The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	小腸選択的MTP阻害薬JTT-130の血糖低下作用機序及び有用性に関する研究
Author(s)	坂田, 昌平
Citation	大阪大学, 2015, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/52254
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

様式１

博　士　論　文

論　文　題　名

小腸選択的MTP阻害薬JTT-130の血糖低下作用機序及び有用性に関する研究

2014年

坂田　昌平

目次

目次 3
略語一覧 5
緒論 7
本論 9
第 1 章　JTT-130 を用いた小腸 MTP 阻害による摂食抑制とは独立した糖代謝への影響 11
1.1　諸言 11
1.2　実験材料及び実験方法 13
1.2.1　材料 13
1.2.2　動物及び資料 13
1.2.3　血液生化学値の測定 13
1.2.4　経口糖負荷試験（OGTT） 14
1.2.5　門脈中 GLP-1 値の測定 14
1.2.6　膵島インスリン陽性面積の測定 14
1.2.7　肝臓中脂質含量の測定 14
1.2.8　統計解析 15
1.3　結果 16
1.3.1　累積摂餌量及び体重 16
1.3.2　血糖値及び血漿中インスリン値 17
1.3.3　血漿中脂質代謝パラメータ 18
1.3.4　経口糖負荷試験（OGTT） 19
1.3.5　肝臓中脂質含量 21
1.3.6　門脈中 GLP-1 値 22
1.3.7　膵臓重量及びインスリン陽性面積 23
1.4　考察 24
1.5　結語 26
第 2 章　JTT-130 を用いた小腸 MTP 阻害による体重増加抑制とは独立した糖代謝への影響 27
2.1　緒言 27
2.2　実験材料及び実験方法 29
2.2.1　実験材料 29
2.2.2　動物及び飼料 29
2.2.3　腹腔内糖負荷試験（実験 1） 29
2.2.4　高血糖クランプ試験（実験 2） 30

2.2.5　高インスリン正常血糖クランプ試験（実験 3）.....31
2.2.6　組織中脂質含量の測定（実験 4）.....32
2.2.7　統計解析.....33
2.3　結果.....34
2.3.1　腹腔内糖負荷試験（ipGTT）（実験 1）.....34
2.3.2　高血糖クランプ試験（実験 2）.....36
2.3.3　高インスリン正常血糖クランプ試験（実験 3）.....38
2.3.4　臓器中脂質含量（実験 4）.....40
2.4　考察.....41
2.5　結語.....43
第 3 章　JTT-130 を用いた小腸 MTP 阻害と PPARγ活性化の糖代謝に与える影響.....45
3.1　緒言.....45
3.2　実験材料及び実験方法.....47
3.2.1　材料.....47
3.2.2　動物及び飼料.....47
3.2.3　血液生化学値の測定.....47
3.2.4　グルコース酸化能の測定.....47
3.2.5　統計解析.....48
3.3　結果.....49
3.3.1　累積摂餌量及び体重.....49
3.3.2　血糖値，HbA1c 値及び血漿中インスリン値.....50
3.3.3　血漿中脂質代謝パラメータ.....52
3.3.4　脂肪組織におけるグルコース酸化能.....54
3.4　考察.....55
3.5　結語.....57
結論.....59
総括.....61
主論文.....63
参考論文.....64
参考文献.....65
謝辞.....73

略語一覧

AMPK	adenine monophosphate-activated protein kinase
DI	disposition index
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
FFA	free fatty acid
GIR	glucose infusion rate
GLP-1	glucagon-like peptide-1
HGP	hepatic glucose poduction
HOMA-IR	homeostasis model assessment-insulin resistance
ipGTT	intraperitoneal glucose tolerance test
MTP	microsomal triglyceride transfer protein
OGTT	oral glucose tolerance test
PPARγ	peroxisome proliferator-activated receptor gamma
Rd	rate of glucose disappearance
s.d.	standard deviation
SGLT2	sodium/glucose transporter 2
TC	total cholesterol
TG	triglyceride
VLDL	very low density lipoprotein
WHO	World Health Organization
ZDF	Zucker diabetic fatty
ZF	Zucker fatty

緒論

生活習慣病である肥満や糖尿病，あるいは脂質異常症や大血管障害の背景には，種々の遺伝的要因だけでなく，ライフスタイルの変化に伴う運動不足や高カロリーな食物の過剰摂取といった環境的要因があることは極めてよく知られている。近年，エネルギーセンサーや免疫機能，あるいは腸内細菌のはたらきなどに注目を集める小腸であるが，その主たる役割は，外来から摂取された食物（糖質，脂質，タンパク質あるいは核酸）を特異的な酵素やタンパク質を介して消化・吸収する主要な臓器としてのはたらきにある。故に小腸は，とりわけ生活習慣病に関する有望な創薬標的臓器としてこれまでに様々な薬剤開発がなされてきた。その薬剤の代表例として，小腸における二糖類の分解を担うα-glucosidase を阻害することにより糖吸収を遅延し抗糖尿作用を発現する Acarbose や Voglibose，トリグリセリド（TG）分解を担う pancreatic lipase を阻害することにより脂肪吸収を抑制し抗肥満作用を発現する Orlistat，あるいはコレステロール吸収を担う Niemann-Pick C1 like 1 を阻害することによりコレステロール吸収を阻害し脂質異常症を改善する Ezetimibe などが挙げられる [1 - 4]。

小腸における TG の消化・吸収においては，まず小腸管腔内において TG が pancreatic lipase のはたらきにより，一旦，遊離脂肪酸（FFA）とモノアシルグリセロール（MG）に分解される。FFA と MG は，小腸上皮細胞に取り込まれ，そこで acyl-CoA:monoacylglycerol acyltransferase 及び acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase というふたつの脂肪酸転移酵素のはたらきにより，再び TG に再構築される。その後，TG はカイロミクロン（CM）の構成要素として，リンパを介して循環に放出される [5]。

microsomal triglyceride transfer protein（MTP）は，主に肝細胞及び小腸上皮細胞のミクロソーム画分に存在するタンパク質で，自身の構造安定化に寄与する P サブユニット（約 58 kDa）と脂質転送タンパク質ファミリーに属する M サブユニット（約 97 kDa）のふたつの分子から構成されるヘテロダイマータンパク質である。MTP は TG，コレステリルエステルあるいはリン脂質といった脂質成分とアポリポタンパク質 B を会合させ，リポタンパク質の形成を触媒する。すなわち MTP は，肝臓においては脂質成分を超低比重リポタンパク質（very low density lipoprotein, VLDL）として血中に分泌させる。また，小腸においては，上述にある TG 吸収の最終ステップである CM の形成を触媒し，脂質成分を血中に分泌させる。以上のようなはたらきから，MTP は小腸における脂質吸収に加え，血中の脂質レベルの維持に深く関与している（Figure 1）[6 - 9]。

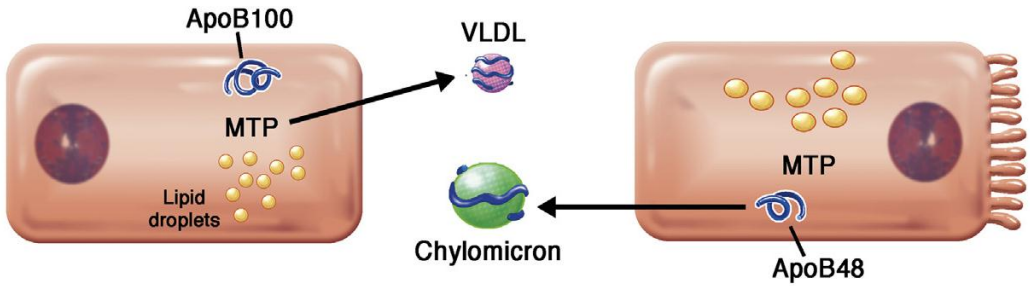

Figure 1 The roles of MTP in the liver and small intestine. [**9**]

本論

MTP はその血中脂質レベルを制御するはたらきから，当初，脂質異常症の標的分子としてその阻害薬の開発が精力的に行われてきた。第一世代の MTP 阻害薬は，全身の MTP を非選択的に阻害する化合物として開発され，強力な血中脂質低下作用を示した [10- 12]。しかしながらその一方で，重篤な肝障害が認められたことから，多くの阻害薬開発は中断を余儀なくされた。この肝障害は，肝臓の MTP を阻害したことにより肝臓からの VLDL 分泌が抑制され，結果として肝臓に脂肪が過剰に蓄積したことに起因すると考えられた。現在では，全身作用型の MTP 阻害薬としては唯一 Lomitapide が，極めて重篤な脂質異常症であるホモ接合体家族性コレステロール血症を適応として限定的に臨床応用されている [13, 14]。

以上のような背景があったものの，それまでに明らかとなっていたMTPのはたらきを考慮すると，小腸選択的にMTPを阻害し小腸における脂肪吸収を抑制することが，生活習慣病の有効な治療に繋がる可能性については残されていた。このことから，肝臓の MTP を阻害しない第二世代の薬剤として，小腸選択的 MTP 阻害薬の開発が試みられた。MTP は小腸と肝臓でサブタイプが同一であることから，酵素の構造の違いを基にした選択性の獲得は困難であった。そこで小腸選択的な作用を取得するためのアプローチとして，薬物の代謝経路を利用することとした。すなわち，小腸上皮細胞の MTP を阻害した後，体内へ吸収される過程において速やかに代謝分解され不活性型化合物へと変換される薬剤を創製することとした。一般的に，経口投与により処方された薬物は，小腸から吸収され門脈を通過した後，肝臓に到達することから，この過程に存在するエステラーゼによって代謝分解されることを志向して，分子構造内にエステル結合を含むよう阻害薬の合成・最適化を実施した。その結果，小腸の MTP を阻害し，肝臓の MTP には作用しない小腸選択的 MTP 阻害薬 JTT-130 が創出された [15]。

JTT-130 は，吸収過程において速やかに加水分解され MTP 阻害活性を有さない代謝物（M1）に変換されることにより，小腸選択的に MTP を阻害するようデザインされた新規低分子化合物である。これまでに JTT-130 については，オリーブ油負荷ハムスターにおいて，小腸における脂質の吸収（血漿中 VLDL 値あるいは TG 値の上昇）を強力に抑制する一方で，肝臓からの脂質分泌（TG 分泌速度）には影響しないことが明らかとなっており，小腸選択的な MTP 阻害作用が確認されている [15]。また JTT-130 は，高脂血症モデルである高脂肪/高コレステロール負荷ハムスターを用いて，本来期待された脂質低下作用を有することが示されている [15]。加えて，高脂肪食負荷肥満ラットを用いた検討から，JTT-130 が小腸における脂質吸収を阻害した結果，小腸管腔内の FFA を上昇させ，glucagon-like peptide1（GLP-1）

をはじめとする消化管ホルモンの上昇，並びに摂食抑制作用を発現すること［16，17］，また摂食抑制に伴う抗肥満作用を発現することが明らかとなっている［17］。また，肥満 2 型糖尿病モデルである Zucker diabetic fatty（ZDF）ラットを用いた検討から，JTT-130 が摂食抑制及び体重増加抑制に伴い，本動物の高血糖を是正することが明らかとなっている［18］。以上の結果と一致して，小腸選択性のあるとされる MTP 阻害薬である Dirlotapide もその体重増加抑制作用を有することから，現在ではイヌの抗肥満薬として使用されている［19，20］。また，その誘導体である MTP 阻害薬が高脂肪食負荷マウスにおいて体重増加を抑制し，血糖値を低下させることが報告されている［21］。以上の知見から，小腸選択的な MTP の阻害は高血糖を是正し，糖尿病治療において新たなアプローチとなることが期待された。しかしながら，その作用機序は摂食抑制作用を基にした抗肥満作用に起因すると考えられており，詳細な解析はなされてこなかった。

そこで本研究においては，小腸選択的 MTP 阻害薬である JTT-130 を用いて，小腸における MTP の阻害が遺伝性及び非遺伝性肥満 2 型糖尿病モデル動物の糖代謝に与える影響を評価し，MTP 阻害薬が有する新たな可能性及びその有用性を検討した。第 1 章においては，ZDF ラットを用いて JTT-130 が糖代謝に与える影響を Pair-feeding 法を用いて比較し，また，第 2 章においては高脂肪食負荷肥満ラットを用いて JTT-130 の単回投与が糖代謝に与える影響を検討することで，小腸における MTP 阻害薬の新たな作用を見出すことを試みた。また，第 3 章においては ZDF ラットを用いて既存糖尿病薬のひとつであるピオグリタゾンと JTT-130 の併用効果を評価し，小腸における MTP 阻害薬の血糖コントロールにおける有用性を検討した。

第1章　JTT-130を用いた小腸MTP阻害による摂食抑制とは独立した糖代謝への影響

1.1　諸言

高カロリーな食物の摂取や運動不足といった環境因子が 2 型糖尿病の背景に存在することは異論がない。そのような背景も相まって，非臨床研究において盛んに用いられる Zucker fatty（ZF）ラット，ZDF ラット，KK-A^y マウス，ob/ob マウスあるは db/db マウスといった 2 型糖尿病モデル動物はいずれも過食・肥満を伴ったものである。ZDF ラットは，レプチン受容体の 269 番目のアミノ酸がグルタミンからプロリンとなる変異を有し，結果としてレプチンのシグナル異常（Leprfa 遺伝子）を持つ ZF ラットの中から，高血糖を示す個体を選別・交配することにより作出された遺伝性肥満 2 型糖尿病モデル動物である [22 - 24]。序論で述べたとおり，これまでに JTT-130 は ZDF ラットの血糖値を低下させることが報告されているが，その発現機序は JTT-130 が有する摂食抑制作用や（投与初期における）体重増加抑制作用に依存するものと考えられてきた [18]。そこで本研究においては，JTT-130 処置と摂餌量を等しく制限した ZDF ラットを比較することにより，JTT-130 の摂食抑制作用とは独立した血糖低下作用を検討することを通じて，小腸における MTP 阻害が糖代謝に与える影響を明らかにすることを目的として検討を実施した。

摂食抑制作用（あるいはその結果として誘導される体重増加抑制作用）と切り離して薬理作用を検討する手段として，非臨床研究では Pair-feeding という方法がしばしば採用される。これは比較したい処置の摂餌量をモニターし，それと同量の飼料を別の動物（Pair-fed 動物）に給餌することにより，摂餌量を等しく制限する制限給餌法のひとつである。しかしながら，Lepfa 遺伝子に異常を背景にもつ ZDF ラットは，正常ラットと比べてただ過食であるだけでなく，その摂餌パターンも大きく破綻している。すなわち，正常動物が明期にはあまり摂食せず暗期に盛んな摂食行動を示すのに対して，ZDF ラットは明期暗期に関係なく摂食行動を示すことから，Pair-feeding を実施するに際しては摂餌量だけでなく摂餌パターンも合致させる必要があった。そこで本研究における Pair-feeding 法として，摂餌制限機能付摂餌量測定装置を用いることにより，JTT-130 の摂餌量と摂餌パターンを 3 時間おきにモニターしながら，Pair-fed 動物の翌日の摂餌量及び摂餌パターンに反映させる方法を採用した。JTT-130 を処置した動物と摂餌制限機能付摂餌量測定装置により制限給餌された Pair-fd 動物の投与期間中における血液生化学値や経口糖負荷試験（oral glucose tolerance test; OGTT）における耐糖能及び血漿中インスリン値を比較すると共に，

投与終了後に解剖を実施し，種々の解析を行うことによりその作用機序解析を試みた。

1.2　実験材料及び実験方法

1.2.1　材料

JTT-130, diethyl-2-(3- {dimethylcarbamoyl-4-[(4-trifluoromethylbiphenyl-2-carbonyl)amino]phenyl}acetyloxymethyl)-2-phenylmalonate については日本たばこ産業株式会社内にて合成されたものを使用した。試験内にて使用された他の試薬については市販品を購入した。

1.2.2　動物及び資料

ZDF ラット（ZDF/CrlCrlj-Lepr<fa>fatty）を日本チャールスリバーより購入した。動物は温度（23 ± 3℃），湿度（55 ± 15%）及び照明（12 時間明暗周期，午前 8 時に点灯）を管理された飼育室内にて個別に飼育され，粉末飼料（CRF-1，オリエンタル酵母工業，日本）及び滅菌水をそれぞれ給餌及び給水された。ZDF ラット（雄性，7 週齢）を体重及び血液生化学値に基づき，対照群，JTT-130 群及び Pair-fed 群の 3 群に群分けした。JTT-130 群の動物には JTT-130（約 10 mg/kg/day 相当）含有する CRF-1 粉末飼料を給餌することにより，41 日間混餌投与した。ラット用摂餌制限機能付摂餌量測定装置（FMD-700AS，メルクエスト，日本）を用いて JTT-130 群の動物の摂餌量及び摂餌パターンを 3 時間毎に毎日測定し，Pair-fed 群の動物の翌日の摂餌行動に反映させることにより，Pair-fed 群の動物を JTT-130 と同等の摂餌量を同様の摂餌パターンで給餌制限した。対照群の動物には CRF-1 粉末飼料を自由摂食させた。試験期間中，3～4 日毎に体重を測定した。すべての操作は日本たばこ産業動物実験委員会の規定に則って実施された。

1.2.3　血液生化学値の測定

7 日毎に非絶食下において尾静脈より血液を採取した。血液を遠心分離することにより得られた血漿を用いて，血液生化学値を測定した。血糖値，血漿中 TG 及び総コレステロール（TC）値を市販のキット（リキテックグルコース HK テスト，リキテック TGII 及びリキテック TCII，Roche Diagnostics，スイス）及び自動分析装置（Hitachi7170S，日立製作所，日本）を用いて酵素比色法により測定した。血漿中インスリン値を市販のキット（超高感度ラットインスリン測定キット，森永生化学研究所，日本）を用いて enzyme-linked immunosorbent assay（ELISA）法により測定した。血漿中 FFA 値を市販のキット（NEFA C-テストワコー，和光純薬工業，日本）を用いて酵素比色法により測定した。

1.2.4　経口糖負荷試験（OGTT）

ラットを 24 時間絶食させた後，投与 36 日目において OGTT を実施した。絶食下にて尾静脈より血液を採取した後，2 g/kg の用量でグルコース（和光純薬工業，日本）水溶液を 5 mL/kg の容量で経口負荷した。糖負荷15，30，60及び120分後において尾静脈より血液を採取した。血液を遠心分離し，得られた血漿を用いて血糖値及び血漿中インスリン値を測定した（方法については 1.2.3 項に記載した）。また，インスリン抵抗性の指標として，Homeostasis model assessment-insulin resistance（HOMA-IR）値を以下の式に従い算出した。

HOMA-IR = 絶食時血糖値（mg/dL）× 絶食時インスリン値（ng/mL）× 26 / 405

1.2.5　門脈中 GLP-1 値の測定

投与 41 日目において解剖を実施した。ラットをジエチルエーテル麻酔下にて開腹し，ethylenediaminetetraacetic acid（EDTA），dipeptidylpeptidase（DPP）4 阻害剤（Millipore，アメリカ）及びアプロチニン（和光純薬工業，日本）を含むサンプルチューブに，門脈より血液を採取した。血液を遠心分離し，血漿中 GLP-1 値を GLP-1 ELISA kit（Linco Research，アメリカ）を用いて ELISA 法により測定した。

1.2.6　膵島インスリン陽性面積の測定

膵臓を摘出し，重量を測定した後，これを 10%ホルマリンにて固定しパラフィン包埋した。固定した試料より連続切片を作成し，光学顕微鏡観察用にヘマトキシリン/エオジン染色を施した。また抗インスリン抗体（Dako，日本）及び HRP 標識抗ウサギ IgG 抗体（Dako，日本）を用いて免疫組織学的検査を実施した。総インスリン陽性（β細胞）面積及び総膵臓面積を蛍光顕微鏡（BZ-9000，キーエンス，アメリカ）を用いて画像解析し，以下の式に従い膵島インスリン陽性面積（%）を算出した。

膵島インスリン陽性面積（%） = 総インスリン陽性面積 / 総膵臓面積

1.2.7　肝臓中脂質含量の測定

肝臓を摘出し，切片の重量を測定した。組織切片をクロロホルム/メタノール（2:1，vol/vol）中にてホモジナイズし，遠心分離した後，有機層を分取した。窒素噴射下にて有機層を乾固させた後，イソプロパノールに再溶解した。イソプロパノール中の TG 及び TC 濃度を測定した（方法については 1.2.3 項に記載した）。

1.2.8　統計解析

測定結果について，平均値±（または＋）標準偏差として表記した。2 群間の有意差検定について，F test により分散性を検討した後，等分散の場合は Student's t test を，不等分散の場合は Welch's test を実施した。統計解析には，SAS System Version 8.2 及び SAS 前臨床パッケージ Version 5.0（SAS Institute Japa）を用いた。Bonferroni の補正により有意水準を両側 1.67（5/3）%とした。

1.3　結果

1.3.1　累積摂餌量及び体重

投与期間中における累積摂餌量及び体重を Figure 2 に示す。投与期間を通じて，対照群に比べ JTT-130 群の摂餌量は有意に低値を推移した。また摂餌量測定装置により管理した結果，Pair-fed 群の摂餌量も JTT-130 群と同等に制限された。

摂餌量の低下に合わせて，JTT-130 群及び Pair-fed 群の体重は投与初期において対照群に比べて低値を推移し，JTT-130 群については投与 14 日目において，Pair-fed 群については投与 4～18 日目において，その差は有意であった。一方，投与後期においては JTT-130 群及び Pair-fed 群の体重は対照群に比して逆に高値を示した。なお，JTT-130 群と Pair-fed 群の体重は投与期間を通じてほぼ同様に推移し，両群間に有意な差は認められなかった。

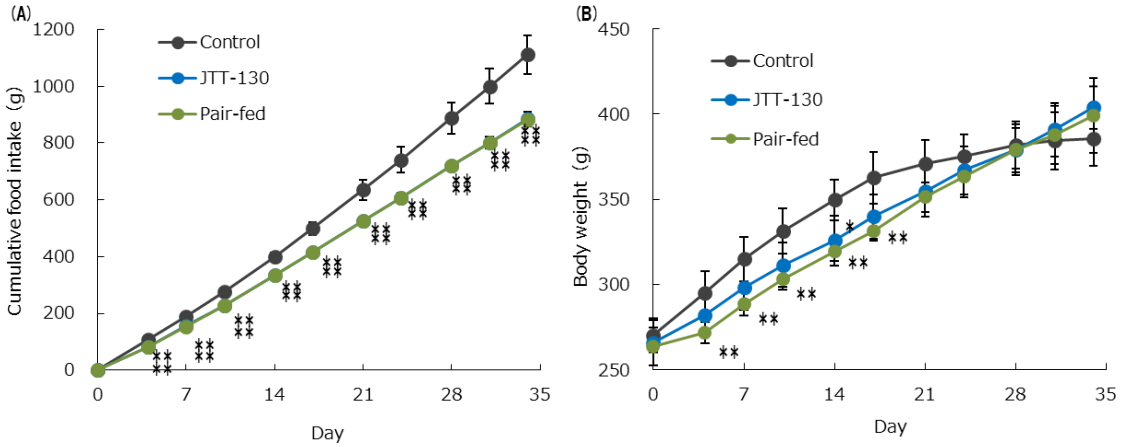

Figure 2 Changes in cumulative food intake (A) and body weight (B). Data represent mean values ± s.d. (n = 5 - 6). *p< 0.05/3, **p < 0.01/3: significantly different from control group (Student's t-test or Welch's test with Bonferroni correction).

1.3.2　血糖値及び血漿中インスリン値

投与期間中における血糖値及び血漿中インスリン値の推移を Figure 3 に示す。ZDF ラットはインスリン抵抗性の発症及び膵 β 細胞の疲弊に伴うインスリン分泌の低下に基づき，糖尿病を発症・増悪することが知られている[23]。本試験においても投与 14 日目以降，対照群の血糖値は上昇し始め，以降の投与期間を通じて顕著な高血糖を呈した。JTT-130 群及び Pair-fed 群の血糖値は投与期間を通じて対照群より有意に低値を推移した。しかしながら，投与 28 日目以降，Pair-fed 群の血糖値は上昇し始め，血糖コントロールを失う傾向を示した。投与 35 日目において JTT-130 群に対して上昇傾向を示した（p = 0.043）。投与 21 日目以降，対照群の血漿中インスリン値は低下しはじめ，膵 β 細胞の疲弊が推察された。一方，JTT-130 群及び Pair-fed 群の血漿中インスリン値は投与 7 日目において対照群に比して低値を示したが，投与 21 日目以降は逆に高値を示した。これは各処置の影響により糖尿病状態が抑制された結果，膵β細胞疲弊の進行が抑制された結果と推察された。

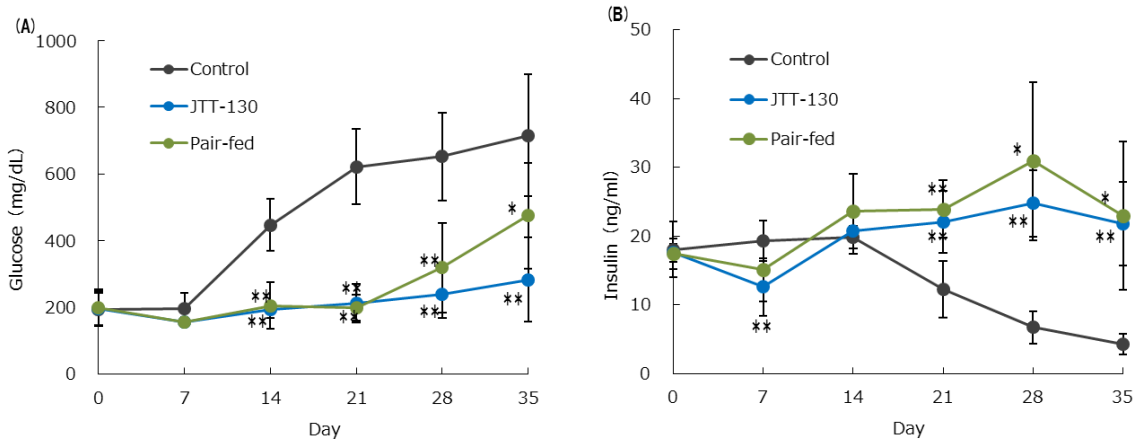

Figure 3 Changes in plasma glucose (A) and insulin (B) levels. Data represent mean values ± s.d. (n = 5-6). *p < 0.05/3, **p < 0.01/3: significantly different from control group. (Student's t-test or Welch's test with Bonferroni correction).

1.3.3　血漿中脂質代謝パラメータ

投与期間中における血漿中 TG 値，TC 値及び FFA 値の推移を Figure 4 に示す。JTT-130 群及び Pair-fed 群の血漿中 TG 値は投与初期において対照群に比して有意に低値を示した。一方，投与 28 日目以降は逆に有意に高値を示した。血漿中 TG 値に関して，JTT-130 群と Pair-fed 群の間に有意な差は認められなかった。JTT-130 群の血漿中 TC 値は，投与期間を通じて対照群に比して有意に低値を推移した。一方，Pair-fed 群の血漿中 TC 値は対照群に比してほぼ変化がなく，投与期間を通じて JTT-130 群より有意に高値を推移した。JTT-130 群及び Pair-fed 群の血漿中 FFA 値は投与 7 日目において一過的に有意な低下を示したが，その後 3 群間に有意な変化は認められなかった。

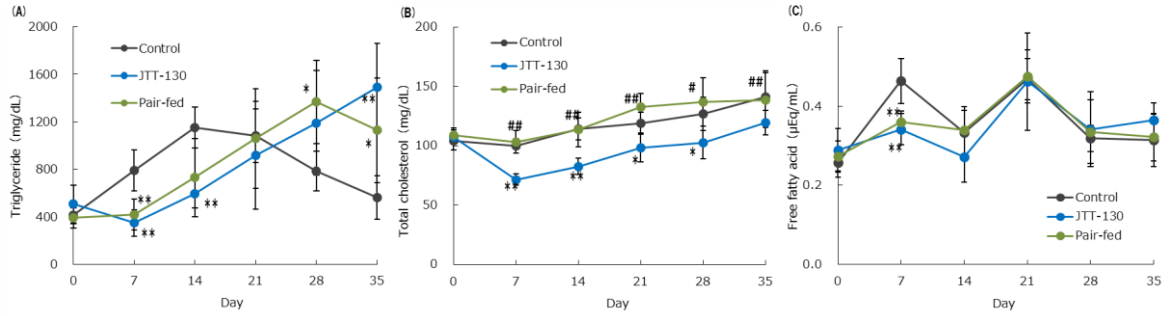

Figure 4 Changes in plasma triglyceride (A), total cholesterol (B) and free fatty acid (C) levels. Data represent mean values ± s.d. (n = 5 - 6). *p < 0.05/3, **p < 0.01/3: significantly different from control group. #p < 0.05/3, ##p < 0.01/3: significantly different from JTT-130 group (Student's t-test or Welch's test with Bonferroni correction).

1.3.4　経口糖負荷試験（OGTT）

投与 36 日目に実施した OGTT における血糖値及び血漿中インスリン値を Figure 5 に示す。対照群に比して，JTT-130 群の血糖値は糖負荷前及び糖負荷後において有意に低下した。Pair-fed 群の血糖値も JTT-130 群と同様に有意に低値を示した。しかしながら，JTT-130 群に比して糖負荷前に上昇傾向（p = 0.018）を，糖負荷 120 分後においては有意に高値を示した。このことは JTT-130 が Pair-fed 処置に比してより強力に耐糖能を改善したことを示している。また，JTT-130 群及び Pair-fed 群の血漿中インスリン値は対照群に比して高値を推移した。対照群は既に膵β細胞が疲弊した状態にあることが推察され，本結果も対照動物の膵機能（糖応答性インスリン分泌能）が低下していることを示していると考えられる。一方，JTT-130 群及び Pair-fed 群の膵機能は比較的良好に保たれているため，膵機能が維持され耐糖能におけるインスリン値も高値を推移したものと推察された。本試験の絶食時（糖負荷前）血糖値及び血漿中インスリン値から算出した HOMA-IR 値を Table 1 に示す。HOMA-IR 値はインスリン抵抗性の指標であるが，膵機能が顕著に低下した状態では正確な判断を下すのが難しいとされている [25，26]。上述の通り，対照群は既に膵β細胞機能が低下した状態にあることが推察され，HOMA-IR 値をもって考察するのは不適当であると考えられた。一方，JTT-130 群の HOMA-IR 値は Pair-fed 群に比して低値を示した。

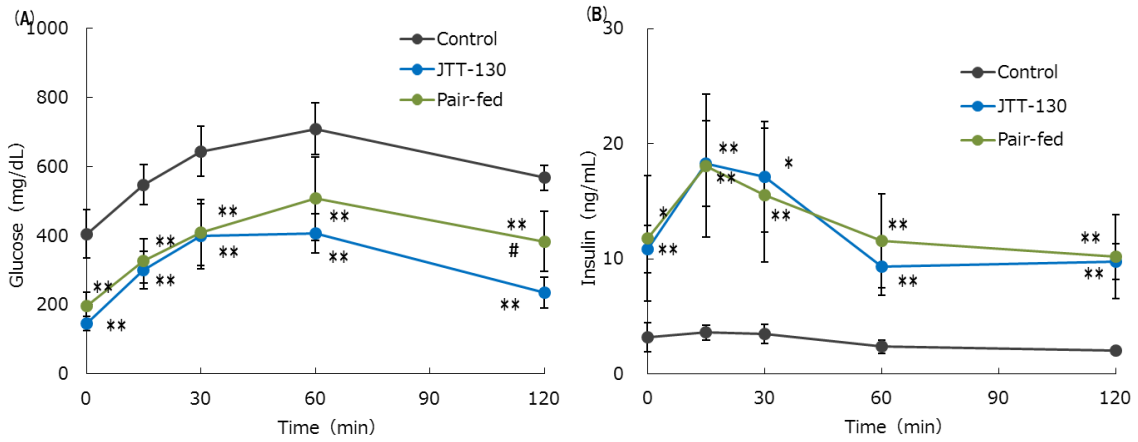

Figure 5 Changes in plasma glucose (A) and insulin (B) levels in glucose-loaded ZDF rats on Day 36. Data represent mean values ± s.d. (n = 5 - 6). **p < 0.01/3: significantly different from control group. #p < 0.05/3: significantly different from JTT-130 group (Student's t-test with Bonferroni correction).

Table 1 Changes in HOMA-IR values.

	Control	JTT-130	Pair-fed
HOMA-IR	84.8 ± 16.6	101.2 ± 10.5	140.5 ± 22.1

Data represent mean values ± s.d. (n = 5 - 6).

1.3.5　肝臓中脂質含量

本作用のメカニズム解析を目的として投与最終日に動物を解剖し，種々の解析を実施した。肝臓や骨格筋といった非脂肪細胞に蓄積した所謂異所性脂肪は，その臓器におけるインスリン抵抗性と関連することが良く知られていることから[27 - 30]，肝臓中 TG 及び TC 含量を測定した（Figure 6）。結果，JTT-130 群の肝臓中 TG 及び TC 含量は対照群に比してそれぞれ低値を示した。一方，Pair-fed 群の肝臓中 TG 及び TC 含量は対照群に比して高値を示し，JTT-130 群に比していずれも有意に高値を示した。以上の結果より，JTT-130 群は Pair-fed 群よりも有意に肝臓中脂質含量が低いことが明らかとなった。

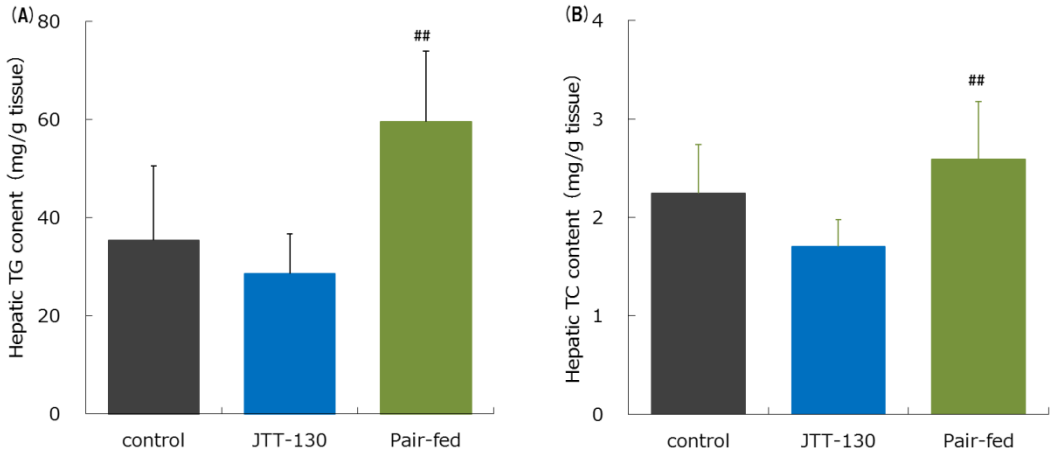

Figure 6 Changes in hepatic triglyceride (A) and total cholesterol (B) levels. Data represent mean values + s.d. (n = 5-6). $^{\#\#}p < 0.01/3$: significantly different from JTT-130 group (Student's t-test with Bonferroni correction).

1.3.6　門脈中 GLP-1 値

解剖時に測定した門脈中 GLP-1 値を Figure 7 に示す。既報同様 [18]，JTT-130 群の門脈中 GLP-1 値は対照群に比して約 2 倍に上昇した（p = 0.037）。一方，Pair-fed 群に対しても JTT-130 群は高値を示したもののその差は有意ではなかった。

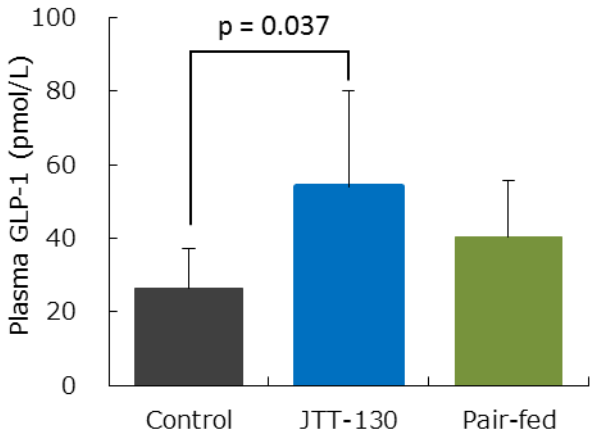

Figure 7 Changes in portal GLP-1 levels. Data represent mean values + s.d. (n = 5-6).

1.3.7　膵臓重量及びインスリン陽性面積

膵臓重量及び膵島のインスリン陽性面積を Figure 8 に示す。JTT-130 群の膵臓重量は対照群及び Pair-fed 群に比して，有意に高値を示した。また，膵島のインスリン陽性面積は対照群に比して約 3 倍程度に上昇した（p = 0.041）。GLP-1 はそれ自体がインクレチンホルモンとして種々のホルモン分泌を制御することにより血糖低下に寄与するのに加えて，膵 β 細胞をアポトーシスから保護するとともに膵 β 細胞の増殖・分化を誘導することが知られている[31，32]。このことから，JTT-130 によって誘導された GLP-1 が膵臓を保護した結果，インスリン陽性面積の増加並びに良好な血糖コントロールに繋がった可能性が推察された。一方，JTT-130 群は Pair-fed 群に対して有意な膵臓重量の増加を示したが，インスリン陽性細胞面積については有意な変化ではなかった。

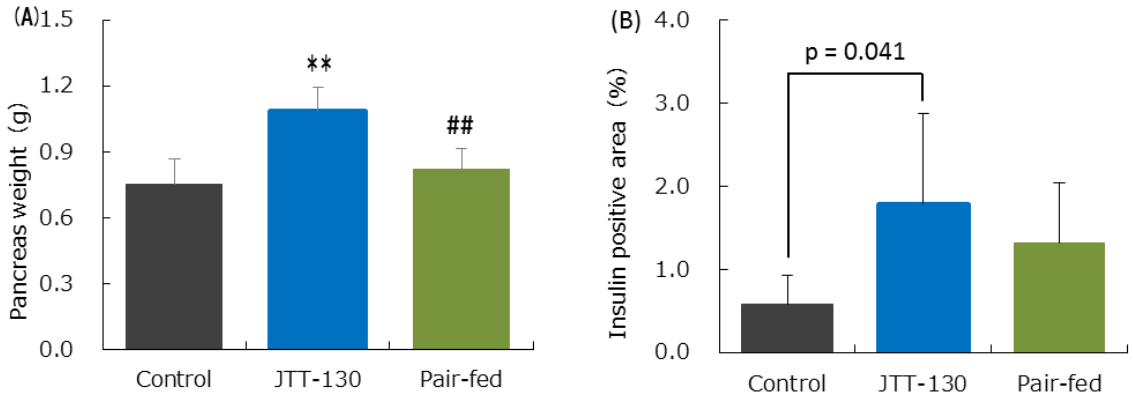

Figure 8 Changes in pancreatic weight (A) and insulin-positive area in islets (B). Data represent mean values + s.d. (n = 5 - 6). **p < 0.01/3: significantly different from control group. ##p < 0.01/3: significantly different from JTT-130 group (Student's t-test with Bonferroni correction).

1.4 考察

本研究では，ZDF ラットを用いて JTT-130 処置と制限給餌処置を比較することにより，JTT-130 の摂食抑制作用とは独立した血糖低下作用を検討することを通じて，小腸におけるMTP阻害が糖代謝に与える影響を明らかにすることを目的として検討を実施した。

摂餌量測定装置で厳密に管理した結果，Pair-fed 群の摂餌量は JTT-130 群と同一に制限された。過食動物である ZDF ラットに JTT-130 群と同量の（すなわち本来摂食すべき量よりも少ない量の）飼料を給餌するだけでは，給餌直後にほとんどの飼料を食べ切るため一日の後半は絶食状態になり，その摂餌パターンは本来の ZDF ラットのそれとは大きく異なってしまう。しかしながら，今回の試験では JTT-130 群の 3 時間ごとの摂餌量をモニターしその摂餌パターンも含めて Pair-fed 群に反映させたため，（結果には記さないが）Pair-fed 群の日内における摂餌パターンも JTT-130 とほぼ完全に同一に制御された。このように摂餌量を制御した結果，体重についてもJTT-130 群と Pair-fed 群ではほぼ同様に推移する結果となった。JTT-130 及び Pair-fed 処置は投与初期において摂餌量の低下に伴い体重増加を抑制した。一方，投与後期においては両群の体重はむしろ対照群に比して高値を示した。ZDF ラットは糖尿病の増悪に伴い，膵β細胞が障害されインスリン分泌不全状態となる。実際，本検討においても投与 21 日目以降，対照群の血漿中インスリン値は週齢を経るに従って低下した。インスリンは血糖値を低下させる唯一のホルモンであるだけでなく，その同化作用から体重を制御する因子としても知られている [33]。故に，JTT-130 や Pair-fed 処置が投与後期においてむしろ体重を増加させたのは，血漿中インスリン値の低下に伴い，その同化作用が失われた結果として対照群の体重増加が鈍化する一方，JTT-130 群や Pair-fed 群の血漿中インスリン値は高値を推移し，体重増加が維持されたために生じた結果と考えられた。これまでにも，カロリー制限したZDFラットは制限していないラットに対して体重低下を示さないこと [34]，GLP-1 アナログ（リラグルチド）とピオグリタゾンの併用は ZDF ラットの摂餌量を低下させるにも関わらず体重を増加させることが報告されており [35]，今回の結果と一致している。

既報と同様 [18]，本研究においても JTT-130 は ZDF ラットの高血糖を抑制した。一方，Pair-fed 処置は試験当初こそ JTT-130 処置とほぼ同様の血糖値の低下を示したものの，試験後半においては血糖コントロールが減弱する傾向が認められた。同様に OGTT においても JTT-130 は Pair-fed 処置に比してより強力な耐糖能改善作用を示した。以上の結果は，JTT-130 がその摂食抑制作用とは独立した機序に基づいて血糖低下作用を発現していることを示している。JTT-130 群及び Pair-fed 群の OGTT の際のインスリン値を比較するとほぼ同様の推移をしていたこと，また HOMA-IR 値も JTT-130 群の方がより低

値を示したことから，JTT-130 が示した良好な血糖コントロールは，一部はインスリン感受性の改善により説明されると考えられた。実際，投与最終日の肝臓中の脂質含量を比較したところ，JTT-130 は Pair-fed 処置に比して有意に TG 及び TC の含量を低下させることが明らかとなった。肝臓など異所性に蓄積した脂質はその臓器のインスリン抵抗性と相関することが知られており，これらの結果は JTT-130 が Pair-fed 処置よりも肝臓のインスリン感受性をより亢進させていたことを示唆している。また，JTT-130 は小腸における MTP を阻害することから，食物からの脂肪吸収を抑制したことが，Pair-fed 処置よりも肝臓中の脂質含量を低下させた要因のひとつと考えられた。投与最終日の解剖時において JTT-130 はより顕著に門脈中の GLP-1 を上昇させた。GLP-1 はそれ自体がインクレチンホルモンとして血糖低下作用を発現することが知られている [31]が，インスリン感受性を増強する作用を有することも報告されている [36 - 38]。例えば，GLP-1 のアナログである Exendin-4 は ZDF ラットにおいてインスリン感受性を改善する。同様に GLP-1 のアナログである Exenatide は ZF ラットにおいてインスリン感受性を改善することが報告されている。故に，JTT-130 がより強力にインスリン感受性を改善した要因のひとつに GLP-1 の関与した可能性も考えられた。

1.5　結語

以上のように，摂餌を同等に制限した（Pair-fed）処置に比べ，JTT-130 処置はさらに血糖を良好にコントロールするとともに，耐糖能をより強力に改善することが明らかとなった。また本作用は主として肝臓における異所性脂肪の低下に伴うインスリン感受性の改善が関与していることが示唆された。このことから小腸における MTP 阻害はその摂食抑制とは独立して肝臓のインスリン感受性を亢進させ，糖代謝を改善することが明らかとなった。

第2章　JTT-130を用いた小腸MTP阻害による体重増加抑制とは独立した糖代謝への影響

2.1　緒言

詳細な病因はいまだ不明であるものの，過食や運動不足といった環境因子が肥満の主要な構成要素であることは異論がない [39]。WHO の調査では 2008 年の時点で 20 歳以上の人口の実に 14 億人以上が過体重であり，5 億人以上が肥満であるとの推計が報告されている [40]。肥満は 2 型糖尿病だけでなく，脳血管疾患，冠動脈疾患，大腸癌，脂質異常症，高血圧といった数多くの疾患のリスク上昇と関連が知られている。このような背景から，これまでに種々の抗肥満薬が開発され臨床応用されている [41]。

肥満に伴い脂肪組織が肥大すると脂肪組織それ自体のインスリン感受性が悪化するのみならず，アディポネクチンや腫瘍壊死因子α，あるいはインターロイキン 6 やレジスチンといったインスリン感受性やインスリン抵抗性に関連する種々のアディポカイン（脂肪組織より分泌されるサイトカイン）の分泌に異常をきたすことが知られている。その結果，これらのアディポカインが肝臓や骨格筋といった種々の臓器のインスリン感受性を低下させる [42，43]。また，肥大した脂肪組織にはマクロファージが集積し活性化され，種々の炎症性サイトカインの分泌が惹起されることにより，所謂低度の慢性炎症状態が惹起され，これがインスリン抵抗性を惹起すると考えられている [44- 46]。一方，肥満に伴い肝臓や骨格筋といったインスリン感受性臓器に脂質が蓄積する，所謂異所性脂肪の蓄積は，その臓器のインスリン感受性を悪化させることが，臨床・非臨床を問わず良く知られている [27 - 30]。以上のように，とりわけ 2 型糖尿病との関連という意味合いにおいては，インスリン抵抗性が肥満と 2 型糖尿病の発症をリンクするキーワードとして挙げられる。これまでに開発されてきた Sibutramine や Orlistat といった抗肥満薬についても，非臨床及び臨床試験において抗肥満作用に伴って血糖低下作用を示すことが報告されている [47 - 50]。

JTT-130 は高脂肪食負荷肥満ラットにおいて摂餌及び体重増加を抑制し，結果として本モデルの耐糖能異常を改善することが報告されている [17]。また同様の報告で，MTP 阻害薬が高脂肪食負荷マウスにおいて体重増加を抑制し，血糖値を低下させることが示されている [21]。しかしながら，小腸における MTP 阻害の糖代謝に与える影響はその体重低下の延長線上の結果であるとされ，その詳細な機序解析は十分になされてはこなかった。そこで本研究では，高脂肪食負荷肥満ラットを用いて JTT-130 の体重増加抑制作用とは独立した血糖低下作用を評価するとともにそのメカニズムを解析することを通じて，小腸にお

ける MTP 阻害が糖代謝に与える影響を明らかにすることを目的として検討を実施した。既報に示されている通り [17]，JTT-130 は高脂肪食負荷肥満ラットにおいて強力な摂食及び体重増加抑制作用を示すことから，通常の反復投与試験では目的を達成することは不可能である。そこで本研究においては JTT-130 を単回投与した後，限られた時間（6～ 8 時間）だけ摂食させ，JTT-130 の摂餌あるいは体重増加への影響を排除した条件下において，腹腔内糖負荷試験（intraperitoneal glucose tolerance test; ipGTT，実験 1），高血糖クランプ試験（実験 2 ）あるいは高インスリン正常血糖クランプ試験（実験 3）といった種々の方法により，糖代謝に対する影響を評価した。また，同条件下における肝臓及び骨格筋の脂肪含量を測定することによりその機序解析を実施した（実験 4）。

2.2　実験材料及び実験方法

2.2.1　実験材料

JTT-130 及びその他試験内にて使用された試薬については第 1 章 1.2.1 項に記載した。

2.2.2　動物及び飼料

Sprague-Dawley（SD）ラットを日本チャールスリバーより購入した。動物は第 1 章に記載した環境下にて個別に飼育され，高脂肪食（35 w% fat diet，オリエンタル酵母工業，日本）及び滅菌水をそれぞれ給餌及び給水された。

Figure 9 に示すデザインに従い，以下の独立した 4 実験を実施した。高脂肪食を負荷した SD 系ラットを 24 時間絶食し，2 群に群分けした。JTT-130（10 mg/kg）あるいは媒体（0.5%メチルセルロース水溶液）を 5 mL/kg の容量で単回経口投与した。投与直後より 6～8 時間高脂肪食を給餌し，再度一晩絶食した。翌日，これらの動物について ipGTT（実験 1），高血糖クランプ試験（実験 2）及び高インスリン正常血糖クランプ試験（実験 3）を実施した。また同条件下における組織中脂質含量を測定した（実験 4）。すべての操作は日本たばこ産業動物実験委員会の規定に則って実施された。

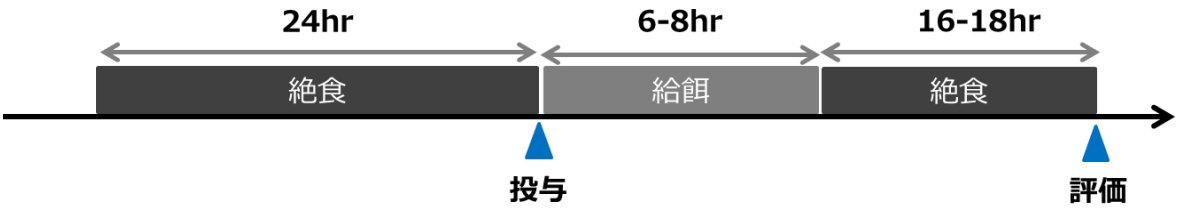

Figure 9 Experimental design of the studies

2.2.3　腹腔内糖負荷試験（実験 1）

2.2.2 項に記載した操作の後，一晩絶食したラットに対して ipGTT を実施した。絶食下においてラットの尾静脈より血液を採取し，1 g/kg の用量でグルコース（和光純薬工業，日本）水溶液を 5 mL/kg の容量で腹腔内より負荷した。糖負荷 7，30，60 及び 120 分後において尾静脈より血液を採取した。血液を遠心分離し，得られた血漿サンプルを用いて血糖値及び血漿中インスリン値を測定した（方法については第 1 章 1.2.3 項に記載した）。糖負荷前の血漿サンプルより血漿中 GLP-1 値を測定した（方法につ

いては第 1 章 1.2.5 項に記載した）。インスリン分泌能の指標として，Disposition index (DI) を以下の式に従い算出した。

Disposition index = $\triangle I_{0\text{-}30}$ / $\triangle G_{0\text{-}30}$ x (1 / 絶食時インスリン値 x 絶食時血糖値)

$\triangle I_{0\text{-}30}$: 糖負荷前から糖負荷 30 分後の血漿中インスリン値の変化量

$\triangle G_{0\text{-}30}$: 糖負荷前から糖負荷 30 分後の血糖値の変化量

2.2.4 高血糖クランプ試験（実験 2）

2.2.2 項における操作の給餌及び再絶食の後，ラットにペントバルビタール（東京化成，日本）を 50 mg/kg の用量で腹腔内より投与し麻酔した。カニューレ（SP45，夏目製作所，日本）を右頸静脈（グルコース注入用）及び左頸動脈（採血用）に留置し，縫合糸で固定した。2 本のカニューレは皮下を通して，後頸部より露出させ，試験開始時まで内部を 100 U/mL のヘパリンナトリウム水溶液（持田製薬，日本）にて満たした。一晩絶食した後，Figure 10 に示す試験デザインに従い，高血糖クランプ試験を実施した。グルコース水溶液注入開始前 30，20 及び 10 分，及びグルコース注入開始直前時に頸動脈に留置したカニューレより血液を採取し，簡易血糖測定装置（Antsense III，フクダ電子，日本）を用いて血糖値を測定した。シリンジポンプを用いて 25%グルコース水溶液を頸静脈に留置したカニューレより注入した。グルコース水溶液注入開始 2 及び 5 分後，及び以降 90 分後まで 5 分おきに血糖値を測定し，およそ 350 mg/dL となるようにグルコース注入速度を調節した。グルコース水溶液注入開始 30，20，10 分前，グルコース水溶液注入開始直前，及びグルコース注入開始 2，5，10 分後及び以降 90 分後まで 10 分おきに，およそ 100 μL の血液を採取し，血漿中インスリン値を測定した（測定方法は 1.2.3 項に記載した）。インスリン分泌能の指標として，第 1 相インスリン分泌及び第 2 相インスリン分泌を以下の式に従い算出した。

第 1 相インスリン分泌 = グルコース注入開始 0～5 分後におけるベースライン*からの血漿中インスリン値曲線下面積

第 2 相インスリン分泌 = グルコース注入開始 10～90 分後におけるベースライン*からの血漿中インスリン値曲線下面積

*ベースライン: グルコース注入開始 30，20，10 分前及びグルコース注入開始直前時における血漿中インスリン値の平均値

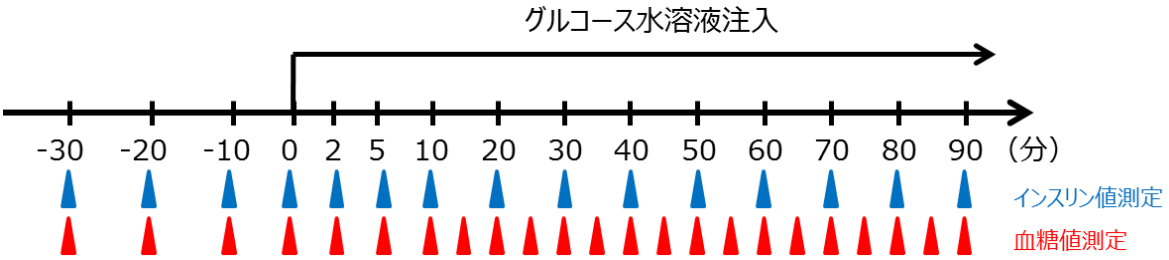

Figure 10 Experimental design of hyperglycemic clamp tests

2.2.5　高インスリン正常血糖クランプ試験（実験 3）

2.2.2 項における操作の給餌及び再絶食の後，ラットにペントバルビタール（東京化成，日本）を 50 g/kg の用量で腹腔内より投与し麻酔した。カニューレ（SP45，夏目製作所，日本）を右頸静脈（グルコース，インスリン及び[3-^{3}H]グルコース注入用）及び左頸動脈（採血用）に留置し，縫合糸で固定した。2 本のカニューレは皮下を通して，後頸部より露出させ，試験開始時まで内部を 100 U/mL のヘパリンナトリウム水溶液にて満たした。一晩絶食した後，Figure 11 に示した試験デザインに従い，高インスリン正常血糖クランプ試験を実施した。静脈に留置したカニューレより 740 kBq/head の用量で[3-^{3}H]グルコース水溶液（GE healtshcare，イギリス）を投与したのち，7.4 kBq/min の速度で持続注入した。持続注入開始 110，115 及び 120 分後を Basal 状態と定義し，Basal 状態パラメータを測定することを目的として，動脈に留置したカニューレより約 200 μL の血液を採取した。0.5 U/kg の用量でインスリン（ノボリンＲ注，ノボノルディスクファーマ，デンマーク）を投与した後，[3-^{3}H]グルコース水溶液及びインスリンをそれぞれ 7.4 kBq/min 及び 7 mU/kg/min の用量で持続注入した。その後 5 分おきに採血し，簡易血糖測定装置（メディセーフ，テルモ，日本）を用いて血糖値をモニターした。血糖値が 110 ± 10 mg/dL となるように 25%グルコース水溶液（和光純薬工業，日本）の注入速度を調整した。30 分間（血糖値の測定が連続 6 回），血糖値が 110 ± 10 mg/dL を維持した状態を定常状態（Clamp 状態）と定義し，Clamp 状態のパラメータを測定するために，後半 3 回の採血時に約 200 μL の血液を採取した。Basal 状態及び Clamp 状態の血液を遠心分離し得られた血漿サンプルを-20℃にて測定時まで保存した。

20 μL の血漿サンプルに，200 μL の 0.3*N* $ZnSO_4$ 水溶液及び 180 μL の 0.3*N* $Ba(OH)_2$ 水溶液（いずれもシグマアルドリッチ，アメリカ）を加え，混和した。混和物を遠心分離し，200 μL の上清を分

取し，これを窒素噴射下で 100℃に加温することにより水（^3H_2O を含む）を除去した。300 μL の精製水を添加し，残渣を再溶解した後，3 mL の液体シンチレーションカクテル（Clear-sol I，ナカライテスク，日本）を加え，[^{3}H]グルコースの放射活性を液体シンチレーションカウンター（TRI-CARB 2500TR，Packard BioScience，アメリカ）を用いて測定した。

全身のインスリン感受性の指標であるグルコース注入速度（glucose infusion rate，GIR），末梢のインスリン感受性の指標であるグルコース消失速度（rate of glucose disappearance，Rd）及び肝臓のインスリン感受性の指標である肝糖産生速度（hepatic glucose production，HGP）を，Steele らの方法に従い，以下の式により算出した [51]。

GIR（mg/kg/min）= 25%グルコース水溶液注入速度（mL/h）× 250／60／体重（kg）

Rd（mg/kg/min）= [^{3}H]グルコース注入速度（dpm/min）／[^{3}H]グルコース比放射能（dpm/mg）／体重（kg）

[^{3}H]グルコース比放射能（dpm/mg）= [3H]グルコース放射能濃度（dpm/mL）／血糖値（mg/dL）×100

HGP（mg/kg/min）= Rd（mg/kg/min）– GIR（mg/kg/min）

（Basal 状態では，GIR = 0 であるため，HGP = Rd）

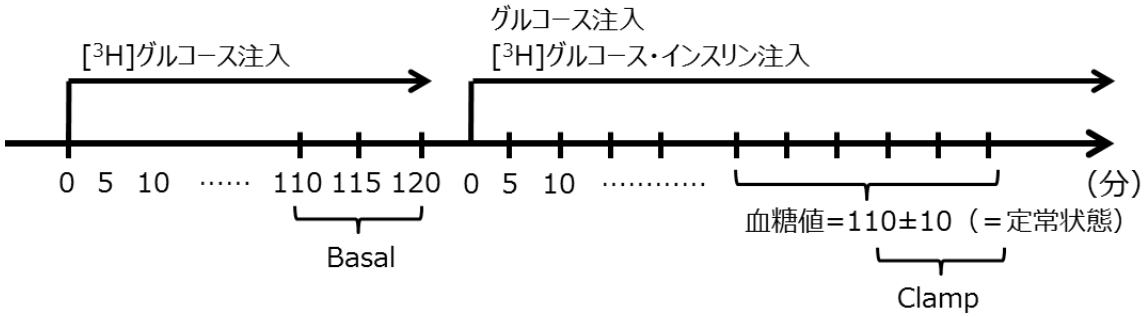

Figure 11 Experimental design of hyperinsulinemic-euglycemic clamp tests

2.2.6 組織中脂質含量の測定（実験 4）

一晩絶食したラットより肝臓及び骨格筋（ヒラメ筋）を摘出し，切片の重量を測定した。以下の操作については第 1 章 1.2.7 項に記載した。

2.2.7　統計解析

測定結果について平均値±（または＋）標準偏差として表記した。2 群間の有意差検定について，F test により分散性を検討した後，等分散の場合は Student's t test を，不等分散の場合は Welch's test を実施した。統計解析には，SAS System Version 8.2 及び SAS 前臨床パッケージ Version 5.0（SAS Institute Japan）を用いた。有意水準を両側 5%とした。

2.3　結果

2.3.1　腹腔内糖負荷試験（ipGTT）（実験 1）

ipGTT 時における体重及び試験期間中の体重増加量を Table 2 に示す。本試験においていずれのパラメータにも 2 群間に有意な変化は認められず，本試験は JTT-130 の体重増加抑制作用とは独立した条件下で実施された。

ipGTT 直前における血漿中 GLP-1 値を Figure 12 に示す。既報と同様[16]，JTT-130 群の血漿中 GLP-1 値は対照群に比して有意に上昇した。ipGTT における血糖値及び血漿中インスリン値を Figure 13 に示す。対照群に比して JTT-130 群においては，糖負荷前の血糖値が有意に低値を示すとともに，糖負荷後 7，30 及び 60 分後の血糖値が有意に低下し，耐糖能の改善が認められた。このことから JTT-130 はその体重増加抑制作用とは独立した作用を介して，血糖値を低下させることが明らかとなった。また，JTT-130 群において糖負荷後の血漿中インスリン値は低値を示し，糖負荷 60 分後においてその低下は有意であった。糖負荷試験における血糖値及びインスリンより，インスリン分泌の指標のひとつである Disposition Index（DI）を算出したところ，JTT-130 群で約 2 倍の上昇が認められたが，有意な差は得られなかった（Control; 3.05 ± 0.40（× 10^{-5}（mg/dL）$^{-2}$），JTT-130; 7.74 ± 2.25（× 10^{-5}（mg/dL）$^{-2}$, p = 0.17（Student's t-test））。

Table 2 Changes in body weight, body weight gain and food consumption in the Experiment 1.

	Body weight	Body weight gain	Food consumption
Control	298.0 ± 18.9	-4.9 ± 4.3	N.E.
JTT-130	292.2 ± 8.6	-8.0 ± 4.3	N.E.

Data represent mean values ± s. d . (n = 6). There were no significant differences between the groups (Student's t test). N.E.; not evaluated

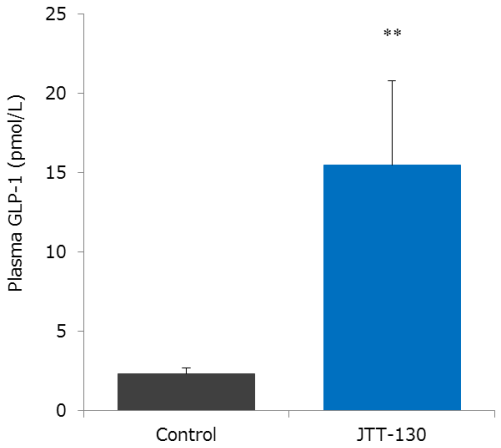

Figure 12 Changes in plasma GLP-1 levels before ipGTT. Data represent mean values + s. d . (n = 6). **p < 0.01; significantly different from control group (Student's t-test).

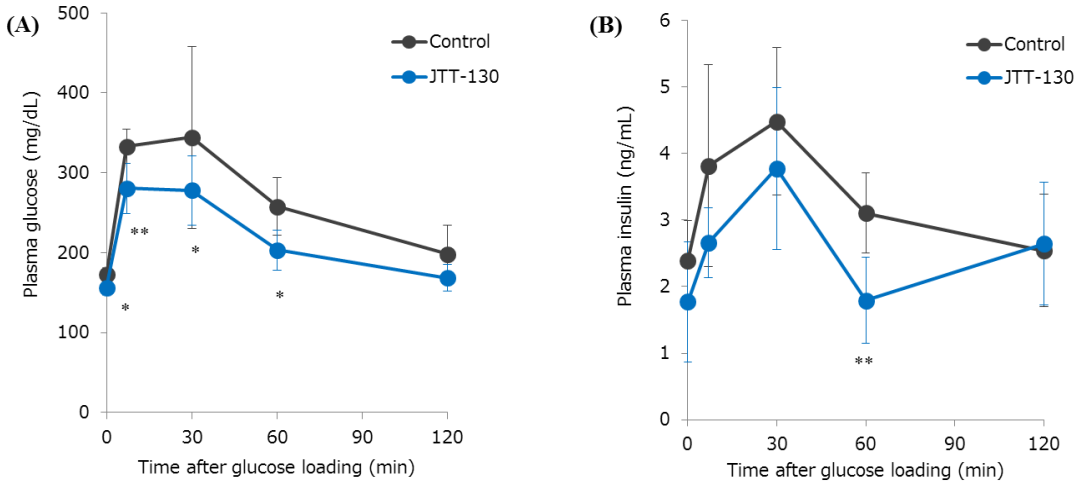

Figure 13 Changes in plasma glucose (A) and insulin (B) levels in ipGTT. Data represent mean values ± s. d . (n = 6). * p < 0.05, ** p < 0.01; significantly different from control group (Student's t-test).

2.3.2　高血糖クランプ試験（実験 2）

ipGTT における高血糖は一過的なものであり，インスリン分泌に対する影響を検討するには不十分である可能性が考えられた。そこで持続的な高血糖状態を維持することによりJTT-130の糖応答性インスリン分泌に対する影響をより正確に評価することを目的として，高血糖クランプ試験を実施した。高血糖クランプ試験時における体重及び試験期間中の体重増加量及び摂餌量をTable 3に示す。本試験においていずれのパラメータにも2群間に有意な変化は認められず，本試験はJTT-130の体重増加抑制作用とは独立した条件下で実施された。

高血糖クランプ試験における血糖値及び血漿中インスリン値の結果を Figure 14 に示す。グルコース水溶液注入前の血漿中インスリン値には両群間の差がなかったことから，JTT-130 は絶食下におけるインスリン分泌に影響を与えないと考えられた。グルコース水溶液の注入により，注入開始 50 分後以降両群の血糖値はほぼ350 mg/dLに維持された。グルコース水溶液注入による血糖値の上昇に応じて，両群の血漿中インスリン値は顕著に上昇したが，JTT-130 群は対照群に比してより高値を示し，第 2 相インスリン分泌を算出したところ上昇傾向が認められた（p = 0.068）。

Table 3 Changes in body weight, body weight gain and food consumption in the Experiment 2.

	Body weight	Body weight gain	Food consumption
Control	428.2 ± 47.3	-2.3 ± 5.5	14.6 ± 1.3
JTT-130	431.5 ± 20.0	-1.8 ± 2.9	13.5 ± 2.2

Data represent mean values ± s.d. (n = 7). There were no significant differences between the groups (Student's t test).

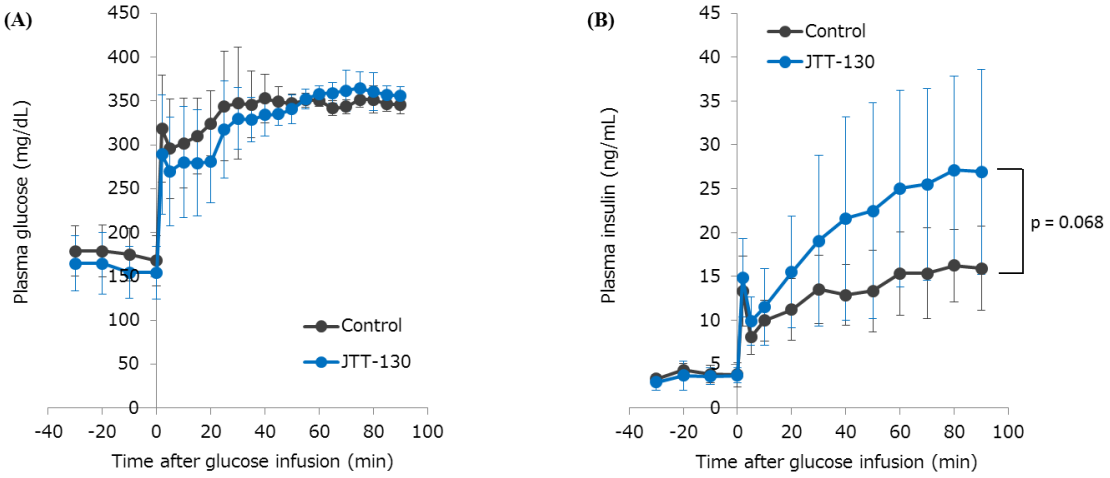

Figure 14 Changes in blood glucose (A) and plasma insulin (B) levels in hyperglycemic clamp tests. Data represent mean values ± s. d . (n = 7). Insulin areas above base line from 0-5 minutes are considered as first-phase insulin secretion, and the areas above base line from 10-90 minutes are considered as second-phase insulin secretion.

2.3.3　高インスリン正常血糖クランプ試験（実験 3）

ipGTT において JTT-130 はインスリン分泌を伴わずに耐糖能を改善したことから，インスリン感受性への影響が推測された。そこで正常血糖クランプ試験を行うことにより，JTT-130 のインスリン感受性に対する作用を検討した。全身のインスリン感受性の指標である GIR を算出するとともに，[3-^{3}H]グルコースをトレーサーとして持続注入することにより，末梢組織及び肝臓のインスリン感受性の指標である Rd 及び HGP をそれぞれ算出した。高インスリン正常血糖クランプ試験時における体重及び試験期間中の体重増加量及び摂餌量を Table 4 に示す。本試験においていずれのパラメータにも 2 群間に有意な変化は認められず，本試験は JTT-130 の体重増加抑制作用とは独立した条件下で実施された。

正常血糖クランプ試験における血糖値，血漿中インスリン値，GIR，Rd 及び HGP を Table 5 に示す。また試験における血糖値及び GIR の推移を Figure 15 に示す。インスリンの持続注入により，Basal 時に比して，Clamp 時の血漿中インスリン値は高値に維持され，両群間に差は認められなかった。またインスリンの持続注入開始 140 分以降，両群ともに血糖値は 110±10 mg/dL の範囲に維持された。Clamp 時において JTT-130 群の GIR は対照群に比して有意に高値を示した。またトレーサー解析の結果，Rd あるいは HGP はそれぞれ有意に高値あるいは低値を示した。これらの結果は，JTT-130 は肝臓及び末梢組織のいずれにおいてもインスリン感受性を増強することを示している。

Table 4 Changes in body weight, body weight gain and food consumption in the Experiment 3.

	Body weight	Body weight gain	Food consumption
Control	274.9 ± 14.2	-1.2 ± 4.3	13.8 ± 3.0
JTT-130	277.0 ± 13.7	1.4 ± 3.8	11.7 ± 1.8

Data represent mean values ± s. d . (n = 5 - 6). There were no significant differences between the groups (Student's t test).

Table 5 Changes in plasma glucose and insulin levels, GIR, Rd and HGP in hyperinsulinemic-euglycemic clamp test.

		Control	JTT-130
Glucose (mg/dL)	Basal	135 ± 11	127 ± 13
	Clamp	112 ± 4	113 ± 5
Insulin (ng/mL)	Basal	4.3 ± 0.9	4.3 ± 1.0
	Clamp	12.7 ± 3.9	10.4 ± 3.7
GIR (mg/kg/min)	Clamp	5.4 ± 6.0	15.2 ± 1.2 **
Rd (mg/kg/min)	Basal	8.0 ± 1.0	7.6 ± 1.1
	Clamp	11.8 ± 1.2	14.1 ± 1.8 *
HGP (mg/kg/min)	Basal	8.0 ± 1.0	7.6 ± 1.1
	Clamp	6.5 ± 5.7	-1.1 ± 2.1*

Data represent mean values ± s. d . (n=5-6). *p < 0.05, **p < 0.01; significantly different from control group (Student's t-test).

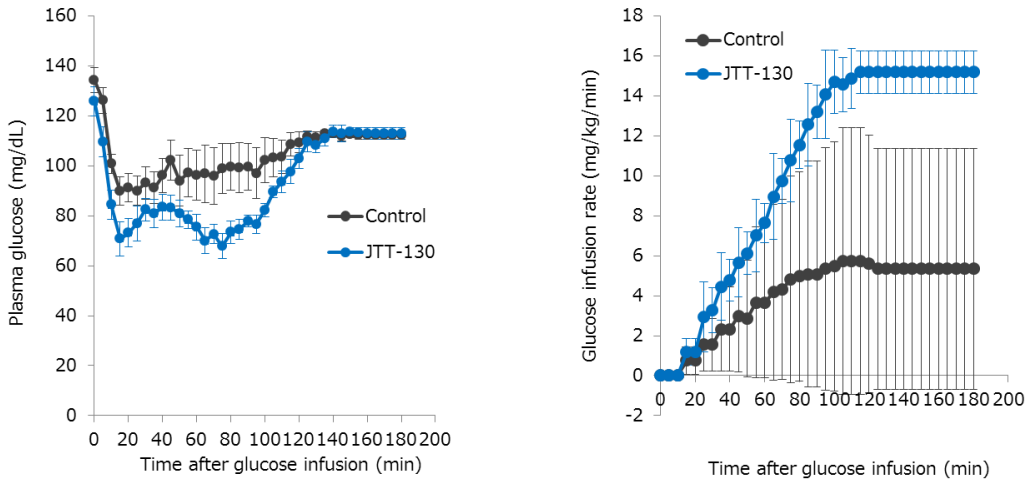

Figure 15 Changes in blood glucose levels (A) and glucose infusion rate (B) in hyperinsulinemic-euglycemic clamp tests. Data represent mean values ± s.d. (n = 5 - 6).

2.3.4　臓器中脂質含量（実験 4）

解剖時における体重及び試験期間中の体重増加量及び摂餌量を Table 6 に示す。本試験においていずれのパラメータにも 2 群間に有意な変化は認められず，本試験は JTT-130 の体重増加抑制作用とは独立した条件下で実施された。

本条件下における肝臓や骨格筋における脂質含量を測定した結果を Figure 16 に示す。JTT-130 群の肝臓及び骨格筋中 TG 及び FFA 含量は対照群に比して低下傾向あるいは有意な低下を示した。

Table 6 Changes in body weight, body weight gain and food consumption in the Experiment 4.

	Body weight	Body weight gain	Food consumption
Control	288.0 ± 16.6	-6.7 ± 3.6	14.8 ± 2.0
JTT-130	286.5 ± 18.4	-6.9 ± 6.5	13.4 ± 3.1

Data represent mean values ± s.d. (n = 8). There were no significant differences between the groups (Student's t test).

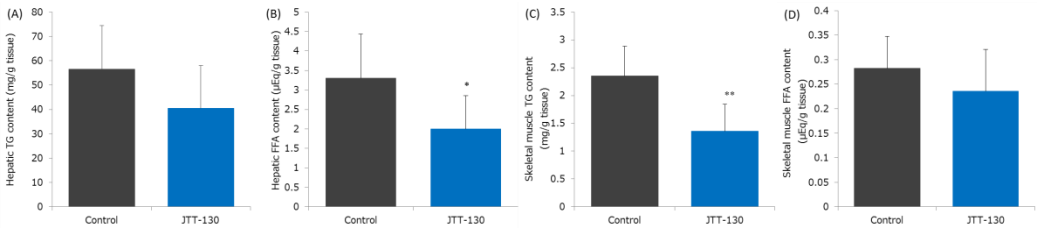

Figure 16 Changes in triglyceride (TG) and free fatty acid (FFA) contents in the liver (A), (B) and skeletal muscle (C), (D). Data represent mean values + s.d. (n = 8). *p < 0.05, **p < 0.01; significantly different from control group (Student's t-test).

2.4 考察

本研究では，高脂肪食負荷肥満ラットを用いて JTT-130 の体重増加抑制作用とは独立した血糖低下作用を評価するとともにそのメカニズムを解析することを通じて，小腸における MTP 阻害が糖代謝に与える影響を明らかにすることを目的として検討を実施した。

過去の検討結果より，JTT-130 は単回投与より，摂餌量及び体重増加量を低下させることが報告されている [17]。一方で，JTT-130 の作用（小腸における MTP 阻害作用）を発現させるには，小腸へ MTP の基質である脂肪を流入させる（すなわち摂食させる）ことが必要不可欠である。実際，低脂肪食を負荷したラットに対する検討では，JTT-130 は摂食抑制作用，体重増加抑制作用あるいは耐糖能改善作用を示しておらず，その作用発現が脂肪摂取依存的であることが示されている [17]。このことから，小腸における脂肪吸収を抑制しつつ，かつ摂食や体重増加への影響を最小限に留めることを企図して，JTT-130 投与後の摂食時間を 6～8 時間に制限することとした。結果として，本研究において実施した各実験において摂餌量及び体重への影響はほとんど認められなかった。

本研究において最初に実施した ipGTT の結果，JTT-130 は単回投与より耐糖能を改善したことから，JTT-130 は摂餌及び体重増加に影響を与えることなく血糖値を低下させることが明らかとなった。種々のインスリン分泌の指標の中でも，DI はインスリン感受性を加味していることから，より精度の高い指標として用いられている [52, 53]が，本試験において DI を算出したところ JTT-130 は上昇傾向を示した。一方で，ipGTT における血漿中インスリン値の推移をみると，JTT-130 はむしろそれを低下させていたことから，JTT-130 の糖応答性インスリン分泌に対する作用を正確に検出するには持続的な高血糖状態が必要であると推察された。事実，次に実施した高血糖クランプ試験において，JTT-130 は有意差こそ認められなかったものの，糖応答性インスリン分泌を促進させる傾向を有することがわかった。以上の結果は，JTT-130 が GLP-1 上昇に伴い，潜在的には糖応答性インスリン分泌を促進する作用を有するものの，それを血漿中インスリン値に反映させるためには，持続的な高血糖状態などの人為的な条件を作り出す必要があると考えられた。

血糖コントロールには種々の臓器が関与していることが知られるが，膵β細胞のインスリンの分泌能や，肝臓や骨格筋，あるいは脂肪組織といった各臓器のインスリン感受性といった，インスリン作用の強度が血糖コントロールにおける主たる決定要因であることは疑いがない。故に，本試験の ipGTT において認められた JTT-130 の血漿中インスリン値に対する作用は，JTT-130 がインスリン分泌よりはむしろインスリン感受性により強く影響を与えたことを示唆している。実際，高インスリン正常血糖クランプ試験では JTT-130 が肝臓

及び末梢組織におけるインスリン感受性を増強していることが示された。また JTT-130 は肝臓や骨格筋における脂質含量を低下させたことから，このインスリン感受性増強作用には異所性脂肪の蓄積の抑制を介したものであると推察された。ラットやヒトにおいて，脂肪の持続注入により骨格筋のインスリン抵抗性が比較的短時間で惹起されることが報告されていることを鑑みると，JTT-130 の異所性脂肪の低下を伴うインスリン感受性改善作用は，JTT-130 が小腸において脂肪吸収を抑制した結果である可能性が推察された [54, 55]。

2.5　結語

以上のように，JTT-130 はその抗肥満作用とは独立して（単回投与から）耐糖能改善作用を示すことが明らかとなった。また同条件の検討から，JTT-130 が GLP-1 分泌を伴う糖応答性インスリン分泌の亢進させる作用を有すること，肝臓や末梢組織における脂質含量を低下させ，インスリン感受性を改善させることがわかった。このことから，小腸における MTP 阻害はその体重低下とは独立して肝臓及び末梢組織のインスリン感受性を亢進させ，糖代謝を改善することが明らかとなった。

第3章　JTT-130 を用いた小腸 MTP 阻害と PPARγ活性化の糖代謝に与える影響

3.1　緒言

糖尿病は相対的なインスリン作用不足に伴う持続的な高血糖状態によって規定されるが，そもそも血糖値の恒常性維持には多種多様な臓器のはたらきが関与することが知られている [56]。すなわち，膵β細胞からのインスリン分泌，肝臓における糖産生，骨格筋あるいは脂肪組織における糖取り込み，腎臓における糖の再吸収あるいは膵α細胞におけるグルカゴン分泌といった現象は，相互に作用しながら血糖値の維持に関与している。またエネルギー代謝の観点から言えば，中枢における摂食制御も糖尿病と深い関わりがあると考えられる。このため，その薬物療法についても様々な作用機序を有する薬剤が開発され，臨床応用されてきた [57]。例えば，ビグアナイド薬は，詳細なメカニズムは不明であるものの，ひとつには adenine AMPK の活性化を介して肝臓における糖産生を抑制すると考えられている [58]。スルホニル尿素薬やメグリチニド系薬は膵β細胞のスルホニル尿素受容体に結合し，K_{ATP} チャネルを閉口することによりインスリン分泌を促す [59]。また，α-グルコシダーゼ阻害薬は小腸における二糖類の分解を阻害し，糖の吸収を遅らせることにより，食後過血糖を抑制する [60]。チアゾリジンジオン系薬は核内受容体のひとつであるペルオキシソーム増殖剤活性化受容体γ（peroxisome proliferator-activated receptor γ; PPARγ）に作用し，肝臓や骨格筋あるいは脂肪組織といった臓器のインスリン感受性を改善する [61]。また DPP4 阻害薬や GLP-1 受容体作動薬といったインクレチン関連薬は GLP-1 の分解を抑制する，あるいは GLP-1 のはたらきを模倣することにより血糖低下作用を発現する [62]。さらに SGLT2 阻害薬は腎臓における尿糖の再吸収を抑制する [63]。しかしながら，いずれの薬剤も個々に何らかの問題点を抱えていることに加えて，2 型糖尿病自体が進行性の病態であることとも相まって，多剤併用が主流となっている。このように多種多様な薬剤が開発され，かつ有効活用されているにも関わらず，長期間安全に血糖管理を達成することが容易ではない状況があり，さらなる新薬の開発が求められている [64 - 66]。

これまでの検討結果から，JTT-130 はその摂食抑制作用や体重増加抑制作用とは独立した機序を伴って血糖低下作用を示すことが明らかとなった。また，JTT-130 のような機序を基にしてインスリン感受性を増強し，かつ膵β細胞機能を改善するような薬剤に関する研究報告はこれまでにないことから，JTT-130 が既存の血糖降下薬との良好な併用作用を有することが示唆された。そこで本検討では，既に市販されて

いる血糖降下薬の代表例として PPARγ作動薬であるピオグリタゾンと JTT-130 の併用効果を ZDF ラットを用いて検討することにより，小腸 MTP 阻害の血糖コントロールにおける有用性を検討した。

3.2　実験材料及び実験方法

3.2.1　材料

併用薬として使用した Pioglitazone（塩酸塩）については AApin chemical Limited より購入した。JTT-130 及びその他試験内にて使用された試薬については第 1 章 1.2.1 項に記載した。

3.2.2　動物及び飼料

ZDF ラットを日本チャールスリバー株式会社より購入した。動物は第 1 章に記載した環境下にて個別に飼育され，粉末飼料（CRF-1，オリエンタル酵母工業，日本）及び滅菌水をそれぞれ給餌及び給水された。ZDF ラット（雄性，7 週齢）を体重及び血液生化学値に基づき，対照群，JTT-130 群，Pioglitazone 群及び併用群の 4 群に群分けした。JTT-130 群，Pioglitazone 群及び併用群の動物に JTT-130（約 10 mg/kg/day 相当），Pioglitazone（0.3 mg/kg/day 相当）及び両剤を含有する CRF-1 粉末飼料をそれぞれ給餌することにより，42 日間混餌投与した。投与期間中における摂餌量及び体重を週 3 日～4 日に 1 回測定した。週 1 回非絶食下において採血を行い，血液生化学値を測定した。また投与最終日に脂肪組織を摘出し，グルコース酸化能（グルコースからの CO_2 産生能）を評価した。すべての操作は日本たばこ産業動物実験委員会の規定に則って実施された。

3.2.3　血液生化学値の測定

採取した血液を遠心分離することにより得られた血漿を用いて，血糖値，血漿中 TG，TC，FFA 及びインスリン値を測定した。血液生化学値の測定方法については第 1 章 1.2.3 項に記載した。血中グリコヘモグロビン値の測定は，市販のキット（リキテック HbA1c II，Roche Diagnostics，スイス）を用いて，自動分析装置にて測定した。

3.2.4　グルコース酸化能の測定

投与最終日にジエチルエーテル麻酔下において解剖し，精巣上体周囲脂肪組織及び腸間膜脂肪組織を摘出した。それぞれの組織を約 200 mg の組織片に細切し，D-[U-^{14}C]グルコース（GE ヘルスケア，イギリス）を含む培地（Hank's Balanced Salt Solution，Life Technologies，アメリカ）中で，インスリン（100 nmol/L）存在下あるいは非存在下にて 37℃で 2 時間培養した。0.05 mol/L H_2SO_4 を培地に添加することにより反応を停止させ，Hyamine Hydroxide 10-X（PerkinElmer，アメリカ）を染み込ませたろ紙に，産生した $^{14}CO_2$ を吸収させた。ろ紙に 10 mL の液体シンチレーションカクテル

（Clear-sol I，ナカライテスク，日本）を加え，放射活性を液体シンチレーションカウンター（TRI-CARB 2500TR，Packard BioScience，アメリカ）を用いて測定した。

3.2.5　統計解析

測定結果について平均値±（または＋）標準偏差として表記した。群間の有意差検定について，Bartlett 検定により分散性を検討した後，等分散の場合は Tukey の多重比較検定を，不等分散の場合は Steel-dwass の多重比較検定を実施した。統計解析には，SAS System Version 8.2 及び SAS 前臨床パッケージ Version 5.0（SAS Institute Japan）を用いた。有意水準を両側 5%とした。

3.3　結果

3.3.1　累積摂餌量及び体重

投与期間中における累積摂餌量及び体重を Figure 17 に示す。投与 4 日目以降，JTT-130 群及び併用群の摂餌量は対照群に比して有意に低値を示した。ピオグリタゾン群の摂餌量は対照群と変化がなかった。JTT-130 群の体重は投与初期において低値を推移したが，投与 33 日目以降，逆に高値に転じた。また，ピオグリタゾン群及び併用群の体重は，投与 19 日目以降有意に高値を示した。

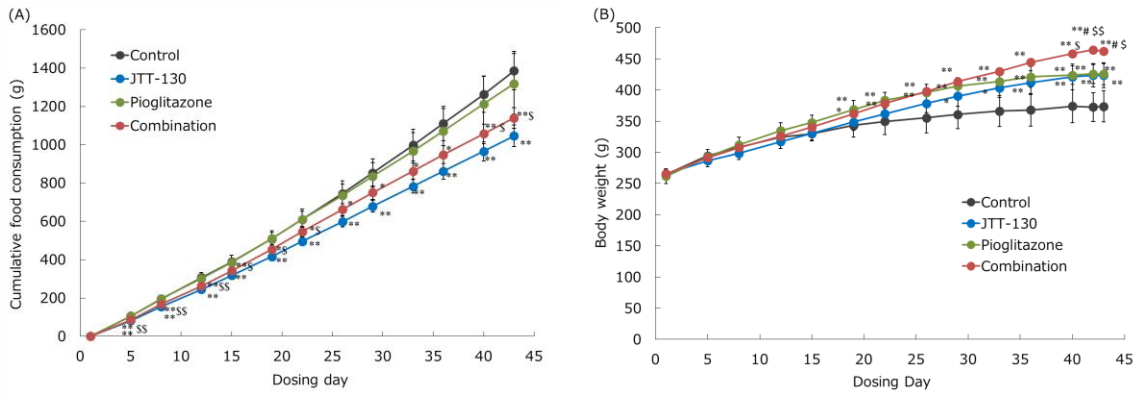

Figure 17 Changes in food intake (a) and body weight (b). Data represent mean values ± s.d. (n = 6). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, significantly different from control group. $^{\#}p < 0.05$, significantly different from JTT-130 treatment group, $^{\$}p < 0.05$, $^{\$\$}p < 0.01$ significantly different from Pioglitazone group (Tukey test).

3.3.2　血糖値，HbA1c 値及び血漿中インスリン値

投与期間中における血糖値，血中グリコヘモグロビン及び血漿中インスリン値の推移を Figure 18 に示す。対照群は，投与初期より経時的な血糖値及び血中グリコヘモグロビン値の上昇が認められ，明らかな糖尿病状態を呈した。投与 7～14 日目以降，JTT-130 群の血糖値及び血中グリコヘモグロビン値は投与期間を通じて対照群に比して概ね有意に低値を示した。またピオグリタゾン群においても血糖値及び血中グリコヘモグロビン値は低値を推移し，投与 7 日目において有意な血糖値の低下を認めた。さらに，併用群の血糖値及び血中グリコヘモグロビン値は投与期間を通じてそれぞれの単独処置群に比して低値を示し，その変化はそれぞれ投与 14 日目及び 28 日目において JTT-130 群と，また投与 21 日目以降においてピオグリタゾン群と比して有意であった。対照群の血漿中インスリン値は投与期間に応じて低下したが，これは膵β細胞の疲弊を反映したものと考えられた。一方，JTT-130 群の血漿中インスリン値は投与 21 日目以降，対照群に比して有意に高値を示した。また，ピオグリタゾン群の血漿中インスリン値は投与 21 日目のみにおいて有意に高値を示した。併用群の血漿中インスリン値は当初対照群と同様に推移したが，その後増加に転じ，投与 21 日目以降有意に増加した。併用群において投与初期に認められたインスリン値の変動（低下）は，同群の血糖値の低下を併せて考えると，インスリン感受性を改善した結果，インスリンの要求量が低下したためと推測された。

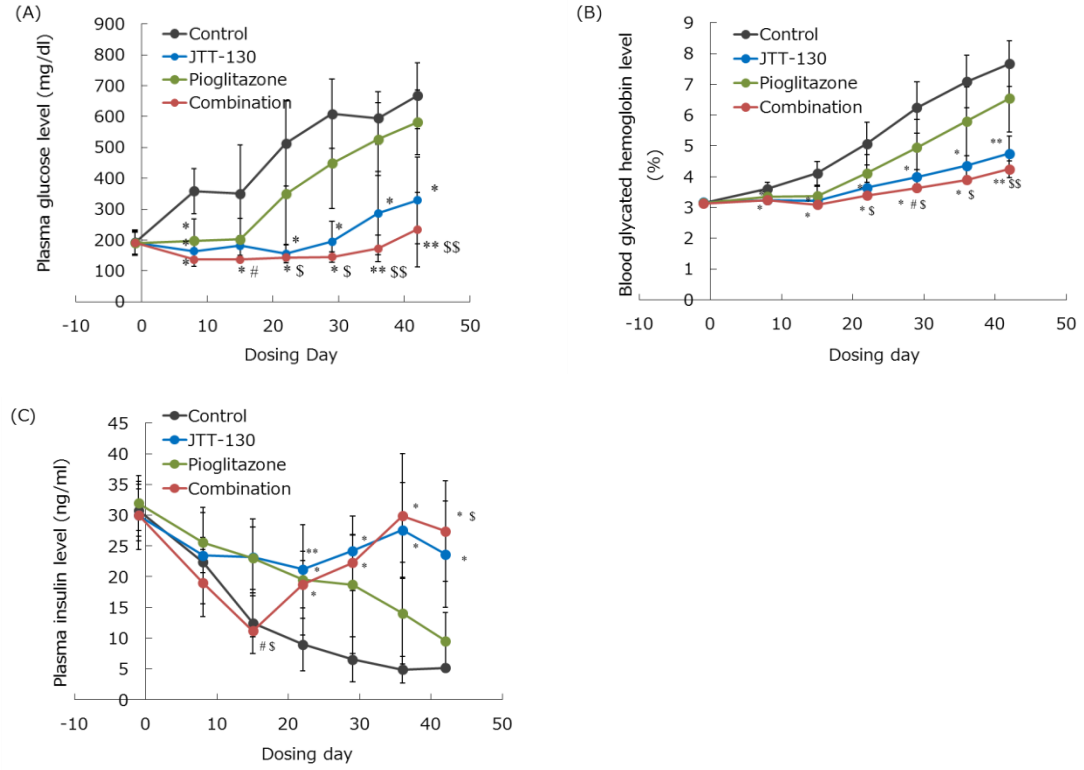

Figure 18 Changes in plasma glucose (A), glycated hemoglobin (B), and insulin (C) levels. Data represent mean values ± s.d. (n = 6). *p < 0.05, **p < 0.01, significantly different from control group. #p < 0.05, significantly different from JTT-130 treatment group. $p < 0.05, $$p < 0.01, significantly different from Piogitazone group (Tukey or Steel-Dwass test).

3.3.3　血漿中脂質代謝パラメータ

投与期間中における血漿中 TG，TC 及び FFA 値の推移を Figure 19 に示す。JTT-130 群の血漿中 TG 値は対照群に比して，投与初期においては低値を推移し，投与 7 日目においてその低下は有意であった。一方，投与後期においては逆に上昇し，投与 35 及び 42 日目において有意な上昇を認めた。ピオグリタゾン群の血漿中 TG 値についても対照群に比して，投与初期に低下傾向を，投与後期に上昇傾向をそれぞれ示したが，その変化は有意ではなかった。併用群の血漿中 TG 値についても同様に対照群に比して，投与初期に投与初期に低下を示し投与 7～21 日目においてその低下は有意であった。とりわけ，投与 14 及び 21 日目においてはピオグリタゾン群と，また 21 及び 28 日目においては JTT-130 群と比べても有意な低下を認めた。一方，投与後期においては対照群に比して上昇し，投与 42 日目において有意な上昇を認めた。

JTT-130 群の血漿中 TC 値は対照群に比して投与期間を通じて低値を推移し，投与 7～21 日目においてその低下は有意であった。ピオグリタゾン群は投与 14 日目に一過的な血漿中 TC 値の低下を認めたが，投与期間を通じて概ね対照群と変化がなかった。併用群の血漿中 TC 値は投与期間を通じて最も低値を推移し，その低下は対照群に比して常に有意であった。とりわけ投与 7～28 日目においてはピオグリタゾン群と比べて有意な低下を示した。

JTT-130 群及びピオグリタゾン群の血漿中 FFA 値は投与期間を通じて対照群と変化がないかやや低下傾向を示した。投与 14 日目における JTT-130 群の血漿中 FFA 値の低下は対照群に比して有意であった。一方，併用群の血漿中 FFA 値は投与期間を通じて最も低値を推移し，その低下は投与 7～28 日目において対照群及びピオグリタゾン群と，投与 7 及び 21 日目において JTT-130 群と，それぞれ比べて有意であった。

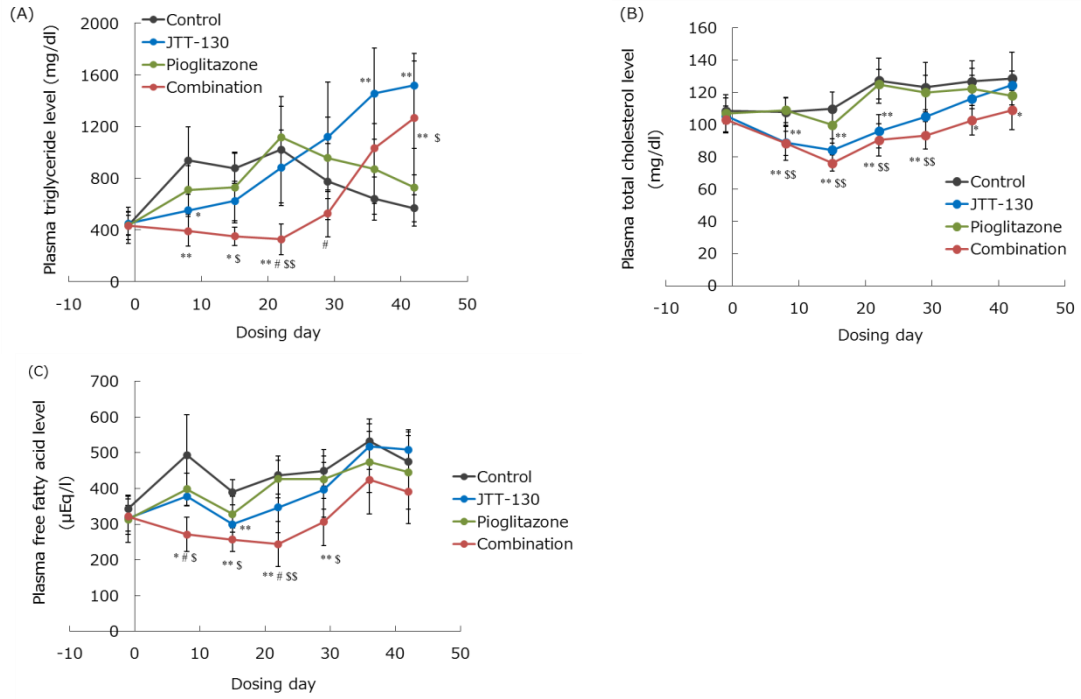

Figure 19 Changes in blood triglyceride (A), total cholesterol (B), and free fatty acid (C) levels. Data represent mean values ± s.d. (n = 6). *p < 0.05, **p < 0.01, significantly different from control group. #p < 0.05, ##p < 0.01, significantly different from JTT-130 treatment group. $p < 0.05, $$p < 0.01, significantly different from Piogitazone group (Tukey or Steel-Dwass test).

3.3.4　脂肪組織におけるグルコース酸化能

血液生化学値を測定した結果，血漿中 FFA 値に両剤の併用効果が認められた。一般に，血漿中 FFA 値は，脂肪組織における TG の分解により分泌された FFA により規定されるとされている。このことから両剤の併用は脂肪組織に対して何らかの作用を有することが推察された。そこで投与最終日に脂肪組織を摘出し，そのグルコース酸化能を検討した。

精巣上体周囲脂肪組織及び腸間膜脂肪組織のグルコース酸化能を Figure 20 に示す。併用群を除くいずれの群においてもインスリンによるグルコース酸化能はほとんど変化がないか，あるいはわずかな上昇が認められた。一方，併用群のグルコース酸化能は対照群に比して有意な上昇を示した。

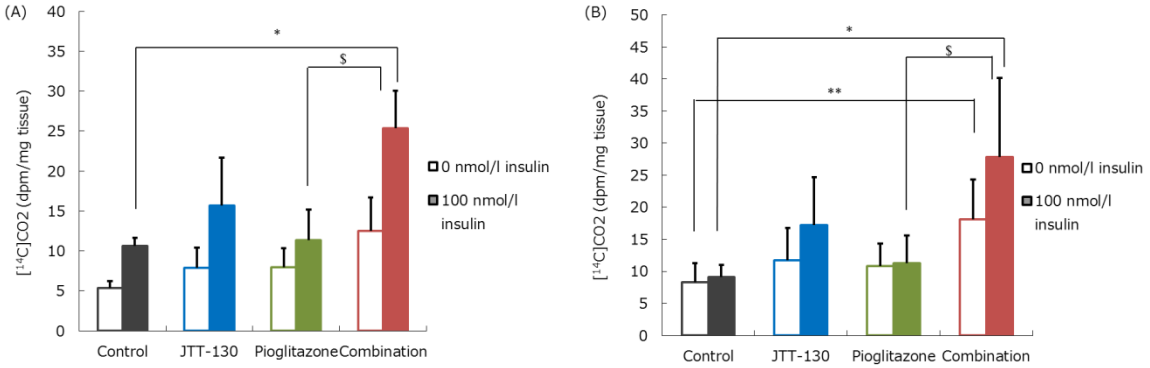

Figure 20 Changes in glucose utilization in the adipose tissues of epididymal fat (A) and mesenteric fat (B). Data represent mean values + s.d. (n = 6). *p < 0.05, **p < 0.01, significantly different from control group. $^{\$}$p < 0.05, significantly different from Pioglitazone group (Tukey or Steel-Dwass test).

3.4　考察

2 型糖尿病は糖代謝に関わる多様な臓器の異常に基づく進行性の疾患であり，そのような背景から多種多様なメカニズムをもつ薬剤が開発され臨床応用されてきた。しかしながら，これらの努力にも関わらず，国立循環器病センターによる糖尿病実態アンケート調査結果によると約半数の患者が糖尿病性合併症の発症を予防するのに必要な血糖管理目標値（HbA1c で 7.0%以下）に到達していないという報告がある[67]。以上のような背景から，新たな作用機序を有し既存の抗糖尿病薬と安全な併用性を有する薬剤の開発は喫緊の課題と言える。

今回併用作用を検討したピオグリタゾンは PPARγの作動薬であり，主に脂肪組織における PPARγに作用し，種々の遺伝子発現を制御することにより脂肪組織の分化を促進し，インスリン感受性を改善するとともに，脂肪組織から分泌されるアディポカインの分泌に影響し，その他の臓器のインスリン感受性を改善する。現在，主に臨床応用されている PPARγ作動薬はピオグリタゾンのみであるが，2 型糖尿病治療において最もよく処方される薬剤のひとつである [68]。そのような背景から，これまでにも数多くの薬剤について PPARγ作動薬との併用作用が検討されてきた。ヒト GLP-1 受容体作動薬であるリラグルチドと TZD 薬である Ragaglitazar は ZDF ラットにおいて[69]，また DPP4 阻害薬である Alogliptin とピオグリタゾンは肥満 2 型糖尿病モデルマウスである ob/ob マウスにおいて [70]，それぞれ併用効果が認められている。

JTT-130 とピオグリタゾンの併用はもっとも良好な血糖コントロールを示した。一方，血漿中インスリン値は両剤の併用により投与初期に低下し対照群と同様に推移したのに対して，投与後期には逆に上昇に転じている。これは対照群においては膵β細胞が障害されることにより血漿中インスリン値が低下した（その結果として高血糖を呈した）のに対して，併用群においては血糖値が明らかに低下していることから，むしろ強力にインスリン感受性が改善したことを反映したものと推察された。

これまでに論じてきた JTT-130 の血糖低下作用機序は既存薬とは異なるものであり，そのような観点からすればピオグリタゾンとの併用効果が認められたのはある意味当然ともいえる。その中で興味深い点を挙げるならば，脂肪組織に対する併用効果が挙げられる。血漿中 FFA 値は飽食・絶食を問わずその多くが脂肪組織における脂肪分解及び分泌により規定されることが報告されている [71]。また脂肪組織における脂肪分解はインスリンにより負に制御されることから，血漿中 FFA 値（の低さ）は脂肪組織のインスリン感受性の程度を示している [72]。本試験では JTT-130 とピオグリタゾンの併用により，それぞれの単剤処置よりも血漿中 FFA 値が低下した。この結果を反映するように摘出脂肪組織の（とりわけインスリン存在下における）グルコース酸化能は併用群において最も亢進していた。これらの結果は，両剤の併用が脂肪組織のインスリ

ン感受性をより強力に改善していたことを示唆している。ピオグリタゾンは脂肪組織における PPARγに作用し，そのインスリン感受性を増強することから，ピオグリタゾン側の寄与があったことに疑問はない。ただし，PPARγ自身は脂肪細胞の分化や肥大に寄与すること [73]，PPARγのヘテロノックアウトマウスでは脂肪組織の肥大が抑制され，高脂肪食負荷時のインスリン抵抗性が減弱していること [74]から，過剰な栄養の流入下におけるPPARγの活性化は，むしろインスリン感受性の改善を制限する可能性が考えられる。また，PPARγ作動薬であるロシグリタゾンに摂餌制限を加えることにより，さらなるインスリン感受性の改善が認められている [75]。このことから，JTT-130 により摂食あるいは小腸における脂肪吸収が抑制された結果，脂肪細胞のインスリン感受性がさらに増強された可能性が考えられた。一方，これまで JTT-130 の脂肪組織に対する作用はあまり検討されてこなかったことから，JTT-130 側の寄与については今後の検討課題と考えられる。

3.5　結語

以上の結果より，ZDF ラットにおいて JTT-130 とピオグリタゾンという異なる作用メカニズムを有するふたつの薬剤の併用は，それぞれの単剤処置に比べてより良好な血糖コントロールを達成することが明らかとなった。また本作用には脂肪組織におけるインスリン感受性の改善が関与していると推察された。このことは小腸選択的な MTP の阻害と PPARγの活性化が 2 型糖尿病治療において有効なアプローチとなることを示唆している。

結論

以上の検討結果を総括する。第 1 章で示した ZDF ラットを用いた検討から，JTT-130 と Pair-fed 処置とを比較することにより，JTT-130 がその摂食抑制作用とは独立した作用機序により血糖低下作用を発現することが明らかとなった。また，第 2 章にて示した高脂肪食負荷肥満ラットを用いた JTT-130 単回投与の検討から，JTT-130 は抗肥満作用とは独立した作用機序により血糖低下作用（耐糖能改善作用）を発現することが明らかとなった。これらの作用の機序として肝臓及び末梢組織におけるインスリン感受性の改善あるいは GLP-1 分泌を伴う糖応答性インスリン分泌の亢進を介していると推察された。また，このインスリン感受性改善作用には肝臓や末梢組織における異所性脂肪の低下が関与している可能性が考えられた。これらの結果は，JTT-130 が単なる抗肥満効果に伴い血糖低下作用を示す薬剤であるというよりも，むしろより直接的に血糖値を低下させるはたらきを有することを示している（Figure 21）。

これまでに MTP 阻害薬については，肝臓における VLDL 分泌抑制作用及び小腸における脂肪吸収抑制作用を介して血中脂質低下作用を有すること [11]，また小腸における脂肪吸収を抑制し，消化管内の FFA が上昇することに伴い抗肥満作用を示すことが報告されてきた [16，17，19]。今回 JTT-130 を用いた検討結果より，MTP 阻害薬は従来知られてきた作用以外にも，肝臓や末梢組織あるいは膵臓といった血糖コントロールに対して主要な役割を果たす臓器に影響を与えることにより，糖代謝改善に寄与することが明らかとなった。

とりわけ興味深い点は，これら JTT-130 の多岐に渡る作用が小腸における脂質吸収抑制という唯一の作用点を起点として発揮されていることである。このように小腸を起点として多種多様な臓器に作用し血糖値を制御する薬剤は存在せず，小腸選択的な MTP の阻害は従来の抗糖尿病薬とは全く異なる作用機序を有する治療アプローチとなる可能性が考えられた。実際，第 3 章において示した JTT-130 とピオグリタゾンの併用効果の検討から，両剤の併用はそれぞれの単剤処置と比べ，さらに良好な血糖コントロールを達成することが明らかとなった。一方，作用機序における類似の手法として，高度肥満者に対する外科手術が挙げられる。Roux-en-Y 胃腸管バイパス法（RYGB）は，世界で最も施行例の多い肥満外科手術であり，胃上部と空腸を直接連結することにより，摂食及び栄養吸収を抑制することを主たる目的としている。RYGB は強い減量効果を有するだけでなく，糖尿病をはじめとする肥満関連の合併症を極めて強力に改善することが知られている [76]。また，RYGB により下部小腸に食後大量の食物が流入し，GLP-1 などインクレチンホルモンの過剰分泌が刺激されることが，その作用機序のひとつとして想定されている [77]。今回

認められた小腸選択的 MTP 阻害の作用や肥満外科手術の成績は，小腸が単に栄養を消化・吸収をするだけでなく，糖代謝を制御するはたらきを担っていることを示している。

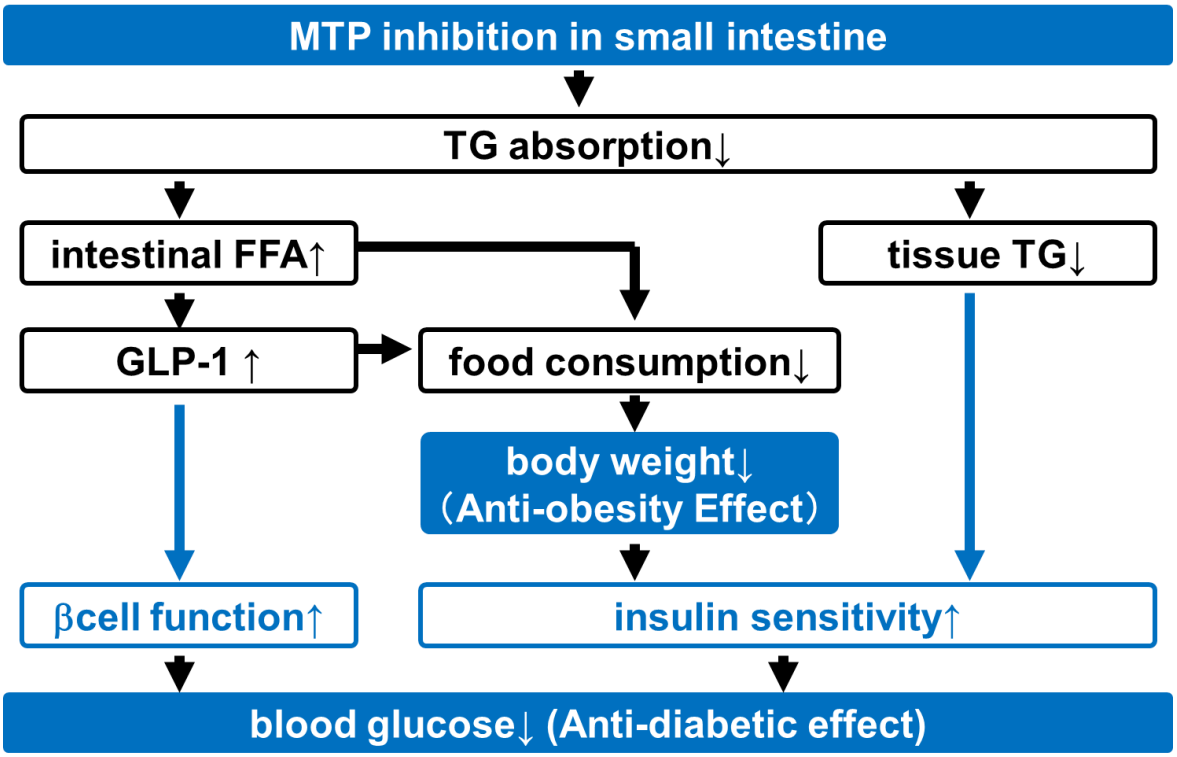

Figure 21 Hypothesis of mechanism of action in anti-diabetic effect of JTT-130.

総括

本研究では，小腸選択的 MTP 阻害薬である JTT-130 を用いて小腸における MTP の阻害が遺伝性あるいは非遺伝性肥満 2 型糖尿病モデル動物の糖代謝に与える影響を検討した。その結果，以下の知見が明らかとなった。

1） MTP 阻害薬は，従来知られている脂質低下作用や抗肥満作用だけでなく，肝臓や末梢組織に作用することによる直接的な血糖低下作用という新しい側面を有する

2） 小腸選択的な MTP の阻害は，従来の血糖降下薬とは異なる機序により血糖値を低下させる

加えて，小腸は栄養を消化・吸収するだけでなく，栄養吸収を介して他の臓器に影響を与えることにより，糖代謝を制御する役割を担うことが示唆された。今後，小腸をターゲットとした薬剤開発が進み小腸のより詳細な役割が明らかになること，代謝性疾患をはじめとする疾患が克服されることを期待する。

主論文

主論文1　Shohei Sakata, Yasuko Mera, Yukiharu Kuroki, Reiko Nashida, Makoto Kakutani, and Takeshi Ohta. Combination Therapy of an Intestine-Specific Inhibitor of Microsomal Triglyceride Transfer Protein and Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ Agonist in Diabetic Rat. Journal of Diabetes Research. 2014 Volume 2014, Article ID 890639, 7 pages

主論文2　Shohei Sakata, Makoto Ito, Yasuko Mera, Tomohiko Sasase, Hiromi Yamamoto, Makoto Kakutani, and Takeshi Ohta. JTT-130, a Novel Intestine-Specific Inhibitor of Microsomal Triglyceride Transfer Protein, Improves Hyperglycemia and Dyslipidemia Independent of Suppression of Food Intake in Diabetic Rats. Journal of Diabetes Research. 2014 Volume 2014, Article ID 803832, 8 pages

主論文3　Shohei Sakata, Sohei Katsumi, Yasuko Mera, Yukiharu Kuroki, Reiko Nashida, Makoto Kakutani, and Takeshi Ohta. Mechanism of action of hypoglycemic effects of an intestine-specific inhibitor of microsomal triglyceride transfer protein (MTP) in obese rats. Journal of Pharmacological Science. 2014. In press.

参考論文

参考論文1 S. Fukuda, T. Ohta, S. Sakata, H. Morinaga, M. Ito, Y. Nakagawa, M. Tanaka & M. Matsushita. Pharmacological profiles of a novel protein tyrosine phosphatase 1B inhibitor, JTT-551. *Diabetes, Obesity & Metabolism*. 12: 299-306. 2010.

参考論文2 Makoto Ito, Sumiaki Fukuda, Shohei Sakata, Hisayo Morinaga, and Takeshi Ohta. Pharmacological Effects of JTT-551, a Novel Protein Tyrosine Phosphatase 1B Inhibitor, in Diet-Induced Obesity Mice. Journal of Diabetes Research. 2014 Volume 2014, Article ID 680348, 7 pages.

参考文献

1 Creutzfeldt W. Effects of the alpha-glucosidase inhibitor acarbose on the development of long-term complications in diabetic animals: pathophysiological and therapeutic implications. Diabetes Metab Res Rev. 1999 Jul-Aug;15(4):289-96.

2 中村二郎 ボグリボース 日本臨床 2005 年 増刊号 耐糖能障害-基礎・臨床研究の最新情報- 457

3 Ballinger A, Peikin SR. Orlistat: its current status as an anti-obesity drug. Eur J Pharmacol. 2002 Apr 12;440(2-3):109-17.

4 Nutescu EA, Shapiro NL. Ezetimibe: a selective cholesterol absorption inhibitor. Pharmacotherapy. 2003 Nov;23(11):1463-74.

5 Demignot S, Beilstein F, Morel E. Triglyceride-rich lipoproteins and cytosolic lipid droplets in enterocytes: key players in intestinal physiology and metabolic disorders. Biochimie. 2014 Jan;96:48-55.

6 Wetterau JR, Lin MC, and Jamil H. Microsomal triglyceride transfer protein. Biochimica et Biophysica Acta. 1997 1345:136–150.

7 Hussain MM, Iqbal J, Anwar K, Rava P, Dai K. Microsomal triglyceride transfer protein: a multifunctional protein. Frontiers in Bioscience. 2003;8:s500-6.

8 Hussain MM, Rava P, Walsh M, Rana M, Iqbal J. Multiple functions of microsomal triglyceride transfer protein. Nutrition & Metabolism. 2012 Feb 21;9:14.

9 Sniderman AD, Tsimikas S, Fazio S. The severe hypercholesterolemia phenotype: clinical diagnosis, management, and emerging therapies. Journal of the American College of Cardiology. 2014 May 20;63(19):1935-47.

10 Wetterau JR, Gregg RE, Harrity TW, Arbeeny C, Cap M, Connolly F, et al. An MTP inhibitor that normalizes atherogenic lipoprotein levels in WHHL rabbits. Science 1998;282(5389):751-4.

11 Chandler CE, Wilder DE, Pettini JL, Savoy YE, Petras SF, Chang G, Vincent J, and Harwood Jr HJ. CP-346086: an MTP inhibitor that lowers plasma cholesterol and triglycerides in experimental animals and in humans Journal of Lipid Research. 2003 Oct;44(10):1887-901.

12 Cuchel M, Rader DJ. Microsomal transfer protein inhibition in humans. Current Opinion in Lipidology 2013 Jun;24(3):246-50.

13 Cuchel M, Meagher EA, du Toit Theron H, Blom DJ, Marais AD, Hegele RA,

Averna MR, Sirtori CR, Shah PK, Gaudet D, Stefanutti C, Vigna GB, Du Plessis AM, Propert KJ, Sasiela WJ, Bloedon LT, Rader DJ. Efficacy and safety of a microsomal triglyceride transfer protein inhibitor in patients with homozygous familial hypercholesterolaemia: a single-arm, open-label, phase 3 study. Lancet. 2013 Jan 5;381(9860):40-6. Circulation. 2014 Mar 4;129(9):1022-32.

14 Rader DJ, Kastelein JJ. Lomitapide and mipomersen: two first-in-class drugs for reducing low-density lipoprotein cholesterol in patients with homozygous familial hypercholesterolemia. Circulation. 2014 Mar 4;129(9):1022-32.

15 Mera Y, Odani N, Kawai T, Hata T, Suzuki M, Hagiwara A, Katsushima T, and Kakutani M. Pharmacological Characterization of Diethyl-2-({3-dimethylcarbamoyl-4-[(4-trifluoromethylbiphenyl-2-carbonyl)amino]phenyl}acetyloxymethyl)-2-phenylmalonate (JTT-130), an Intestine-Specific Inhibitor of Microsomal Triglyceride Transfer Protein. The Journal of Pharmacological Experimental Therapeutics. 2011 Feb;336(2):321-7.

16 Hata T, Mera Y, Ishii Y, Tadaki H, Tomimoto D, Kuroki Y, Kawai T, Ohta T, and Kakutani M. JTT-130, a Novel Intestine-Specific Inhibitor of Microsomal Triglyceride Transfer Protein, Suppresses Food Intake and Gastric Emptying with the Elevation of Plasma Peptide YY and Glucagon-Like Peptide-1 in a Dietary Fat-Dependent Manner. The Journal of Pharmacological Experimental Therapeutics. 2011 Mar;336(3):850-6.

17 Hata T, Mera Y, Tadaki H, Kuroki Y, Kawai T, Ohta T, and Kakutani M. JTT-130, a novel intestine-specific inhibitor of microsomal triglyceride transfer protein, suppresses high fat diet-induced obesity and glucose intolerance in Sprague-Dawley rats. Diabetes, Obesity and Metabolism. 2011 May;13(5): 446-54.

18 Hata T, Mera Y, Kawai T, Ishii Y, Kuroki Y, Kakimoto K, Ohta T, and Kakutani M. JTT-130, a novel intestine-specific inhibitor of microsomal triglyceride transfer protein, ameliorates impaired glucose and lipid metabolism in Zucker diabetic fatty rats. Diabetes, Obesity and Metabolism. 2011 Jul;13(7):629-38.

19 Li J, Bronk BS, Dirlam JP, Blize AE, Bertinato P, Jaynes BH, Hickman A, Miskell C, Pillai UA, Tibbitts JS, Haven ML, Kolosko NL, Barry CJ, Manion TB. In vitro and in vivo profile of 5-[(4'-trifluoromethyl-biphenyl-2-carbonyl)-amino]-1H-indole-2-carboxylic acid benzylmethyl carbamoylamide (dirlotapide), a novel potent MTP inhibitor for obesity. Bioorg Med Chem Lett. 2007 Apr 1;17(7):1996-9.

20 Klonoff DC. Dirlotapide, a U.S. Food and Drug Administration-approved

first-in-class obesity drug for dogs-will humans be next? J Diabetes Sci Technol. 2007 May;1(3):314-6.

21 Vu CB, Milne JC, Carney DP, Song J, Choy W, Lambert PD, Gagne DJ, Hirsch M, Cote A, Davis M, Lainez E, Meade N, Normington K, Jirousek MR, Perni RB. Discovery of benzothiazole derivatives as efficacious and enterocyte-specific MTP inhibitors. Bioorg Med Chem Lett. 2009 Mar 1;19(5):1416-20.

22 Clark JB, Palmer CJ, Shaw WN. The diabetic Zucker fatty rat. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. 1983;173(1):68-75.

23 Tokuyama Y, Sturis J, DePaoli AM, Takeda J, Stoffel M, Tang J, Sun X, Polonsky KS, Bell GI. Evolution of beta-cell dysfunction in the male Zucker diabetic fatty rat. Diabetes 1995;44(12):1447-57.

24 Sparks JD, Phung TL, Bolognino M, Cianci J, Khurana R, Peterson RG, Sowden MP, Corsetti JP, Sparks CE. Lipoprotein alterations in 10- and 20-week-old Zucker diabetic fatty rats: hyperinsulinemic versus insulinopenic hyperglycemia. Metabolism 1998;47(11):1315-24.

25 日本糖尿病学会編，糖尿病治療ガイド 2008-2009

26 下村弘治，前畑英介，川口健，山門実，柴輝男．健診受診者を対象としたインスリン抵抗性指数（Homeostasis model assessment ratio: HOMA-R）の基準値設定の試み．生物試料分析 2003 26(2): 123 -128

27 Unger RH. Lipotoxicity in the pathogenesis of obesity dependent NIDDM: Genetic and clinical implications. Diabetes. 1995 Aug;44(8):863-70.

28 Capeau J. Insulin resistance and steatosis in humans. Diabetes & Metabolism. 2008 Dec;34(6 Pt 2):649-57.

29 Lettner A, and Roden M. Ectopic fat and insulin resistance. Current Diabetes Reports. 2008;8:185-191.

30 Virtue S, and Vidal-Puig A. Adipose tissue expandability, lipotoxicity and the Metabolic Syndrome - an allostatic perspective. Biochimica et Biophysica Acta, 2010 Mar;1801(3):338-49.

31 Drucker DJ. The role of gut hormones in glucose homeostasis. Journal of Clinical Investigation. 2007 Jan;117(1):24-32.

32 Farilla L, Hui H, Bertolotto C, Kang E, Bulotta A, Di Mario U, Perfetti R. Glucagon-like peptide-1 promotes islet cell growth and inhibits apoptosis in Zucker diabetic rats. Endocrinology. 2002 Nov;143(11):4397-408.

33 McFarlane SI. Insulin therapy and type 2 diabetes: management of weight gain. J Clin Hypertens (Greenwich). 2009 Oct;11(10):601-7.

34 Ohneda M, Inman LR, Unger RH. Caloric restriction in obese pre-diabetic rats prevents beta-cell depletion, loss of beta-cell GLUT 2 and glucose incompetence. Diabetologia 1995; 38: 173–179.

35 Larsen PJ, Wulff EM, Gotfredsen CF, Brand CL, Sturis J, Vrang N, Knudsen LB, Lykkegaard K. Combination of the insulin sensitizer, pioglitazone, and the long-acting GLP-1 human analog, liraglutide, exerts potent synergistic glucose-lowering efficacy in severely diabetic ZDF rats. Diabetes, Obesity and Metabolism. 2008 Apr;10(4):301-11.

36 He M, Su H, Gao W, Johansson SM, Liu Q, Wu X, Liao J, Young AA, Bartfai T, Wang MW. Reversal of obesity and insulin resistance by a non-peptidic glucagon-like peptide-1 receptor agonist in diet-induced obese mice. PLoS One. 2010 Dec 3;5(12):e14205.

37 Young AA, Gedulin BR, Bhavsar S, Bodkin N, Jodka C, Hansen B, Denaro M. Glucose-lowering and insulin-sensitizing actions of exendin-4: studies in obese diabetic (ob/ob, db/db) mice, diabetic fatty Zucker rats, and diabetic rhesus monkeys (Macaca mulatta). Diabetes. 1999 May;48(5):1026-34.

38 Gedulin BR, Nikoulina SE, Smith PA, Gedulin G, Nielsen LL, Baron AD, Parkes DG, Young AA. Exenatide (exendin-4) improves insulin sensitivity and {beta}-cell mass in insulin-resistant obese fa/fa Zucker rats independent of glycemia and body weight. Endocrinology. 2005 Apr;146(4):2069-76.

39 Zhang Y, Liu J, Yao 1, Ji G, Qian L, Wang J, Zhang G, Tian J, Nie Y, Zhang YE, Gold MS and Liu Y. Obesity: Pathophysiology and Intervention. Nutrients. 2014 Nov 18;6(11):5153-5183.

40 Obesity and overweight, WHO media centre fact sheet No. 311 http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/

41 Kim GW, Lin JE, Blomain ES, Waldman SA. Antiobesity pharmacotherapy: new drugs and emerging targets. Clinical Pharmacology & Thererapeutics. 2014 Jan;95(1):53-66.

42 Whitehead JP, Richards AA, Hickman IJ, Macdonald GA, Prins JB. Adiponectin--a key adipokine in the metabolic syndrome. Diabetes Obesity and Metabolism. 2006 May;8(3):264-80. Molecular and cellular Endocrinology. 2010 Jan 15;314(1):1-16.

43 Maury E, Brichard SM. Adipokine dysregulation, adipose tissue inflammation and metabolic syndrome. Molecular and Cellular Endocrinology. 2010 Jan 15;314(1):1-16.

44 Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders. Nature. 2006 Dec 14;444(7121):860-7.

45 Shoelson SE, Herrero L, Naaz A. Obesity, inflammation, and insulin resistance. Gastroenterology. 2007 May;132(6):2169-80.

46 Tateya S, Kim F, Tamori Y. Recent advances in obesity-induced inflammation and insulin resistance. Frontiers in Endocrinology. 2013 Aug 8;4:93.

47 Day C, Bailey CJ. Effect of the antiobesity agent sibutramine in obese-diabetic ob/ob mice. International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders. 1998 Jul;22(7):619-23.

48 Finer N, Bloom SR, Frost GS, Banks LM, Griffiths J. Sibutramine is effective for weight loss and diabetic control in obestiy with type 2 diabetes: a randomised, double-blind, placebo-controlled study. Diabetes Obesity and Metabolism. 2000 Apr;2(2):105-12.

49 Lamotte M, Annemans L, Lefever A, Nechelput M, Masure J. A health economic model to assess the long-term effects and cost-effectiveness of orlistat in obese type 2 diabetic patients. Diabetes Care. 2002 Feb;25(2):303-8.

50 Kelley DE, Bray GA, Pi-Sunyer FX, Klein S, Hill J, Miles J, Hollander P. Clinical efficacy of orlistat therapy in overweight and obese patients with insulin-treated type 2 diabetes: A 1-year randomized controlled trial. Diabetes Care. 2002 Jun;25(6):1033-41.

51 Steele R. Influences of glucose loading and of injected insulin on hepatic glucose output. Annals of the New York Academy of Sciences. 1959; 82: 420-430.

52 Utzschneider KM, Prigeon RL, Faulenbach MV, Tong J, Carr DB, Boyko EJ, Leonetti DL, McNeely MJ, Fujimoto WY, Kahn SE. Oral disposition index predicts the development of future diabetes above and beyond fasting and 2-h glucose levels. Diabetes Care. 2009 Feb;32(2):335-41.

53 Lorenzo C, Wagenknecht LE, Rewers MJ, Karter AJ, Bergman RN, Hanley AJ, Haffner SM. Disposition index, glucose effectiveness, and conversion to type 2 diabetes: the Insulin Resistance Atherosclerosis Study (IRAS). Diabetes Care. 2010 Sep;33(9):2098-103.

54 Kim JK, Gimeno RE, Higashimori T, Kim HJ, Choi H, Punreddy S, Mozell RL, Tan G, Stricker-Krongrad A, Hirsch DJ, Fillmore JJ, Liu ZX, Dong J, Cline G, Stahl A, Lodish HF, Shulman GI. Inactivation of fatty acid transport protein 1 prevents fat-induced insulin resistance in skeletal muscle. Journal of Clinical

Investigation. 2004 Mar;113(5):756-63.
55 Szendroedi J, Yoshimura T, Phielix E, Koliaki C, Marcucci M, Zhang D, Jelenik T, Müller J, Herder C, Nowotny P, Shulman GI, Roden M. Role of diacylglycerol activation of PKCθ in lipid-induced muscle insulin resistance in humans. Proceedings of the National Academy of Sciences of USA 2014 Jul 1;111(26):9597-602.
56 Defronzo RA. Banting Lecture. From the triumvirate to the ominous octet: a new paradigm for the treatment of type 2 diabetes mellitus. Diabetes. 2009 Apr;58(4): 773-95.
57 Inzucchi SE, Bergenstal RM, Buse JB, Diamant M, Ferrannini E, Nauck M, Peters AL, Tsapas A, Wender R, and Matthews DR. Management of hyperglycemia in type 2 diabetes: a patient-centered approach: position statement of the American Diabetes Association (ADA) and the European Association for the Study of Diabetes (EASD). Diabetes Care. 2012 Jun;35(6):1364-79.
58 Cusi K, DeFronzo RA. AMP-activated protein kinase: Role in metabolism and therapeutic implications. Diabetes Obesity and Metabolsim. 2006 Nov;8(6):591-602.
59 Proks P, Reimann F, Green N, Gribble F, Ashcroft F. Sulfonylurea stimulation of insulin secretion. Diabetes. 2002 Dec;51 Suppl 3:S368-76.
60 Ishida H. alpha-Glucosidase inhibitor. Nihon Rinsho. 1999 Mar;57(3):669-74.
61 Yki-Järvinen H. Thiazolidinediones New England Journal of Medicine. 2004 Sep 9;351(11):1106-18.
62 Drucker DJ, Nauck MA.The incretin system: glucagon-like peptide-1 receptor agonists and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in type 2 diabetes. Lancet. 2006 Nov 11;368(9548):1696-705.
63 Hasan FM, Alsahli M, Gerich JE. SGLT2 inhibitors in the treatment of type 2 diabetes. Diabetes Research and Clinical Practice. 2014 Jun;104(3):297-322.
64 Nathan DM, Buse JB, Davidson MB, Ferrannini E, Holman RR, Sherwin R, and Zinman B Medicalmanagement of hyperglycaemia in type 2 diabetes mellitus: a consensus algorithm for the initiation and adjustment of therapy : a consensus statement from the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes," Diabetologia. 2009 Jan;52(1):17-30.
65 Bennett WL, Maruthur NM, Singh S, Segal JB, Wilson LM, Chatterjee R, Marinopoulos SS, Puhan MA, Ranasinghe P, Block L, Nicholson WK, Hutfless S, Bass EB, Bolen S. Comparative effectiveness and safety of medications for type

2 diabetes: an update including new drugs and 2-drug combinations. Annual Internal Medicine. 2011 May 3;154(9):602-13.

66 Stein SA, Lamos EM, Davis SN. A review of the efficacy and safety of oral antidiabetic drugs. Expert Opinion in Drug Safety. 2013 Mar;12(2):153-75.

67 国立循環器病センター，2013 年，糖尿病実態アンケート調査結果 http://www.ncvc.go.jp/pr/release/005581.html

68 Oishi M, Yamazaki K, Okuguchi F, Sugimoto H, Kanatsuka A, Kashiwagi A, Japan Diabetes Clinical Data Management Study Group Changes in oral antidiabetic prescriptions and improved glycemic control during the years 2002–2011 in Japan (JDDM32). Journal of Diabetes Investigation. Vol. 5 No. 5 September 2014 581-587

69 Brand CL, Galsgaard ED, Tornehave D. Synergistic effect of the human GLP-1 analogue liraglutide and a dual PPARα/γ agonist on glycaemic control in Zucker diabetic fatty rats. Diabetes, Obesity and Metabolism. 2009 Aug;11(8):795-803.

70 Moritoh Y, Takeuchi K, Asakawa T, Kataoka O, Odaka H. The dipeptidyl peptidase-4 inhibitor alogliptin in combination with pioglitazone improves glycemic control, lipid profiles, and increases pancreatic insulin content in ob/ob mice. European Journal of Pharmacology. 2009 Jan 14;602(2-3):448-54.

71 Donnelly KL, Smith CI, Schwarzenberg SJ, Jessurun J, Boldt MD, Parks EJ. Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. Journal of Clininical Investigatoin. 2005 May;115(5):1343-51.

72 Carmen GY, Víctor SM. Signalling mechanisms regulating lipolysis. Cellular Signalling. 2006 Apr;18(4):401-8.

73 Tamori Y, Masugi J, Nishino N, Kasuga M. Role of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in maintenance of the characteristics of mature 3T3-L1 adipocytes. Diabetes. 2002 Jul;51(7):2045-55.

74 Kubota N, Terauchi Y, Miki H, Tamemoto H, Yamauchi T, Komeda K, Satoh S, Nakano R, Ishii C, Sugiyama T, Eto K, Tsubamoto Y, Okuno A, Murakami K, Sekihara H, Hasegawa G, Naito M, Toyoshima Y, Tanaka S, Shiota K, Kitamura T, Fujita T, Ezaki O, Aizawa S, Kadowaki T, et al. PPAR gamma mediates high-fat diet-induced adipocyte hypertrophy and insulin resistance. Mol Cell. 1999 Oct;4(4):597-609.

75 Pickavance LC, Buckingham RE, Wilding JP. Insulin-sensitizing action of rosiglitazone is enhanced by preventing hyperphagia. Diabetes Obes Metab. 2001 Jun;3(3):171-80.

76 Schauer PR, Kashyap SR, Wolski K, Brethauer SA, Kirwan JP, Pothier CE, Thomas S, Abood B, Nissen SE, Bhatt DL. Bariatric surgery versus intensive medical therapy in obese patients with diabetes. N Engl J Med. 2012 Apr 26;366(17):1567-76.

77 Dirksen C, Jørgensen NB, Bojsen-Møller KN, Jacobsen SH, Hansen DL, Worm D, Holst JJ, Madsbad S. Mechanisms of improved glycaemic control after Roux-en-Y gastric bypass. Diabetologia. 2012 Jul;55(7):1890-901.

謝辞

本稿を終えるにあたり，本論文の作成において懇切なる御指導，御鞭撻を賜り，かつ本研究の発表の機会を賜りまし大阪大学大学院　薬学研究科　細胞生理学分野教授　辻川　和丈博士に謹んで感謝の意を表します。また，本論文を作成するにあたり，議論の進め方，記載のあり方について懇切丁寧なご指導を賜りました大阪大学大学院　薬学研究科　神経薬理学分野教授　橋本　均博士，並びに大阪大学大学院　薬学研究科　臨床薬効解析学分野教授　藤尾　慈博士に謹んで感謝の意を表します。

本研究の機会を与えていただきました日本たばこ産業株式会社　医薬総合研究所　生物研究所副所長　角谷　真博士に深く感謝いたします。本研究を纏めるに際し，数々の御指導をいただきました日本たばこ産業株式会社　医薬総合研究所　生物研究所　太田　毅博士に深く感謝いたします。

本研究を遂行するにあたり，多大な御協力をいただきました，日本たばこ産業株式会社　医薬総合研究所　生物研究所，米良　泰子研究員，黒木　幸治研究員，梨子田　玲子研究員，笹瀬　智彦博士，伊藤　誠研究員，山本　裕美研究員，並びに勝見　壮平研究員に感謝致します。