を 50% まで低下させた。実際に、トログリタゾンを処置した後腹膜脂肪組織中のアポトーシスを示す核の割合は、対照群に比べ、2.5 倍高かった。それに付随して、トログリタゾンは、肥満ラットの後腹膜と腸間膜白色脂肪組織でそれぞれ 2 倍と 1.4 倍に上昇している TNF α の発現レベルを正常化した。また、トログリタゾンは肥満ラットの白色脂肪で 4–10 倍に上昇しているレプチンの発現レベルも顕著に低下させた。これらのことから、トログリタゾンを作用させると、白色脂肪組織において、小型脂肪細胞の数を増加させ、大型脂肪細胞の数を減少させると考えられる。トログリタゾン処置肥満ラットの白色脂肪組織における小型脂肪細胞の数の増加と大型脂肪細胞の数の減少は、増加した TNF α の発現レベルと血漿中性脂肪を正常化し、インスリン抵抗性を改善に導く重要な機序であることが示唆された。

第3章 2 型糖尿病モデル動物 WBN/Kob-*Lepr*^{fa} ラットの糖尿病の病態とその進行におけるインスリン抵抗性の役割

WBN/Kob-*Lepr*^{fa} (*fa/fa*) ラットは、WBN/Kob ラットに Zucker 肥満ラットの肥満遺伝子 (*Lepr*^{fa}) を導入した新規コンジェニックラットであり、肥満を伴い高血糖や膵炎などの病態を示す糖尿病モデル動物で

ある。本研究では、*fa/fa* ラットを用いて糖尿病の発症および進展におけるインスリン抵抗性の関与を検討した。インスリン抵抗性およびインスリン分泌能は、それぞれ、インスリン抵抗性指数および静脈内糖負荷耐糖能試験後のインスリン値の血中濃度－時間曲線下面積を指標として評価した。*fa/fa* ラットは Wistar ラットに比べ、5 週齢からインスリン抵抗性が顕著であった。*fa/fa* ラットのインスリン分泌能は 5 週齢では Wistar ラットよりも高かったが、9 週齢および 11 週齢では約半分に低下した。トログリタゾンを経口飼料に 0.2% wt/wt の割合で混合し、予防実験では糖尿病発症前の 7 週齢より、治療実験では糖尿病発症後の 12 週齢より、4 週間投与した。トログリタゾン投与は予防実験と治療実験のいずれにおいても、インスリン抵抗性を顕著に減少させた。また、予防試験では高血糖の発症を完全に抑制し、治療試験では高血糖を軽減させた。これらの成績から *fa/fa* ラットの呈する 2 型糖尿病にはインスリン抵抗性の関与が大きいことが示された。

本研究の結果から、インスリン抵抗性改善薬であるトログリタゾンは骨格筋においてインスリンによる糖取り込みを増強し、脂肪組織においては小型脂肪細胞の数の増加と大型脂肪細胞の数の減少によってインスリン抵抗性を改善していることが明らかとなった。これらの作用により、トログリタゾンは 2 型糖尿病の成因の一つであるインスリン抵抗性を軽減し、高血糖を改善すると考えられた。本研究成果はチアゾリジン系インスリン抵抗性改善薬の作用機序を明らかにしたとともに、WBN/Kob-*Lep^{fa}* ラットにおけるインスリン抵抗性の重要性を示した。また、本研究成果は、更なる 2 型糖尿病の病態メカニズムの解明研究、新規 2 型糖尿病モデル動物の開発、新規作用メカニズムのインスリン抵抗性改善薬の開発に貢献すると期待される。

**Study on the Improvement Effect of Troglitazone,
an Antidiabetic Agent, on Insulin Resistance**

(抗糖尿病薬トログリタゾンの
インスリン抵抗性改善作用に関する研究)

By

Akira Okuno

Abstract

As diabetes mellitus can be broadly classified into type 1 and type 2, insulin excreted from pancreatic β cells plays an important role in the regulation of glucose metabolism in both type 1 and 2 diabetes mellitus. While type 1 diabetes is believed to be caused by an absolute lack of insulin secretion associated with the destruction of pancreatic β cells, the major causes of type 2 diabetes mellitus are believed to be impaired insulin secretion and insulin resistance where insulin action is attenuated. In recent years, rapid increase in the prevalence of diabetes has become a serious problem worldwide, where type 2 diabetes especially accounts for most with the largest number of patients. This increase in diabetes warrants the development of new antidiabetic drugs for type 2 diabetes.

There are several kinds of anti-diabetic agents which apply to type 2 diabetic patients, for example, insulin secretagogues, glucose absorption inhibitors and insulin sensitizers. Troglitazone, one of the thiazolidinedione

derivatives, was launched as the first insulin sensitizer worldwide with the expectation of clinically usefulness and high safety, however, troglitazone was subsequently withdrawn because of concerns about idiosyncratic hepatotoxicity. Also, the action mechanism of troglitazone had not been fully evaluated. Nevertheless, in order for research progress in this field, analysis of the action mechanism of troglitazone is thought to be important.

The main reason for insulin resistance leading hyperglycemia is reported to be insufficient action of insulin in the skeletal muscle. Troglitazone is speculated to have an enhancing effect on insulin-stimulated glucose uptake in the skeletal muscle. On the other hand, thiazolidinedione derivatives are reported to be ligands for the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) γ , one of the nuclear receptors, which is primarily expressed in adipose tissues and regulates the gene expressions in adipocytes and their functions. In addition, the rank order of binding affinity of the thiazolidinedione derivatives to PPAR γ matches closely with the order of potency of their antidiabetic action, suggesting that PPAR γ is the functional receptor of this class of compounds in their antidiabetic action. From the above, troglitazone is speculated to have both the enhancing action on glucose uptake in the skeletal muscle and the action via adipose tissues.

In this study, the action mechanisms of troglitazone are examined in both aspects of the enhancing effect on glucose uptake in the skeletal muscle and of the regulatory effect on gene expressions which is thought to be related to PPAR γ in adipose tissue. For the former action, the effects of troglitazone on insulin-stimulated glucose uptake and glucose metabolism

in the skeletal muscle were investigated with or without insulin in perfused rat hindlimbs which include the skeletal muscle, one of the insulin action sites (Chapter 1). For the latter action, the effects on white adipose tissues were evaluated using Zucker fatty rats, an obese and insulin resistant animal model, after treatment of troglitazone for 19 to 28 days, because a certain amount of time is thought to be necessary to express the effect via the change of gene expression (Chapter 2). Moreover, to clarify the pathological profile of the WBN/Kob-*lepr^{fa}* rat, a novel diabetic model animal, the relationship of insulin resistance to pathogenesis and progression of diabetes was evaluated by administration of an insulin sensitizer, troglitazone (Chapter 3).

Chapter 1 Effect of Troglitazone on Glucose Metabolism in Perfused Sprague-Dawley Rat Hindlimbs

When 20 μ M troglitazone was infused for 30 minutes together with 250 μ U/mL insulin in perfused Sprague-Dawley rat hindlimbs, insulin-induced glucose uptake significantly increased 30 minutes after troglitazone infusion, and this increase was further augmented after withdrawal of troglitazone. In insulin plus troglitazone infusion at 30 minutes after troglitazone removal; glycogen content in the hindlimb muscle was significantly decreased compared with that obtained with insulin infusion alone. In the absence of insulin, even 50 μ M troglitazone did not elicit glucose uptake. Troglitazone did increase lactate and pyruvate release at concentrations of 20 μ M and higher; however, it decreased the ratio of lactate to pyruvate (L/P ratio) and increased oxygen consumption.

In the hindlimb muscle, troglitazone decreased glycogen content without changing fructose 2,6-bisphosphate content in the absence of insulin. In the presence of insulin, troglitazone increases insulin-induced glucose uptake, and this increase is further augmented after troglitazone removal. The addition of troglitazone to insulin infusion decreased the glycogen content in the hindlimb muscle. This decrease in muscle glycogen content may trigger an enhancement of insulin-induced glucose uptake similar to that observed during muscle contraction or epinephrine treatment.

Chapter 2 Effect of Troglitazone on Adipose Tissue **in Zucker Fatty Rats, an Insulin Resistant Model Animal**

Administration of troglitazone for 19 to 28 days normalized mild hyperglycemia and marked hyperinsulinemia in a Zucker fatty rat, an obese and insulin resistant model animal. The plasma triglyceride level was decreased by troglitazone in both obese and lean rats. Troglitazone did not change the total weight of white adipose tissues but increased the number of small adipocytes ($<2,500 \text{ mm}^2$), approximately fourfold in both retroperitoneal and subcutaneous adipose tissues of obese rats. It also decreased the number of large adipocytes ($>5,000 \text{ mm}^2$) by 50%. In fact, the percentage of apoptotic nuclei was 2.5-fold higher in the troglitazone-treated retroperitoneal white adipose tissue than control. Concomitantly, troglitazone normalized the expression levels of TNF α which were elevated by 2- and 1.4-fold in the retroperitoneal and mesenteric white adipose tissues of the obese rats, respectively. Troglitazone also caused a dramatic decrease in the expression levels of

leptin, which were increased by 4–10-fold in the white adipose tissues of obese rats. These results suggest that the primary action of troglitazone may be to increase the number of small adipocytes and decrease the number of large adipocytes in white adipose tissues. The increased number of small adipocytes and the decreased number of large adipocytes in white adipose tissues of troglitazone-treated obese rats appear to be an important mechanism by which increased expression levels of TNF α and higher levels of plasma lipids are normalized, leading to alleviation of insulin resistance.

Chapter 3 Role of Insulin Resistance in the Pathogenesis and Progression of Diabetes in WBN/Kob-*Lep^{fa}* Rats, a Type 2 Diabetic Model Animal

The WBN/Kob-*Lep^{fa}* (*fa/fa*) rat is a novel congenic rat, into which the obesity gene (*Lep^{fa}*) is introduced, and is a diabetic animal model representing obesity, hyperglycemia and pancreatitis. The present study was aimed at elucidating the role of insulin resistance in the pathogenesis and progression of diabetes in the *fa/fa* rats. Insulin resistance and insulin secretory capacity were measured by a homeostasis model assessment of insulin resistance and the area under the blood concentration–time curve for plasma insulin levels during the intravenous glucose tolerance test, respectively. The *fa/fa* rats exhibited marked insulin resistance at 5 weeks or over that age, compared with age-matched Wistar rats. The insulin secretory capacity of *fa/fa* rats was higher than that of Wistar rats at 5 weeks of age, but decreased by 50% between 9 and 11 weeks of age. Troglitazone was mixed with a standard diet at 0.2% wt/wt, and given as

food admixture for 4 weeks from 7 weeks of age before the progression of diabetes for prophylactic study or 12 weeks of age after progression of diabetes for therapeutic study. Treatment with troglitazone significantly improved insulin resistance in both prophylactic and therapeutic study. Also, troglitazone completely suppressed the onset of hyperglycemia in prophylactic study and improved hyperglycemia in therapeutic study. These results suggest that insulin resistance is markedly involved in the type 2 diabetes in *fa/fa* rats.

The results of these studies revealed that troglitazone, an insulin sensitizer, enhances insulin-stimulated glucose uptake in the skeletal muscle, and increases or decreases the number of small or large adipocytes in adipose tissue, respectively, resulting in improvement of insulin resistance. These actions of troglitazone would alleviate insulin resistance, one of the causes of type 2 diabetes, and troglitazone would improve ameliorate hyperglycemia. These results of research clarified the action mechanism of the thiazolidinedione-based insulin-sensitizing agent and showed the importance of insulin resistance in the WBN/Kob-*Lep^{fa}* rat. In addition, these results of research are expected to contribute to further elucidatory research on the mechanism of type 2 diabetic pathogeny, the development of a new type 2 diabetes model animal, and the development of an insulin action-enhancing agent with the new action mechanism.

出典

本論文の実験結果は、以下の論文より引用した。

第1章 Sprague-Dawley ラット後肢灌流系の糖代謝に対する トログリタゾンの作用

Okuno, A., Ikeda, K., Shiota, M., Fujiwara, T., Yoshioka, S., Sugano, T. and Horikoshi, H. (1997): Acute effect of troglitazone on glucose metabolism in the absence or presence of insulin in perfused rat hindlimb. *Metabolism* 46(6): 716–721.

第2章 インスリン抵抗性モデル動物、Zucker 肥満ラットの 脂肪組織におけるトログリタゾンの作用

Okuno, A., Tamemoto, H., Tobe, K., Ueki, K., Mori, Y., Iwamoto, K., Umesono, K., Akanuma, Y., Fujiwara, T., Horikoshi, H., Yazaki, Y. and Kadowaki, T. (1998): Troglitazone increases the number of small adipocytes without the change of white adipose tissue mass in obese Zucker rats. *J. Clin. Invest.* 101(6): 1354–1361.

第3章 2型糖尿病モデル動物、WBN/Kob-*Lepr^{fa}* ラットの糖尿病の
病態とその進行におけるインスリン抵抗性の役割

Okuno, A., Kaji, N., Takahashi, A., Nagakubo, D., Ohno-Ichiki, K., Shirai, M. and Asai, F. (2013): Role of Insulin Resistance in the Pathogenesis and Development of Type 2 Diabetes in WBN/Kob-*Lepr^{fa}* Rats. *J. Vet. Med. Sci.* 75(12): 1557–1561.