



Title	消化管と膵臓の内分泌機能に着目した糖尿病および肥満の予防・改善に関する研究
Author(s)	持田, 泰佑
Citation	北海道大学. 博士(農学) 乙第7117号
Issue Date	2021-03-25
DOI	10.14943/doctoral.r7117
Doc URL	<a href="http://hdl.handle.net/2115/81323">http://hdl.handle.net/2115/81323</a>
Type	theses (doctoral)
File Information	Taisuke_Mochida.pdf



[Instructions for use](#)

消化管と膵臓の内分泌機能に着目した  
糖尿病および肥満の予防・改善に関する研究

2021 年

持田 泰佑

本学位論文は、以下の投稿論文の内容を含む。なお、報文内容の転載許可は、各出版社から取得済である。

- 1) Taisuke Mochida, Tohru Hira, Hiroshi Hara: The corn protein, zein hydrolysate, administered into the ileum attenuates hyperglycemia via its dual action on glucagon-like peptide-1 secretion and dipeptidyl peptidase-IV activity in rats. *Endocrinology*, 151(7):3095-3104 (2010). [第 1 章]
- 2) Taisuke Mochida, Kazumi Take, Toshiyuki Maki, Masanori Nakakariya, Ryutaro Adachi, Kenjiro Sato, Tomoyuki Kitazaki, Shiro Takekawa: Inhibition of MGAT2 modulates fat-induced gut peptide release and fat intake in normal mice and ameliorates obesity and diabetes in *ob/ob* mice fed on a high-fat diet. *FEBS Open Bio*, 10(3):316-326 (2020). [第 2 章]
- 3) Taisuke Mochida, Hikaru Ueno, Noriko Tsubooka-Yamazoe, Hideyuki Hiyoshi, Ryo Ito, Hirokazu Matsumoto, Taro Toyoda: Insulin-Deficient Diabetic Condition Upregulates the Insulin-Secreting Capacity of Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Pancreatic Endocrine Progenitor Cells After Implantation in Mice. *Diabetes*, 69(4):634-646 (2020). [第 3 章]

## 目次

### 略語一覧

### 序論

## 第1章 トウモロコシタンパク質加水分解物 ZeinH の、グルカゴン様ペプチド-1 分泌促進作用と血糖上昇抑制作用の検討

### 第1節 緒言

### 第2節 実験材料と方法

1. 使用ペプチド
2. 動物
3. 外科的手術
4. 覚醒ラットを用いたペプチド回腸管腔内投与と耐糖能試験
5. 麻酔下ラットを用いたペプチド回腸管腔内投与と血中ジペプチジルペプチダーゼ-4 (DPP-4)活性測定
6. ZeinH の経口投与と耐糖能試験
7. 統計解析

### 第3節 結果

1. ペプチド回腸投与が血糖値および血中インスリン濃度に与える影響
2. ペプチド回腸投与が血中グルカゴン様ペプチド-1 濃度に与える影響
3. ペプチド回腸投与が血中 DPP-4 活性に与える影響
4. ZeinH の経口投与が血糖値に与える影響

### 第4節 考察

## 第2章 モノアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼ 2 阻害薬の、脂質誘導性消化管ホルモン分泌促進作用、脂質摂取抑制作用および抗糖尿病・抗肥満作用の検討

### 第1節 緒言

### 第2節 実験材料と方法

1. 使用薬物および試薬
2. 動物
3. 経口液体流動食負荷試験
4. Compound B (CpdB)の薬物動態
5. 脂質誘導性の腸管ペプチド分泌に対する作用の評価
6. 食餌選択試験
7. 高脂肪食負荷 ob/ob マウスを用いた反復投与試験
8. 血中指標の測定
9. 統計解析

### 第3節 結果

1. *In vitro* における CpdB のモノアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼ 2 (MGAT2)に対する阻害活性
2. CpdB の脂質誘導性高トリアシルグリセロール血症に対する抑制作用
3. CpdB の脂質誘導性腸管ペプチド分泌に対する促進作用
4. CpdB の高脂肪食摂取に対する抑制作用
5. 高脂肪食負荷 ob/ob マウスにおける CpdB の抗糖尿病および抗肥満作用

### 第4節 考察

### 第3章 インスリン欠乏糖尿病病態におけるヒト人工多能性幹細胞由来膵内分泌前駆細胞の移植後のインスリン分泌能力の検討

#### 第1節 緒言

#### 第2節 実験材料と方法

1. ヒト人工多能性幹細胞 (iPSC)の *in vitro* 分化誘導
2. 動物
3. 移植および移植片の *in vivo* 評価
4. インスリン持続投与
5. 高脂肪食負荷
6. ダパグリフロジンの反復投与
7. 蛍光免疫染色
8. 血中指標の測定
9. ホルモン含量の測定
10. 統計解析

#### 第3節 結果

1. *In vitro* 分化誘導により作製したヒト iPSC 由来膵内分泌前駆細胞 (EPCs)のプロファイル
2. 糖尿病ホストにおける EPCs の移植後インスリン分泌能力
3. 血中インスリンが EPCs 移植片のインスリン分泌能力に与える影響
4. 糖尿病ホスト由来の摘出 EPCs 移植片の解析
5. EPCs のインスリン産生細胞への *in vitro* 分化誘導におけるインスリン作用低下の影響

#### 第4節 考察

総括

謝辞

引用文献

## 略語一覧

ACAT1	acetyl-Coenzyme A acetyltransferase 1	アセチル CoA アセチルトランス フェラーゼ 1
ANOVA	analysis of variance	分散分析
AUC	area under the curve	濃度曲線下面積
CD	control diet	通常食
CHGA	chromogranin A	クロモグラニン A
CM/TG	chylomicron/ triacylglycerol	カイロミクロン/トリアシル グリセロール
CpdB	compound B	化合物 B
DGAT1	diacylglycerol <i>O</i> - acyltransferase 1	ジアシルグリセロールアシル トランスフェラーゼ 1
DPP-4	dipeptidyl peptidase-4	ジペプチジルペプチダーゼ-4
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid	エチレンジアミン四酢酸
EGF	epidermal growth factor	上皮成長因子
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay	酵素結合免疫吸着測定法
EPC	endocrine progenitor cells	内分泌前駆細胞
ESC	embryonic stem cell	胚性幹細胞
FCM	flow cytometry	フローサイトメトリー
GCG	glucagon	グルカゴン
GIP	glucose-dependent insulinotropic polypeptide	グルコース依存性インスリン分泌 刺激ポリペプチド
GLP-1	glucagon-like peptide-1	グルカゴン様ペプチド-1
Gly-Pro- <i>p</i> NA	Gly-Pro <i>p</i> -nitroanilide	グリシン-プロリン- <i>p</i> -ニトロ アニリド
GPR119	G protein-coupled receptor 119	G タンパク質共役受容体 119
HFD	high-fat diet	高脂肪食
INS	insulin	インスリン
IPGTT	intraperitoneal glucose tolerance test	腹腔内グルコース負荷試験
iPSC	induced pluripotent stem cell	多能性幹細胞
KGF	keratinocyte growth factor	ケラチン細胞成長因子
LPL	lipoprotein lipase	リポタンパク質リパーゼ
MG	monoacylglycerol	モノシルグリセロール



MGAT2	monoacylglycerol acyltransferase 2	O-	モノアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼ 2
MHY	meat protein hydrolysate		肉タンパク質加水分解物
MTT	meal tolerance test		食事負荷試験
OEA	oleoylethanolamine		オレオイルエタノールアミン
P/S	penicillin/streptomycin		ペニシリン/ストレプトマイシン
PEC	pancreatic endoderm cell		膵内胚葉細胞
PYY	peptide tyrosine-tyrosine		ペプチド チロシン-チロシン
RYGB	Roux-en-Y gastric bypass		ルーワイ胃バイパス
SGLT2	sodium-glucose cotransporter-2		ナトリウム/グルコース共輸送体 2
STZ	streptozotocin		ストレプトゾトシン
TG	triacylglycerol		トリアシルグリセロール
TGR5	takeda-G-protein-receptor-5		武田 G タンパク質共役受容体 5
WT	wild type		野生型
ZeinH	Zein hydrolysate		ゼイン加水分解物

#### List of tables

- Table 1-1. Free and total amino acid composition of ZeinH and MHY.
- Table 2-1. *In vitro* inhibitory activities of CpdB for MGAT2 and related acyltransferases.
- Table 2-2. Levels of GHb and plasma biochemical parameters in HFD-fed *ob/ob* mice treated with the compounds.
- Table 3-1. Additional information on EPCs generated in vitro from hiPSCs.
- Table 3-2. The information on antibodies used in this study.

#### List of figures

- Figure 1-1. Plasma glucose and insulin levels during IPGTT in conscious rats after the ileal administration of water, MHY or ZeinH.
- Figure 1-2. Plasma glucose, total GLP-1 and active GLP-1 levels during IPGTT in conscious rats after ileal administration of water, MHY or ZeinH.
- Figure 1-3. Changes in plasma DPP-4 activity in the ileal vein in anesthetized rats after ileal administration of water, MHY or ZeinH.
- Figure 1-4. Plasma glucose level after the oral administration of ZeinH during IPGTT in conscious rats.
- Figure 2-1. Chemical structure of CpdB, and previously reported CpdA.
- Figure 2-2. The effect of CpdB on hypertriglyceridemia during an oral meal tolerance

test in mice.

- Figure 2-3. Pharmacokinetics of CpdB in mice.
- Figure 2-4. The effect of CpdB on plasma gut peptide levels in meal- or oil-loaded C57BL/6J mice.
- Figure 2-5. The effect of CpdB on fat intake in a two-diet-choice test using C57BL/6J mice.
- Figure 2-6. The effect of CpdB on diabetes and obesity in HFD-fed *ob/ob* mice.
- Figure 3-1. *In vitro* generated EPC aggregates for implantation contain high proportion of CHGA<sup>+</sup>NKX6.1<sup>+</sup> cells while very few INS<sup>+</sup> or GCG<sup>+</sup> cells.
- Figure 3-2. Immunostaining of the cell population in EPC aggregates.
- Figure 3-3. EPCs are differentiated from human iPSCs by *in vitro* directed differentiation.
- Figure 3-4. Insulin-deficient diabetic environment in host upregulates insulin secreting capacity of the grafts derived from EPCs.
- Figure 3-5. The upregulated insulin secreting capacity of grafts in diabetic environment is reproduced when EPCs are derived from another hiPSC line or are implanted in genetically induced Akita model.
- Figure 3-6. Endogenous insulin is severely defected in diabetic mouse model used for implantation studies.
- Figure 3-7. Both exogenous insulin supplementation and hyperinsulinemia induced by a HFD feeding suppress the insulin secreting capacity of EPC-grafts.
- Figure 3-8. Partial attenuation of hyperglycemia by dapagliflozin has no effect on the insulin secreting capacity of EPC-grafts.
- Figure 3-9. Diabetic environment in host affects EPC-grafts to increase endocrine cells including insulin producing cells without affecting graft mass.
- Figure 3-10. Supplementary information referred to Figure 3-9.
- Figure 3-11. Lowering insulin action directly promotes the differentiation of EPCs into INS<sup>+</sup>NKX6.1<sup>+</sup> cells *in vitro*.

## 序論

### 食事と肥満

食事は、人間の健康維持にとって必要不可欠である。肥満は体内に過剰量の脂肪が蓄積して体重が増加した状態と定義され、近年、栄養過多や運動不足といった食生活・ライフスタイルの変化により肥満者は世界規模で増加している。米国では10年後には国民の50%以上が肥満者と判定される恐れがある (Ward 2019)。肥満における体脂肪の蓄積は、エネルギー摂取量がエネルギー消費量を上回ることによって引き起こされる。食事中の脂質はカロリーベースで40%程度を占め、肥満率が高い欧米人は推奨量の約4倍の脂質を日常的に摂取するとされる (Shi 2009, Laugerette 2005)。

### 肥満と糖尿病

肥満は2型糖尿病発症の危険因子であり、重度になると脂質代謝異常や高血圧などと並んで心血管疾患発症の発症リスクを高めることから、危険な疾患との認識が広がっており、肥満の予防と治療の重要性は高い。糖尿病は、インスリンの作用不足による高血糖が持続することで臓器障害を引き起こす代謝性疾患であり、1型と2型がある。2型糖尿病は、肥満などの環境的要因や遺伝的要因によりインスリンの分泌不全およびインスリン抵抗性を示す疾患であり、1型糖尿病はインスリンを産生・分泌する膵β細胞が破壊される自己免疫疾患である。2019年において、世界では成人の11人に1人の割合で糖尿病を罹患しており、有効な対策を施さないと少なくとも2045年まで患者数は増加し続けると予測されている (国際糖尿病連合 2019)。糖尿病は、3大合併症である「糖尿病性網膜症」「糖尿病性腎症」「糖尿病性神経障害」が問題になる他、心筋梗塞や脳梗塞などの大血管障害を引き起こす。糖尿病患者では、新型コロナウイルス感染症が重症化するリスクが高いこと (CDC 2020)、重症化を防ぐためには良好な血糖コントロールを保つことが重要であることも報告されている (Zhu 2020)。食後高血糖は、糖尿病だけでなく糖尿病予備群においても重要な指標の一つとして認識されており、心血管系疾患等の合併症による死亡リスクを上昇させる (Nakagami 2004, Tominaga 1999)。空腹時血糖値が正常値と異常値 (糖尿病と判断される値)の間を示す耐糖能異常の状態では、動脈硬化が促進し、脳卒中などの大血管障害を起こすリスクが高くなるため、空腹時血糖値のみではなく食後高血糖もあわせて管理することが重要である。

## 抗肥満薬と抗糖尿病薬

抗肥満薬の開発は、強い薬効に加えて高い安全性が求められるため難航してきた (Rodgers 2012)。2012 年に米国でロルカセリンとキシミアが承認されたが、これらは中枢性食欲抑制薬であり、中枢へ直接作用するために副作用に対する懸念が大きい。中枢への直接作用を必要としない末梢性抗肥満薬としては、食事性脂質の吸収を抑制する薬剤の開発が進められてきた。臍リパーゼ阻害薬であるオルリスタットが一例であるが、脂肪便などの消化管に対する副作用があり (Padwal 2007)、薬効・安全性ともに十分とは言い難いため、より効果的で安全な末梢性抗肥満薬の開発が期待されている。抗糖尿病薬としては、良好な血糖コントロールを実現するために、臍β細胞のスルホニル尿素受容体に結合することでインスリン分泌を促す SU 薬、肝臓における糖新生を抑制するビッグアナイド薬、インスリン抵抗性を改善するチアゾリジン薬等のメカニズムの異なる血糖降下薬が臨床で使用されている。しかしながら、利便性・安全性・有効性を兼ね備えた新規薬剤に対する期待は依然として大きい。

## 消化管由来のシグナル

生体内のエネルギーバランスの調節には、古くから中枢への化学的、直接的な情報入力による機構が唱えられてきたが (Blouet 2010)、近年は末梢組織からのシグナルを介して中枢へ間接的に情報伝達する機構の存在が明らかにされてきた。その一つが消化管における栄養素の感知であり、管腔内に流入してきた食事由来の分子を感知することは消化管の機能の一つとして認識されている。具体的には、上皮に存在する消化管内分泌細胞が、管腔内の脂質 (脂肪酸)、炭水化物 (グルコース)、タンパク質の消化産物であるペプチドやアミノ酸を直接感知して種々の消化管ホルモンを分泌することにより、摂食や食後代謝が調節される (Janssen 2013)。グルカゴン様ペプチド-1 (GLP-1) やペプチド チロシン-チロシン (PYY) は、小腸下部や結腸に多く存在する L 細胞で産生・分泌される消化管ホルモンである。GLP-1 は血糖依存的な臍β細胞からのインスリン分泌促進作用、すなわちインクレチン作用が最も知られている (Drucker 2007)。GLP-1 や PYY は摂食抑制作用を示し、食欲の調節に寄与している (Neary 2005)。このように、消化管は、摂取した食物を消化・吸収する役割のみならず、内分泌器官としての役割も有しており、全身のエネルギー恒常性の維持に貢献している。

## 膵臓

膵臓は、消化酵素を含む膵液を小腸に送り出す外分泌器官の他に、糖代謝を

調節するホルモンを産生・分泌する内分泌器官を有する臓器である。膵臓の内分泌機能は、腺房の間に島状に存在する膵島が担う。膵島は、主にインスリンを分泌する $\beta$ 細胞、グルカゴンを分泌する $\alpha$ 細胞、ソマトスタチンを分泌する $\delta$ 細胞から構成され、血糖値の厳密なコントロールを可能にしている。1型糖尿病患者では、膵 $\beta$ 細胞が破壊されているために現状の治療法ではインスリンを補充するしかない。優れたインスリン製剤が実用化されているものの、外因性インスリンから解放されることは無いため管理負担は重く、また、インスリン投与の厳格化は重症低血糖を引き起こすリスクと表裏一体である。特に重症度の高い1型糖尿病は、膵島移植の適応となる。膵島移植は、移植した膵島が十分に生着・機能すれば頻回のインスリン注射や血糖モニタリングから解放されることから (Anazawa 2018)、1型糖尿病の根治療法として確立されている。しかしながら、ドナーの確保が十分ではなく、また、提供される膵島の質も安定していないため、移植の恩恵を受ける患者は限定されている。

## 本研究の目的

近年、疾患の予防・治療のためのアプローチは益々多様化している。具体的には、食事療法や運動療法に加え、機能性食品、低分子合成化合物、タンパク製剤、抗体医薬品、ペプチド (中分子)製剤、核酸医薬、遺伝子治療、細胞移植治療等がある。本研究では、食品ペプチドとしてトウモロコシタンパク質加水分解物 ZeinH (第1章)、低分子化合物としてモノアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼ 2 (MGAT2)阻害薬 (第2章)、移植用細胞としてヒト induced pluripotent stem cell (iPSC)由来膵内分泌前駆細胞 (第3章)を用いて、消化管や膵臓の内分泌機能に与える影響並びに血糖コントロールや肥満に対する作用を評価した。本研究は、糖尿病や肥満の予防または治療の観点から新たな提案をし、本研究分野の更なる発展に貢献することを目的とした。

## 第1章

### トウモロコシタンパク質加水分解物ZeinHのグルカゴン様ペプチド-1

### 分泌促進作用と血糖上昇抑制作用の検討

#### 第1節 緒言

グルカゴン様ペプチド-1 (GLP-1)は、栄養素摂取に応じて分泌される消化管ホルモンの一種である。GLP-1は、血糖依存的に膵β細胞からのインスリン分泌を刺激する (Drucker 2007)。GLP-1やグルコース依存性インスリン分泌刺激ポリペプチド (GIP)のような腸管由来の因子によるインスリン分泌の増強は、インクレチン作用と呼ばれる (Baggio 2007)。GLP-1はまた、ラットやヒトにおいて、胃排出遅延および摂食抑制作用を示す (Baggio 2007, Holst 2007)。活性型GLP-1のジペプチジルペプチダーゼ-4 (DPP-4)による分解を阻害するDPP-4阻害薬や、GLP-1アナログ (GLP-1受容体作動薬)は、抗2型糖尿病薬として臨床応用されており、食後高血糖のコントロールに有効である (Drucker 2006, Gentilella 2009)。

GLP-1は消化管内分泌L細胞で産生され、L細胞は下部消化管 (回腸、盲腸、結腸)に多く分布している (Eissele 1992)。腸管膜静脈および門脈血中への放出後、活性型のGLP-1は、血漿中のDPP-4により速やかに分解すなわち不活性化される (Hansen 1999)。GLP-1は肝床を通過する間や、末梢組織においてもDPP-4により不活性化される (Deacon 1996)。その短い半減期にも関わらず、インクレチン作用は、糖摂取後のインスリン分泌の50%以上に寄与していると推測されている (Tseng 1999)。加えて、GLP-1受容体遺伝子欠損マウスは、絶食時血糖の上昇と耐糖能異常を示す (Baggio 2007)。それゆえ、管腔内の栄養素により惹起されるGLP-1分泌は、食後の糖恒常性の維持にとって重要であると考えられる。

耐糖能改善のためにL細胞で産生される内因性のGLP-1を利用することが可能かどうか注目されてきた (Tolhurst 2009)。例えば、*Coptidis rhizome*由来イソキノリンアルカロイドであるベルベリン (Lu 2009)、武田Gタンパク質共役受容体5 (TGR5)アゴニスト (Thomas 2009)およびGタンパク質共役受容体119 (GPR119)アゴニスト (Chu 2008)について、GLP-1分泌の増強を伴って耐糖能を改善するという有効性が示されている。それゆえ、強力な消化管腔内のGLP-1分泌刺激物質は、健常人または耐糖能異常の患者において、より良好な血糖コントロールに有効な可能性があり、興味を持たれる。

糖と脂肪酸は強力なGLP-1分泌の刺激物質としてよく知られているが (Anini 1999, Elliott 1993)、食品ペプチドもまた、ラット (Dumoulin 1998)や消化管内分

泌細胞株 (Cordier-Bussat 1998)においてGLP-1分泌を刺激し、そしてヒトにおいてwheyタンパク質の食前摂取はGLP-1分泌を増強することが報告されている (Hall 2003)。著者らは以前に、トウモロコシに含まれるタンパク質Zeinの加水分解物 (ZeinH)が、GLP-1産生内分泌細胞株およびラット小腸においてGLP-1分泌を強く刺激することを見出した (Hira 2009)。十二指腸においてZeinHは、回腸L細胞からのGLP-1分泌を、迷走神経を介して間接的に刺激した。一方で、回腸においてZeinHは、脂肪酸によるGLP-1分泌 (Brubaker 2003)と同様に、回腸L細胞に直接作用してGLP-1分泌を誘発した。

本研究の目的は、強力なGLP-1分泌誘導ペプチドであるZeinHが、GLP-1分泌の刺激を伴って血糖に影響を与えるかどうかを検討することである。覚醒ラットを用いて腹腔内グルコース負荷試験 (IPGTT)を実施し、回腸に投与したZeinHが、血漿中グルコース、インスリンおよびGLP-1濃度に与える影響を調べた。また、麻酔下のラットにおいて、回腸結紮ループ内にZeinHを投与した後に回腸静脈血における血漿中DPP-4活性も測定した。GLP-1の生理作用を考慮すると、消化管腔内の食品ペプチドによる内因性GLP-1の分泌調節は、肥満や糖尿病の予防や治療において有効なストラテジーになり得る。

## 第2節 実験材料と方法

### 1. 使用ペプチド

ZeinHを既報の方法で調製した (Hira 2009)。まず、Zein (東京化成工業株式会社、東京都) 50 gを純水 500 mlに懸濁し、pHを7.0に調整した。懸濁液にpapain (250 mg, Papain F; アサヒフードアンドヘルスケア株式会社、東京都)を添加し、55°Cで60分間よく振蕩した。その後、沸騰水に20分間浸して酵素反応を停止した。遠心分離および吸引濾過 (0.2- $\mu$ m細孔径)後、濾液を凍結乾燥して得た粉末をZeinHとした。肉タンパク質加水分解物 (MHY)は、Sigma (St. Louis, MO)より購入した。ローリー法による定量では、ZeinHは65.6%、MHYは80.0%ペプチドを含み、それらの平均分子量は、ZeinHで1,600 Da、MHYで1,200 Da以下である (Hira 2009, Cuber 1990)。既報の方法 (Cohen 1986)で測定したZeinHとMHYの遊離および総アミノ酸組成をTable 1-1に示す。

**Table 1-1. Free and total amino acid composition of ZeinH and MHY.**

	Free (mg/g)		Total (mg/g)	
	ZeinH	MHY	ZeinH	MHY
Ala	2.9	6.8	55.5	92.4
Arg	-	28.9	11.8	103.4
Asp*	-	3.1	62.9	86.7
Glu**	-	9.6	217.1	143.0
Gly	-	5.9	16.2	258.2
His	-	-	5.0	6.9
Ile	10.7	12.1	30.8	26.3
Leu	8.3	14.1	141.1	46.4
Lys	-	7.5	-	47.4
Met	-	-	8.6	-
Phe	-	9.1	47.5	25.9
Pro	3.6	-	70.3	139.6
Ser	-	5.1	42.9	40.8
Thr	-	4.9	20.9	24.1
Tyr	-	-	37.3	6.1
Val	-	6.3	26.8	33.9

Cys and Trp were not detected.

-: not detected, \*: includes Asn, \*\*: includes Gln



## 2. 動物

7週齢の雄性Sprague-Dawleyラットを、日本エスエルシー株式会社 (静岡県) より購入した。動物は、AIN93G (Reeves 1993)に準拠した25%カゼイン食を用い、自由給餌と自由飲水条件下で単飼育した。12時間毎の明暗周期 (明期8:00-20:00)、室温 $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ の飼育室にて飼育し、3から7日間の馴化期間の後に実験に使用した。動物の取り扱いおよび実験は、北海道大学動物実験委員会の定める基準に準じて実施した (承認番号08-0138)。

## 3. 外科的手術 (頸静脈カニューレーション)

一夜絶食後、ペントバルビタール (40 mg/kg; Nembutal Injection; 大日本住友製薬株式会社、大阪府)の腹腔内投与による麻酔下において、以下の外科的手術を行った。頸部を剃毛後、右側頸静脈を目視で確認し、近傍の皮膚を切開した。筋層を剥離して右の内頸静脈を露出し、シリコンカテーテル (Silascon No. 00; I.D. 0.5 mm, O.D. 1.0 mm; ダウコーニング株式会社、神奈川県)を挿入し、縫合糸で緩く結紮して固定した。カテーテルは50 IU/ml ヘパリン (味の素株式会社、東京都)を含む生理食塩水で充填した。続いて、腹部 (剃毛済み)の正中線に沿って切開 (開腹)し、トライツ靭帯の位置を確認した。2-3 mmのポリエチレンチューブ (Hibiki Fr No. 4; 株式会社クニイ、東京都)の小片を先端に入れ込んだシリコンカテーテル (Silascon No.00; I.D. 0.5 mm, O.D. 1.0 mm; ダウコーニング株式会社)を、トライツ靭帯より下部45 cmの上部回腸に挿入し、縫合糸で結紮してカテーテルを固定した。覚醒下・非拘束下の試験ができるように、2本のカテーテルの自由端を背部皮下から体外に出して固定した。腹筋は縫合糸により縫合し、皮膚 (腹部、頸部)はミッヘル縫合針により縫合した。ラットは、3もしくは4日間の回復期間の後、各実験に使用した。回腸と頸静脈に挿入したカテーテルは、詰まらないようにそれぞれ生理食塩水とヘパリン含有生理食塩水を毎日通した。小腸内容物の流れは、回腸カテーテルの径が回腸よりも小さいため、障害を受けることはない想定した。これについて、摂食や排泄行動に術前後で変化が見られず、また、実験終了時の安楽死処分直前に麻酔下において小腸内容物の流れを観察することで確認した。

## 4. 覚醒ラットを用いたペプチド回腸管腔内投与と耐糖能試験

実験1: 耐糖能試験では、消化管腔内のペプチドによるGLP-1分泌を介した血糖調節作用を評価するために、グルコースを腹腔内投与した。ペプチド (MHYとZeinH)と水 (control)は、GLP-1分泌に対する直接的な影響を評価するために、回腸管腔にカテーテルを通して投与した。MHYは、*in vitro* (Cordier-Bussat 1998, Reimer 2006)および*in situ* (Dumoulin 1998)の実験系においてGLP-1分泌活性が報告されている食品ペプチドとして選択した。Basal (-30 min)の血液サンプル

を頸静脈カテーテルから200 kIU/ml アプロチニン (和光純薬工業株式会社、大阪府)および50 IU/ml ヘパリンを含んだシリンジに採取した。採取直後に毎回カテーテル内を50 IU/ml ヘパリンを含んだ生理食塩水で満たした。Basal採血の直後、純水 (2 ml)あるいはペプチド溶液 (500 mg MHYまたは500 mg ZeinHを2 ml 純水に溶解)を回腸カテーテルから回腸管腔に投与した。回腸投与30分後の0 minで採血し、その後、グルコースを1 g/kgにて腹腔内投与した。血液サンプルは、グルコース投与15、30および60分後に採取した。遠心分離 (2,500 x g, 15 min, 4°C)により血漿を回収し、各種血中指標の測定まで-80°Cにて凍結保管した。血漿中グルコース濃度はGlucose CII-testキット (和光純薬工業株式会社)、インスリン濃度はenzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)キット (AKRIN-010T; 株式会社シバヤギ、群馬県)を用いて測定した。

実験2: 回腸に投与したペプチドがGLP-1分泌に与える影響について、グルコース、totalおよびactive GLP-1を測定するための十分な血漿量を用意するために、実験1とは別日に同実験を実施した。活性型 (7-37)と不活性型 (9-37)の両方を含むtotal GLP-1濃度の変化は、インクレチンとしての活性ではなく、GLP-1の分泌を反映していると考えられるため、同一の血漿サンプルにてactive GLP-1濃度も測定した。実験1と同様に覚醒ラットにおいてIPGTTを実施した。Total GLP-1測定用の血液サンプルは、200 kIU/ml アプロチニンおよび50 IU/ml ヘパリンを含んだシリンジに回収した。活性型GLP-1測定用の血液サンプルは、EDTA (1 mg/ml; 同仁化学研究所、熊本県)、200 kIU/ml アプロチニンおよび50 μM DPP-4阻害剤 (catalog no. DPP4-010; Linco Research, St. Charles, MO)を含んだシリンジに回収した。血漿中のtotal GLP-1濃度[GLP-1 (7-36) + GLP-1 (9-36)]はELISAキット (株式会社矢内原研究所、静岡県)を、active GLP-1濃度はELISAキット (Linco Research)を用いて測定した。

#### 5. 麻酔下ラットを用いたペプチド回腸管腔内投与と回腸静脈血中DPP-4活性測定

回腸へのZeinHおよびMHYの投与が血中DPP-4活性に与える影響を調べるため、麻酔下ラットにおいて、水もしくは各ペプチド溶液を回腸結紮ループ内に投与後に、回腸静脈に留置したカテーテルから血液を採取した。一夜絶食後、ケタミン (80 mg/kg; Ketalar; 第一三共株式会社、東京都)およびキシラジン (12 mg/kg; MP Biomedicals, Irvine, CA)の腹腔内投与によりラットを麻酔し、中腹部を切開した。斜めにカットした6-7 mmのポリエチレンカテーテル (SP 10; ID 0.28 mm, OD 0.61 mm; 株式会社夏目製作所、東京都)の薄片を先端に入れ込んだシリコンカテーテル (Silascon no. 00; ID 0.5 mm, OD 1.0 mm; ダウコーニング株式会社)を、回腸間膜組織の回腸静脈に挿入した。回腸管腔を生理食塩水で洗浄した。回腸結紮ループは、盲腸上部5 cmから35 cmに作製し、ループの上部と下部

は縫合糸で結紮した。回腸静脈カテーテルからbasal (-30 min)の血液サンプルを採取し、各採血間でカテーテルは50 IU/ml ヘパリンを含んだ生理食塩水で満たした。純水 (2 ml)あるいはペプチド溶液 (500 mg MHYまたは500 mg ZeinHを2 ml純水に溶解)を回腸結紮ループ内に投与した。投与30分後 (0 min)に採血し、実験1および2と条件を揃えるために腹腔内にグルコース (1 g/kg)を投与した。グルコース投与15、30および60分後に回腸カテーテルから採血した。試験中、ラットには麻酔状態を維持するためにケタミン/キシラジンを追加投与し、体温維持のために加温パッドを使用した。DPP-4活性用の血液サンプルは、50 IU/ml ヘパリンを含んだシリンジに回収した。

DPP-4活性は、基質であるグリシン-プロリン-*p*-ニトロアニリド (Gly-Pro-*p*NA; Sigma) (Flock 2007, Karl 2003)の加水分解率を指標として測定した。5  $\mu$ lの血漿と80  $\mu$ lのアッセイバッファー (0.25 M Tris-HCl buffer; pH 8.0)を平底96ウェルプレートに添加した。純水に溶解した1.6 mM Gly-Pro-*p*NAを80  $\mu$ l添加して反応を開始した。37°Cで60分反応させた後、1 M 酢酸 (pH 5.2)を40  $\mu$ l添加して反応を停止し、マイクロプレートリーダー (model 680; Bio-Rad Laboratories, Mississauga, ON, Canada)にて波長405 nmの吸光値で*p*NAを測定した (A)。基質と酢酸を含むアッセイバッファーで37°Cで60分間保温した後に血漿を添加する陰性対照を血漿サンプルごとに用意し、同様に波長405 nmで吸光値を測定した (B)。血漿DPP-4活性は、吸光値 (A)から(B)の差し引きにより算出した。1分間に1  $\mu$ molの*p*NAを遊離する活性を1ユニットと定義した。

## 6. ZeinH経口投与と耐糖能試験

ラットには馴化期間中、フィーディングチューブ (Safeed Feeding Tube Fr. 5, 40 cm; テルモ株式会社、東京都)を用いて水を1日1回経口で胃内投与した。一夜絶食後、尾静脈からbasal (-15 min)の血液サンプルを採取し、水 (8 ml/kg)またはZeinH (250 mg/ml; 2 g/kg、または500 mg/ml; 4 g/kg)をフィーディングチューブを用いて経口投与した。経口投与15分後にグルコース (1 g/kg)を腹腔内投与した。グルコース投与直前 (0 min)および投与15, 30, 60, 90, 120分後に尾静脈血を採取した。血液サンプルは上記と同様にヘパリン処理し、血漿中グルコース濃度を測定した。

## 7. 統計解析

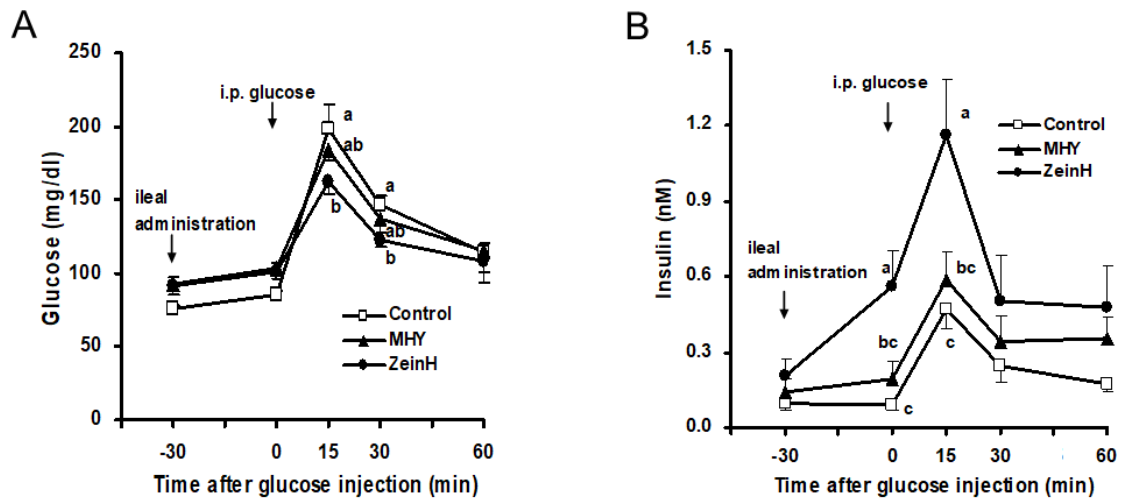
全てのデータは平均値±標準誤差で示した。一元配置もしくは二元配置分散分析 (ANOVA)と、Fisher's post hoc testあるいはDunnett's post hoc testにより、平均値間の有意差 ( $P < 0.05$ )を検定した。

## 第3節 結果

## 1. ペプチド回腸投与が血糖値および血中インスリン濃度に与える影響

覚醒ラットにおいてIPGTTを実施し、血糖値と血中インスリン濃度に対するZeinH回腸管腔内投与の影響を検討した。グルコースを経口投与するとグルコース自体がGLP-1分泌を惹起する可能性があったため、また、回腸管腔内ZeinHのGLP-1分泌と血糖値に対する作用を評価しなかったため、本研究では経口グルコース負荷試験ではなく、IPGTTを行った。条件検討の実験において、血糖値はグルコース腹腔内投与 (1 g/kg) 60分後においてほぼ正常値に戻ったため、血液サンプルは60分後まで採取した。

Fig. 1-1Aで示しているように、試料回腸投与は僅かに血糖値を上昇させた (-30~0 min)。水を投与したControl群では、グルコース投与後、血糖値は85.1 mg/dl (0 min)から198.8 mg/dl (15 min)にまで上昇し、投与60分後にはほぼbasal値に戻った。MHY投与群では、グルコース投与15および30分後の血糖値がControl群よりも僅かに低い傾向があったが、有意差は認められなかった。一方で、ZeinH投与群では、グルコース投与15および30分後の血糖値がControl群よりも有意に低下した。また、グルコース投与30分後の血糖値はほぼbasal値にまで戻った。Control群において、血中インスリン濃度は回腸への水投与による影響を受けず (-30~0 min)、グルコース投与後は、0.09 nM (0 min)から0.47 nM (15 min)に上昇した (Fig. 1-1B)。MHY投与群では、グルコース投与直前 (0 min)および15分後の血中インスリン濃度がControl群よりも僅かに上昇する傾向があったが、有意ではなかった。一方で、ZeinH投与群では、グルコース投与直前 (0 min)および15分後のインスリン濃度がControl群よりもそれぞれ6.3倍 (Control: 0.09 nM、ZeinH: 0.56 nM)および2.4倍 (Control: 0.59 nM、ZineH: 1.16 nM)上昇した。グルコース投与30分後以降についても、ZeinH投与群のインスリン濃度は、Control群およびMHY投与群と比較して高い傾向を示した。



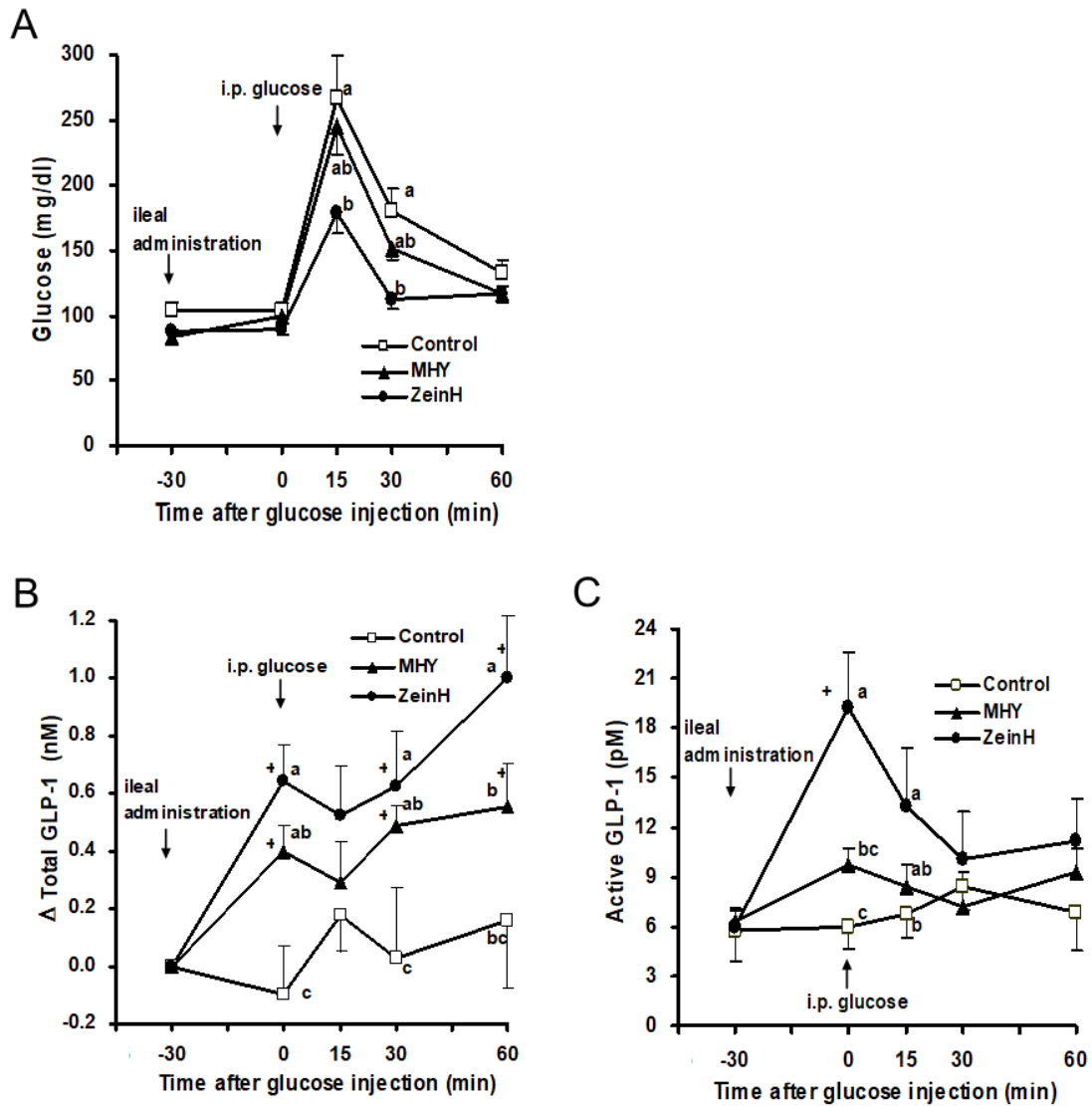
**Figure 1-1. Plasma glucose and insulin levels during IPGTT in conscious rats after the ileal administration of water, MHY or ZeinH.** Water (2 ml, open square, presented as Control), MHY (500 mg/2 ml, closed triangle), or ZeinH (500 mg/2 ml, closed circle) was administered into the ileum 30 min prior to intraperitoneal glucose injection (1 g/kg). Blood samples were collected from the jugular vein before (-30, 0 min) and after (15, 30, 60 min) the glucose injection. Values are displayed as the means  $\pm$  SEM of 6 rats in each group. Two-way ANOVA *P* values for glucose (A) and insulin (B) were 0.14 and  $< 0.01$  for the treatments; both  $< 0.01$  for time; and  $< 0.05$  and 0.26 for treatment  $\times$  time, respectively. Plots at the same time point not sharing the same letter differed significantly between treatments (Fisher's PLSD test,  $P < 0.05$ ).

## 2. ペプチド回腸投与が血中GLP-1濃度に与える影響

続いて、上記と同様の実験条件において、ZeinHやMHYの回腸管腔内投与がGLP-1分泌を刺激しているか調べた。ZeinH投与群では、グルコース投与15分および30分後の血糖値がControl群よりも有意に低下し、血糖上昇の抑制が認められたのに対して、MHY投与群では認められなかった。これらの結果は、Fig. 1-1Aの結果と一致している。

Total GLP-1濃度のbasal値は3.20-3.78 nMであり、この絶対値と比較して、既報 (Hira 2009)においても示しているように試料投与後のtotal GLP-1濃度の変化は小さかったため、試料回腸管腔内投与後の血中total GLP-1濃度は-30 minからの変化量 ( $\Delta$  total GLP-1)を示した (Fig. 1-2B)。水投与 (Control)は血中total GLP-1濃度に有意な変化を与えなかった。一方で、ZeinHおよびMHYの回腸管腔内投与は、15 min値を除くと、有意で持続的な血中total GLP-1濃度の上昇をもたらした(0~60 min)。Total GLP-1濃度の上昇はZeinH投与群の方がMHY投与群よりも僅かに強い傾向があり、どちらもグルコース投与15分後で僅かに減弱する傾向が見られた。Fig. 1-1の結果も合わせると、ZeinH回腸管腔内投与によりGLP-1分泌が刺激され、インスリン分泌促進と血糖上昇の抑制が認められたが、同様にGLP-1分泌を刺激したMHY投与によってはインスリン分泌促進と血糖上昇の抑制は認められなかった。

インスリン分泌促進作用を有するactive GLP-1濃度も測定した (Fig. 1-2C)。各群でbasalのactive GLP-1濃度に有意な差はなかった (5.78-6.25 pM)。回腸への水投与 (-30 min)とグルコース腹腔内投与 (0 min)は、total GLP-1と同様にactive GLP-1濃度に有意な変化を与えなかった。MHY投与群ではactive GLP-1濃度が上昇する傾向があったが、有意な変動ではなかった (0 min)。ZeinH投与群では、active GLP-1濃度は5.9 pM (-30 min)から19.3 pM (0 min)にまで鋭く上昇し、0 minと15 minでcontrol群よりも有意に高かった。Total GLP-1濃度 (Fig. 1-2B)とは対照的に、active GLP-1濃度の推移は、血中インスリンや血糖値の推移と連動しているように見えた。MHYとZeinHで、投与後に誘導される血中total GLP-1とactive GLP-1の反応に不一致があることは、血中DPP-4活性の違いによって説明できるかもしれない。それゆえ、次にZeinHおよびMHYの回腸管腔内投与による血中DPP-4活性への影響を調べた。

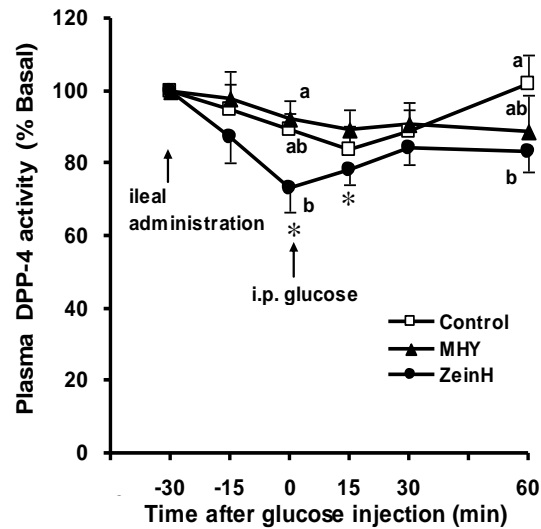


**Figure 1-2. Plasma glucose, total GLP-1 and active GLP-1 levels during IPGTT in conscious rats after ileal administration of water, MHY or ZeinH.** Water (2 ml, open square), MHY (500 mg/2 ml, closed triangle), or ZeinH (500 mg/2 ml, closed circle) was administered into the ileum 30 min prior to intraperitoneal glucose injection (1 g/kg). Blood samples were collected from the jugular vein before (–30, 0 min) and after (15, 30, 60 min) the glucose injection. Values are displayed as the means  $\pm$  SEM of 6–8 rats in each group. Two-way ANOVA *P* values for glucose (A), total GLP-1 (B) and active GLP-1 (C) were all  $< 0.01$  for the treatment;  $< 0.01$ ,  $< 0.01$ , and  $< 0.05$  for time; and 0.07, 0.23, and 0.11 for treatment  $\times$  time, respectively. Plus (+) signs indicate significant differences from the basal value (–30 min) in each group (Dunnett’s test,  $P < 0.05$ ). Plots at the same time point not sharing the same letter differ significantly between treatments (Fisher’s PLSD test,  $P < 0.05$ ).

### 3. ペプチド回腸投与が血中DPP-4活性に与える影響

以前の報告 (Hira 2009)のように、麻酔下ラットを用いて回腸静脈にカテーテルを留置し、試料の回腸結紮ループ内投与前後に回腸静脈からの採血を実施した。Basalの血中DPP-4活性に群間で有意な差はなかった (24.0-28.3 mU/ml)。グルコース腹腔内投与 (0 min)による血中DPP-4活性への影響は見られなかった。Control群では、回腸への水投与により血中DPP-4活性が低下する傾向があったが (-30-0 min)、有意な変化は起きなかった (Fig. 1-3)。MHY投与群でも有意な変化はなかった。一方で、ZeinH投与群では、血中DPP-4活性が0 minと15 minで-30 min値 (basal値)に比べて有意に低下し、その後60分までにbasal値に戻らないものの穏やかに上昇した。ZeinH投与群の血中DPP-4活性の低下度合はbasalに対して0 minで26.8%、15 minで22.1%であった。ZeinH投与群の血中DPP-4活性は、試験中、他の2群よりも一様に低い傾向があった。本試験結果は、麻酔下ラットにおいて、ZeinH回腸結紮ループ内投与が回腸静脈血中DPP-4活性を低下させることを示している。

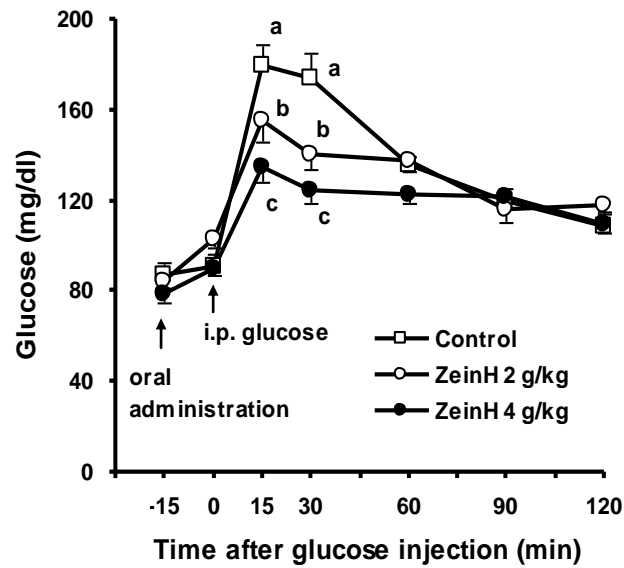




**Figure 1-3. Changes in plasma DPP-4 activity in the ileal vein in anesthetized rats after ileal administration of water, MHY or ZeinH.** Water (2 ml, open square), MHY (500 mg/2 ml, closed triangle), or ZeinH (500 mg/2 ml, closed circle) was administered into the ligated ileal loop at -30 min, and then glucose (1 g/kg) was injected intraperitoneally at 0 min. Blood samples were collected through the ileal vein catheter before (-30, 0 min) and after (15, 30, 60 min) the glucose injection. Two-way ANOVA *P* values were < 0.05, < 0.05, and 0.76 for treatment, time and treatment x time, respectively. Values are displayed as the means  $\pm$  SEM of 5–7 rats in each group and are expressed as the percentage of basal (-30 min) activities. \*, *P* < 0.05 compared with basal levels (-30 min) (Dunnett's test, *P* < 0.05). Plots at the same time point not sharing the same letter differ significantly between treatments (Fisher's PLSD test, *P* < 0.05).

#### 4. ZeinH経口投与が血糖値に与える影響

覚醒ラットを用いたIPGTTにおいてZeinH経口投与の影響を調べた。ZeinHは2および4 g/kgの用量で投与した。2 g/kgの用量は、上記実験で体重250 gのラットに対して個体あたり500 mgを投与することを基に設定している。全ての群において、血糖値はグルコース投与15分後で上昇し、その後30-120分にかけて緩やかに低下した (Fig. 1-4)。ZeinHを経口投与したラットでは、グルコース投与15および30分後において、用量依存的に有意な血糖値の低下が認められた。



**Figure 1-4. Plasma glucose level after the oral administration of ZeinH during IPGTT in conscious rats.** Water (8 ml/kg, open square) or 250 mg/ml of ZeinH (2 g/kg, closed circle) was administered orogastrically 15 min prior to intraperitoneal glucose injection (1 g/kg). Blood samples were collected from the tail vein before (-15, 0 min) and after (15, 30, 60, 90, 120 min) the glucose injection. Values are displayed as the means  $\pm$  SEM of 6 rats in each group. Plots at the same time point not sharing the same letter differ significantly between treatments (Fisher's PLSD test,  $P < 0.05$ ).

## 第4節 考察

消化管上皮に散在するL細胞は消化管腔内の栄養素を認識してGLP-1を分泌し、分泌されたGLP-1はインスリン分泌の増幅作用などにより、正常な糖恒常性の維持にとって重要な生理学的役割を担う (Drucker 2007, Baggio 2007)。GLP-1の静脈投与は、膵β細胞に直接作用してインスリン分泌を促進するsulfonylurea薬の効果が減弱している2型糖尿病患者においても強力な抗糖尿病作用を発揮する (Nauck 1998)。生体内での安定性を高めたGLP-1アナログやDPP-4阻害剤が、2型糖尿病治療薬として臨床で使用されている (Holst 2009, Lovshin 2009)。それゆえ、L細胞からのGLP-1分泌をターゲットとする研究は、耐糖能改善を指向した新たな提案につながり得る。

ZeinHのGLP-1分泌活性は、十二指腸や空腸よりも多くL細胞が分布する回腸において強く発揮される (Hira 2009)。回腸を空腸よりも近位に挿入する手術により、正常ラットにおいてグルコース経口負荷後のGLP-1分泌が向上し、インスリン分泌の増幅を介して血糖上昇が抑制される (Strader 2009)。これは、経口投与されたグルコースが空腸から血中に吸収される前に、挿入した回腸部位のL細胞からのGLP-1分泌を刺激し、それによりインスリン放出が促進されたことが関与するかもしれない。この報告は、血糖上昇が誘発される前に、ZeinHによりGLP-1分泌を刺激することで高血糖を抑制できる可能性を示唆する。

覚醒ラットにおいて、回腸管腔内に投与したZeinHはグルコース投与に誘発される血糖上昇を抑制し (Fig. 1-1A)、その作用は再現性が認められた (Fig. 1-2A)。ZeinH投与群におけるグルコース投与前 (0 min)と投与後のインスリン分泌の促進が原因として考えられる (Fig. 1-1B)。本研究ではグルコースは腹腔内に投与したため、グルコース吸収の阻害は血糖上昇の抑制には寄与しない。そのため、ZeinHのような食品ペプチドが、インスリン分泌促進による高血糖の予防に有効であることが示唆される。

一方で、MHYはグルコース投与により誘発される血糖上昇を有意には抑制しなかった (Fig. 1-1A)。これは、急な血糖上昇に対するインスリン分泌がControl群と同レベルだったためと考えられる (Fig. 1-1B)。MHYは*in situ*系 (Dumoulin 1998)、*in vitro*系 (Cordier-Bussat 1998, Reimer 2006)の研究においてGLP-1分泌活性を有する食品ペプチドとして報告されている。以前の研究において、MHYはGLP-1産生モデル細胞であるGLUTag細胞において、ZeinHよりも弱いGLP-1分泌活性を示した (Hira 2009)。それゆえ、本研究でMHY投与群とZeinH投与群で血糖やインスリン濃度の挙動に差が認められたのは、ZeinHと比較してMHYによって惹起されたGLP-1分泌が弱かったことが影響したと予想した。

ZeinHおよびMHYの回腸管腔内投与は、どちらも覚醒ラットにおいて血中

total GLP-1濃度の有意で持続的な増加を誘発した (Fig. 1-2B)。MHY投与によるtotal GLP-1の分泌反応は予想外にZeinH投与群に類似していた。GLUTag細胞を用いた*in vitro*試験において、低用量 (5 mg/ml)でMHYはZeinHよりも弱いGLP-1分泌活性を示したが (Hira 2009)、本研究での500 mgの投与は比較的高用量と思われる、GLP-1分泌が最大限に刺激されてその差が見えにくかったのかもしれない。

Total GLP-1とは対照的に、active GLP-1はZeinH投与によってのみ有意に血中濃度が上昇し、MHY投与によっては有意な上昇は認められなかった (Fig. 1-2C)。このactive GLP-1の反応は血糖値や血中インスリン濃度の変動 (Fig. 1-1および1-2A)に反映されているように見えるが、total GLP-1濃度の変動 (Fig. 1-2B)からは説明できない。Total GLP-1はactive form (7-37)とinactive form (9-37)のGLP-1を含むため、total GLP-1濃度の増加は、active GLP-1の分泌と血中でのinactive GLP-1の蓄積を反映している。そのため、ZeinH投与群とMHY投与群で認められた血中active GLP-1濃度の有意な差は、total GLP-1濃度の僅かな差として表れる可能性がある。

Active GLP-1濃度の変化は、分泌されたGLP-1とDPP-4による不活性化 (分解)を受けずに生き残ったGLP-1の両方を反映する。ZeinH投与群とMHY投与群での血中active GLP-1濃度の差 (0および15 min)は、DPP-4によるactive GLP-1の分解の程度の差に由来し得る。すなわち、ZeinH投与群では分泌されたGLP-1の分解が減少しているか、あるいはMHY投与群ではそれが増加していたことが考えられる。こうして、本研究の結果は、GLP-1分泌の刺激は、必ずしも血中active GLP-1濃度の増加には反映されないことを示している。ZeinH投与はグルコース投与前 (0 min)において有意に血中インスリン濃度を上昇させるが、低血糖は引き起こしていない (Fig. 1-1B)。この程度の上昇では低血糖を引き起こすには不十分であると思われる。

著者らは、回腸管腔内に投与したZeinHとMHYが、麻酔下ラットにおいて回腸静脈血中DPP-4活性に影響するかどうかを調べた。Active formとしてL細胞から分泌されたGLP-1のうち、約50%以上が門脈に入るまでに分解されて不活性型に変換される (Hansen 1999)。DPP-4は肝臓、腎臓、小腸刷子縁膜など多くの組織に膜結合型として存在するだけでなく、血中においても可溶型として多く存在する (Deacon 2004)。本研究において、消化管全体の血液が集まる門脈よりも上流に当たる回腸静脈からの採血は、回腸L細胞から分泌されたactive GLP-1のDPP-4による分解が起きているであろう血液中のDPP-4活性の測定を可能にする。

興味深いことに、ZeinH投与は血中DPP-4活性を低下させ (0および15 min)、一方でMHY投与は血中DPP-4活性に有意な変化を与えなかった (Fig. 1-3)。Control群とMHY投与群で見られた僅かな減少傾向 (-30~0 min)の原因は不明だ

が、吸収された水分によって血液が一時的に希釈されたことを反映しているかもしれない。ZeinH投与群の結果は、管腔内のペプチドが急性に血中DPP-4活性を低下させる可能性を示している。

本実験系は、覚醒ラットを用いた実験1および2とは必ずしも一致しないが、ZeinH投与による血中DPP-4活性の低下はactive GLP-1濃度の上昇 (Fig. 1-2C) と同期して見られた (0および15 min)。これはZeinH投与によるactive GLP-1濃度の上昇は、L細胞からのGLP-1分泌の刺激とDPP-4によるactive GLP-1の急速な分解の抑制の両方の結果であることを示唆する。対照的に、MHY投与では血中DPP-4活性が低下しなかったために、GLP-1分泌を刺激したもののactive GLP-1濃度の有意な上昇は見られず、結果としてインスリン分泌の促進が起きなかったと考えられる。2型糖尿病モデルであるLean Zuckerラットを用いた経口グルコース負荷試験において、20-30%程度の部分的な血中DPP-4活性の低下が、active GLP-1濃度の上昇と血糖上昇の抑制に有効であることが報告されている (Tanaka-Amino 2008)。それゆえ、回腸管腔のZeinHによる血中DPP-4活性の低下 (0 min: 26.8%, 15 min: 22.1%)は、分泌されたGLP-1を活性型で維持するのに寄与できたと考えられる。

回腸管腔内に投与したZeinHが血中DPP-4活性を低下させるメカニズムは不明である。一つの仮説として、ZeinH由来の吸収されたペプチドによるDPP-4の競合的阻害がある。マウスにおいてホエイタンパク質の摂取が、小腸組織中のDPP-4活性を低下させることが報告されている (Gunnarsson 2006)。その報告では、ホエイタンパク質の消化によって生じる低分子ペプチドが小腸壁に存在するDPP-4の基質となり、競合的にDPP-4による分解を阻害してその活性を低下させたことを示唆している。加えて、ジプロチンA (Ile-Pro-Ile)やジプロチンB (Val-Pro-Leu)などのトリペプチドが、*in vitro*系においてDPP-4によるGLP-1の分解を阻害し (Kieffer 1995, Deacon 1995)、DPP-4の阻害剤として報告されている (Rahfeld 1991)。これらの報告は、吸収されたZeinH由来のペプチドが回腸静脈血中のDPP-4活性を阻害するという仮説を支持する。腸内洗浄後は管腔内の膵酵素が除去されているため、回腸結紮ループ内においてZeinHは消化を受けにくいかもしれないが、刷子縁膜上に存在するアミノペプチダーゼが少なからずZeinHを分解し、低分子のペプチドが生じ、それらが吸収されて血中DPP-4活性を阻害し得る。しかしながら、ホエイタンパク質の摂取によるDPP-4活性の低下は小腸組織中でしか見られず、血液中 (眼窩静脈)では認められなかった (Gunnarsson 2006)。本研究では、回腸静脈へのカニューレーションによってZeinHを投与したラットの血液中のDPP-4活性の低下を示すことができた (Fig. 1-3)。

Zeinは、疎水性の高さから難消化性タンパク質として知られている。実際、*in vitro*において、ZeinHは乳タンパク質カゼインと比較してペプシン/パンクレアチンによる加水分解に耐性を示す (Higuchi 2013)。MHYに比べると僅かに少な

いものの、ZeinHは、Zeinをアルカラーゼ処理して得られる加水分解物 (Zhu 2008)と同様に、プロリンやアラニンを含んでいた (Table 1-1)。DPP-4はペプチドのN末端から2残基目のプロリンやアラニンを認識するため (Demuth 2005)、ZeinHやZeinHの消化により生じた低分子ペプチドがDPP-4阻害に寄与し得る。MHYと比較してZeinHは遊離アミノ酸を少なく含むことから、ZeinHに元々含まれている遊離アミノ酸のGLP-1分泌への寄与は小さいと思われる。ZeinHはMHYよりもロイシンやグルタミン酸 (グルタミンを含む)を多く含んでいた。ロイシンとグルタミンはGLP-1分泌活性を有することが報告されているので (Chen 2009, Greenfield 2009)、消化によって遊離したこれらのアミノ酸や、これらのアミノ酸を含む低分子ペプチドがZeinHによって誘発されるGLP-1分泌に関与していると思われる。これらの考察は、GLUTag細胞において、ZeinHのアミノ酸組成に揃えたアミノ酸混合物がZeinHと比較して弱いGLP-1分泌活性を示したこと、また、*in vitro*でペプシン/パンクレアチン処理して調製したZeinH人工消化物がGLP-1分泌活性を示したことと矛盾しない (Higuchi 2013)。GLP-1分泌促進作用とDPP-4阻害作用の各々について、活性本体を同定するには更なる検討が必要である。ZeinHが血糖上昇を抑制するGLP-1非依存的なメカニズムとして、ロイシンやアルギニンは直接インスリン分泌を刺激することが報告されているため (Ball 2004)、吸収されたZeinH由来の低分子ペプチドや遊離アミノ酸が直接インスリン分泌を刺激している可能性についても興味深い。

2 g/kg (~500 mg/rat)の用量で経口投与したZeinHは、覚醒ラットにおけるIPGTTで血糖上昇を抑制した (Fig. 1-4)。この結果は、より生理的な状況でのZeinHの血糖上昇抑制作用を示している。ZeinHの用量は、回腸投与 (500 mg/rat)に比べて経口投与した場合の方が高くなると推測していたが、2 g/kg (~500 mg/rat)での経口投与は血糖上昇抑制作用を示すのに十分だった。経口投与されたZeinHが、GLP-1に加えてGIPの分泌も促進したことが影響したと考えられる (Higuchi 2013)。GIPは、十二指腸や空腸に分布する消化管内分泌細胞K細胞から分泌される消化管ホルモんで、GLP-1と同様にインスリン分泌促進作用を持つインクレチンである (Parker 2008, Mortensen 2003)。ZeinHの経口投与による血糖上昇抑制作用は、GLP-1受容体アンタゴニストやGIP受容体アンタゴニストの投与により減弱したことから、GLP-1とGIPの両方の関与が示されている (Higuchi 2013)。

ホエイタンパク質の経口投与は、げっ歯類のみならず臨床においてもGLP-1分泌を刺激することが報告されている (Hutchison 2015, Jakubowicz 2014, Giezenaar 2018)。ラットにおいて、ホエイタンパク質の経口投与による血中active GLP-1濃度上昇は、DPP-4阻害薬の投与やDPP-4欠損によらずに認められた一方で、デキストリンや脂肪乳剤、カゼインの経口投与による血中active GLP-1濃度の上昇は、DPP-4阻害薬の投与やDPP-4欠損によって増強された (Shimizu

2020)。これは、ホエイタンパク質の経口投与後の血中active GLP-1濃度の上昇には、GLP-1の分泌促進だけでなく、同時にDPP-4による分解の阻害が寄与することを示唆する。米タンパク加水分解物についても、ラットにおいて、GLP-1の分泌を刺激し、また、分解を抑制し、血糖上昇抑制作用を示すことが報告されている (Ishikawa 2015)。本研究において、DPP-4活性の減少は回腸静脈血中で認められたが、GLP-1は分泌後に近傍で局所作用している可能性もある。GLP-1の局所作用には分泌L細胞近傍の迷走神経の求心繊維の活性化が関与することや (Hansen 1999)、GLP-1による食後の膵β細胞の刺激が肝門脈領域での神経反射を介して起きることが報告されている (Nakabayashi 1996, Balkan 2000)。

まとめると、覚醒ラットにおいて、ZeinHの回腸投与は、インスリン分泌の増強を伴って血糖上昇を抑制し、一方でMHYはインスリン分泌も血糖上昇抑制も引き起こさなかった。ZeinHとMHYは同等の血中total GLP-1濃度の上昇を誘発したが、active GLP-1濃度はZeinHを処置したラットにおいてのみ増加していた。麻酔下のラットにおいて、MHYではなくZeinHの回腸投与は、回腸静脈血中の血漿中DPP-4を低下した。ZeinHの回腸投与は、GLP-1分泌とGLP-1の分解阻害の双方に作用し、インスリン分泌を増強した。これまでに、*in vitro*においてDPP-4阻害活性を示す食品ペプチドは複数報告されているが (Tulipano 2011, Corrochano 2018, Nongonierma 2016, Hatanaka 2012, Taga 2017, Neves 2017)、著者らの知る限り、本研究は、食品ペプチドがGLP-1の分泌促進と分解抑制の双方に作用し、分泌されたGLP-1の生理作用が発揮されるという概念を示した初めての報告である。IPGTTにおけるZeinHの血糖上昇抑制作用は、経口投与によっても示された。本研究の結果は、内因性GLP-1を利用して血糖コントロール改善を指向する栄養学的な提案、特に耐糖能不全に対する効果的な予防・食事療法の開発に寄与し得る。



## 第2章

# モノアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼ2阻害薬の、脂質誘導性消化管ホルモン分泌促進作用、脂質摂取抑制作用および抗糖尿病・抗肥満作用の検討

### 第1節 緒言

摂取した栄養素は、中枢の神経システムに対してシグナル分子として直接的に、または、末梢組織からのシグナルを介して間接的に作用し、これにより代謝の恒常性が維持されている。間接的なメカニズムの一つとして、消化管における「脂質/脂肪酸の感知」がある (Youn 2014, Blouet 2010)。例えば、小腸において消化によって生じた脂肪酸は、脂肪酸受容体による感知を介して、消化管ホルモンの分泌を刺激し、食欲や全身のエネルギーバランスを制御する (Chu 2008, Edfalk 2008, Hirasawa 2005)。脂質の摂取は、迷走神経の活性化による消化管運動や、高脂肪食に対する脳報酬系制御に関与する生理活性脂質の産生を引き起こす (Rodríguez de Fonseca 2001, Gillum 2008, Wellner 2013)。肥満や2型糖尿病のような代謝性疾患の病態生理において、これらの脂質/脂肪酸感知機構の異常が関与していることが示唆されている。

モノアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼ2 (MGAT2)は、食事性脂質の主な加水分解物である脂肪酸とモノアシルグリセロール (MG)からジアシルグリセロールを生成する (Shi 2009)。MGAT2は小腸で高発現し、小腸吸収上皮細胞においてトリアシルグリセロール (TG)再合成経路の律速酵素である (Kayden 1967, Phan 2001)。マウスにおいて、MGAT2の遺伝子欠損は、小腸上部からの脂質吸収量を減少させ、一方で小腸下部からの吸収量を増加させ、食餌誘導性の肥満や耐糖能異常を防ぐ (Yen 2009, Tsuchida 2012)。GLP-1のような摂食抑制作用を有する消化管ホルモンの分泌促進や、食事脂質に対する嗜好性の低下もまたMGAT2欠損マウスで認められている (Yen 2009, Mul 2014)。これらの結果は、MGAT2が腸管における脂質/脂肪酸の感知に関与する重要な分子で、MGAT2の阻害が、肥満とそれに関連する代謝性疾患の治療に対して有用であるという説を提示する。これまでいくつかの低分子MGAT2阻害薬が見出されている (Devasthale 2018)。しかしながら、前臨床試験において、MGAT2の薬理的阻害が代謝性疾患に及ぼす作用については報告が限られている (Okuma 2015)。

著者らはこれまでに、経口投与可能な選択的 MGAT2 阻害薬である CpdA を創造した (Sato 2015)。CpdA の経口投与は、高脂肪食負荷マウスにおいて摂食抑制作用を示し、高脂肪食とストレプトゾトシンによって重篤な糖尿病を誘発したマウスモデルにおいて、脂肪肝と高血糖を改善した (Take 2016)。本研究では、CpdA と同じく強力かつ選択的な MGAT2 阻害活性を示す Compound B (CpdB) を用い (Sato 2018)、1) MGAT2 阻害作用、2) 正常マウスにおける消化管ホルモン分泌と脂質摂取に及ぼす作用、3) 重篤な肥満・2 型糖尿病モデルである高脂肪食負荷 ob/o/b マウスにおける代謝異常に対する作用、を検討した。本研究データは、肥満関連代謝性疾患の改善を指向した薬理的 MGAT2 阻害に関して、新規かつ有益な側面を示している。

## 第2節 実験材料と方法

### 1. 使用薬物および試薬

CpdB、CpdA およびピオグリタゾン は、武田薬品工業株式会社 (東京都) にて合成された。MGAT2 と関連アシル基転移酵素 [ジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼ1 (DGAT1)、DGAT2 およびアセチルCoA アセチルトランスフェラーゼ1 (ACAT1)] の *in vitro* 阻害活性は、FreeStyle293 細胞を用いて各酵素タンパク質を発現させ、その蛋白質を含む膜画分を使用し、各酵素が触媒する反応に対する阻害率を測定して求めた (Sato 2015, Sato 2018)。リラグルチド (Victoza) は、Novo Nordisk Pharma Ltd. (Bagsvaerd, Denmark) より購入した。その他の試薬は全て研究用で和光純薬工業株式会社 (大阪府) より購入した。

### 2. 動物

雄性 C57BL/6J マウスは、日本クレア株式会社 (東京都) から購入した。雄性 B6.Cg-Lepob/J (ob/ob) マウスは、日本チャールス・リバー株式会社 (神奈川県) から購入した。動物は、特に記載がない限り、通常食 (CE-2; 日本クレア株式会社) の自由給餌と自由飲水条件下で飼育した。温度 20-26°C、湿度 40-70%、12 時間の明暗周期の環境で単飼育した。動物の取り扱いおよび実験は、武田薬品工業株式会社の実験動物倫理委員会の定める基準に準じて実施した。

### 3. 経口液体流動食負荷試験 (Meal tolerance test, MTT)

一夜絶食した C57BL/6J マウス (9 週齢) を用いて、午前中に MTT を実施した。Vehicle、CpdA (3, 10 mg/kg) あるいは Cpd B (3, 10 mg/kg) はゾンデを用いて経口投与した。化合物は 0.5% メチルセルロース溶液 (vehicle) に懸濁した。経口投与 6.5 時間後あるいは 16.5 時間後に、生理食塩水に溶解した pluronic F-127 (500

mg/kg, 5 mL/kg, BASF, Ludwigshafen, Germany)を、リポタンパク質リパーゼ (LPL) による血中 TG の加水分解を阻害する目的で腹腔内投与した。腹腔内投与 30 分後に、コーン油とエンシュア-H(アボットジャパン株式会社、東京都)を 3:17 (v/v) で混合した液体流動食 (10 ml/kg)を経口投与した。液体流動食負荷前 (0 h)、および 2, 4h 後に採血し (下記)、血漿中 TG 濃度を測定した。小腸において食事性脂質から合成されるカイロミクロン TG (CM/TG)の濃度曲線下面積 (AUC)を、液体流動食を負荷した群の血中 TG 濃度から、負荷していない群の血中 TG 濃度を差し引いて算出した。

#### 4. CpdB の薬物動態

高脂肪食 (HFD, 45% kcal fat, 4.7 kcal/g; D12451, Research Diets, Inc., New Brunswick, NJ)を 49 週間自由摂取させた 54 週齢の C57BL/6J mice に CpdB (30 mg/kg)を単回経口投与した。投与 0.25、0.5、1、2、4、8 および 24 h 後に採血 (下記) した。血漿中 CpdB 濃度を、既報 (Take 2016)の方法と同様に液体クロマトグラフィータンデム質量分析装置により測定した。

#### 5. 脂質誘導性の消化管ホルモン分泌に対する作用の評価

一夜絶食した C57BL/6J マウス (9 週齢)を、体重に基づいて群分けし、Vehicle もしくは CpdB (10 mg/kg)を経口投与した。CpdB は 0.5%メチルセルロース溶液 (vehicle)に懸濁した。投与 30 分後、脂質としてオリーブ油 (8 ml/kg)もしくは液体流動食 (上記 MTT と使用したものと同様、10 ml/kg)を経口投与した。化合物投与前および脂質負荷 1、2、3h 後に採血した。血漿中のペプチド チロシン-チロシン (PYY)および GLP-1 の濃度を測定した。CpdB の薬効発現を確認するため、オリーブ油負荷 2 h 後の血漿中 TG 濃度を測定した。Vehicle 投与後に水 (8 ml/kg)を経口投与したマウスを対照群とした。

#### 6. 食餌選択試験

C57BL/6J マウス (9 週齢)を用いて、HFD (D12451; Research Diets, Inc.)と低脂肪食 (LFD; 10% kcal fat; 3.8 kcal/g; D124510B, Research diets, Inc.)の食餌選択性を評価した。通常食給餌で馴化した後、別々の給餌器に入れた HFD と LFD を同時に提示し、一晚の摂餌量を測定した。マウスは体重と摂餌量を基に群分けした。その後、vehicle もしくは CpdB (10 mg/kg; 5 ml/kg)を経口投与し、各々の食餌の一晚の摂餌量を測定した。CpdB は 0.5%メチルセルロース溶液に懸濁した。陽性対照として、10% ジメチルスルホキシド (DMSO)含有生理食塩水に溶解したリラゲルチド (0.04 mg/kg; 2 ml/kg)を皮下投与する群も設けた。

#### 7. HFD 負荷 *ob/ob* マウスを用いた反復投与試験

雄性 *ob/ob* マウスに、8 週齢から試験終了時まで HFD (D12451, Research diets, Inc.) を 7 週間自由摂取させた。HFD 給餌 2 週間後、マウスを体重、摂餌量、糖化ヘモグロビン (GHb) および血漿中生化学パラメータに基づいて群分けした。Vehicle、ピオグリタゾン (3 mg/kg) あるいは CpdB (30 mg/kg) を、1 日 1 回で 36 日間経口反復投与した (5 ml/kg)。化合物は 0.5%メチルセルロース溶液 (vehicle) に懸濁した。試験中、体重と摂餌量を測定した。投与開始 34 日目 (day34) において採血し、GHb と各種血漿中生化学パラメータを測定した。加えて、EchoMRI-900 (日立アロカメディカル株式会社、東京都) を用いて体脂肪重量 (fat mass) および除脂肪重量 (lean mass) を測定した。Day36 において、Vehicle および CpdB で処置したマウスを個別に Oxymax システム (Columbus Instruments, Columbus, OH) の代謝チャンバーに入れた。3h の馴化後、酸素消費量 ( $VO_2$ ) と二酸化炭素産生量 ( $VCO_2$ ) を 22 時間 (13:00 から翌 11:00) 測定した。測定中、vehicle または CpdB の投与は 18:00 に実施した。呼吸商 (RQ) とエネルギー消費量 (EE) を、以下の計算式から算出した。

$$RQ = VCO_2/VO_2$$

$$EE \text{ (kcal/h)} = [3.815 + 1.232 \times (VCO_2/VO_2)] \times VO_2$$

## 8. 血中指標の測定

血液サンプルは、覚醒下で尾静脈もしくは顔面静脈から採取し、遠心分離後 (1,500 g、10 分、4°C) に血漿を採取した。インクレチンホルモンの分解を防ぐために、血液サンプルはヘパリン (終濃度 100 単位)/アプロチニン (終濃度 500 KIU/ml) と DPP-4 阻害剤アログリプチン (終濃度 10  $\mu$ M) で処置した。血漿中アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST) およびアラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT) は、自動分析装置 7180 (株式会社日立ハイテック、東京都) で測定した。GHb は、東ソー自動グリコヘモグロビン分析計 (HLC-723G8; 東ソー株式会社、東京都) で測定した。インスリンは、Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) キット (634-01481; 株式会社シバヤギ、群馬県) を用いて測定した。Total GLP-1 および total PYY は、ELISA キット (total GLP-1: 299-75501, total PYY: 291-73501; 和光純薬株式会社) を用いて測定した。

## 9. 統計解析

全てのデータは平均値±標準偏差で示した。2 群間の比較は、Student's *t*-test もしくは Aspin-Welch test を行った。また、Bartlett's test で等分散性を検定した後、用量依存性の評価は片側 William's test を、多群比較は Dunnett's test または Tukey's test を用いて解析した。

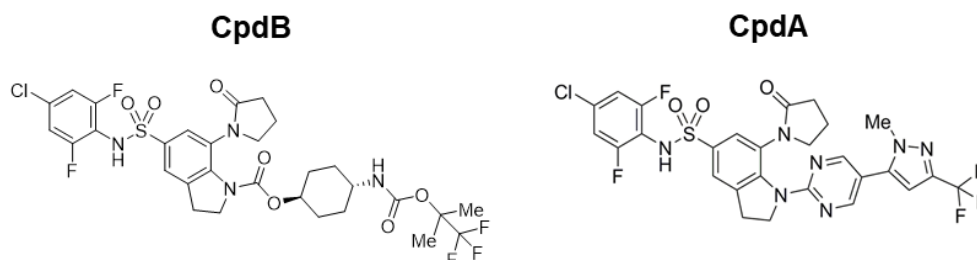
### 第3節 結果

#### 1. *In vitro*における CpdB の MGAT2 に対する阻害活性

特許申請文書に記載の通り (Sato 2018)、CpdB はヒトおよびマウスの MGAT2 に対して強力な阻害活性を示した (Table 2-1 および Fig. 2-1)。ヒトおよびマウスの MGAT2 に対する IC<sub>50</sub> は、それぞれ 8.1 nM と 0.85 nM であった。CpdB は、関連するアシル基転移酵素 (DGAT1、DGAT2 および ACAT1) に対して 300 倍以上の選択性を示した。これらのプロファイルは、以前に報告した CpdA と同等だった (ヒトおよびマウスの MGAT2 に対する IC<sub>50</sub> は、それぞれ 7.8 nM と 2.4 nM) (Sato 2015)。

**Table 2-1. *In vitro* inhibitory activities of CpdB for MGAT2 and related acyltransferases.**

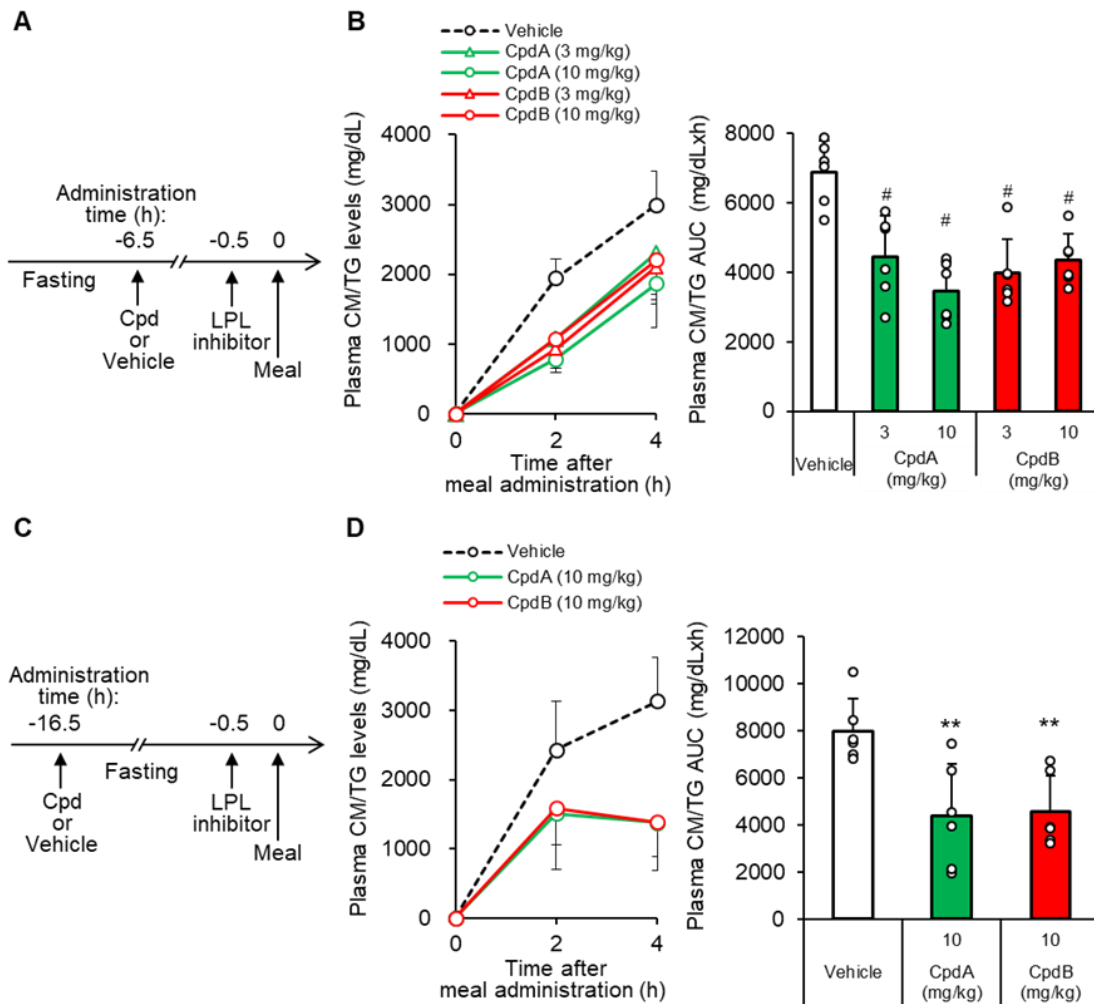
	MGAT2	DGAT1	DGAT2	ACAT1
	human/mouse	human	human	human
IC <sub>50</sub> (nM)	8.1 / 0.85	2500	>30000	>30000



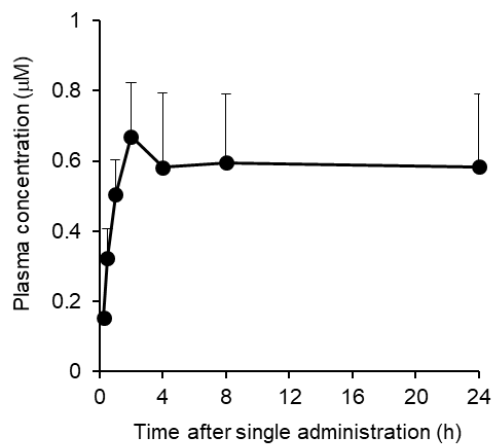
**Figure 2-1. Chemical structure of CpdB, and previously reported CpdA.**

## 2. 正常 C57BL/6J マウスにおける CpdB の脂質誘導性食後血中 TG 濃度上昇に対する抑制作用

CpdB の食後血中 TG 濃度上昇への影響を評価するために、CpdA を陽性対照として用いてマウス MTT における血中 TG 濃度の変化を調べた。CpdB は、液体流動食負荷の 6.5 時間前に経口投与すると、血中 TG 濃度の上昇を抑制し、血中 CM/TG の AUC を有意に減少させ、その作用は用量 3 mg/kg でプラトーに達した (Fig. 2-2A および 2-2B)。10 mg/kg では、CpdB は Vehicle 投与群と比較して血中 CM/TG を 37%低下させた。これと同等の低下が、CpdB を流動食負荷の 16.5 時間前に経口投与した場合においても認められた (Fig. 2-2C および 2-2D)。CpdB の食後血中 TG 濃度上昇抑制作用は、CpdA とほぼ同等であった。CpdA は、その薬物動態データも含めてマウス単回経口投与で 24 時間 MGAT2 阻害を示すことが示されている (Take 2016)。CpdB を高脂肪食負荷マウスに 30 mg/kg の用量で経口投与した場合、血漿中 CpdB 濃度は 24 時間後で 0.58  $\mu\text{M}$  であり (Fig. 2-3)、それはマウス MGAT2 阻害  $\text{IC}_{50}$  の約 700 倍以上の値であった (Table 1)。予備検討で、CpdB を正常マウスに 10 mg/kg の用量で投与した場合においても血漿中 CpdB 濃度は 0.58  $\mu\text{M}$  より高濃度であった。CpdB の食後血中 TG 濃度上昇抑制作用 (Fig. 2-2D) および薬物動態データより、CpdB は用量 10 mg/kg での単回投与により、マウスにおいて 24 時間の MGAT2 阻害を達成することが示唆された。それゆえ、以降の検討では CpdB の用量を 10 mg/kg 以上に設定した。



**Figure 2-2. The effect of CpdB on hypertriglyceridemia during an oral meal tolerance test in mice.** Fasted C57BL/6J mice were given a liquid meal orally with intraperitoneal injection of pluronic F-127 (LPL inhibitor) to inhibit plasma TG lipolysis. (A) The brief schematic diagram of the experimental procedure in (B). (B) Changes in plasma chylomicron TG (CM/TG) levels and the AUC during 4 h after the meal challenge (0-4 h) when CpdB (3 and 10 mg/kg) was administered orally at -6.5 h. CpdA (3 and 10 mg/kg) was also evaluated as a positive control. (C) The brief schematic diagram of the experimental procedure in (D). (D) Changes in plasma CM/TG levels (0-4 h) and the AUC when CpdA (10 mg/kg) or CpdB (10 mg/kg) was administered orally at -16.5 h. # $P < 0.025$  vs. vehicle group by one-tailed Williams' test. \*\* $P < 0.01$  vs. vehicle by Dunnett's test. Data are represented as the mean and SD values (n=6).

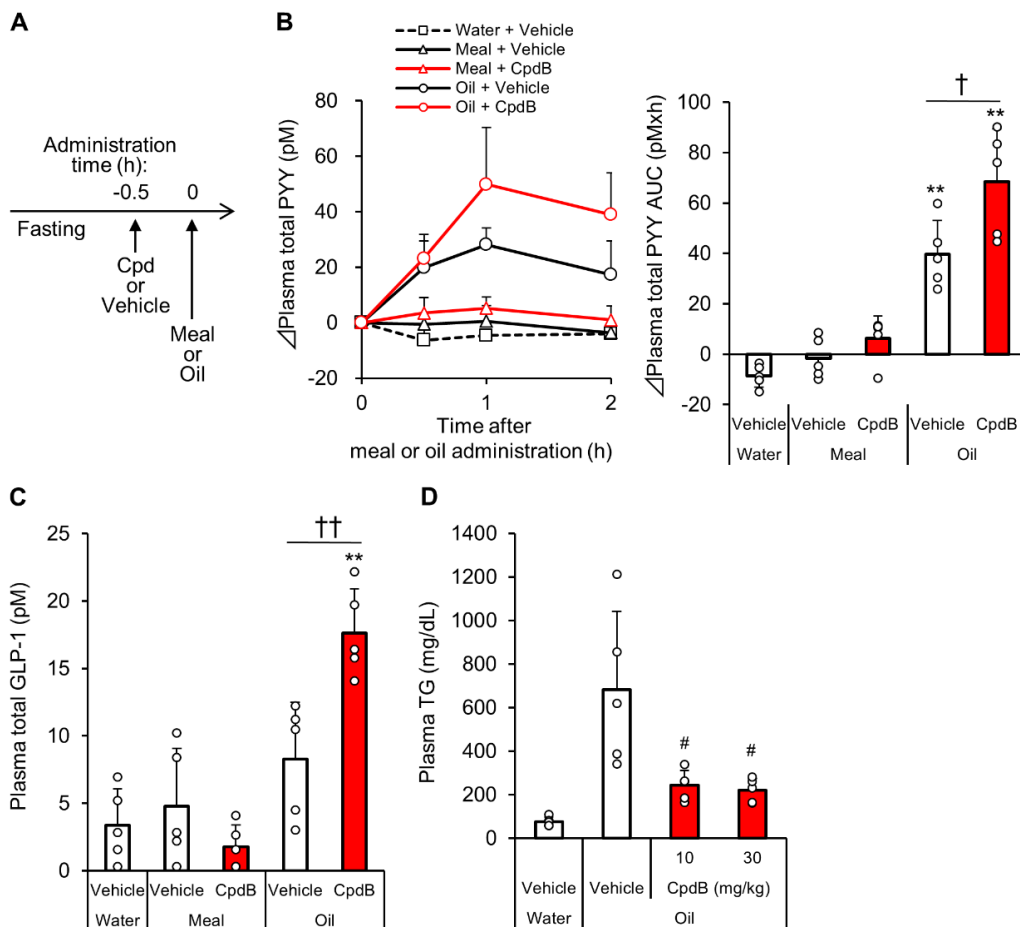


**Figure 2-3. Pharmacokinetics of CpdB in mice.** Plasma concentrations at 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, and 24 h after a single oral administration of CpdB (30 mg/kg). Data are represented as the mean and SD values (n=3).



### 3. 正常 C57BL/6J マウスにおける CpdB の脂質誘導性消化管ホルモン分泌に対する促進作用

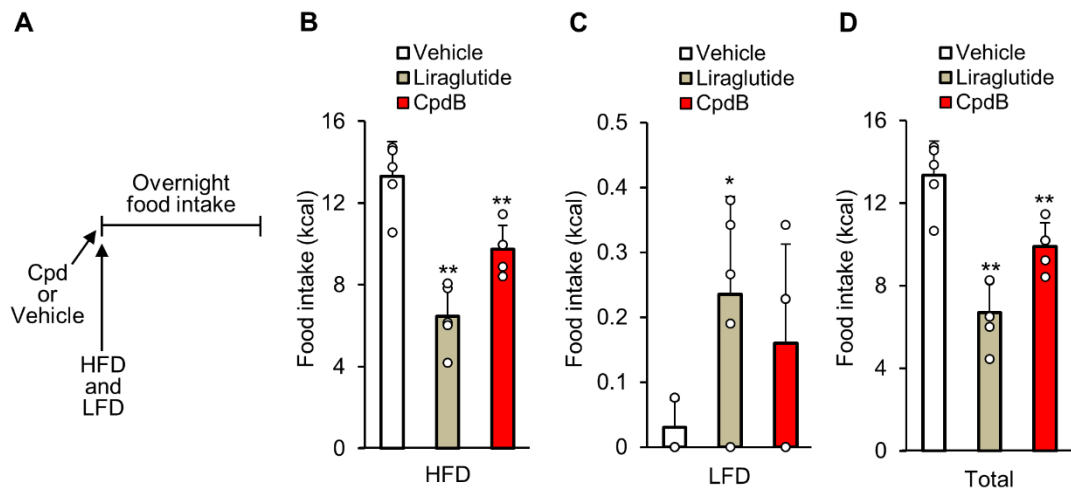
MGAT2阻害の消化管ホルモン放出に対する作用を調べるために、CpdB (10 mg/kg)を投与した正常C57/BL6Jマウスに液体流動食やオリーブ油を負荷した (Fig. 2-4A)。オリーブ油負荷は血中PYY濃度を有意に増加させた。その増加は、Vehicle群に比較して、CpdBの事前投与によって有意に増加した (Fig. 2-4B)。加えて、CpdBはオリーブ油負荷3時間後の血中total GLP-1濃度の上昇を有意に増加させた (Fig. 2-4C)。総採血量の上限を考慮し、total GLP-1濃度測定用の血液サンプルは、オリーブ油負荷3時間後の時点でのみ用意した。液体流動食負荷によっては、vehicleおよびCpdBを投与しても血中PYYおよびGLP-1濃度の上昇は検出されなかった。CpdBは、オリーブ油負荷2時間後の血中TG濃度の上昇を強力に阻害し、その阻害作用は10 mg/kgで頭打ちを示したことから (Fig. 2-4D)、この試験系において十分なMGAT2阻害が達成されていることが示唆された。これらの結果から、CpdBの経口投与は、正常マウスにおいて血中への脂質誘導性PYYおよびGLP-1の放出を増強することが示された。



**Figure 2-4. The effect of CpdB on plasma gut peptide levels in meal- or oil-loaded C57BL/6J mice.** Fasted C57BL/6J mice were loaded with a liquid meal or oil following administration of CpdB (10 mg/kg). (A) The brief schematic diagram of the experimental procedure. (B) Changes in plasma total PYY levels for 2 h post meal or oil load (0-2 h) and the AUC. (C) Plasma total GLP-1 levels at 3 h. (D) Plasma TG levels at 2 h post oil load. \*\* $P < 0.01$  vs. water-vehicle by Dunnett's test. † $P < 0.05$ , †† $P < 0.01$  vs. oil-vehicle by Tukey's test. # $P < 0.025$  vs. vehicle group by one-tailed Williams' test. Data are represented as the mean and SD values ( $n=5$ ).

#### 4. 正常C57BL/6JマウスにおけるCpdBの高脂肪食摂取に対する抑制作用

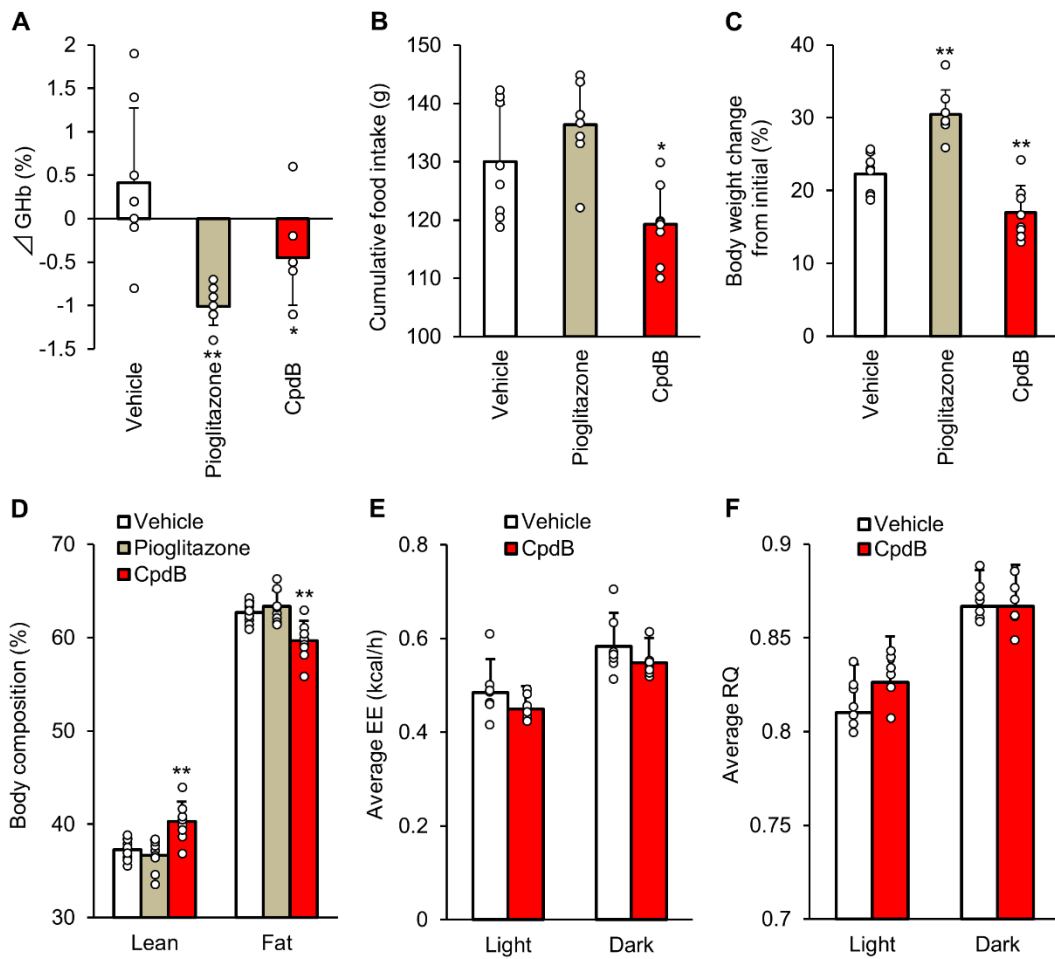
CpdB (10 mg/kg)の高脂肪食の摂取に及ぼす作用を調べるために、正常C57/BL6Jマウスにおいて、高脂肪食と低脂肪食に対する選択性を評価した (Fig. 2-5A)。長時間作用型 GLP-1 アナログであるリラグルチド (0.04 mg/kg)は、げっ歯類において、詳細なメカニズムは不明なものの嗜好性の高い餌の摂取量を選択的に減少させることが報告されていたため (Hansen 2012)、陽性対照として使用した。Vehicle 処置に比べて、CpdB 処置は高脂肪食の摂取量を有意に減少させ (Fig. 2-5B)、一方で低脂肪食の摂取量については増加傾向を示した (Fig. 2-5C)。これらの結果として、総エネルギー摂取量は有意に減少した (Fig. 2-5D)。これらの結果は、liraglutide ほど明確にはではないものの、正常マウスにおいて CpdB によるMGAT2 阻害は高脂肪食の摂取を選択的に抑制し、総エネルギー摂取量を抑制することを示唆している。



**Figure 2-5. The effect of CpdB on fat intake in a two-diet-choice test using C57BL/6J mice.** C57BL/6J mice pre-administered with CpdB (10 mg/kg) were given an HFD and an LFD simultaneously, and overnight intake of each diet was monitored. (A) The brief schematic diagram of the experimental procedure. Energy intake of (B) high-fat diet and (C) low fat diet and (D) total energy intake. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs. vehicle by Dunnett's test. Data are represented as the mean and SD values ( $n=5$ ).

## 5. 高脂肪食負荷 *ob/ob* マウスにおける CpdB の抗糖尿病および抗肥満作用

MGAT2 阻害の抗糖尿病作用および抗肥満作用を調べるために、重度の肥満症および2型糖尿病モデルである高脂肪食負荷 *ob/ob* マウスにおいて、CpdB (30 mg/kg)を 36 日間反復投与した。インスリン抵抗性改善薬であるピオグリタゾン は、以前の著者らの検討において本動物モデルで明確な抗糖尿病作用を示したことから、本実験において陽性対照として用いた。34 日間反復投与後 (day 34)、CpdB 処置は vehicle 処置に比べて有意に GHb レベルを低下させた (Fig. 2-6A および Table 2-2)。CpdB 処置は vehicle 処置に比べて、累積の食餌摂取量を減少させ (Fig. 2-6B)、体重増加を平均 23.9%抑制し (Fig. 2-6C)、体脂肪重量を低下させた (Fig. 2-6D)。Day 34 において、CpdB 処置群は Vehicle 処置群に比較して血漿中 AST・ALT 濃度の減少傾向を示し、血中インスリン濃度については減少傾向を示さなかった (Table 2-2)。Day36 において、平均のエネルギー消費量および呼吸商に、Vehicle 群と CpdB 群で差は認められなかった。これらの結果は、CpdB による MGAT2 阻害は、高脂肪食の過剰な摂取を抑制し、本マウスモデルにおいて肥満および糖尿病を改善することを示唆している。



**Figure 2-6. The effect of CpdB on diabetes and obesity in HFD-fed *ob/ob* mice.** CpdB (30 mg/kg) was administered orally once daily for 36 days in HFD-fed *ob/ob* mice. (A) Changes in GHb levels 34 days after the repeated dosing. (B) Cumulative food intake, (C) % changes in body weight and (D) lean and fat mass composition measured with Echo-MRI. (E) Average energy expenditure (EE) and (F) Respiratory quotient (RQ) during light and dark phase at day 36. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs. vehicle by Dunnett's test. Data are represented as the mean and SD values (n=7-8).

**Table 2-2. Levels of GHb and plasma biochemical parameters in HFD-fed *ob/ob* mice treated with the compounds.**

Parameter	Group	Pre		Post		
GHb (%)	Vehicle	5.9	± 0.2	6.4	± 1.0	
	Pioglitazone	5.9	± 0.3	4.9	± 0.4	**
	CpdB	5.9	± 0.4	5.4	± 0.6	*
Plasma insulin (ng/mL)	Vehicle	109	± 22	89.8	± 38	
	Pioglitazone	103	± 29	30.8	± 16	**
	CpdB	106	± 30	109	± 40	
Plasma AST (U/L)	Vehicle	291	± 50	611	± 150	
	Pioglitazone	314	± 61	733	± 174	
	CpdB	333	± 64	492	± 122	
Plasma ALT (U/L)	Vehicle	330	± 26	756	± 175	
	Pioglitazone	347	± 53	803	± 132	
	CpdB	378	± 76	632	± 144	

\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs. Vehicle by Dunnett's test.

Data are presented as the mean ± SD values (n=8).

## 第4節 考察

MGAT2 遺伝子の機能は、小腸における食餌性脂質の同化に限定されず、体重や血糖値など、全身のエネルギー恒常性の調節に寄与している (Devasthale 2018)。本研究は、CpdB による MGAT2 阻害が、正常マウスにおいて、摂食抑制作用を有する消化管ホルモンの分泌と、高脂肪食の摂取 (すなわち食事嗜好性) を調節することを明らかにし、高脂肪食負荷 *ob/ob* マウスにおいて肥満および糖尿病を改善する可能性を示した。マウス MTT における CpdB の食後血中 TG 濃度上昇抑制作用 (Fig. 2-2B および 2-2D) と、マウスにおける薬物動態のデータ (Fig. 2-3) から、本研究の試験において、CpdB の 1 日 1 回の投与は持続的な MGAT2 阻害を達成できていると考える。

消化管内分泌細胞は、管腔内の栄養素を認識し、GLP-1 や PYY などのペプチドホルモンを血中に放出する。脂質摂取に反応して、小腸下部に存在する L 細胞は、GLP-1 や PYY を分泌する (Husted 2017)。これら 2 つの消化管ホルモンは満腹ホルモンとしてよく知られ、それらは協調して食欲の調節に寄与している。60% kcal fat の高脂肪食を長期摂取した MGAT2 欠損マウスにおいて、野生型マウスに比べて食後の血中 GLP-1 濃度の上昇が観察された (Yen 2009)。他の低分子 MGAT2 阻害薬 JTP-103237 は、35% kcal fat の高脂肪食を摂取したラットにおいて脂質負荷後の血中 PYY 濃度を増加させたが、GLP-1 については増加させなかった (Okuma 2015)。著者らの以前の報告では (Take 2016)、*in vivo* における消化管ホルモンの影響は調べていない。本研究では、CpdB による MGAT2 阻害は、正常マウスにおいて、脂質投与後の血中 PYY と GLP-1 の濃度上昇を増大させることができた (Fig. 2-4B および 2-4C)。MGAT2 欠損マウスでは、糞中への脂質排出量を増加させることなく、脂肪酸や MG などの食餌性脂質の吸収が、小腸上部から下部へと移行し、その結果遅延していることが報告されている (Yen 2009, Tsuchida 2012)。加えて、いくつかの報告が、GLUTag 細胞において、MG が GLP-1 分泌を増加することを示している (Take 2016, Hassing 2016)。小腸管腔における MG の蓄積は、L 細胞の GPR119 を刺激して消化管ホルモンの放出を惹起することも報告されている (Hansen 2012)。それゆえ、CpdB は、脂質吸収を遅延させ、消化管下部に届く脂肪酸や MG を増加させ、その結果として L 細胞からの GLP-1 や PYY の血中への放出を促進しているのかもしれない。食餌性脂質の感知に関与している GPR40、GPR119 および GPR120 などを欠損したマウスが、CpdB に誘導される消化管ホルモン分泌のメカニズムについて更なる情報を提供するかもしれない。今後の興味の一つは、CpdB による GLP-1 分泌の増大によるメリットが、インクレチン作用を増大させる DPP-4 阻害薬との併用により増強されるかどうかである。



肥満の重要な特徴の一つは、脳報酬系において食物摂取に反応するドーパミン伝達が欠損していることであり、このことは、健康的な低脂肪の食事よりも肥満を悪化させるような高脂肪の食事へと嗜好性が高まることに寄与しているという説がある (Johnson 2010, Tellez 2013)。マウスにおいて MGAT2 の遺伝子欠損は、食事選択試験において脂質から糖質へと食餌嗜好性を変化させ、これは単純にエネルギー熱量が多い食事を避けたという単純なものではない (Mul 2014)。本研究では、マウスの食餌選択試験において、MGAT2 阻害剤が高脂肪食の摂取を選択的に阻害することを示した (Fig. 2-5B~D)。以前に報告した CpdA は、MGAT2 欠損マウスにおいて摂食抑制作用を示さず (Take 2016)、また、CpdB は CpdA と同様に選択的で強力な *in vitro* MGAT2 阻害活性を示した。それゆえ、CpdB の高脂肪食摂取抑制作用は、MGAT2 阻害活性に依存していると思われる。食餌性脂質の吸収不良もまた、MGAT2 遺伝子欠損も薬理的 MGAT2 阻害も糞中脂質含量を増加させなかったことが以前に報告されているため、本研究の結果には関与していないと考えている (Yen 2009, Take 2016)。げっ歯類を用いた複数の試験が、高脂肪食に対する嗜好性の調節のために、消化管と脳の情報伝達が重要な役割を担っていることを示している。例えば、体重増加は、食餌性脂質の満腹シグナルとして機能する生理活性脂質アミドであるオレオイルエタノールアミン (OEA) の小腸における産生に異常をもたらす (Tellez 2013)。また、食事性の脂肪酸は脳におけるドーパミン放出を誘導する一方で、2-オレオイルグリセロールは誘導しないことも報告されている (Kleberg 2015)。これとは別に、長時間作用型の GLP-1 アナログであるリラグルチドは、ラットにおいて嗜好性の高い食餌の摂取を優先的に減少させることが報告されており (Hansen 2012)、これは、高脂肪食に対する嗜好性の調節に GLP-1 シグナルが関与していることを示唆するものである。CpdB が脂質摂取を調節するメカニズムを理解するために、CpdB が小腸における OEA の産生を増加させるか、脳の報酬系に影響を与えるほど GLP-1 分泌を増強するか等について調べるのが有用かもしれない。特筆すべきこととして、より長期の試験が本研究結果の更なる理解を導くであろう。また、本研究結果に、脂質以外の栄養素や食餌の総エネルギー量が影響している可能性は完全に否定できない。

*ob/ob* マウスは、レプチン遺伝子に変異を有し、その結果として過食を伴った重度の肥満とインスリン抵抗性を伴った高血糖を示す。このマウスモデルは、肥満や2型糖尿病の治療を指向した栄養学および薬理的な研究において広く用いられている (Wang 2014)。*ob/ob* マウスもまた、正常マウスと比較して高脂肪食に対する嗜好性の増加を示すこと (Shimizu 2017)、そしてその肥満表現型は、高脂肪食で長期飼育することでさらに重篤度が増すことが報告されている (Trevaskis 2012)。本研究において、高脂肪食負荷 *ob/ob* マウスにおける CpdB の反復投与は、体重増加を緩和し、GHb の増加を完全に阻害した (Fig. 2-6A および 2-

6C)。著者らが知る限り、MGAT2 阻害薬が、本マウスモデルにおける重篤な肥満および糖尿病の改善に有用な作用を発揮することを示したのは初めてである。これらの作用は、主にエネルギーリッチな高脂肪食の過剰摂取が抑制されたことによると考えている (Fig. 2-6B)。5 週間の反復投与後、CpdB 処置は、vehicle 処置群と比較して非絶食時血漿中インスリン濃度を低下させなかった (Table 2-2)。対照的に、インスリン抵抗性改善薬であるピオグリタゾン、明確に血漿中インスリン濃度の低下を示した。加えて、明期でも暗期でも、CpdB によるエネルギー消費や呼吸商に対する明確な影響は認められなかった (Fig. 2-6E および 2-6F)。これらの結果は、インスリン抵抗性の改善と末梢臓器における脂質酸化の向上よりもむしろ、摂食量の減少が、高脂肪食負荷 *ob/ob* マウスにおける CpdB の抗肥満および抗高血糖作用に寄与しているという仮説を支持する。高脂肪食を負荷した MGAT2 遺伝子欠損マウスは、野生型マウスよりも暗期における酸素消費量が増加していることが報告されているため (Yen 2009)、CpdB の反復投与によりエネルギー消費量が増加しなかったことは予想に反していた。詳細は不明だが、*leptin* 遺伝子の変異や (Hwa 1997)、高脂肪食への暴露による重度の肥満表現型の誘導が (Trevaskis 2012)、エネルギー消費量の減少に影響しているのかもしれない。方法論について言えば、oxymax システムでの馴化期間について、本研究ではストレスの影響を減らすために 3 時間の馴化時間を設けたものの、より最適化することができるかもしれない。Vehicle 処置と比較して、CpdB は AST や ALT などの肝逸脱酵素の血漿中濃度を低下させる傾向を示した (Table 2-2)。その傾向は、主には体重増加の抑制、あるいは部分的には、マウス肝臓では MGAT2 の発現レベルはとて低いものの (Shi 2009, Cao 2004)、肝臓に対する直接的な作用に由来している可能性も考えられる。この考察は、MGAT2 阻害剤が、体重低下などの全身代謝の改善を介して非アルコール性脂肪肝炎の治療に対して有効である可能性 (Devasthale 2018) と関連しているだろう。著者らは、CpdB が正常 C57BL/6J マウスにおいて示したように、高脂肪食負荷 *ob/ob* マウスにおいても摂食抑制作用を有する消化管ホルモンの放出に影響を与え得るかについては確認できていない。高脂肪食負荷 *ob/ob* マウスにおける CpdB の作用に関わる因子を調べるには、更なる試験が必要だろう。

肥満症患者に対して効果的な減量を可能にする処置の一つが、肥満減量手術で、最もよく知られている術式がルーワイ胃バイパス (RYGB) 術である (Puzziferri 2014)。肥満 2 型糖尿病患者において、RYGB 術後すぐに体重減少だけでなく糖尿病が寛解することが知られている (Thaler 2009)。RYGB 術を受けた患者では、食事摂取に伴った GLP-1 や PYY のような消化管ホルモン分泌が増強し (Svane 2016)、食事性脂質に対する食欲低下や、嗜好性の高い食品が有する快楽的性質に対する感受性の低下 (Münzberg 2015, Ullrich 2013) が観察されている。これらの変化は、げっ歯類モデルにおいても報告されており (Hankir 2017)、RYGB 術

の有益な作用に寄与していると考えられている。しかしながら、そのメカニズムの詳細ははっきりしていない。本研究では、CpdB が、漠然と RYGB 術と同様に消化管ペプチドの分泌および高脂肪食の摂取を調節することを示した。また、MGAT2 の遺伝子欠損は、RYGB 術と同じく、下部小腸へ到達する脂肪酸や MG などの食餌性脂質を増加させる (Yen 2009, Tsuchida 2012)。RYGB 術が有益な作用をもたらすメカニズムが、MGAT2 阻害のそれと重複するかどうか詳細は不明であり、さらなる調査が必要である。

本研究では、MGAT2 阻害が、おそらく小腸における脂質/脂肪酸感知機構への介入により、脂質誘導性の消化管ペプチドの分泌と高脂肪食の摂取を調節することを示した。CpdB が高脂肪食の摂取を優先的に阻害するメカニズムを調べるためには、消化管の食事性脂質の感知に関連する GPCR や、消化管ホルモンの受容体を遺伝的に欠損したマウスモデルの使用が役に立つかもしれない。肥満の流行は拡大し続けており、エネルギー量や嗜好性が高い食事に手が届きやすいことは、その傾向を加速するドライビングフォースの一つであると考えられている (Swinburn 2011)。本研究で示した MGAT2 阻害薬の薬理作用に対する新たな知見は、MGAT2 の阻害が肥満やそれに関連する代謝性疾患の治療に有効であるというコンセプトを支持している。

## 第3章

# インスリン欠乏糖尿病病態におけるヒト人工多能性幹細胞由来膵内 分泌前駆細胞の移植後のインスリン分泌能力の検討

## 第1節 緒言

1型糖尿病は、膵β細胞が自己免疫の異常により破壊され、インスリンが不足することによって引き起こされる。現状のインスリン治療を以てしても血糖コントロールが困難な患者層が存在し、その病態はブリットル型1型糖尿病として知られている (Bertuzzi 2007)。これらの患者の quality of life は、無自覚低血糖や重篤な低血糖発作により著しく脅かされる。これらの患者において、膵島移植が有効な治療法であることが報告されている (Anazawa 2018)。しかしながら、効果が保証されているもののドナー不足という大きな障壁がある。ドナー不足を解決するため、近年、脳死ドナー由来膵島の代わりに、幹細胞由来の膵島や異種膵島を利用することが盛んに検討されている (Kieffer 2018, Latres 2019)。

多くの小動物を用いた試験において、ヒト胚性幹細胞 (ESC)やヒト人工多能性幹細胞 (iPSC)から作製した膵細胞が、1型糖尿病を根治する可能性を示している (Toyoda 2015, Kroon 2008, Rezania 2012)。その多くは、ヒト膵臓、膵島、β細胞の発生における知見を基にした段階的な *in vitro* 分化誘導プロトコルを利用している (Kieffer 2016)。急速な進捗があるものの、現状、*in vitro* で成熟膵島を完全に再現した機能的な内分泌細胞の凝集体を作製することはできていない (Veres 2019)。これは、移植後に生体環境において分化・成熟することの重要性を示唆する。

一般的に、生体内に移植された細胞は、液性因子や他種類の細胞との接着など、多くの環境因子に暴露される。これらの因子は、移植細胞の生着性、細胞周期、機能に影響し、未熟な細胞においては、分化や成熟過程にも影響を与える。実際、ホストの性別 (Saber 2018)や甲状腺ホルモンの不足 (Bruin 2016)は、*in vitro* で作製した未熟膵細胞の移植後の分化・成熟過程に影響を与えることが報告されている。1型糖尿病患者に対する ES 細胞由来の未熟膵細胞の移植試験が実施されているが (ClinicalTrials.gov NCT02239354, NCT03163511)、レシピエントの糖尿病病態が移植細胞の挙動に与える影響については明らかになっていない。

免疫不全マウスにおけるヒト ESC 由来膵前駆細胞 (Pancreatic endoderm cells; PECs)の移植後、ストレプトゾトシン (STZ)誘発性の糖尿病病態は、移植片由来インスリン分泌の指標である血中ヒト C-peptide 濃度の増加を高めることが報告されている (Bruin 2013)。移植後、一部の生着した PECs は、内分泌前駆細胞

(endocrine progenitor cells; EPCs)、未熟なホルモン産生細胞、そして $\beta$ 細胞を含む成熟内分泌細胞や膵島へと分化し、循環血中へとインスリン/C-ペプチドを放出すると考えられる。この研究では、血中ヒト C-ペプチド濃度の増加は、移植した PECs の分化が促進したことよるとしている (Bruin 2013)。しかしながら、それには移植細胞の生着、分化・成熟過程、増殖といった多様な細胞運命をはらんでいる。さらに、STZ 誘発性糖尿病病態では、低インスリン血症や高血糖、それらに続く全身レベルでの代謝変化が起きている。これら多くの因子が関与していることが、この現象の詳細なメカニズムを調査することの必要性を示している。

EPCs は、発生学的には PECs からホルモン産生細胞の方向に分化が進んだ細胞として位置付けることができ、膵内分泌細胞の初期段階の細胞である。それゆえ、EPCs は、PECs と比較して、EPCs への分化過程の影響が無視できるため、ホスト環境における未熟な内分泌細胞の運命を理解するために有用な可能性がある。また、理論的に EPCs は、PECs に比べて非内分泌細胞へと分化する可能性を秘める前駆細胞を少なく含んでいるため、その点においても EPCs の方が移植細胞としては好ましい。

本研究は、ヒト iPS 細胞から作製した EPCs を使用し、インスリン欠乏糖尿病病態が、未熟な膵内分泌細胞の移植後の挙動に与える影響とそのメカニズムを調べることを目的とした。著者らが知る限りでは初めて、インスリン欠乏糖尿病病態が、免疫不全マウスにおいて EPC 移植片のインスリン分泌能力を高めることを示した。さらに、糖尿病病態が、EPC 移植片の重量に影響を与えずに、移植片に含まれるインスリン産生細胞を含む内分泌細胞の数を増加させるというインスリン分泌能力を高める上で有益な影響を与えることを示した。

## 第 2 節 実験材料と方法

### 1. ヒト iPSCs の *in vitro* 分化誘導

前臨床研究用の 2 つのヒト iPSC 株 (Ff-I14s14 および Ff-WJ18) は、京都大学 iPSC 細胞研究所によって供給され、StemFit AK03N 培地 (味の素株式会社、東京都) を用いて継代・維持培養した。未分化のヒト iPSC を、計 16 あるいは 17 日をかけて、膵発生の重要なステージである、内胚葉 (ステージ 1)、原始腸管 (ステージ 2)、後方前腸 (ステージ 3)、膵内胚葉 (ステージ 4)、内分泌前駆 (ステージ 5) の段階的に分化誘導した。分化誘導には、既報プロトコルを一部改変したプロトコルを使用した [ステージ 1~4 (Toyoda 2015, Nostro 2015, Agulnick 2015, Russ 2015), ステージ 3-5 (Rezania 2014), ステージ 5 (Kunisada 2017, Pagliuca 2014)]。詳細は以下で、Fig. 3-1A に概要図を示した。ヒト iPSCs の使用は、武田薬品工業株式会社と京都大学の実験倫理委員会による承認を受けた。

ステージ 1: Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 培地 (12633012; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) に 2% (v/v) B27 (17504001; Thermo Fisher Scientific)、1% (v/v) ペニシリン/ストレプトマイシン (P/S; 168-23191; 富士フイルム和光純薬株式会社、大阪府)、5-100 ng/ml アクチビン A (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)、3  $\mu$ M CHIR99021 (Axon Medchem, Groningen, Netherlands)、10  $\mu$ M Y-27632 (富士フイルム和光純薬株式会社) および 1% (v/v) ジメチルスルホキシド (DMSO; 045-24511; 富士フイルム和光純薬株式会社) を添加してステージ 1 培地を調製した。未分化ヒト iPSCs をこの培地に再懸濁し、iMatrix-511 (381-07363; 富士フイルム和光純薬株式会社) をコートしたプレートに  $1-2 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup> の密度で播種し、1 日培養した。続いて 2 日間、細胞を 2% B27、1% P/S、5-100 ng/ml アクチビン A、1% DMSO を添加した RPMI 1640 培地で培養した。アクチビン A を 100 ng/ml で使用する場合、DMSO は培地中に添加しなかった。

ステージ 2: Improved MEM Zinc Option (iMEM) 培地 (Thermo Fisher Scientific) に 1% B27、1% P/S (iMEM-B27) および 50 ng/ml ケラチン細胞成長因子 (KGF; R&D Systems) を添加してステージ 2 培地を調製し、細胞をこの培地で 4 日間培養した。

ステージ 3: iMEM-B27 に、50 ng/ml KGF、0.5  $\mu$ M 3-keto-*N*-aminoethyl-*N'*-aminocaproyldihydrocinnamoyl cyclopamine (KAAD-CYC; Toronto Research Chemicals, Toronto, Canada)、10 nM 4-[(*E*)-2-(5,6,7,8-tetrahydro-5,5,8,8-tetramethyl-2-naphthalenyl)-1-propenyl] benzoic acid (TTNPB; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA)、100 ng/ml ノギン (Pepro-tech, Rocky Hill, NJ, USA) および 250  $\mu$ M L-アスコルビン酸 (A4544; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) を添加してステージ 3 培地を調製し、細胞をこの培地で 2 もしくは 3 日間培養した。

ステージ 4: 細胞を 0.25% トリプシン-エチレンジアミン四酢酸 (EDTA) で剥離し、穏やかにピペッティングして単細胞化し、iMatrix-511 でコートしたプレートに  $3-4 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup> の密度で再播種した。培地は、iMEM-B27 に 100 ng/ml KGF、50 ng/ml 上皮成長因子 (EGF; R&D Systems)、10 mM ニコチンアミド (株式会社ベリタス、東京都)、50  $\mu$ M Y-27632 および 250  $\mu$ M L-アスコルビン酸を添加したステージ 4 培地を使用し、4 日間培養した。

ステージ 5: 凝集培養のために、上述のように細胞を剥離して単細胞化し、低接着 96 ウェルプレートに  $30 \times 10^3$  cells/well で播種した。培地は、iMEM-B27 に 250 nM SANT-1 (S4572; Sigma-Aldrich)、50 nM レチノイン酸 (Sigma-Aldrich)、10  $\mu$ M ALK5 inhibitor II (SC-221234A; Santa Cruz Biotechnology)、100 nM LDN193189 塩酸塩 (HY-12071A; Medchemexpress, Monmouth Junction, NJ, USA)、1  $\mu$ M L-3,3',5-triiodothyronine (64245; Merck Millipore, Burlington, MA, USA)、1  $\mu$ M XAV939 (X3004; Sigma-Aldrich)、50 ng/ml 線維芽細胞増殖因子-2 (100-18B; Pepro Tech, London, UK)、1  $\mu$ M  $\gamma$ -secretase inhibitor XXI (Compound E, 565790; Merck Millipore)

および 10  $\mu$ M Y-27632 を添加したステージ 5 培地を使用し、3 もしくは 4 日間培養した。作製した凝集体をマウス移植試験に使用した。

EPC についての追加情報を Table 3-1 に示した。各ステージでの分化誘導の程度は、膵内分泌細胞の発生過程に基づき、既報 (Toyoda 2015) と同様にフローサイトメトリー (FCM) と免疫染色によって評価した。使用した抗体の詳細を Table 3-2 に示す。In vitro における EPC からインスリン産生細胞への分化誘導は、既報のプロトコル (Rezania 2014, Pagliuca 2014) を使用し、以下に詳細を示す。

低接着 96 ウェルプレートに作製した EPC 凝集体を、iMEM-B27 に 10  $\mu$ M ALK5 Inhibitor II、100 nM LDN193189 塩酸塩および 1  $\mu$ M L-3,3',5-triiodothyronine を添加した培地で 10 日間培養した。グルコースについて、200 mg/dL (低グルコース) を含有する培地、またはグルコース (G8769; Sigma) を添加して 540 mg/dL (高グルコース) を含有する培地を使用した。インスリンの影響を低下させるため、インスリン不含の B27 (A1895602; Thermo Fisher Scientific) を使用した培地、または合成ペプチド S961 (Phoenix Pharmaceuticals, Burlingame, CA, USA) を添加した培地を使用した。S961 は 100 nM で強力なインスリン受容体アンタゴニストとして作用する (Knudsen 2012)。各群について 48 個の凝集体を使用し、培地交換は 3 もしくは 4 日間おきに行った。10 日間の培養後、INS<sup>+</sup>NKX6.1<sup>+</sup>細胞および INS<sup>+</sup>Ki67<sup>+</sup>細胞への分化誘導効率を FCM により評価した。3 回の独立した試験を、各々異なるバッチの EPC を用いて実施した。INS<sup>+</sup>NKX6.1<sup>+</sup>細胞の FCM 解析時のゲーティングは、全ての試験において、10 日間の培養開始時において INS<sup>+</sup>NKX6.1<sup>+</sup>細胞が 1.5% 以下になるように設定した。細胞数は、NC200 (Chemometec, Allerod, Denmark) を用いて測定した。

## 2. 動物

7-15 週齢の雄性 NOD.CB17-Prkdc<sup>scid</sup>/J マウス (NOD/SCID; 日本チャールス・リバー株式会社、神奈川県) に、STZ (Sigma-Aldrich) を用量 50 mg/kg で 5 日間腹腔内投与し、糖尿病モデルを作製した。同週齢 NOD/SCID マウスに、STZ の溶媒として使用した 0.05 M クエン酸緩衝液 (pH 4.5) を同様に投与 (10 ml/kg) し、非糖尿病マウスとして使用した。糖尿病 Akita-NOD/SCID マウスは、雄性 AKITA/Slc マウス (Akita; 日本エスエルシー株式会社、静岡県) と雌性 NOD/SCID マウスの交配により作製した。高血糖を示す仔マウスを選抜し、NOD/SCID マウスと 10 代以上戻し交配した。SCID と *Ins2<sup>Akita</sup>* の両方の変異は、PCR による遺伝子型判定で確認した。同週齢の *Ins2<sup>Akita</sup>* 変異を有しない NOD/SCID マウスを、野生型 (WT) の非糖尿病マウスとして使用した。動物は、特に記載がない限り、通常食 (CE-2; 日本クレア株式会社、東京都) の自由給餌と自由飲水条件下で飼育し、温度 20-26°C、湿度 40-70%、12 時間の明暗周期の環境で単飼育した。動物の取り扱いおよび実験は、武田薬品工業株式会社の実験動物倫理委員会の定める基準に準じて実施し

た。全ての移植試験において、マウスは非絶食時血糖値と体重を基に群分けを実施した。

### 3. 移植および移植片の *in vivo* 評価

イソフルラン吸引麻酔下において、マウスの腎被膜下へ EPCs の凝集体 ( $30 \times 10^3$  cells/凝集体)を 192 個移植した。腎被膜下 (腎被膜と腎実質の間)は、移植片の状態を目視で確認しやすく、また、血管が誘導されやすく高い生着率が見込めるため、移植部位として選択した。各試験において、個体間で同一バッチの EPC を使用した。偽手術群のマウスを用意した試験もある。全てのマウスに、移植時にメロキシカム (1 mg/kg, Metacam; Boehringer-Ingelheim, Ingelheim am Rhein, Germany)を単回皮下投与した。移植後に指定の週数において、覚醒下で尾静脈より採血し、ヘパリン/アプロチニン処置後に 4°C にて遠心し、血漿を採取した。血漿中ヒト C-ペプチド濃度を移植片のインスリン分泌能力や機能を評価するために測定した。経口グルコース負荷試験では、一夜絶食後にグルコースを強制経口投与した (2 g/kg)。グルコース投与直前および投与後指定の時間において尾静脈より採血した。

### 4. インスリン持続投与

STZ 誘発性の糖尿病 NOD/SCID マウスに、浸透圧ポンプ (Model 1002, Alzet; DURECT Corporation, Cupertino, CA, USA)を皮下に留置してヒトインスリン (50 nmol/kg/day; 株式会社ペプチド研究所、大阪府)を 14 日間持続投与した。外因性インスリンに対して感受性を示す個体で評価するため、インスリン処置により非絶食時血糖値が低下した個体のみ EPCs を移植した。EPCs 移植 4 および 8 週間後において、11 週までインスリンを持続投与するために、浸透圧ポンプを新しいものに入れ替えた (Model 1004, Alzet; DURECT Corporation)。低血糖状態を防ぐために、インスリンの投与量は、非絶食時血糖値に基づいて個体別に 40-60 nmol/kg/day の間で調節した。インスリン持続投与を受けていない同週齢の糖尿病 NOD/SCID マウスと非糖尿病 NOD/SCID マウスに対しても EPCs を移植した。

### 5. 高脂肪食 (HFD)負荷

非糖尿病の 7 週齢の NOD/SCID マウスに EPCs を移植し、その直後から移植 12 週間まで HFD (D12492; Research Diets, Inc., New Brunswick, NJ, USA)を給餌した。通常食を給餌した同週齢の非糖尿病 NOD/SCID マウスを control diet (CD)群として使用した。

### 6. ダパグリフロジンの反復投与



STZ 誘発性の糖尿病 NOD/SCID マウスに、vehicle (0.5% メチルセルロース, w/v)もしくはナトリウム/グルコース共輸送体 2 (SGLT2)選択的阻害剤であるダパグリフロジン (10 mg/kg)を 1 日 1 回、4 週間経口投与 (10 ml/kg)した。ダパグリフロジンは株式会社ナード研究所 (兵庫県)より購入し、0.5% メチルセルロース溶液に懸濁した。Vehicle 処置群とダパグリフロジン処置群を各々2 群に分け、EPCs の移植もしくは偽手術を実施した。その後、vehicle もしくはダパグリフロジン処置を 12 週間継続した。Vehicle 処置をした同週齢の非糖尿病 NOD/SCID マウスも用意し、EPCs を移植した。

## 7. 蛍光免疫染色

移植用の細胞凝集体および移植後に摘出した移植片を、4°C にて 4% パラホルムアルデヒドで固定し、既報 (Toyoda 2015)と同様の方法で蛍光免疫染色工程を進めた。使用した抗体を Table 3-2 に示す。蛍光撮像は、BZ-X710 蛍光顕微鏡 (株式会社キーエンス、大阪府)を用いて行った。移植片全体と、chromogranin A (CHGA)、NK6 homeobox 1 (NKX6.1)、インスリン (INS)およびグルカゴン (GCG)に陽性を示す面積を cellSens Dimension ソフトウェア (オリンパス株式会社、東京都)を用いて定量解析した。陽性面積の定量は、既報 (Bruin 2015)と同様に実施した。具体的には、各移植片につき最低 100  $\mu\text{m}$  以上の間隔が空いた薄切切片を 3 もしくは 4 枚用意して蛍光免疫染色を行い、各切片で陽性を示した面積の平均値を用いて移植片全体の値を算出した。各切片について、移植片の面積は腎実質との境界に基づいて設定した。INS<sup>+</sup>Ki67<sup>+</sup>細胞数は、各移植片につき最低 100  $\mu\text{m}$  以上の間隔が空いた薄切切片を 4 枚用意し、盲検条件でマニュアルカウントし、各切片でのカウント数の平均値を移植片全体の値として採用した。

## 8. 血中指標の測定

血糖は ACCU-CHEK Aviva (ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社、東京都)を用いて測定した。ヒト C-ペプチドおよびヒトインスリンの血漿中濃度は、各々の ELISA キット (Mercodia, Uppsala, Sweden)を用いて測定した。血漿中マウスインスリンは、Morinaga mouse insulin ELISA キット (株式会社森永生科学研究所、神奈川県)を用いて測定した。

## 9. ホルモン含量の測定

移植片全体を腎臓から慎重に剥がし、重量を測定した後、以下の手順でヒトインスリンおよびグルカゴンの含量を測定した。移植片全体を 75% エタノール/0.15N 塩酸溶液中で破碎して均質化し、その後、4°C で一夜保管した。遠心分離により細胞片を除いた後、上清中のヒトインスリンおよびグルカゴンの濃度を ELISA キット (Mercodia)を用いて測定した。同様の方法で細胞凝集体のホルモン

含量を測定した。膵インスリン含量についても、膵尾部の小片を同様に処理し、mouse insulin ELISA キット (株式会社森永生科学研究所)を用いて測定した。

#### 10. 統計解析

データは平均値と標準偏差で示した。2 群間の比較は、Student's *t*-test もしくは Aspin-Welch test を行い、多重性は Bonferroni 法で補正した。血中指標の群間差は、分散分析 (ANOVA)により評価した。また、Bartlett's test で等分散性を検定した後、多群比較のために Bonferroni 補正 Dunnett's test で解析した。

**Table 3-1: Additional information on EPCs generated *in vitro* from hiPSCs.**

<b>Figure</b>	<b>iPSC line</b>	<b><i>In vitro</i> differentiation</b>	
		<b>Period of stage 3 (days)</b>	<b>Period of stage 5 (days)</b>
3-1, 3-2, 3-3, 3-9, 3-10, and 3-11	Ff-I14s14	2	3
3-4	Ff-I14s14	2	4
3-5A, 3-5B and 3-7A~C	Ff-WJ18	2	3
3-5C, 3-5D, and 3-6	Ff-I14s14	3	3
3-7D~F	Ff-WJ18	3	3
3-8	Ff-WJ18	2	3

**Table 3-2: The information on antibodies used in this study.**

<b>Primary antibody</b>	<b>Species</b>	<b>Source</b>	<b>Dilution</b>
SOX2	Rabbit	35795, Cell Signaling Technology	1:100
SOX17	Goat	AF1924, R&D Systems	1:500
FOXA2	Rabbit	07-633, EMD Millipore	1:100
PDX1	Goat	AF2419, R&D Systems	1:200
NKX6.1	Mouse	F55A12, University of Iowa	1:360
CHGA	Rabbit	ab68271, Abcam	1:500
Neurogenin3	Sheep	AF3444, R&D Systems	1:2000
Insulin	Rabbit	C27C9, Cell Signaling Technology	1:200
*Insulin	Rat	GN-ID4, University of Iowa	1:600
Glucagon	Mouse	G2654, Sigma-Aldrich	1:200
Ki67	Mouse	550609, BD Pharmingen	1:100
Ki67	Rabbit	D3B5, Cell Signaling Technology	1:100
CK19	Mouse	M088, Dako	1:200
Trypsinogen	Sheep	AF3848, R&D Systems	1:100
SOX9	Rabbit	ab196450, Abcam	1:100

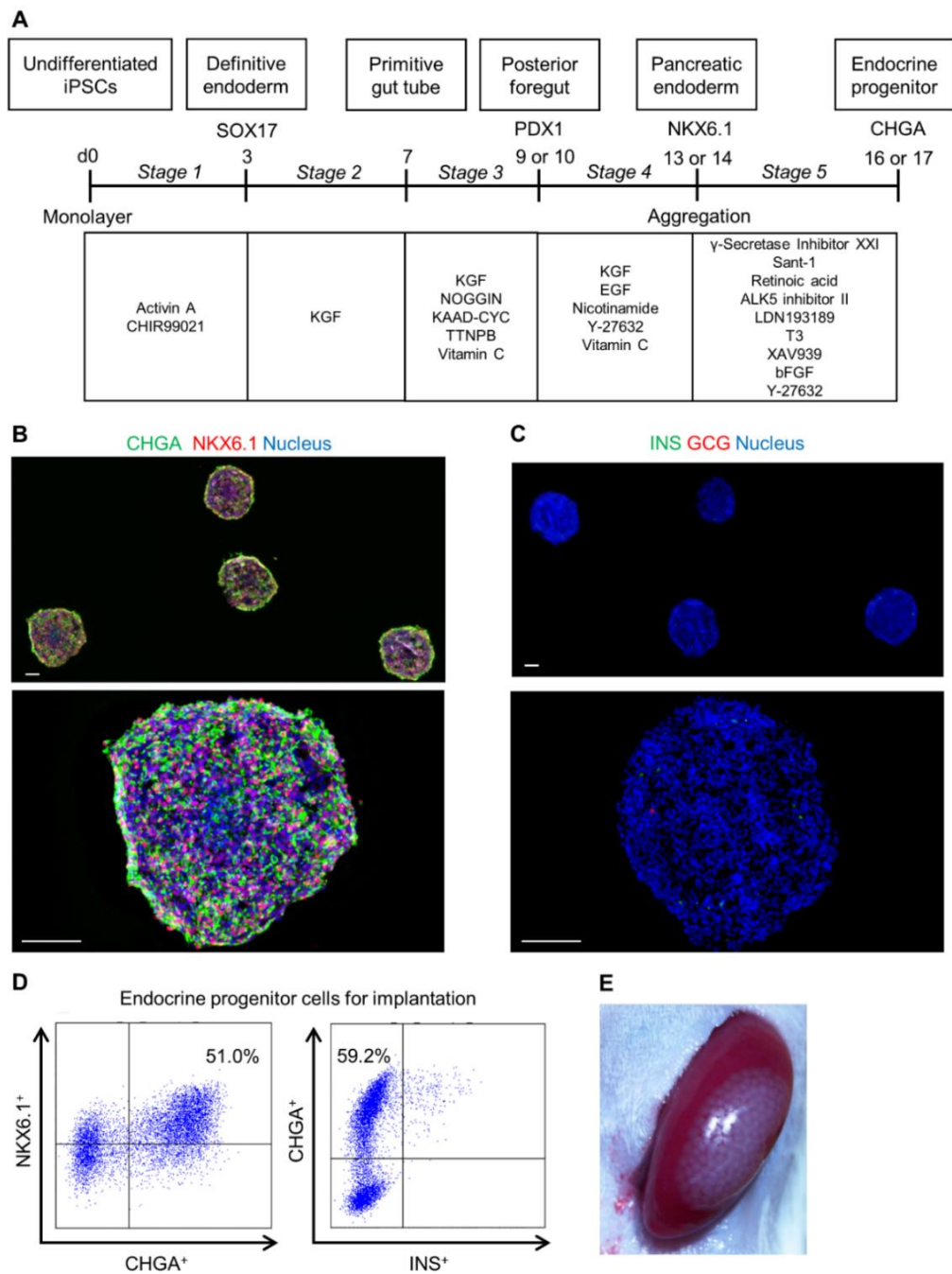
<b>Fluorescent secondary antibody</b>	<b>Source</b>	<b>Dilution</b>
Nucleus	Hoechst 33342; H3570, Invitrogen	1:200
Alexa 488 conjugated	For each species; all from Invitrogen	1:500
*Alexa 546 conjugated	For each species; all from Invitrogen	1:500
Alexa 594 conjugated	For each species; all from Invitrogen	1:500

\*: Used only for flow cytometry

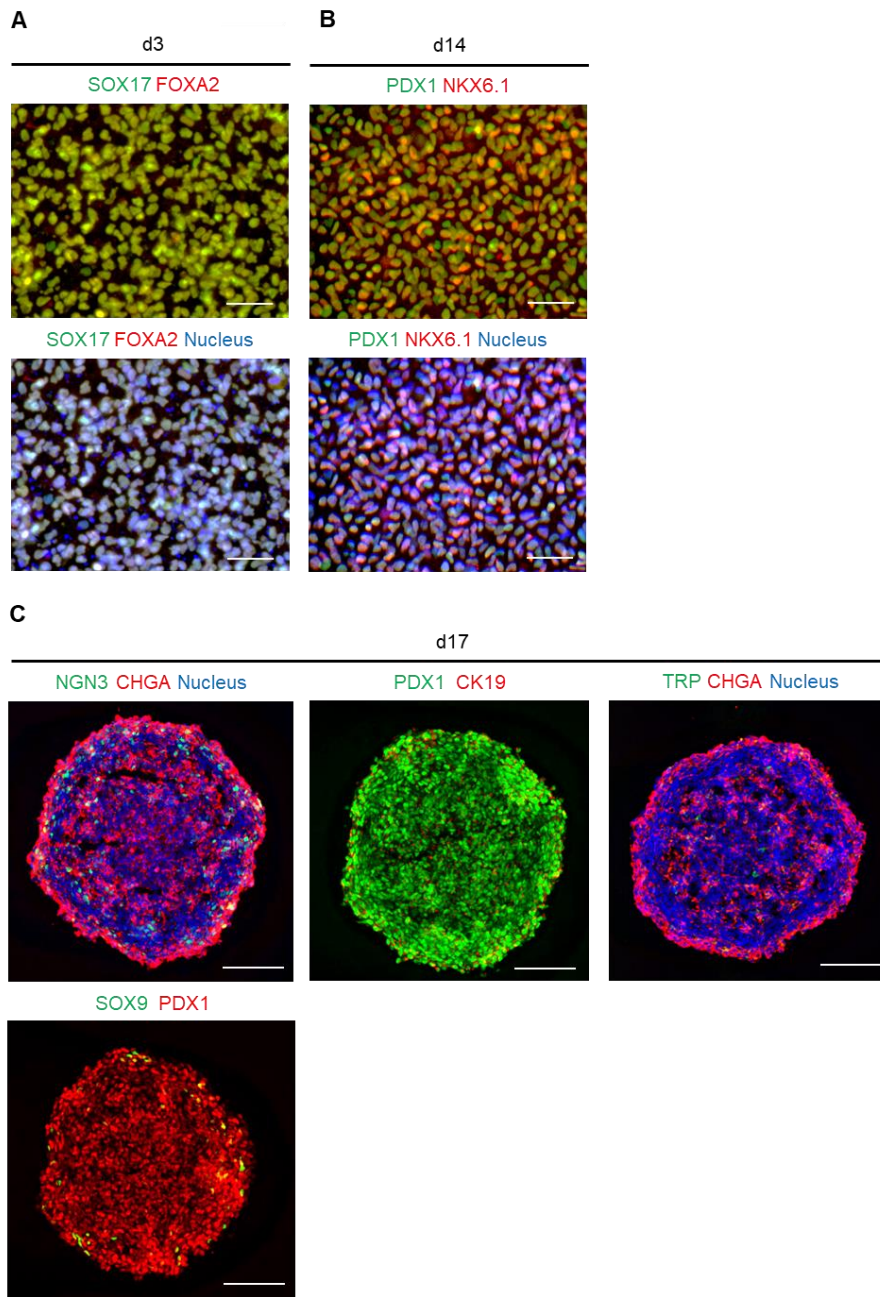
### 第3節 結果

#### 1. *In vitro* 分化誘導で作製した EPCs のプロファイル

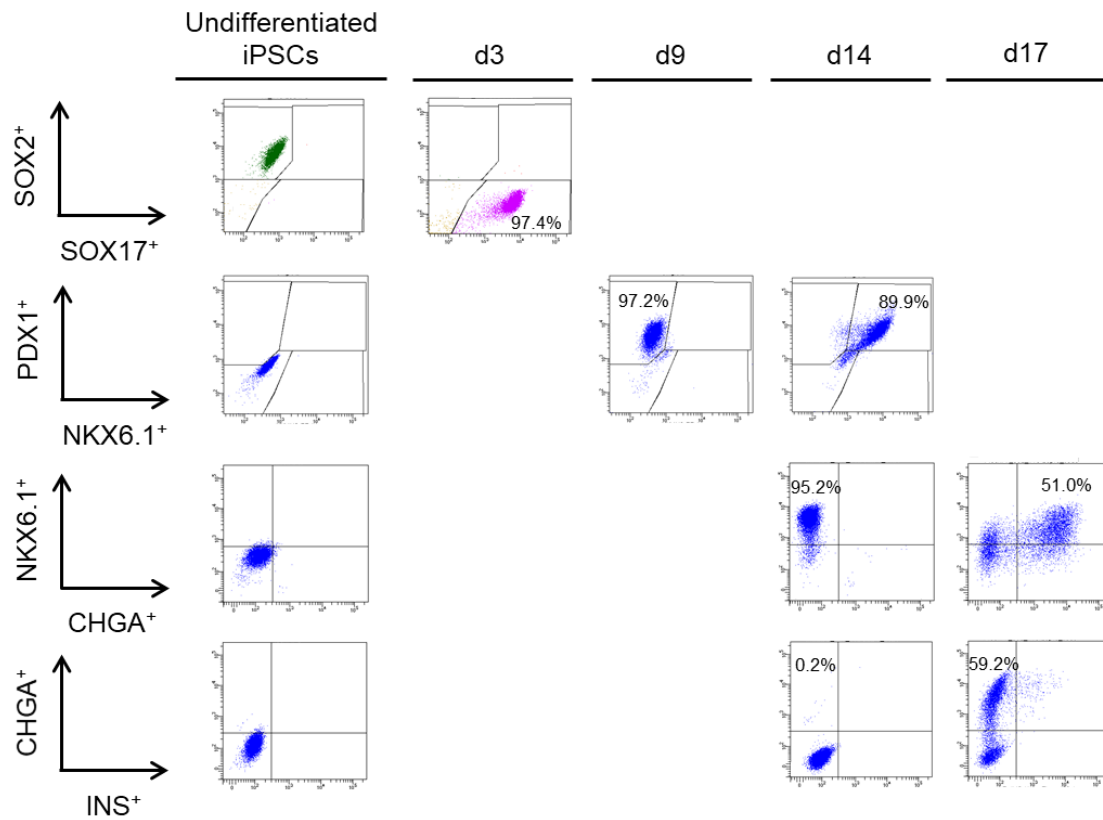
ヒト iPSC (Ff-I14s04 株)を、Fig. 3-1A に示す分化誘導プロトコルで EPCs へと分化誘導した。既報のように (Toyoda 2015)、ステージ1 [SRV-box (SOX)17<sup>+</sup>forkhead box (FOX)A2<sup>+</sup>を指標]とステージ4 [pancreatic and duodenal homeobox 1(PDX1)<sup>+</sup>NKX6.1<sup>+</sup>を指標] (Fig. 3-2A および 3-2B)において高い分化誘導効率を示し、ステージ5 では細胞を一度解離して凝集体を形成させた。内胚葉細胞として SOX17<sup>+</sup>細胞、膵内胚葉細胞として PDX1<sup>+</sup>NKX6.1<sup>+</sup>細胞、内分泌/内分泌前駆細胞として CHGA<sup>+</sup> (Cai 2014)細胞の分化誘導効率を FCM により測定し、各々の平均誘導効率は 98.6±1.1%, 90.1±0.6%, 59.4±4.2%であった。CHGA<sup>+</sup>細胞の大部分 (52.9±4.0%)は NKX6.1 を共発現しており、これは β 細胞に分化する可能性を示唆している。一方で、インスリンおよびグルカゴンを発現する細胞はほとんど含まれていなかった (Fig. 3-1B および 3-1C)。1 ロットの実験において、*in vitro* 分化誘導マーカーの代表的な FCM プロットを Fig. 3-1D および Fig. 3-3 に示す。内分泌前駆細胞のマーカーである neurogenin-3 (NGN3)に関しては、既報 (Yamashita-Sugahara 2016)でも示されているように、その発現はステージ5 の間で一過性であり (データ不記載)、免疫蛍光染色では EPCs の大部分で NGN3 シグナルは検出されなかった (Fig. 3-2C)。それゆえ、本研究では、NGN3 の発現ピークを越した内分泌前駆細胞の集団を EPCs と定義する。移植試験に使用された EPC 凝集体は、膵上皮マーカーである cytokeratin 19 (CK19) (Lyttle 2008)を発現する細胞を含み、外分泌マーカーであるトリプシノーゲンや多能性前駆細胞マーカーである SOX9 (Seymour 2017)を発現する細胞はほとんど含まれていなかった (Fig. 3-2C)。



**Figure 3-1. *In vitro* generated EPC aggregates for implantation contain high proportion of CHGA<sup>+</sup>NKX6.1<sup>+</sup> cells while very few INS<sup>+</sup> or GCG<sup>+</sup> cells.** EPCs for implantation were generated from hiPSCs by stepwise differentiation. (A) A schematic diagram of the differentiation procedures. Representative cryosectional images of Ff-I14s04-derived EPC aggregates stained for (B) endocrine/endocrine progenitor marker CHGA and pancreatic progenitor marker NKX6.1 and (C) pancreatic hormones INS and GCG. Nuclei were stained with DAPI. The lower panels show magnified images. (D) Representative dot plots indicating differentiation efficiency into endocrine progenitor stage (CHGA<sup>+</sup>NKX6.1<sup>+</sup> and CHGA<sup>+</sup>INS<sup>-</sup>). The differentiation induction efficiency was inserted. (E) A representative image of a host kidney with sub-capsular implantation of EPC aggregates. Scale bars, 100  $\mu$ m.



**Figure 3-2. Immunostaining of the cell population in EPC aggregates.** Representative immunofluorescence images of planar cultured cells stained for (A) SOX17/FOXA2 and (B) PDX1/NKX6.1 at d3 and d14, respectively. (C) Representative cryosectional images of EPC aggregates stained for the indicated markers. Nuclei were stained with DAPI. Scale bars, 50  $\mu$ m in (A) and (B); 100  $\mu$ m in (C). TRP, trypsinogen.



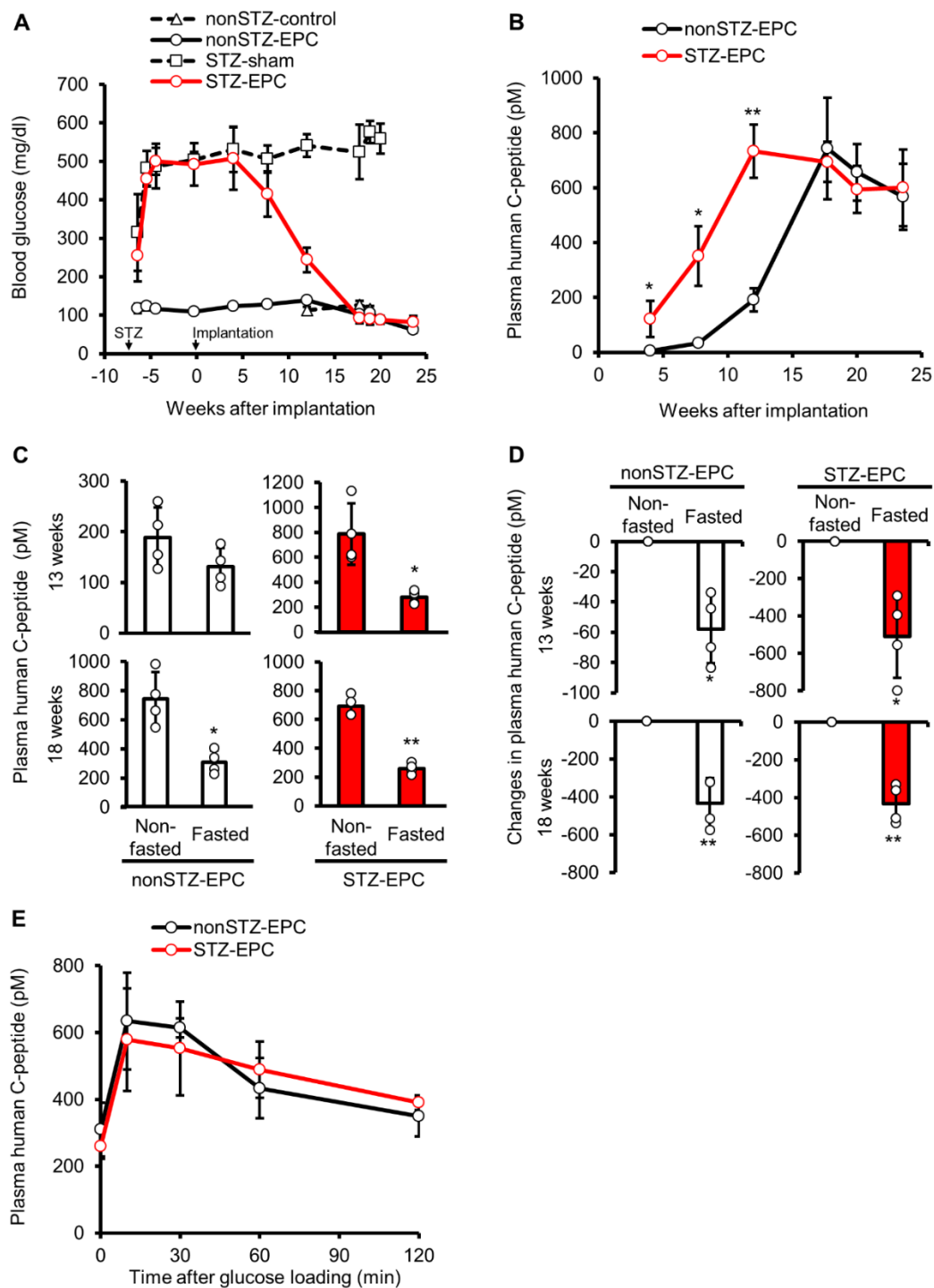
**Figure 3-3. EPCs are differentiated from human iPSCs by *in vitro* directed differentiation.** Cell populations at individual stages were analyzed by flow cytometry. Representative dot plots indicating high differentiation efficiency of definitive endoderm SOX17<sup>+</sup>SOX2<sup>-</sup> cells at d3, posterior foregut PDX1<sup>+</sup>NKX6.1<sup>-</sup> cells at d9, pancreatic endoderm PDX1<sup>+</sup>NKX6.1<sup>+</sup> cells at d14, and endocrine progenitor NKX6.1<sup>+</sup>CHGA<sup>+</sup> and CHGA<sup>+</sup>INS<sup>-</sup> cells at d17. Each of these differentiation induction efficiencies is inserted.



## 2. 糖尿病ホストにおける EPCs の移植後インスリン分泌能力

ホストのインスリン欠乏糖尿病病態が EPCs の移植後の挙動に影響を検討するために、STZ で糖尿病を誘発した NOD/SCID マウスの腎被膜下に EPCs を移植し、移植片の機能を評価した。STZ 糖尿病マウスでは、STZ 非処置のマウスと比べて非絶食時血糖が高値を示した (平均 504-576 mg/dL)。しかし、EPCs の移植は移植後 12 週までに血糖値を低下させ、18 週後には血糖は正常化した (平均 82-93 mg/dL) (Fig. 3-4A)。移植片由来インスリンの指標である血漿中ヒト C-ペプチドの濃度は、STZ 非処置の non-STZ 非糖尿病マウスでも糖尿病 STZ マウスでも時間の経過と共に増加したが、移植後早期において (4-13 週)、非糖尿病マウスに比べて糖尿病マウスの方が高値を示した (Fig. 3-4B)。血漿中ヒト C-ペプチド濃度は、両群とも 700 pM 程度でプラトーに達し、プラトーに達した以降の血糖値は正常範囲内だった。糖尿病マウスの内因性インスリン欠損状態は、EPCs の移植の影響を受けずに維持されていること、また、移植後早期において血中マウス C-ペプチド濃度が non-STZ マウスに比べて STZ マウスで劇的に低いことを確認した (データ不記載)。これらの結果は、ホスト糖尿病環境が EPC 移植片のインスリン分泌能力を高めることを示している。

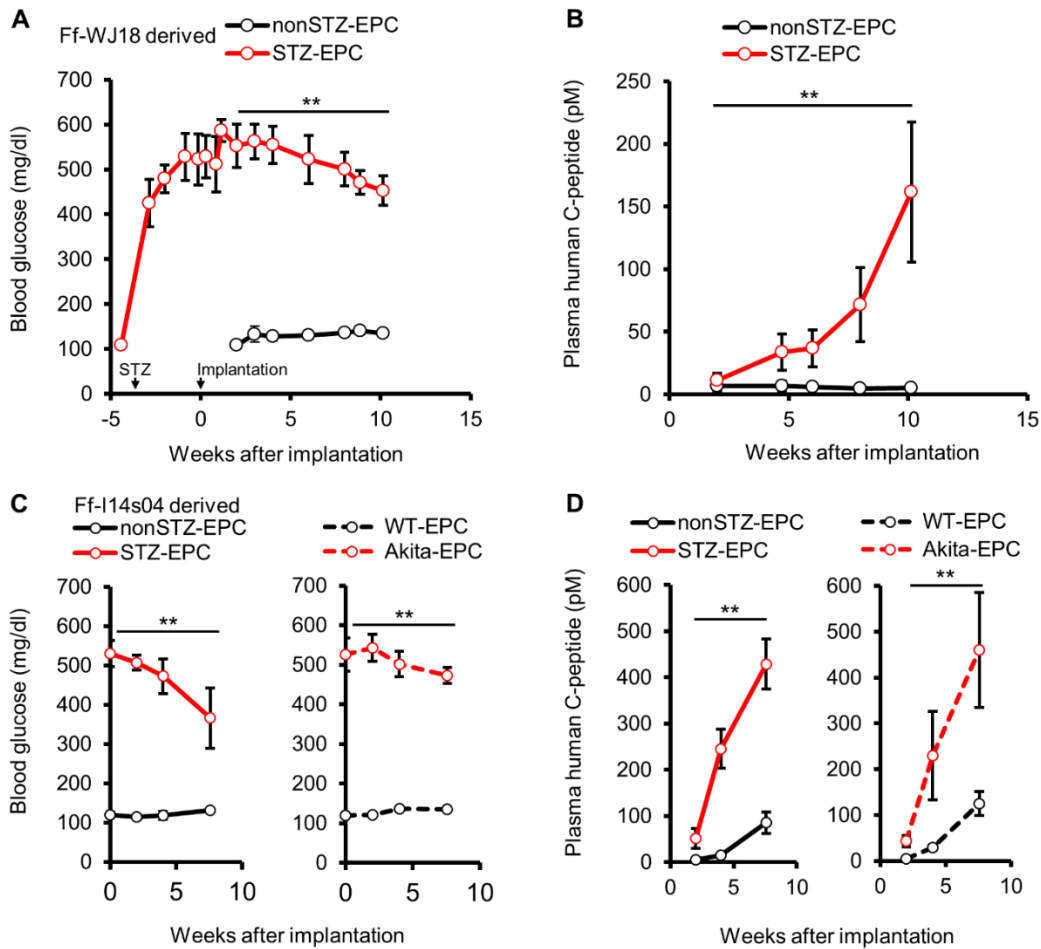
糖尿病病態が EPC 移植片の膵  $\beta$  細胞としての成熟を促進するかを調べるために、移植後 13 および 18 週において、絶食時と非絶食時の血漿中ヒト C-ペプチド濃度を比較した。一夜絶食により血漿中ヒト C-ペプチド濃度は STZ マウスでも nonSTZ マウスでも低下していた (Fig. 3-4C および 3-4D)。さらに、経口グルコース負荷後の血中ヒト C-ペプチド分泌についても、STZ マウスと nonSTZ マウスで同等であり、移植後 18 週において移植片の  $\beta$  細胞としての機能的成熟に両群で差がないことが示された (Fig. 3-4E)。これらの結果は、EPC 移植片のインスリン分泌能力の向上 (Fig. 3-2B)は、 $\beta$ -cell としての成熟の程度の差によるものではないことを示唆している。ホストの糖尿病病態は移植後早期 (4~13 週)にインスリン分泌能力を高めたので、以降の評価は移植後早期に着目して実施した。



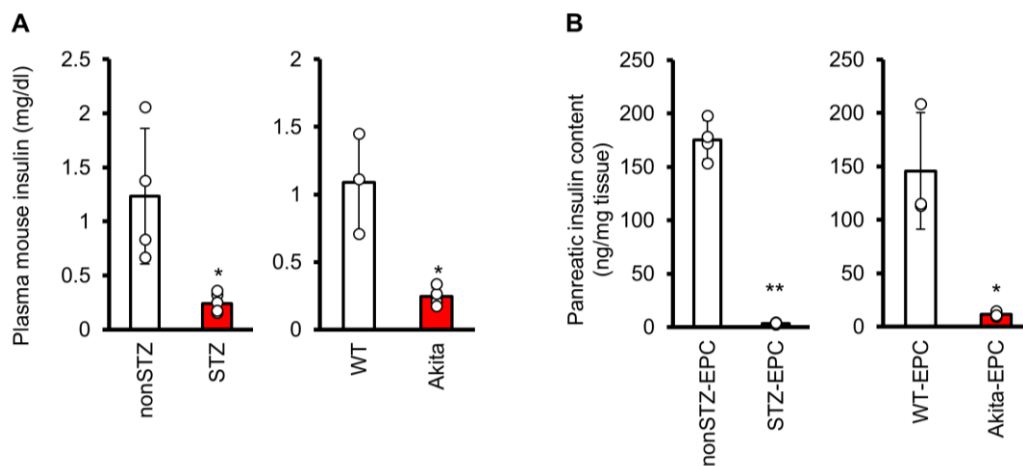
**Figure 3-4. Insulin-deficient diabetic environment in host upregulates insulin secreting capacity of the grafts derived from EPCs.** NOD/SCID mice were injected intraperitoneally with 50 mg/kg of STZ for 5 consecutive days to induce diabetes or with vehicle buffer for non-diabetic control (nonSTZ). Six weeks later, each mouse was implanted Ff-I14s04-derived EPCs under the kidney sub-capsule (STZ-EPC and nonSTZ-EPC). Sham-operated STZ mice (STZ-sham) and non-operated nonSTZ mice (nonSTZ-control) were also prepared. Levels of (A) non-fasting blood glucose and (B) plasma human C-peptide were measured at the indicated weeks after implantation in the indicated

groups. (C) Plasma human C-peptide levels before and after an overnight fast were measured and (D) changes in the levels (D) were calculated at 13 and 18 weeks after implantation in the indicated groups. (E) An oral glucose tolerance test (2 g/kg) was performed at 18 weeks after implantation. Data are presented as the mean  $\pm$  SD. \* $P$  < 0.05, \*\* $P$  < 0.01; STZ-EPC vs. nonSTZ-EPC by Bonferroni adjusted Student's or Aspin-Welch's t-test in (B). \* $P$  < 0.05, \*\* $P$  < 0.01; fed vs. fasted by Student's or Aspin-Welch's paired t-test in (C and D). nonSTZ-control (n=3), nonSTZ-EPC (n=3-6), STZ-sham (n=4), and STZ-EPC (n=3-6).

次に、インスリン欠乏糖尿病の EPC 移植片インスリン分泌能力に与える影響が、iPSC の株に依存しているかを検討するために、別株として Ff-WJ18 由来の EPCs を使用した。Ff-WJ18 由来 EPCs は、各分化誘導段階において、SOX17<sup>+</sup> (内胚葉)細胞を 97.8±1.0%、PDX1<sup>+</sup>NKX6.1<sup>+</sup> (膵内胚葉)細胞を 74.4±13.7%、CHGA<sup>+</sup> (内分泌前駆)細胞を 58.3±14.4%含み、一方でインスリン発現細胞をほとんど含んでいなかった。この細胞を STZ 糖尿病 NOD/SCID マウスの腎被膜下に移植した。高血糖を示す STZ 糖尿病マウスでは、血漿中ヒト C-ペプチド濃度は移植後 10 週まで持続的に増加したが、一方で STZ 非処置の非糖尿病マウスでは増加は明らかではなかった (Fig. 3-5A および 3-5B)。加えて、別の糖尿病マウスモデルでも評価するために、インスリン依存性糖尿病を引き起こす *Ins2<sup>Akita</sup>* 変異を有する Akita-NOD/SCID マウスも使用した。血漿中および膵臓中の内因性マウスインスリンは、どちらの糖尿病モデルにおいてもほとんど欠損していることを確認し (Fig. 3-6)、高血糖の程度も両糖尿病モデルで同様だった (Fig. 3-5C)。EPC 移植により、血漿中ヒト C-ペプチド濃度は移植後 8 週まで持続的に増加し、そのレベルは糖尿病マウスの方が各々対照として用意した非糖尿病マウスに比べて高かった (Fig. 3-5D)。これらの結果より、ホスト糖尿病病態による EPC 移植片インスリン分泌能力の増強は、使用する iPSC 株やインスリン欠乏糖尿病モデルとは非依存的に認められた。



**Figure 3-5. The upregulated insulin secreting capacity of grafts in diabetic environment is reproduced when EPCs are derived from another hiPSC line or are implanted in genetically induced Akita model.** (A and B) EPCs derived from Ff-WJ18 hiPSCs were implanted under the kidney capsule in STZ-induced diabetic and non-diabetic NOD/SCID mice (STZ-EPC and nonSTZ-EPC, respectively). (C and D) EPCs derived from Ff-I14s04 hiPSCs were implanted not only in STZ-induced diabetic NOD/SCID mice (STZ-EPC) but also in genetically induced Akita diabetic NOD/SCID mice (Akita-EPC). Each non-diabetic control mouse was implanted the EPCs similarly (nonSTZ-EPC and WT-EPC, respectively). In all experiments, levels of (A and C) non-fasting blood glucose and (B and D) plasma human C-peptide were measured at the indicated weeks after implantation. Data are presented as the mean  $\pm$  SD. \*\* $P < 0.01$  STZ-EPC vs. nonSTZ-EPC by ANOVA in (A) and (B). \*\* $P < 0.01$  STZ-EPC vs. nonSTZ-EPC or Akita-EPC vs. WT-EPC by ANOVA in (C) and (D). nonSTZ-EPC (n=3-4) and STZ-EPC (n=5-6) in (A and B). nonSTZ-EPC (n=4), STZ-EPC (n=5-6), WT-EPC (n=3) and Akita-EPC (n=3-5) in (C and D).

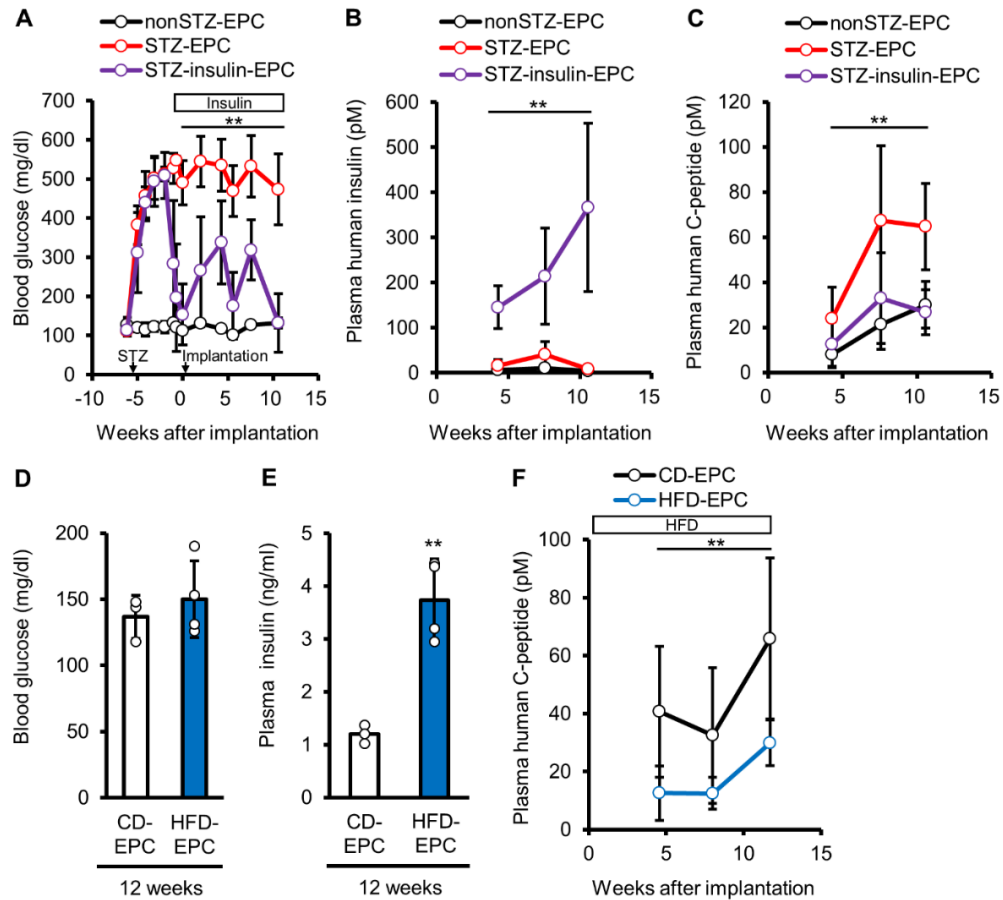


**Figure 3-6. Endogenous insulin is severely defected in diabetic mouse model used for implantation studies.** Levels of (A) plasma mouse insulin levels at the day before EPC-implantation and (B) pancreatic insulin contents at 18 weeks after the EPC-implantation were measured in STZ-induced diabetic NOD/SCID mice and genetically induced Akita diabetic NOD/SCID mice. These levels in each non-diabetic control mice were measured similarly. Data are presented as the mean  $\pm$  SD. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  STZ vs. nonSTZ or Akita vs. WT by Aspin-Welch's t-test. nonSTZ (n=4) and STZ (n=6) in (A). nonSTZ-EPC (n=4), STZ-EPC (n=5), WT-EPC (n=3) and Akita-EPC (n=3) in (B).

### 3. 血中インスリンが EPCs 移植片のインスリン分泌能力に与える影響

ホスト糖尿病病態の影響について、原因因子を特定するために、糖尿病におけるインスリン欠損が移植片のインスリン分泌能力を向上させるかどうかを検討した。まず、EPCs の移植前に浸透圧ポンプでヒトインスリンを 40-60 nmol/kg/day で皮下持続投与した (Fig. 3-7A)。インスリン投与は、EPCs 移植前および移植後 11 週まで、STZ により誘発した高血糖を平均で 300 mg/dL 以下にまで低下させた。インスリン投与によって血漿中ヒトインスリン濃度は増加したが、血中ヒト C-ペプチド濃度は非糖尿病マウスに移植した場合と同レベルにまで低下した (Fig. 3-7B および 3-7C)。

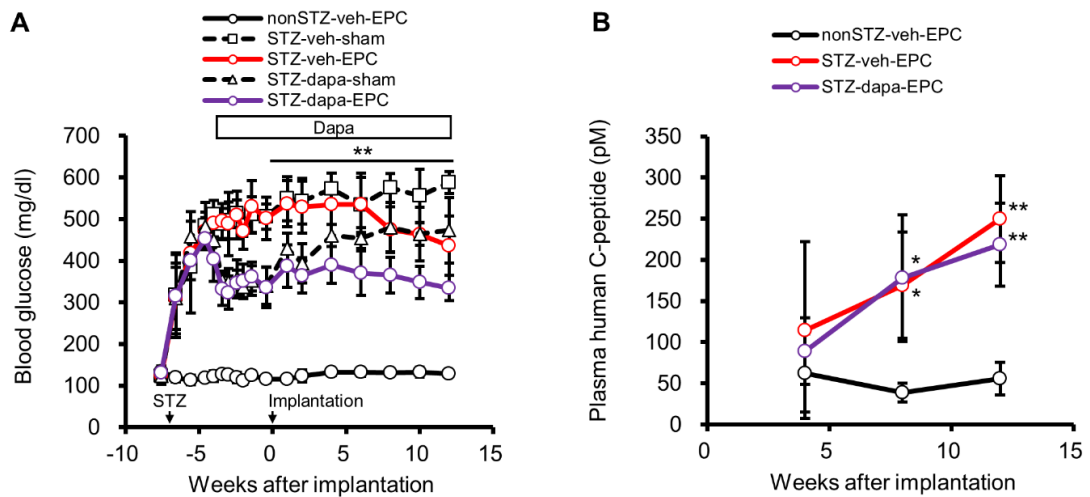
続いて、高脂肪食の摂取により内因性インスリンを代償的に増加させた高インスリン血症モデルを用いた。NOD/SCID マウスに EPCs を移植し、その後、通常食または高脂肪食を 12 週間給餌した。移植後 12 週で、非絶食時血糖は通常食群と高脂肪食群で同等だったが、高脂肪食の摂取は高インスリン血症を誘発した (Fig. 3-7D および 3-7E)。高脂肪食群において、血漿中インスリンとは対照的に、血中ヒト C-ペプチドは移植後 12 週まで低値が持続した (Fig. 3-7F)。この低値から、高脂肪食群での高インスリン血症は、代償的な内因性インスリン分泌の上昇によることが確認できた (Fig. 3-7E)。まとめると、血中インスリン濃度の増加は EPCs 移植片からのヒト C-ペプチド分泌を減弱させ、ホストのインスリン欠乏は移植片のインスリン分泌能力を高める作用がある可能性が示された。



**Figure 3-7. Both exogenous insulin supplementation and hyperinsulinemia induced by a HFD feeding suppress the insulin secreting capacity of EPC-grafts.** (A-C) Human insulin (40–60 nmol/kg/day) was subcutaneously administered via osmotic pump before and after EPC implantation in STZ-induced NOD/SCID mice (STZ-insulin-EPC). STZ-induced NOD/SCID mice without insulin supplementation and non-diabetic control mice were implanted EPCs similarly (STZ-EPC and nonSTZ-EPC, respectively). Plasma levels of (A) blood glucose, (B) human insulin, and (C) human C-peptide at non-fasting state were measured at the indicated weeks after implantation. (C-E) Feeding of a HFD (60% kcal fat) was started in NOD/SCID mice at the same time as EPC implantation (HFD-EPC). NOD/SCID mice fed control diet were implanted EPCs similarly (CD-EPC). Levels of (C) blood glucose and plasma levels of (D) mouse insulin and (E) human C-peptide at non-fasting state were measured at the indicated weeks after implantation. Data are presented as the mean  $\pm$  SD.  $**P < 0.01$  STZ-EPC vs. STZ-insulin-EPC by ANOVA in (A-C).  $**P < 0.01$  HFD-EPC vs. CD-EPC by Aspin-Welch's *t*-test in (D).  $**P < 0.01$  HFD-EPC vs. CD-EPC by ANOVA in (E). nonSTZ-EPC (n=3), STZ-EPC (n=4) and STZ-insulin-EPC (n=7). CD-EPC (n=3) and HFD-EPC (n=4).



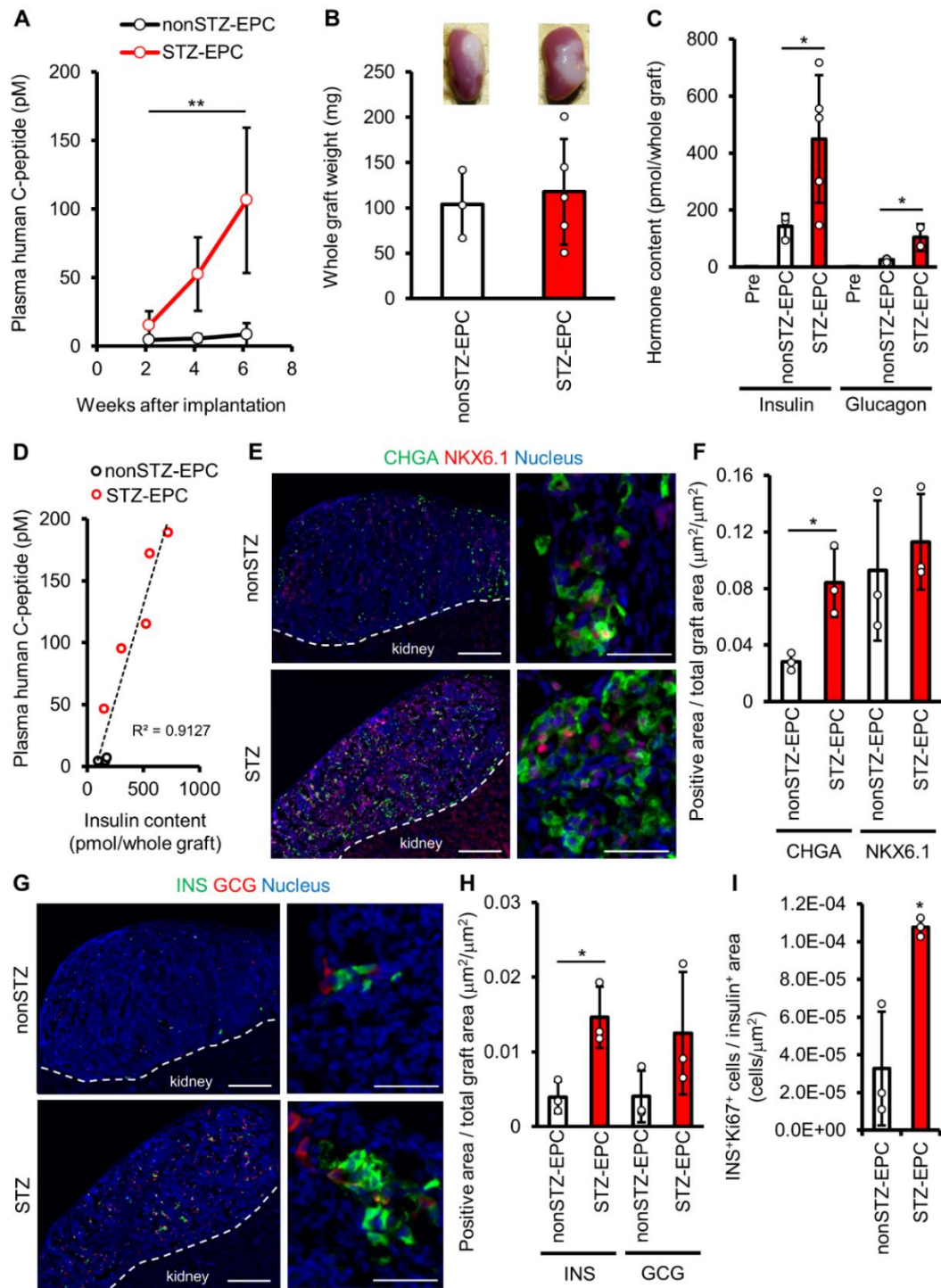
次に、この宿主作用に対する血糖の影響を調べるために、STZ 糖尿病 NOD/SCID マウスにおいて、EPCs 移植前後にインスリンを補充せずに尿糖排出促進により高血糖を減弱させた。ダパグリフロジンは、腎臓のグルコース再吸収を阻害する選択的 SGLT2 阻害薬であり、これを 1 日 1 回、血糖低下作用が見込める 10 mg/kg (Han 2008)の用量で反復投与した。ダパグリフロジン処置は安定的に高血糖を改善したが、非絶食時血糖値は EPCs を移植した群でも約 300 mg/dL 程度だった (Fig. 3-8A)。EPCs 移植後、ダパグリフロジンを処置した糖尿病マウスの血漿中ヒト C-ペプチド濃度は、vehicle を処置した糖尿病マウスと同等で、そのレベルは非糖尿病マウスよりも高かった (Fig. 3-8B)。これらの結果は、インスリン非依存的なメカニズムによる部分的な高血糖の改善は、EPCs 移植片への宿主作用にほとんど影響を与えない可能性を示している。



**Figure 3-8. Partial attenuation of hyperglycemia by dapagliflozin has no effect on the insulin secreting capacity of EPC-grafts.** The SGLT2 inhibitor dapagliflozin was repeatedly administered before and after EPC implantation in STZ-induced NOD/SCID mice (STZ-dapa-EPC). STZ-induced diabetic and non-diabetic NOD/SCID mice with vehicle treatment were implanted EPCs similarly (STZ-veh-EPC and nonSTZ-veh-EPC, respectively). Sham-operated STZ-diabetic mice with or without treatment of Dapagliflozin were also prepared (STZ-veh-sham and STZ-dapa-sham, respectively). Levels of (A) blood glucose and (B) plasma human C-peptide at non-fasting state were measured at the indicated weeks after implantation. Data are presented as the mean  $\pm$  SD. \*\* $P < 0.01$  STZ-veh-EPC vs. STZ-dapa-EPC by ANOVA in (A). \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs. nonSTZ-veh-EPC by Bonferroni adjusted Dunnett's test in (B). nonSTZ-veh-EPC (n=5), STZ-veh-sham (n=5), STZ-veh-EPC (n=5), STZ-dapa-sham (n=6) and STZ-dapa-EPC (n=6).

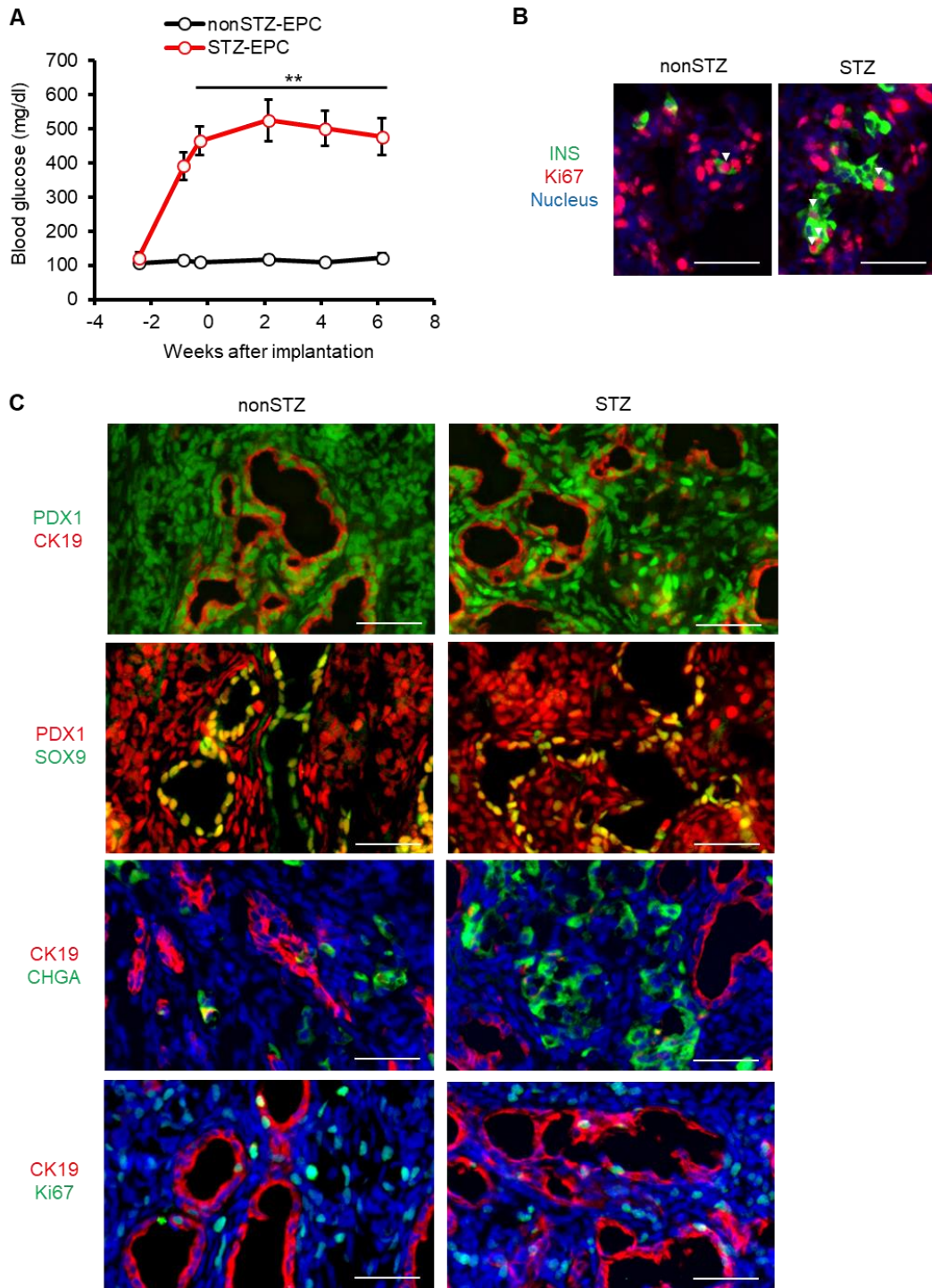
#### 4. 糖尿病ホスト由来の摘出 EPCs 移植片の解析

STZ 糖尿病 NOD/SCID マウスにおいて、EPCs 移植後 6 週に移植片を摘出し、移植片の重量や細胞組成を解析した。血中ヒト C-ペプチド濃度には大きな差があるものの、移植 6 週後の移植片の目視での様子や重量に糖尿病マウス由来移植片と非糖尿病マウス由来移植片で差はなかった (Fig. 3-9A, 3-9B および Fig. 3-10A)。対照的に、移植片全体のインスリンおよびグルカゴンの含量は糖尿病マウスの移植片の方が高かった (Fig. 3-9C)。個別に分析すると、6 週時点の血中ヒト C-ペプチド濃度と移植片インスリン含量の間に強い正の相関関係が認められた (Fig. 3-9D)。加えて、免疫組織染色による定量解析の結果、糖尿病マウスの移植片は、非糖尿病マウスの移植片に比べて CHGA とインスリンに対して陽性を示す面積が約 3 倍大きいことが認められ、一方で NKX6.1 とグルカゴンについては有意な差はなかった (Fig. 3-9E~H)。さらに、糖尿病マウスの移植片では増殖性の INS<sup>+</sup>Ki67<sup>+</sup>細胞が多く見られた (Fig. 3-9I および Fig. 3-10B)。糖尿病マウスと非糖尿病マウスのどちらの移植片も、PDX1<sup>+</sup>CK19<sup>+</sup>の管構造を含み、そこに SOX9<sup>+</sup> の膵前駆細胞や CHGA<sup>+</sup>細胞はほとんど観察されず、同様に Ki67<sup>+</sup>細胞を含んでいた (Fig. 3-10C)。これらは、管構造が移植片のインスリン分泌能力には関与していないことを示唆している。β細胞の成熟マーカーに関しては、免疫組織染色により、インスリン陽性細胞に urocortin-3 と MAFA のシグナルを検出することはできなかった (データ不記載)。まとめると、ホストのインスリン欠乏糖尿病病態は、移植片の重量に影響を与えることなく、少なくとも増殖を介してインスリン産生細胞を含む内分泌細胞を増加させることが示された。予備検討として、別ロットの移植試験において (Fig. 3-4)、移植後 24 週の移植片を解析した。その結果、糖尿病マウスの移植片は、非糖尿病マウスの移植片と比較して重量に差はないものの、移植片全体のインスリンおよびグルカゴンの含量が多かった (インスリン: 糖尿病マウス 5.27±1.66 nmol、非糖尿病マウス 1.43±0.52 nmol、グルカゴン: 糖尿病マウス 1.59±0.27 nmol、非糖尿病マウス 0.37±0.02 nmol)。この結果は、糖尿病ホスト環境における移植片中インスリン産生細胞の増加は、血中ヒト C-ペプチド濃度がプラトーに達した以降も維持されている可能性を示している。



**Figure 3-9. Diabetic environment in host affects EPC-grafts to increase endocrine cells including insulin producing cells without affecting graft mass.** A cohort of STZ-induced diabetic and non-diabetic NOD/SCID mice were implanted EPCs from the same batch, and the grafts were explanted 6 weeks after the implantation (STZ-EPC and nonSTZ-EPC, respectively). (A) Plasma levels of human C-peptide were measured at the indicated weeks after implantation. (B) Weight of explanted whole grafts and (C) the contents of insulin and glucagon were measured. The representative images of grafts were inserted in (B). (D) Correlation between individual plasma human C-peptide level and graft

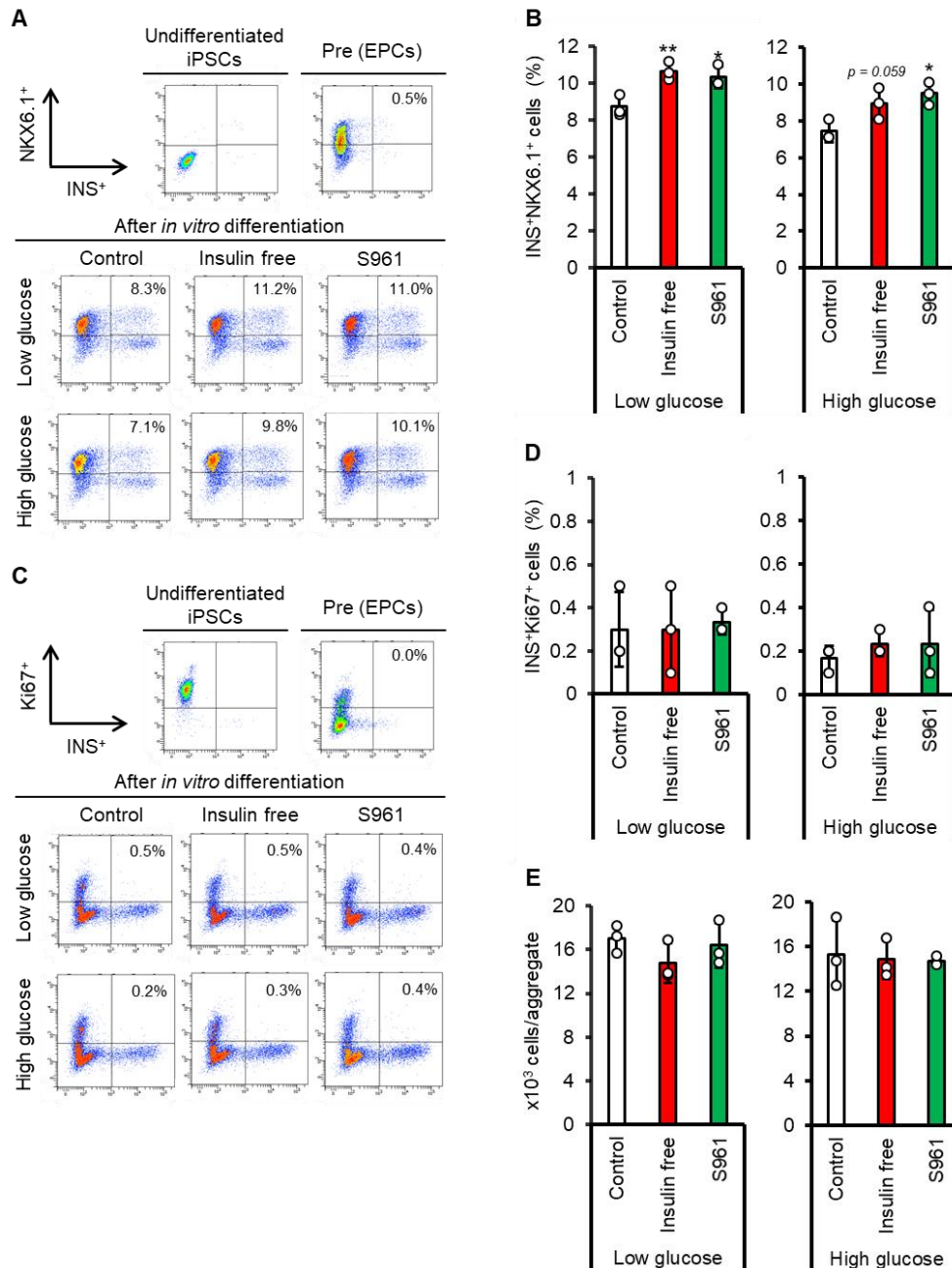
insulin content and the correlation coefficient were shown. Representative immunofluorescence images of the grafts stained for (E) endocrine/endocrine progenitor marker CHGA and pancreatic progenitor marker NKX6.1 and (G) pancreatic hormones INS and GCG. In left panels, graft and kidney tissue are delineated by a dashed white line (scale bars, 500  $\mu\text{m}$ ). In right panels, higher magnifications are inset (scale bars, 50  $\mu\text{m}$ ). Areas of (F) CHGA or NKX6.1 and (H) INS or GCG immunoreactivity relative to the total graft area for each graft. (I) Number of INS<sup>+</sup>Ki67<sup>+</sup> cells relative to the total area of INS immunoreactivity for each graft. Data are presented as the mean  $\pm$  SD. \*\* $P < 0.01$  STZ-EPC vs. nonSTZ-EPC by ANOVA in (A). \* $P < 0.05$  nonSTZ-EPC vs. STZ-EPC by Aspin-Welch's or Student's  $t$ -test in (C, F, H, and I). N number of STZ-EPC is 8 in (A), 5 in (B-D) and 3 in (F, H and I) and that of nonSTZ-EPC is 6 in (A), 3 in (B-D) and 3 in (F, H and I). Nuclei were stained with DAPI.



**Figure 3-10. Supplementary information referred to Figure 3-9.** (A) Levels of blood glucose in STZ-induced diabetic and non-diabetic NOD/SCID mice before and after EPC implantation. Data are presented as the mean  $\pm$  SD. STZ-EPC (n=8) and nonSTZ-EPC (n=6). Representative immunofluorescence images of the explanted grafts stained for (B) INS/Ki67 and (C) PDX1/CK19, PDX1/SOX9, CK19/CHGA and CK19/Ki67. Nuclei were stained with DAPI. Scale bars, 50  $\mu$ m.

## 5. *in vitro* における EPCs のインスリン産生細胞への分化誘導におけるインスリン作用の関与

EPCs のインスリン産生細胞への分化誘導におけるグルコースとインスリンの影響を調べるために、既報の分化誘導培地 (Rezania 2014, Pagliuca 2014) からインスリンを除いた条件およびインスリン受容体アンタゴニストを添加した条件下で EPCs を 10 日間培養した。低グルコースでも高グルコースの条件でも、培地中にインスリン受容体アンタゴニスト S961 を添加することで、INS<sup>+</sup>NKX6.1<sup>+</sup>細胞の分化誘導率が僅かだが有意に増加した (Fig. 3-11A および 3-11B)。さらに、INS<sup>+</sup>NKX6.1<sup>+</sup>細胞の分化誘導率は、低グルコースの条件でインスリン不含培地を用いた場合においても増加した。高グルコース条件においても有意ではなかったが ( $p=0.059$ )、増加傾向が認められた。グルコースの影響に関して、低グルコースに比べて高グルコースの条件で INS<sup>+</sup>NKX6.1<sup>+</sup>細胞の分化誘導率が増加することはなかった。INS<sup>+</sup>Ki67<sup>+</sup>細胞の分化誘導率と細胞凝集体の細胞数は、群間で差は認められなかった (Fig. 3-11C~E)。これらの結果は、少なくとも *in vitro* の分化誘導系で、インスリン作用の低下が直接的に EPCs から INS<sup>+</sup>NKX6.1<sup>+</sup>細胞への分化を促進することを示している。



**Figure 3-11. Lowering insulin action directly promotes the differentiation of EPCs into INS<sup>+</sup>NKX6.1<sup>+</sup> cells *in vitro*.** The EPC aggregates were cultured for 10 days with previous report-based medium to induce the differentiation into insulin-producing cells. The medium contained glucose at 200 mg/dL (low) or 540 mg/dL (high). Under the both glucose concentration, medium without containing insulin (insulin free) or added an insulin receptor antagonist S961 (100 nM) was used. (A) Representative flow cytometry plots showing the proportion of INS<sup>+</sup>NKX6.1<sup>+</sup> cells and (B) the average of three independent experiments. (C) Representative flow cytometry plots showing the proportion of INS<sup>+</sup>Ki67<sup>+</sup> cells and (D) the average of three independent experiments. (E) Cell number of the aggregates after the 10-day culture. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs. control by Dunnett's test.



### 第3節 考察

1 型糖尿病に対する幹細胞由来膵細胞を用いた細胞治療の実現に向けて、世界中で熱心に研究が実施されている (Latres 2019)。臨床応用のための未解決課題の一つは、移植後の細胞運命に与えるホスト環境の影響である。本研究では、ホストのインスリン欠乏糖尿病病態が、免疫不全マウスにおいて iPS 細胞由来 EPCs の移植後の挙動に影響を与えるかを検討し、大きく二つの知見を見出した。まず一つ目は、ホストの糖尿病環境は、少なくとも一部はインスリン欠乏を介して EPC 移植片のインスリン分泌能力の増強すること。二つ目は、非糖尿病に比べて糖尿病のホスト由来の移植片は、移植片重量に差がないものの、インスリン産生細胞を含めた内分泌細胞を多く含んでいるということである。インスリン分泌能力と移植片インスリン含量の間に正の相関が認められたことから、この2つの知見は関連しているだろう。

糖尿病ホストで血中ヒトインスリン/C-ペプチドの増加が加速する (Fig. 3-4B, 3-5B, 3-5D, 3-7C, 3-8B, および 3-9A) 機序は、移植片で起きる2つの現象で説明でき得る。一つ目は、移植片中のインスリン産生細胞数の増加である。二つ目は、個々のインスリン産生細胞のインスリン分泌能力の増加で、それは  $\beta$  細胞への成熟が加速していることを示唆する。免疫組織染色による解析は、EPC 移植片がインスリン産生細胞および増殖性のインスリン産生細胞を多く含んでいることを示しており、一つ目の仮説を支持している (Fig. 3-9G~I)。加えて、*in vitro* 試験から得られた知見ではあるものの、インスリン作用の低下は、 $INS^+Ki67^+$  細胞の分化誘導率を増加させることなく、EPCs の  $INS^+NKX6.1^+$  細胞への分化を促進した (Fig. 3-11A~D)。これは、 $INS^+$  細胞への分化指向性が高まったことも、糖尿病ホストでのインスリン産生細胞数の増加に関与している可能性を示している。一方で、EPC 移植片由来の血中ヒト C-ペプチドは、糖尿病マウスでも非糖尿病マウスでも、絶対値に差が見られる時点においても、絶食に反応して低下した (Fig. 3-4C)。移植片のインスリン産生細胞数の増加について、二つ目の説を支持する明確な根拠はない。それゆえ、移植片のインスリン産生細胞数の増加は、インスリン産生細胞の増殖とインスリン産生細胞への分化指向性が高まったことの両方を介し、血中インスリン増加の加速に寄与していると考えている。

糖尿病病態では異常な血中インスリン濃度、高血糖、それらによる合併症など、多くの変化が起きている (Anazawa 2018)。血中インスリン濃度を調節した場合 (Fig. 3-7B および 3-7E) や *in vitro* 実験 (Fig. 3-11) の結果から、ホストにおけるインスリン欠乏が EPC 移植片のインスリン分泌能力の増強に寄与していると提案する。ホスト糖尿病病態の影響についてヒト胎児膵を用いて本研究のように検討した例はないものの、ESC 由来の PECs を用いた報告はこの説を支持している。PEC 移植後早期において、糖尿病マウスは、非糖尿病マウスに比べて高い血中ヒ

ト C-ペプチド濃度を示し、その増加は外因性のインスリン補充により低下している傾向を示した (Bruin 2013)。本研究で使用している EPCs は、発生学的には PECs に比べて非内分泌細胞へと分化する可能性を秘める膵前駆細胞の含有は少ない。PECs を用いた既報 (Bruin 2013) の現象には、非内分泌の膵前駆細胞の分化だけでなく、移植片中のホルモン産生細胞の増加も関与しているのかもしれない。まとめると、PECs や EPCs、未熟なホルモン産生細胞のような細胞種は、血中インスリンの低下を代償するような挙動を示すようだ。一方で、血糖の関与については明らかではない。EPC 移植片のインスリン分泌能力の増強は、ダパグリフロジンの反復投与によって非絶食時血糖を安定的に低下させた場合に影響を受けなかった (Fig. 3-7B)。ダパグリフロジンで処置したマウスは、EPCs を移植した場合においても非絶食時血糖が 300 mg/dL 程度であったため、300 mg/dL 以下の血糖が EPC 移植片に対して直接的な影響を示すかどうかは詳細不明である。

インスリン作用の低下が EPCs のインスリン産生細胞への分化を促進するという *in vitro* 実験の結果は、インスリンシグナルの関与を示唆している (Fig. 3-11)。いくつかの既報が、インスリンシグナル分子の未熟な膵細胞の分化への関与を示している。Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) はインスリンによって活性化され、wortmannin や Ly294002 による PI3K の阻害は、*in vitro* においてヒト胎児由来の膵島様細胞凝集体の分化を促進することが知られている (Ptasznik 1997)。PI3K が膵島の発生に対して負の調節因子として機能することから、本研究の結果 (Fig. 3-11A および 3-11B) に関与する因子の一つかもしれない。FOXO1 は、PI3K シグナルの下流に位置し、その転写活性はインスリンシグナルにより Ser<sup>256</sup> リン酸化を介して阻害される。FOXO1 阻害剤である AS1842856 は、ESC 由来の膵前駆細胞のインスリン産生細胞への分化を促進することが報告されている (Yu 2018)。その報告では FOXO1 は膵細胞のインスリン産生細胞への分化の過程で阻害されていることになるので、インスリンによる FOXO1 阻害がインスリン産生細胞への分化を促進するようと思われる。そのため、本研究結果に FOXO1 は関与していないかもしれない。詳細は不明だが、FOXO1 以外の下流分子を介したインスリン PI3K シグナルの活性化はインスリン産生細胞への分化を負に制御し、一方で、インスリン欠乏糖尿病病態ではそのシグナルが減弱し、インスリン産生細胞への分化が正に制御される、という機構を考えている。*In vivo* で認められた INS<sup>+</sup>Ki67<sup>+</sup>細胞の増加について (Fig. 3-9I)、*in vitro* では INS<sup>+</sup>Ki67<sup>+</sup>細胞の増加は認められなかったため (Fig. 3-11C および 3-11D)、移植した EPC 以外の細胞種が関与していると考えている。インスリンシグナル分子について遺伝子組み換えを施したマウスを用いた検討が、*in vivo* でのメカニズム解析に役立つかもしれない。

移植後の高脂肪食負荷は、移植細胞のインスリン分泌能力を弱めることを示した (Fig. 3-7D~F)。これは、移植細胞に影響はないとする Bruin らの既報と異なる結果であるように見える (Bruin 2015)。本研究では移植直後から高脂肪食摂取

を開始したのに対し、既報では、高脂肪食を7週間負荷してインスリン抵抗性が惹起された時点で移植しており、高脂肪食負荷のタイミングが異なっている。インスリン抵抗性は全身のインスリンシグナル状態の変化を引き起こし得るため (Kahn 2006)、インスリン抵抗性が惹起されるタイミングが、本研究と既報の結果の違いに関与している可能性がある。詳細なメカニズムは不明だが、高脂肪食を長期負荷してインスリン抵抗性が惹起された時点で EPCs を移植した場合、代償的な内因性インスリン分泌の上昇は EPC 移植片からのヒトインスリン分泌を減弱させないかもしれない。しかしながら、既報 (Bruin 2015) と本研究では、移植部位 (皮下と腎被膜下)、移植細胞のカプセル化 (免疫隔離デバイスと裸)、細胞種 (PECs と EPCs) など実験デザインが異なるため、厳密に比較することは難しい。

臨床において、レシピエントの移植後ケアは膵島移植片の機能を高める (Anazawa 2018)。例えば、免疫抑制剤の種類は膵島移植片の機能に影響を与える (Shapiro 2000)。また、ラットにおいて、移植後早期における絶食とインスリン処置の併用による成熟膵島移植片への負荷軽減は、長期移植片の生着を改善する (Jimbo 2014)。本研究では、外因性インスリンの処置により血糖値をコントロールすると、移植時点ではインスリン産生細胞をほとんど含まない EPCs (Fig. 3-1B, 3-1C および Fig. 3-3) の移植後のインスリン分泌能力が鈍化することを示した (Fig. 3-7C)。それゆえ、未熟な膵内分泌細胞を用いた1型糖尿病に対する細胞治療を考える上で、移植後ケアとしてのインスリン処置は、移植片に期待する機能を低下させる可能性があるとして推測している。近年、ダパグリフロジンをはじめとする SGLT2 阻害薬が、1型糖尿病に対する非インスリン性の補助薬物療法を対象として承認され、インスリン投与量を減少させつつ血糖コントロールを改善することが報告された (McCrimmon 2018)。インスリン欠乏状態は未熟な移植片の機能を高めると考えられ、インスリン以外の血糖降下薬の選択や併用は、移植片を成熟させていく期間の血糖コントロールにとって良い選択肢の一つなのかもしれない。本研究の結果は、成熟膵島に代わる供給源を用いた将来の細胞治療において、移植後のケアとして適した治療は何かという点に関して、新しい見識を与えているであろう。

## 第4章 総括

本研究では、食品ペプチドとしてZeinH、低分子化合物としてMGAT2阻害薬、移植用細胞としてヒトiPSC由来膵内分泌前駆細胞を用い、消化管と膵臓の内分泌機能を利用した、糖尿病および肥満の予防・改善の可能性を検討した。

### 第1章 ZeinH

著者らは以前に、ZeinHがGLP-1産生内分泌細胞株およびラット小腸、特に回腸においてGLP-1分泌を刺激することを示した (Hira 2009)。本研究では、回腸に投与したZeinHが、GLP-1分泌の刺激を介して耐糖能に影響を与えるかどうか検討した。ZeinHのGLP-1分泌および血糖値に対する影響を評価するために、回腸と頸静脈にカテーテルを留置した覚醒ラットを用いて腹腔内糖負荷試験を実施し、血糖、血中インスリンおよびGLP-1を測定した。加えて、麻酔下ラットにおいて回腸結紮ループ内にZeinHを投与した後に回腸静脈血における血中DPP-4活性を測定した。ZeinHの回腸投与は、糖負荷後、インスリン分泌の増強を伴って血糖上昇を抑制し、一方で肉タンパク加水分解物MHYによってはインスリン分泌促進も血糖上昇抑制も認められなかった。ZeinHの血糖上昇抑制作用は、経口投与によっても示された。これらの結果より、MHYに比べてZeinHは強いGLP-1分泌促進作用を示すと推測したが、予想に反して血中total GLP-1濃度の上昇は同等であった。対照的に、活性型GLP-1の血中濃度はZeinHを処置したラットにおいて顕著に増加していた。麻酔下ラットにおいて、ZeinHの回腸投与により回腸静脈血中の血中DPP-4活性は低下し、MHY投与によっては低下していなかった。食品ペプチドZeinHは、ラットにおいてGLP-1の分泌促進と分解抑制の双方に作用し、インスリン分泌を増大させ、血糖上昇を抑制することが示された。

抗糖尿病薬メトホルミンは、肝臓での糖新生の抑制が主作用とされるが、消化管にも作用する。ヒトや齧歯類において、メトホルミンは、胆汁酸の再吸収を阻害することで消化管腔内の胆汁酸濃度を上昇させ、その結果、胆汁酸受容体TGR5の活性化によるGLP-1分泌が引き起こされ、血中GLP-1濃度が上昇すると考えられている (McCreight 2016)。遅延徐放型のメトホルミンは、血中暴露量が少ないにも関わらず、速攻吸収型のメトホルミンと同等の血糖降下作用を示すことから、作用部位として小腸下部の寄与の大きさが示唆される (Buse 2015)。また、臨床において、メトホルミンによる血中GLP-1濃度の上昇は、DPP-4阻害薬との併用により増強され (Migoya 2010)、また、メトホルミンとDPP-4阻害薬の併用が、DPP-4阻害薬単剤よりも強い抗糖尿病作用を示すことが報告されている (Kaku 2017)。これらは、本研究で示した、食品ペプチドがGLP-1の分泌促進と分解抑制の双方に作用し、分泌されたGLP-1の生理作用が発揮されるという概念を支持している。現在、GLP-1の分泌促進を主作用として上市されている抗糖尿病薬および抗肥満薬はない。消化管ホルモン分泌促進薬としてGPR119アゴニスト (Ritter 2016)やGPR40アゴニスト (Ueno 2019)の開発が進められているが、これらは血液中に移行して消化管以外の臓器にも作用する。GLP-1

は分泌後、消化管や肝門脈領域の迷走神経求心繊維の活性化を介して耐糖能改善作用を示すことが報告されている (Iwasaki 2018)。ZeinHは、GLP-1の分泌を刺激すると同時に、分泌部位に近い、体循環系に入る手前の血液中のDPP-4活性を低下させる。食後、より生理的な状況を模倣して分泌部位近傍で内因性GLP-1のシグナルを高めることが重要かもしれず、それが食品由来のペプチドにより可能であることは、糖尿病および肥満の食事による予防の観点において意義深い。内因性GLP-1は、2型糖尿病の発症過程において代償的な分泌増強が起きている時期があり、糖恒常性の維持に関する新たな側面が近年明らかになってきており、興味は尽きない (Hira 2020)。本研究結果は、内因性GLP-1を利用して血糖コントロール改善を指向する栄養学的な提案を支持する。

## 第2章 MGAT2阻害薬

MGAT2は、小腸においてTGの再合成の律速酵素の一つである。著者らはこれまでに、MGAT2の薬理的阻害が、マウスにおいて肥満とそれに関連する代謝性疾患に対して有用な作用を示すことを報告した (Take 2016)。本研究では、MGAT2阻害の、1) 正常マウスにおける消化管ホルモン分泌と脂質摂取に対する作用、2) 重篤な肥満・2型糖尿病モデルである高脂肪食負荷ob/o/bマウスにおける代謝異常に対する作用について、経口投与可能な低分子の選択的MGAT2阻害薬CpdBを用いて調べた。CpdBはオイルを負荷した液体流動食を投与したマウスにおいて、血中TGの上昇を阻害した。脂質負荷は、消化管ホルモンPYYおよびGLP-1の分泌を刺激し、この反応はCpdBの事前投与により増強された。正常マウスにおける高脂肪食と低脂肪食の選択試験において、CpdBは高脂肪食の摂取を選択的に阻害した。高脂肪食負荷ob/o/bマウスへのCpdBの5週間反復投与は、摂食量および体重増加を抑制し、GHbの上昇を阻害した。これらの結果は、MGAT2の薬理的阻害が、脂質誘導性の消化管ホルモン分泌と脂質摂取を調節し、肥満および糖尿病を改善することを示唆している。

肥満症を適応として承認された中枢性食欲抑制薬は、中枢へ直接作用するために副作用に対するリスク懸念が大きい。末梢性抗肥満薬としては、消化管からの食事性脂質の吸収を抑制する隣リパーゼ阻害薬オルリスタットが承認されている。オルリスタットは、肥満の成人における2型糖尿病の発症を予防するが (Mancini 2008)、食事性脂質が未消化のまま排泄されることによる下痢・脂排便などの消化管症状が副作用として報告されている (Padwal 2007)。脂質吸収抑制作用を有する他の薬剤として、ミクロソームトリアシルグリセロール輸送タンパク質阻害薬 (Lin 2014)やDGAT1阻害薬 (Haas 2012)があるが、いずれも下痢などの消化管症状により抗肥満薬としての開発が阻まれている。MGAT2阻害薬については、現状で臨床成績の報告はない。MGAT2欠損マウスでは脂肪便の所見はなく、糞中への脂質排泄量の増加も認められなかった (Yen 2009)。また、MGAT2は、小腸においてTG再合成の律速酵素の一つであるが、DGAT1もMGAT2活性を有することが報告されている (Cheng 2008)。これらの理由から、MGAT2の選択的な阻害は、小腸において食事性脂質の吸収を完全に阻害するわけではなく、生理的な範囲で吸収を遅延させると想定され、そのため下痢などの消化管症状を引き起こしにくく、安全性が高いかもしれない。脂質の摂取量

は近年益々増加している (Saito 2018)。本研究結果は、小腸における脂質/脂肪酸感知機構の調節が、全身の代謝や体重に影響を与えることを示した重要な一例だと考えられる。

### 第3章 ヒトiPSC由来膵内分泌前駆細胞

1型糖尿病患者への移植用の膵島に代わる供給源として、幹細胞由来膵細胞が期待されている (Nakamura 2020)。ホスト環境は、幹細胞由来の未熟な膵細胞の移植にとって、その移植成績を左右する重大な因子である。本研究では、インスリン欠乏糖尿病病態が未熟な膵内分泌細胞の移植片の挙動に与える影響とそのメカニズムについて調べた。ヒトiPSCから、CHGA<sup>+</sup>NKX6.1<sup>+</sup>細胞を多く含み、一方でInsulin<sup>+</sup>細胞をほとんど含まない膵内分泌前駆細胞EPCsを作製した。EPCsを免疫不全マウスの腎被膜下に移植したところ、インスリン欠乏糖尿病病態は、移植片由来インスリン分泌の指標である血中ヒトC-ペプチド濃度の上昇を加速させた。その加速は、インスリンの持続投与によって鈍化し、一方で、インスリン非依存的血糖降下薬であるDapagliflozinの反復投与による部分的な高血糖の改善によっては影響を受けなかった。免疫組織学的解析により、非糖尿病マウスと比較して糖尿病マウス由来の移植片は、移植片重量に差が認められなかったにも関わらず、インスリン産生細胞を含む内分泌細胞を多く含有していることが示された。インスリン欠乏糖尿病病態は、移植片重量に影響を与えずにインスリン産生細胞を含む内分泌細胞の数を増加させることにより、EPCsのインスリン分泌能力を高めることを示唆している。また、EPCsの移植後長期の時点で、移植片中のインスリン含量が、非糖尿病マウスに比べて糖尿病マウスに移植した場合の方が多かったことは、移植後早期にインスリン分泌量が増えるだけでなく、長期的に見ても移植細胞の最大機能が高まる可能性を示している。

本研究結果は、ヒトiPSC由来膵細胞を用いた移植治療において、移植後にインスリンなどの薬剤をどの程度併用すべきなのか等、重要な手がかりを示しているかもしれない。米国では成人1型糖尿病患者のうち約60%が肥満であり (Miller 2015)、インスリン注射治療による体重増加が懸念される。GLP-1やそのアナログは、摂食抑制・体重低下作用による肥満の改善、また、膵β細胞に対する抗アポトーシス作用等による他家膵島の移植後生着の改善が報告されている (Müller 2019, Zoso 2016)。これらは、肥満1型糖尿病患者におけるヒトiPSC由来膵細胞の移植治療において、GLP-1アナログの使用が有効であることを示唆する。しかしながら、GLP-1アナログは悪心や嘔吐の副作用が懸念される (Dejgaard 2016)。また、近年、経口投与可能なGLP-1アナログが上市されたが (Sofogianni 2020)、胃の内容物により吸収が低下する可能性があるため、1日の最初の食事または飲水の前に空腹状態で服用しなければならない等、制限がある。上述のZeinH (第1章)やMGAT2阻害薬 (第2章)を利用して、内因性GLP-1の生理作用を効果的に発揮させることができれば、より安全で、かつquality of lifeが維持しやすい可能性がある。将来のヒトiPSC由来膵細胞の移植療法において、食事や併用薬との組み合わせによる移植細胞の機能最大化が重要視されるかもしれない。2021年でインスリンの血糖低下作用が発見されてから100年が経つ

が、この間に糖尿病研究は驚異的に発展してきた。ヒトiPSC由来膵細胞の臨床応用に向けて今後も研究が発展していくことを期待する。

## 第5章 謝辞

本論文の作成にあたり、御懇篤なるご指導とご鞭撻を賜りました、北海道大学 大学院農学研究院 基盤研究部門 生物機能化学分野 比良徹 准教授、石塚敏 教授、園山慶 教授には深甚なる感謝の意を表します。

ZeinHについての研究は、比良徹 准教授、藤女子大学 人間生活学部 食物栄養学科 原博 教授の親身なご指導のもと遂行されたものであり、厚く御礼申し上げます。本研究の遂行にあたり多大なるご協力とご助言を賜りました食品栄養学研究室の皆様へ深く感謝の意を表します。

MGAT2阻害薬についての研究は、武田薬品工業株式会社 医薬研究本部 循環代謝創薬ユニットにおいて、竹河志郎 氏、牧敏之 博士の親身なご指導のもと遂行されたものであります。本研究の遂行にあたり多大なるご協力とご助言を賜りました武和巳 博士、佐藤健二郎 博士、中仮屋匡紀 博士、安達竜太郎 博士、北崎智幸 博士をはじめとした医薬研究本部の皆様へ深く感謝の意を表します。

iPSC由来膵内分泌前駆細胞についての研究は、武田薬品工業株式会社と京都大学iPS細胞研究所との共同研究プログラムT-CiRAにおいて、武田薬品工業株式会社 T-CiRAディスカバリー 伊藤亮 博士、松本寛和 博士、京都大学iPS細胞研究所 増殖分化機構研究部門 豊田太郎 講師の親身なご指導のもと遂行されたものであります。本研究の遂行にあたり、武田薬品工業株式会 上野光 氏、山添則子 博士、日吉秀行 氏、山崎緑 氏、佐久間健介 博士、山浦順司 氏、Stephanie Napier 氏、京都大学iPS細胞研究所 小長谷周平 博士をはじめとしたT-CiRA膵島細胞プロジェクト関係者の皆様には多大なるご協力を賜りました。井上志香 氏、桑野亜貴 氏、牧田あや子 氏、邑楽美帆 氏、高橋愛可 氏をはじめとした派遣研究員の方々にも深く感謝の意を表します。また、*in vivo*試験において技術協力いただいた武田ラビックスおよびアクセリード株式会社の皆様にも厚く御礼申し上げます。本研究の機会を与えて下さいました武田薬品工業株式会社 T-CiRAディスカバリー ヘッド 梶井靖 博士、リサーチマネージャー 葛西義明 博士、京都大学iPS細胞研究所 山中伸弥 教授、長船健二 教授に深く感謝いたします。

末筆ながら、長期に渡り辛抱強く私を見守ってくれた妻 茉耶、息子 理来の支えなくして本論文の作成は為し得ませんでした。心から感謝致します。

2021年 持田 泰佑



## 引用文献

- A safety, tolerability, and efficacy study of VC-01™ combination product in subjects with type 1 diabetes mellitus. ClinicalTrials.gov identifier NCT02239354.
- A safety, tolerability, and efficacy study of VC-02™ combination product in subjects with type 1 diabetes mellitus and hypoglycemia unawareness. ClinicalTrials.gov identifier NCT03163511.
- Agulnick AD, Ambruzs DM, Moorman MA, Bhoumik A, Cesario RM, Payne JK, Kelly JR, Haakmeester C, Srijemac R, Wilson AZ, Kerr J, Frazier MA, Kroon EJ, D'Amour KA. Insulin-producing endocrine cells differentiated *in vitro* from human embryonic stem cells function in macroencapsulation devices *in vivo*. *Stem Cells Transl Med* 2015;4(10):1214-1222.
- Anazawa T, Okajima H, Masui T, Uemoto S. Current state and future evolution of pancreatic islet transplantation. *Ann Gastroenterol Surg* 2018;3(1):34-42
- Anini Y, Fu-Cheng X, Cuber JC, Kervran A, Chariot J, Roz C. Comparison of the postprandial release of peptide YY and proglucagon-derived peptides in the rat. *Pflügers Arch* 1999;438:299-306.
- Baggio LL, Drucker DJ. Biology of incretins: GLP-1 and GIP. *Gastroenterology* 2007;132:2131-2157.
- Balkan B, Li X. Portal GLP-1 administration in rats augments the insulin response to glucose via neuronal mechanisms. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2000;279:R1449-R1454.
- Ball AJ, Flatt PR, McClenaghan NH Acute and long-term effects of nateglinide on insulin secretory pathways. *Br J Pharmacol*. 2004;142:367-373.
- Bertuzzi F, Verzaro R, Provenzano V, Ricordi C. Brittle type 1 diabetes mellitus. *Curr Med Chem* 2007;14(16):1739-44.
- Blouet C, Schwartz GJ. Hypothalamic nutrient sensing in the control of energy homeostasis. *Behav Brain Res*. 2010;209(1):1-12.
- Brubaker PL, Anini Y. Direct and indirect mechanisms regulating secretion of glucagon-like peptide-1 and glucagon-like peptide-2. *Can J Physiol Pharmacol*. 2003;81:1005-1012.
- Bruin JE, Asadi A, Fox JK, Erener S, Rezanian A, Kieffer TJ. Accelerated maturation of human stem cell-derived pancreatic progenitor cells into insulin-secreting cells in immunodeficient rats relative to mice. *Stem Cell Reports* 2015;5(6):1081-1096.
- Bruin JE, Rezanian A, Xu J, Narayan K, Fox JK, O'Neil JJ, Kieffer TJ. Maturation and function of human embryonic stem cell-derived pancreatic progenitors in macroencapsulation devices following transplant into mice. *Diabetologia* 2013;56(9):1987-1998.
- Bruin JE, Saber N, Braun N, Fox JK, Mojibian M, Asadi A, Drohan C, O'Dwyer S, Rosman-Balzer DS, Swiss VA, Rezanian A, Kieffer TJ. Treating diet-induced diabetes and obesity with human embryonic stem cell-derived pancreatic progenitor cells and antidiabetic drugs. *Stem Cell Reports* 2015;4(4):605-620.
- Bruin JE, Saber N, O'Dwyer S, Fox JK, Mojibian M, Arora P, Rezanian A, Kieffer TJ. Hypothyroidism impairs human stem cell-derived pancreatic progenitor cell maturation in mice. *Diabetes* 2016;65(5):1297-1309.
- Buse JB, DeFronzo RA, Rosenstock J, Kim T, Burns C, Skare S, Baron A, Fineman M. The primary glucose-lowering effect of metformin resides in the gut, not the

- circulation: results from short-term pharmacokinetic and 12-week dose-ranging studies. *Diabetes Care*. 2016;39(2):198-205.
- CDC COVID-19 Response Team. Preliminary estimates of the prevalence of selected underlying health conditions among patients with coronavirus disease 2019 - United States, February 12-March 28, 2020. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2020;69(13):382-386.
  - Cai Q, Bonfanti P, Sambathkumar R, Vanuytsel K, Vanhove J, Gysemans C, Debiec-Rychter M, Raitano S, Heimberg H, Ordovas L, Verfaillie CM. Prospectively isolated NGN3-expressing progenitors from human embryonic stem cells give rise to pancreatic endocrine cells. *Stem Cells Transl Med* 2014;3(4):489-499.
  - Cao J, Hawkins E, Brozinick J, Liu X, Zhang H, Burn P, Shi Y. A predominant role of acyl-CoA:monoacylglycerol acyltransferase-2 in dietary fat absorption implicated by tissue distribution, subcellular localization, and up-regulation by high fat diet. *J Biol Chem*. 2004;279(18):18878-18886.
  - Chen Q, Reimer RA. Dairy protein and leucine alter GLP-1 release and mRNA of genes involved in intestinal lipid metabolism *in vitro*. *Nutrition* 2009;25:340-349.
  - Cheng D, Iqbal J, Devenny J, Chu CH, Chen L, Dong J, Seethala R, Keim WJ, Azzara AV, Lawrence RM, Pellemounter MA, Hussain MM. Acylation of acylglycerols by acyl coenzyme A:diacylglycerol acyltransferase 1 (DGAT1). Functional importance of DGAT1 in the intestinal fat absorption. *J. Biol. Chem*. 2008;283:29802-29811.
  - Chu ZL, Carroll C, Alfonso J, Gutierrez V, He H, Lucman A, Pedraza M, Mondala H, Gao H, Bagnol D, Chen R, Jones RM, Behan DP, Leonard J. A role for intestinal endocrine cell-expressed G protein-coupled receptor 119 in glycemic control by enhancing glucagon-like peptide-1 and glucose-dependent insulinotropic peptide release. *Endocrinology* 2008;149:2038-2047.
  - Cohen SA, Bidlingmeyer BA, Tarvin TL. PITC derivatives in amino acid analysis. *Nature* 1986;320:769-770.
  - Cordier-Bussat M, Bernard C, Levenez F, Klages N, Laser-Ritz B, Philippe J, Chayvialle JA, Cuber JC. Peptones stimulate both the secretion of the incretin hormone glucagon-like peptide 1 and the transcription of the proglucagon gene. *Diabetes* 1998;47:1038-1045.
  - Corrochano AR, Arranz E, De Noni I, Stuknyte NM, Ferrarettod A, Vitaly PMK, Giblina BL. Intestinal health benefits of bovine whey proteins after simulated gastrointestinal digestion. *J Funct Foods*. 2018;49:526-535.
  - Cuber JC, Bernard G, Fushiki T, Bernard C, Yamanishi R, Sugimoto E, Chayvialle JA. Luminal. CCK-releasing factors in the isolated vascularly perfused rat duodenojejunum. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 1990;259:G191-G197.
  - Deacon CF, Johnsen AH, Holst JJ. Degradation of glucagon-like peptide-1 by human plasma *in vitro* yields an N-terminally truncated peptide that is a major endogenous metabolite *in vivo*. *J Clin Endocrinol Metab*. 1995;80:952-957.
  - Deacon CF, Pridal L, Klarskov L, Olesen M, Holst JJ. Glucagon-like peptide 1 undergoes differential tissue-specific metabolism in the anesthetized pig. *Am J Physiol*. 1996;271:E458-E464.
  - Deacon CF. What do we know about the secretion and degradation of incretin hormones? *Regul Pept*. 2004;128:117-124.
  - Dejgaard TF, Frandsen CS, Hansen TS, Almdal T, Urhammer S, Pedersen-Bjergaard U, Jensen T, Jensen AK, Holst JJ, Tarnow L, Knop FK, Madsbad S, Andersen HU.

- Efficacy and safety of liraglutide for overweight adult patients with type 1 diabetes and insufficient glycaemic control (Lira-1): a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2016;4(3):221-232.
- Demuth HU, McIntosh CH, Pederson RA. Type 2 diabetes-therapy with dipeptidyl peptidase IV inhibitors. *Biochim Biophys Acta* 2005;1751:33-44.
  - Devasthale P, Cheng D. Monoacylglycerol acyltransferase 2 (MGAT2) inhibitors for the treatment of metabolic diseases and nonalcoholic steatohepatitis (NASH). *J Med Chem.* 2018;61(22):9879-9888.
  - Drucker DJ, Nauck MA. The incretin system: glucagon-like peptide-1 receptor agonists and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in type 2 diabetes. *Lancet* 2006;368:1696-1705
  - Drucker DJ. The role of gut hormones in glucose homeostasis. *J Clin Invest.* 2007;117(1):24-32.
  - Dumoulin V, Moro F, Barcelo A, Dakka T, Cuber JC. Peptide YY, glucagon-like peptide-1, and neurotensin responses to luminal factors in the isolated vascularly perfused rat ileum. *Endocrinology* 1998;139:3780-3786.
  - Edfalk S, Steneberg P, Edlund H. GPR40 is expressed in enteroendocrine cells and mediates free fatty acid stimulation of incretin secretion. *Diabetes* 2008;57(9):2280-2287.
  - Eissele R, Göke R, Willemer S, Harthus HP, Vermeer H, Arnold R, Göke B. Glucagon-like peptide-1 cells in the gastrointestinal tract and pancreas of rat, pig and man. *Eur J Clin Invest* 1992;22:283-291.
  - Elliott RM, Morgan LM, Tredger JA, Deacon S, Wright J, Marks V. Glucagon-like peptide-1 (7-36)amide and glucose-dependent insulintropic polypeptide secretion in response to nutrient ingestion in man: acute post-prandial and 24-h secretion patterns. *J Endocrinol* 1993;138:159-166.
  - Flock G, Baggio LL, Longuet C, Drucker DJ. Incretin receptors for glucagon-like peptide 1 and glucose-dependent insulintropic polypeptide are essential for the sustained metabolic actions of vildagliptin in mice. *Diabetes* 2007;56:3006-3013.
  - Gentilella R, Bianchi C, Rossi A, Rotella CM. Exenatide: a review from pharmacology to clinical practice. *Diabetes Obes Metab.* 2009;11:544-556.
  - Giezenaar C, Lange K, Hausken T, Jones KL, Horowitz M, Chapman I, Soenen S. Acute effects of substitution, and addition, of carbohydrates and fat to protein on gastric emptying, blood glucose, gut hormones, appetite, and energy intake. *Nutrients.* 2018;10(10):1451.
  - Gillum MP, Zhang D, Zhang XM, Erion DM, Jamison RA, Choi C, Dong J, Shanabrough M, Duenas HR, Frederick DW, Hsiao JJ, Horvath TL, Lo CM, Tso P, Cline GW, Shulman GI. N-acylphosphatidylethanolamine, a gut-derived circulating factor induced by fat ingestion, inhibits food intake. *Cell* 2008;135(5):813-824.
  - Greenfield JR, Farooqi IS, Keogh JM, Henning E, Habib AM, Blackwood A, Reimann F, Holst JJ, Gribble FM. Oral glutamine increases circulating glucagon-like peptide 1, glucagon, and insulin concentrations in lean, obese, and type 2 diabetic subjects. *Am J Clin Nutr.* 2009;89:106–113.
  - Gunnarsson PT, Winzell MS, Deacon CF, Larsen MO, Jelic K, Carr RD, Ahrén B. Glucose-induced incretin hormone release and inactivation are differently modulated by oral fat and protein in mice. *Endocrinology* 2006;147:3173-3180.
  - Haas JT, Winter HS, Lim E, Kirby A, Blumenstiel B, DeFelice M, Gabriel S, Jalas C, Branski D, Grueter CA, Toporovski MS, Walther TC, Daly MJ, Farese RV Jr.

- DGAT1 mutation is linked to a congenital diarrheal disorder. *J Clin. Invest.* 2012;122:4680-4684.
- Hall WL, Millward DJ, Long SJ, Morgan LM. Casein and whey exert different effects on plasma amino acid profiles, gastrointestinal hormone secretion and appetite. *Br J Nutr.* 2003;89:239-248.
  - Han S, Hagan DL, Taylor JR, Xin L, Meng W, Biller SA, Wetterau JR, Washburn WN, Whaley JM. Dapagliflozin, a selective SGLT2 inhibitor, improves glucose homeostasis in normal and diabetic rats. *Diabetes* 2008;57(6):1723-1729.
  - Hankir MK, Seyfried F, Hintschich CA, Diep TA, Kleberg K, Kranz M, Deuther-Conrad W, Tellez LA, Rullmann M, Patt M, Teichert J, Hesse S, Sabri O, Brust P, Hansen HS, de Araujo IE, Krügel U, Fenske WK. Gastric bypass surgery recruits a gut PPAR- $\alpha$ -striatal D1R pathway to reduce fat appetite in obese rats. *Cell Metab.* 2017;25(2):335-344.
  - Hansen G, Jelsing J, Vrang N. Effects of liraglutide and sibutramine on food intake, palatability, body weight and glucose tolerance in the gubra DIO-rats. *Acta Pharmacol Sin.* 2012;33(2):194-200.
  - Hansen HS, Rosenkilde MM, Holst JJ, Schwartz TW. GPR119 as a fat sensor. *Trends Pharmacol Sci.* 2012;33(7):374-381.
  - Hansen L, Deacon CF, Orskov C, Holst JJ. Glucagon-like peptide-1-(7-36)amide is transformed to glucagon-like peptide-1-(9-36)amide by dipeptidyl peptidase IV in the capillaries supplying the L cells of the porcine intestine. *Endocrinology* 1999; 140:5356-5363.
  - Hassing HA, Engelstoft MS, Sichlau RM, Madsen AN, Rehfeld JF, Pedersen J, Jones RM, Holst JJ, Schwartz TW, Rosenkilde MM, Hansen HS. Oral 2-oleyl glyceryl ether improves glucose tolerance in mice through the GPR119 receptor. *Biofactors.* 2016; 42(6):665-673.
  - Hatanaka T, Inoue Y, Arima J, Kumagai Y, Usuki H, Kawakami K, Kimura M, Mukaihara T. Production of dipeptidyl peptidase IV inhibitory peptides from defatted rice bran. *Food Chem.* 2012;134(2):797-802.
  - Higuchi N, Hira T, Yamada N, Hara H. Oral administration of corn zein hydrolysate stimulates GLP-1 and GIP secretion and improves glucose tolerance in male normal rats and Goto-Kakizaki rats. *Endocrinology* 2013;154(9):3089-3098.
  - Hira T, Mochida T, Miyashita K, Hara H. GLP-1 secretion is enhanced directly in the ileum but indirectly in the duodenum by a newly identified potent stimulator, zein hydrolysate, in rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2009;297:G663-G671.
  - Hira T, Pinyo J, Hara H. What is GLP-1 really doing in obesity? *Trends Endocrinol Metab.* 2020;31(2):71-80.
  - Hirasawa A, Tsumaya K, Awaji T, Katsuma S, Adachi T, Yamada M, Sugimoto Y, Miyazaki S, Tsujimoto G. Free fatty acids regulate gut incretin glucagon-like peptide-1 secretion through GPR120. *Nat Med.* 2005;11(1):90-94.
  - Holst JJ, Vilsbøll T, Deacon CF. The incretin system and its role in type 2 diabetes mellitus. *Mol Cell Endocrinol.* 2009;297:127-36.
  - Holst JJ. The physiology of glucagon-like peptide 1. 2007 *Physiol Rev.* 87:1409-1439.
  - Husted AS, Trauelsen M, Rudenko O, Hjorth SA, Schwartz TW. GPCR-mediated signaling of metabolites. *Cell Metab.* 2017;25(4):777-796.
  - Hutchison AT, Piscitelli D, Horowitz M, Jones KL, Clifton PM, Standfield S,

- Hausken T, Feinle-Bisset C, Luscombe-Marsh ND. Acute load-dependent effects of oral whey protein on gastric emptying, gut hormone release, glycemia, appetite, and energy intake in healthy men. *Am J Clin Nutr*. 2015;102(6):1574-1584.
- Hwa JJ, Fawzi AB, Graziano MP, Ghibaudi L, Williams P, Van Heek M, Davis H, Rudinski M, Sybertz E, Strader CD. Leptin increases energy expenditure and selectively promotes fat metabolism in ob/ob mice. *Am J Physiol*. 1997;272(4 Pt 2):R1204-1209.
  - Ishikawa Y, Hira T, Inoue D, Harada Y, Hashimoto H, Fujii M, Kadowaki M, Hara H. Rice protein hydrolysates stimulate GLP-1 secretion, reduce GLP-1 degradation, and lower the glycemic response in rats. *Food Funct*. 2015;6(8):2525-34.
  - Iwasaki Y, Sendo M, Dezaki K, Hira T, Sato T, Nakata M, Goswami C, Aoki R, Arai T, Kumari P, Hayakawa M, Masuda C, Okada T, Hara H, Drucker DJ, Yamada Y, Tokuda M, Yada T. GLP-1 release and vagal afferent activation mediate the beneficial metabolic and chronotherapeutic effects of D-allulose. *Nat Commun*. 2018;9(1):113.
  - Jakubowicz D, Froy O, Ahrén B, Boaz M, Landau Z, Bar-Dayana Y, Ganz T, Barnea M, Wainstein J. Incretin, insulinotropic and glucose-lowering effects of whey protein pre-load in type 2 diabetes: a randomised clinical trial. *Diabetologia*. 2014;57(9):1807-1811.
  - Janssen S, Depoortere I. Nutrient sensing in the gut: new roads to therapeutics? *Trends Endocrinol Metab*. 2013;24(2):92-100.
  - Jimbo T, Inagaki A, Imura T, Sekiguchi S, Nakamura Y, Fujimori K, Miyagawa J, Ohuchi N, Satomi S, Goto M. A novel resting strategy for improving islet engraftment in the liver. *Transplantation* 2014;97(3):280-286.
  - Johnson PM, Kenny PJ. Dopamine D2 receptors in addiction-like reward dysfunction and compulsive eating in obese rats. *Nat Neurosci*. 2010;13(5):635-641.
  - Kahn SE, Hull RL, Utzschneider KM. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature* 2006;444(7121):840-846.
  - Kaku K, Sumino S, Katou M, Nishiyama Y, Kinugawa Y. Randomized, double-blind, phase III study to evaluate the efficacy and safety of once-daily treatment with alogliptin and metformin hydrochloride in Japanese patients with type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab*. 2017;19(3):463-467.
  - Karl T, Chwalisz WT, Wedekind D, Hedrich HJ, Hoffmann T, Jacobs R, Pabst R, von Hörsten S. Localization, transmission, spontaneous mutations, and variation of function of the *Dpp4* (Dipeptidyl-peptidase IV; CD26) gene in rats. *Regul Pept*. 2003;115:81-90.
  - Kayden HJ, Senior JR, Mattson FH. The monoglyceride pathway of fat absorption in man. *J Clin Invest*. 1967;46(11):1695-1703.
  - Kieffer TJ, McIntosh CHS, Pederson RA. Degradation of glucose-dependent insulinotropic polypeptide and truncated glucagon-like peptide 1 *in vitro* and *in vivo* by dipeptidyl peptidase IV. *Endocrinology* 1995;136:3585-3596.
  - Kieffer TJ, Woltjen K, Osafune K, Yabe D, Inagaki N. Beta-cell replacement strategies for diabetes. *J Diabetes Investig* 2018;9(3):457-463.
  - Kieffer TJ. Closing in on Mass Production of Mature Human Beta Cells. *Cell Stem Cell* 2016;18(6):699-702.
  - Kleberg K, Jacobsen AK, Ferreira JG, Windeløv JA, Rehfeld JF, Holst JJ, de Araujo IE, Hansen HS. Sensing of triacylglycerol in the gut: different mechanisms for fatty acids and 2-monoacylglycerol. *J Physiol*. 2015;593(8):2097-2109.

- Knudsen L, Hansen BF, Jensen P, Pedersen TÅ, Vestergaard K, Schäffer L, Blagoev B, Oleksiewicz MB, Kiselyov VV, De Meyts P. Agonism and antagonism at the insulin receptor. *PLoS One*. 2012;7(12):e51972.
- Kroon E, Martinson LA, Kadoya K, Bang AG, Kelly OG, Eliazer S, Young H, Richardson M, Smart NG, Cunningham J, Agulnick AD, D'Amour KA, Carpenter MK, Baetge EE. Pancreatic endoderm derived from human embryonic stem cells generates glucose-responsive insulin-secreting cells *in vivo*. *Nat Biotechnol* 2008;26(4):443-452.
- Kunisada Y. Method for proliferation of pancreatic progenitor cells. Publication number US20170233700A1.
- Latres E, Finan DA, Greenstein JL, Kowalski A, Kieffer TJ. Navigating two roads to glucose normalization in diabetes: automated insulin delivery devices and cell therapy. *Cell Metab* 2019;29(3):545-563.
- Laugerette F, Passilly-Degrace P, Patris B, Niot I, Febbraio M, Montmayeur JP, Besnard P. CD36 involvement in orosensory detection of dietary lipids, spontaneous fat preference, and digestive secretions. *J Clin Invest*. 2005;115(11):3177-3184.
- Lin M, Zhao S, Shen L, Xu D. Potential approaches to ameliorate hepatic fat accumulation seen with MTP inhibition. *Drug Saf*. 2014;37:213-224.
- Lovshin JA, Drucker DJ. Incretin-based therapies for type 2 diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol*. 2009;5:262-269.
- Lu SS, Yu YL, Zhu HJ, Liu XD, Liu L, Liu YW, Wang P, Xie L, Wang GJ. Berberine promotes glucagon-like peptide-1 (7-36) amide secretion in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Endocrinol*. 2009;200:159-165.
- Lyttle BM, Li J, Krishnamurthy M, Fellows F, Wheeler MB, Goodyer CG, Wang R. Transcription factor expression in the developing human fetal endocrine pancreas. *Diabetologia*. 2008;51(7):1169-1180.
- Mancini MC, Halpern A. Orlistat in the prevention of diabetes in the obese patient. *Vasc Health Risk Man*. 2008;4(2):325-336.
- McCreight LJ, Bailey CJ, Pearson ER. Metformin and the gastrointestinal tract. *Diabetologia*. 2016;59(3):426-35.
- McCrimmon RJ, Henry RR. SGLT inhibitor adjunct therapy in type 1 diabetes. *Diabetologia* 2018;61(10):2126-2133.
- Migoya EM, Bergeron R, Miller JL, Snyder RN, Tanen M, Hilliard D, Weiss B, Larson P, Gutierrez M, Jiang G, Liu F, Pryor KA, Yao J, Zhu L, Holst JJ, Deacon C, Herman G, Thornberry N, Amatruda J, Williams-Herman D, Wagner JA, SinhaRoy R. Dipeptidyl peptidase-4 inhibitors administered in combination with metformin result in an additive increase in the plasma concentration of active GLP-1. *Clin Pharmacol Ther*. 2010;88(6):801-808.
- Miller KM, Foster NC, Beck RW, Bergenstal RM, DuBose SN, DiMeglio LA, Maahs DM, Tamborlane WV; T1D Exchange Clinic Network. Current state of type 1 diabetes treatment in the U.S.: updated data from the T1D Exchange clinic registry. *Diabetes Care*. 2015;38(6):971-978.
- Mortensen K, Christensen LL, Holst JJ, Orskov C. GLP-1 and GIP are colocalized in a subset of endocrine cells in the small intestine. *Regul Pept*. 2003;114:189-196.
- Mul JD, Begg DP, Haller AM, Pressler JW, Sorrell J, Woods SC, Farese RV Jr, Seeley RJ, Sandoval DA. MGAT2 deficiency and vertical sleeve gastrectomy have independent metabolic effects in the mouse. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2014;307(11):E1065-1072.

- Müller TD, Finan B, Bloom SR, D'Alessio D, Drucker DJ, Flatt PR, Fritsche A, Gribble F, Grill HJ, Habener JF, Holst JJ, Langhans W, Meier JJ, Nauck MA, Perez-Tilve D, Pocai A, Reimann F, Sandoval DA, Schwartz TW, Seeley RJ, Stemmer K, Tang-Christensen M, Woods SC, DiMarchi RD, Tschöp MH. Glucagon-like peptide 1 (GLP-1). *Mol Metab.* 2019;30:72-130.
- Münzberg H, Laque A, Yu S, Rezai-Zadeh K, Berthoud HR. Appetite and body weight regulation after bariatric surgery. *Obes Rev.* 2015;16 Suppl 1:77-90.
- Nakabayashi H, Nishizawa M, Nakagawa A, Takeda R, Nijima A. Vagal hepatopancreatic reflex effect evoked by intraportal appearance of tGLP-1. *Am J Physiol.* 1996;271:E808-E813.
- Nakagami T, DECODA Study Group. Hyperglycaemia and mortality from all causes and from cardiovascular disease in five populations of Asian origin. *Diabetologia* 2004;47(3):385-394.
- Nakamura T, Fujikura J, Inagaki N. Advancements in transplantation therapy for diabetes: Pancreas, islet and stem cell. *J Diabetes Investig.* 2020. doi: 10.1111/jdi.13358. Online ahead of print.
- Nauck MA, Sauerwald A, Ritzel R, Holst JJ, Schmiegel W. Influence of glucagon-like peptide 1 on fasting glycemia in type 2 diabetic patients treated with insulin after sulfonylurea secondary failure. *Diabetes Care* 1998;21:1925-1931.
- Neary NM, Small CJ, Druce MR, Park AJ, Ellis SM, Semjonous NM, Dakin CL, Filipsson K, Wang F, Kent AS, Frost GS, Ghatei MA, Bloom SR. Peptide YY3-36 and glucagon-like peptide-17-36 inhibit food intake additively. *Endocrinology.* 2005;146(12):5120-5127.
- Neves AC, Harnedy PA, O'Keeffe MB, FitzGerald RJ. Bioactive peptides from Atlantic salmon (*Salmo salar*) with angiotensin converting enzyme and dipeptidyl peptidase IV inhibitory, and antioxidant activities. *Food Chem.* 2017;218:396-405.
- Nongonierma AB, FitzGerald RJ. Structure activity relationship modelling of milk protein-derived peptides with dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) inhibitory activity. *Peptides.* 2016;79:1-7.
- Nostro MC, Sarangi F, Yang C, Holland A, Elefanty AG, Stanley EG, Greiner DL, Keller G. Efficient generation of NKX6-1<sup>+</sup> pancreatic progenitors from multiple human pluripotent stem cell lines. *Stem Cell Reports* 2015;4(4):591-604.
- Okuma C, Ohta T, Tadaki H, Hamada H, Oda T, Taniuchi H, Yamanaka K, Ishii Y, Ohe Y, Yata S, Nishiu J, Aratsu Y, Oshida S, Kume S, Kakutani M. JTP-103237, a novel monoacylglycerol acyltransferase inhibitor, modulates fat absorption and prevents diet-induced obesity. *Eur J Pharmacol.* 2015;758:72-81.
- Padwal RS, Majumdar SR. Drug treatments for obesity: orlistat, sibutramine, and rimonabant. *Lancet.* 2007;369(9555):71-77.
- Pagliuca FW, Millman JR, Gürtler M, Segel M, Van Dervort A, Ryu JH, Peterson QP, Greiner D, Melton DA. Generation of functional human pancreatic  $\beta$  cells *in vitro*. *Cell* 2014;159(2):428-439.
- Parker HE, Habib AM, Rogers GJ, Gribble FM, Reimann F. Nutrient-dependent secretion of glucose-dependent insulinotropic polypeptide from primary murine K cells. *Diabetologia* 2008;52:289-298.
- Phan CT, Tso P. Intestinal lipid absorption and transport. *Front Biosci.* 2001;6:D299-319.
- Ptasznik A, Beattie GM, Mally MI, Cirulli V, Lopez A, Hayek A. Phosphatidylinositol 3-kinase is a negative regulator of cellular differentiation. *J Cell*

- Biol. 1997;137(5):1127-1136.
- Puzziferri N, Roshek TB 3rd, Mayo HG, Gallagher R, Belle SH, Livingston EH. Long-term follow-up after bariatric surgery: a systematic review. *JAMA* 2014;312(9):934-942.
  - Rahfeld J, Schierhorn M, Hartrodt B, Neubert K, Heins J. Are diprotin A (Ile-Pro-Ile) and diprotin B (Val-Pro-Leu) inhibitors or substrates for dipeptidyl peptidase IV? *Biochim Biophys Acta* 1991;1076:314-316.
  - Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC Jr. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr.* 1993;123:1939-1951.
  - Reimer RA. Meat hydrolysate and essential amino acid-induced glucagon-like peptide-1 secretion, in the human NCI-H716 enteroendocrine cell line, is regulated by extracellular signal-regulated kinase1/2 and p38 mitogen-activated protein kinases. *J Endocrinol.* 2006;191:159-170.
  - Rezanian A, Bruin JE, Arora P, Rubin A, Batushansky I, Asadi A, O'Dwyer S, Quiskamp N, Mojibian M, Albrecht T, Yang YH, Johnson JD, Kieffer TJ. Reversal of diabetes with insulin-producing cells derived *in vitro* from human pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol* 2014;32(11):1121-1133.
  - Rezanian A, Bruin JE, Riedel MJ, Mojibian M, Asadi A, Xu J, Gauvin R, Narayan K, Karanu F, O'Neil JJ, Ao Z, Warnock GL, Kieffer TJ. Maturation of human embryonic stem cell-derived pancreatic progenitors into functional islets capable of treating pre-existing diabetes in mice. *Diabetes* 2012;61(8):2016-2029.
  - Ritter K, Buning C, Halland N, Pöverlein C, Schwink L. G protein-coupled receptor 119 (GPR119) agonists for the treatment of diabetes: recent progress and prevailing challenges. *J Med Chem.* 2016;59(8):3579-3592.
  - Rodgers RJ, Tschöp MH, Wilding JP. Anti-obesity drugs: past, present and future. *Dis Model Mech.* 2012;5(5):621-626.
  - Rodríguez de Fonseca F, Navarro M, Gómez R, Escuredo L, Nava F, Fu J, Murillo-Rodríguez E, Giuffrida A, LoVerme J, Gaetani S, Kathuria S, Gall C, Piomelli D. An anorexic lipid mediator regulated by feeding. *Nature* 2001;414(6860):209-212.
  - Russ HA, Parent AV, Ringler JJ, Hennings TG, Nair GG, Shveygert M, Guo T, Puri S, Haataja L, Cirulli V, Blelloch R, Szot GL, Arvan P, Hebrok M. Controlled induction of human pancreatic progenitors produces functional beta-like cells *in vitro*. *EMBO J* 2015;34(13):1759-1772.
  - Saber N, Bruin JE, O'Dwyer S, Schuster H, Rezanian A, Kieffer TJ. Sex differences in maturation of human embryonic stem cell-derived  $\beta$  cells in mice. *Endocrinology* 2018;159(4):1827-1841.
  - Saito A, Imai S, Htun NC, Okada E, Yoshita K, Yoshiike N, Takimoto H. The trends in total energy, macronutrients and sodium intake among Japanese: findings from the 1995-2016 National Health and Nutrition Survey. *Br J Nutr.* 2018;120(4):424-434.
  - Sato K, Kitazaki T, Takahagi H, Kubo O, Yoshikawa T, Hidaka K, Morimoto S, Takai T, Okamoto R, Kamaura M, Sasaki M, Ishii N. Sulfonamide compound. Patent JP 2018-52818 A.
  - Sato K, Takahagi H, Kubo O, Hidaka K, Yoshikawa T, Kamaura M, Nakakariya M, Amano N, Adachi R, Maki T, Take K, Takekawa S, Kitazaki T, Maekawa T. Optimization of a novel series of N-phenylindoline-5-sulfonamide-based acyl CoA:monoacylglycerol acyltransferase-2 inhibitors: Mitigation of CYP3A4 time-dependent inhibition and phototoxic liabilities. *Bioorg Med Chem.*



- 2015;23(15):4544-4560.
- Seymour PA, Freude KK, Tran MN, Mayes EE, Jensen J, Kist R, Scherer G, Sander M. SOX9 is required for maintenance of the pancreatic progenitor cell pool. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2017;104:1865-1870.
  - Shapiro AM, Lakey JR, Ryan EA, Korbutt GS, Toth E, Warnock GL, Kneteman NM, Rajotte RV. Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *N Engl J Med* 2000;343(4):230-8.
  - Shi Y, Cheng D. Beyond triglyceride synthesis: the dynamic functional roles of MGAT and DGAT enzymes in energy metabolism. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2009;297 (1):E10-18.
  - Shimizu Y, Hara H, Hira T. Glucagon-like peptide-1 response to whey protein is less diminished by dipeptidyl peptidase-4 in comparison with responses to dextrin, a lipid and casein in rats. *Br J Nutr.* 2020;1-10.
  - Shimizu Y, Son C, Aotani D, Nomura H, Hikida T, Hosoda K, Nakao K. Role of leptin in conditioned place preference to high-fat diet in leptin-deficient ob/ob mice. *Neurosci Lett.* 2017;640:60-63.
  - Sofogianni A, Tziomalos K. Oral Semaglutide, A new option in the management of type 2 diabetes mellitus: A Narrative Review. *Adv Ther.* 2020;37(10):4165-4174.
  - Strader AD, Clausen TR, Goodin SZ, Wendt D. Ileal Interposition Improves Glucose Tolerance in Low Dose Streptozotocin-treated Diabetic and Euglycemic Rats. *Obes Surg.* 2009;19:96-104.
  - Svane MS, Jørgensen NB, Bojsen-Møller KN, Dirksen C, Nielsen S, Kristiansen VB, Toräng S, Wewer Albrechtsen NJ, Rehfeld JF, Hartmann B, Madsbad S, Holst JJ. Peptide YY and glucagon-like peptide-1 contribute to decreased food intake after Roux-en-Y gastric bypass surgery. *Int J Obes (Lond).* 2016;40(11):1699-1706.
  - Swinburn BA, Sacks G, Hall KD, McPherson K, Finegood DT, Moodie ML, Gortmaker SL. The global obesity pandemic: shaped by global drivers and local environments. *Lancet* 2011;378(9793):804-814.
  - Taga Y, Hayashida O, Kusubata M, Ogawa-Goto K, Hattori S. Production of a novel wheat gluten hydrolysate containing dipeptidyl peptidase-IV inhibitory tripeptides using ginger protease. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2017;81(9):1823-1828.
  - Take K, Mochida T, Maki T, Satomi Y, Hirayama M, Nakakariya M, Amano N, Adachi R, Sato K, Kitazaki T, Takekawa S. Pharmacological inhibition of monoacylglycerol *O*-acyltransferase 2 improves hyperlipidemia, obesity, and diabetes by change in intestinal fat utilization. *PLoS One* 2016;11(3):e0150976.
  - Tanaka-Amino K, Matsumoto K, Hatakeyama Y, Shima I, Takakura S, Muto S. ASP4000, a novel, selective, dipeptidyl peptidase 4 inhibitor with antihyperglycemic activity. *Eur J Pharmacol.* 2008;590:444-449.
  - Tellez LA, Medina S, Han W, Ferreira JG, Licona-Limón P, Ren X, Lam TT, Schwartz GJ, de Araujo IE. A gut lipid messenger links excess dietary fat to dopamine deficiency. *Science* 2013;341(6147):800-802.
  - Thaler JP, Cummings DE. Minireview: Hormonal and metabolic mechanisms of diabetes remission after gastrointestinal surgery. *Endocrinology* 2009;150(6):2518-2525.
  - Thomas C, Gioiello A, Noriega L, Strehle A, Oury J, Rizzo G, Macchiarulo A, Yamamoto H, Matakı C, Pruzanski M, Pellicciari R, Auwerx J, Schoonjans K. TGR5-mediated bile acid sensing controls glucose homeostasis. *Cell Metab.*

- 2009;10: 167-177.
- Tolhurst G, Reimann F, Gribble FM. Nutritional regulation of glucagon-like peptide-1 secretion. *J Physiol*. 2009;587:27-32.
  - Tominaga M, Eguchi H, Manaka H, Igarashi K, Kato T, Sekikawa A. Impaired glucose tolerance is a risk factor for cardiovascular disease, but not impaired fasting glucose. The Funagata Diabetes Study. *Diabetes Care* 1999;22(6):920-924.
  - Toyoda T, Mae S, Tanaka H, Kondo Y, Funato M, Hosokawa Y, Sudo T, Kawaguchi Y, Osafune K. Cell aggregation optimizes the differentiation of human ESCs and iPSCs into pancreatic bud-like progenitor cells. *Stem Cell Res* 2015;14(2):185-197.
  - Trevaskis JL, Griffin PS, Wittmer C, Neuschwander-Tetri BA, Brunt EM, Dolman CS, Erickson MR, Napora J, Parkes DG, Roth JD. Glucagon-like peptide-1 receptor agonism improves metabolic, biochemical, and histopathological indices of nonalcoholic steatohepatitis in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2012;302(8):G762-772.
  - Tseng CC, Zhang XY, Wolfe MM. Effect of GIP and GLP-1 antagonists on insulin release in the rat. *Am J Physiol*. 1999;276: E1049-E1054.
  - Tsuchida T, Fukuda S, Aoyama H, Taniuchi N, Ishihara T, Ohashi N, Sato H, Wakimoto K, Shiotani M, Oku A. MGAT2 deficiency ameliorates high-fat diet-induced obesity and insulin resistance by inhibiting intestinal fat absorption in mice. *Lipids Health Dis*. 2012;11:75
  - Tulipano G, Sibilio V, Caroli AM, Cocchi D. Whey proteins as source of dipeptidyl dipeptidase IV (dipeptidyl peptidase-4) inhibitors. *Peptides*. 2011;32(4):835-838.
  - Ueno H, Ito R, Abe SI, Ookawara M, Miyashita H, Ogino H, Miyamoto Y, Yoshihara T, Kobayashi A, Tsujihata Y, Takeuchi K, Watanabe M, Yamada Y, Maekawa T, Nishigaki N, Moritoh Y. SCO-267, a GPR40 full agonist, improves glycemic and body weight control in rat models of diabetes and obesity. *J Pharmacol Exp Ther*. 2019;370(2):172-181.
  - Ullrich J, Ernst B, Wilms B, Thurnheer M, Schultes B. Roux-en Y gastric bypass surgery reduces hedonic hunger and improves dietary habits in severely obese subjects. *Obes Surg*. 2013;23(1):50-55.
  - Veres A, Faust AL, Bushnell HL, Engquist EN, Kenty JH, Harb G, Poh YC, Sintov E, Gürtler M, Pagliuca FW, Peterson QP, Melton DA. Charting cellular identity during human *in vitro*  $\beta$ -cell differentiation. *Nature* 2019;569(7756):368-373.
  - Wang B, Chandrasekera PC, Pippin JJ. Leptin- and leptin receptor-deficient rodent models: relevance for human type 2 diabetes. *Curr Diabetes Rev*. 2014;10(2):131-145.
  - Ward ZJ, Bleich SN, Cradock AL, Barrett JL, Giles CM, Flax C, Long MW, Gortmaker SL. Projected U.S. State-level prevalence of adult obesity and severe obesity. *N Engl J Med*. 2019;381(25):2440-2450.
  - Wellner N, Diep TA, Janfelt C, Hansen HS. N-acylation of phosphatidylethanolamine and its biological functions in mammals. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1831(3):652-662.
  - Yamashita-Sugahara Y, Matsumoto M, Ohtaka M, Nishimura K, Nakanishi M, Mitani K, Okazaki Y. An inhibitor of fibroblast growth factor receptor-1 (FGFR1) promotes late-stage terminal differentiation from NGN3<sup>+</sup> pancreatic endocrine progenitors. *Sci Rep*. 2016;6:35908.
  - Yen CL, Cheong ML, Grueter C, Zhou P, Moriwaki J, Wong JS, Hubbard B, Marmor S, Farese RV Jr. Deficiency of the intestinal enzyme acyl CoA: monoacylglycerol

- acyltransferase-2 protects mice from metabolic disorders induced by high-fat feeding. *Nat Med.* 2009;15(4):442-446.
- Youn JH. Fat sensing and metabolic syndrome. *Rev Endocr Metab Disord.* 2014;15(4):263-75.
  - Yu F, Wei R, Yang J, Liu J, Yang K, Wang H, Mu Y, Hong T. FoxO1 inhibition promotes differentiation of human embryonic stem cells into insulin producing cells. *Exp Cell Res.* 2018;362(1):227-234.
  - Zhu L, Chen J, Tang X, Xiong YL. Reducing, radical scavenging, and chelation properties of *in vitro* digests of alcalase-treated zein hydrolysate. *J Agric Food Chem.* 2008;56:2714-2721.
  - Zhu L, She ZG, Cheng X, Qin JJ, Zhang XJ, Cai J, Lei F, Wang H, Xie J, Wang W, Li H, Zhang P, Song X, Chen X, Xiang M, Zhang C, Bai L, Xiang D, Chen MM, Liu Y, Yan Y, Liu M, Mao W, Zou J, Liu L, Chen G, Luo P, Xiao B, Zhang C, Zhang Z, Lu Z, Wang J, Lu H, Xia X, Wang D, Liao X, Peng G, Ye P, Yang J, Yuan Y, Huang X, Guo J, Zhang BH, Li H. Association of blood glucose control and outcomes in patients with COVID-19 and pre-existing type 2 diabetes. *Cell Metab.* 2020;31(6):1068-1077.
  - Zoso A, Serafini P, Lanzoni G, Peixoto E, Messinger S, Mantero A, Padilla-Télez ND, Baidal DA, Alejandro R, Ricordi C, Inverardi L. G-CSF and exenatide might be associated with increased long-term survival of allogeneic pancreatic islet grafts. *PLoS One.* 2016;11(6):e0157245.
  - 国際糖尿病連合「糖尿病アトラス第9版」2019.